

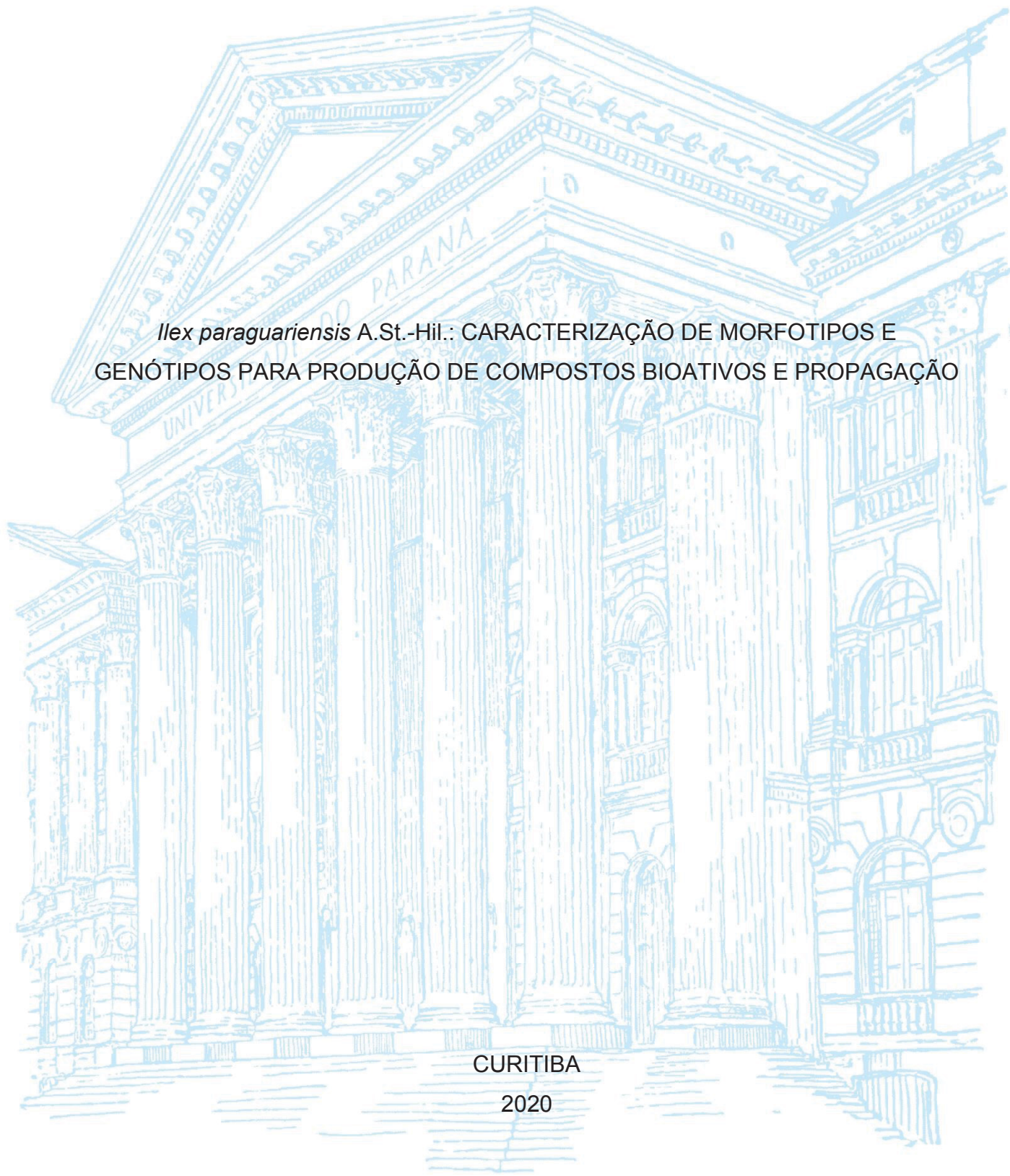
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MANOELA MENDES DUARTE

Ilex paraguariensis A.St.-Hil.: CARACTERIZAÇÃO DE MORFOTIPOS E
GENÓTIPOS PARA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E PROPAGAÇÃO

CURITIBA

2020



MANOELA MENDES DUARTE

Ilex paraguariensis A.St.-Hil.: CARACTERIZAÇÃO DE MORFOTIPOS E
GENÓTIPOS PARA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E PROPAGAÇÃO

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

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Nogueira

Coorientadores: Dr. Ivar Wendling
Prof^a. Dr^a. Érika Amano
Dr. Marcelo Lazzarotto

CURITIBA

2020

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

Duarte, Manoela Mendes

Ilex paraguariensis A.St.-Hil.: caracterização de morfotipos e genótipos para produção de compostos bioativos e propagação / Manoela Mendes Duarte. - Curitiba, 2020.

149 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Nogueira

Coorientadores: Dr. Ivar Wendling

Profa. Dra. Érika Amano; Dr. Marcelo Lazzarotto

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

Defesa: Curitiba, 16/06/2020.

Área de concentração: Silvicultura.

1. Erva-mate. 2. Erva-mate – Melhoramento genético. 3. Erva-mate – Propagação. 4. Erva-mate – Sementes. 5. Erva-mate – Aspectos econômicos. 6. Teses. I. Nogueira, Antonio Carlos. II. Wendling, Ivar. III. Amano, Erika. IV. Lazzarotto, Marcelo. V. Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias. VI. Título.

CDD – 634.9

CDU – 634.0.285

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 **MANOELA MENDES DUARTE** intitulada: *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.: **CARACTERIZAÇÃO DE MORFOTIPOS E GENÓTIPOS PARA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E PROPAGAÇÃO**, sob orientação do Prof. Dr. ANTÔNIO CARLOS NOGUEIRA, que após terem inquirido a aluna 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, 16 de Junho de 2020.

Assinatura Eletrônica

17/06/2020 10:32:42.0

ANTÔNIO CARLOS NOGUEIRA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

24/06/2020 10:41:53.0

SUELEN SANTOS REGO

Avaliador Externo (FACULDADE DE JAGUARIAIVA)

Assinatura Eletrônica

18/06/2020 12:34:25.0

ELISA SERRA NEGRA VIEIRA

Avaliador Externo (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA
AGROPECUÁRIA)

Assinatura Eletrônica

24/06/2020 10:08:01.0

ADRIANA TOURINHO SALAMONI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE)

Assinatura Eletrônica

17/06/2020 13:03:50.0

ROSSANA CATIE BUENO DE GODOY

Avaliador Externo (EMBRAPA FLORESTA)

A todas as mulheres da ciência brasileira.

Aos meus pais, Gomercindo e Ana Lucia.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Não há no mundo exagero mais belo que a gratidão.
Jean de La Bruyère

À Deus e à Mãe, Rainha e Vencedora Três Vezes Admirável de Schöenstatt, por toda luz, sabedoria, discernimento e bençãos ao longo desta caminhada.

À minha família, pelo incentivo, apoio e por compreender a minha ausência na busca pelos meus sonhos.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, pela oportunidade de realizar o doutorado. Sinto-me orgulhosa por fazer parte dessa renomada instituição. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos a mim concedida. Sei do meu privilégio e espero honrar os investimentos que me foram concedidos durante esses anos de pós-graduação.

Ao meu querido orientador, Professor Antonio Carlos Nogueira, pela confiança, paciência e dedicação ao longo desses sete anos de UFPR. Hoje posso dizer que o Senhor é um grande amigo e levarei seus ensinamentos acadêmicos, de vida e especialmente de fé, como lindas recordações dessa jornada. Obrigada por tudo!

Ao meu coorientador Dr. Ivar Wendling, agradeço imensamente a oportunidade, a orientação e a disponibilidade para realização deste trabalho. Além do chimarrão diário, agora a erva-mate faz parte da minha história como pesquisadora e sua contribuição foi fundamental.

À minha coorientadora Prof^a. Erika Amano pelo auxílio e confiança dedicados a mim e pelas produtivas conversas sobre a vida (pessoal e profissional). Ao meu coorientador Dr. Marcelo Lazzarotto, pela paciência, atenção e pela disponibilidade em sempre me atender.

Às Empresas Bitumirim Indústria e Comércio de Erva-mate Ltda., Baldo SA e ao Mercado Municipal de Curitiba, pelo apoio na realização deste trabalho.

À banca examinadora, pelas valiosas contribuições para melhoria deste trabalho.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Florestas, por todo apoio técnico e suporte logístico para realização deste trabalho. Em especial, aos funcionários do Laboratório de Propagação: Décio, Vero, Joelzinho e Nide, pelo

auxílio nas coletas de campo, instalação de experimentos, risadas, cuecas viradas, chá mate e churrascos. Agradeço imensamente a companhia de todos vocês!

Às pesquisadoras Rossana Catie Bueno de Godoy e Cristiane Vieira Helm, pelo auxílio nas análises sensoriais e químicas. Obrigada por toda atenção e dedicação, vocês são um grande exemplo de pesquisadoras! Às técnicas Dayanne Mendes e Tiélidy de Lima por transmitirem o conhecimento de forma tão positiva e alegre, e pela sempre disponibilidade em me auxiliar e tirar dúvidas nas milhões de análises laboratoriais. Luziane Franciscon e ao Fabrício Hansel pelo auxílio estatístico. Daiane Kestring e Marianne Bernardes pela disponibilidade e auxílio. E à querida Caroline Buhner, por ser uma pessoa tão generosa: obrigada pelas inúmeras conversas, amizade e caronas.

Aos meus queridos amigos e colegas “Embrapianos”: Jéssica Tomasi, Mônica Gabira, Leandro Marcolino Vieira, Natália Aguiar Saudade, Renata Almeida Magionni e Francielen Paola de Sá, pela amizade, auxílio nos experimentos e avaliações, pelos inúmeros e divertidos almoços na propagação. Aprendi muito com todos vocês e serei sempre muito grata pela nossa amizade.

A minha colega e hoje grande amiga Jéssica Tomasi. Você é exemplo de pessoa e de profissional! Agradeço de coração tudo que tu fizeste por mim nestes últimos anos. Sem dúvida essa minha conquista tem parte importante da tua dedicação, amizade e generosidade! Você é luz, menina Jéssica!

Aos meus queridos amigos da Pós em Agronomia, Jéssica Tomasi, Leandro Marcolino, Cíntia Fagundes e Maíra Tomazzoli, pela parceria, amizade, reuniões de estudo e pelas noites de pizza e muita risada no Agrárias. Aos colegas de pós Floresta, Maria Cecília Mireski e Carlos André Stuepp, pela parceria nos trabalhos acadêmicos.

A Jaqueline Valérius, Thiare Aparecida Coelho e Ana Carolina Brumat Lyra, por serem minha família em Curitiba, e por dividir não só o apartamento, mas suas experiências de vida. Levarei vocês sempre no coração. Obrigada por tudo!

Ao Laboratório de Sementes Florestais da UFPR e a todos os colegas que tornaram essa caminhada mais alegre. Aos alunos de iniciação científica: Cléber Porth, Amanda Cardoso e Vinícius Gris pelo auxílio na montagem e avaliação de experimentos. Aos colegas de Pós Francival Cardoso e Daniele Cristina pelo auxílio nos experimentos, parceria no laboratório e momentos de descontração. À Mônica Gabira e Letícia Walter, agradeço imensamente todo o auxílio nos experimentos e avaliações da tese, mas agradeço principalmente pela amizade de vocês e por me ensinarem a fazer café. À técnica Simone Pereira, sou grata pelos anos de amizade, comilanças e chimarrão.

Agradecimento especial para a “chefa” do Laboratório de Sementes, minha querida amiga Prof^a. Dr^a. Dagma Kratz, pela amizade, apoio acadêmico e confiança ao longo de todos esses anos. Obrigada por abrir as portas da sua casa e por você e sua família me acolherem sempre com tanto carinho. Já temos provas de que mesmo com a distância nossa amizade permanece, então, aonde eu estiver, conte sempre comigo.

Aos queridos amigos e colegas do LECOF (antigos e atuais), que foram companheiros de café, aniversários, pipocas, RU e muita diversão. De maneira especial a Jaçanan Eloisa de Freitas Milani, Tomaz Longhi Santos, Bruno Palka, Viviane Palma e Edilaine Duarte. Carinho especial a Amanda Marcon, pela amizade, compartilhamento de séries e muito apoio estatístico. E também, meus agradecimentos sinceros a Edberto Moura Lima, pelo apoio ao longo dessa jornada de pós-graduação e de vida, por me mostrar um mundo muito além da minha “bolha”: você é parte importante da pessoa que me tornei.

Aos mestres Yoshiko Saito Kuniyoshi, Carlos Vellozo Roderjan, Franklin Galvão e Christopher Thomas Blum, pelos ensinamentos, parceria sempre agradável, conselhos acadêmicos e de vida. Foi uma honra poder conviver e aprender com vocês.

Aos meus queridos companheiros do “Bão da Pós”, Aurélio Lourenço, Jaçanan Milani, Jaqueline Valérius, Linéia Zen, Victor Andrade, Thiago Wendling e Francisco Higuchi. Obrigada pelas ótimas lembranças dessa época de Pós-Graduação.

Aos amigos de longa data, em especial Renata Camargo, Renata Cerutti, Josiele Fão e Bruna Vasconcelos, por fazer essa caminhada ser mais leve e divertida.

E por fim, à ciência brasileira, que mesmo em meio ao descaso e falta de incentivos, resiste!

A todos aqui mencionados e aos que de alguma forma contribuíram com este trabalho: MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS!

If you want to change the fruits, you will first have to change the roots. If you want to change the visible, you must first change the invisible.”

T. Harv Eker

RESUMO

Ilex paraguariensis A.St.-Hil. é uma espécie arbórea, nativa e amplamente consumida e cultivada no Brasil, Paraguai e Argentina. Considerada um dos componentes dos sistemas tradicionais silviculturais mais antigos, a espécie apresenta reconhecida importância ecológica/ambiental, econômica, social e cultural para os três estados do Sul do Brasil. Seu consumo tradicional se dá pelo preparo de bebidas tônicas e estimulantes, como o chimarrão, tererê e chá mate. Em função da sua versatilidade química, a erva-mate vem se destacando no cenário mundial, sendo utilizada com sucesso na farmacologia, indústria alimentícia e cosmética, com reconhecimento científico em relação aos seus benefícios à saúde humana. Com essa crescente demanda, é necessário que a renovação e implantação de novos ervais seja realizada com materiais genéticos de qualidade, bem como ter as suas características químicas conhecidas, a fim de proporcionar maior produtividade dos plantios e maior qualidade do produto final. Neste sentido, existem vários gargalos que podem ser explorados pela silvicultura da erva-mate, e alguns desses foram tratados no presente estudo. No Capítulo I foi estudada a diferenciação e caracterização física de frutos e pirênios, a viabilidade e desenvolvimento embrionário de pirênios, anatomia foliar e os compostos bioativos em folhas (capacidade antioxidante, compostos fenólicos totais, metilxantinas e ácidos cafeoilquínicos) de cinco morfotipos de erva-mate: sassafrás, verde escuro, verde fosco, cinza e peludinha. Concluiu-se que: há diferenças entre os frutos e pirênios entre os lotes estudados; Todos os morfotipos apresentaram elevada atividade antioxidante e teores de compostos fenólicos totais; o teor de cafeína diferiu significativamente entre os morfotipos verde escuro e peludinha; A deposição e configuração da cutícula na face adaxial foi a principal diferença observada pela anatomia foliar entre os morfotipos. O Capítulo II teve como objetivos avaliar diferentes temperaturas (câmara fria a 5 °C, câmara seca a 15 °C e viveiro), substratos (areia e papel germitest) e períodos (0, 90 e 180 dias) como métodos alternativos de estratificação na superação da dormência embrionária de pirênios de erva-mate. De maneira geral, os métodos utilizados foram eficientes para manutenção da viabilidade dos pirênios. A estratificação à 5 e 15 °C por 90 dias possibilitou o desenvolvimento embrionário até o estágio pós-coração. A estratificação convencional foi o único método que apresentou embriões em estágio maduro. O Capítulo III objetivou avaliar a influência da sazonalidade (quatro estações do ano) nos teores de compostos bioativos e no enraizamento de estacas de 19 genótipos, bem como, a correlação entre esses compostos e a rizogênese da erva-mate. Concluiu-se que o potencial de enraizamento e os teores de compostos bioativos sofrem variação entre os genótipos e entre as épocas do ano. Primavera e verão proporcionaram maiores porcentagens de enraizamento e maiores teores de compostos, sendo que os compostos bioativos estudados não apresentaram correlação com o enraizamento das estacas. E por fim, o Capítulo IV objetivou analisar a influência da tosta da erva-mate nos teores de compostos bioativos de diferentes genótipos e a aceitação por consumidores de chá mate cafeinados ou descafeinados. Os resultados indicaram que o processo de tosta influenciou significativamente nos teores de compostos bioativos dos chás, bem como houve diferenças significativas entre os genótipos. De maneira geral, os chás descafeinados tiveram melhor aceitação do que os chás cafeinados.

