

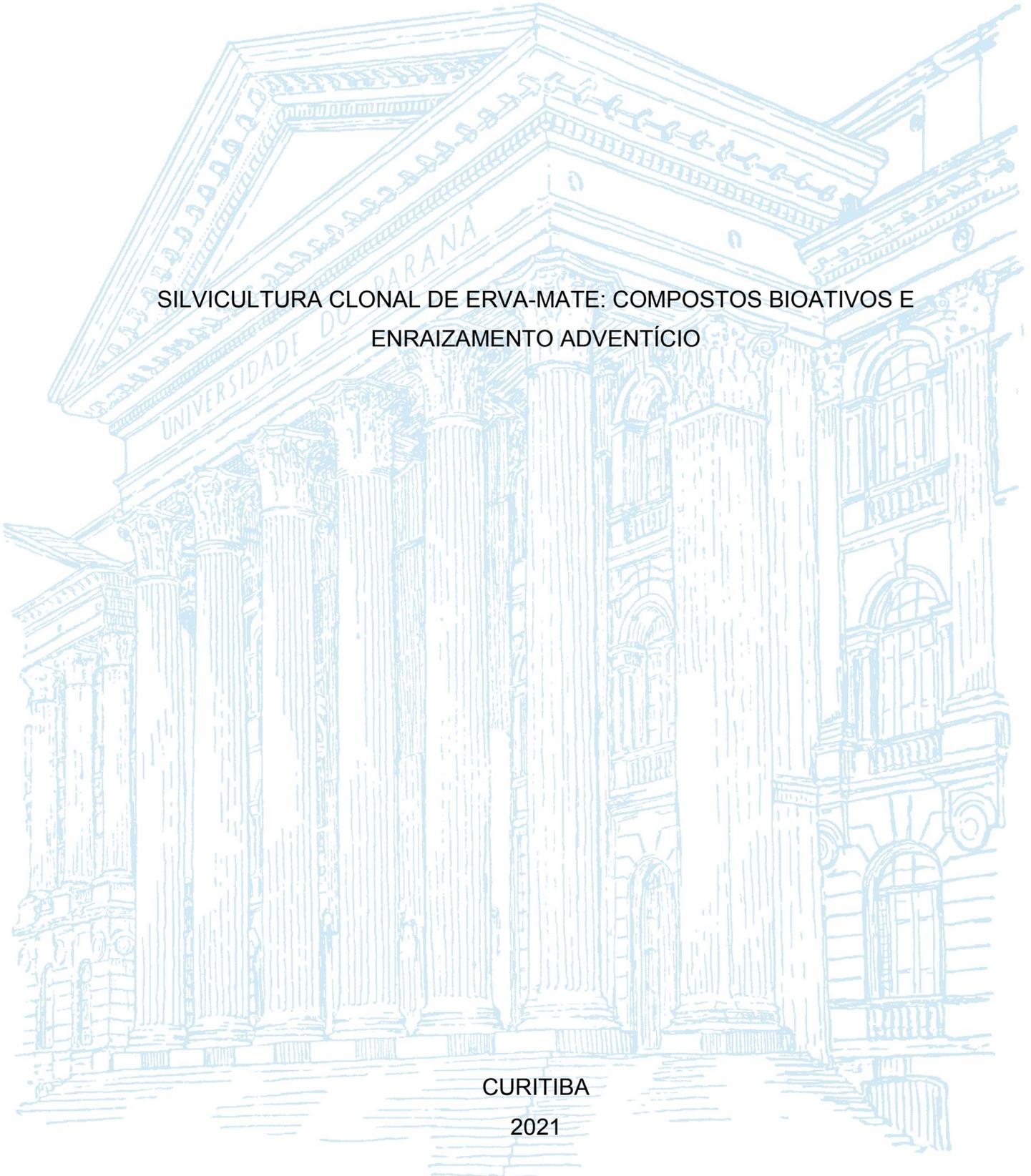
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CARLOS ANDRÉ STUEPP

SILVICULTURA CLONAL DE ERVA-MATE: COMPOSTOS BIOATIVOS E  
ENRAIZAMENTO ADVENTÍCIO

CURITIBA

2021



CARLOS ANDRÉ STUEPP

SILVICULTURA CLONAL DE ERVA-MATE: COMPOSTOS BIOATIVOS E  
ENRAIZAMENTO ADVENTÍCIO

Tese apresentada como requisito parcial à  
obtenção do título de Doutor, Curso de  
Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Setor de  
Ciências Agrárias, Universidade Federal do  
Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ivar Wendling

Coorientadores: Dra. Cristiane Vieira Helm  
Profa. Dra. Dagma Kratz

CURITIBA

2021

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Florestais e da Madeira - UFPR

Stuepp, Carlos André

Silvicultura clonal de erva-mate: compostos bioativos e enraizamento adventício / Carlos André Stuepp. – Curitiba, 2021.  
73 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Ivar Wendling

Coorientadoras: Dra. Cristiane Vieira Helm

Profa. Dra. Dagma Kratz

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal.

Defesa: Curitiba, 19/06/2021.

Área de concentração: Silvicultura.

1. Erva-mate – Propagação por estaquia. 2. Erva-mate – Cultivo.  
3. Erva-mate – Melhoramento genético. 4. Teses. I. Wendling, Ivar.  
II. Helm, Cristiane Vieira. III. Kratz, Dagma. IV. Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias. V. Título.

CDD – 634.9

CDU – 634.0.285

Bibliotecária: Berenice Rodrigues Ferreira – CRB 9/1160



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA  
FLORESTAL - 40001016015P0

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA FLORESTAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **CARLOS ANDRÉ STUEPP** intitulada: **SILVICULTURA CLONAL DE ERVA-MATE: COMPOSTOS BIOATIVOS E ENRAIZAMENTO ADVENTÍCIO**, sob orientação do Prof. Dr. IVAR WENDLING, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 19 de Julho de 2021.

Assinatura Eletrônica  
19/07/2021 15:44:54.0

IVAR WENDLING  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica  
19/07/2021 15:58:46.0

ALESSANDRO CAMARGO ANGELO  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
19/07/2021 15:32:42.0

ROZIMEIRY GOMES BEZERRA GASPAR  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
19/07/2021 16:39:03.0

DIEGO TYSZKA MARTINEZ  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
20/07/2021 09:18:08.0

PATRICIA PEREIRA PIRES  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS)

À ciência e aos que a constroem.

Dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, em primeiro lugar.

Aos meus orientadores pela sabedoria, paciência e pelo amor que transparece em suas ações.

À instituição pública brasileira, gratuita e resiliente aos desafios. Entre estas, especial carinho e agradecimento à Universidade Federal do Paraná e Embrapa Florestas, e todos os alunos e professores que construíram e constroem os alicerces destas que considero, minha casa.

Àquela que se faz importante em todos os momentos, pela presença e fé, apoio, amor e paz, esposa em palavra, gestos e ações, responsável pela transformação do meu ser humano e pela felicidade dos amanheceres.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À vida que me presentou com a oportunidade deste doutoramento.

Às pessoas especiais que fazem parte do meu viver.

## RESUMO

*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (Aquifoliaceae), conhecida popularmente como erva-mate, é uma espécie perene nativa representante da Floresta Ombrófila Mista, de grande valor econômico, social e ambiental. Além dos produtos tradicionais, como o chimarrão, tererê e chás, apresenta grande potencial na área de fármacos e alimentos, por conter propriedades funcionais e medicinais. Por essa razão, materiais genéticos vêm sendo avaliados quanto à concentração de compostos bioativos, sem, no entanto, levar em consideração sua estabilidade em ciclos sucessivos de produção, bem como sua relação com os diferentes morfotipos, sexo e produtividade de biomassa comercial. A presente tese está organizada em capítulos, com os respectivos objetivos: Capítulo I - avaliar 58 genótipos de erva-mate quanto às suas composições de cafeína, teobromina, compostos fenólicos totais e proteínas e verificar sua estabilidade ao longo de quatro anos consecutivos; Capítulo II - avaliar o potencial de resgate vegetativo e multiplicação clonal de 22 genótipos de erva-mate e sua correlação com os compostos bioativos, morfotipo, sexo e produtividade de biomassa comercial. Para tanto, foram selecionados 58 genótipos de erva-mate com base em sua produtividade, morfotipo foliar e sexo, provenientes de um teste de procedências e progênies instalado no município de Ivaí-PR. Entre 2015 e 2018, sempre no mês de agosto, foram coletadas folhas maduras, livres de injúrias, do terço médio das plantas e encaminhadas para a determinação do teor de cafeína, teobromina e compostos fenólicos totais e proteínas totais. Para avaliar o potencial de resgate vegetativo por estaquia foram utilizados 22 genótipos dos 58 inicialmente selecionados, os quais foram submetidos a poda drástica para a coleta de brotações que ocorreu em duas épocas. A partir das brotações foram preparadas estacas caulinares com  $12 \pm 0,5$  cm de comprimento, as quais foram desinfestadas e submetidas ao tratamento com ácido indolbutírico na concentração de  $4.000 \text{ mg L}^{-1}$ , sendo posteriormente plantadas em caixas plásticas preenchidas com vermiculita de granulometria fina e acondicionadas em casa de vegetação climatizada para enraizamento, durante 90 dias. A elevada variabilidade genética atribuída à espécie fica evidente na distribuição quantitativa dos principais compostos bioativos, com extremos de cafeína ( $0,035$  a  $2,385 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ ), teobromina ( $0,0004$  a  $1,772 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ ), compostos fenólicos totais ( $7,028$  a  $9,424 \text{ g EAG } 100\text{g}^{-1}$ ), proteínas ( $10,39$  a  $16,58 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ ) e estabilidade individual dos genótipos nos quatro anos de avaliação. Da mesma forma, o enraizamento adventício mostrou ampla variação, com percentuais entre 13% a 78% entre os 22 genótipos, sem, no entanto, haver correlação significativa com os compostos bioativos avaliados.

Palavras-chave: Compostos bioativos. Estaquia. *Ilex paraguariensis*. Metilxantinas, Morfotipo foliar. Produtividade de biomassa.

## ABSTRACT

*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (Aquifoliaceae), popularly known as yerba mate, is a perennial Brazilian native species representing the Mixed Ombrophilous Forest, of great economic, social and environmental value. In addition to traditional products, such as chimarrão, tererê and teas, it has great potential in the area of pharmaceuticals and industries, as it contains functional and medicinal properties. For this reason, genetic materials have been evaluated for the concentration of biocompounds, without, however, taking into account the stability in successive production cycles, as well as their relationship with different morphotypes, sex and commercial biomass productivity. This thesis is organized in chapters, with the respective objectives: Chapter I - to evaluate 58 yerba mate genotypes regarding their caffeine, theobromine, total phenolic compounds and proteins compounds and check their stability over four consecutive years; Chapter II - to evaluate the potential for vegetative rescue by rooting cuttings of 22 yerba mate genotypes and their correlation with biochemical composition, morphotype, sex and commercial biomass productivity. For this purpose, 58 yerba mate genotypes were selected based on their productivity, leaf morphotype and sex, from a provenance and progenies trial installed in the city of Ivaí-PR, Brazil. Between 2015 and 2018, always in August, mature leaves were collected, free of injuries, from the middle third of the plants and sent for determination of the caffeine, theobromine, total phenolic compounds and total protein content. To assess the potential for vegetative rescue by rooting cuttings, 22 genotypes were selected from the 58 initially selected, which were subjected to drastic pruning to collect shoots in two periods. From the shoots, stem cuttings were prepared with  $12\pm 0.5$  cm in length, disinfested and subjected to treatment with indolebutyric acid at a concentration of  $4,000\text{ mg L}^{-1}$ , being subsequently planted in plastic boxes filled with fine-grained vermiculite and stored in a climate-controlled greenhouse, for 90 days. The high genetic variability attributed to the species is evident in the quantitative distribution of the main biochemical components, with extremes of caffeine ( $0.035$  to  $2.385\text{ g }100\text{g}^{-1}$ ), theobromine ( $0.0004$  to  $1.772\text{ g }100\text{g}^{-1}$ ), total phenolic compounds ( $7.028$  to  $9.424\text{ g }100\text{g}^{-1}$ ) and proteins ( $10.39$  to  $16.58\text{ g }100\text{g}^{-1}$ ) and individual stability of the genotypes in the four years of evaluation. Likewise, adventitious rooting showed wide variation, with percentages ranging from 13% to 78% among the 22 genotypes, without, however, having significant correlation with the bioactive compounds evaluated.

Keywords: Bioactive compounds. Cutting, *Ilex paraguariensis*. Methylxanthines. Leaf morphotype. Biomass productivity.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1	DISTRIBUIÇÃO DOS 58 GENÓTIPOS DE ERVA-MATE DE ACORDO COM SUAS CONCENTRAÇÕES DE CAFEÍNA.....	27
------------	---	----

## LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 2.1 ACP PARA CONCENTRAÇÃO DE CAFEÍNA EM 54 GENÓTIPOS DE ERVA-MATE PARA O PRIMEIRO COMPONENTE NOS ANOS DE 2015, 2016, 2017 E 2018. A PORCENTAGEM ENTRE PARÊNTESES REPRESENTA A VARIAÇÃO DO COMPONENTE..... 26
- GRÁFICO 2.2 ACP DA RELAÇÃO GENÓTIPO-AMBIENTE DE 54 GENÓTIPOS DE ERVA-MATE PARA CONCENTRAÇÃO DE CAFEÍNA DE ACORDO COM PC1 E PC2. AS PORCENTAGENS ENTRE PARÊNTESES REPRESENTAM A VARIAÇÃO DE CADA COMPONENTE..... 29
- GRÁFICO 2.3 ACP PARA CONCENTRAÇÃO DE TEOBROMINA EM 55 GENÓTIPOS DE ERVA-MATE PARA O PRIMEIRO COMPONENTE NOS ANOS DE 2015, 2016, 2017 E 2018. A PORCENTAGEM ENTRE PARÊNTESES REPRESENTA A VARIAÇÃO DO COMPONENTE..... 30
- GRÁFICO 2.4 ACP DA RELAÇÃO GENÓTIPO-AMBIENTE DE 55 GENÓTIPOS DE ERVA-MATE PARA CONCENTRAÇÃO DE TEOBROMINA DE ACORDO COM PC1 E PC2. AS PORCENTAGENS ENTRE PARÊNTESES REPRESENTAM A VARIAÇÃO DE CADA COMPONENTE..... 31
- GRÁFICO 2.5 ACP PARA CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM 55 GENÓTIPOS DE ERVA-MATE PARA O PRIMEIRO COMPONENTE NOS ANOS DE 2015, 2016, 2017 E 2018. A PORCENTAGEM ENTRE PARÊNTESES REPRESENTA A VARIAÇÃO DO COMPONENTE..... 32
- GRÁFICO 2.6 ACP DA RELAÇÃO GENÓTIPO-AMBIENTE DE 55 GENÓTIPOS DE ERVA-MATE PARA CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DE ACORDO COM PC1 E PC2. AS PORCENTAGENS ENTRE PARÊNTESES REPRESENTAM A VARIAÇÃO DE CADA COMPONENTE..... 34
- GRÁFICO 2.7 ACP PARA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS EM 55

	GENÓTIPOS DE ERVA-MATE PARA O PRIMEIRO COMPONENTE NOS ANOS DE 2015, 2016, 2017 E 2018. A PORCENTAGEM ENTRE PARÊNTESES REPRESENTA A VARIAÇÃO DO COMPONENTE.....	35
GRÁFICO 2.8	ACP DA RELAÇÃO GENÓTIPO-AMBIENTE DE 55 GENÓTIPOS DE ERVA-MATE PARA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DE ACORDO COM PC1 E PC2. AS PORCENTAGENS ENTRE PARÊNTESES REPRESENTAM A VARIAÇÃO DE CADA COMPONENTE.....	36
GRÁFICO 3.1	RESPOSTAS DO ENRAIZAMENTO ADVENTICIO (EA) DE 22 GENÓTIPOS DE ERVA-MATE COM BASE EM DOIS PERÍODOS INDEPENDENTES (ENTRE DEZEMBRO/2015 E JUNHO/2016). AS BARRAS INDICAM O ERRO PADRÃO DA MÉDIA. BAIXO EA (0-30%) MÉDIO EA (31-60%) E ALTO EA (61-100%).....	49
GRÁFICO 3.2	NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES DE 22 GENÓTIPOS DE ERVA-MATE COM BASE EM DOIS PERÍODOS INDEPENDENTES (ENTRE DEZEMBRO/2015 E JUNHO/2016). AS BARRAS INDICAM O ERRO PADRÃO DA MÉDIA.....	50
GRÁFICO 3.3	COMPRIMENTO TOTAL DE RAÍZES DE 22 GENÓTIPOS DE ERVA-MATE EM DOIS PERÍODOS DE AVALIAÇÃO (ENTRE DEZEMBRO/2015 E JUNHO/2016). AS BARRAS INDICAM O ERRO PADRÃO DA MÉDIA.....	51
GRÁFICO 3.4	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DE 22 GENÓTIPOS DE ERVA-MATE PARA PERCENTUAL DE ENRAIZAMENTO (E), NÚMERO DE RAÍZES (NR), COMPRIMENTO MÉDIO DE RAÍZES (CMR), PERCENTUAL DE ESTACAS BROTADAS (EBT) E PRODUÇÃO DE BIOMASSA COMERCIAL (BC) DE ACORDO COM PC1 E PC2. AS PORCENTAGENS ENTRE PARÊNTESES REPRESENTAM A VARIAÇÃO DE CADA COMPONENTE.....	54
GRÁFICO 3.5	DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CAFEÍNA (a) E PROTEÍNAS (b) EM 22 GENÓTIPOS DE ERVA-MATE PARA O PRIMEIRO COMPONENTE. A PORCENTAGEM ENTRE PARÊNTESES	

	REPRESENTA A VARIAÇÃO DO COMPONENTE.....	55
GRÁFICO 3.6	REPRESENTAÇÃO RELATIVA (%) DAS VARIÁVEIS ENRAIZAMENTO (EA), NÚMERO DE RAÍZES (NR), COMPRIMENTO MÉDIO DE RAÍZES (CMR), EMISSÃO DE BROTOS (EB), BIOMASSA COMERCIAL (BC), CAFEÍNA (C), TEOBROMINA (TB), COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT), E PROTEÍNAS TOTAIS (PT), EM FUNÇÃO DO SEXO (a) E DOS MORFOTIPOS (b) EM 22 GENÓTIPOS DE ERVA-MATE.....	56

## LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1	CARACTERIZAÇÃO DOS 22 GENÓTIPOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> , 24 MESES APÓS A PODA ANTERIOR, DE ACORDO COM A PROCEDÊNCIA (P), SEXO (S), MORFOTIPO (M), BIOMASSA COMERCIAL (BC), CAFEÍNA (C), TEOBROMINA (TB), COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT) E PROTEÍNAS TOTAIS (PT).....	46
TABELA 3.2	COMPRIMENTO MÉDIO DE RAÍZES (CMR), ESTACAS BROTADAS (EB), ESTACAS BROTADAS SEM RAIZ (EB*) E ESTACAS BROTADAS COM RAIZ (EB**).....	52
TABELA 3.3	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE O PERCENTUAL DE ENRAIZAMENTO E AS VARIÁVEIS BIOMÉTRICAS AVALIADAS NAS ESTACAS.....	53

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	16
1.1 REFERÊNCIAS.....	18
<b>2 CONCENTRAÇÕES E ESTABILIDADE DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM GENÓTIPOS DE <i>ILEX PARAGUARIENSIS</i></b> .....	20
2.1 INTRODUÇÃO .....	21
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	23
2.2.1 Material vegetal e preparação de amostra .....	23
2.2.2 Determinação de metilxantinas .....	24
2.2.3 Determinação de compostos fenólicos totais .....	24
2.2.4 Análises estatísticas .....	25
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
2.3.1 Cafeína.....	26
2.3.2 Teobromina .....	29
2.3.3 Compostos fenólicos totais.....	31
2.3.4 Proteínas .....	34
2.4 CONCLUSÕES .....	37
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>38</b>
<b>3 EFEITO DO GENÓTIPO, DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E DA COMPOSIÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS NA FORMAÇÃO DE RAÍZES ADVENTÍCIA EM <i>ILEX PARAGUARIENSIS</i></b> .....	<b>41</b>
3.1 INTRODUÇÃO .....	42
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	43
3.2.1 Material vegetal e preparação de amostra .....	43
3.2.2 Determinação dos compostos bioativos e caracterização dos genótipos .....	44
3.2.3 Resgate vegetativo de materiais genéticos selecionados .....	46
3.2.4 Análises estatísticas .....	47
3.3 RESULTADOS .....	48
3.4 DISCUSSÃO .....	56
3.5 CONCLUSÕES .....	62
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>63</b>
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS GERAIS</b> .....	<b>68</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) é uma espécie arbórea de elevada importância econômica, ambiental, social e cultural na América do Sul, ocorrendo naturalmente em partes do Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai, onde geralmente é consumida na forma de infusões como chás, chimarrão e tererê (STURION; RESENDE, 2010). A origem de seu consumo remete aos primórdios da colonização brasileira, coevoluindo com as populações locais, desde os primeiros relatos de consumo por índios da etnia Guarani, mantendo sua relevância até os dias atuais. Seu sistema de produção, ainda ligado ao extrativismo, tem mostrado mudanças significativas, e em 2018, a produção brasileira de erva-mate totalizou 939.580 toneladas, sendo aproximadamente 42% proveniente de plantas nativas e 58% de plantações (IBGE, 2018).

