

DETERMINACIÓN DE HIERRO Y MANGANESO EN YERBA MATE MEDIANTE TÉCNICAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS

ANA FLÓ, MATÍAS MOLNAR, LEILA SALEH

La yerba mate es una planta muy popular en la región de Argentina, Uruguay, Brasil y Paraguay, de la cual se han encontrado muchas características beneficiosas para la salud (**). El objetivo de este trabajo es poder determinar mediante técnicas espectrofotométricas sencillas el contenido de los oligoelementos hierro y manganeso en la yerba mate comercial y sus respectivos extractos.

Objetivos:

- Determinación del contenido de Fe y Mn en la yerba mate (*Ilex paraguariensis*) y extractos.
- Comparación de los resultados entre dos marcas de distinto origen.
- Análisis de cómo influye la presencia del palo en la yerba respecto de la cantidad de Fe y Mn y de la facilidad de su extracción con agua caliente.

Introducción:

El sistema de estudio de este trabajo es la yerba mate (*Ilex paraguariensis*). Se trata de una planta, con la que se prepara una infusión de amplio consumo en países como Argentina, Paraguay, Uruguay y Brasil. La planta es sometida a un proceso de secado, luego una primera trituración, un período de estacionamiento, la molienda y por último el envasado. La yerba puede ser mezclada con fragmentos de ramas secas y jóvenes. El producto se comercializa en paquetes de un cuarto, medio, uno o dos kilos.

Existen varias formas de preparación de la infusión, las principales son mate cebado, tereré y mate cocido.

Dado que las cantidades de metales en la planta pueden variar de acuerdo a la zona geográfica, tipo de suelo, forma de cultivo, etc., se eligieron dos marcas de yerba de distinto origen: Taragüí, producida en el establecimiento las Marías en la provincia de Corrientes, y Nobleza Gaucha, producida en la localidad de San José, provincia de Misiones. De esta forma se busca lograr una evaluación de dicha variación.

La cantidad de metales en el extracto también es muy variable, dependiendo de las condiciones de extracción: tiempo de infusión, temperatura, volumen de agua utilizada y número de extracciones. Se eligió trabajar realizando una extracción muy similar a la que se realiza al preparar un mate cocido, debido a la simplicidad de este método y a que permite un control mucho mejor de todas estas variables.

Para cuantificar los metales en un extracto, se determinó primero su concentración en una muestra de yerba antes de ser utilizada y luego se tomó otra muestra igual a la que se le hizo un extracto con agua caliente y se determinó el contenido de los metales mediante la misma técnica y tratamiento, para luego por diferencia, saber cuánto fue la cantidad extraída. Esto presentaba una ventaja importante, ya que permite trabajar siempre con una misma técnica, y no tener que utilizar procedimientos distintos para la cuantificación en yerba (sólido) y extracto (líquido); lo cual conlleva también una disminución de cualquier error sesgado, ya que el contenido de metales en extracto se determina por diferencia.

Previamente a la determinación cuantitativa de los metales se realizaron una serie de ensayos cualitativos sobre el extracto, para confirmar el contenido de Fe y Mn en él.

Ambos metales fueron determinados por colorimetría utilizando un espectrofotómetro. En el caso del Mn se realizó también una determinación por absorción atómica como método de control.

Materiales, técnicas y desarrollo experimental:

Ensayos cualitativos sobre el extracto

El extracto realizado con agua monodestilada presentaba un color marrón verdoso bastante oscuro. Se midió el pH con cintas de papel graduadas en media unidad y se determinó un valor entre 5,0 y 5,5.

Debido a la presencia de gran cantidad de sustancias orgánicas, la mayor parte de los ensayos de rutina fueron negativos (KSCN y o-fenantrolina para Fe, NaBiO₃ para Mn, NH₃ para cobre). Se debió hacer un tratamiento previo de oxidación con Agua Regia y/o Ácido Nítrico concentrado y luego proceder con estos ensayos. Después de este tratamiento, los ensayos con KSCN dieron positivo, indicando la presencia de Fe, y el agregado de NaBiO₃ dio una solución con un leve color violeta, confirmando la presencia de Mn.