Palavras-chave: Superação de dormência. Metabólitos secundários. Melhoramento genético da erva-mate. Produção de mudas. Seleção de genótipos.

ABSTRACT

Ilex paraguariensis A.St.-Hil. is a tree species, native and widely consumed, cultivated and planted in Brazil, Paraguay and Argentina. Considered one of the components of the oldest traditional silvicultural systems, yerba mate has been recognized by ecological/environmental, economic, social and cultural importance in the three states of southern Brazil. Its traditional consumption is given by the preparation of tonic and stimulating drinks, such as chimarrão, tererê and mate tea. Due to its chemical versatility, yerba mate has been standing out on the world stage, being used successfully in pharmacology, food and cosmetics industry, with scientific recognition in relation to its benefits to human health. With this growing demand, it is necessary that the renovation and implantation of new mate plantations be carried out with high quality genetic materials, as well as having known chemical characteristics, in order to provide greater productivity and higher quality of the final product. In this sense, there are several bottlenecks that can be exploited by yerba mate silviculture, and some of these were treated in the present study. In chapter I we studied physical differentiation and characterization of fruits and pyrenes, embryonic viability and embryos development of pyrenes, leaf anatomy and bioactive compounds in leaves (antioxidant capacity, total phenolic compounds, methylxanthines and caffeoylquinic acids) of five yerba mate morphotypes: sassafras, dark green, dull green, gray and peludinha. We concluded that: there are differences between fruits and pyrenes of the studied lots; All morphotypes showed high antioxidant activity and total phenolic compounds; Caffeine content differed significantly between dark green and peludinha morphotypes; The deposition and configuration of the cuticle of the adaxial face was the main difference observed by the leaf anatomy between morphotypes. Chapter II aimed to evaluate different temperatures (cold chamber at 5 °C, dry chamber at 15 °C and greenhouse), substrates (sand and germitest paper) and periods (0, 90 and 180 days) as alternative stratification methods for overcoming embryonic dormancy in yerba mate pyrenes. In general, the methods used were efficient to maintain pyrenes viability. Stratification at 5 and 15 °C for 90 days favors embryonic development until the post-heart stage. Conventional stratification was the only method that presented mature embryos. Chapter III aimed to evaluate the influence of seasonality (four seasons) on the of bioactive compounds contents and the cuttings rooting in 19 genotypes, as well as the correlation between these compounds and the rhizogenesis of yerba mate. We concluded that rooting potential and bioactive compounds contents vary between genotypes and seasons. Spring and summer provided higher percentages of rooting and higher levels of compounds, and the bioactive compounds did not show correlation with rooting cuttings. Finally, Chapter IV aimed to analyze the influence of yerba mate toasting on bioactive compounds contents in different genotypes and the acceptance by consumers of caffeinated or decaffeinated mate tea. The results indicated that toast process significantly influenced the levels of bioactive compounds in teas, as well as a difference between genotypes. In general, decaffeinated teas were better accepted than caffeinated teas.

Keywords: Overcoming dormancy. Secondary metabolites. Yerba mate breeding. Seedling production. Genotypes selection.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 2.1 - PORCENTAGEM DE EMBRIÕES VIÁVEIS, INVIÁVEIS E DETERIORADOS EM PIRÊNIOS DE QUATRO LOTES DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.37
- FIGURA 2.2 - MORFOTIPOS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. a) SASSAFRÁS; b) VERDE FOSCO; c) VERDE ESCURO; d) CINZA; e) PELUDINHA. ...39
- FIGURA 2.3 - MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA MOSTRANDO DETALHES DA NERVURA CENTRAL (a) E MESOFILO (b) FOLIAR DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.40
- FIGURA 2.4 - CARACTERIZAÇÃO GERAL DA DEPOSIÇÃO DE CERA EPICUTICULAR (imagens à esquerda: a, c, e, g, i) E DETALHES (imagens à direita: b, d, f, h, j) NA FACE ADAXIAL DE FOLHAS DE MORFOTIPOS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. SASSAFRÁS (a, b); VERDE ESCURO (c, d); VERDE FOSCO (e, f); CINZA (g, h); PELUDINHA (i, j).41
- FIGURA 2.5 - CARACTERIZAÇÃO GERAL DA FACE ABAXIAL DE FOLHAS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. a) PERFIL ESTOMÁTICO; b) DETALHE DA NERVURA CENTRAL DO MORFOTIPO PELUDINHA, ILUSTRANDO A PRESENÇA DE TRICOMAS TECTORES.42
- FIGURA 2.6 - CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA GERAL DE MORFOTIPOS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. EM MICROSCOPIA DE LUZ. a) VISÃO GERAL DA FOLHA; b) DETALHE DA NERVURA CENTRAL; c) DETALHE DO MESOFILO DORSIVENTRAL; d) DETALHE DO MESOFILO.....43
- FIGURA 2.7 - TEORES DE CAFEÍNA, TEOBROMINA E METILXANTINAS TOTAIS DE MORFOTIPOS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.45
- FIGURA 3.1 - PIRÊNIO (ENDOCARPO + SEMENTE) DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., EM CORTE LONGITUDINAL, DEMONSTRANDO: ENDOCARPO (end), TEGUMENTO (teg), ENDOSPERMA (en) E EMBRIÃO (em)..62
- FIGURA 3.2 - PORCENTAGEM DE EMBRIÕES VIÁVEIS, INVIÁVEIS E DETERIORADOS EM DIFERENTES TEMPERATURAS, SUBSTRATOS E PERÍODOS DE ESTRATIFICAÇÃO DE PIRÊNIOS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. CF = CÂMARA FRIA (5 °C); CS = CÂMARA SECA (15 °C); P = SUBSTRATO PAPEL; A = SUBSTRATO AREIA; 90 DIAS; 180 DIAS; C = CONVENCIONAL (CASA DE VEGETAÇÃO POR 180 DIAS).....64
- FIGURA 3.3 - GRAU DE UMIDADE (%) DE PIRÊNIOS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS, SUBSTRATOS E PERÍODOS DE ESTRATIFICAÇÃO. CF = CÂMARA FRIA (5 °C); CS = CÂMARA SECA (15 °C); P = SUBSTRATO PAPEL; A = SUBSTRATO AREIA; 90 DIAS; 180 DIAS; C = CONVENCIONAL (CASA DE VEGETAÇÃO POR 180 DIAS).....66
- FIGURA 3.4 - PORCENTAGEM DE EMBRIÕES VIÁVEIS, INVIÁVEIS E DETERIORADOS EM DIFERENTES LOTES E PERÍODOS DE ESTRATIFICAÇÃO DE PIRÊNIOS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. S = SASSAFRÁS; VE = VERDE ESCURO; VF = VERDE FOSCO; M =

	MIX; 0 = SEMENTES FRESCAS; 90 DIAS DE ESTRATIFICAÇÃO; 180 DIAS DE ESTRATIFICAÇÃO.....	67
FIGURA 3.5 -	GRAU DE UMIDADE MÉDIO, EM PORCENTAGEM, DE PIRÊNIOS DE MORFOTIPOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil. SUBMETIDOS A DIFERENTES PERÍODOS DE ESTRATIFICAÇÃO. S = SASSAFRÁS; VE = VERDE ESCURO; VF = VERDE FOSCO; M = MIX.....	68
FIGURA 3.6 -	PORCENTAGEM MÉDIA DE EMBRIÕES MADUROS, AOS 180 DIAS (A), E GRAU DE UMIDADE INICIAL E AOS 180 DIAS (B) DE PIRÊNIOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil. SUBMETIDOS A ESTRATIFICAÇÃO CONVENCIONAL. S = SASSAFRÁS; VE = VERDE ESCURO; VF = VERDE FOSCO; M = MIX.	70
FIGURA 4.1 -	PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO AO LONGO DAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO EM 19 GENÓTIPOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.....	89
FIGURA 4.2 -	TEORES DE CAFEÍNA AO LONGO DAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO EM 19 GENÓTIPOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.....	91
FIGURA 4.3 -	CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE ENRAIZAMENTO (EM), BROTAÇÃO (BR), MANUTENÇÃO DE FOLHAS (MF), CAPACIDADE ANTIOXIDANTE (RADICAIS ABTS E DPPH), COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT), CAFEÍNA (C), TEOBROMINA (T), METILXANTINAS TOTAIS (MXT), ÁCIDO-3-CAFEIOLQUÍNICO (AC3), ÁCIDO-4-CAFEIOLQUÍNICO (AC4), ÁCIDO-5-CAFEIOLQUÍNICO (AC5) E ÁCIDOS CAFEIOLQUÍNICOS TOTAIS (ACT) PARA 19 GENÓTIPOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.....	94
FIGURA 5.1 -	INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE TOSTA NOS TEORES DE CAFEÍNA EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil..	117
FIGURA 5.2 -	MAPA INTERNO DE PREFERÊNCIA DO CONSUMIDOR PARA CHÁ MATE QUENTE DESCAFEINADO (A) E CHÁ MATE QUENTE CAFEINADO (B) PRODUZIDOS A PARTIR DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.....	122
FIGURA 5.3 -	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA (ANÁLISE HIERÁRQUICA DE CLUSTER) DA SEGMENTAÇÃO DOS CONSUMIDORES DE CHÁ MATE DESCAFEINADO (A) E CAFEINADOS (B) PRODUZIDOS A PARTIR DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.....	123

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 - DIÂMETRO, ALTURA, MASSA FRESCA, MASSA SECA E GRAU DE UMIDADE (GU) DE FRUTOS DE QUATRO LOTES DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.	34
TABELA 2.2 - COMPRIMENTO, LARGURA, ESPESSURA, GRAU DE UMIDADE (GU), PESO DE MIL PIRÊNIOS (P1000) E NÚMERO DE PIRÊNIOS POR QUILOGRAMA (N°/KG) DE QUATRO LOTES DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.	36
TABELA 2.3 - PORCENTAGEM DE EMBRIÕES VIÁVEIS EM ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO GLOBULAR, CORAÇÃO, PÓS-CORAÇÃO E TORPEDO, EM PIRÊNIOS DE QUATRO LOTES DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.	38
TABELA 2.4 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE (RADICAIS ABTS E DPPH), COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CF), METILXANTINAS TOTAIS (MX) E ÁCIDOS CAFEOLQUÍNICOS (CQA) DE MORFOTIPOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.	47
TABELA 2.5 - AMPLITUDE DE VARIAÇÃO DOS TEORES DE CAFEÍNA, TEOBROMINA, METILXANTINAS TOTAIS (MX) E ÁCIDOS CAFEOLQUÍNICOS (CQA) DE MORFOTIPOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.	48
TABELA 3.1 - LOTES E MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA EMBRIONÁRIA EM PIRÊNIOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.	60
TABELA 3.2 - PORCENTAGEM DE EMBRIÕES EM ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE CORAÇÃO, PÓS-CORAÇÃO E TORPEDO, EM PIRÊNIOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil. SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS, SUBSTRATOS E PERÍODOS DE ESTRATIFICAÇÃO. CF = CÂMARA FRIA (5 °C); CS = CÂMARA SECA (15 °C).	65
TABELA 3.3 - FASES DE DESENVOLVIMENTO DO ESTÁGIO EMBRIONÁRIO (%) EM PIRÊNIOS VIÁVEIS DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil., SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS, SUBSTRATOS E PERÍODOS DE ESTRATIFICAÇÃO. CF = CÂMARA FRIA (5 °C); CS = CÂMARA SECA (15 °C); P = PAPEL; A = AREIA.	65
TABELA 3.4 - PORCENTAGEM DE PIRÊNIOS DETERIORADOS E EMBRIÕES EM FASE DE CORAÇÃO, PÓS-CORAÇÃO E TORPEDO EM QUATRO LOTES DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil. SUBMETIDOS A DIFERENTES PERÍODOS DE ESTRATIFICAÇÃO. S = SASSAFRÁS; VE = VERDE ESCURO; VF = VERDE FOSCO; M = MIX.	67
TABELA 3.5 - PORCENTAGEM MÉDIA DE PIRÊNIOS VIÁVEIS, INVIÁVEIS, DETERIORADOS E ESTÁGIO EMBRIONÁRIO EM FASE DE CORAÇÃO, PÓS-CORAÇÃO E TORPEDO, NA ESTRATIFICAÇÃO CONVENCIONAL DE QUATRO LOTES DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil. S = SASSAFRÁS; VE = VERDE ESCURO; VF = VERDE FOSCO; M = MIX.	69
TABELA 3.6 - CONDUTIVIDADE ELÉTRICA (CE), APÓS 24 HORAS, DE PIRÊNIOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil. SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS, SUBSTRATOS E PERÍODOS DE	

	ESTRATIFICAÇÃO CF = CÂMARA FRIA (5 °C); CS = CÂMARA SECA (15 °C).....	71
TABELA 4.1 -	IDENTIFICAÇÃO DOS GENÓTIPOS E CLASSIFICAÇÃO QUANTO AO TEOR DE CAFEÍNA.....	84
TABELA 4.2 -	PORCENTAGEM MÉDIA DE ENRAIZAMENTO, NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES, EMISSÃO DE NOVAS BROTAÇÕES E MANUTENÇÃO DE FOLHAS EM ESTAQUIA DE OITO GENÓTIPOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil. EM QUATRO ÉPOCAS DO ANO.....	95
TABELA 4.3 -	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE (RADICAIS ABTS E DPPH) E TEORES DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DE OITO GENÓTIPOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil. EM QUATRO ÉPOCAS DO ANO.....	98
TABELA 4.4 -	TEORES DE CAFEÍNA E TEOBROMINA DE OITO GENÓTIPOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil. EM QUATRO ÉPOCAS DO ANO.	99
TABELA 5.1 -	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE VIA RADICAIS ABTS E DPPH E TEORES DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM EXTRATO AQUOSO DE CHÁ MATE VERDE E TOSTADO, OBTIDOS A PARTIR DE GENÓTIPOS CAFEINADOS E DESCAFEINADOS.....	118
TABELA 5.2 -	TEORES DE METILXANTINAS EM EXTRATO AQUOSO DE CHÁ MATE VERDE E TOSTADO, OBTIDOS A PARTIR DE GENÓTIPOS CAFEINADOS E DESCAFEINADOS.....	118
TABELA 5.3 -	ÁCIDOS CAFEOLQUÍNICOS EM EXTRATO AQUOSO DE CHÁ MATE VERDE E TOSTADO, OBTIDOS A PARTIR DE GENÓTIPOS CAFEINADOS E DESCAFEINADOS.....	120
TABELA 5.4 -	MÉDIAS DE ACEITAÇÃO, A PARTIR DA ESCALA HEDÔNICA, PARA CHÁS MATE DESCAFEINADOS E CAFEINADOS, PRODUZIDOS A PARTIR DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE <i>Ilex. paraguariensis</i> A. St.-Hil., EM CADA SEGMENTO.....	124