A erva-mate apresenta alta competitividade comercial frente a seus principais concorrentes (GODOY et al., 2020), muito embora, seu consumo seja ainda, inferior a *Coffea* spp. e *Camelia sinensis* (CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016). Muito além das cuias e bombas de chimarrão e tererê, o potencial de consumo da erva-mate ultrapassa seu consumo histórico e atual. Consagrada na cultura indígena para o tratamento de patologias, teve a comprovação científica de seus benefícios à saúde humana somente nas últimas décadas, com evidências de efeitos benéficos em virtude da presença de compostos bioativos em suas folhas, ricas em nutrientes, minerais e vitaminas hidrossolúveis (CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016). A presença de polifenóis (ácidos fenólicos, flavonoides), alcalóides (metilxantinas, incluindo cafeína, teobromina, teofilina) e terpenos (carotenoides, saponinas) (HECK; MEJIA, 2007; GAN et al., 2018) tem despertado o interesse e aumento do consumo a nível mundial (CARDOZO JUNIOR; MORAND 2016; OELLIG et al., 2018; GODOY et al., 2020), despertando também o interesse dos produtores.

Com o objetivo de obter materiais genéticos superiores, programas de melhoramento vêm sendo desenvolvidos no Brasil desde a década de 1990, quase sempre com enfoque na adaptação, produção de massa foliar, resistência a doenças e pragas, desfolhamento e arquitetura da copa (tipo de ramificação) (STURION; RESENDE, 2010; WENDLING et al., 2018). Recentemente, passou-se a dar ênfase na seleção de genótipos que pudessem oferecer maiores concentrações

de alguns compostos bioativos relevantes (ANESINI et al., 2012; DEBAT et al., 2014; GONZÁLEZ ARBELÁEZ et al., 2016; CARDOZO JUNIOR; MORAND 2016; LIMA et al., 2019; DUARTE et al., 2020; CROGE et al., 2021).

O despertar da ciência para a presença de compostos bioativos em erva-mate trouxe uma intensa procura por um produto competitivo e de qualidade, que possa subsidiar um novo modelo de consumo (TOMASI et al., 2021). Não obstante, se intensificam as pesquisas direcionadas a viabilizar a disponibilização destes recursos genéticos, capazes de subsidiar a indústria e o surgimento de novos produtos, direcionando assim a ciência e inovação (WENDLING et al., 2018; VIEIRA et al., 2021). Com o enfoque claro, todos os esforços devem ser direcionados à seleção de genótipos com garantias de composição de compostos bioativos que possam suprir as novas demandas de consumo e estejam aptos a multiplicação vegetativa. A viabilização da multiplicação massal destes genótipos envolve o resgate vegetativo (STUEPP et al., 2018), sendo fortemente influenciado pelas características genéticas das matrizes (MAYER et al., 2020) e sua utilização traz a possibilidade de maiores ganhos de seleção, otimização de práticas de manejo e melhor qualidade do produto final. Deve garantir também a estabilidade destes compostos, mantendo assim um padrão quantitativo ao longo de ciclos sucessivos de produção.

Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivo aprofundar o estudo a respeito da composição de compostos bioativos de distintos genótipos de erva-mate, suas respectivas produtividades, e correlacionar estas variáveis com a capacidade de enraizamento adventício no resgate vegetativo da espécie.

O primeiro capítulo avalia a composição de compostos bioativos de 58 genótipos melhorados de erva-mate, compreendendo os principais compostos de interesse industrial ao longo de quatro anos consecutivos, com o objetivo de determinar sua concentração e estabilidade ao longo do tempo.

O segundo capítulo apresenta uma análise ampla de correlação entre a composição de compostos bioativos (cafeína, teobromina, compostos fenólicos totais e proteínas), morfotipo, sexo, produtividade das matrizes e a capacidade de enraizamento adventício (EA) e vigor dos propágulos em 22 genótipos adultos de erva-mate em dois períodos do ano, com o objetivo de determinar o potencial destes genótipos ao resgate vegetativo.

## 1.1 REFERÊNCIAS

- ANESINI, C. et al. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, n. 2, p. 299-304, 2012.
- CARDOZO JUNIOR, E. L.; MORAND, C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 440-454, 2016.
- CROGE, C. P.; CUQUEL, F. L.; PINTRO, P. T. M. Yerba mate: cultivation systems, processing and chemical composition. A review. **Scientia Agricola**, v. 78, n. 5, 2021.
- DEBAT, H. J. et al. Exploring the genes of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) by NGS and de novo transcriptome assembly. **Plos one**, v. 9, n. 10, p. e109835, 2014.
- DUARTE, M. M. et al. Caffeinated and decaffeinated mate tea: Effect of toasting on bioactive compounds and consumer acceptance. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 15, p. 1-10, 2020.
- GAN, R. Y. et al. Health benefits of bioactive compounds from the genus *Ilex*, a source of traditional caffeinated beverages. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1682, 2018.
- GODOY, R. C. B.; CHAMBERS IV, E.; YANG, G. Development of a preliminary sensory lexicon for mate tea. **Journal of Sensory Studies**, p. e12570, 2020.
- GONZÁLEZ ARBELÁEZ, L. F. et al. Effect of an *Ilex paraguariensis* (yerba mate) extract on infarct size in isolated rat hearts: the mechanisms involved. **Food & Function**, v. 7, p. 816-824, 2016.
- HECK C. I.; MEJIA, E. G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. R138-R151, 2007.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Dados PAM e PEVS**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>>. Acesso em: 22 out. 2018.
- LIMA, G. G. et al. Prediction of yerba mate caffeine content using near infrared spectroscopy. **Spectroscopy Letters**, v. 52, n. 5, p. 282-287, 2019.
- MAYER, L.; NIENOW, A. A.; TRES, L. Cutting propagation of ‘Cambona 4’ yerba mate clones. **Comunicata Scientiae**, v. 11, p. e3287-e3287, 2020.
- OELLIG, C.; SCHUNCK, J.; SCHWACK, W. Determination of caffeine, theobromine and theophylline in Mate beer and Mate soft drinks by high-performance thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1533, p. 208-212, 2018.

STUEPP, C. A. et al. Vegetative propagation and application of clonal forestry in Brazilian native tree species. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, n. 9, p. 985-1002, 2018.

STURION, J. A.; RESENDE, M. D. V. **Melhoramento genético da erva-mate**. Colombo: Embrapa Florestas, 2010. 274 p.

TOMASI, J. C. et al. Effects of different drying methods on the chemical, nutritional and colour of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves. *International Journal of Food Engineering*, p. 000010151520200312, 2021.

VIEIRA, L. et al. Vegetative propagation, chemical composition and antioxidant activity of yerba mate genotypes. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, v. 19, n. 2, p. 112-121, 2021.

WENDLING, I.; STURION, J. A.; STUEPP, C. A. Early selection and classification of yerba mate progenies. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, n. 03, 2018.

## CAPÍTULO I

### 2 CONCENTRAÇÕES E ESTABILIDADE DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM GENÓTIPOS DE *Ilex paraguariensis*

#### RESUMO

O consumo de erva-mate vem sendo estimulado por descobertas científicas que identificaram elevadas concentrações de compostos bioativos e seus benefícios à saúde. Não há, no entanto, comprovações científicas que certifiquem e garantam a estabilidade na concentração destes compostos em materiais genéticos selecionados. Assim, este estudo avaliou os níveis de cafeína, teobromina, compostos fenólicos totais e proteínas em 58 genótipos de erva-mate e sua estabilidade ao longo de quatro anos sucessivos. Para isso, as metilxantinas (cafeína e teobromina) foram quantificadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e o teor de proteína total pelo método micro-Kjeldahl. Os resultados indicaram a presença de genótipos com extremos de cafeína (0,035 a 2,385 g 100g<sup>-1</sup>), teobromina (0,0004 a 1,772 g 100g<sup>-1</sup>), compostos fenólicos totais (7,028 a 9,424 g 100g<sup>-1</sup>) e proteínas (10,39 a 16,58 g 100g<sup>-1</sup>) com elevada estabilidade ao longo dos anos. Sob forte influência genética, ao explicar o comportamento destes compostos bioativos e sua estabilidade em genótipos de erva-mate ao longo de quatro anos, este estudo apresenta o potencial da espécie no fornecimento de compostos bioativos.

Palavras-chave: Alcalóides xantinas. Chá mate. Erva-mate descafeinada. Interação genótipo x ambiente. HPLC. Melhoramento genético. *Ilex paraguariensis*.

#### ABSTRACT

Yerba mate consumption has been stimulated by scientific discoveries that have identified high concentrations of bioactive compounds and their health benefits. However, there are no studies or scientific evidence to certify or guarantee stability of these compounds' concentrations during different years in the same plants. So, we evaluated caffeine, theobromine, total phenolic compounds and proteins

concentrations in 58 yerba mate genotypes and their stabilities in the same plants over four consecutive years. To do this, methylxanthines (caffeine and theobromine) were quantified through High Efficiency Liquid Chromatography (HPLC) and total protein content by the micro-Kjeldahl method. Our results indicate genotypes with extremes of caffeine (0.035 to 2.385 g 100g<sup>-1</sup>), theobromine (0.0004 to 1.772 g 100g<sup>-1</sup>), total phenolic compounds (7.028 to 9.424 g GAE 100g<sup>-1</sup>) and proteins (10.39 to 16.58 g 100g<sup>-1</sup>), and high stabilities of those compounds over the years. Under strong genetic influence, by explaining the behavior of these biochemical compounds and their stability in yerba mate genotypes, this study presents the potential of the species in providing bioactive compounds.

Keywords: Xanthine alkaloid. mate tea. decaffeinate yerba mate. genotype x environment interaction. HPLC. genetic improvement. *Ilex paraguariensis*.

## 2.1 INTRODUÇÃO

Espécie nativa da América do Sul, *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., ou erva-mate, é tradicionalmente consumida como bebida tônica e estimulante não alcoólica. Desde os primeiros relatos de seu consumo por índios da etnia Guarani até os modelos de consumo atuais, a erva-mate tem tido papel central na evolução socioeconômica e cultural dos povos que habitam a América do Sul. Na Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai, seu consumo se tornou expressão cultural, com influência direta na cadeia de produção (HECK; MEJIA, 2007), alcançando em algumas regiões 10 kg pessoa<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> (GAN et al., 2018). Trata-se de um produto competitivo em termos de preço, qualidade, conformidade regulatória e inovação (GODOY et al., 2020), muito embora, as formas de consumo regional não favoreçam sua expansão comercial para mercados de expressão, com consumo significativamente inferior a seus concorrentes *Coffea* spp. na Europa e América do Norte e *Camelia sinensis* na Ásia e Europa (CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016).

Os recursos genéticos de erva-mate são de fundamental importância para a seleção de genótipos específicos, que possam subsidiar a indústria e o surgimento de novos produtos, direcionando assim a ciência e inovação neste mercado (WENDLING et al., 2018). Com foco no consumo regional, os programas de melhoramento da espécie recorreram durante décadas à seleção de genótipos com

características adaptativas a fatores bióticos e abióticos e à alta produção de biomassa comercial (STURION; RESENDE, 2010; WENDLING et al., 2018). Recentemente, passou-se a dar ênfase na seleção de genótipos que pudessem oferecer maiores concentrações de alguns compostos bioativos relevantes (ANESINI et al., 2012; DEBAT et al., 2014; GONZÁLEZ ARBELÁEZ et al., 2016; CARDOZO JUNIOR; MORAND 2016; LIMA et al., 2019; DUARTE et al., 2020). Estas descobertas têm despertado o interesse e aumento do consumo a nível mundial, principalmente pelos benefícios que estes compostos podem trazer à saúde (CARDOZO JUNIOR; MORAND 2016; OELLIG et al., 2018; GODOY et al., 2020).

Consumida entre os indígenas de diferentes etnias, a erva-mate foi empregada para o tratamento de diferentes patologias de forma empírica. A comprovação científica de suas funções antioxidantes, anti-inflamatórias, antiobesidade e cardioprotetores são recentes (CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016; GAN et al., 2018; POSWAL et al., 2019). A constituição da biomassa foliar seca de erva-mate é bastante rica e diversa, incluindo nutrientes, minerais e vitaminas hidrossolúveis (CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016). Sua composição de compostos bioativos envolve a presença de polifenóis (ácidos fenólicos, flavonóides), alcalóides (metilxantinas, incluindo cafeína, teobromina, teofilina) e terpenos (carotenóides, saponinas) (HECK; MEJIA, 2007; GAN et al., 2018). Apesar da diversidade de compostos, grande parte das pesquisas tem focado no conteúdo de cafeína, teobromina e teofilina em produtos comerciais a base de erva-mate (CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016; OELLIG et al., 2018; GODOY et al., 2020) e antioxidantes (ver mais em GULLÓN et al., 2018; GAN et al., 2018).

Os compostos bioativos presentes na erva-mate são responsáveis pelas propriedades estimulantes e medicinais verificadas (CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016; GAN et al., 2018; POSWAL et al., 2019). Muito embora a escassez de materiais genéticos selecionados e padronizados para tal fim, torne a variação neste conteúdo um dos limitantes de seu uso, o qual fica dependente do modo de preparo e quantidade ingeridas e, principalmente, da matéria prima utilizada na produção (BUTIUK et al., 2016; GIL; WIANOWSKA, 2017; KALTBACH et al., 2020).

Assim, neste estudo, 58 genótipos melhorados de erva-mate foram submetidos a análises de cafeína, teobromina, compostos fenólicos totais e

proteínas durante quatro anos consecutivos, com o objetivo de determinar as suas respectivas concentrações e sua estabilidade ao longo do tempo.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Material vegetal e preparação de amostra

Foram selecionados 58 genótipos de erva-mate com base em sua produtividade, morfotipo foliar e sexo, provenientes de um teste de procedências e progênes instalados no município de Ivaí-PR (25°01'S e 50°48'W, altitude de 600 m, precipitação média anual de 1500-1600 mm) (STURION; RESENDE, 2010). O referido teste foi implantado em novembro de 1997 com 156 progênes em espaçamento de 3 x 2 m e condições de pleno sol.

Nos anos de 2015, 2016, 2017 e 2018, sempre no mês de agosto, foram coletadas folhas maduras, livres de injúrias, em toda a circunferência da copa das árvores, a uma altura aproximada de 1,6 m. As folhas foram armazenadas em embalagens do tipo "kraft", identificadas e encaminhadas ao Laboratório de Tecnologia de Produtos não-madeiráveis da Embrapa Florestas, em Colombo, PR. As amostras foram previamente secas em forno micro-ondas (potência 1.500 W, frequência 2.450 MHz), por aproximadamente 4 min, alternando a posição das folhas em intervalos de 60 segundos, com a finalidade de homogeneizar a secagem. Posteriormente, as folhas foram trituradas, peneiradas a 0,5 mm, embaladas e armazenadas em freezer (-20 °C).

Para a determinação do teor de cafeína, teobromina e compostos fenólicos totais, foram preparados extratos aquosos contendo 0,1 g de material vegetal em 50 mL de água ultrapura tipo I aquecida até sua temperatura de ebulição (100 °C sob pressão de 1 atm). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em ultrassom (Ultracleaner 1.400 A) por 30 min, resfriadas a temperatura ambiente e filtradas, com seu volume completado para 100 mL em balão volumétrico, e congeladas (-20 °C) (HELM et al., 2015).

As análises de umidade e proteínas totais seguiram as metodologias oficiais da Association of Official Analytical Chemists International (AOAC, 2016). Para a determinação do teor de umidade por método termo-gravimétrico, a 105 °C, até massa constante e teor de proteína total pelo método micro-Kjeldahl, utilizando o

teor de nitrogênio total multiplicado pelo fator de conversão 6,25 para obtenção do teor de proteínas totais.

### 2.2.2 Determinação de metilxantinas

Os extratos foram descongelados e homogeneizados manualmente por 30 segundos. Cerca de 2 mL de extrato foram filtrados em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  com auxílio de seringa e holder. Após, uma alíquota foi transferida para um vial de 1,5 mL âmbar e tampa de teflon. Estas amostras foram injetadas diretamente no cromatógrafo. As metilxantinas (cafeína e teobromina) foram quantificadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), com a utilização de cromatógrafo líquido Agilent, modelo 1260 Infinity, controlado pelo software ChemStation e equipado com bomba quaternária G1311B, injetor automático G1329B, detector DAD G4212B e detector FLD G1321B, disponível no Laboratório Multiusuário de Equipamentos e Análises Ambientais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (LAMEAA-UTFPR). Para a separação dos compostos utilizou-se a coluna Acclaim 120 C18 (Dionex<sup>®</sup> 2,1 x 150 mm, 3  $\mu\text{m}$ ) com cartucho de guarda Acclaim C18 2,1 mm, 5  $\mu\text{m}$ . As condições de separação dos compostos presentes no extrato aquoso (10  $\mu\text{L}$  de injeção) foram: 30 °C com fluxo de 0,3 mL min<sup>-1</sup> de eluente com a fase móvel A (H<sub>2</sub>O:ácido acético J.T. Baker – 99,5:0,5 v/v) e B (acetonitrila Merck<sup>®</sup> - 100%). O comprimento de onda utilizado para detecção do composto foi 280 nm (fixo). O programa de eluição com gradiente foi: 0-8 min (4% B), 8-12 min (4-5% B), 12-30 min (5% B).

A quantificação dos compostos cafeína (1,3,7-trimetilxantina) e teobromina (3,7-dimetilxantina) foi realizada a partir de curvas analíticas obtidas com padrões da Sigma<sup>®</sup> para cafeína ( $R^2 = 0,99989$ ) e teobromina ( $R^2 = 0,99964$ ). Os resultados foram expressos em gramas de composto por cem gramas de amostra seca ( $\text{g } 100\text{g}^{-1}$ ).

### 2.2.3 Determinação de compostos fenólicos totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi determinada segundo a metodologia espectrofotométrica de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965), com modificações. Em balão volumétrico foram adicionados 0,1 mL de extrato, 6.0

mL de água destilada e 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu, agitando-se por 1 minuto. Após, adicionou-se 2 mL de solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 15%, agitando-se por mais 30 segundos. O volume final foi ajustado com água destilada para 10 mL. A reação permaneceu no escuro, em temperatura ambiente, por 2 horas e, posteriormente as absorbâncias foram tomadas em espectrofotômetro a 760 nm. A curva analítica foi obtida com compostos fenólicos totais (ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzóico) entre as concentrações de 0,25 e 13  $\text{g L}^{-1}$  ( $R^2 = 0,9988$ ) e os resultados expressos em gramas equivalentes aos compostos fenólicos totais por cem gramas de amostra seca ( $\text{g EAG } 100\text{g}^{-1}$ ).

#### 2.2.4 Análises estatísticas

Previamente as análises de estabilidade, foram removidos os *outliers*, permanecendo 54 genótipos para concentração de cafeína e proteína e 55 genótipos para concentração de teobromina e compostos fenolicos totais. A estabilidade dos materiais genéticos foi observada nos quatro anos de testes com base na existência de interação entre genótipos e anos, e analisada pelo procedimento AMMI (Additive Main effects and Multiplicative Interaction). Esse procedimento foi complementar às análises de deviance, obtidas do modelo linear generalizado com função Gamma de probabilidade. Proposto inicialmente por Mandel (1971), o método AMMI foi usado na decomposição das fontes de variação dos efeitos aditivos entre genótipos e anos e dos efeitos multiplicativos para a interação, via componentes principais. Este método produz estimativas mais precisas das respostas genotípicas e fornece uma interpretação gráfica dos resultados através do procedimento biplot (GABRIEL, 1971), em que, os escores dos efeitos de interação para cada genótipos e ano são plotados simultaneamente.