Muestreo

Se trabajó con un total de 8 muestras:

Muestra	Rótulo
Taragüf sin palo seca	TSS
Taragüf sin palo húmeda	TSH
Taragüf con palo seca	TCS
Taragüf con palo húmeda	TCH
Nobleza sin palo seca	NSS
Nobleza sin palo húmeda	NSH
Nobleza con palo seca	NCS
Nobleza con palo húmeda	NCH

Tabla 1. Muestras utilizadas.

En todos los casos se pesó una masa de yerba seca de entre 25 y 30 g, utilizándose una balanza semimicro. Las muestras mencionadas como húmedas son aquellas a las que antes de disgregarlas se les realizó una extracción.

Extracción

Se colocó la yerba en un vaso de precipitados de 500 ml y se añadieron 250 ml de agua monodestilada a 70°C. Se dejó reposar durante 5 minutos y a continuación se filtró utilizando trampa de vacío.

Luego se siguió el mismo procedimiento para todas las muestras.

Tratamiento de la muestra

Las distintas muestras de yerba se calcinaron primeramente en una cápsula de porcelana con mechero Mecker hasta obtener cenizas de color gris con cierto tono violáceo. Luego se trataron con aproximadamente 16 mL de ácido nítrico, agregándolo en pequeñas porciones y calentando luego de cada adición, para eliminar la materia orgánica restante. Una vez que dejaron de desprenderse humos blancos se agregaron aproximadamente 5 mL de ácido perclórico también en frío. Finalmente se calentó para eliminar los posibles residuos orgánicos, hasta que dejaron de salir vapores blancos (Ver **notas de seguridad**). Se obtuvo así un sólido marrón blanquecino violáceo, que se disolvió en 50 ml de HCl (1+2) y se calentó a ebullición hasta obtener una solución amarilla, con un precipitado blanco en el fondo (algunas muestras tenían finas partículas de carbón).

A continuación se trasvasó a un vaso de precipitados de 500 ml, se llevó a un volumen de aproximadamente 400 ml y se calentó ligeramente, lográndose la disolución de una porción importante del precipitado blanco.

Luego se procedió a filtrar la solución utilizando papel banda negra; el filtrado se recogió en matraces de 500 mL y el precipitado se lavó con HCl (1+2), comprobándose la ausencia de Fe(III) por resultados negativos con KSCN. También se hicieron ensayos con NaBiO₃ para confirmar la ausencia de Mn, dando negativo desde el primer caso, por lo que posteriormente no se volvió a realizar. Finalmente se llevó a volumen en matraces de 500 ml con agua destilada, y luego se guardaron en frascos de plástico, salvo las muestras TCH y NCH. Todas las determinaciones se realizaron a partir de esta disolución (solución A).

El precipitado blanco obtenido (con restos de carbón no oxidado) resultó soluble en ácido fluorhídrico, en base a esto y a las cantidades de silicio reportadas en otros trabajos¹, se asumió que se trataba de óxido de silicio. Ensayos con

KSCN y NaBiO₃ sobre él, dieron resultados negativos para la presencia de Fe y Mn respectivamente.

En las soluciones obtenidas se realizaron ensayos con o-fenantrolina y KSCN confirmando que todo el Fe se oxidó durante el tratamiento a Fe(III).

Determinación de hierro

Se determina espectrofotométricamente, midiendo la absorbancia del complejo rojo Fe(SCN)₆³⁻. El barrido del espectro de una solución de dicho complejo mostró que su máximo de absorbancia se encontraba a los 474 nm. Todas las mediciones de absorbancia posteriores se realizaron a dicha longitud de onda.

Se realizó una curva de calibración usando patrones preparados a partir de una solución de 1000 ppm en Fe(III).

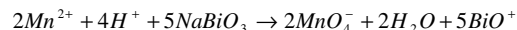
Se hicieron diferentes diluciones, preparándose patrones con una concentración final de entre 0,8 y 6 ppm en matraces de 25, 50 y 100 ml. A cada uno se le agregó 1, 2 y 4 ml de HNO₃ (1:100), y 3, 5 y 10 ml de KSCN (más de 500 veces la concentración de Fe reportada en la bibliografía). Se preparó un blanco con la misma cantidad de HNO₃ y KSCN, y se midió la absorbancia de cada patrón seteando previamente el blanco como cero.