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	19
REFERÊNCIAS.....	23
2 MORFOTIPOS DE ERVA-MATE: CARACTERIZAÇÃO BIOMÉTRICA DE FRUTOS E PIRÊNIOS, ANATOMIA FOLIAR E COMPOSTOS BIOATIVOS	26
2.1 INTRODUÇÃO.....	27
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
2.2.1 Material vegetal.....	29
2.2.2 Coleta, beneficiamento e análises físicas de frutos e pirênios.....	29
2.2.3 Viabilidade e estágio embrionário dos pirênios.....	30
2.2.4 Caracterização anatômica de folhas.....	30
2.2.5 Caracterização de compostos bioativos.....	31
2.2.5.1 Compostos fenólicos totais.....	32
2.2.5.2 Capacidade antioxidante (radicais ABTS e DPPH).....	32
2.2.5.3 Metilxantinas e ácidos cafeoilquínicos.....	33
2.2.6 Análises estatísticas.....	33
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
2.3.1 Análises físicas de frutos e pirênios.....	34
2.3.2 Viabilidade e estágio embrionário dos pirênios.....	37
2.3.3 Anatomia foliar.....	38
2.3.4 Compostos bioativos.....	44
2.4 CONCLUSÃO.....	48
2.5 REFERÊNCIAS.....	48
3 ALTERNATIVAS PARA SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA EMBRIONÁRIA DE PIRÊNIOS DE ERVA-MATE	55
3.1 INTRODUÇÃO.....	56
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	59
3.2.1 Coleta e beneficiamento de frutos.....	59
3.2.2 Métodos alternativos de estratificação.....	60
3.2.3 Viabilidade e estágio embrionário dos pirênios.....	61
3.2.4 Grau de umidade.....	62
3.2.5 Condutividade elétrica.....	63
3.2.6 Análise estatística.....	63
3.3 RESULTADOS.....	64
3.3.1 Experimento 1 - Temperaturas, substratos e períodos de estratificação na superação de dormência embrionária.....	64
3.3.2 Experimento 2 - Lotes e períodos de estratificação na superação de dormência embrionária.....	66

3.3.3 Experimento 3 - Estratificação convencional na superação da dormência embrionária em lotes de erva-mate.....	68
3.3.4 Condutividade elétrica.....	70
3.4 DISCUSSÃO.....	71
3.5 CONCLUSÃO.....	76
3.6 REFERÊNCIAS.....	76
4 VARIAÇÃO SAZONAL DE COMPOSTOS BIOATIVOS E DO ENRAIZAMENTO EM GENÓTIPOS DE ERVA-MATE.....	80
4.1 INTRODUÇÃO.....	81
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	84
4.2.1 Coleta do material vegetal.....	84
4.2.2 Estaquia.....	85
4.2.3 Compostos bioativos.....	85
4.2.3.1 Preparo do extrato.....	85
4.2.3.2 Capacidade antioxidante (radicais ABTS e DPPH).....	86
4.2.3.3 Compostos fenólicos totais.....	87
4.2.3.4 Metilxantinas e ácidos cafeoilquínicos.....	87
4.2.4 Análise estatística.....	88
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
4.4 CONCLUSÃO.....	100
4.5 REFERÊNCIAS.....	101
5 CHÁ MATE CAFEINADO E DESCAFEINADO: EFEITO DA TOSTA NOS TEORES DE COMPOSTOS BIOATIVOS E ACEITAÇÃO POR CONSUMIDORES.....	108
5.1 INTRODUÇÃO.....	109
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	111
5.2.1 Coleta e secagem da erva-mate.....	111
5.2.2 Preparo dos extratos aquosos.....	112
5.2.3 Capacidade antioxidante (radicais ABTS e DPPH).....	112
5.2.4 Teor de compostos fenólicos.....	113
5.2.5 Metilxantinas e ácidos cafeoilquínicos.....	113
5.2.6 Preparo dos chás para teste de aceitação.....	114
5.2.7 Teste de aceitação.....	114
5.2.8 Análises estatísticas.....	115
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	116
5.3.1 Influência da tosta nos compostos bioativos.....	116
5.3.2 Aceitação de chá mate descafeinado e cafeinado.....	121
5.4 CONCLUSÃO.....	126
5.5 REFERÊNCIAS.....	126

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	131
REFERÊNCIAS GERAIS	134

1 INTRODUÇÃO GERAL

A família Aquifoliacea é extensivamente distribuída nas regiões tropicais e temperadas do planeta, com vasta importância econômica e diversos usos (GOTTLIEB et al., 2005, p. 352; YANG et al., 2015, p. 733), destacando-se o gênero *Ilex* com cerca de 700 espécies (SPICHIGER et al., 1993, p. 463). Dentre as espécies, a importância de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil é notória, sendo considerada um dos componentes dos sistemas tradicionais silviculturais mais antigos da região sul do Brasil (ROSSA et al., 2017, p. 1366). Nativa e amplamente consumida na América do Sul, o cultivo da erva-mate abrange os países Brasil, Argentina e Paraguai (OLIVEIRA; ROTTA, 1985, p. 24). Típica da Floresta Ombrófila Mista, no Brasil, sua ocorrência natural se dá predominantemente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e região sul do Mato Grosso do Sul (CARVALHO, 2006, p. 459; DIAZ, 2013, p. 27).

Largamente consumida, a erva-mate é responsável por uma das atividades econômicas extrativistas de maior importância para o País, impulsionando a economia de muitos municípios do sul do Brasil. No ano de 2018, a erva-mate gerou o segundo maior valor de produção entre os produtos não madeireiros (36,7%), com colheita de 393 mil toneladas, sendo o Paraná o maior produtor (IBGE, 2019, p. 08). Somando-se as áreas plantadas e de extrativismo, a erva-mate torna-se o principal produto não madeireiro na Região Sul, e seu potencial econômico, social e ecológico gera emprego e renda, especialmente para pequenos e médios produtores rurais (MOSELE; RODIGHERI; PENTEADO JUNIOR, 1994, p. 07). A sua importância socioeconômica está principalmente baseada na rusticidade da planta, quando comparada aos cultivos agrícolas em geral, motivando sua produção e fixação do homem ao campo (VIDOR et al., 2002, p. 416).

O consumo tradicional da erva-mate se dá pelo uso das folhas e ramos finos no preparo de bebidas tônicas e estimulantes, a partir da infusão à quente, o chimarrão, ou à frio, o tererê, e da tosta das folhas, obtendo-se o chá mate (SAIDELLES et al., 2010, p. 259). Além dos usos tradicionais, o cenário atual demonstra que a potencialidade da erva-mate é crescente, sendo aplicada com sucesso para fins fitoterápicos, cosméticos, estéticos e culinários (HECK; DE MEJIA, 2007, p. 140; GODOY et al., 2013, p. 801; ALKHATIB; ATCHESON, 2017, p. 882; BARBOZA; CAZAL, 2018, p. 01). Neste sentido, a versatilidade de produtos que

podem ser obtidos a partir da erva-mate tem despertado interesse do mercado nacional e internacional, abrindo oportunidades para o desenvolvimento de pesquisas científicas relacionadas a silvicultura da espécie, que tragam resultados objetivos e práticos, a fim de atender novas demandas.

A espécie contém inúmeros compostos bioativos, responsáveis por diversos benefícios a saúde humana (HECK; DE MEJIA, 2007, p. 138). Estudos destacam as propriedades antioxidantes, anti-inflamatória, anticarcinogênica, auxiliando também no controle da obesidade, além de ser diurético e energético. Esses e outros benefícios são atribuídos à erva-mate principalmente pela gama de compostos químicos presentes em suas folhas, especialmente aos pertencentes a classe das metilxantinas, saponinas, taninos e compostos fenólicos (HECK; DE MEJIA, 2007, p. 138; CARDOZO JÚNIOR; MORAND, 2016, p. 442; ALKHATIB; ATCHESON, 2017, p. 01; GÓMEZ-JUARISTI et al., 2018, p. 1028). Dentre os compostos de interesse destaca-se a cafeína, produzida a partir do metabolismo secundário das plantas, e que atualmente tem despertado a atenção de consumidores e de produtores de erva-mate.

A cafeína é considerada um composto estimulante, encontrada em diversas bebidas e suplementos, e sua presença é muitas vezes requerida pelos benefícios conferidos a ela, tais como resistência física, redução da fadiga e aumento da atenção e concentração mental (HECKMAN et al., 2010, p. 77). Em contrapartida, os baixos teores desse composto são alvo da preferência de outros consumidores, que buscam produtos descafeinados, dado a ocorrência de problemas associados à insônia, hiperatividade, azia e taquicardia (HECKMAN et al., 2010, p. 81; VALDUGA et al., 2019, p. 481). O consumo de produtos cafeinados é contraindicado em casos de doenças cardiovasculares graves, úlceras, tensão nervosa e insônia (CASSEL et al., 2010, p. 656) e a versão de produtos com baixos teores ou até mesmo descafeinados é uma alternativa para esse público.

Além dos benefícios da cafeína, os compostos fenólicos atuam de diversas maneiras na saúde humana, apresentando atividades como antioxidantes, anti-inflamatória, antialérgica, atuando também na inibição de tumores (CHAICOUSKI et al., 2014, p. 34). *I. paraguariensis* é fonte natural de compostos fenólicos, especialmente devido a classe dos ácidos clorogênicos e seus derivados, sendo que esses compostos são os principais responsáveis pela elevada atividade antioxidante (RIACHI; DE MARIA, 2017, p. 309). Do ponto de vista comercial, diferentes teores de

caféina e elevados teores de compostos fenólicos são interessantes por proporcionarem uma gama maior de produtos e aplicações potenciais, sendo esse um importante mercado a ser explorado. Neste sentido, a silvicultura pode auxiliar na seleção e obtenção de indivíduos que apresentem esses e outros compostos.

Em função das inúmeras aplicabilidades e interesses de consumo, há uma crescente preocupação para que os plantios de erva-mate consigam fornecer e suprir a demanda atual, especialmente buscando atender às expectativas de produtividade e do padrão de qualidade exigidos pelo mercado mundial. Para atingir esses objetivos é indispensável a utilização de mudas de elevado padrão genético, obtidas a partir de seleção de genótipos superiores, além da qualidade fisiológica e sanitária, que irão contribuir para maior produtividade e melhor perfil da matéria-prima a ser produzida (DUARTE et al., 2019, p. 06). Assim, existem vários gargalos que podem ser explorados pela silvicultura da erva-mate, sendo alguns deles tratados no presente estudo.

Com relação a propagação da espécie, podem ser observados problemas tanto relacionados as sementes quanto a propagação vegetativa. A formação ou renovação dos ervais ainda se dá em grande parte por mudas produzidas por sementes, entretanto, a dormência embrionária torna a germinação lenta e irregular. Assim, estudos visando alternativas para superação dessa dormência, acelerando e trazendo homogeneidade para o processo germinativo e formação das mudas, são de grande relevância, pois a produção via sementes é uma opção fácil, que demanda pouca tecnologia e com baixos custos, sendo efetiva para os pequenos viveiros e produtores.

Agora, quando se pensa em plantios destinados a produtos específicos, especialmente relacionados a composição química, como um chimarrão mais suave, chá mate descafeinado ou até mesmo para a indústria química, a aplicação das técnicas de propagação vegetativa é indispensável, pois permite a propagação clonal e massal de genótipos de interesse. Dentro desse aspecto, podem ser estudados diversos pontos, como a determinação de indivíduos que apresentem um perfil fitoquímico de interesse, época apropriada para a colheita da matéria-prima, além das questões efetivas de produção de mudas, como enraizamento, influência da sazonalidade e composição química no processo rizogênico.

O conhecimento acerca da silvicultura da erva-mate, abrangendo aspectos de produção de mudas, caracterização e seleção de genótipos de interesse,

caracterização de perfis fitoquímicos, bem como a aceitação por consumidores de produtos diferenciados, se torna cada vez mais necessário, para que se possa produzir matéria-prima de melhor qualidade, visando atender os diversos mercados e produtos em potencial. Além disso, serve como suporte para seleção de matrizes com características desejadas, implantação de áreas de produção mais produtivas, como também o planejamento adequado de toda a cadeia produtiva da erva-mate.

Diante dessa problemática, esta tese foi estruturada em quatro capítulos, a fim de melhor abordar algumas das demandas relacionadas a cultura da erva-mate:

- O Capítulo I, intitulado *Morfotipos de erva-mate: caracterização biométrica de frutos e pirênios, anatomia foliar e compostos bioativos* apresenta a diferenciação e caracterização de cinco morfotipos de *I. paraguariensis*, com base em análises físicas de frutos e pirênios, viabilidade e estágio embrionário de pirênios, anatomia foliar e teores de compostos bioativos;

- O Capítulo II intitula-se *Alternativas para superação de dormência embrionária de pirênios de erva-mate* e estuda a combinação de temperaturas, substratos e períodos de estratificação como métodos alternativos visando acelerar o desenvolvimento embrionário dos pirênios;

- O Capítulo III, que se intitula *Variação sazonal de compostos bioativos e do enraizamento em genótipos de erva-mate*, trata da avaliação do potencial de enraizamento e dos teores de compostos bioativos, especialmente a cafeína, além das diferenças entre genótipos, e como essas alterações ocorrem nas quatro estações do ano;

- E por fim, o Capítulo IV, intitulado *Chá mate cafeinado e descafeinado: efeito da tosta nos teores de compostos bioativos e aceitação por consumidores*, aborda a potencialidade de produtos diferenciados oriundos da erva-mate, especialmente relacionados às características químicas e aceitação.

REFERÊNCIAS

- ALKHATIB, A.; ATCHESON, R. Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) metabolic, satiety and mood state effects at rest and during prolonged exercise. **Nutrients**, v. 9, n. 8, p. 882-896, 2017.
- BARBOZA, H. C.; CAZAL, M. M. Avaliação da influência de características sensoriais e do conhecimento nutricional na aceitação do chá-mate. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, p. 01-06, 2018.
- CARDOZO JÚNIOR, 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.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Vol. 2. Brasília: Embrapa Informações Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2006. 627p.
- CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F.; BRUN, G. W.; ALMEIDA, D. E.; COGOI, L.; FERRARO, G.; FILIP, R. Supercritical fluid extraction of alkaloids from *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Journal of Food Engineering**, v. 100, n. 4, p. 656-661, 2010.
- CHAICOUSKI, A.; SILVA, J. E.; TRINDADE, J. L. F.; CANTERI, M. H. G. Determinação da quantidade de compostos fenólicos totais presentes em extratos líquido e seco de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 16, n. 1, p. 33-41, 2014.
- DIAZ, V. S. **Diversidade genética, estrutura genética espacial e fluxo gênico da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.), em dois fragmentos florestais na área de entorno do Parque Nacional do Iguçu**. 89 f. (Dissertação de Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/USP. Piracicaba, 2013.
- DUARTE, M. M.; MIRESKI, M. C.; OLISZESKI, A.; WENDLING, I.; STUEPP, C. A. Rooting of yerba mate cuttings with different lengths. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 5, n. 1, p. 05-11, 2019.
- GODOY, R. C. B.; DELIZA, R.; GHENO, L. B.; LICODIEDOFF, S.; FRIZON, C. N. T.; RABANI, R. H.; SANTIS, G. G. Consumer perceptions, attitudes and acceptance of new and traditional mate tea products. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 801-807, 2013.

GÓMEZ-JUARISTI, M.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, S.; SARRIA, B.; BRAVO, L.; MATEOS, R. Absorption and metabolism of yerba mate phenolic compounds in humans. **Food Chemistry**, v. 240, p. 1028-1038, 2018.

GOTTLIEB, A. M.; GIBERTI, G. C.; POGGIO, L. Molecular analyses of the genus *Ilex* (Aquifoliaceae) in southern South America, evidence from AFLP and ITS sequence data. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 2, p. 352-69, 2005.

HECK, C.; DE MEJIA, E. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, health implications and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 138-151, 2007.

HECKMAN, M. A.; WEIL, J.; DE 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.

IBGE. **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura 2018 – PEVS 2018**. Rio de Janeiro, v. 33, p. 1-8, 2019.

MOSELE, S. H.; RODIGHERI, H. R.; PENTEADO JUNIOR, J. Diagnóstico da erva-mate na região do Alto Uruguai gaúcho. **Perspectiva**, v. 18, n. 64, p. 7-17, 1994.

OLIVEIRA, Y. M. M.; ROTTA, E. Área de distribuição natural de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). In: Seminário Sobre Atualidades e Perspectivas Florestais, 10: Silvicultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), 1983, Curitiba. **Anais...Curitiba: EMBRAPA-CNPQ**, 1985. p. 17-36. (Documentos, 15).

RIACHI, L. G.; DE MARIA, C. A. B. Yerba mate: An overview of physiological effects in humans. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 308-320, 2017.

ROSSA, Ü. B.; ANGELO, A. C.; MAZUCHOWSKI, J. Z.; WESTPHALEN, D. J.; FRIZON, C. N. T.; MARTINS, C. E. N. Influência da luminosidade e fertilizantes nos teores de metilxantinas e compostos fenólicos em folhas de erva-mate. **Ciência Florestal**, v. 27, n. 4, p. 1365-1374, 2017.