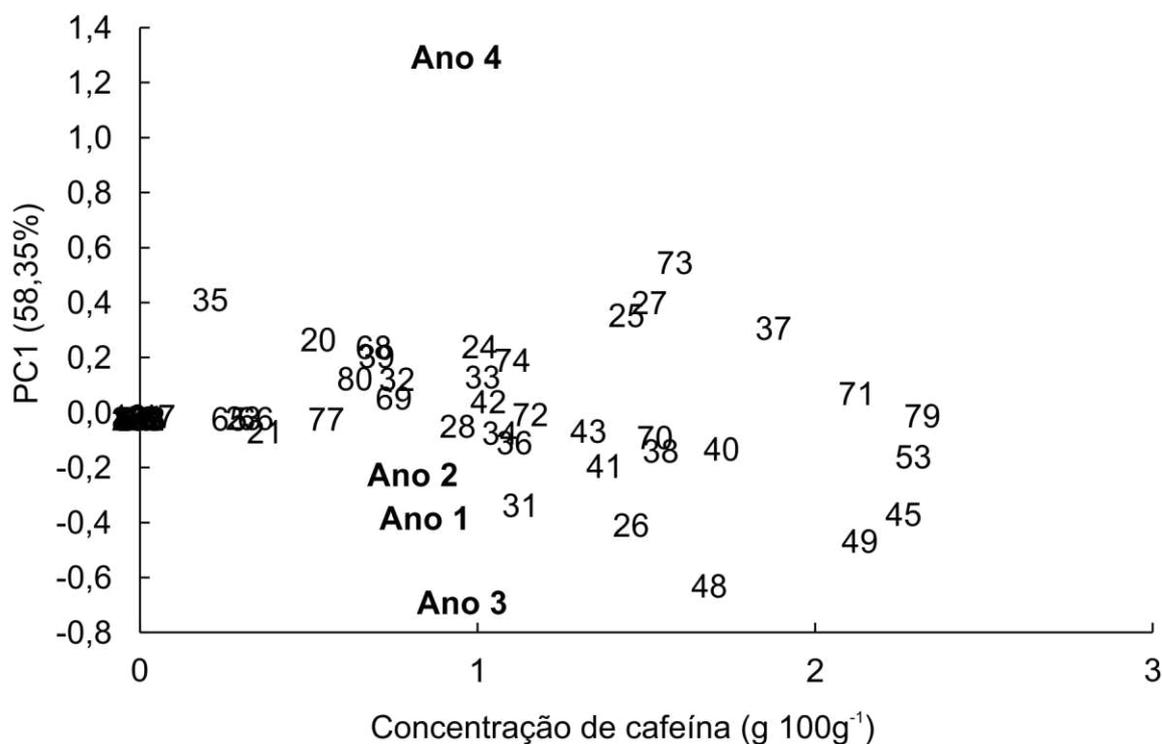
A interpretação é baseada na magnitude e no sinal dos coeficientes para cada eixo de componente principal. Valores baixos indicam genótipos e/ou anos que pouco ou quase nada contribuem para a interação, exibindo estabilidade estatística.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 Cafeína

Os resultados mostram a ampla variação existente na composição de cafeína em genótipos de erva-mate, com forte influência daqueles sobre a sua concentração. O conteúdo de cafeína em genótipos de erva-mate mostrou uma variação de 0,0348 a 2,3846 g 100g<sup>-1</sup> nos 54 genótipos analisados (GRÁFICO 2.1). O primeiro componente é capaz de descrever 58,35% da variação observada na interação genótipo ano. A similaridade verificada na distribuição dos anos e dos genótipos (Gráfico 2.1) viabilizam o agrupamento das amostras de acordo com a concentração de cafeína, no entanto, a grande quantidade de genótipos gera a sobreposição destes, sobretudo em zonas de interesse.

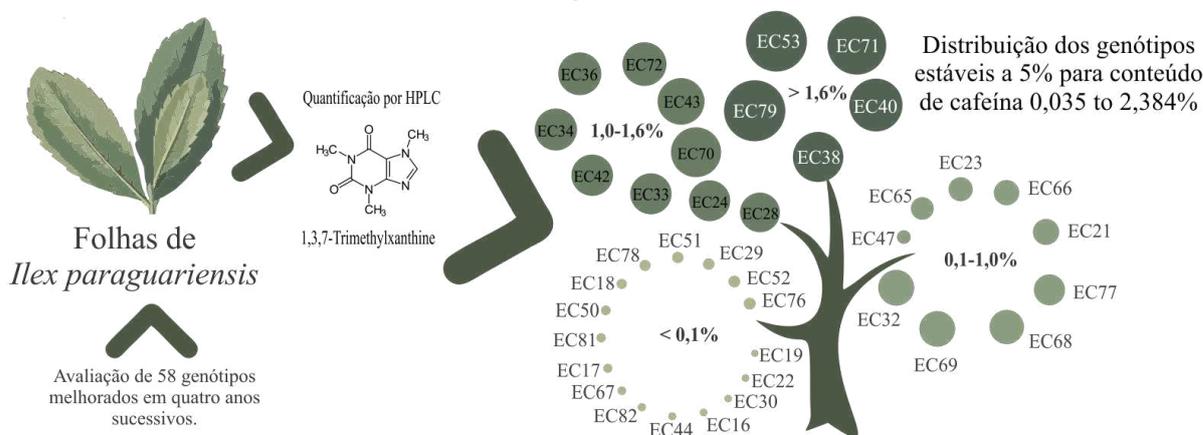
GRÁFICO 2.1 – ACP PARA CONCENTRAÇÃO DE CAFEÍNA EM 54 GENÓTIPOS DE ERVA-MATE PARA O PRIMEIRO COMPONENTE NOS ANOS DE 2015, 2016, 2017 E 2018. A PORCENTAGEM ENTRE PARÊNTESES REPRESENTA A VARIÇÃO DO COMPONENTE.



FONTE: O autor (2021).

Os genótipos EC19, 22, 30, 16, 44, 82, 67, 17, 81, 50, 18, 78, 51, 29, 52 e 76 (16 genótipos) apresentaram concentração média de cafeína abaixo de  $0,1 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ , sendo, portanto, descafeinados de acordo com a RDC nº 277 da Anvisa (BRASIL, 2005). Todos os demais genótipos (38 genótipos) foram caracterizados como cafeinados, com concentração de cafeína variando de  $0,121$  a  $2,385 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ . Seguindo a classificação definida por SCHUHLI; PENTEADO JUNIOR; WENDLING (2019), a concentração de cafeína para a erva-mate pode ser muito baixa ou ausente ( $< 0,1\%$ ), baixa ( $0,1 - 1,0\%$ ), média ( $1,0 - 1,6\%$ ) ou alta ( $> 1,6\%$ ). A partir destas informações foi possível observar uma distribuição ampla dos 54 genótipos avaliados nas quatro faixas designadas, com  $29,6\%$  dos genótipos possuindo concentração muito baixa ou ausente ( $< 0,1\%$ ),  $24,1\%$  com baixa concentração ( $0,1 - 1,0\%$ ),  $27,8\%$  com média concentração ( $1,0 - 1,6\%$ ) e  $18,5\%$  com alta concentração ( $> 1,6\%$ ) (FIGURA 2.1).

FIGURA 2.1 – DISTRIBUICAO DOS 58 GENÓTIPOS DE ERVA-MATE DE ACORDO COM SUAS CONCENTRAÇÕES DE CAFEÍNA.



FONTE: O autor (2021).

A cafeína está naturalmente presente em vários alimentos, sendo um dos ingredientes alimentares mais consumidos no mundo, com destaque para sua presença no chá, guaraná e café (HECKMAN et al., 2010). Seu conteúdo em chás é bastante variável, dependendo da espécie, das condições edafoclimáticas no cultivo e do estágio fenológico das folhas (ATHAYDE et al., 2000; HECKMAN et al., 2010), podendo influenciar na qualidade do produto, conferindo amargor e, alterando assim, o sabor do produto (MOHANPURIA et al., 2010; GODOY et al., 2020).

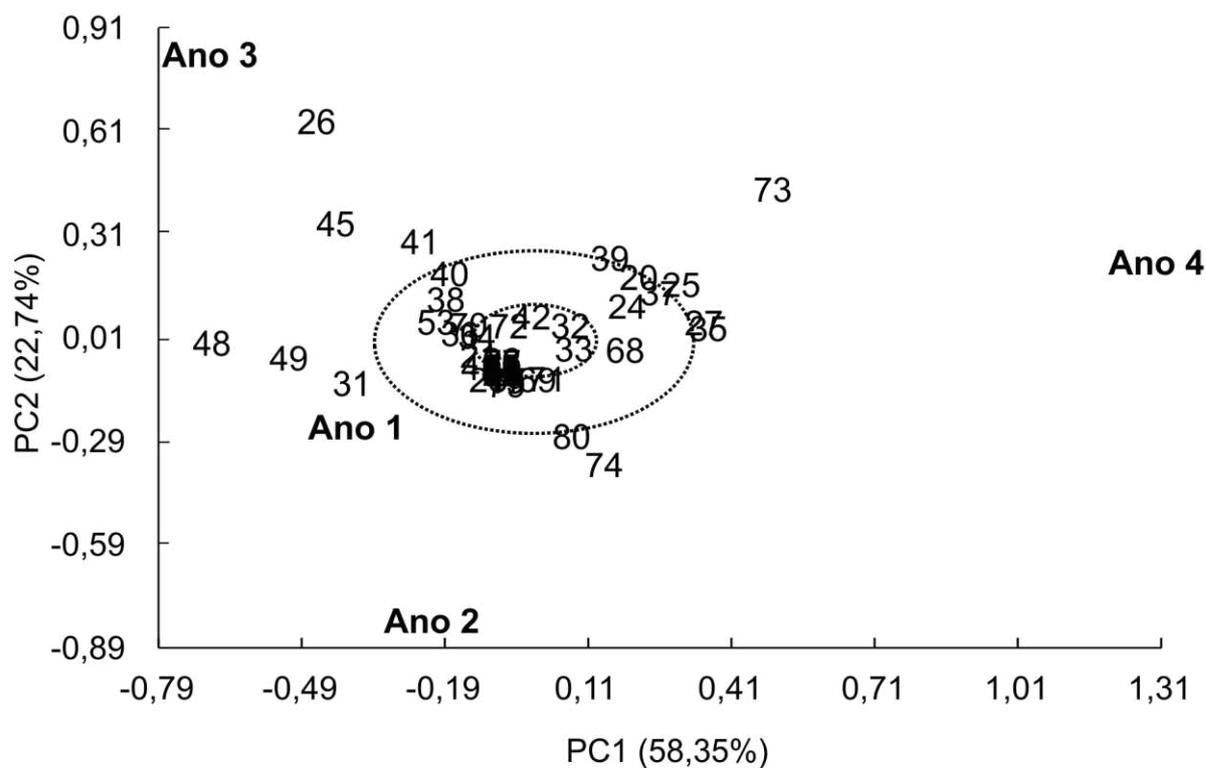
Embora a presença de cafeína em erva-mate seja conhecida (SCHERER et al., 2002; HECK; MEJIA, 2007; ANESINI et al., 2012;

HELM et al., 2015; CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016; DUARTE et al., 2020), a elevada variabilidade entre materiais genéticos (0,01 a 2,96 g 100g<sup>-1</sup>) (CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016; HELM et al., 2015) e a falta de conhecimento sobre a estabilidade desta característica eram ainda perguntas recorrentes. Quando estas características são padronizadas e avaliadas de forma sucessiva ao longo de vários ciclos de produção, é possível estabelecer uma análise mais confiável, subsidiando o surgimento de novas cultivares de erva-mate com diferentes concentrações de cafeína, para diferentes usos.

Ao longo do tempo, a grande diversidade entre as amostras e protocolos de beneficiamento tem levado a caracterização da erva-mate como uma biomassa com menores níveis de cafeína quando comparada a *Camellia sinensis*, muito embora apresente os maiores percentuais de transferência em infusão (80,90 a 85,20%) (TFOUNI et al., 2018). Nota-se que os resultados da ACP confirmam a partir dos teores de cafeína identificados neste estudo, o amplo potencial para desenvolvimento de diferentes produtos com baixa (ou descafeinados), média e alta concentração de cafeína a partir de biomassa de erva-mate (GRÁFICO 2.1).

A análise de componentes principais mostra que os dois primeiros componentes descrevem 81,1% da variância total, conotando a grande dependência do genótipo para concentrações de cafeína. O eixo horizontal é responsável por 58,3% da variação, enquanto o eixo vertical corresponde a 22,7% (GRÁFICO 2.2). O Gráfico 2.2 mostra a estabilidade dos genótipos, com 51,8% dos genótipos estáveis a 1% de probabilidade de erro (EC16, 17, 18, 21, 22, 23, 29, 30, 32, 33, 34, 36, 42, 43, 44, 50, 51, 52, 65, 66, 67, 70, 72, 76, 77, 78, 81 e 82). Somados a estes, 20,4% dos genótipos mostram-se estáveis a 5% de probabilidade de erro (EC19, 24, 28, 38, 40, 47, 53, 68, 69, 71 e 79) e apenas 27,8% dos genótipos mostram-se não estáveis ao longo dos quatro anos de avaliação (EC20, 25, 26, 27, 31, 35, 37, 39, 41, 45, 48, 49, 73, 74 e 80) (GRÁFICO 2.2). Resultados de alta herdabilidade genética no sentido restrito para teores de cafeína (de 0,60 a 0,83) observados em estudos conduzidos em erva-mate (SCHERER et al., 2002; NAKAMURA et al., 2009; CARDOZO JUNIOR et al., 2010) já mostravam que o efeito genético é altamente significativo na concentração deste componente.

GRÁFICO 2.2 – ACP DA RELAÇÃO GENÓTIPO-AMBIENTE DE 54 GENÓTIPOS DE ERVA-MATE PARA CONCENTRAÇÃO DE CAFEÍNA DE ACORDO COM PC1 E PC2. AS PORCENTAGENS ENTRE PARÊNTESES REPRESENTAM A VARIÇÃO DE CADA COMPONENTE.

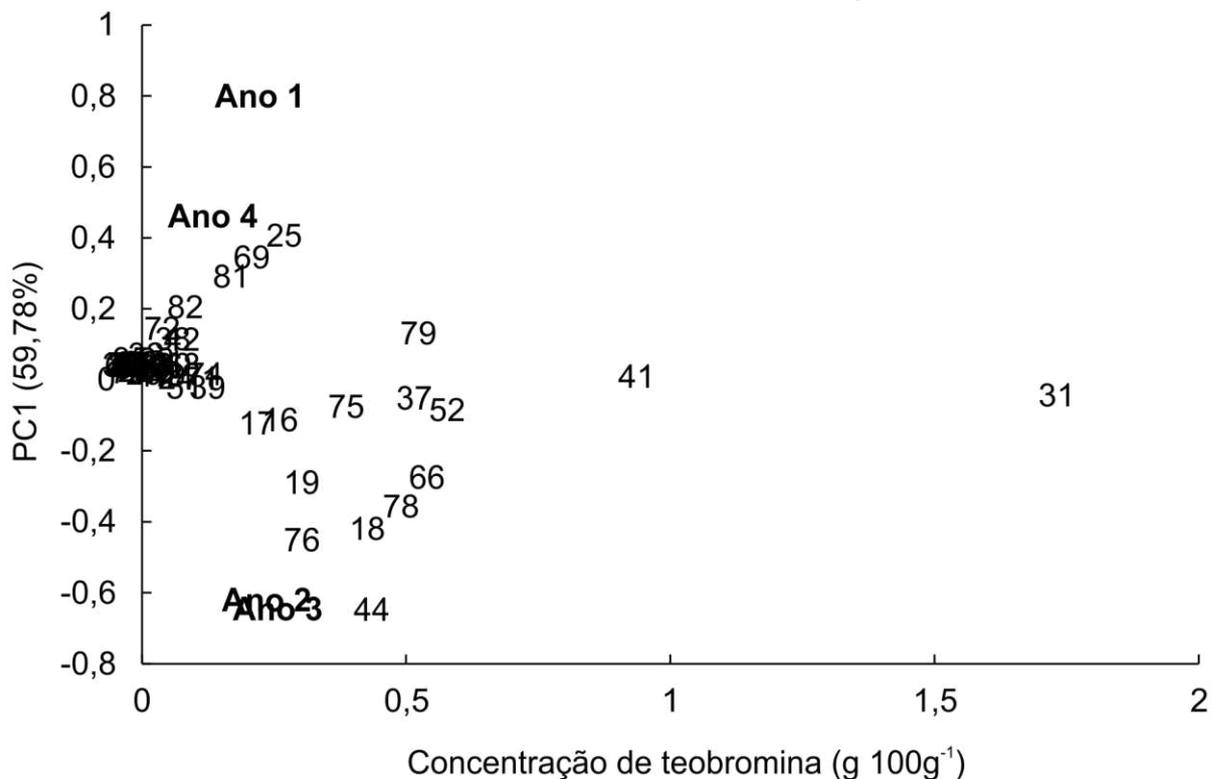


FONTE: O autor (2021).

### 2.3.2 Teobromina

A ampla variação entre genótipos refletiu em concentrações de teobromina que variam de 0,0004 a 1,7719 g 100g<sup>-1</sup> nos 55 genótipos analisados (GRÁFICO 2.3), onde o primeiro componente é capaz de descrever 59,8% da variância verificada na interação genótipo ano. A homogeneidade da distribuição de genótipos na faixa entre 0 e 0,5 g 100g<sup>-1</sup> deixa clara a menor concentração de teobromina em plantas de erva-mate quando comparadas a cafeína.

GRÁFICO 2.3 – ACP PARA CONCENTRAÇÃO DE TEOBROMINA EM 55 GENÓTIPOS DE ERVA-MATE PARA O PRIMEIRO COMPONENTE NOS ANOS DE 2015, 2016, 2017 E 2018. A PORCENTAGEM ENTRE PARÊNTESES REPRESENTA A VARIACÃO DO COMPONENTE.



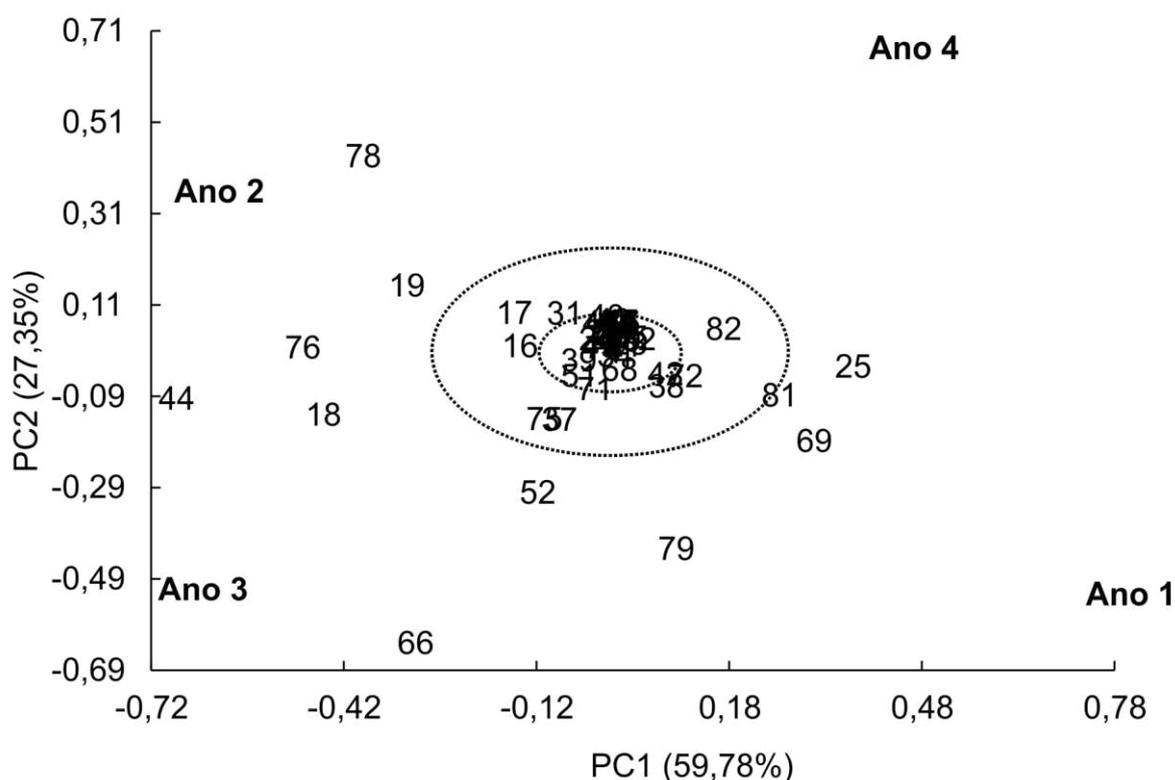
FONTE: O autor (2021).

Essa menor expressão da teobromina tem sido observação constante na literatura (GAN et al., 2018), em plantas de erva-mate variando de 0,01 a 0,95 g 100g<sup>-1</sup> (HELM et al., 2015) e 0,002 e 0,503 g 100g<sup>-1</sup> (ATHAYDE et al., 2000). Em plantas de *Camelia sinensis* tem sido frequente a identificação de uma relação inversamente proporcional entre cafeína e teobromina (MOHANPURIA et al., 2010; ZHU et al., 2019). Esta informação se sustenta na biossíntese de cafeína que envolve uma série de reações e pode culminar na conversão de teobromina em cafeína (ASHIHARA et al., 1996; DEBAT et al., 2014), somado ao fato de que folhas jovens apresentam maiores concentrações de metilxantinas em comparação a folhas totalmente desenvolvidas, avaliadas no presente estudo e tradicionalmente avaliadas em erva-mate.

A análise de componentes principais mostra que os dois primeiros componentes descrevem 81,1% da variância total, conotando a grande dependência do genótipo para concentrações de teobromina. O eixo horizontal é responsável por 59,8% da variação, enquanto o eixo vertical corresponde a 27,3% (GRÁFICO 2.4). O Gráfico 2.4 mostra a estabilidade dos genótipos, com 65,4% dos deles estáveis a

1% de probabilidade de erro (EC16, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 39, 40, 41, 43, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 53, 65, 67, 68, 70, 71, 73, 74, 77 e 80). Somados a estes, 14,5% dos genótipos mostram-se estáveis a 5% de probabilidade de erro (EC17, 31, 37, 38, 42, 72, 75 e 82) e apenas 20% dos genótipos mostram-se não estáveis (EC18, 19, 25, 44, 52, 66, 69, 76, 78, 79 e 81) (GRÁFICO 2.4).

GRÁFICO 2.4 – ACP DA RELAÇÃO GENÓTIPO-AMBIENTE DE 55 GENÓTIPOS DE ERVA-MATE PARA CONCENTRAÇÃO DE TEOBROMINA DE ACORDO COM PC1 E PC2. AS PORCENTAGENS ENTRE PARÊNTESES REPRESENTAM A VARIAÇÃO DE CADA COMPONENTE.