Para la determinación en las muestras, se tomaron 10 ml de cada una, de la solución A y se colocaron en un matraz de 25 ml junto con 1 ml de HNO₃ (1:100) y 4 ml de KSCN 0,6M. Luego se midió su absorbancia.

Se realizó también una fallida determinación por agregado patrón con el objetivo de lograr una validación de los resultados obtenidos, pero la forma en que se hizo no fue correcta: en cuatro matraces de 25 ml se colocaron 5 ml de muestra, 1 ml de HNO₃ (1:100) y 4 ml de KSCN 0,6 M en cada uno, luego se agregaron 0, 2, 4 y 5 ml de una solución patrón de 10 ppm en Fe (III) a los distintos matraces, y se enrasó con agua (el error fue éste, se debería haber enrasado con la misma muestra, y haberse utilizado matraces de mayor capacidad).

Determinación de manganeso

Luego del tratamiento realizado a las muestras, el Mn presente se encuentra como Mn (II). Para su determinación se realizó una espectrofotometría de la especie MnO₄⁻ para lo cual previamente se procedió a oxidarlo con bismutato de sodio.

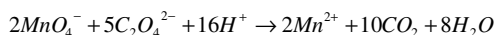


Para determinar la longitud de onda de trabajo se barrió el espectro de una solución de KMnO₄, de donde se obtuvo un valor de longitud de onda máximo a los 526 nm.

Se colocaron 2 mL de solución A de cada yerba en distintos tubos de hemólisis y 1 mL de HNO₃ para evitar la posible comproporción de Mn (II) y (VII) a dióxido de manganeso. Luego se agregó exceso de bismutato de sodio para asegurarse la máxima oxidación del Mn (II). A continuación se centrifugó y de allí se extrajo 1 mL de muestra que se llevó a volumen en matraces de 25 y 50 ml.

Los patrones utilizados para la curva de calibración se prepararon a partir de una solución de permanganato de potasio. Tal solución se obtuvo disolviendo 0,0508 g. de KMnO₄ en un matraz de 250 mL llevando a volumen con agua destilada.

La solución madre de permanganato de potasio se tituló con Na₂C₂O₄.



Para ello se pesaron 0,0616 g de $Na_2C_2O_4$, patrón primario y se llevó a 100 ml. Se tomaron 10 ml de dicha solución y se colocaron en un erlenmeyer al que se le adicionaron aproximadamente 5 gotas de HCl 6 M (pH 1-1,5). A continuación se agregó rápidamente aproximadamente el 80-90% del volumen de solución de $KMnO_4$, que se estimaba necesario para alcanzar el punto final (de esta forma se reduce la cantidad de $Na_2C_2O_4$ que puede ser oxidado por el oxígeno atmosférico). La titulación se concluyó con agitación magnética sobre plancha de calentamiento a unos $60^\circ C$, hasta permanencia del color violeta del permanganato.

Se prepararon patrones en un rango de concentraciones desde 0,1 ppm hasta 6,8 ppm.

El blanco utilizado se preparó con 2 mL de HNO_3 que se llevaron a un volumen final de 50 mL con agua destilada.

Por otro lado, como método de control para verificar que se estaba trabajando correctamente, se determinó Mn también vía absorción atómica. Para ello se practicó a la solución original una dilución de 1:4. Los patrones se prepararon a partir de una solución de Mn (II), obtenida utilizando $MnSO_4 \cdot H_2O$, patrón primario. Todos se prepararon en medio nítrico con concentraciones de Mn(II) de entre 0,46 y 4,6 ppm.

Resultados:

Las masas utilizadas de yerba y las masas obtenidas de cenizas luego de la calcinación fueron las siguientes:

	Pesada (g)	Cenizas (g)	%	Extracto
TSS	27,3928	1,7374	6,34	2,70
TSH	26,1764	0,9541	3,64	
TCS	25,1891	1,5846	6,29	2,90
TCH	25,9495	0,8796	3,39	
NSS	28,5910	1,6681	5,83	2,37
NSH	26,6912	0,9229	3,46	
NCS	31,9890	1,8549	5,80	2,33
NCH	27,6992	0,9615	3,47	

Tabla 2. Masa de yerba utilizada y cenizas obtenidas.