SAIDELLES, A. P. F.; KIRCHNER, R. M.; SANTOS, N. R. Z.; FLORES, E. M. M.; BARTZ, F. R. Análise de metais em amostras comerciais de erva-mate do sul do Brasil. **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 2, p. 259-265, 2010.

SPICHIGER, R.; SAVOLAINEN, V.; MANEN, JEAN-FRANÇOIS. Systematic affinities of *Aquifoliaceae* and *Icacinaceae* from molecular data analysis. **Candollea**, v. 48, n. 2, p. 459-464, 1993.

VALDUGA, A. T.; GONÇALVES, I. L.; MAGRI, E.; FINZER, J. R. D. Chemistry, pharmacology and new trends in traditional functional and medicinal beverages. **Food Research International**, v. 120, p. 478-503, 2019.

VIDOR, M. A.; RUIZ, C. P.; MORENO, S. V.; FLOSS, P. A. Marcadores moleculares em estudos de caracterização de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.): o sabor. **Ciência Rural**, v. 32, n. 3, p. 415-420, 2002.

YANG, Y.; ZHANG, D.; LI, Z.; JIN, X.; DONG, J. Immature embryo germination and its micropropagation of *Ilex crenata* Thunb. **HortScience**, v. 50, p.733-737, 2015.

CAPÍTULO I

2 MORFOTIPOS DE ERVA-MATE: CARACTERIZAÇÃO BIOMÉTRICA DE FRUTOS E PIRÊNIOS, ANATOMIA FOLIAR E COMPOSTOS BIOATIVOS

RESUMO

Há uma ampla variação fenotípica em plantas de *Ilex paraguariensis*, especialmente relacionadas a cor das folhas e presença de tricomas, sendo essas características agrupadas e as plantas denominadas morfotipos. Devido à escassez de informações acerca das diferenças entre esses grupos, objetivou-se a caracterização e diferenciação física de frutos e pirênios, da viabilidade e desenvolvimento embrionário de pirênios, anatomia foliar e de compostos bioativos de cinco morfotipos de *Ilex paraguariensis*: sassafrás, verde escuro, verde fosco, cinza e peludinha. Para as análises físicas de frutos e pirênios determinou-se a biometria, grau de umidade, número de pirênios por quilo, peso de mil pirênios e massa fresca e seca dos frutos. Para determinação da viabilidade e das fases de desenvolvimento embrionário utilizou-se o teste de tetrazólio. Para a caracterização anatômica de folhas utilizou-se microscopia de luz, fluorescência e microscopia eletrônica de varredura. Nas avaliações de compostos bioativos foram determinados a capacidade antioxidante, compostos fenólicos totais, metilxantinas e ácidos cafeoilquínicos, a partir de extratos aquosos das folhas. Houve diferenças significativas para os aspectos biométricos de frutos e pirênios entre os lotes, sendo que o lote sassafrás apresentou as maiores médias de tamanho e massa fresca de frutos. O grau de umidade médio dos frutos foi de 64,5% e a umidade média dos pirênios de 10%. O peso médio de mil pirênios foi de 7,2 g, com número médio de pirênios por quilo de 138.841. A deposição de cera e configuração da cutícula na face adaxial foi a principal diferença observada pela anatomia foliar entre os morfotipos. O morfotipo peludinha se diferencia, na face abaxial, pela presença de tricomas tectores. Todos os morfotipos apresentaram elevada atividade antioxidante e teores de compostos fenólicos totais. O morfotipo verde escuro apresentou os maiores teores de cafeína (20,4 mg.g⁻¹), diferindo significativamente apenas do morfotipo peludinha (8,78 mg.g⁻¹). Os resultados encontrados são de grande relevância para silvicultura de erva-mate e apresentam grande potencialidade na obtenção de produtos diferenciados.

Palavras-chave: Teste de tetrazólio. Morfologia de frutos e sementes. Metilxantinas. Seleção de genótipos. Compostos fenólicos.

ABSTRACT

There is a wide phenotypic variation in *Ilex paraguariensis* plants, especially related to leaves color and presence of trichomes and, when these characteristics are grouped, and these plants are called morphotypes. Due to the fact that there is little information about the differences between these groups, we characterized and differentiated fruits and pyrenes, pyrenes viability and embryonic development, leaf anatomy and bioactive compounds of five morphotypes of *I. paraguariensis*: sassafras, dark green, dull green, gray and peludinha. For the physical analysis we determined fruits and pyrenes biometrics, moisture content, number of pyrenes per kilo, weight of

one thousand pyrenes and fruits fresh and dry weight. To determine viability and embryonic development phases, we used the tetrazolium test. For leaves anatomical characterization we used light microscopy, fluorescence and scanning electron microscopy. We determined the bioactive compounds evaluations, antioxidant capacity, total phenolic compounds, methylxanthines and caffeoylquinic acids from leaves aqueous extracts. We found significant differences for biometric characteristics of fruits and pyrenes between morphotypes, where sassafras showed the highest mean size and fruits fresh weight. Average moisture content of fruits and pyrenes was 64.5% and 10%, respectively. Thousand pyrenes average weight was 7.2 g, with an average number of pyrenes of 138,841 per kilo. Deposition and configuration of adaxial face cuticle was the main difference observed by leaf anatomy between morphotypes. The peludinha morphotype differs, on the abaxial face, by the presence of non-glandular trichomes. All morphotypes showed high antioxidant activity and total phenolic compounds contents. Dark green morphotype showed the highest levels of caffeine (20.4 mg.g⁻¹), differing statistically only from peludinha morphotype (8.78 mg.g⁻¹). The results found are of great relevance for yerba mate silviculture and have great potential in obtaining differentiated products.

Keywords: Tetrazolium test. Fruits and seeds morphology. Methylxanthines. Genotypes selection. Phenolic compounds.

2.1 INTRODUÇÃO

Amplamente consumida e comercializada no sul do Brasil e nos países do Mercosul, *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. é responsável por uma das atividades econômicas extrativistas de maior importância para o País. No ano de 2018, a erva-mate gerou o segundo maior valor de produção entre os produtos não madeireiros (36,7%), com colheita de 393 mil toneladas, sendo no Paraná onde ocorre a maior produção (IBGE, 2019, p. 08). A principal matéria-prima proveniente da erva-mate provém das folhas e galhos finos, ricos em compostos bioativos e com inúmeras aplicabilidades.

O consumo tradicional da erva-mate se dá pelo chimarrão, pelo tererê e pelo chá mate, bebidas tônicas e estimulantes muito apreciadas (SAIDELLES et al., 2010, p. 259), que comprovadamente trazem inúmeros benefícios à saúde humana. As infusões produzidas a partir de suas folhas apresentam elevada capacidade antioxidante e outras ações benéficas em função dos diferentes compostos presentes, como metilxantinas, saponinas, minerais, ácidos fenólicos e seus derivados (HECK; DE MEJIA, 2007, p. 140).

Há uma grande variação fenotípica observada em plantas de erva-mate, seja em populações naturais ou plantios comerciais, sobretudo relacionadas às

características de cor do talo, tamanho, pilosidade e cor das folhas (RESENDE; STURION; MENDES, 1995, p. 02). Comumente, produtores e ervateiros agrupam as plantas que apresentam semelhanças na coloração das folhas e na presença de pelos, denominando esses grupos de morfotipos. A literatura sobre morfotipos de erva-mate é restrita, sendo observados poucos estudos, como os realizados por Reginatto et al. (1999, p. 443), Coelho; Athayde; Schenkel (2001, p. 153), Borille; Reissmann; Freitas (2005, p. 189) e Wendling et al. (2016, p. 243).

Ainda com relação as variações fenotípicas, são observadas três variedades botânicas descritas para erva-mate: *I. paraguariensis* var. *vestita* Loes., *I. paraguariensis* var. *sincorensis* Loes. e *I. paraguariensis* var. *paraguariensis*, sendo as duas primeiras restritas a regiões geográficas específicas (COELHO; ATHAYDE; SCHENKEL, 2001, p. 153). A variedade *sincorensis* ocorre na Bahia, em altitudes acima de 1800 metros e suas características não são relatadas na literatura. A variedade *vestita* ocorre no nordeste do Paraná e sudoeste de São Paulo, em região com cerrado e vegetação de transição, e é caracterizada pela presença de pilosidade nas folhas e ramos. Já a variedade *paraguariensis* é considerada a genuína erva-mate (COELHO; ATHAYDE; SCHENKEL, 2001, p. 153).

Em função dessa diversidade fenotípica, Mattos (1985, p. 39) afirma que há certa dificuldade do ponto de vista sistemático, levando aos menos familiarizados a atribuírem novas espécies, variedades ou formas às diferenças de um indivíduo para outro. A polimorfia da erva-mate pode estar relacionada às variações ecológicas, à própria peculiaridade da espécie ou a uma reação da planta aos cortes sucessivos na exploração (MATTOS, 1985, p. 39). Ainda, com a produção comercial em larga escala, outra suposição para a grande diversidade morfológica seria a migração antrópica de genótipos de diversas origens e subsequentes cruzamentos.

Com o crescente mercado e potencialidades da espécie, é imprescindível a realização de pesquisas que visem atender as diversas áreas da cultura da erva-mate, seja na produção de mudas, no aumento da produtividade em campo, melhoria do perfil químico ou para estabelecimento de programas de melhoramento genético. Neste sentido, conhecer as peculiaridades de cada morfotipo, é essencial para prospecção de mercados e produtos futuros, podendo vir a fornecer erva-mate para chimarrão e *blends* de chá mate diferenciados e com maior valor agregado.

Diante da importância econômica, social e ecológica da erva-mate, torna-se indispensável investigar se, além das diferenças observadas na coloração das folhas

dos morfotipos, há outras variações que podem ser diagnosticadas e caracterizadas. Assim, o presente estudo objetivou avaliar a diferenciação e caracterização física de frutos e pirênios, a viabilidade e desenvolvimento embrionário de pirênios, anatomia foliar e compostos bioativos de cinco morfotipos de *Ilex paraguariensis*.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Material vegetal

Os frutos e folhas foram coletados entre os meses de fevereiro de 2018 e junho de 2019, em um teste de procedências e progênies instalado em 1997 (WENDLING et al., 2018, p. 280), no município de Ivaí, Paraná (25° 01' S, 50° 47' W e 650-750 m altitude). Foram estudados cinco morfotipos de erva-mate: sassafrás, verde escuro, verde fosco, cinza e peludinha, descritos por Wendling et al. (2016, p. 243), selecionando-se apenas indivíduos com a característica do morfotipo bem evidente e marcante.

2.2.2 Coleta, beneficiamento e análises físicas de frutos e pirênios

Foram estudados quatro lotes, dentre estes, três morfotipos (sassafrás, verde escuro e verde fosco), a partir da seleção de 10 indivíduos para cada morfotipo e um lote denominado "mix", composto por frutos de aproximadamente 30 indivíduos, selecionados aleatoriamente na área (sem considerar o morfotipos destas matrizes). Para todos os lotes, foi respeitada a distância mínima de 30 metros entre plantas coletadas. Não foram observados frutos em indivíduos dos morfotipos cinza e peludinha.

As análises e beneficiamento foram realizadas no Laboratório de Sementes Florestais da Universidade Federal do Paraná. A caracterização biométrica dos frutos foi realizada com quatro repetições de 50 frutos frescos, determinando-se com auxílio de paquímetro digital o diâmetro cruzado (mm) e a altura (mm), nas linhas medianas dos frutos, e a massa (g) em balança de precisão (0,001 g). Posteriormente, a despolpa foi em água corrente, com auxílio de peneiras, e os pirênios (endocarpo + semente) deixados para secar em ambiente natural de laboratório por aproximadamente cinco dias. A biometria dos pirênios foi realizada com quatro

repetições de 50 unidades frescas, tomando-se comprimento, altura e espessura (mm) nas linhas medianas.

O grau de umidade dos frutos foi determinado pelo método de estufa a 105 ± 3 °C por 24 horas, com quatro repetições de 25 frutos para cada lote. O grau de umidade dos pirênios foi determinado seguindo-se a Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009, p. 309), também pelo método de estufa, com quatro repetições de 100 pirênios para cada lote. Ainda, foram determinados o peso de mil pirênios e o número de pirênios por quilo (BRASIL, 2009, p. 346).

2.2.3 Viabilidade e estágio embrionário dos pirênios

Os estudos de viabilidade e estágio embrionário foram realizados no Laboratório de Sementes Florestais da Universidade Federal do Paraná. Para tanto, pirênios frescos foram submetidos ao teste de tetrazólio 20 dias após a colheita e beneficiamento. Para cada lote foram utilizadas quatro repetições de 50 pirênios. O teste seguiu as etapas descritas nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009, p. 226), com algumas adaptações, sendo:

1°) Pré-condicionamento: pirênios inteiros imersos em água destilada a temperatura de 35 °C por 18h; 2°) Exposição dos tecidos para coloração: pirênios cortados no eixo longitudinal, expondo levemente o endosperma; 3°) Coloração em solução de 2, 3, 5-trifenil cloreto de tetrazólio: pirênios excisados imersos em solução de tetrazólio, em concentração de 1%, e acondicionados no escuro, por 18h a 30 °C; 4°) Avaliação: com auxílio de lupa estereoscópica e bisturi, os embriões dos pirênios foram avaliados quando à sua coloração (brancos: inviáveis; rosa a vermelho: viáveis; e deteriorados: pirênios que se já se encontravam em deterioração ou vazios) e quanto ao estágio de desenvolvimento embrionário: globular, coração, pós-coração, torpedo ou maduro (CATAPAN, 1998, p. 31; MIRESKI et al., 2019 p. 1357).

2.2.4 Caracterização anatômica de folhas

As análises anatômicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica, no Centro de Microscopia Eletrônica e no Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência, todos pertencentes à Universidade Federal do Paraná.

Foram coletadas folhas maduras, do quarto ao oitavo nó, de três plantas de cada morfotipo (sassafrás, verde escuro, verde fosco, cinza e peludinha). A região mediana do limbo foliar foi fixada em FAA₅₀ (formaldeído 37%; ácido acético glacial; etanol 50%), desidratada em série alcoólica (60, 70, 80, 90 e 100%), emblocada em historesina Leica® e, seccionada em micrótomo de rotação. A coloração foi feita com azul de toluidina (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964, p. 368), sendo as lâminas observadas em microscopia de luz e em microscópio equipado com fluorescência.

Para a análise da epiderme em microscopia eletrônica de varredura (MEV) o mesmo processo de fixação e desidratação das folhas foi utilizado. Posteriormente, as amostras foram submetidas à secagem pelo método do ponto crítico, aderidas em suporte metálico com fita adesiva de carbono e posteriormente, metalizadas com ouro e então analisadas em microscópio eletrônico. Foram analisados e descritos: mesofilo foliar, nervura central e epiderme (face abaxial e adaxial).

2.2.5 Caracterização de compostos bioativos

As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia da Universidade Federal do Paraná, e no Laboratório de Tecnologia de Produtos Não Madeiráveis da Embrapa Florestas. Para a caracterização de compostos químicos foram coletadas folhas maduras e livres de injúrias, em toda a circunferência da copa de cinco morfotipos (sassafrás, verde escuro, verde fosco, cinza e peludinha), em junho de 2019. Foram selecionados 10 indivíduos de cada morfotipo, respeitando-se uma distância mínima de 30 metros entre plantas. As folhas foram secas em micro-ondas, por aproximadamente cinco minutos, e trituradas até a obtenção de pó fino e homogêneo. Para a correção da massa utilizada nas análises químicas, o grau de umidade das amostras foi determinado em triplicada, com secagem em estufa a 105 °C até peso constante.

Para o extrato aquoso foram utilizados 10 mg de amostra moída, adicionados 2 mL de água ultrapura agitando-se em vórtex por 30 segundos. As extrações foram realizadas em equipamento Thermomixer® a 60 °C e 300 rpm por uma hora e posterior filtragem em filtro de nylon de 0,22 µm. A partir do extrato foram determinados o teor de compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante pelos radicais ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) e DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazil), metilxantinas (cafeína e teobromina) e ácidos cafeoilquínicos.

2.2.5.1 Compostos fenólicos totais

Seguiu-se metodologia espectrofotométrica Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965, p. 144), com modificações. Em balão volumétrico foram adicionados 0,1 mL de extrato, 6 mL de água destilada e 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu, agitando-se por 1 minuto. Após, adicionou-se 2 mL de solução aquosa de Na_2CO_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 ácido gálico (ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzóico) entre as concentrações de 0,25 e 13 mg.L^{-1} ($R^2 = 0,9988$) e os resultados expressos em mg Equivalentes ao Acido Gálico por grama de amostra seca (mgEAG.g^{-1}).