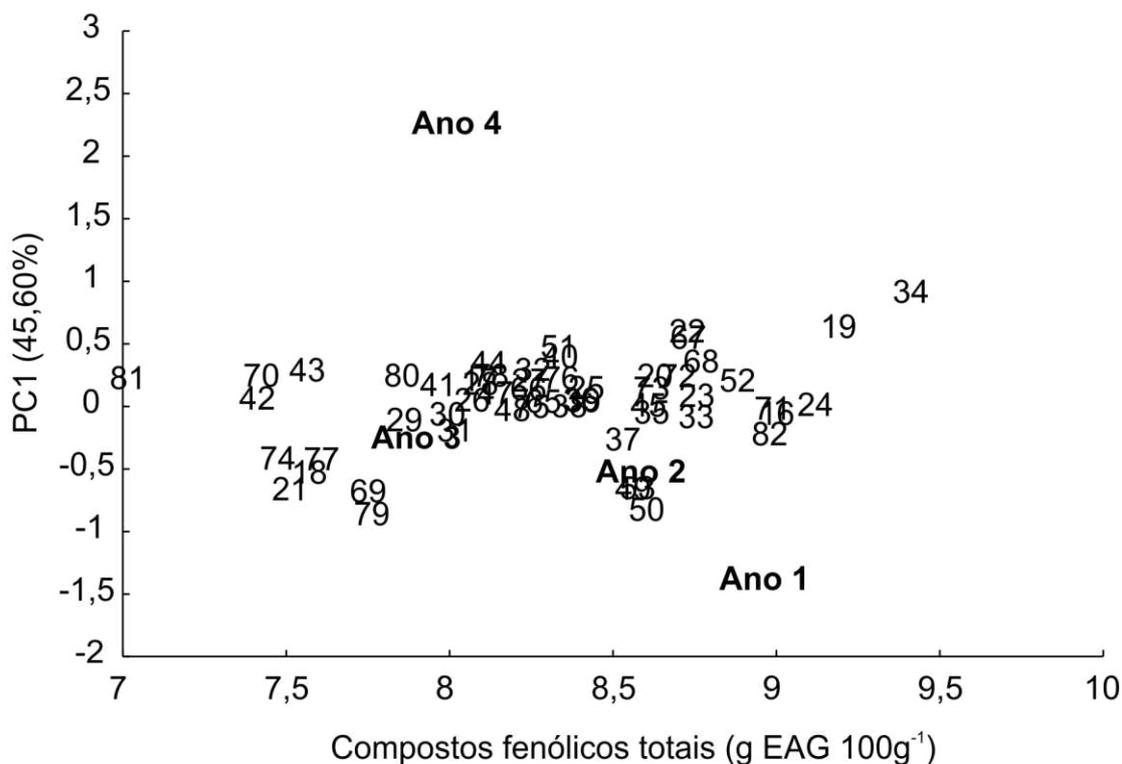


FONTE: O autor (2021).

### 2.3.3 Compostos fenólicos totais

De forma similar ao verificado para metilxantinas, uma ampla variabilidade foi observada para os resultados de compostos fenólicos totais, com variação de 7,028 a 9,424 g EAG 100g<sup>-1</sup> nos 55 genótipos analisados (GRÁFICO 2.5). Observa-se que o primeiro componente é capaz de descrever 45,6% da variação verificada na interação genótipo x ano. A influência do genótipo na constituição de fenólicos totais fica clara na distribuição dos mesmos ao longo do eixo horizontal e expressa a relevância e o potencial do melhoramento genético para o aumento desta característica na biomassa foliar de erva-mate em cultivares melhoradas.

GRÁFICO 2.5 – ACP PARA CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM 55 GENÓTIPOS DE ERVA-MATE PARA O PRIMEIRO COMPONENTE NOS ANOS DE 2015, 2016, 2017 E 2018. A PORCENTAGEM ENTRE PARÊNTESES REPRESENTA A VARIAÇÃO DO COMPONENTE.



FONTE: O autor (2021).

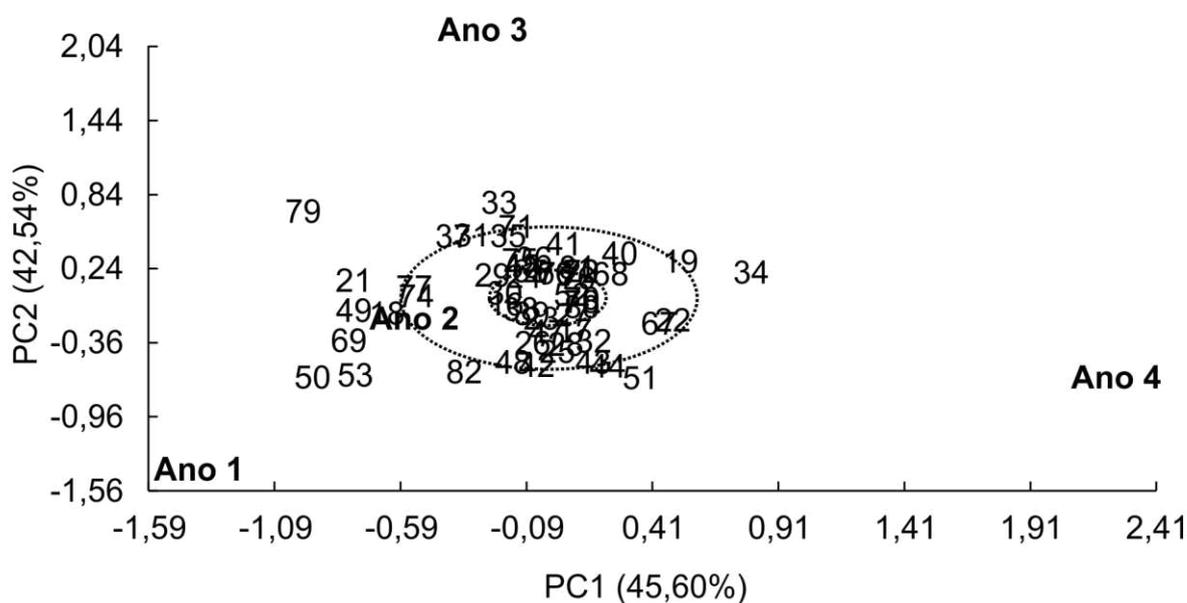
A presença de polifenóis em erva-mate é conhecida (GAN et al., 2018; GULLÓN et al., 2018) e tem despertado o interesse por suas características antioxidantes, potencializando a proteção do tecido corporal contra eventos de estresse oxidativo como envelhecimento celular e doenças degenerativas (câncer, doenças cardiovasculares, inflamações e outros) (GAN et al., 2018). Sua concentração no tecido vegetal é determinada por diversos fatores, entre eles, a variabilidade genética (SCHERER et al., 2002; CARDOZO et al., 2007) e ambiental (CROCE, 2002), formas de processamento (DUARTE et al., 2020), além do tempo entre a colheita e processamento do material vegetal (ATHAYDE et al., 2000).

Diante dos benefícios à saúde proporcionados pela erva-mate, sobretudo com relação à concentração de compostos fenólicos, fica evidente a importância de pesquisas que possam estimular a disponibilidade destes compostos para consumo humano (GÓMEZ-JUARISTI et al., 2018). Em extratos e produtos comerciais, a concentração de compostos fenólicos é elevada e altamente dependente de fatores relacionados ao cultivo e beneficiamento (BUTIUK et al., 2016; GIL; WIANOWSKA, 2017; KALTBACH et al., 2020). Em alguns casos, suas concentrações em erva-mate

se caracterizaram superiores àquelas encontradas em produtos similares como chá verde e vinho tinto (GUGLIUCCI; BASTOS, 2009). Sua presença pode ser preponderante no aprimoramento nutricional e sensorial, além de aumentar significativamente o prazo de validade de produtos industrializados (VALERGA et al., 2012). Essa caracterização não consegue, no entanto, representar o potencial genético da erva-mate para o fornecimento de antioxidantes. Neste estudo foi possível esclarecer a amplitude de distribuição de compostos fenólicos em erva-mate, gerando novas perspectivas com a produção de uma biomassa foliar padronizada e com ampla aplicação industrial.

A análise de componentes principais mostra que os dois primeiros componentes descrevem 88,1% da variância total. O eixo horizontal é responsável por 45,6% da variação, enquanto o eixo vertical corresponde a 42,5% (GRÁFICO 2.6). O Gráfico 2.6 mostra a estabilidade dos genótipos, com apenas 5,4% dos genótipos estáveis a 1% de probabilidade de erro (EC18, 74, 77). Destaca-se, no entanto, que 58,2% dos genótipos mostram-se estáveis a 5% de probabilidade de erro (EC16, 17, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 31, 35, 36, 37, 38, 39, 45, 47, 48, 49, 52, 65, 66, 69, 70, 72, 73, 75, 76, 78, 80, 81) e 36,4% dos genótipos mostram-se não estáveis (EC19, 22, 25, 28, 32, 33, 34, 40, 41, 42, 43, 44, 50, 51, 53, 67, 68, 71, 79, 82) (GRÁFICO 2.6). Estes resultados estão de acordo com a conclusão de estudo conduzido por Sturion (2004), que mostra que o teor de polifenóis totais é influenciado pelo ambiente, embora, conforme aqui verificado, para alguns genótipos o efeito genético é preponderante.

GRÁFICO 2.6 – ACP DA RELAÇÃO GENÓTIPO-AMBIENTE DE 55 GENÓTIPOS DE ERVA-MATE PARA CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DE ACORDO COM PC1 E PC2. AS PORCENTAGENS ENTRE PARÊNTESES REPRESENTAM A VARIÇÃO DE CADA COMPONENTE.



FONTE: O autor (2021).

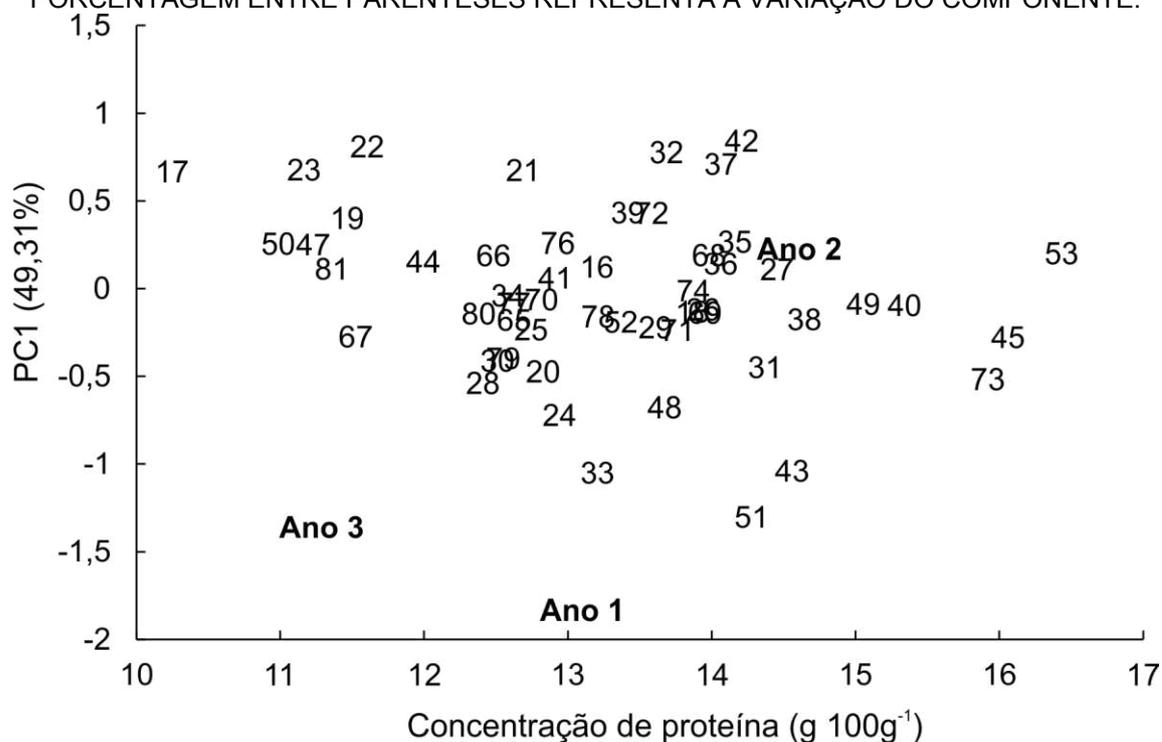
A estabilidade observada para concentração de compostos fenólicos totais em 63,6% dos genótipos avaliados ao longo dos quatro anos sucessivos representa significativa evolução e embasamento técnico-científico na busca por materiais clonais. A disponibilização de materiais genéticos com elevadas concentrações de compostos fenólicos totais pode favorecer o consumo e a absorção de antioxidantes sem, no entanto, aumentar os volumes de consumo de produtos à base de erva-mate por parte da população (SILVEIRA et al., 2016). A variabilidade conhecida entre produtos fabricados a partir de biomassa comercial (folhas e ramos finos) de erva-mate tem sua variação atribuída às características da biomassa e seu beneficiamento, inversamente proporcional ao aumento da proporção de ramos/folhas, a redução da área superficial da biomassa foliar e altamente sensível a variação nos processos de produção e beneficiamento da matéria prima (KALTBACH et al., 2020).

#### 2.3.4 Proteínas

Foi encontrada ampla variação na composição de proteínas nos genótipos de erva-mate avaliados, com forte influência genética e um incremento de até 59,5%

entre os mesmos. A análise de componentes principais para a distribuição das concentrações de proteínas totais mostrou uma variação de 10,4 a 16,6 g 100g<sup>-1</sup> nos 54 genótipos analisados (GRÁFICO 2.7). O primeiro componente é capaz de descrever 49,3% da variação verificada na interação genótipo ano. Os resultados mostram-se acima dos verificados na literatura para folhas de erva-mate processadas industrialmente, ou seja, 7,97±0,17 g 100g<sup>-1</sup> (BERTÉ et al., 2011) para plantas de origem nativa (de 80 anos em ambiente sombreado) (9,52±0,42 g 100g<sup>-1</sup>) e para plantadas (de 16 anos a pleno sol) (10,06±0,12 g 100g<sup>-1</sup>) (FRIZON et al., 2018).

GRÁFICO 2.7 – ACP PARA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS EM 55 GENÓTIPOS DE ERVA-MATE PARA O PRIMEIRO COMPONENTE NOS ANOS DE 2015, 2016, 2017 E 2018. A PORCENTAGEM ENTRE PARÊNTESES REPRESENTA A VARIÇÃO DO COMPONENTE.

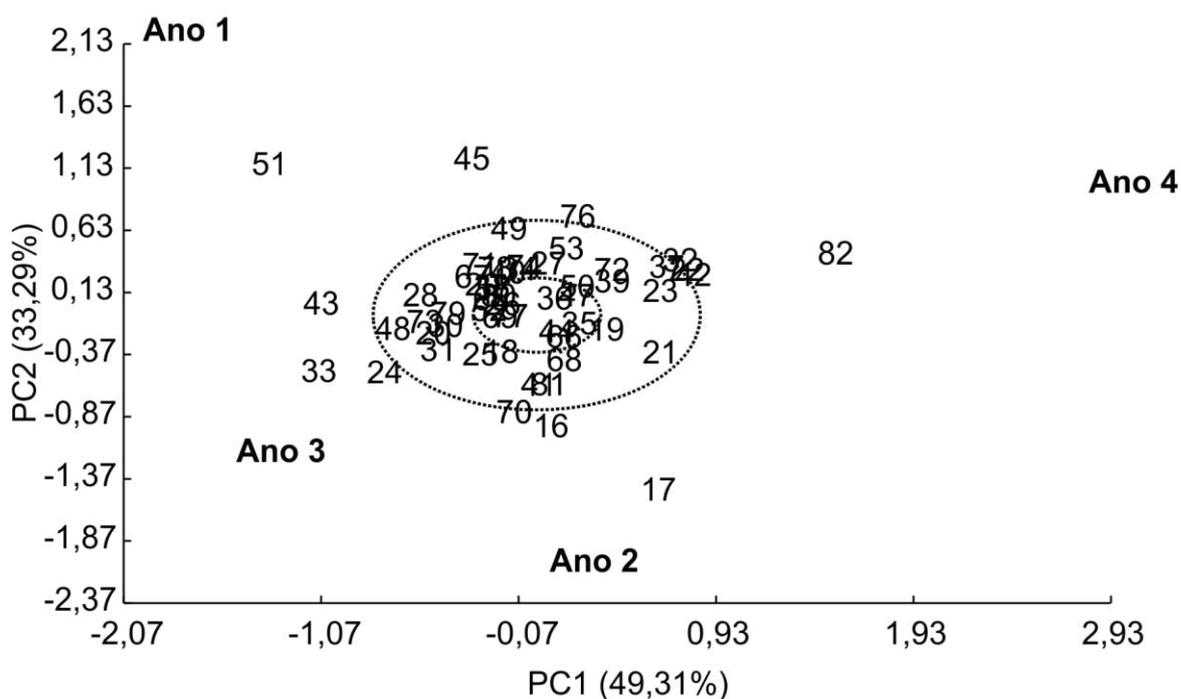


FONTE: O autor (2021).

A análise de componentes principais mostra que os dois primeiros componentes descrevem 82,6% da variância total. O eixo horizontal é responsável por 49,3% da variação, enquanto o vertical corresponde a 33,3% (GRÁFICO 2.8). Observa-se 29,6% dos genótipos estáveis a 1% de probabilidade de erro (EC26, 29, 34, 36, 38, 40, 47, 50, 52, 65, 67, 69, 74, 77, 78, 80) e 46,3% a 5% de probabilidade de erro (EC18, 19, 20, 21, 23, 25, 27, 28, 30, 31, 35, 37, 39, 41, 44, 48, 49, 53, 66,

68, 71, 72, 73, 79, 81). Como não estáveis, foram encontrados 24,1% dos genótipos (EC16, 17, 22, 24, 32, 33, 42, 43, 45, 51, 70, 76, 82) (GRÁFICO 2.8).

GRÁFICO 2.8 – ACP DA RELAÇÃO GENÓTIPO-AMBIENTE DE 55 GENÓTIPOS DE ERVA-MATE PARA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DE ACORDO COM PC1 E PC2. AS PORCENTAGENS ENTRE PARÊNTESIS REPRESENTAM A VARIÇÃO DE CADA COMPONENTE.



FONTE: O autor (2021).

O conjunto de dados compreende análises quantitativas de cafeína, teobromina, compostos fenólicos totais e proteínas em extratos aquosos de 58 progênies de erva-mate estabelecidas em teste combinado de procedências e progênies sob manejo padronizado, avaliados durante quatro anos sucessivos e agrupados de acordo com a interação genótipo ano por meio de análise de componentes principais. Os resultados sugerem que a variação na composição de compostos bioativos destas progênies sofre forte influência do genótipo e possui elevada estabilidade ao longo de ciclos sucessivos de produção.

Pela primeira vez, este estudo aborda a composição dos principais compostos bioativos em genótipos selecionados de *Ilex paraguariensis* e sua estabilidade ao longo de quatro anos sucessivos. Os resultados observados trazem elucidções às dúvidas relacionadas à ampla distribuição dos compostos bioativos em genótipos de erva-mate e sua estabilidade ao longo de diferentes colheitas.

Conhecer as características bioquímicas deve auxiliar na melhoria e evolução de programas de melhoramento e na ênfase em desenvolvimento de novos produtos com características estabelecidas e padronizadas para a indústria de alimentos e bebidas com erva-mate.

## 2.4 CONCLUSÕES

Os compostos fenólicos totais, as metilxantinas e as proteínas são os principais componentes da erva-mate, comprovado pela análise de ampla gama de genótipos melhorados. Com poucas exceções, os materiais genéticos de erva-mate são individualmente estáveis para concentração de compostos bioativos estabelecendo um enorme potencial de inovação para as espécies e suas vertentes alimentícias, farmacêuticas e cosméticas, requerendo estudos futuros quanto ao isolamento, purificação e identificação dos compostos bioativos.

## REFERÊNCIAS

- ANESINI, C. et al. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, n. 2, p. 299-304, 2012.
- AOAC - The Association of Official Analytical Chemists International. **Official Methods of Analysis**. 21. ed. v. 38, n. 8, p. 431, 2016.
- ASHIHARA, H. et al. Biosynthesis of caffeine in leaves of coffee. **Plant Physiology**, v. 111, n. 3, p. 747-753, 1996.
- ATHAYDE, M. L.; COELHO, G. C.; SCHENKEL, P. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 853-857, 2000.
- BERTÉ, K. A. et al. Chemical composition and antioxidant activity of yerba-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) extract as obtained by spray drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 5523-5527, 2011.
- BRASIL. **Resolução RDC n. 277, de 22 de setembro de 2005**. Regulamento técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 set. 2005.
- BUTIUK, A. P. et al. Study of the chlorogenic acid content in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): effect of plant fraction, processing step and harvesting season. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 3, n. 1, p. 27-33, 2016.
- CARDOZO, E. L. et al. Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 7, p. 553-558, 2007.
- CARDOZO JUNIOR, E. L.; MORAND, C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 440-454, 2016.
- CROCE, D. M. Características físico-químicas de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) no estado de Santa Catarina. **Ciência Florestal**, v. 12, n. 2, p. 107-113, 2002.
- DEBAT, H. J. et al. Exploring the genes of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) by NGS and de novo transcriptome assembly. **Plos one**, v. 9, n. 10, p. e109835, 2014.
- DUARTE, M. M. et al. Caffeinated and decaffeinated mate tea: Effect of toasting on bioactive compounds and consumer acceptance. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 15, p. 1-10, 2020.