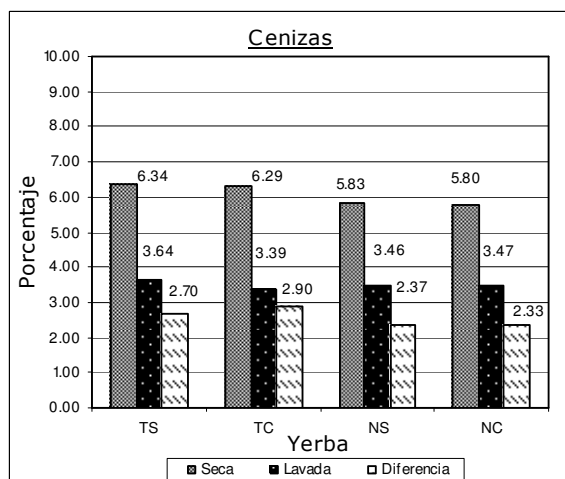


Figura 1. Comparación de las cantidades de ceniza obtenidas

Determinación de hierro

A continuación se presenta la curva de calibración externa obtenida y los datos referentes a ésta.

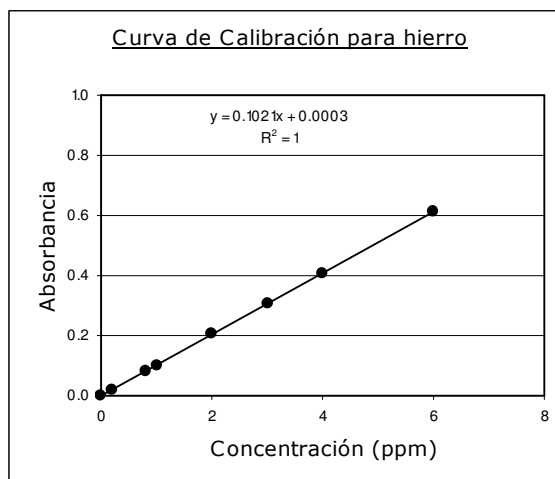


Figura 2. Recta de calibración para la determinación por absorción del complejo $Fe(SCN)_6^{3-}$.

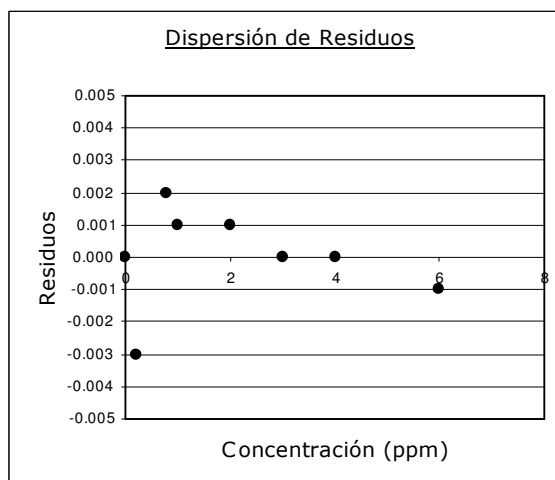


Figura 3. Gráfico de residuos para la calibración en la determinación de $Fe(III)$.

Curva de calibración	
Pendiente	$0,1021 \pm 0,0007$
Ordenada	$0,000 \pm 0,002$
R^2	0,99996
Ámbito lineal	(0,2 - 6) ppm
Límite de detección	0,09 ppm

Tabla 3. Datos referentes a la curva de calibración para la determinación de $Fe(III)$

El límite de detección en todos los casos se calculó con la fórmula:

$$X_L = \frac{3 \cdot DS_{Sx}}{m}$$

Donde X_L es el límite de detección calculado, DS_{Sx} es el desvío estándar de los residuos y m la pendiente.

Dado que se cometió un error en la aplicación del método de agregado patrón, los resultados obtenidos mediante este método carecieron de validez, como validación de resultados. Sin embargo ciertos datos recolectados durante este procedimiento permitieron observar un par de aspectos bastante relevantes: la medición realizada una semana

después reveló un aparente aumento en la concentración de Fe(III) al transcurrir el tiempo.

Los resultados obtenidos se presentan a continuación junto con los resultados de la medición realizada al cabo de una semana.