2.2.5.2 Capacidade antioxidante (radicais ABTS e DPPH)

A capacidade antioxidante do extrato pelo radical ABTS foi determinada pela reação de 10 mL de ABTS (7 mmol.L^{-1}) com 176 μL de persulfato de potássio (140 mmol.L^{-1}), por 16 horas no escuro. Posteriormente, 1 mL dessa solução foi adicionada em tampão de acetato de sódio (80 mmol.L^{-1} ; pH 4,5), sendo a absorbância da solução ajustada para $0,70 \pm 0,05$. A alíquota de 3 mL da solução ajustada foi adicionada a 30 μL de extrato. As amostras foram mantidas no escuro por 2 horas, em temperatura ambiente e as absorbâncias tomadas em espectrofotômetro a 734 nm (RE et al., 1999, p. 1233; YIM et al., 2013, p. 277, com modificações).

A capacidade antioxidante do extrato via radical livre DPPH foi determinada pela utilização de 0,1 mL de extrato diluídos em 3,9 mL de solução metanólica de DPPH ($0,06 \text{ mmol.L}^{-1}$) (ajustada para absorbância de $0,50 \pm 0,05$), mantidas por 30 minutos no escuro e em temperatura ambiente. Posteriormente, as absorbâncias foram tomadas em espectrofotômetro a 515 nm (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995, p. 26, com modificações).

As curvas analíticas foram obtidas com Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), entre as concentrações de 0 a 2500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ($R^2 = 0,9896$) para a conversão da absorbância do sequestro de radicais ABTS e entre as concentrações entre 0 e 1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ($R^2 = 0,9868$) para a conversão da absorbância do sequestro de radicais DPPH. Os resultados foram expressos em μmol

de Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox por grama de amostra seca ($\mu\text{molTEAC.g}^{-1}$).

2.2.5.3 Metilxantinas e ácidos cafeoilquínicos

Para as análises cromatográficas foi utilizado um 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[®].

As condições de separação dos compostos presentes no extrato aquoso (20 μL de injeção) foram: 30 °C com fluxo de 0,5 mL.min^{-1} de eluente com a fase móvel A (H_2O : ácido acético Alphatec[®] - 99,9: 0,1 v/v) e B (acetonitrila Merck[®] - 100%). O comprimento de onda utilizado para detecção do composto foi 280 nm (fixo). O programa de eluição com gradiente foi: 0-15 min (3%B), 15-20 min (3-20% B), 20-40 min (20% B), 40-45 min (20-30% B), 45-55 min (30-100% B), 55-75 (100% B), 75-80 (100-3% B) e 80-95 (3% B).

A identificação e quantificação das metilxantinas cafeína (1,3,7-trimetilxantina) e teobromina (3,7-dimetilxantina) foi realizada a partir de curvas analíticas obtidas com padrões Sigma[®], entre as concentrações de 0 a 1,0 mg.mL^{-1} ($R^2 = 0,9933$) e de 0 a 0,5 mg.mL^{-1} ($R^2 = 0,9827$) para cafeína e teobromina, respectivamente. A identificação dos ácidos cafeoilquínicos (ácido 3-cafeoilquínico (3-CQA), ácido 4-cafeoilquínico (4-CQA), ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA)) também foi realizada com padrão Sigma[®] e a semi quantificação foi obtida a partir de curva analítica entre as concentrações de 0 e 10 mg.mL^{-1} de 3-CQA ($R^2 = 0,9914$). Os resultados foram expressos em mg de composto por grama de amostra (mg.g^{-1}), em base seca.

2.2.6 Análises estatísticas

Todos os experimentos seguiram o delineamento inteiramente casualizado. As análises físicas dos frutos e pirênios, viabilidade e estágio embrionário foram realizadas com quatro repetições, sendo para as fases embrionárias contabilizadas apenas pirênios viáveis. As análises dos compostos bioativos foram realizadas em

triplicata. Os dados foram testados quanto a homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett) e normalidade dos resíduos (teste de Shapiro-Wilk). Havendo diferença significativa na análise de variância (ANOVA), a comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As variáveis que não atenderam os pressupostos da ANOVA foram submetidos a análise não paramétrica, utilizando-se o teste de Kruskal Wallis.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Análises físicas de frutos e pirênios

Houve diferença significativa para as variáveis diâmetro, altura e massa de frutos, para quatro lotes estudados (TABELA 2.1). O lote do morfotipo sassafrás apresentou os maiores frutos, sendo as médias significativamente superiores aos demais, exceto para a variável altura, que não diferiu significativamente do lote mix. Os menores frutos foram observados no lote do morfotipo verde escuro. A maior massa fresca foi observada nos frutos do morfotipo sassafrás (0,2076 g). O grau de umidade médio dos frutos foi de 64,5%, sendo que os valores apresentaram pequena variação, indicando semelhança na maturação dos frutos e pirênios entre os lotes. Os resultados de diâmetro e massa fresca observados no presente estudo são maiores do que os reportados por Brito et al. (2019, p. 05).

TABELA 2.1 - DIÂMETRO, ALTURA, MASSA FRESCA, MASSA SECA E GRAU DE UMIDADE (GU) DE FRUTOS DE QUATRO LOTES DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.

Lote	Diâmetro (mm) *	Altura (mm)	Massa fresca (g) *	Massa seca (g) *	GU (%)
Sassafrás	6,99 a	6,29 a	0,2076 a	0,0726 a	65,03
Verde Escuro	6,39 c	5,75 c	0,1722 c	0,0620 c	63,97
Verde Fosco	6,77 b	5,92 b	0,1869 b	0,0673 b	63,98
Mix	6,83 b	6,18 a	0,1927 b	0,0674 b	65,01
Média	6,74	6,03	0,1899	0,0674	64,50

FONTE: A autora (2020).

NOTA: Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. * Teste de Kruskal Wallis.

Com os resultados de massa seca observa-se que a diferença existente entre os lotes está relacionada ao lote e não ao grau de umidade dos frutos, sendo que sassafrás apresentou massa superior as demais (0,0726 g). De maneira geral, frutos

maiores dão origem a sementes com maiores dimensões, e para algumas espécies florestais, estudos reportam que sementes maiores apresentam melhor germinação, vigor e produção de maiores plântulas (FLORES et al., 2014, p. 145; BISPO et al., 2017, p. 370; ALBUQUERQUE; SANTOS; MACHADO, 2018, p. 55). Essa característica é de interesse tanto do ponto de vista ecológico quanto silvicultural, entretanto, não são encontrados estudos neste sentido para erva-mate.

Pesquisas relacionadas aos frutos de erva-mate ainda são incipientes, entretanto, vêm despertando interesse em função dos inúmeros compostos químicos por eles produzidos (SCHUBERT et al., 2007, p. 876; FERNANDES et al., 2016, p. 139; BRITO et al., 2018, p. 01; SILVA et al., 2018, p. 72). Dentre estes, as saponinas têm sido foco de estudos recentes, sendo compostos provenientes do metabolismo secundário das plantas, tendo como principais características a ação espumante, detergente e emulsificante (CHEOK; SALMAN; SULAIMAN, 2014, p. 16).

Além das saponinas, os frutos apresentam potencial antioxidante, presença de metilxantinas e compostos fenólicos (FERNANDES et al., 2016, p. 139), levantando também hipóteses para futuras aplicações e atribuição de valor à indústria alimentícia. Zanon (1988, p. 06) reporta que uma planta adulta pode produzir até 10 kg de frutos quando cultivada a pleno sol e 5 kg em sub-bosque. Ainda é importante destacar que os frutos são descartados do processo de produção de erva-mate por não conferirem boa qualidade ao produto final (SILVA et al., 2018, p. 72). Desta maneira, a utilização destes para outros processos industriais seria uma maneira eficiente de reaproveitamento de resíduos, transformando o que seria rejeitado em uma matéria-prima de elevada potencialidade.

Com relação aos pirênios, houve diferença significativa entre os lotes para as variáveis comprimento, largura e espessura (TABELA 2.2). O maior comprimento foi para o lote mix e menor para os pirênios do morfotipo verde fosco. A maior largura foi observada no lote verde escuro, diferindo significativamente somente do verde fosco. A espessura foi maior para o lote mix e menor para o verde fosco. De maneira geral, as dimensões dos pirênios se mostraram bastante heterogêneas. O grau de umidade médio dos pirênios frescos foi de 10%, o peso médio de mil pirênios apresentou 7,23 g, com número médio de pirênios por quilo de 138.841 (TABELA 2.2).

TABELA 2.2 - COMPRIMENTO, LARGURA, ESPESSURA, GRAU DE UMIDADE (GU), PESO DE MIL PIRÊNIOS (P1000) E NÚMERO DE PIRÊNIOS POR QUILOGRAMA (N°/KG) DE QUATRO LOTES DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.

Lote	Comprimento (mm) *	Largura (mm)	Espessura (mm)	GU (%)	P1000 (g)	N°/kg
Sassafrás	3,95 bc	2,31 ab	1,80 bc	9,98	7,66	130.467
Verde Escuro	3,88 b	2,36 a	1,83 ab	10,16	7,10	140.813
Verde Fosco	3,58 c	2,29 b	1,78 c	9,87	6,61	151.300
Mix	4,00 a	2,33 ab	1,85 a	10,11	7,53	132.784
Média	3,85	2,32	1,81	10,03	7,23	138.841

FONTE: A autora (2020).

NOTA: Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade; *Teste de Kruskal Wallis.

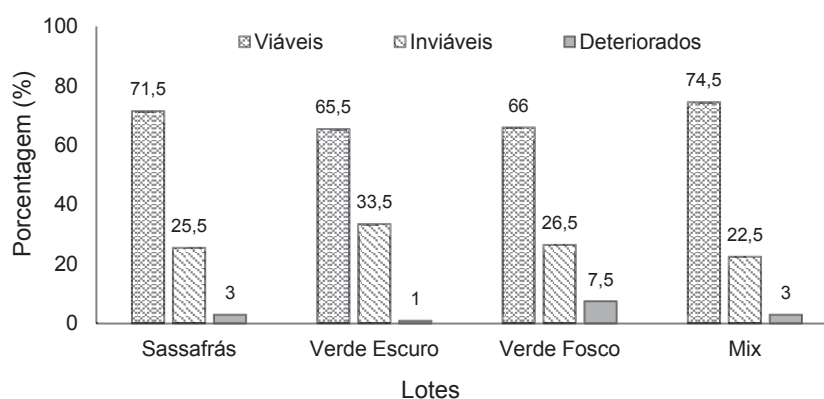
Pode-se afirmar que os lotes dos morfotipos sassafrás e lote mix apresentaram as maiores médias de peso de mil pirênios e, conseqüentemente, o menor número de pirênios por quilo (TABELA 2.2). Os valores observados para a caracterização física geral dos pirênios estão de acordo com os mencionados pela literatura (KUNIYOSHI, 1983, p. 40; CATAPAN, 1998, p. 33). Em termos silviculturais, Zanon (1988, p.06) afirma que para obtenção de um quilo de pirênios são necessários de seis a nove quilos de frutos, podendo-se produzir em média de 12 a 15 mil mudas com essa quantidade de sementes.

As diferenças biométricas observadas entre os lotes estudados, tanto nos frutos quanto nos pirênios, podem ser atribuídas a variação genética, dado o cruzamento entre indivíduos não aparentados na área de estudo. Cabe destacar que este é o primeiro estudo que relata diferenças entre frutos e pirênios em morfotipos de *I. paraguariensis*. Assim, conhecer essas características é de fundamental importância, especialmente para a silvicultura da erva-mate, pois a partir dessas informações pode-se planejar a coleta e o beneficiamento de frutos e sementes, bem como a produção de mudas. Além disso, serve como suporte para seleção de matrizes com características desejadas e para implantação de áreas de produção de sementes, resultando em mudas de melhor qualidade, refletindo em maior produtividade dos plantios.

2.3.2 Viabilidade e estágio embrionário dos pirênios

As variáveis porcentagem de embriões viáveis, embriões inviáveis e deteriorados não apresentaram diferença significativa entre os lotes estudados (FIGURA 2.1).

FIGURA 2.1 - PORCENTAGEM DE EMBRIÕES VIÁVEIS, INVIÁVEIS E DETERIORADOS EM PIRÊNIOS DE QUATRO LOTES DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.



FONTE: A autora (2020).

A viabilidade inicial das sementes é característica fundamental, seja no âmbito ecológico ou silvicultural. A partir dessa variável, pode-se prever o sucesso da espécie com relação à germinação e estabelecimento de plântulas no cenário ecológico natural, e a obtenção de mudas para produção comercial. Os resultados de viabilidade inicial obtidos no presente estudo são superiores aos observados por Catapan (1998, p. 55), Galíndez et al. (2018, p. 03) e Mireski et al. (2019, p. 1359), sendo desta maneira considerados satisfatórios para a espécie.

Com relação as fases de desenvolvimento embrionário, houve diferença significativa entre os lotes somente para o estágio torpedo, com maior porcentagem para o lote do morfotipo verde fosco, não diferindo significativamente do lote mix (TABELA 2.3). A fase embrionária de coração foi a mais representativa, com média geral de 67,6% dos embriões neste estágio. Os resultados indicam heterogeneidade no desenvolvimento embrionário, sendo observadas todas as fases nos pirênios recém coletados, exceto embriões maduros, podendo isso estar relacionado à variabilidade genética entre os indivíduos. O mesmo comportamento irregular é

observado para floração, frutificação e amadurecimento dos frutos da espécie (ZANON, 1988, p. 05).

TABELA 2.3 - PORCENTAGEM DE EMBRIÕES VIÁVEIS EM ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO GLOBULAR, CORAÇÃO, PÓS-CORAÇÃO E TORPEDO, EM PIRÊNIOS DE QUATRO LOTES DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.

Lote	Globular (%)	Coração (%)	Pós-coração (%)	Torpedo (%)
Sassafrás	2,5 a	65,0 a	28,5 a	1,0 b
Verde Escuro	0,0 a	75,0 a	23,5 a	0,5 b
Verde Fosco	3,5 a	65,0 a	19,0 a	5,0 a
Mix	0,5 a	65,5 a	29,0 a	2,0 ab

FONTE: A autora (2020).