FRIZON, C. N. T. et al. Novel beverages of yerba-mate and soy: Bioactive compounds and functional properties. **Beverages**, v. 4, n. 1, p. 21, 2018.

GABRIEL, K. R. Biometrika trust the biplot graphic display of matrices with application to principal component analysis. **Biometrika**, v. 58, n. 3, p. 453-467, 1971.

GAN, R. Y. et al. Health benefits of bioactive compounds from the genus *Ilex*, a source of traditional caffeinated beverages. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1682, 2018.

GIL, M.; WIANOWSKA, D. Chlorogenic acids – their properties, occurrence and analysis. **Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska**, v. 72, n. 1, p. 61-104, 2017.

GODOY, R. C. B.; CHAMBERS IV, E.; YANG, G. Development of a preliminary sensory lexicon for mate tea. **Journal of Sensory Studies**, p. e12570, 2020.

GÓMEZ-JUARISTI, M. et al. Absorption and metabolism of yerba mate phenolic compounds in humans. **Food Chemistry**, v. 240, p. 1028-1038, 2018.

GONZÁLEZ ARBELÁEZ, L. F. et al. Effect of an *Ilex paraguariensis* (yerba mate) extract on infarct size in isolated rat hearts: the mechanisms involved. **Food & Function**, v. 7, p. 816-824, 2016.

GUGLIUCCI, A.; BASTOS, D. H. M. Chlorogenic acid protects paraoxonase 1 activity in high density lipoprotein from inactivation caused by physiological concentrations of hypochlorite. **Fitoterapia**, v. 80, p. 138-142, 2009.

GULLÓN, B. et al. Yerba mate waste: A sustainable resource of antioxidant compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 113, p. 398-405, 2018.

HECK C. I.; MEJIA, E. G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. R138-R151, 2007.

HECKMAN, M. A.; Weil, J.; Mejia, E. G. Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) in foods: A comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 3, p. 77-87, 2010.

HELM, V. C. et al. **Efeito do solvente na extração de teobromina e cafeína em progênies de erva-mate**. Colombo: Embrapa Florestas, 2015. 6 p.

LIMA, G. G. et al. Prediction of yerba mate caffeine content using near infrared spectroscopy. **Spectroscopy Letters**, v. 52, n. 5, p. 282-287, 2019.

KALTBACH, P. et al. New HPTLC methods for analysis of major bioactive compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) tea. **Journal of Food Composition and Analysis**, p. 103568, 2020.

MANDEL, J. American society for quality a new analysis of variance model for non-additive data a new analysis of variance model for non-additive data.

**Technometrics**, v. 13, n. 1, p. 1-18, 1971.

MOHANPURIA, P.; KUMAR, V.; YADAV, S. K. Tea caffeine: Metabolism, functions, and reduction strategies. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, p. 275-287, 2010.

NAKAMURA, K. L. et al. Genetic variation of phytochemical compounds in progenies of *Ilex paraguariensis*. **Crop Breeding Applied Biotech**, v. 9, p. 116-123, 2009.

OELLIG, C.; SCHUNCK, J.; SCHWACK, W. Determination of caffeine, theobromine and theophylline in Mate beer and Mate soft drinks by high-performance thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1533, p. 208-212, 2018.

POSWAL, F. S. et al. Herbal teas and their health benefits: A scoping review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 74, p. 266-276, 2019.

SCHERER, R. et al. Inheritance studies of caffeine and theobromine content of Mate (*Ilex paraguariensis*) in Misiones, Argentina. **Euphytica**, v. 126, n. 2, p. 203-210, 2002.

SCHUHLI, G. S.; PENTEADO JUNIOR, J. F.; WENDLING, I. **Descritores mínimos em cultivares de espécies florestais: uma contribuição para erva-mate**. Colombo: Embrapa Florestas, 2019. 22 p.

SILVEIRA, T. F. F. et al. Phenolic compounds from yerba mate based beverages – A multivariate optimisation. **Food chemistry**, v. 190, p. 1159-1167, 2016.

SINGLETON, V.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

STURION, J. A.; RESENDE, M. D. V. **Melhoramento genético da erva-mate**. Colombo: Embrapa Florestas, 2010. 274 p.

TFOUNI, S. A. V. et al. Caffeine in teas: levels, transference to infusion and estimated intake. **Food Science and Technology**, n. AHEAD, p. 0-0, 2018.

VALERGA, J.; RETA, M.; LANARI, M. C. Polyphenol input to the antioxidant activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts. **Food Science and Technology**, v. 45, n. 1, p. 28-35, 2012.

WENDLING, I.; STURION, J. A.; STUEPP, C. A. Early selection and classification of yerba mate progenies. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, n. 03, 2018.

ZHU, B. et al. Caffeine content and related gene expression: novel insight into caffeine metabolism in camellia plants containing low, normal, and high caffeine concentrations. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 67, n. 12, p. 3400-3411, 2019.

## CAPÍTULO II

### 3 EFEITO DO GENÓTIPO, DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E DA COMPOSIÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS NA FORMAÇÃO DE RAÍZES ADVENTÍCIA EM *Ilex paraguariensis*

#### RESUMO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) vem se apresentando como uma excelente fonte de compostos bioativos. A disponibilidade de genótipos que proporcionem maiores concentrações destes compostos possibilita a mudança no modelo de consumo e produção, passando, impreterivelmente pela silvicultura clonal. O presente estudo avaliou as concentrações de cafeína, teobromina, compostos fenólicos totais e proteínas em 22 genótipos de erva-mate e sua correlação com o enraizamento adventício e vigor radicial e vegetativo. Os resultados indicam elevada variabilidade genética para os principais compostos bioativos, bem como para o enraizamento adventício e vigor radicial e vegetativo. Embora não tenham sido encontradas evidências de que compostos bioativos afetem o enraizamento adventício ou o vigor na formação de raízes ou vegetação em estacas de *Ilex paraguariensis*, foi encontrada uma grande variação de concentrações dos principais compostos bioativos; o resultado consequentemente identificou materiais genéticos com alto potencial rizogênico para variáveis de interesse, especialmente baixas e altas concentrações de cafeína.

Palavras-chave: Compostos bioativos. Erva-mate descafeinada. Enraizamento adventício. HPLC. Melhoramento genético. Metilxantinas. Propagação vegetativa.

#### ABSTRACT

Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) has emerged as an excellent source of bioactive compounds. The availability of genotypes providing higher concentrations of these compounds makes it possible to change models of consumption and production through clonal forestry. This study evaluated concentrations of caffeine,

theobromine, total phenolic compounds, and proteins in 22 genotypes of yerba mate, along with correlations between these characteristics and adventitious rooting and vigor of root and vegetation formation. Although no evidence was found that bioactive compounds affected adventitious rooting or vigor in the formation of roots or vegetation in cuttings of *Ilex paraguariensis*, a wide variety of concentrations of the main biochemical components was found; the result consequently identified genetic materials with high rhizogenic potential for variables of interest, especially low and high concentrations of caffeine.

Keywords: Bioactive compounds. Decaffeinated yerba mate. Adventitious rooting. HPLC. Genetic improvement. Methylxanthines. Vegetative propagation.

### 3.1 INTRODUÇÃO

*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. é a espécie florestal não madeireira de maior expressão na silvicultura brasileira. Plantada principalmente no sul do Brasil com o objetivo de produção de folhas, destinadas quase sempre à produção de bebidas tônicas, não alcoólicas e estimulantes, como o chimarrão, tererê e chá mate. Na Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai, seu consumo se tornou expressão cultural, com influência direta na cadeia de produção, alcançando em algumas regiões 10 kg pessoa<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> (GAN et al., 2018). Seu potencial de consumo vai além das tradicionais bebidas consumidas na América do Sul, trata-se de um produto competitivo em termos de preço, qualidade, conformidade regulatória e inovação (GODOY et al., 2020), com disponibilidade de recursos genéticos capazes de subsidiar a indústria e o surgimento de novos produtos, direcionando assim a ciência e inovação (WENDLING et al., 2018).

Sustentado por pesquisas que comprovam os efeitos benéficos da erva-mate à saúde humana (ver mais em CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016; CROGE et al., 2020), houve o aumento no interesse e consumo a nível mundial, gerando assim, a necessidade de se investir em materiais genéticos que possam oferecer maiores concentrações de alguns compostos bioativos (ANESINI et al., 2012; DEBAT et al., 2014; GONZÁLEZ ARBELÁEZ et al., 2016; CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016; LIMA et al., 2019). Os efeitos positivos da ingestão de erva-mate abrangem uma grande dinâmica de pesquisas e com indícios

fortes de seu estímulo à redução de peso e gordura corporal (TABRIZI et al., 2018; LUÍS et al., 2019), associado principalmente a seu efeito termogênico (ZAPATA et al., 2020) e de seus efeitos benéficos relacionados às suas propriedades antioxidantes (BLUM-SILVA et al., 2015; MATEOS et al., 2018; BECKER et al., 2019; ZIELINSKI et al., 2020).

A busca por esses materiais exige a seleção de genótipos com características bioquímicas que possam suprir as demandas de mercado, com boa produtividade e aptos a multiplicação vegetativa, viabilizando assim, a produção de biomassa, em quantidade e qualidade adequada à indústria. A viabilização da multiplicação massal destes genótipos envolve o resgate vegetativo (STUEPP et al., 2018), sendo fortemente influenciado pelas características genéticas das matrizes (MAYER et al., 2020). Sua utilização traz a possibilidade de maiores ganhos de seleção, otimização de práticas de manejo e melhor qualidade do produto final.

Com a hipótese de que a composição de compostos bioativos (cafeína, teobromina, compostos fenólicos totais e proteínas), o morfotipo, o sexo e a produtividade das matrizes pode influenciar a capacidade de enraizamento adventício (EA) e o vigor das estacas, foram avaliados genótipos adultos de erva-mate, objetivando explicar a relação entre o EA e as demais características.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Material vegetal e preparação de amostra

Foram selecionados 22 genótipos de erva-mate com base em sua produtividade (biomassa comercial), morfotipo foliar e sexo, provenientes de um teste de procedências e progênies instalado no município de Ivaí, Paraná, Brasil (25°01'S e 50°48'W, altitude de 600 m, precipitação média anual de 1500-1600 mm) (STURION; RESENDE, 2010). O referido teste foi implantado em março de 1997 com 126 progênies no espaçamento de 3 m x 2 m e condições de pleno sol, recebendo podas bianuais para colheita de galhos e folhas.

Em agosto de 2015, 24 meses após a colheita anterior, realizou-se poda drástica nos 22 genótipos selecionados. As coletas de brotações para os experimentos de resgate vegetativo foram realizadas em 01/12/2015 (Período 1) e

24/02/2016 (Período 2). Em agosto de 2016 foram coletadas folhas maduras, livres de injúrias, em toda a circunferência da copa das árvores a uma altura aproximada de 1,6 m, armazenadas em embalagens do tipo “kraft”, identificadas e encaminhadas ao Laboratório de Tecnologia de Produtos não-madeiráveis da Embrapa Florestas para determinação dos compostos bioativos e bioativos. A identificação dos morfotipos individuais considerou a descrição de Wendling et al. (2016).

### 3.2.2 Determinação dos compostos bioativos e caracterização dos genótipos

As amostras de folhas foram previamente secas em forno micro-ondas (potência 1.500 W, frequência 2.450 MHz), por aproximadamente 4 minutos, alternando a posição das folhas em intervalos de 60 segundos, com a finalidade de homogeneizar a secagem (HELM et al., 2015). Posteriormente, as folhas foram trituradas, peneiradas a 0,5 mm, embaladas e armazenadas em freezer (-20 °C).

Para a determinação do teor de cafeína, teobromina e compostos fenólicos totais, foram preparados extratos aquosos contendo 0,1 g de material vegetal em 50 mL de água ultrapura tipo I aquecida até sua temperatura de ebulição (100 °C sob pressão de 1 atm). Em seguida, os extratos foram homogeneizados em ultrassom (Ultracleaner 1.400 A) por 30 min, filtrados e o volume completado para 100 mL em balão volumétrico, resfriados a temperatura ambiente e congelados (-20 °C) (HELM et al., 2015).

As análises de umidade e proteínas totais seguiram as metodologias oficiais da Association of Official Analytical Chemists International (AOAC, 2016). O teor de umidade foi determinado pelo método termo-gravimétrico, a 105 °C, até massa constante e teor de proteína total pelo método micro-Kjeldahl, utilizando o teor de nitrogênio total multiplicado pelo fator de conversão 6,25 para obtenção do teor de proteínas totais.

As metilxantinas, cafeína e teobromina foram quantificadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), com a utilização de cromatógrafo líquido Shimadzu® (UFLC) controlado pelo software LC Solution e equipado com injetor automático e detector de UV (SPD-20A). Para a separação dos compostos utilizou-se a coluna Shim-Pack CLC-ODS (M)® (250 x 4,6 mm, Ø 5 µm), com

pré-coluna Shim-Pack CLC G-ODS® (10 x 4,0 mm, Ø 5 µm), ambos Shimadzu® (HELM et al., 2015).

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi determinada segundo a metodologia espectrofotométrica de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965), com modificações. Em balão volumétrico foram adicionados 0,1 mL de extrato, 6,0 mL de água destilada e 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu, agitando-se por 1 minuto. Após, adicionou-se 2 mL de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 15%, agitando-se por mais 30 segundos. O volume final foi ajustado com água destilada para 10 mL. A reação permaneceu no escuro, em temperatura ambiente, por 2 horas e posteriormente as absorbâncias foram tomadas em espectrofotômetro a 760 nm. A curva analítica foi obtida com compostos fenólicos totais (ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzóico) entre as concentrações de 0,25 e 13 g L<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0,9988) e os resultados expressos em g, equivalentes aos compostos fenólicos totais por cem gramas de amostra seca (g EAG 100g<sup>-1</sup>).

Os genótipos foram caracterizados quanto ao sexo, morfotipo e produtividade individual, seguindo os critérios estabelecidos em Wendling et al. (2016) (TABELA 3.1).

TABELA 3.1 – CARACTERIZAÇÃO DOS 22 GENÓTIPOS DE *Ilex paraguariensis*, 24 MESES APÓS A PODA ANTERIOR, DE ACORDO COM A PROCEDÊNCIA (P), SEXO (S), MORFOTIPO (M), BIOMASSA COMERCIAL (BC), CAFEÍNA (C), TEOBROMINA (TB), COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT) E PROTEÍNAS TOTAIS (PT).

Genótipo	ID	P	S	M	BC	C	TB	CFT	PT
I3	EC17	Ivaí-PR	M	F	12,30	0,0549	0,5337	8,694	14,095
I4	EC18	Ivaí-PR	M	C	18,80	0,0765	0,7131	8,933	14,723
I5	EC19	Ivaí-PR	F	F	23,70	0,0621	0,7473	8,318	12,727
I7	EC20	Barão de Cotegipe-RS	NI	E	16,00	0,3555	0,3243	8,514	13,364
I8	EC21	Barão de Cotegipe-RS	F	S	17,90	0,5560	0,0003	8,491	15,850
I10	EC22	Ivaí-RS	F	F	29,00	0,0405	0,0542	8,521	12,159
I16	EC26	Quedas do Iguaçu-PR	F	S	21,50	1,1295	0,0891	8,669	15,307
I17	EC27	Quedas do Iguaçu-PR	F	S	27,40	1,6474	0,1459	8,510	15,326
I19	EC29	Ivaí-PR	M	F	18,30	0,0883	0,0854	8,380	13,690
I20	EC30	Ivaí -PR	F	C	8,95	0,0362	0,0189	8,810	14,605
I21	EC31	Barão de Cotegipe-RS	M	S	15,00	1,2680	0,0233	8,489	16,072
I23	EC33	Quedas do Iguaçu-PR	M	S	23,00	0,9746	0,0111	8,513	14,866
I28	EC36	Cascavel-PR	F	S	22,10	1,0631	0,0301	8,423	14,895
I30	EC37	Ivaí-PR	M	F	18,00	1,7771	0,0031	8,826	14,851
I31	EC38	Ivaí-PR	M	F	16,30	1,3670	0,0020	8,578	15,902
I32	EC39	Barão de Cotegipe-RS	F	E	22,00	0,3411	0,0534	8,365	13,779
I34	EC40	Barão de Cotegipe-RS	F	S	41,80	1,4502	0,1343	8,570	16,892
I41	EC44	Pinhão-PR	F	C	8,80	0,0400	0,8091	8,639	14,556
I42	EC45	Antônio Olinto-PR	M	F	15,00	1,9379	0,0139	8,363	14,166
I47	EC48	Ivaí-PR	M	C	7,90	1,9036	0,0532	8,551	16,306
I48	EC49	Ivaí-PR	F	C	6,20	2,2735	0,1122	8,516	14,451
I49	EC50	Ivaí-PR	M	C	8,10	0,0597	0,1719	8,528	11,867
Média		-	-	-	18,09	0,8410	0,1877	8,555	14,566
DP		-	-	-	8,10	0,7500	0,2562	0,153	1,266

FONTES: O autor (2021). ID (Identificação no Projeto de Pesquisa “Desenvolvimento e disponibilização de material genético melhorado de erva-mate - Fase III” da Embrapa Florestas). A Biomassa comercial representa folhas e galhos menores que 7 mm. Em sexo, M (macho), F (fêmea) e NI (não identificado). Em morfotipo, F (verde fosco), C (cinza), E (verde escuro) e S (sassafrás).

### 3.2.3 Resgate vegetativo de materiais genéticos selecionados

Os experimentos de enraizamento foram conduzidos entre os meses de dezembro/2015 e junho/2016, nas dependências do Laboratório de Propagação de Espécies Florestais da Embrapa Florestas, em Colombo-PR (25°20' S e 49°14' W, 950 m). Segundo a classificação de Köppen, o clima da região é temperado, do tipo

Cfb, com temperatura do mês mais frio entre -3 e 18 °C, sempre úmido, com chuvas bem distribuídas ao longo do ano e temperatura média do mês mais quente inferior a 22 °C (ALVARES et al., 2013).

As brotações foram obtidas a partir de 22 genótipos de erva-mate, coletadas pela manhã, umedecidas, acondicionadas em caixas de poliestireno contendo gelo e transportadas até o local de instalação dos experimentos. Foram preparadas estacas caulinares com  $12 \pm 0,5$  cm de comprimento, corte em bisel na base e reto acima da última gema apical, mantendo-se duas folhas com a área reduzida a 50% de sua superfície original. As estacas foram acondicionadas em bandejas com água e desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (0,5%), por 10 minutos, posteriormente lavadas pelo mesmo período em água corrente e, por fim tratadas com solução de fungicida a base de Derosal® 1 mL L<sup>-1</sup>, durante 15 minutos. Em seguida as estacas foram tratadas em solução hidroalcolica (50% v/v) de ácido indolbutírico (AIB) (4.000 g L<sup>-1</sup>), por imersão rápida por 10 segundos. Para o plantio das estacas foram utilizadas caixas plásticas preenchidas com vermiculita de granulometria fina, sendo a base das estacas inserida em cerca de 2 cm de profundidade e, posteriormente, acondicionadas em casa de vegetação climatizada.

Os experimentos foram implantados segundo um delineamento inteiramente casualizado, num modelo de parcelas subdivididas no tempo, com duas coletas, 22 genótipos e cinco repetições de 20 estacas por unidade experimental. Transcorridos 90 dias da instalação dos experimentos, foram avaliadas a porcentagem de enraizamento (estacas vivas com raízes de pelo menos 2 mm de comprimento); número médio de raízes por estaca; comprimento médio de raízes/estaca (cm); comprimento total de raízes/estaca (cm); número médio de brotos em estacas enraizadas (brotos > 0,5 cm); número de brotos em estacas não enraizadas (brotos > 0,5 cm); estacas brotadas com raízes (%); estacas brotadas sem raízes (%) e total de estacas brotadas (%).