Muestra	1° Determinación		2° Determinación	
	Yerba (ppm)	Extracto (ppm)	Yerba (ppm)	Extracto (ppm)
TS	195 ± 2	39 ± 3	217 ± 4	34 ± 5
TC	206 ± 2	-250 ± 3	233 ± 4	-323 ± 5
NS	252 ± 2	11 ± 3	354 ± 4	17 ± 5
NC	194 ± 2	43 ± 2	238 ± 3	56 ± 5

Tabla 4. resultados obtenidos para la determinación de Fe.

En la siguiente tabla se indican las diferencias porcentuales halladas entre las dos determinaciones, para cada yerba .

Yerba	Diferencia en secas (%)	Diferencia en húmedas (%)
TS	10,7	15,9
TC	12,3	19,8
NS	33,7	33,2
NC	20,4	19,2

Tabla 5. Diferencias halladas en la determinación de Fe(III), en una primera oportunidad y al transcurso de una semana.

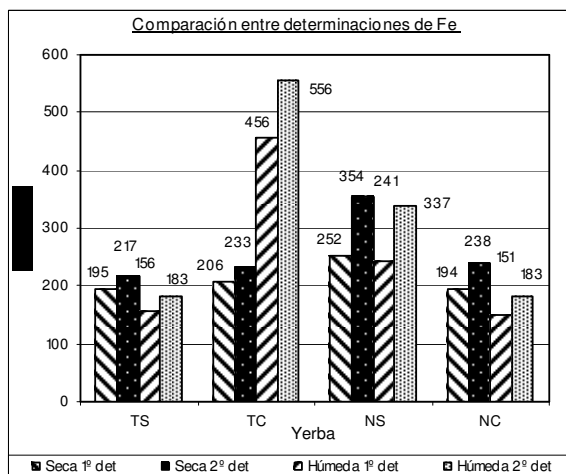


Figura 4. Gráfico donde se comparan las mediciones realizadas una vez y al transcurso de una semana.

Determinación de manganeso

Se obtuvo la siguiente curva de calibración.

Curva de calibración	
Pendiente	0,0400±0,0001
Ordenada	-0,0003±0,0005
R ²	0,999953
Ámbito lineal	(0,4 - 6,8) ppm
Límite de detección	0,07 ppm

Tabla 6. Datos referentes a la curva de calibración para la determinación de Mn(VII).

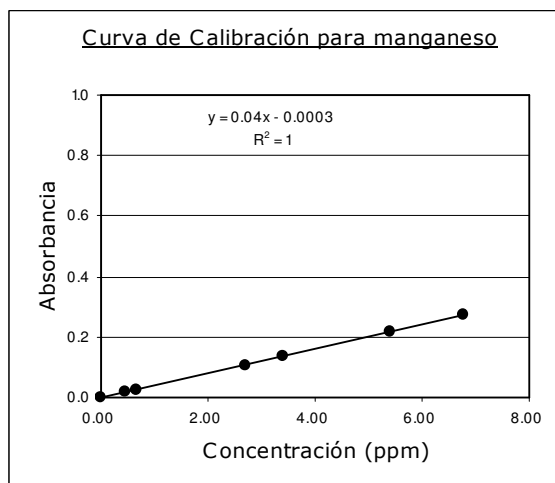


Figura 5. Recta de calibración para la determinación por espectrofotometría del MnO₄⁻.

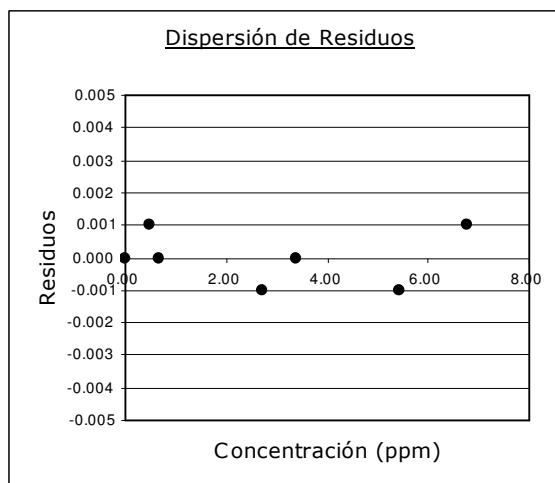


Figura 6. Gráfico de residuos para la calibración en la determinación de MnO₄⁻.