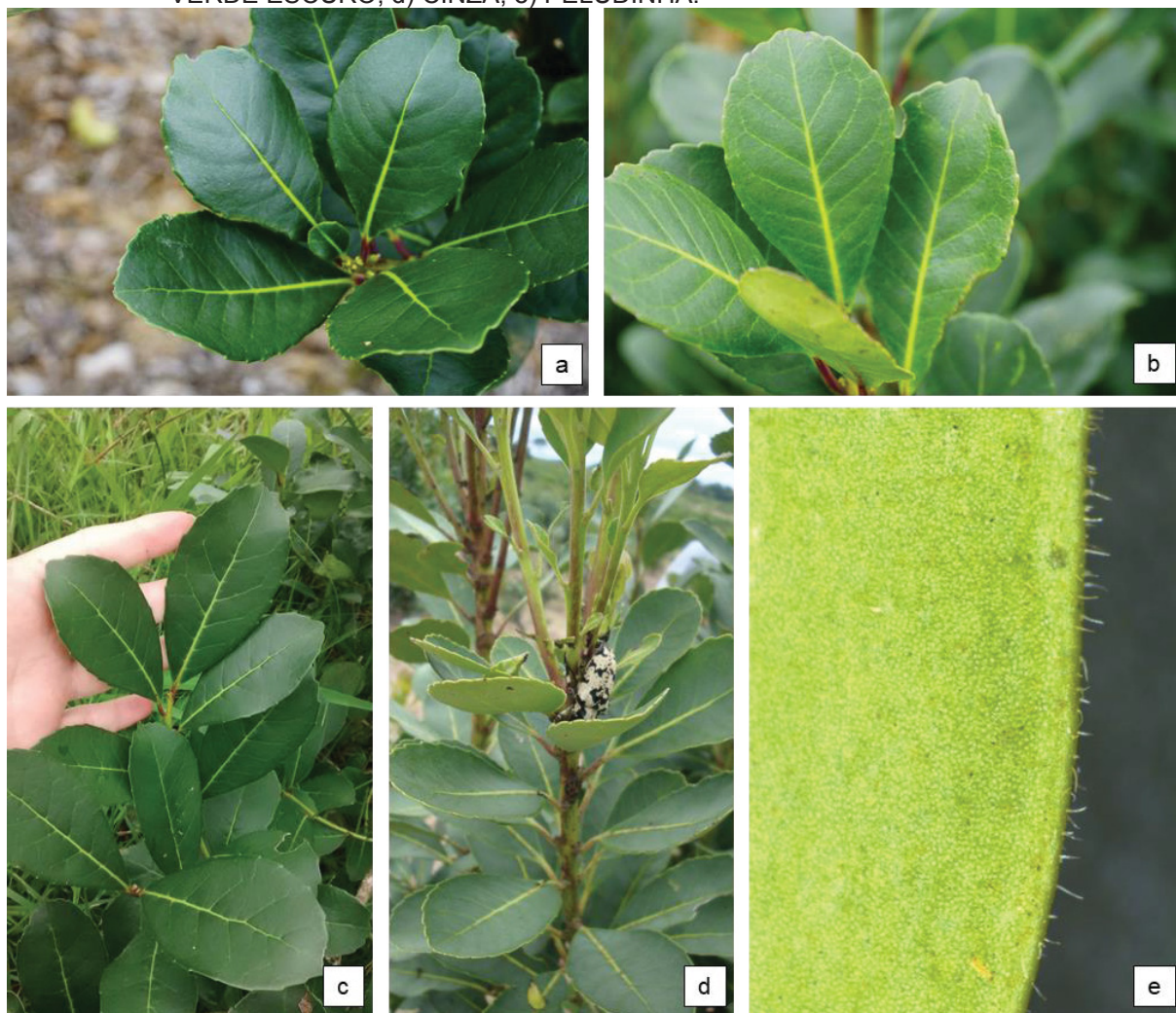
NOTA: Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Os resultados do presente estudo corroboram com os encontrados por Niklas (1987, p. 51), relatando que em pirênios recém coletados de *I. paraguariensis* foram observados 2,6% de embriões em estágio embrionário globular, aproximadamente 70,2 e 23,6% em estágios de coração e pós-coração, respectivamente, seguidos de 2,6% em estágio de torpedo. Esses resultados podem direcionar questões relacionadas à coleta de sementes e produção de mudas, pois de maneira geral, quanto mais avançada a fase de desenvolvimento embrionário (mais próxima do maduro), menor o período necessário entre estratificação e a germinação.

2.3.3 Anatomia foliar

A diferenciação entre os morfotipos se dá pela coloração da folha, na face adaxial, e pela presença ou não de tricomas na face abaxial. Reissmann et al. (2003, p. 146) e Wendling et al. (2016, p. 243) descreveram as características dos morfotipos como: *morfotipo sassafrás* – folhas com tonalidade verde escuro e extremo brilho na face adaxial do limbo; *morfotipo verde fosco* – folhas com tonalidade verde mais claro e opaco, ausência de brilho na face adaxial; *morfotipo verde escuro* – tonalidade verde escuro, ausência de brilho na face adaxial da folha; *morfotipo cinza* – face adaxial com tonalidade cinza-esverdeada; e *morfotipo peludinha* - presença de pilosidade especialmente na face abaxial (FIGURA 2.2).

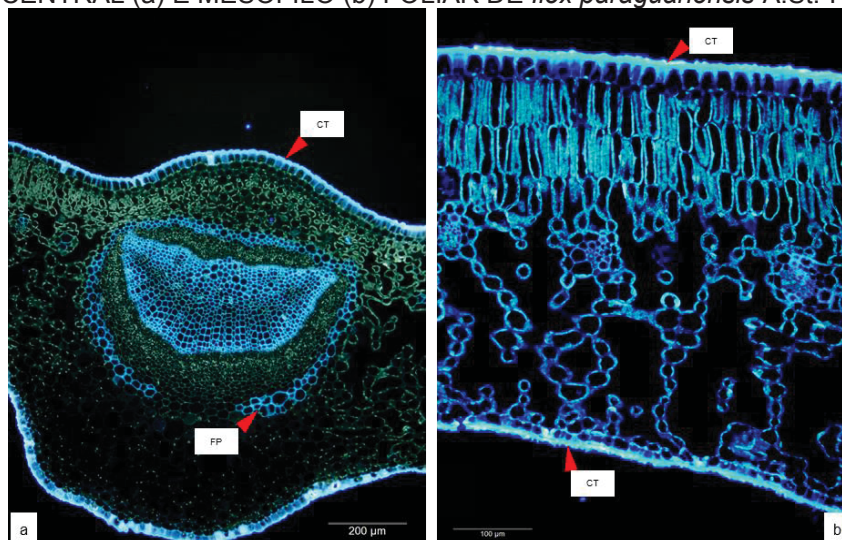
FIGURA 2.2 - MORFOTIPOS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. a) SASSAFRÁS; b) VERDE FOSCO; c) VERDE ESCURO; d) CINZA; e) PELUDINHA.



FONTE: A autora (2020).

Com relação às características externas, a imagem de fluorescência revela presença de cutícula espessa, sendo maior na face abaxial (FIGURAS 2.3a e 2.3b). Fermino Júnior e Fockink (2017, p. 338) mencionam que a espessura da cutícula de folhas de erva-mate não apresentou diferenças quando submetidas a diferentes intensidades luminosas. Duarte e Golambiuk (2008, p. 09) ressaltam que o sistema de revestimento da folha de *I. paraguariensis* é recoberto por cutícula relativamente espessada e estriada. No presente estudo, ainda com às características externas, foi observado que o padrão de estrias e revestimento adaxial das folhas são diferentes entre os morfotipos (FIGURA 2.4), sendo essa a principal diferença anatômica observada.

FIGURA 2.3 - MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA MOSTRANDO DETALHES DA NERVURA CENTRAL (a) E MESOFILO (b) FOLIAR DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.

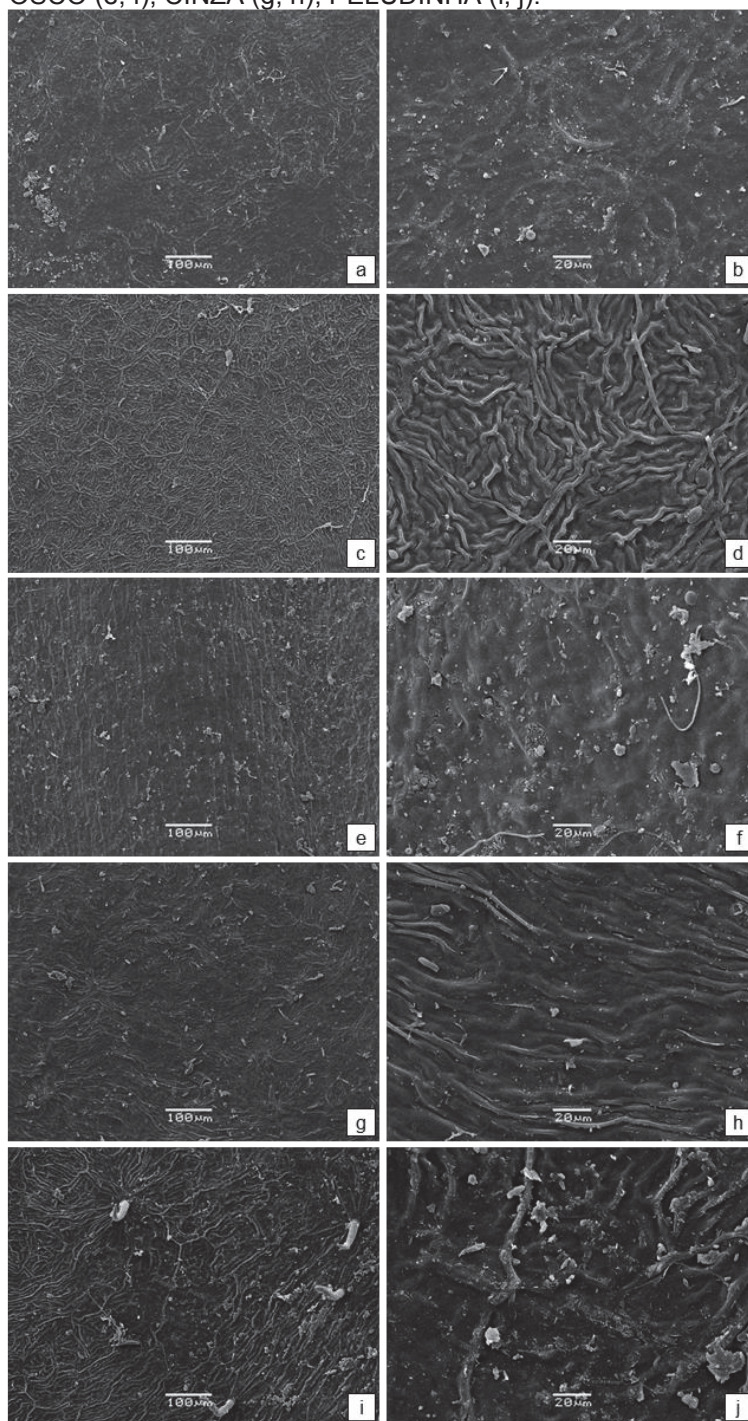


FONTE: A autora (2020).

NOTA: Corte transversal; CT: Cutícula; FP: Fibras perivasculares; a) Imagem do morfotipo cinza; b) Imagem do morfotipo sassafrás.

Para o morfotipo sassafrás (FIGURA 2.4a e 2.4b) a deposição de cera epicuticular ocorre em forma de filamentos pouco definidos, com tendência para uma cutícula mais lisa, com alguns grânulos de cera dispersos. O morfotipo verde escuro apresenta cutícula bastante estriada, com filamentos bem definidos e proeminentes e poucos grânulos de cera (FIGURA 2.4c e 2.4d). O morfotipo verde fosco, assim como sassafrás, apresenta cutícula lisa, com discretos filamentos unidirecionais e a presença de numerosos grânulos de cera (FIGURA 2.4e e 2.4f). O morfotipo cinza é caracterizado por leve estriamento, sendo os filamentos menos proeminentes do que os observados para o verde escuro, com presença de grânulos de cera (FIGURA 2.4g e 2.4h). O morfotipo peludinha apresenta estriamento bem pronunciado, com grânulos de cera, e a presença de tricomas tectores, dispersos aleatoriamente pela face adaxial, em baixa densidade (FIGURA 2.4i e 2.4j).

FIGURA 2.4 - CARACTERIZAÇÃO GERAL DA DEPOSIÇÃO DE CERA EPICUTICULAR (imagens à esquerda: a, c, e, g, i) E DETALHES (imagens à direita: b, d, f, h, j) NA FACE ADAXIAL DE FOLHAS DE MORFOTIPOS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. SASSAFRÁS (a, b); VERDE ESCURO (c, d); VERDE FOSCO (e, f); CINZA (g, h); PELUDINHA (i, j).



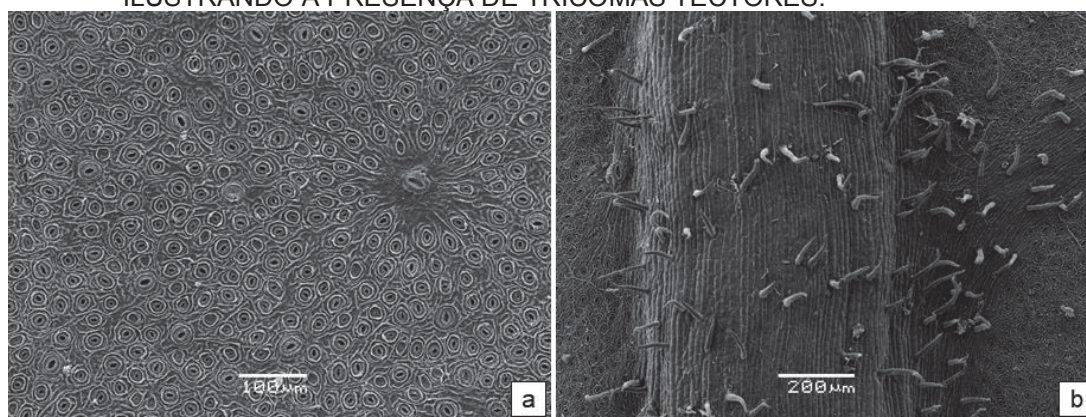
FONTE: A autora (2020).

NOTA: Corte paradérmico; Barra: 100 μm (geral); 20 μm (detalhes).

A face abaxial apresenta uma alta densidade estomática, em sua grande maioria estômatos de tamanho semelhantes entre si, dentre esses, destacam-se alguns estômatos maiores (FIGURA 2.5a). Não foram observados estômatos na face

adaxial das folhas, corroborando com a descrição já mencionada na literatura de que *I. paraguariensis* apresenta folhas hipoestomáticas (RAKOCEVIC et al., 2011, p. 04). Os mesmos autores observaram maior densidade estomática em folhas produzidas a pleno sol quando comparadas a densidade das folhas de sub-bosque.

FIGURA 2.5 - CARACTERIZAÇÃO GERAL DA FACE ABAXIAL DE FOLHAS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. a) PERFIL ESTOMÁTICO; b) DETALHE DA NERVURA CENTRAL DO MORFOTIPO PELUDINHA, ILUSTRANDO A PRESENÇA DE TRICOMAS TECTORES.



FONTE: A autora (2020).

NOTA: Corte paradérmico; a) Imagem do morfotipo sassafrás; b) Imagem do morfotipo peludinha; Barra: 100 µm (a); 200 µm (b).

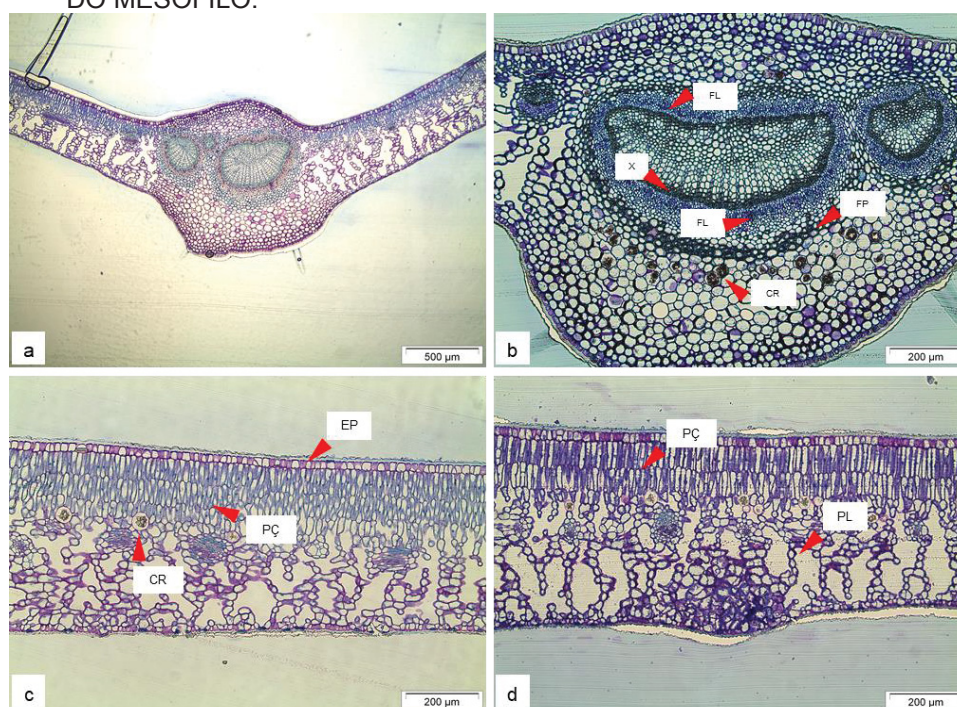
A face abaxial de todos os morfotipos mostrou-se bastante semelhante, além da grande densidade estomática, poros estomáticos sem obstrução e poucos grânulos de cera dispersos foram observados (FIGURA 2.5a). O morfotipo peludinha se diferencia, na face abaxial, pela presença de tricomas tectores, em maior número especialmente no pecíolo e nervuras (FIGURA 2.5b). Além da importância taxonômica, os tricomas exercem papel fundamental na proteção das plantas, formando uma barreira natural contra herbívoros, radiação, ataque de patógenos e excessiva transpiração, sendo que a distribuição e morfologia desse aparato anatômico é relacionada a diversos fatores, inclusive geográficos (XIAO et al., 2017, p. 01).