#### 3.2.4 Análises estatísticas

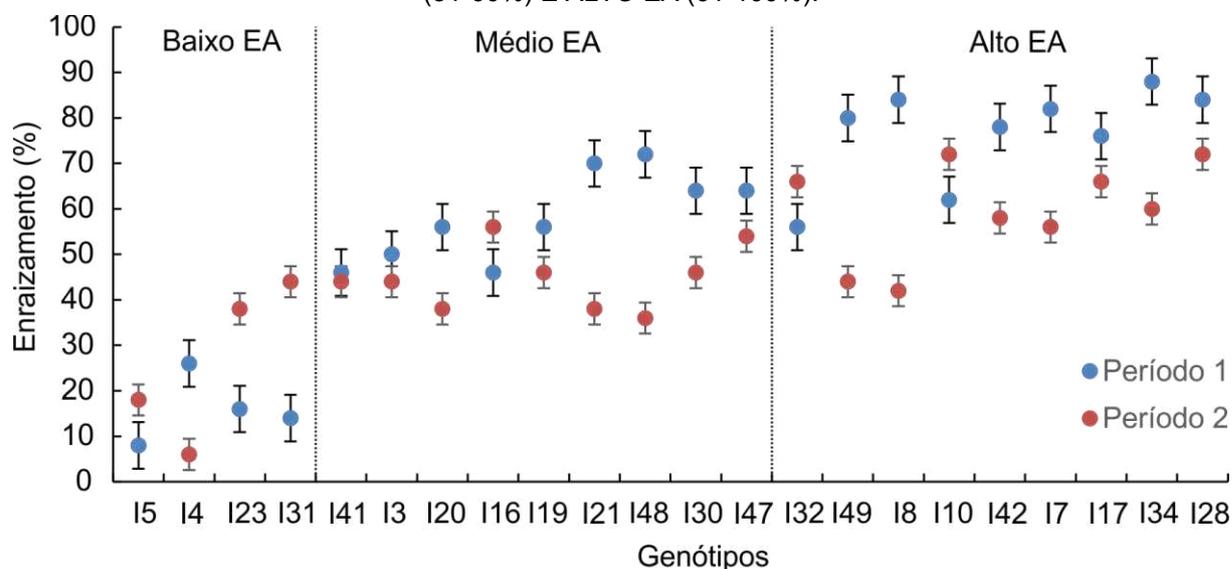
As variâncias dos tratamentos foram avaliadas quanto à homogeneidade pelo teste de Bartlett, e as variáveis que apresentaram diferenças significativas pelo teste F tiveram suas médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Para verificar a relação entre as características ligadas ao EA,

produtividade e composição de compostos bioativos procedeu-se a análise de correlação de Pearson ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ) e análise multivariada pelo método de análise de componentes principais (ACP).

### 3.3 RESULTADOS

Todos os genótipos apresentaram enraizamento, embora com grande variação entre os mesmos. A percentagem média de enraizamento variou de 13% (I5) a 78% (I28). Houve interação entre os genótipos e os períodos de avaliação, com efeito significativo dos períodos sobre o enraizamento. No primeiro período I8, I28 e I34 mostraram-se superiores apenas a I3, I4, I5, I16, I23, I31 e I41. No segundo período, I10 e I28 mostraram-se superiores a I4, I5, I20, I21, I23 e I48 (GRÁFICO 3.1). As médias de enraizamento no primeiro período foram maiores que no segundo. Os genótipos I3, I5, I10, I16, I17, I19, I28, I32, I41 e I47 não apresentaram diferenças significativas entre os dois períodos de avaliação (GRÁFICO 3.1). A fim de facilitar o entendimento da variação no EA (enraizamento adventício) de materiais genéticos de erva-mate, agrupou-se os genótipos de acordo com a média de enraizamento nos dois períodos em: baixo EA (0-30%), médio EA (31-60%) e alto EA (61-100%) (GRÁFICO 3.1).

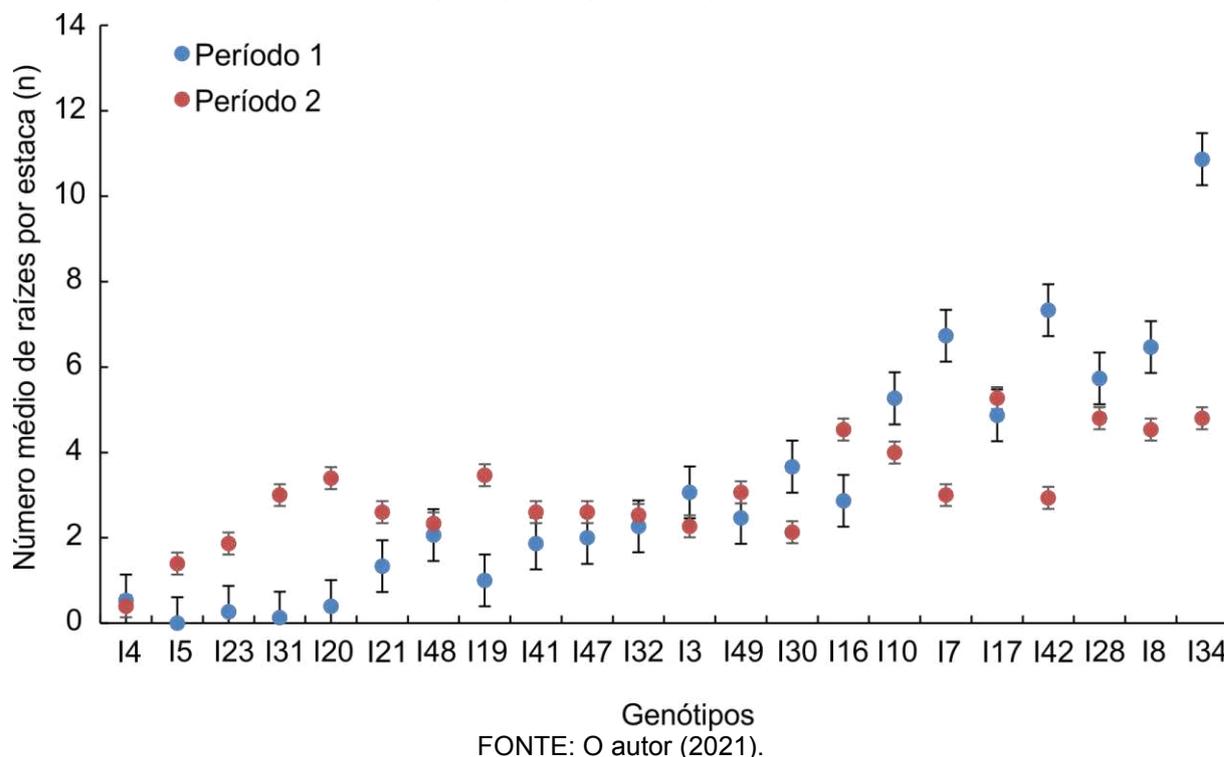
GRÁFICO 3.1 - RESPOSTAS DO ENRAIZAMENTO ADVENTÍCIO (EA) DE 22 GENÓTIPOS DE ERVA-MATE COM BASE EM DOIS PERÍODOS INDEPENDENTES (ENTRE DEZEMBRO/2015 E JUNHO/2016). AS BARRAS INDICAM O ERRO PADRÃO DA MÉDIA. BAIXO EA (0-30%) MÉDIO EA (31-60%) E ALTO EA (61-100%).



FONTE: O autor (2021).

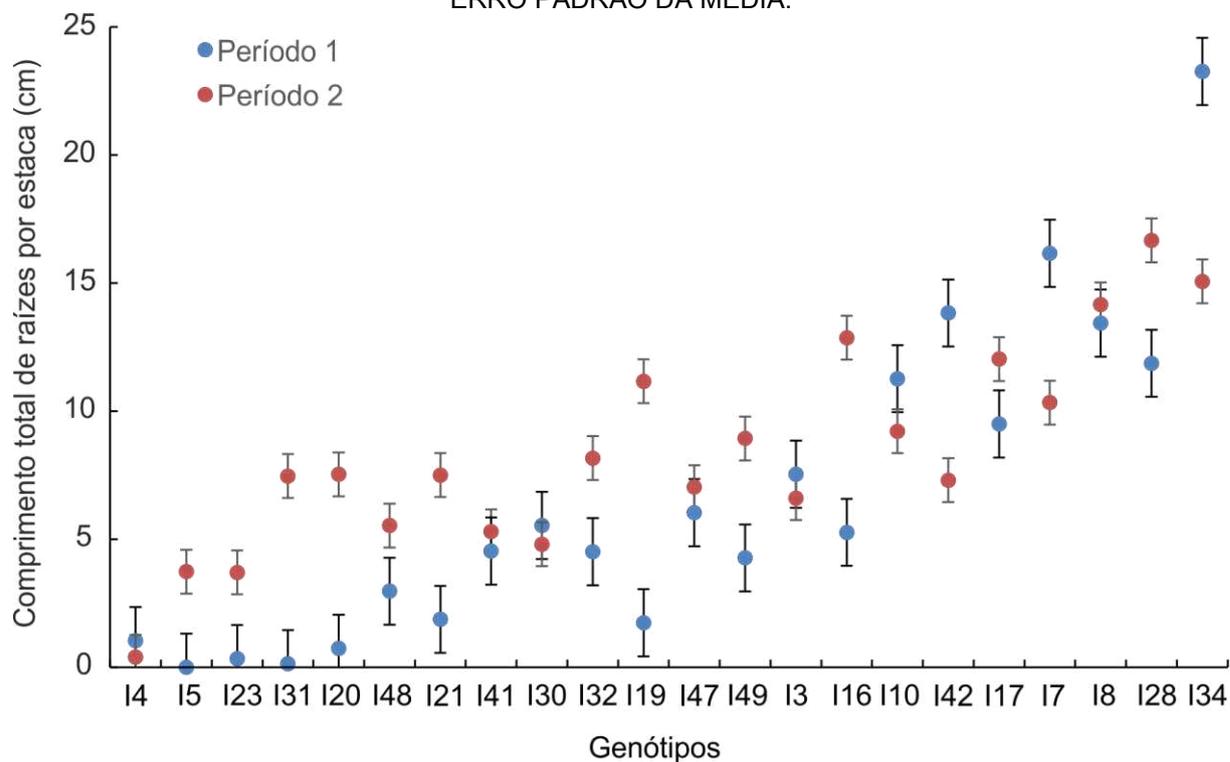
O número médio de raízes (GRÁFICO 3.2) e o comprimento total de raízes por estaca (GRÁFICO 3.3) mostraram-se altamente influenciados pelo genótipo. Ambas as variáveis apresentaram correlação positiva entre si e com o EA (TABELA 3.3). Para o número de raízes, no primeiro período, o genótipo I34 não mostrou diferença significativa em relação aos genótipos I42, I7 e I8, diferindo, porém, dos demais. Já no segundo período, o genótipo I17 mostrou-se significativamente superior apenas ao I4 (GRÁFICO 3.2). Na comparação dos dois períodos, apenas os genótipos I7, I19, I20, I31, I34 e I42 apresentaram diferenças significativas.

GRÁFICO 3.2 - NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES DE 22 GENÓTIPOS DE ERVA-MATE COM BASE EM DOIS PERÍODOS INDEPENDENTES (ENTRE DEZEMBRO/2015 E JUNHO/2016). AS BARRAS INDICAM O ERRO PADRÃO DA MÉDIA.



Para o comprimento total de raízes por estaca o genótipo I34 não mostrou diferença significativa em relação a I7, I42, I8, I10 e I28, sendo superior aos demais no primeiro período de avaliação; já no segundo período os genótipos I8 e I28 mostraram-se superiores apenas a I4 (GRÁFICO 3.3). Na comparação entre os dois períodos, apenas os genótipos I16, I19, I31 e I34 apresentaram diferenças significativas entre as médias.

GRÁFICO 3.3 - COMPRIMENTO TOTAL DE RAÍZES DE 22 GENÓTIPOS DE ERVA-MATE EM DOIS PERÍODOS DE AVALIAÇÃO (ENTRE DEZEMBRO/2015 E JUNHO/2016). AS BARRAS INDICAM O ERRO PADRÃO DA MÉDIA.



FONTE: O autor (2021).

O genótipo I7 mostrou-se superior apenas aos genótipos I4, I5, I20, I23 e I31 para o comprimento médio de raízes. Para o percentual de estacas brotadas, o genótipo I34 foi superior apenas a I41 e I49. A distribuição do percentual de estacas brotadas entre estacas enraizadas e não enraizadas mostrou maior proporção de brotação em estacas não enraizadas, onde os genótipos I20 e I23 mostraram-se superiores a I7, I8, I17, I28, I34 e I42. Entre as estacas brotadas com presença de raízes o genótipo I34 mostrou-se igual estatisticamente a I7, I8, I28 e I42 (TABELA 3.2).

TABELA 3.2 - COMPRIMENTO MÉDIO DE RAÍZES (CMR), ESTACAS BROTADAS (EB), ESTACAS BROTADAS SEM RAIZ (EB\*) E ESTACAS BROTADAS COM RAIZ (EB\*\*).

Clone	CMR (cm)		EB (%)		EB* (%)		EB** (%)	
I3	1,96	abcd	78,00	ab	58,00	abc	20,00	Efgh
I4	0,68	d	54,00	ab	50,00	abcd	4,00	Fgh
I5	1,10	cd	52,00	ab	52,00	abcd	0,00	H
I7	2,70	a	76,00	ab	14,00	cde	62,00	Abcd
I8	2,35	abc	74,00	ab	0,00	e	74,00	Ab
I10	2,04	abcd	72,00	ab	36,00	abcde	36,00	Defg
I16	1,87	abcd	66,00	ab	44,00	abcde	22,00	Efgh
I17	2,06	abcd	70,00	ab	18,00	bcde	52,00	Bcde
I19	2,00	abcd	70,00	ab	60,00	ab	10,00	Fgh
I20	1,17	bcd	68,00	ab	66,00	a	2,00	gh
I21	1,74	abcd	64,00	ab	52,00	abcd	12,00	fgh
I23	1,01	cd	68,00	ab	66,00	a	2,00	gh
I28	2,68	ab	74,00	ab	14,00	cde	60,00	abcd
I30	1,70	abcd	66,00	ab	46,00	abcd	20,00	efgh
I31	1,16	cd	50,00	ab	48,00	abcd	2,00	gh
I32	2,30	abc	68,00	ab	44,00	abcde	24,00	efgh
I34	2,68	ab	88,00	a	0,00	e	88,00	a
I41	1,50	abcd	48,00	b	34,00	abcde	14,00	fgh
I42	2,05	abcd	80,00	ab	8,00	de	72,00	abc
I47	2,07	abcd	72,00	ab	50,00	abcd	22,00	efgh
I48	1,68	abcd	62,00	ab	24,00	abcde	38,00	cdef
I49	2,19	abcd	48,00	b	26,00	abcde	22,00	efgh

FONTE: O autor (2021). Médias seguidas da mesma letra na mesma variável não diferem entre si a 5% pelo teste de Tukey.

Foi possível observar elevada correlação entre o percentual de enraizamento e as variáveis biométricas, com exceção do total de estacas brotadas. No entanto, não foram verificadas correlações significativas entre os compostos bioativos e produtividade e o percentual de enraizamento (TABELA 3.3).

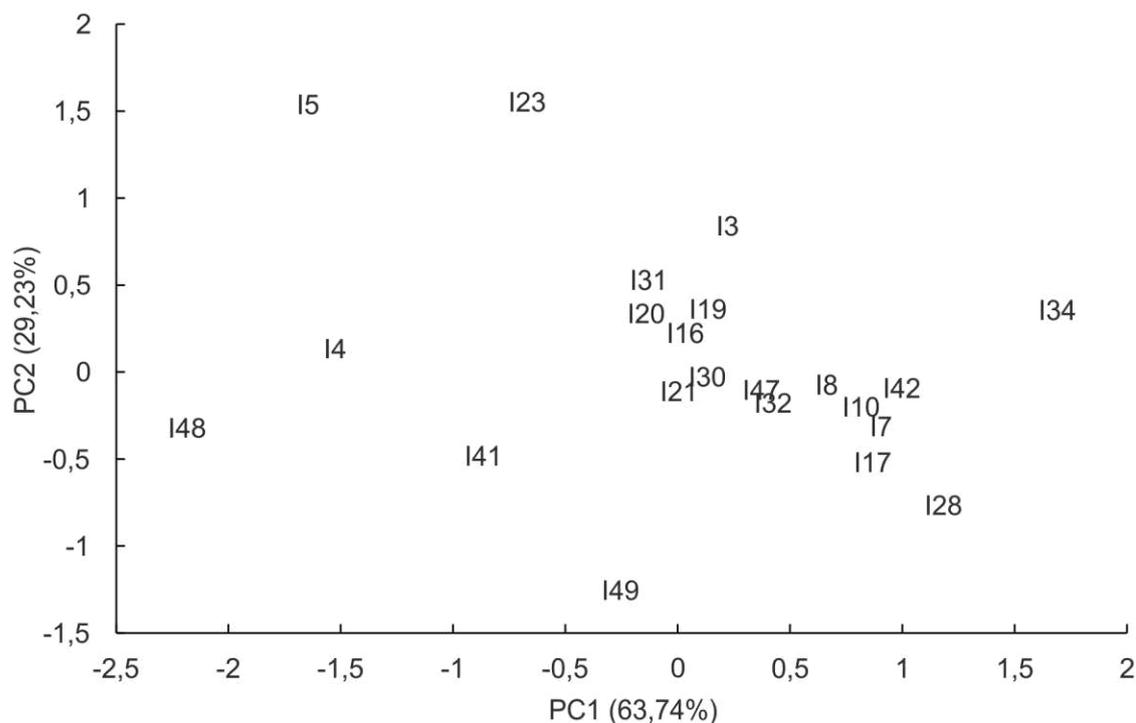
TABELA 3.3 - COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE O PERCENTUAL DE ENRAIZAMENTO E AS VARIÁVEIS BIOMÉTRICAS AVALIADAS NAS ESTACAS.

	E	NR	CTR	CMR	NB <sup>1</sup>	NB <sup>2</sup>	EB <sup>1</sup>	EB <sup>2</sup>	EBT	M	C	TB	CFT
<b>NR</b>	0,83	1,00											
<b>CTR</b>	0,82	0,98	1,00										
<b>CMR</b>	0,90	0,81	0,87	1,00									
<b>NB<sup>1</sup></b>	0,78	0,91	0,86	0,72	1,00								
<b>NB<sup>2</sup></b>	-0,60	-0,68	-0,72	-0,67	-0,47	1,00							
<b>EB<sup>1</sup></b>	0,77	0,94	0,92	0,79	0,91	-0,71	1,00						
<b>EB<sup>2</sup></b>	-0,68	-0,83	-0,80	-0,68	-0,86	0,65	-0,93	1,00					
<b>EBT</b>	0,36	0,52	0,55	0,43	0,26	-0,33	0,37	-0,12	1,00				
<b>M</b>	0,17	0,52	0,51	0,25	0,35	-0,26	0,39	-0,28	0,49	1,00			
<b>C</b>	0,33	0,26	0,18	0,15	0,35	-0,21	0,35	-0,30	-0,15	0,03	1,00		
<b>TB</b>	-0,55	-0,34	-0,31	-0,35	-0,27	0,33	-0,28	0,13	-0,21	-0,10	-0,51	1,00	
<b>CFT</b>	-0,29	-0,22	-0,27	-0,43	-0,30	0,03	-0,30	0,30	-0,06	-0,18	-0,09	0,22	1,00
<b>PT</b>	0,11	0,21	0,22	0,01	0,12	-0,29	0,21	-0,12	0,18	0,17	0,58	-0,28	0,23

FONTE: O autor (2021). Enraizamento (E), número de raízes (NR), comprimento total de raízes (CTR), comprimento médio de raízes (CMR), número de brotos em estacas enraizadas (NB1 com raízes), número de brotos em estacas não enraizadas (NB2), estacas brotadas com raízes (EB1), estacas brotadas sem raízes (EB2), total de estacas brotadas (EBT), morfotipo (M), cafeína (C), teobromina (TB), compostos fenólicos totais (CFT), proteínas totais (PT).

A análise de componentes principais para as variáveis E, NR, CMR, EBT e BC mostra que os dois primeiros componentes descrevem 93,0% da variância total. O eixo horizontal é responsável por 63,7% da variação, enquanto o eixo vertical corresponde a 29,2% (GRÁFICO 3.4). A distribuição dos genótipos ao longo dos eixos mostra a grande variação nos traços quantitativos avaliados. Os genótipos localizados à direita do gráfico estão intimamente ligados à produtividade em biomassa e aptidão ao EA e a brotação. O topo direito está intimamente relacionado à produtividade dos genótipos e à emissão de brotações nas estacas, já a parte inferior direita está intimamente ligada ao EA e ao número de raízes.