Por su parte los datos de la calibración por absorción atómica son los siguientes:

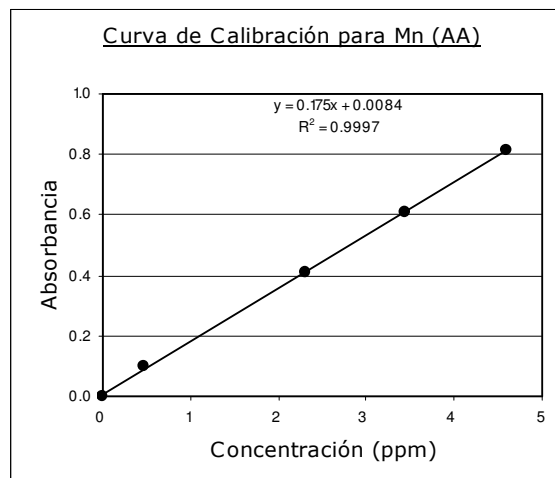


Figura 7. recta de calibración para Mn(II) por absorción atómica.

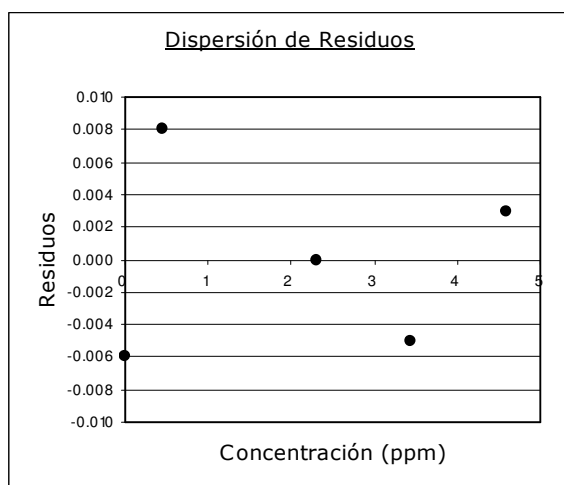


Figura 8. Gráfico de residuos de la recta de calibración de Mn por absorción atómica.

Curva de calibración	
Pendiente	0,175 ± 0,002
Ordenada	0,008 ± 0,005
R ²	0,9997
Ámbito lineal	(0,4 - 4,6) ppm
Límite de detección	0,06 ppm

Tabla 7. Datos referentes a la curva de calibración para la determinación de Mn(II) por absorción atómica.

Los resultados obtenidos para la determinación de Mn por los distintos métodos fueron los siguientes:

Yerba	Espectro-fotometría	Absorción atómica	Dif. (%)
TSS	2135 ± 2	2498 ± 4	14,54
Extracto TS	907 ± 2	912 ± 3	0,46
TCS	1574 ± 1	1828 ± 3	13,89
Extracto TC	586 ± 2	645 ± 3	9,11
NSS	1860 ± 2	2053 ± 3	9,40
Extracto NS	712 ± 2	687 ± 3	3,59
NC	1458 ± 1	1729 ± 3	15,69
Extracto NC	694 ± 2	704 ± 2	1,37

Tabla 8. resultados obtenidos para el Mn por espectrofotometría, absorción atómica y diferencia entre métodos

Yerba	Espectrofotometría	Absorción atómica
TS	42,48%	36,51%
TC	37,23%	35,28%
NS	38,28%	33,46%
NC	47,60%	40,72%

Tabla 8. Porcentajes de Mn que quedan en el extracto en cada tipo de yerba.

Conclusiones:

Los resultados obtenidos de porcentajes de cenizas luego de la calcinación resultaron sorprendentemente alentadores, lo cual nos lleva a realizar ciertas observaciones sobre el total de minerales en yerbas y extractos. En primer lugar y como era de esperarse el porcentaje de cenizas es mayor en la yerba seca. Se observa además (Tabla 2) que las obtenidas a partir de yerbas secas son similares entre sí, al igual que las húmedas entre ellas. A su vez la cantidad de cenizas en la Nobleza es un poco menor, así también como la diferencia entre las cenizas en yerba seca y húmeda en dicha marca. Esto lleva a pensar que en principio sería lógico encontrar un contenido mayor de minerales en la Taragüí.