Para erva-mate, os tricomas são descritos e atribuídos à variedade botânica *Ilex paraguariensis* var. *vestita*, sendo sua principal característica a presença nas folhas, inflorescências e superfície dos galhos (COELHO; ATHAYDE; SCHENKEL, 2001, p. 153). De acordo com esses autores, a variedade *vestita* ocorre naturalmente no nordeste do Paraná e no sudoeste de São Paulo, em região de cerrado e de transição vegetacional. Supõe-se então que a presença desses tricomas está

associada à origem da planta. Não há registros de estudos sobre a manutenção dessa característica após propagação seminal ou vegetativa da variedade *vestita*, tampouco sobre a influência do ambiente nesta manutenção. Entretanto, há relatos pessoais de produtores e pesquisadores de que essa característica persiste após propagação.

Como caracterização geral, a epiderme foliar é unisseriada, com células justapostas, apresentando maior diâmetro periclinal na face adaxial. O mesofilo é dorsiventral, com o parênquima paliçádico composto por dois a três estratos de células alongadas e justapostas, independente do morfotipo (FIGURAS 2.6c e 2.6d). O parênquima lacunoso é formado por células de diferentes formatos com distribuição irregular, arranjadas frouxamente. A nervura central é biconvexa, com sistema vascular em arco fechado, sendo o feixe circundado por uma bainha, formada por fibras perivasculares (FIGURA 2.6b e 2.6a).

FIGURA 2.6 - CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA GERAL DE MORFOTIPOS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. EM MICROSCOPIA DE LUZ. a) VISÃO GERAL DA FOLHA; b) DETALHE DA NERVURA CENTRAL; c) DETALHE DO MESOFILO DORSIVENTRAL; d) DETALHE DO MESOFILO.



FONTE: A autora (2020).

NOTA: Cortes transversais; a) Imagem do morfotipo cinza; b) Imagem do morfotipo sassafrás; c) Imagem do morfotipo verde fosco; d) Imagem do morfotipo verde escuro; FL: Floema; X: xilema; CR: cristais de oxalato de cálcio; PÇ: parênquima paliçádico; PL: parênquima lacunoso; EP: epiderme; FP: fibras perivasculares.

Os poucos estudos anatômicos para erva-mate são direcionados especialmente para às diferenças entre folhas submetidas a diferentes ambientes, não

havendo relatos sobre morfotipos. Neste sentido, Fermino Júnior e Fockink (2017, p. 338) observaram em *I. paraguariensis*, dupla camada e células mais alongadas de parênquima paliçádico em folhas à pleno sol quando comparadas as folhas submetidas a 70% de sombreamento, que variaram de um a dois estratos, apresentando células mais isodiamétricas.

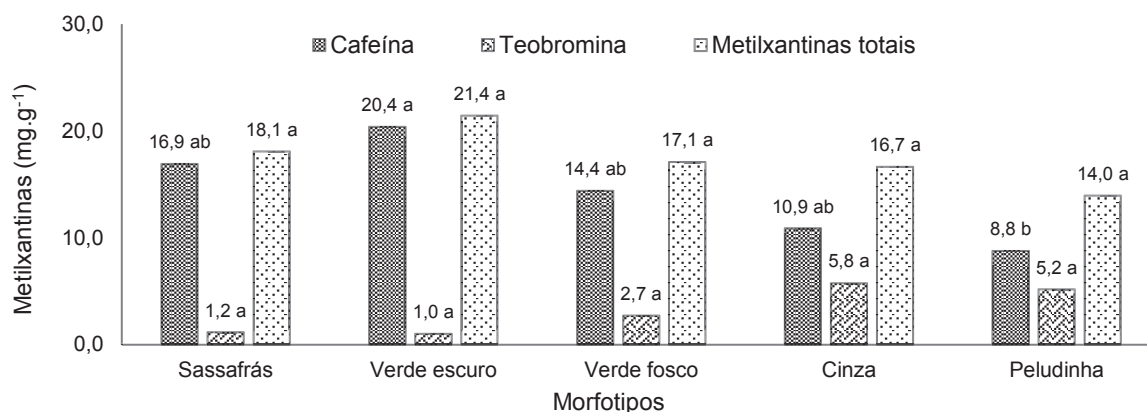
Abaixo do parênquima paliçádico são observadas grandes células parenquimáticas isodiamétricas, com drusas ao longo de todo o limbo foliar, em todos os morfotipos (FIGURAS 2.6c e 2.6d). Os mesmos cristais também são observados na nervura central das folhas, próximos ao feixe vascular (FIGURA 2.6b). Prychid e Rudall (1999, p. 726) relatam que os cristais podem estar presentes nos órgãos vegetativos e reprodutivos vegetais, geralmente próximos às nervuras, possivelmente por estarem relacionados ao transporte de cálcio através do xilema. Os autores afirmam que a quantidade de cristais formados é influenciada pelas condições ambientais e sazonalidade.

A lâmina foliar é a estrutura que mais sofre alterações em resposta às alterações ambientais (NERY et al., 2007, p. 130), e dependendo da condição à qual a folha é exposta pode aumentar o número de camadas ou apenas alongar as células. Luna et al. (2017, p.466) observaram que a cultura *in vitro* ocasionou alterações na arquitetura, espessura, vascularização e na diferenciação estomática em folhas de erva-mate. Fermino Júnior e Fockink (2017, p. 339) sugerem plasticidade anatômica para *I. paraguariensis*, o que possibilita a aclimação da espécie em diferentes ambientes. De acordo com Bastias et al. (2018, p. 25) espécies mais plásticas têm maiores chances de sobrevivência em condições ambientais contrastantes, especialmente pelas adaptações morfofisiológicas.

2.3.4 Compostos bioativos

Dentre as variáveis analisadas para os compostos bioativos de interesse em *I. paraguariensis*, apenas o teor de cafeína apresentou diferença significativa entre os morfotipos. O morfotipo verde escuro apresentou os maiores teores para esse composto (20,4 mg.g⁻¹), entretanto, diferindo significativamente apenas do morfotipo peludinha (8,78 mg.g⁻¹), o qual apresentou o menor teor. A soma das metilxantinas não apresentou diferença significativa entre os morfotipos (FIGURA 2.7).

FIGURA 2.7 - TEORES DE CAFEÍNA, TEOBROMINA E METILXANTINAS TOTAIS DE MORFOTIPOS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.



FONTE: A autora (2020).

Diferenças nos teores de cafeína e teobromina entre morfotipos já foram reportadas na literatura, mas ainda são estudos pontuais. Reginatto et al. (1999, p. 444) mencionam que *I. paraguariensis* var. *vestita* (morfotipo peludinha) apresenta teores de metilxantinas muito abaixo dos observados para *I. paraguariensis* típica, sendo a mesma tendência observada por Coelho; Athayde; Schenkel (2001, p. 155). Em contrapartida, Borille; Reissmann; Freitas (2005, p. 189) não identificaram diferenças significativas para cafeína e teobromina ao estudarem três morfotipos (amarelinha, cinza e sassafrás).

Vários são os compostos químicos que atribuem sabor amargo para as infusões de erva-mate, destacando-se taninos, compostos fenólicos e as metilxantinas (PAGLIOSA et al., 2009, p. 416; TFOUNI et al., 2018, p. 661; VALDUGA et al., 2019, p. 480). Produtores e ervateiros relatam que os morfotipos apresentam variações no sabor do chimarrão, sugerindo que a partir de folhas do morfotipo sassafrás, por exemplo, seria obtido chimarrão com sabor mais forte/amargo do que com folhas do morfotipo cinza, estando isso possivelmente relacionado aos supostos teores de cafeína mais elevados encontrados no primeiro morfotipo. No entanto, ainda não foram realizados estudos que confirmem esses relatos.

Coincidentemente, os dois morfotipos que apresentaram os menores teores de cafeína (cinza e peludinha, com 10,89 e 8,78 mg.g⁻¹, respectivamente) apresentaram os maiores teores de teobromina (5,76 e 5,17 mg.g⁻¹, respectivamente) (FIGURA 2.7). Esse resultado pode ser explicado pela principal rota de biossíntese da cafeína para *I. paraguariensis* (YIN; KATAHIRA; ASHIHARA, 2015, p. 709), sendo a teobromina seu precursor direto. Assim, os teores de teobromina observados no

presente estudo poderiam tanto estar disponíveis para transformação em cafeína, como ser resultado do catabolismo, ou seja, da quebra da cafeína.

Ainda, os teores de metilxantinas observados podem estar relacionados com a época da coleta (REGINATTO et al., 1999, p. 445), a qual foi realizada no período de inverno, coincidindo com a safra da erva-mate. Schubert et al. (2006, p. 1235) relatam diferenças nos teores de metilxantinas para *I. paraguariensis*, afirmando que o conteúdo total desses compostos é maior nos meses de verão, reduzindo-se os teores nos meses de inverno. Da mesma maneira, Coelho; Athayde; Schenkel (2001, p. 155) observaram maiores teores de cafeína e teobromina em amostras coletadas no verão quando comparadas às coletadas no início da primavera. Assim, novos estudos ampliando as épocas de coleta são sugeridos, a fim de verificar o comportamento sazonal dos morfotipos com relação ao conteúdo de metilxantinas.

Do ponto de vista comercial, diferentes teores de cafeína são interessantes por proporcionarem uma gama maior de produtos e aplicações potenciais. Da mesma maneira que elevados teores de cafeína são desejados em produtos energéticos e estimulantes, produtos com baixos teores de cafeína ou descafeinados também são alvo de diversos consumidores, especialmente os que buscam produtos alternativos em função de problemas associados à insônia, hiperatividade, azia e taquicardia (HECKMAN; WEIL; DE MEJIA, 2010, p. 81; VALDUGA et al., 2019, p. 481), sendo esse um mercado a ser explorado. Ainda, são poucos os estudos que relatam a cafeína como alvo do melhoramento genético da erva-mate, mas os resultados observados na literatura para esse e outros compostos, indicam a possibilidade de ganhos genéticos com a seleção de genótipos (SCHERER et al., 2002, p. 208; STURION et al., 2004, p. 13; NAKAMURA et al., 2009, p. 120; CARDOZO JUNIOR et al., 2010, p. 176).

A capacidade antioxidante para ambos radicais, ABTS e DPPH, bem como os teores de compostos fenólicos totais não apresentaram diferenças significativas entre os morfotipos estudados. Resultados similares foram encontrados para os teores de metilxantinas totais e ácidos cafeoilquínicos (3-CQA, 4-CQA, 5-CQA e CQA Totais). De maneira geral, os valores médios de capacidade antioxidante e teores de compostos fenólicos totais ficaram muito próximos entre os morfotipos. Verde escuro apresentou a maior média para metilxantinas totais (21,43 mg.g⁻¹), e o morfotipo peludinha o menor (13,95 mg.g⁻¹) (TABELA 2.4).

Os compostos fenólicos atuam de diversas maneiras na saúde humana, apresentando atividades como antioxidantes, ação anti-inflamatória, antialérgica, atuando também na inibição de tumores (CHAICOUSKI et al., 2014, p. 34). *I. paraguariensis* é fonte natural de compostos fenólicos, especialmente pela classe dos ácidos clorogênicos e seus derivados, sendo que esses compostos são os principais responsáveis pela elevada atividade antioxidante observada na espécie (RIACHI; DE MARIA, 2017, p. 309). Essas informações corroboram com os resultados observados no presente estudo, sendo que todos os morfotipos apresentaram elevada atividade antioxidante e teores de compostos fenólicos totais (TABELA 2.4).

TABELA 2.4 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE (RADICAIS ABTS E DPPH), COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CF), METILXANTINAS TOTAIS (MX) E ÁCIDOS CAFEOLQUÍNICOS (CQA) DE MORFOTIPOS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.

Morfotipos	ABTS	DPPH	CF Totais	MX Totais
	($\mu\text{molTEAC.g}^{-1}$)	($\mu\text{molTEAC.g}^{-1}$)	(mgEAG.g^{-1})	(mg.g^{-1})
Sassafrás	830,62 a	569,90 a	75,35 a	18,08 a
Verde escuro	902,10 a	594,30 a	75,19 a	21,43 a
Verde fosco	882,46 a	568,35 a	72,49 a	17,11 a
Cinza	889,01 a	611,83 a	71,63 a	16,65 a
Peludinha	925,84 a	596,02 a	74,85 a	13,95 a
Morfotipos	3-CQA	4-CQA	5-CQA	CQA Totais
	(mg.g^{-1})	(mg.g^{-1})	(mg.g^{-1})	(mg.g^{-1})
Sassafrás	19,27 a	15,55 a	42,84 a	77,66 a
Verde escuro	18,37 a	16,67 a	48,01 a	83,05 a
Verde fosco	20,41 a	16,78 a	44,87 a	82,06 a
Cinza	19,95 a	15,28 a	40,01 a	75,24 a
Peludinha	20,89 a	18,58 a	47,86 a	87,34 a

FONTE: A autora (2020).

NOTA: Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Com relação aos ácidos cafeoilquínicos, o 5-CQA foi o mais abundante, seguido do 3-CQA e posteriormente o 4-CQA, embora sem diferença significativa. Os teores médios de ácidos cafeoilquínicos totais apresentaram pequena variação entre os morfotipos (TABELA 2.4). Mateos et al. (2018, p. 239) indicam que o ácido 3-cafeoilquínico é o mais abundante nas folhas de erva-mate, seguidos do 5-CQA e 4-CQA, respectivamente. Como já mencionado, os resultados demonstraram semelhança na atividade antioxidantes, teor de fenólicos totais e de ácidos cafeoilquínicos entre os morfotipos estudados. Desta maneira, pode-se afirmar que os produtos potenciais provenientes de qualquer desses grupos terão elevados teores de compostos bioativos. Ainda, cabe salientar que houve grande variação química entre os indivíduos de um mesmo morfotipo, sendo mais acentuada para cinza e peludinha (TABELA 2.5).

TABELA 2.5 - AMPLITUDE DE VARIAÇÃO DOS TEORES DE CAFEÍNA, TEOBROMINA, METILXANTINAS TOTAIS (MX) E ÁCIDOS CAFEOLQUÍNICOS (CQA) DE MORFOTIPOS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.

Composto (mg.g ⁻¹)	Sassafrás		Verde escuro		Verde fosco		Cinza		Peludinha	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Cafeína	10,68	27,04	15,63	23,58	6,01	23,25	1,96	28,92	0,06	24,27
Teobromina	0,00	3,29	0,00	3,48	0,00	7,81	0,00	15,37	0,00	10,97
MX Totais	11,67	27,87	16,30	26,60	8,65	24,16	6,40	33,62	4,76	26,71
3-CQA	12,99	27,57	14,11	24,17	12,36	29,94	14,09	29,53	13,79	30,17
4-CQA	9,54	21,14	12,88	19,66	11,67	22,91	8,94	23,54	12,48	25,74
5-CQA	34,15	56,02	40,02	61,17	27,91	62,47	24,53	59,80	40,05	58,46
CQA Totais	59,14	102,48	67,01	100,99	51,94	109,78	50,79	101,52	66,86	101,27

FONTE: A autora (2020).

Ampla variação dos compostos bioativos para *I. paraguariensis* também já foi reportada por Coelho; Athayde; Schenkel (2001, p. 155), Athayde; Coelho; Schenkel (2007, p. 277) e Blum-Silva et al. (2015, p. 04). Ainda, esse comportamento corrobora com os resultados mencionados por Bastos et al. (2006, p. 401), que afirmam que a amplitude observada provavelmente é decorrente de inúmeras condições, tais como ambiente, variabilidade genética entre as plantas, idade, luminosidade, entre outras. Com esses resultados é possível perceber a necessidade de maior tamanho amostral ou o uso de clones para estudos futuros, a fim de selecionar indivíduos que contemplem toda essa amplitude química, além de um treinamento adequado para identificação dos morfotipos.

2.4 CONCLUSÃO

As características físicas de frutos e pirênios variam entre os morfotipos. As dimensões biométricas dos pirênios se mostraram bastante heterogêneas. A viabilidade e o desenvolvimento embrionário foram semelhantes para os quatro lotes estudados. A anatomia do mesofilo foliar é semelhante, entretanto, a deposição de cera e estriamento da cutícula adaxial se diferencia entre todos os morfotipos. Os cinco morfotipos apresentaram elevada capacidade antioxidante e teores de compostos fenólicos, ambos similares entre os morfotipos. O teor de cafeína diferiu entre os morfotipos verde escuro e peludinha.