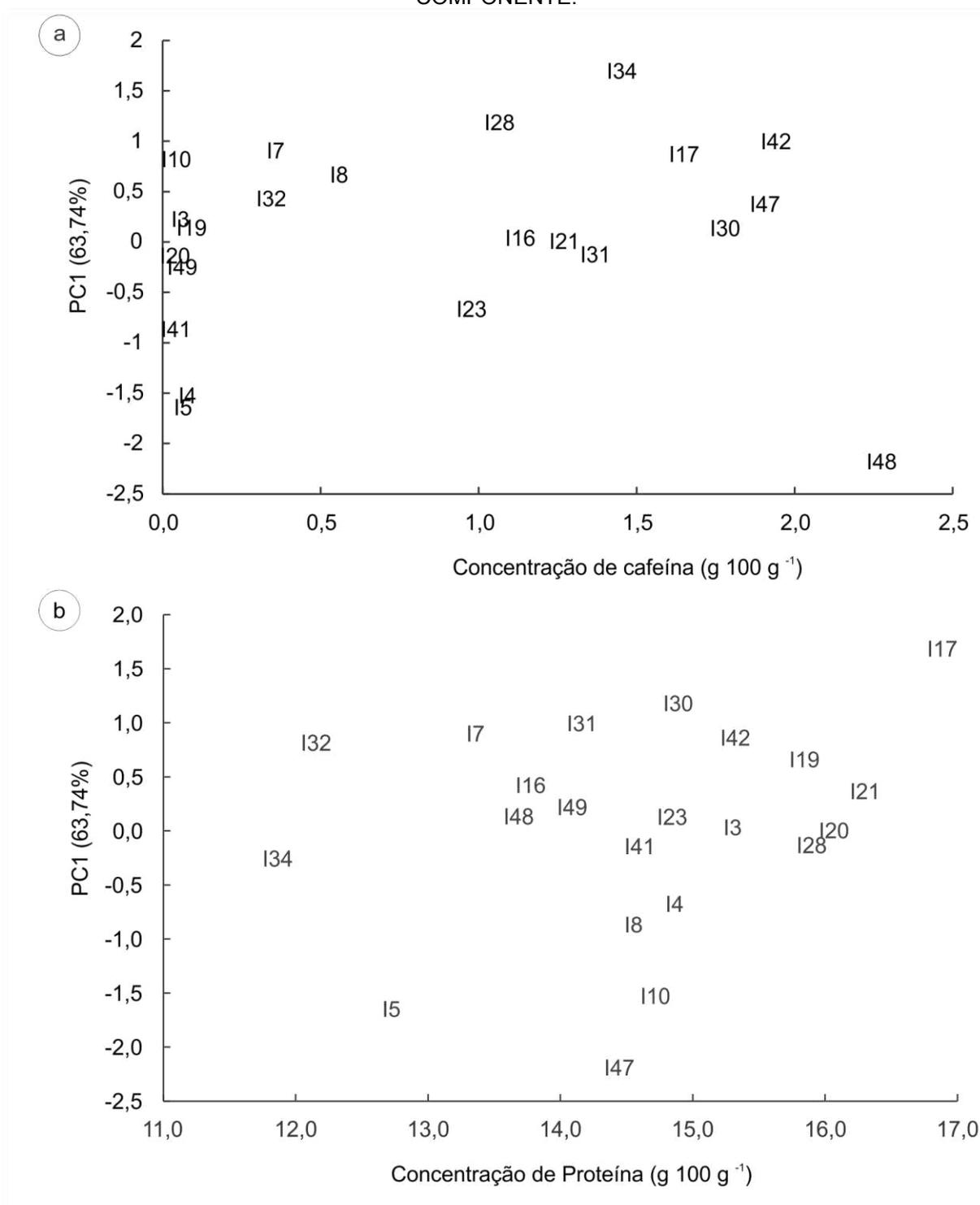
GRÁFICO 3.4 - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DE 22 GENÓTIPOS DE ERVA-MATE PARA PERCENTUAL DE ENRAIZAMENTO (E), NÚMERO DE RAÍZES (NR), COMPRIMENTO MÉDIO DE RAÍZES (CMR), PERCENTUAL DE ESTACAS BROTADAS (EBT) E PRODUÇÃO DE BIOMASSA COMERCIAL (BC) DE ACORDO COM PC1 E PC2. AS PORCENTAGENS ENTRE PARÊNTESES REPRESENTAM A VARIACÃO DE CADA COMPONENTE.



FONTE: O autor (2021).

A distribuição dos genótipos ao longo do eixo das abscissas indica a variação relacionada à composição de cafeína. Já a distribuição ao longo do eixo vertical, representando o primeiro componente para EA, NR, CMR e BC está intimamente ligada à capacidade rizogênica. É possível identificar genótipos com alto potencial para o enraizamento em todas as faixas de concentração de cafeína (GRÁFICO 3.5a).

GRÁFICO 3.5 - DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CAFEÍNA (a) E PROTEÍNAS (b) EM 22 GENÓTIPOS DE ERVA-MATE PARA O PRIMEIRO COMPONENTE. A PORCENTAGEM ENTRE PARÊNTESES REPRESENTA A VARIACÃO DO COMPONENTE.

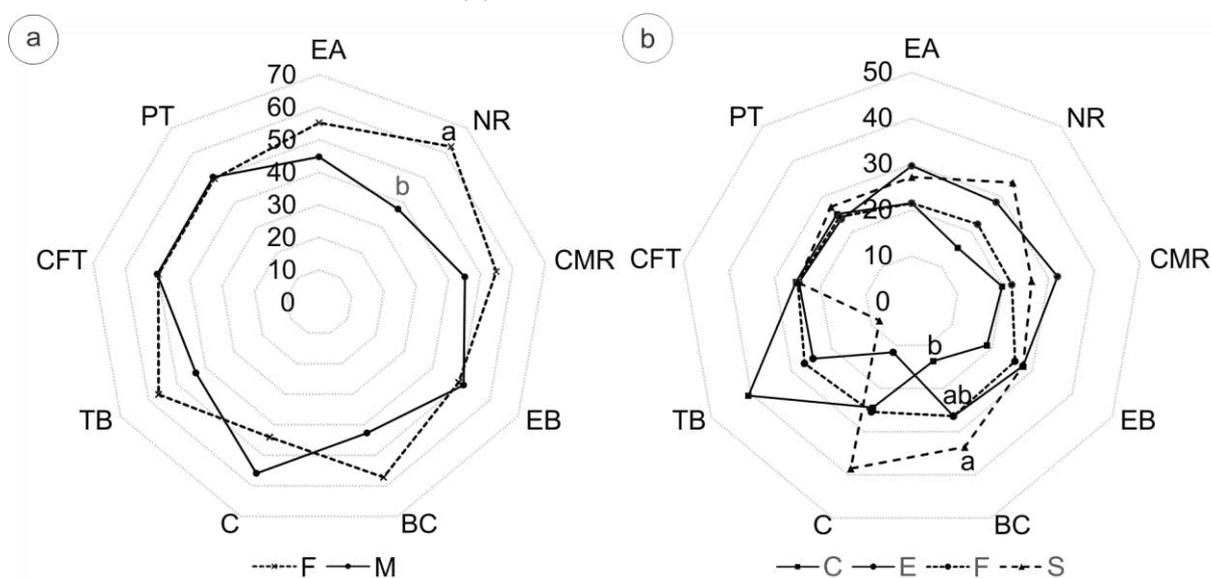


FONTE: O autor (2021).

O sexo do genótipo influencia de forma mais expressiva as variáveis enraizamento, número e comprimento médio de raízes, biomassa comercial, teor de cafeína e teobromina, com diferenças significativas entre as médias apenas para

número de raízes, onde o sexo feminino mostrou-se superior ao masculino (GRÁFICO 3.6a). Os morfotipos mostram-se bastante influentes sobre as variáveis. No entanto, foram verificadas diferenças significativas apenas para a biomassa comercial, onde o morfotipo sassafrás (S) mostrou-se superior apenas ao cinza (C) (GRÁFICO 3.6b). Destaca-se a variação na concentração média de cafeína entre os diferentes morfotipos, com maiores valores no sassafrás (S) e menores no verde fosco (F).

GRÁFICO 3.6 - REPRESENTAÇÃO RELATIVA (%) DAS VARIÁVEIS ENRAIZAMENTO (EA), NÚMERO DE RAÍZES (NR), COMPRIMENTO MÉDIO DE RAÍZES (CMR), EMISSÃO DE BROTOS (EB), BIOMASSA COMERCIAL (BC), CAFEÍNA (C), TEOBROMINA (TB), COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT), E PROTEÍNAS TOTAIS (PT), EM FUNÇÃO DO SEXO (a) E DOS MORFOTIPOS (b) EM 22 GENÓTIPOS DE ERVA-MATE.



FONTE: O autor (2021). Médias seguidas da mesma letra na mesma variável não diferem entre si a  $p < 0,05$  pelo teste de Tukey.

### 3.4 DISCUSSÃO

Os efeitos dos genótipos de erva-mate sobre o EA são destacados neste estudo. Todos os genótipos apresentaram EA entre 13 e 78%. Essa variação entre os genótipos evidencia a necessidade de um conhecimento mais aprofundado sobre suas características morfofisiológicas individuais. Aliado a isso, a grande influência do período de avaliação conota a importância da variação genótipo x ambiente no enraizamento de estacas de erva-mate (GRÁFICO 3.1). A grande quantidade de genótipos avaliados e sua variação com relação ao EA nos subsidiam a estabelecer

critérios para a distinção de materiais de fácil e difícil enraizamento no resgate vegetativo por estaquia, convencionando-se neste documento espécies de baixo EA (0-30%), médio EA (31-60%) e alto EA (61-100%) (GRÁFICO 3.1).

O EA envolve uma série de mudanças fisiológicas e moleculares e depende de inúmeros fatores endógenos e exógenos, dos quais, a homeostase e as auxinas desempenham papel central (ALMEIDA et al., 2017). Todos esses fatores, isolados ou conjuntamente, influenciam o processo de EA e são intensificados por características genéticas. Desta forma, materiais genéticos com alto potencial de EA podem favorecer o melhoramento e silvicultura clonal da espécie, proporcionando maiores taxas de resgate e multiplicação e disponibilizando mudas para plantios clonais.

Os resultados sugerem uma variação na aptidão ao EA nos dois períodos, grande parte em função da influência das características ambientais, uma vez que se tratam dos mesmos genótipos e metodologia empregada. Características como irradiância e temperatura podem influenciar a disponibilidade de auxina, seu transporte e sua atividade (ALMEIDA et al., 2017; ALAIN et al., 2019), podendo, em um mesmo genótipo, resultar em respostas similares em coletas distintas em função das variações ambientais. Tais informações podem ser um excelente indicativo da aptidão à rizogênese, mesmo sob condições ambientais distintas, fator relevante quando da seleção de clones elite.

É importante destacar que a estaquia é uma técnica de propagação vegetativa recomendada para o resgate vegetativo de erva-mate (WENDLING; BRONDANI, 2015), podendo, sob a perspectiva da propagação massal, empregar-se a técnica de miniestaquia (STUEPP et al., 2018), que propicia produção contínua de propágulos, manutenção da juvenilidade das matrizes e adequado controle das condições ambientais e de manejo. Assim, pode-se inferir sobre estes materiais genéticos a possibilidade de um grande potencial de ampliação dos percentuais de EA à medida que sejam avaliados sobre os pressupostos acima descritos.

A dependência do genótipo não se restringe ao EA, influenciando também a biometria e arquitetura do sistema radicial (GRÁFICO 3.2). Estudos com *Populus* sp. evidenciaram a dependência genética das características morfológicas do sistema radicial adventício (DOUGLAS et al., 2016). Assim como, neste estudo a correlação significativa entre EA e número de raízes (0,83) e comprimento médio de raízes

(0,90) ressaltam a importância da seleção de genótipos com alto potencial rizogênico, que agreguem a qualidade radicial necessária à produção clonal. Apesar do leve aumento no número de raízes entre a primeira e a segunda coleta, os resultados para comprimento médio de raízes sugerem uma redução do vigor radicial entre os dois períodos. De fato, os resultados mostram um leve efeito sobre a redução do vigor radicial das estacas, o que tem sido considerado uma consequência da maturação dos propágulos vegetativos (WENDLING et al., 2014). Uma das expressões mais consistentes da maturação em plantas lenhosas refere-se à redução no vigor e enraizamento de propágulos vegetais (WENDLING et al., 2014; BACCARIN et al., 2015). Nesse caso, a redução do EA e do vigor radicial podem ser consequências da redução do vigor vegetativo das matrizes, reduzindo assim o metabolismo da planta e, conseqüentemente, a capacidade de absorção de água e nutrientes, afetando a produção de hormônios relacionados a rizogênese (ALMEIDA et al., 2017).

A elevada emissão de brotos sugere a utilização de propágulos com alta concentração de carboidratos e adequado vigor vegetativo. No entanto, é importante analisar a emissão de brotos do ponto de vista fisiológico e suas implicações no EA de genótipos de erva-mate. É possível observar uma emissão de brotos significativamente maior em estacas não enraizadas quando comparada a estacas enraizadas, sugerindo a emissão destes brotos previamente à emissão de raízes adventícias (TABELA 3.2). Essa elevada emissão de brotações pode ser ainda catalisada pelas altas temperaturas em casa de vegetação, aumentando as taxas de transpiração e perda de umidade pelas folhas (HARTMANN et al., 2011), culminando na mortalidade dos propágulos. O elevado vigor vegetativo dos propágulos neste estudo sugere um processo de esgotamento das reservas de carboidratos das estacas antes mesmo da fase de indução (RASMUSSEN et al., 2015). No presente estudo, o gasto energético gerado pela emissão de brotações parece estar intimamente relacionado às características intrínsecas de cada genótipo. Assim, genótipos com elevada aptidão ao EA tendem à emissão precoce de raízes adventícias e, concomitantemente, à emissão de brotações.

O melhoramento genético de erva-mate tem se dedicado à seleção de genótipos que unam a adaptação bioclimática à elevada produção de biomassa comercial, com herdabilidade em nível de média de progênies acima de 0,85 e

possibilidade de seleção precoce aos 6,5 anos (WENDLING et al., 2018). Este tem sido um dos grandes desafios do sistema de produção da espécie, e deve passar, imprescindivelmente, pela silvicultura clonal. Assim, a amplitude da produtividade nos 22 genótipos avaliados, de 6,2 a 41,8 Kg planta<sup>-1</sup>, mostram a ampla variabilidade genética e o potencial de seleção de materiais altamente produtivos em erva-mate. Embora os resultados verificados neste estudo não identifiquem correlações significativas entre a produtividade das matrizes e o EA, faz-se necessária a análise dos genótipos envolvendo essa característica. Por meio da análise de componentes principais, é possível distinguir e explicar o comportamento dos genótipos de acordo com caracteres quantitativos de EA, NR, CMR e biomassa comercial (BC), abrangendo 93,0% da variância por meio dos dois primeiros componentes (GRÁFICO 3.4). Em um dos extremos pode-se identificar os genótipos I4 e I5 como materiais genéticos de baixo vigor radicial, porém bom potencial produtivo. No mesmo sentido, os genótipos I41, I48 e I49 localizados nos extremos negativos do gráfico identificam genótipos com valores de EA variando de médio a alto, mas baixa produtividade. À medida que a distribuição se aproxima do cruzamento, no ponto zero, tende-se a alcançar materiais genéticos que se aproximam da média, tanto para EA como para produtividade. Os genótipos elite para produtividade, enraizamento e vigor radicial encontram-se na região positiva do eixo das abscissas, em duas dimensões, em função do segundo componente, positivamente relacionando-se à biomassa e emissão de brotos e, negativamente, relacionando-se ao EA e vigor radicial.

A ampla distribuição dos genótipos ao longo dos dois componentes corrobora com a alta variabilidade genética para as variáveis quantitativas. A possibilidade de destacar genótipos elite a partir desta distribuição pode contribuir positivamente para a seleção simplificada destes materiais e colaborar com programas de melhoramento e silvicultura clonal da espécie. No entanto, apesar da clonagem ser considerada por muitos autores como uma ferramenta viável para a espécie (KRATZ et al., 2015; SANTIN et al., 2015; STUEPP et al., 2018), a alta variabilidade para este caráter torna essencial a seleção de materiais que apresentem aptidão ao EA, possibilitando assim a comprovação da superioridade genética em testes clonais.

Além da biomassa comercial, recentemente, a ênfase do melhoramento de erva-mate tem sido direcionada à inclusão do conteúdo de alguns compostos

bioativos relevantes que podem afetar a qualidade dos produtos comerciais e seus efeitos biológicos (WENDLING et al., 2018). Isolados ou conjuntamente, estes compostos são responsáveis pelas propriedades estimulantes e medicinais verificadas na erva-mate (CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016; GAN et al., 2018; POSWAL et al., 2019). Atualmente, o fornecimento destes compostos é limitado pela ampla variabilidade genética presente na espécie, com elevada dependência da matéria prima utilizada na produção (BUTIUK et al., 2016; GIL; WIANOWSKA, 2017; KALTBACH et al., 2020).

A cafeína é de fato um dos compostos bioativos presentes na erva-mate de maior interesse industrial, sendo um dos ingredientes dietéticos mais consumidos no mundo (TFOUNI et al., 2018). Os genótipos I17, I30, I42, I47 e I48 são genótipos elite para concentração de cafeína, com médias superiores a 1,6% (TABELA 3.1, GRÁFICO 3.5a). Além destes, é possível identificar materiais com conteúdo de cafeína abaixo de 0,1%, sendo, portanto, descafeinados (BRASIL, 2005). Deve-se ressaltar que a identificação de genótipos que somem alta produtividade, alta concentração de compostos bioativos e aptidão à rizogênese favorece o desenvolvimento tecnológico a partir de uma biomassa homogênea e em grandes volumes.

O primeiro componente da ACP explica 63,7% da variação para EA, NR, CMR e biomassa comercial e, por meio de sua associação com a distribuição das concentrações de cafeína, é possível observar que os genótipos na porção positiva do gráfico se caracterizam por bons percentuais de EA e vigor radicial. Assim, fica evidente a qualificação para tal conteúdo dos genótipos I17, I30, I47 e I42 (GRÁFICO 3.5a), todos acima de 1,6%, caracterizados como de alta concentração de cafeína (SCHUHLLI et al., 2019). De forma semelhante, mas em posição oposta, o genótipo I10 é o único que associa, conjuntamente, conteúdo de cafeína muito baixo ou ausente e EA acima de 60% (GRÁFICO 3.5a).

Além do conteúdo de cafeína, a ampla variabilidade genética para conteúdo de proteínas tem chamado atenção, possibilitando um leque ainda maior para o melhoramento da espécie (AGUILERA et al., 2018; GREGIANINI; WINGE, 2019). A variação dos percentuais de proteínas nas folhas de erva-mate (11,9 a 16,9%) verificada no presente estudo corroboram com aquelas relatadas na literatura (BERTÉ et al., 2011; SOUZA et al., 2015; FRIZON et al., 2018) e sugerem uma excelente fonte de alimento e nutrição humana e animal. Assim como para cafeína,

a seleção de genótipos elite para teor de proteína deve levar em consideração o EA e, entre os 22 genótipos avaliados, destacam-se os genótipos I8, I34 e I47 (GRÁFICO 3.5b).

O levantamento de variáveis qualitativas (sexo e morfotipo) nos 22 genótipos sugere a existência de relação entre estas características e as variáveis avaliadas (GRÁFICO 3.5a, b). A possibilidade de seleção de plantas em função de características qualitativas que tragam confiabilidade na seleção é de extrema importância ao melhoramento, sobretudo em culturas onde a grande maioria das mudas ofertadas no mercado tem sua origem desconhecida. Modelos de seleção qualitativa para biomassa já foram descritos para a espécie (WENDLING et al., 2016). De acordo com os autores, esta permite, de forma fácil, a seleção de genótipos mais produtivos, tanto para fins seminais como clonais.

O percentual relativo da expressão das principais variáveis avaliadas nos 22 genótipos sugere maior produtividade, EA e vigor radicial e vegetativo em plantas do sexo feminino. A única tendência favorecida pelo sexo masculino é a concentração de cafeína (GRÁFICO 3.5a). Deve-se, entretanto, levar em consideração a dependência das condições edafoclimáticas no cultivo e do estágio fenológico das folhas (HECKMAN et al., 2010), recomendando-se uma investigação mais aprofundada para garantir maior acurácia nesta seleção.

Muito discutido de forma empírica, a influência dos morfotipos sobre características qualitativas e quantitativas é uma unanimidade entre produtores e indústrias ervateiras. De fato, a cafeína está naturalmente presente em erva-mate (HELM et al., 2015), sendo seu conteúdo significativamente variável (TABELA 3.1). A cafeína depende principalmente do genótipo, devido a sua alta herdabilidade (CARDOZO JUNIOR et al., 2010; NAKAMURA et al., 2009), e também das condições edafoclimáticas no cultivo e do estágio fenológico das folhas (HECKMAN et al., 2010), os quais influenciam nas características do produto, conferindo amargor e, alterando assim, o sabor do produto final (GODOY et al., 2020; DUARTE et al., 2020). Destaque deve ser dado ao morfotipo sassafrás (S) que representou bom EA e vigor radicial, além de elevada produtividade e concentração de cafeína. Em contrapartida, o morfotipo cinza (C) tende a apresentar menores valores destas características (GRÁFICO 3.5b). A utilização de caracteres morfológicos para a seleção de genótipos de erva-mate vem sendo realizada com diferentes finalidades (VALDUGA et al., 2016;

WENDLING et al., 2016), comprovando a possibilidade de ser estabelecida como uma ferramenta de referência para modelos de pré-seleção de genótipos superiores. O morfotipo sassafrás (S), por exemplo, traz consigo grande associação à produção de biomassa comercial, com copa densa e menor queda de folhas, apresentando elevada relação folhas/ramos finos, o que favorece a produção de biomassa comercial (WENDLING et al., 2016).

A busca por indicadores simplificados para seleção de genótipos superiores para erva-mate é um dos objetivos dos programas de melhoramento genético e silvicultura clonal da espécie. Sua abordagem quase sempre se associa à produtividade e, mais recentemente, à composição de compostos bioativos, mas, sob hipótese, tem sido associada à capacidade de EA destes genótipos. A falta de associação da base de melhoramento com a silvicultura clonal pode gerar lacunas irreversíveis a estes programas, sendo de suma importância sua inserção nas bases de seleção da espécie. Este documento traz em primeira mão informações relevantes sobre a associação de características visuais de fácil identificação a campo e variáveis de interesse para o melhoramento e silvicultura clonal da espécie, favorecendo a seleção de materiais de alta qualidade silvicultural e industrial.

### 3.5 CONCLUSÕES

Nas condições em que o presente trabalho foi realizado não é possível identificar efeitos das concentrações de cafeína, teobromina, compostos fenólicos totais e proteínas no enraizamento e no vigor radicial e vegetativo em estacas de erva-mate. O efeito do genótipo sobre o enraizamento das estacas é expressivo, assim como sua variação sazonal.