Por lo que podemos decir que en cuanto a las cenizas, no aparecen diferencias evidentes entre las yerbas sin palo y con palo pero sí entre marcas.

En cuanto a la determinación de Fe(III) al realizar la medición de TCH, se obtuvo un resultado extremadamente grande (456 ppm), de hecho mucho mayor que el obtenido para la yerba seca, lo cual nos llevó a descartarlo. Debido a inconvenientes en el filtrado, se utilizó una espátula metálica en la manipulación de la muestra, la cual puede ser la causante de este dato sin sentido. Este hecho limita un poco las conclusiones que se pueden sacar, ya que se desconoce el contenido de Fe(III) en TC.

Como se dijo anteriormente la ideal original era realizar una validación del método haciendo una medición por agregado patrón, para detectar posibles interferencias de tipo multiplicativo en la solución A. Sin embargo se cometió un error al no enrasar con la propia muestra, dado que al hacer esto las concentraciones de muestra en uno y otro patrón resultaron diferentes, y por lo tanto también la matriz, por lo que el método carece de sentido. De todas formas lo que si se pudo observar es que las matrices debían ser muy parecidas entre si, ya que la respuesta de todos los sistemas ante el agregado fue muy similar (se obtuvieron pendientes muy parecidas, y tests de normalidad sobre los conjuntos de puntos para los deltas de concentración agregada y el delta de absorbancia medido, dieron p-valores mayores a 0.4).

Además pareciera haber interferencias multiplicativas aunque no se pudo evaluar su efecto, ya que al calcular con la recta de calibración externa el contenido de hierro luego de cada agregado patrón, los incrementos medidos no coincidían con las cantidades agregadas. De hecho siempre se medía una cantidad mayor a lo que correspondía.

En cuanto al aparente aumento de la concentración de hierro en el tiempo, se pudo ver que se dio sistemáticamente en todas las yerbas, por lo que no se lo puede asociar con algún error de medición. La explicación que se encuentra es que haya quedado alguna sustancia capaz de complejar al hierro, y que con el transcurso del tiempo se haya ido descomponiendo, dejando al hierro libre y por lo tanto visible frente al método usado. Este hecho sería además coincidente con las aparentes interferencias multiplicativas presentes.

Se descarta que la oxidación del hierro no haya sido cuantitativa (tratamiento de la muestra con oxidantes fuertes y ensayo con fenantrolina negativo).

Observando la tabla 5 y figura 4 se puede ver además que las diferencias entre mediciones realizadas en distintos días, son del mismo orden en todas las yerbas (salvo en el caso de la NS) y en particular muy parecidas entre si para el mismo tipo de yerba, es sorprendente esta concordancia en las yerbas NC y NS. Esto es razonable considerando que después de un lavado, las matrices son prácticamente iguales (seca y húmeda), por lo que el incremento de hierro debería ser similar.

Conclusiones respecto a los valores concretos son muy difíciles de sacar, debido a todos los inconvenientes señalados anteriormente. Sin embargo se puede decir que la diferencia de hierro en yerba entre TC y NC, no parece ser significativa. Tampoco se podría juzgar que existe una diferencia evidente entre TS y TC, pero el contenido parece ser superior en la NS, sin embargo la extracción en esta yerba fue mucho más pobre. Para sacar conclusiones contundentes al respecto, se debería hacer un estudio más exhaustivo en cuanto a cantidad de muestras para poder

realizar mediante técnicas estadísticas, comparaciones más precisas. Pero una hipótesis podría ser que el hierro en las hojas de las plantas se encuentre en estructuras que lo retengan más que en el palo al hacerse extracciones con agua caliente.

En la determinación de manganeso por absorción atómica se obtuvieron mayores cantidades de dicho metal que por espectrofotometría. Esto puede deberse a una oxidación parcial del Mn por el bismutato. Este hecho introduce errores sesgados, y es aquí donde se evidencia la ventaja de la técnica elegida. Observando las diferencias en las mediciones por ambos métodos sobre los extractos, estas resultan en comparación sorprendentemente pequeñas.