## REFERÊNCIAS

- AGUILERA, P. M.; DEBAT, H. J.; GRABIELE, M. Dataset of the first transcriptome assembly of the tree crop “yerba mate” (*Ilex paraguariensis*) and systematic characterization of protein coding genes. **Data in brief**, v. 17, p. 1036-1040, 2018.
- ALAIN, T. et al. Effects of pre-severance irradiance on the growth of *Allanblackia floribunda* Oliv. stockplants and on the subsequent rooting capacity of leafy stem cuttings. **New Forests**, v. 50, n. 3, p. 505-517, 2019.
- ALMEIDA, M. R. et al. Environmental control of adventitious rooting in *Eucalyptus* and *Populus* cuttings. **Trees**, v. 31, n. 5, p. 1377-1390, 2017.
- ALVARES, C. A. et al. Köppen’s climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 1-18, 2013.
- ANESINI, C. et al. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, n. 2, p. 299-304, 2012.
- AOAC - The Association of Official Analytical Chemists International. **Official Methods of Analysis**. 21. ed. v. 38, n. 8, p. 431, 2016.
- BACCARIN, F. J. B. et al. Vegetative rescue and cloning of *Eucalyptus benthamii* selected adult trees. **New Forests**, v. 46, n. 4, p. 465-483, 2015.
- BECKER, A. M. et al. Spray-Dried Yerba Mate Extract Capsules: Clinical Evaluation and Antioxidant Potential in Healthy Individuals. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 74, n. 4, p. 495-500, 2019.
- BERTÉ, K. A. et al. Chemical composition and antioxidant activity of yerba-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) extract as obtained by spray drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, p. 5523-5527, 2011.
- BLUM-SILVA, C. H. et al. The influence of leaf age on methylxanthines, total phenolic content, and free radical scavenging capacity of *Ilex paraguariensis* aqueous extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p.1-6, 2015.
- BRASIL. **Resolução RDC n. 277, de 22 de setembro de 2005**. Regulamento técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 set. 2005.
- BUTIUK, A. P. et al. Study of the chlorogenic acid content in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): effect of plant fraction, processing step and harvesting season. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 3, n. 1, p. 27-33, 2016.

CARDOZO JUNIOR, E. L.; MORAND, C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 440-454, 2016.

CROGE, C. P.; CUQUEL, F. L.; PINTRO, P. T. M. Yerba mate: cultivation systems, processing and chemical composition. A review. **Scientia Agricola**, v. 78, 2020.

DEBAT, H. J. et al. Exploring the genes of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) by NGS and de novo transcriptome assembly. **Plos one**, v. 9, n. 10, p. e109835, 2014.

DOUGLAS, G. B.; MCIVOR, I. R.; LLOYD-WEST, C. M. Early root development of field-grown poplar: effects of planting material and genotype. *New Zealand Journal of Forestry Science*, v. 46, n. 1, p. 2-14, 2016.

DUARTE, M. M. et al. Caffeinated and decaffeinated mate tea: Effect of toasting on bioactive compounds and consumer acceptance. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 15, p. 1-10, 2020.

FRIZON, C. N. T. et al. Novel beverages of yerba-mate and soy: Bioactive compounds and functional properties. **Beverages**, v. 4, n. 1, p. 21, 2018.

GAN, R. Y. et al. Health benefits of bioactive compounds from the genus *Ilex*, a source of traditional caffeinated beverages. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1682, 2018.

GIL, M.; WIANOWSKA, D. Chlorogenic acids – their properties, occurrence and analysis. **Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska**, v. 72, n. 1, p. 61-104, 2017.

GODOY, R. C. B.; CHAMBERS IV, E.; YANG, G. Development of a preliminary sensory lexicon for mate tea. **Journal of Sensory Studies**, p. e12570, 2020.

GONZÁLEZ ARBELÁEZ, L. F. et al. Effect of an *Ilex paraguariensis* (yerba mate) extract on infarct size in isolated rat hearts: the mechanisms involved. **Food & Function**, v. 7, p. 816-824, 2016.

GREGIANINI, T. S.; WINGE, H. Storage protein variability in natural populations of maté (*Ilex paraguariensis*) in Brazil. **Ciência Rural**, v. 49, n. 2, p. e20180451, 2019.

HARTMANN, H. T. et al. **Hartmann and Kester's Plant propagation: principles and practices**. 8. ed. São Paulo: Prentice-Hall, 2011. 928 p.

HECKMAN, M. A.; Weil, J.; Mejia, E. G. Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) in foods: A comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 3, p. 77-87, 2010.

HELM, V. C. et al. **Efeito do solvente na extração de teobromina e cafeína em progênies de erva-mate**. Colombo: Embrapa Florestas, 2015. 6 p.

KALTBACH, P. et al. New HPTLC methods for analysis of major bioactive compounds in *Ilex paraguariensis* tea. **Journal of Food Composition and Analysis**, p. 103568, 2020.

KRATZ, D. et al. Produção de mudas de erva-mate por miniestaquia em substratos renováveis. **Floresta**, v. 45, n. 3, p. 609-616, 2015.

LIMA, G. G. et al. Prediction of yerba mate caffeine content using near infrared spectroscopy. **Spectroscopy Letters**, v. 52, n. 5, p. 282-287, 2019.

LUÍS, Â. F.S.; DOMINGUES, F. C.; AMARAL, L. M. J. P. The anti-obesity potential of *Ilex paraguariensis*: results from a meta-analysis. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 55, p. e17615, 2019.

MATEOS, R. et al. Improved LC-MSn characterization of hydroxycinnamic acid derivatives and flavonols in different commercial mate (*Ilex paraguariensis*) brands. Quantification of polyphenols, methylxanthines, and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 241, p. 232-241, 2018.

MAYER, L.; NIENOW, A. A.; TRES, L. Cutting propagation of 'Cambona 4' yerba mate clones. **Comunicata Scientiae**, v. 11, p. e3287-e3287, 2020.

NAKAMURA, K. L. et al. Genetic variation of phytochemical compounds in progenies of *Ilex paraguariensis*. **Crop Breeding Applied Biotech**, v. 9, p. 116-123, 2009.

POSWAL, F. S. et al. Herbal teas and their health benefits: A scoping review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 74, p. 266-276, 2019.

RASMUSSEN, A. et al. Adventitious rooting declines with the vegetative to reproductive switch and involves a changed auxin homeostasis. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 5, p. 1437-1452, 2015.

SANTIN, D. et al. Sobrevivência, crescimento e produtividade de plantas de erva-mate produzidas por miniestacas juvenis e por sementes. **Ciência Florestal**, v. 25, n. 3, p. 571-579, 2015.

SCHUHLI, G. S.; PENTEADO JUNIOR, J. F.; WENDLING, I. **Descritores mínimos em cultivares de espécies florestais: uma contribuição para erva-mate**. Colombo: Embrapa Florestas, 2019. 22 p.

SINGLETON, V.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SOUZA, A. H. P. et al. Phytochemicals and bioactive properties of *Ilex paraguariensis*: An in-vitro comparative study between the whole plant, leaves and stems. **Food Research International**, v. 78, p. 286-294, 2015.

- STUEPP, C. A. et al. Vegetative propagation and application of clonal forestry in Brazilian native tree species. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, n. 9, p. 985-1002, 2018.
- STURION, J. A.; RESENDE, M. D. V. **Melhoramento genético da erva-mate**. Colombo: Embrapa Florestas, 2010. 274 p.
- TABRIZI, R. et al. The effects of caffeine intake on weight loss: A systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 2, p. 1-9, 2018.
- TFOUNI, S. A. V. et al. Caffeine in teas: levels, transference to infusion and estimated intake. **Food Science and Technology**, n. AHEAD, p. 0-0, 2018.
- VALDUGA, A. T. et al. Phytochemical profile of morphologically selected yerba-mate progenies. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 1, p. 114-120, 2016.
- WENDLING, I. et al. Indirect and expedite assessment of *Ilex paraguariensis* commercial yield. **Cerne**, v. 22, n. 3, p. 241-248, 2016.
- WENDLING, I.; BRONDANI, G. Produção de mudas de erva-mate. In: WENDLING, I.; SANTIN, D. (Org.). Propagação e nutrição de erva-mate. 1. ed. Brasília: Embrapa Informação, 2015. 195 p.
- WENDLING, I.; STURION, J. A.; STUEPP, C. A. Early selection and classification of yerba mate progenies. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, n. 03, 2018.
- WENDLING, I.; TRUEMAN, S. J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry-Part I: Concepts, regulation and consequences of phase change. **New Forests**, v. 45, n. 4, p. 449-471, 2014.
- ZAPATA, F. J. Caffeine, but not other phytochemicals, in mate tea (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) attenuates high-fat-high-sucrose-diet-driven lipogenesis and body fat accumulation. **Journal of Functional Foods**, v. 64, p. 103646, 2020.
- ZIELINSKI, A. A. F. et al. A multivariate approach to differentiate yerba mate (*Ilex paraguariensis*) commercialized in the southern Brazil on the basis of phenolics, methylxanthines and in vitro antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 3, p. 644-652, 2020.

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Com base nos resultados do presente trabalho é possível concluir que:

Há grande variação nas concentrações de cafeína, teobromina, compostos fenólicos totais e proteínas totais em genótipos de erva-mate. Os principais compostos bioativos em erva-mate se mostram estáveis ao longo dos anos a condições ambientais variáveis.

Há grande variação no enraizamento adventício e vigor radicial em genótipos de erva-mate. Não há relação entre os compostos bioativos e o enraizamento adventício entre os genótipos avaliados.

## REFERÊNCIAS GERAIS

- AGUILERA, P. M.; DEBAT, H. J.; GRABIELE, M. Dataset of the first transcriptome assembly of the tree crop “yerba mate” (*Ilex paraguariensis*) and systematic characterization of protein coding genes. **Data in brief**, v. 17, p. 1036-1040, 2018.
- ALAIN, T. et al. Effects of pre-severance irradiance on the growth of *Allanblackia floribunda* Oliv. stockplants and on the subsequent rooting capacity of leafy stem cuttings. **New Forests**, v. 50, n. 3, p. 505-517, 2019.
- ALMEIDA, M. R. et al. Environmental control of adventitious rooting in *Eucalyptus* and *Populus* cuttings. **Trees**, v. 31, n. 5, p. 1377-1390, 2017.
- ALVARES, C. A. et al. Köppen’s climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 1-18, 2013.
- ANESINI, C. et al. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, n. 2, p. 299-304, 2012.
- AOAC - The Association of Official Analytical Chemists International. **Official Methods of Analysis**. 21. ed. v. 38, n. 8, p. 431, 2016.
- ASHIHARA, H. et al. Biosynthesis of caffeine in leaves of coffee. **Plant Physiology**, v. 111, n. 3, p. 747-753, 1996.
- ATHAYDE, M. L.; COELHO, G. C.; SCHENKEL, P. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 853-857, 2000.
- BACCARIN, F. J. B. et al. Vegetative rescue and cloning of *Eucalyptus benthamii* selected adult trees. **New Forests**, v. 46, n. 4, p. 465-483, 2015.
- BECKER, A. M. et al. Spray-Dried Yerba Mate Extract Capsules: Clinical Evaluation and Antioxidant Potential in Healthy Individuals. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 74, n. 4, p. 495-500, 2019.
- BERTÉ, K. A. et al. Chemical composition and antioxidant activity of yerba-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) extract as obtained by spray drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 5523-5527, 2011.
- BLUM-SILVA, C. H. et al. The influence of leaf age on methylxanthines, total phenolic content, and free radical scavenging capacity of *Ilex paraguariensis* aqueous extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p.1-6, 2015.
- BRASIL. **Resolução RDC n. 277, de 22 de setembro de 2005**. Regulamento técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 set. 2005.

- BUTIUK, A. P. et al. Study of the chlorogenic acid content in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): effect of plant fraction, processing step and harvesting season. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 3, n. 1, p. 27-33, 2016.
- CARDOZO, E. L. et al. Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 7, p. 553-558, 2007.
- CARDOZO JUNIOR, E. L.; MORAND, C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 440-454, 2016.
- CROGE, C. P.; CUQUEL, F. L.; PINTRO, P. T. M. Yerba mate: cultivation systems, processing and chemical composition. A review. **Scientia Agricola**, v. 78, 2020.
- DEBAT, H. J. et al. Exploring the genes of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) by NGS and de novo transcriptome assembly. **Plos one**, v. 9, n. 10, p. e109835, 2014.
- DOUGLAS, G. B.; MCIVOR, I. R.; LLOYD-WEST, C. M. Early root development of field-grown poplar: effects of planting material and genotype. **New Zealand Journal of Forestry Science**, v. 46, n. 1, p. 2-14, 2016.
- DUARTE, M. M. et al. Caffeinated and decaffeinated mate tea: Effect of toasting on bioactive compounds and consumer acceptance. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 15, p. 1-10, 2020.
- FRIZON, C. N. T. et al. Novel beverages of yerba-mate and soy: Bioactive compounds and functional properties. **Beverages**, v. 4, n. 1, p. 21, 2018.
- GABRIEL, K. R. Biometrika trust the biplot graphic display of matrices with application to principal component analysis. **Biometrika**, v. 58, n. 3, p. 453-467, 1971.
- GAN, R. Y. et al. Health benefits of bioactive compounds from the genus *Ilex*, a source of traditional caffeinated beverages. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1682, 2018.
- GIL, M.; WIANOWSKA, D. Chlorogenic acids – their properties, occurrence and analysis. **Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska**, v. 72, n. 1, p. 61-104, 2017.
- GODOY, R. C. B.; CHAMBERS IV, E.; YANG, G. Development of a preliminary sensory lexicon for mate tea. **Journal of Sensory Studies**, p. e12570, 2020.
- GÓMEZ-JUARISTI, M. et al. Absorption and metabolism of yerba mate phenolic compounds in humans. **Food Chemistry**, v. 240, p. 1028-1038, 2018.

GONZÁLEZ ARBELÁEZ, L. F. et al. Effect of an *Ilex paraguariensis* (yerba mate) extract on infarct size in isolated rat hearts: the mechanisms involved. **Food & Function**, v. 7, p. 816-824, 2016.

GREGIANINI, T. S.; WINGE, H. Storage protein variability in natural populations of maté (*Ilex paraguariensis*) in Brazil. **Ciência Rural**, v. 49, n. 2, p. e20180451, 2019.

GUGLIUCCI, A.; BASTOS, D. H. M. Chlorogenic acid protects paraoxonase 1 activity in high density lipoprotein from inactivation caused by physiological concentrations of hypochlorite. **Fitoterapia**, v. 80, p. 138-142, 2009.

GULLÓN, B. et al. Yerba mate waste: A sustainable resource of antioxidant compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 113, p. 398-405, 2018.

HARTMANN, H. T. et al. **Hartmann and Kester's Plant propagation: principles and practices**. 8. ed. São Paulo: Prentice-Hall, 2011. 928 p.

HECK C. I.; MEJIA, E. G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. R138-R151, 2007.

HECKMAN, M. A.; Weil, J.; Mejia, E. G. Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) in foods: A comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 3, p. 77-87, 2010.

HELM, V. C. et al. **Efeito do solvente na extração de teobromina e cafeína em progênies de erva-mate**. Colombo: Embrapa Florestas, 2015. 6 p.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Dados PAM e PEVS**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>>. Acesso em: 22 out. 2018.

KALTBACH, P. et al. New HPTLC methods for analysis of major bioactive compounds in ate (*Ilex paraguariensis*) tea. **Journal of Food Composition and Analysis**, p. 103568, 2020.

KRATZ, D. et al. Produção de mudas de erva-mate por miniestaquia em substratos renováveis. **Floresta**, v. 45, n. 3, p. 609-616, 2015.

LIMA, G. G. et al. Prediction of yerba mate caffeine content using near infrared spectroscopy. **Spectroscopy Letters**, v. 52, n. 5, p. 282-287, 2019.

LUÍS, Â. F.S.; DOMINGUES, F. C.; AMARAL, L. M. J. P. The anti-obesity potential of *Ilex paraguariensis*: results from a meta-analysis. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 55, p. e17615, 2019.

MANDEL, J. American society for quality a new analysis of variance model for non-additive data a new analysis of variance model for non-additive data. **Technometrics**, v. 13, n. 1, p. 1-18, 1971.

- MATEOS, R. et al. Improved LC-MSn characterization of hydroxycinnamic acid derivatives and flavonols in different commercial mate (*Ilex paraguariensis*) brands. Quantification of polyphenols, methylxanthines, and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 241, p. 232-241, 2018.
- MAYER, L.; NIENOW, A. A.; TRES, L. Cutting propagation of 'Cambona 4' yerba mate clones. **Comunicata Scientiae**, v. 11, p. e3287-e3287, 2020.
- MOHANPURIA, P.; KUMAR, V.; YADAV, S. K. Tea caffeine: Metabolism, functions, and reduction strategies. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, p. 275-287, 2010.
- NAKAMURA, K. L. et al. Genetic variation of phytochemical compounds in progenies of *Ilex paraguariensis*. **Crop Breeding Applied Biotech**, v. 9, p. 116-123, 2009.
- OELLIG, C.; SCHUNCK, J.; SCHWACK, W. Determination of caffeine, theobromine and theophylline in Mate beer and Mate soft drinks by high-performance thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1533, p. 208-212, 2018.
- POSWAL, F. S. et al. Herbal teas and their health benefits: A scoping review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 74, p. 266-276, 2019.
- RASMUSSEN, A. et al. Adventitious rooting declines with the vegetative to reproductive switch and involves a changed auxin homeostasis. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 5, p. 1437-1452, 2015.
- SANTIN, D. et al. Sobrevivência, crescimento e produtividade de plantas de erva-mate produzidas por miniestacas juvenis e por sementes. **Ciência Florestal**, v. 25, n. 3, p. 571-579, 2015.
- SCHERER, R. et al. Inheritance studies of caffeine and theobromine content of Mate (*Ilex paraguariensis*) in Misiones, Argentina. **Euphytica**, v. 126, n. 2, p. 203-210, 2002.
- SCHUHLI, G. S.; PENTEADO JUNIOR, J. F.; WENDLING, I. **Descritores mínimos em cultivares de espécies florestais: uma contribuição para erva-mate**. Colombo: Embrapa Florestas, 2019. 22 p.
- SILVEIRA, T. F. F. et al. Phenolic compounds from yerba mate based beverages – A multivariate optimisation. **Food chemistry**, v. 190, p. 1159-1167, 2016.
- SINGLETON, V.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.
- SOUZA, A. H. P. et al. Phytochemicals and bioactive properties of *Ilex paraguariensis*: An in-vitro comparative study between the whole plant, leaves and stems. **Food Research International**, v. 78, p. 286-294, 2015.

- STUEPP, C. A. et al. Vegetative propagation and application of clonal forestry in Brazilian native tree species. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, n. 9, p. 985-1002, 2018.
- STURION, J. A.; RESENDE, M. D. V. **Melhoramento genético da erva-mate**. Colombo: Embrapa Florestas, 2010. 274 p.
- TABRIZI, R. et al. The effects of caffeine intake on weight loss: A systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 2, p. 1-9, 2018.
- TFOUNI, S. A. V. et al. Caffeine in teas: levels, transference to infusion and estimated intake. **Food Science and Technology**, n. AHEAD, p. 0-0, 2018.
- TOMASI, J. C. et al. Effects of different drying methods on the chemical, nutritional and colour of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves. **International Journal of Food Engineering**, p. 000010151520200312, 2021.
- VALDUGA, A. T. et al. Phytochemical profile of morphologically selected yerba-mate progenies. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 1, p. 114-120, 2016.
- VIEIRA, L. et al. Vegetative propagation, chemical composition and antioxidant activity of yerba mate genotypes. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, v. 19, n. 2, p. 112-121, 2021.
- WENDLING, I. et al. Indirect and expedite assessment of *Ilex paraguariensis* commercial yield. **Cerne**, v. 22, n. 3, p. 241-248, 2016.
- WENDLING, I.; BRONDANI, G. Produção de mudas de erva-mate. In: WENDLING, I.; SANTIN, D. (Org.). **Propagação e nutrição de erva-mate**. 1. ed. Brasília: Embrapa Informação, 2015. 195 p.
- WENDLING, I.; STURION, J. A.; STUEPP, C. A. Early selection and classification of yerba mate progenies. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, n. 03, 2018.
- WENDLING, I.; TRUEMAN, S. J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry-Part I: Concepts, regulation and consequences of phase change. **New Forests**, v. 45, n. 4, p. 449-471, 2014.
- ZAPATA, F. J. Caffeine, but not other phytochemicals, in mate tea (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) attenuates high-fat-high-sucrose-diet-driven lipogenesis and body fat accumulation. **Journal of Functional Foods**, v. 64, p. 103646, 2020.
- ZHU, B. et al. Caffeine content and related gene expression: novel insight into caffeine metabolism in camellia plants containing low, normal, and high caffeine concentrations. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 67, n. 12, p. 3400-3411, 2019.
- ZIELINSKI, A. A. F. et al. A multivariate approach to differentiate yerba mate (*Ilex paraguariensis*) commercialized in the southern Brazil on the basis of phenolics,

methylxanthines and in vitro antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 3, p. 644-652, 2020.