Al comparar la cantidad de manganeso en las yerbas secas (tabla 8) se puede ver el efecto diluyente que tiene el palo pues se encontró mayor cantidad del metal en las muestras sin palo. Esto es coherente con el hecho de que el manganeso se encuentra mayormente en las hojas, formando parte del fotosistema II de las plantas.

Sin embargo, en el extracto de Nobleza con palo se determinó, por absorción atómica, una cantidad de manganeso mayor que en el extracto de Nobleza sin palo. Lo que contradice las suposiciones hechas. Se debería realizar los mismos ensayos sobre un número más grande de muestras para obtener resultados fehacientes.

A simple vista, la cantidad de palo aumenta en el siguiente orden: TS < NS < NC < TC, y un hecho que refuerza este ordenamiento es que las diferencias en la cantidad de manganeso determinada por ambos métodos son más acentuadas en las de marca Taragüi, que son las que tienen más y menos palo a la vista.

De acuerdo a las cantidades que quedan en el extracto en relación a lo que hay en la yerba seca (Tabla 8) se ve que se extrae aproximadamente entre un 35% y un 48% del manganeso. Haciendo esta relación para los dos métodos empleados, no se observa una tendencia: en las Taragüi se extrae más manganeso en la sin palo mientras que en las noblezas se esto sucede más en la que tiene palo.

Por otro lado, viendo los valores obtenidos por absorción atómica, se ve que para las Taragüi la cantidad de manganeso extraída es muy parecida por lo que el palo no influiría en la extracción de este metal. Pero para las noblezas se encuentra una diferencia considerable entre la sin palo y la con palo; ésta última es la que deja pasar mayor cantidad de manganeso al extracto. Nuevamente como en el caso del hierro, una explicación sería que en la hoja el Mn esté en estructuras que lo retengan más, o bien, al tratarse de marcas diferentes, el tratamiento industrial es distinto, obteniéndose productos de descomposición de las moléculas orgánicas diferentes donde se encuentran los metales, por lo que puede terminar afectando la cantidad de manganeso y hierro transferidas en las infusiones.

En base a todo lo explicado, no se pueden sacar conclusiones absolutas sobre la relación entre el palo y la proporción de manganeso que pasa al extracto.

Cabe destacar que en varios puntos (cenizas, contenido de manganeso) se han observado diferencias mayores entre la TC y la TS, que entre la NC y la NS, lo cual además coincide con las observaciones realizadas al comienzo sobre el contenido de palos en yerbas. Excepción a esta observación fue la determinación de Fe, pero como ya se señaló no se pueden sacar conclusiones series en base a estos datos.

Notas de Seguridad:

Cuando se calcinan las muestras sólidas en cápsula de porcelana con mecheros, se debe tener cuidado y hacerlo primero con fuego suave y aumentar la llama recién una vez que los humos se hagan menos densos y de color blanco (si son verdes, se debe seguir a fuego lento).

La oxidación con ácido perclórico es muy peligrosa si todavía hay materia orgánica (riesgo de explosión). Este ácido debe agregarse una vez eliminada la mayor cantidad de materia orgánica posible con ácido nítrico concentrado. Debe ser agregado en frío y si se quiere calentar, debe ser en forma muy suave.

Bibliografía:

- (1) Raquel Giulian, Carla Iochims Eliete Dos Santos, Samir de Morales Shubeita, Luiza manfradi da Silva, Johnny Ferraz Dias y Maria Lúcia Yoneama; Elemental Characterization of comercial mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) before and after water hot infusión using ion beam techniques. *J. Food Chem.* 2007, 55, 741-746.
- (2) Renee Street, Jirina Szákova, Ondej Drábek y Lenka Miládková; The Status of Micronutrients (Cu, Fe, Mn, Zn) in Tea and Tea Infusion in the Selected Samples imported to Czech Republic. *Czech J. Food Sci.*, Vol 24, No.2: 62-71.
- (3) Marco Maiocchi, Susana Moyano, Luís Martínez y Jorge Avanza. Estudio comparativo del contenido de minerales en *Ilex paraguariensis* e *Ilex dumosa*.
- (4) Vogel. A text book of quantitative inorganic analysis including elementary instrumental analysis.