2.5 REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, K. A. D.; SANTOS, G. J. S.; MACHADO, M. A. B. L. Influência do tamanho das sementes na germinação de *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *leiostachya* Benth. **Revista Ouricuri**, v. 8, n. 2, p.49-57, 2018.

ATHAYDE, M. L.; COELHO, G. C.; SCHENKEL, E. P. Populational diversity on methylxanthines content of mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 2, p. 275-279, 2007.

BASTIAS, C. C.; VALLADARES, F.; RICOTE, N.; BENAVIDES, R. Local canopy diversity does not influence phenotypic expression and plasticity of tree seedlings exposed to different resource availabilities. **Environmental and Experimental Botany**, v. 156, n. 1, p. 38-47, 2018.

BASTOS, D. H.; FORNARI, A. C.; QUEIROZ, Y. S.; TORRES, E. A. Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) leaves. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 399-404, 2006.

BISPO, J. S.; COSTA, D. C. C.; GOMES, S. E. V.; OLIVEIRA, G. M.; MATIAS, J. R.; RIBEIRO, R. C.; DANTAS, B. F. Size and vigor of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan seeds harvested in Caatinga areas. **Journal of Seed Science**, v. 39, n. 4, p. 363-373, 2017.

BLUM-SILVA, C. H.; CHAVES, V. C.; SCHENKEL, E. P.; COELHO, G. C.; REGINATTO, F. H. 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.

BORILLE, A. M. W.; REISSMANN, C. B.; FREITAS, R. J. S. Relação entre compostos fitoquímicos e nitrogênio em morfotipos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 23, n. 1, p. 183-198, 2005.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel - Wissenschaft und -Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399 p.

BRITO, F. C.; ÁVILA, S.; PACHECO, S. D. G.; LAZZAROTTO, M. **Estágios de maturação dos frutos de erva-mate, *Ilex paraguariensis***. Colombo: Embrapa Florestas, 2019. 10 p. (Comunicado Técnico, 433).

BRITO, F. C.; GOSMANN, G.; OLIVEIRA, G. T. Extracts of the unripe fruit of *Ilex paraguariensis* as a potential chemical control against the golden apple snail *Pomacea analiculata* (Gastropoda, Ampullariidae). **Natural Product Research**, v. 33, n. 16, p. 1-4, 2018.

CARDOZO JUNIOR, E. L.; DONADUZZI, C. M.; FERRARESE-FILHO, O.; FRIEDRICH, J. C.; GONELA, A.; STURION, J. A. Quantitative genetic analysis of methylxanthines and phenolic compounds in mate progenies. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 2, p. 171-177, 2010.

CATAPAN, M. I. S. **Influência da temperatura, substrato e luz na germinação de sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil.** 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1998.

CHAICOUSKI, A.; SILVA, J. E.; TRINDADE, J. L. F.; CANTERI, M. H. G. Determinação da quantidade de compostos fenólicos totais presentes em extratos líquido e seco de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 16, n. 1, p. 33-41, 2014.

CHEOK, C. Y.; SALMAN, H. A. K.; SULAIMAN, R. Extraction and quantification of saponins: a review. **Food Research International**, v. 59, p. 16-40, 2014.

COELHO, G. C.; ATHAYDE, M. L.; SCHENKEL, E. P. Methylxanthines of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. var. *vestita* Loes. and var. *paraguariensis*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 2, p. 153-158, 2001.

DUARTE, M. R.; GOLAMBIUK, G. Ilustração de caracteres microscópicos de drogas vegetais para o controle de qualidade farmacognóstico. III. Erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae). **Visão Acadêmica**, v. 9, n. 1, p. 07-12, 2008.

FERMINO JÚNIOR, P. C.; FOCKINK, G. D. Anatomia foliar de plantas jovens de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.Hill.) sob diferentes níveis de sombreamento. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 16, n. 3, p. 335-341, 2017.

FERNANDES, C. E.; KUHN, F.; SCAPINELLO, J.; LAZAROTTO, M.; BOHN, A., BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; ZANATTA, M. S.; ZANATTA, L.; DAL MAGRO, J.; OLIVEIRA, J. V. Phytochemical profile, antioxidant and hypolipemiant potential of *Ilex paraguariensis* fruit extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 81, p. 139-146, 2016.

FLORES, A. V.; BORGES, E. E. L.; GONÇALVES, J. F. C.; GUIMARÃES, V. M.; ATAÍDE, G. M.; BARROS, D. P.; PEREIRA, M. D. Efeito do substrato, cor e tamanho de sementes na germinação e vigor de *Melanoxylon brauna*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 34, n. 78, p. 141-147, 2014.

GALÍNDEZ, G.; CECCATO, D.; BUBILLO, R.; LINDOW-LÓPEZ, L.; MALAGRINA, G.; ORTEGA-BAES, P.; BASKIN, C. C. Three levels of simple morphophysiological dormancy in seeds of *Ilex* (Aquifoliaceae) species from Argentina. **Seed Science Research**, v. 28, n. 2, p. 131-139, 2018.

HECK, C.; DE MEJIA, E. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, health implications and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 138-151, 2007.

HECKMAN, M. A.; WEIL, J.; DE 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.

IBGE. **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura 2018 – PEVS 2018**. Rio de Janeiro, v. 33, p. 1-8, 2019.

KUNIYOSHI, Y. S. **Morfologia da semente e da germinação de 25 espécies arbóreas de uma floresta com Araucária**. 231 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1983.

LUNA, C. V., GONZALEZ, A. M., MROGINSKI, L. A.; SANSBERRO, P. A. Anatomical and histological features of *Ilex paraguariensis* leaves under different *in vitro* shoot culture systems. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 129, p. 457-467, 2017.

MARTINEZ, H. E. P.; CLEMENTE, J. M.; LACERDA, J. S.; NEVES, Y. P.; PEDROSA, A. W. Nutrição mineral do cafeeiro e qualidade da bebida. **Revista Ceres**, v. 61, p. 838-848, 2014.

MATEOS, R.; BAEZA, G.; SARRIA, B.; BRAVO, L. 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.

MIRESKI, M. C.; GUEDES, R. S.; WENDLING, I.; PEÑA, M. L. P.; MEDEIROS, A. C. S. Secagem na viabilidade e desenvolvimento embrionário de sementes de *Ilex paraguariensis*. **Ciência Florestal**, v. 29, n. 3, p. 1354-1362, 2019.

NAKAMURA, K. L.; CARDOZO JUNIOR, E. L.; DONADUZZI, C. M.; SCHUSTER, I. Genetic variation of phytochemical compounds in progenies of *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Crop Breeding Applied Biotech**, v. 9, p. 116-123, 2009.

NERY, F. C.; ALVARENGA, A. A.; JUSTO, C. F.; CASTRO, E. M.; SOUZA, G. S.; ALVES, E. Aspectos anatômicos de folhas de plantas jovens de *Calophyllum brasiliense* Cambess. submetidas a diferentes níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 129-131, 2007.

NIKLAS, C. O. Estudios embriológicos y citológicos em la yerba mate – *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). **Bonplandia**, v. 6, n. 1, p. 45-56, 1987.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.

PAGLIOSA, C. M.; PEREIRA, S. M.; VIEIRA, M. A.; COSTA, L. A.; TEIXEIRA, E.; AMBONI, R. D. M. C.; AMANTE, E. R. Bitterness in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves. **Journal of Sensory Studies**, v. 24, n. 3, p. 415-426, 2009.

PRYCHID, C. J.; RUDALL, P. J. Calcium oxalate crystals in monocotyledons: a review of their structure and systematics. **Annals of Botany**, v. 84, p. 725-739, 1999.

RAKOCEVIC, M.; BORSATO, A. V.; BONA, C.; MEDRADO, M. J. S. Distribuição de estômatos em folhas de diferentes idades de erva-mate cultivada em monocultura e subbosque. In: CONGRESSO SUDAMERICANO DE LA YERBA MATE, 5, 2011. **Actas...** Posadas, INYM/INTA/INaM, 2011. p.45-50.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231-1237, 1999.

REGINATTO, F. H.; ATHAYDE, M. L.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Methylxanthines accumulation in *Ilex* species - Caffeine and theobromine in yerba-mate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, n. 6, p. 443-446, 1999.

REISSMANN, C. B.; DÜNISCH, O.; BOEGER, M. R. Beziehung Zwischen Ernährungsbiologischen (Fe, Mn, Ca) und Strukturellen Merkmalen Ausgewählter Morphotypen Der Mate-Pflanze (*Ilex paraguariensis* St. Hil). In: HÜTTL, R. F. (Org.). Boden, **Wald und Wasser**. 1. ed. Germany: KLUVER, 2003, p. 146-171.

RESENDE, M. D. V.; STURION, J. A.; MENDES, S. **Genética e melhoramento da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Curitiba: Embrapa-CNPQ, 1995. 33 p.
RIACHI, L. G.; DE MARIA, C. A. B. Yerba mate: An overview of physiological effects in humans. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 308-320, 2017.

SAIDELLES, A. P. F.; KIRCHNER, R. M.; SANTOS, N. R. Z.; FLORES, E. M. M.; BARTZ, F. R. Análise de metais em amostras comerciais de erva-mate do sul do Brasil. **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 2, p. 259-265, 2010.

SCHERER, R.; URFER, P.; MAYOL, M. R.; BELINGHERI, L. D.; MARX, F.; JANSSENS, M. J. J. Inheritance studies of caffeine and theobromine content of Mate (*Ilex paraguariensis*) in Misiones, Argentina. **Euphytica**, v. 126, n. 2, p. 203-210, 2002.

SCHUBERT, A., PEREIRA, D. F.; ZANIN, F. F.; ALVES, S. H.; BECK, R. C. R.; ATHAYDE, M. L. Comparison of antioxidant activities and total polyphenolic and methylxanthine contents between the unripe fruit and leaves of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. **Pharmazie**, v. 62, p. 876-880, 2007.

SCHUBERT, A.; ZANIN, F. F.; PEREIRA, D. F.; ATHAYDE, M. L. Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* A. St. - Hil. (erva-mate) em Ijuí e Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1233-1236, 2006.

SILVA, C. G. F.; CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F.; MARCZAK, L. D. F. Selective extraction of saponins from *Ilex paraguariensis* St.-Hil. unripe fruits. **Food and Bioproducts Processing**, v. 111, p. 72-82, 2018.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

STURION, J. A.; CORREA, G.; RESENDE, M. D. V.; CARDOZO JUNIOR, E. L.; DONADUZZI, C. M. **Controle genético dos teores de polifenóis totais, taninos e cafeína em progênies de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) cultivadas em três classes de solos**. Colombo: Embrapa Florestas, 2004. 16 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 16).

TFOUNI, S. A. V.; CAMARA, M. M.; KAMIKATA, K.; GOMES, F. M. L.; FURLANI, R. P. Z. Caffeine in teas: levels, transference to infusion and estimated intake. **Food Science Technology**, v. 38, n. 4, p. 661-666, 2018.

VALDUGA, A. T.; GONÇALVES, I. L.; MAGRI, E.; FINZER, J. R. D. Chemistry, pharmacology and new trends in traditional functional and medicinal beverages. **Food Research International**, v. 120, p. 478-503, 2019.

WENDLING, I.; STURION, J. A.; REIS, C. A. F.; STUEPP, C. A.; PEÑA, M. L. P. Indirect and expedite assessment of *Ilex paraguariensis* commercial yield. **Cerne**, v. 22, n. 3 p. 241-248, 2016.

WENDLING, I.; STURION, J. A.; STUEPP, C. A.; REIS, C. A. F.; RAMALHO, M. A. P.; RESENDE, M. D. V. Early selection and classification of yerba mate progenies. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, n. 3, p. 279-286, 2018.

XIAO, K.; MAO, X.; LIN, Y.; XU, H.; ZHU, Y.; CAI, Q; XIE, H; ZHANG, J. Trichome, a functional diversity phenotype in plant. **Molecular Biology**, v. 6, n. 1, p. 01-06, 2017.

YIM, H. S.; CHYE, F. Y.; RAO, V.; LOW, J. Y.; MATANJUN, P.; HOW, S. E.; HO, C. W. Optimization of extraction time and temperature on antioxidant activity of *Schizophyllum commune* aqueous extract using response surface methodology. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 275-283, 2013.

YIN, Y.; KATAHIRA, R.; ASHIHARA, H. Metabolism of purine alkaloids and xanthine in leaves of mate (*Ilex paraguariensis*). **Natural Product Communications**, v. 10, n. 5, p. 707-712, 2015.

ZANON, A. **Produção de sementes de erva-mate**. Curitiba, EMBRAPA-CNPF, 1988. 08 p. (Circular técnica n. 17).

CAPÍTULO II

3 ALTERNATIVAS PARA SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA EMBRIONÁRIA DE PIRÊNIOS DE ERVA-MATE

RESUMO

A produção de mudas seminais de erva-mate é a mais utilizada na propagação da espécie, entretanto, a dormência embrionária das sementes dificulta esse processo. Neste sentido, objetivou-se avaliar diferentes temperaturas, substratos e períodos como métodos alternativos de estratificação na superação da dormência embrionária de pirênios de *Ilex paraguariensis*. Para tanto, foram realizados três experimentos: *Experimento 1* - temperaturas, substratos e períodos de estratificação, seguindo esquema fatorial triplo com tratamento adicional [(2 x 2 x 2) + 1], sendo duas temperaturas (5° C - câmara fria e 15° C - câmara seca) x dois substratos (papel e areia) x dois períodos de avaliação (90 e 180 dias) + tratamento adicional (estratificação convencional em viveiro). *Experimento 2* - lotes e períodos de estratificação, em esquema fatorial duplo (4 x 3), consistindo em quatro lotes de pirênios (morfotipo sassafrás, verde escuro, verde fosco e lote mix) x 3 períodos de avaliação (0, 90 e 180 dias). *Experimento 3* - estratificação convencional, em viveiro, em esquema fatorial duplo (4 x 2), sendo quatro lotes de pirênios (sassafrás, verde escuro, verde fosco e mix) x dois períodos de avaliação (0 e 180 dias). Para determinação da eficiência dos tratamentos de superação de dormência foi utilizado o teste de tetrazólio, sendo determinadas a viabilidade e o estágio de desenvolvimento embrionário dos pirênios. Ainda, foram determinados o grau de umidade e condutividade elétrica para todos os tratamentos. De maneira geral, em todos os métodos de estratificação a viabilidade dos pirênios se manteve acima de 60% e pirênios inviáveis tiveram porcentagens abaixo de 30%. A estratificação a 5 °C e 15 °C por 90 dias favoreceu o desenvolvimento embrionário dos pirênios de *Ilex paraguariensis* até o estágio pós-coração. A estratificação convencional foi o único método que apresentou embriões em estágio maduro. Os lotes responderam de maneira semelhante aos métodos de estratificação e também apresentaram desenvolvimento embrionário semelhante. A condutividade elétrica foi maior em pirênios frescos.

Palavras-chave: Estratificação. Germinação de sementes florestais. *Ilex paraguariensis*. Propagação seminal. Teste de tetrazólio.

ABSTRACT

The yerba mate seedlings production is the most used propagation method of the species, however, the embryonic dormancy of seeds makes this process difficult. So, we evaluated different temperatures, substrates and periods as alternative stratification methods to overcome embryonic dormancy of *Ilex paraguariensis* pyrenes. For this, we performed three experiments: *Experiment 1* - temperatures, substrates and stratification periods, following a triple factorial scheme with additional treatment [(2 x 2 x 2) + 1], with two temperatures (5 °C - cold chamber and 15 °C - dry

chamber) x two substrates (paper and sand) x two evaluation periods (90 and 180 days) + additional treatment (conventional stratification in a nursery). *Experiment 2* - lots and stratification periods, in a double factorial scheme (4 x 3), consisting of four pyrenes lots (sassafras, dark green and dull green morphotypes and mix lot) x 3 evaluation periods (0, 90 and 180 days). *Experiment 3* - conventional stratification, in a nursery, in a double factorial scheme (4 x 2), with four pyrenes lots (sassafras, dark green and dull green and morphotypes and mix lot) x two evaluation periods (0 and 180 days). We used tetrazolium test for determined the efficiency of the dormancy overcoming treatments and evaluated viability and embryonic development stage of pyrenes. In addition, we determined the moisture content and electrical conductivity for all treatments. In general, after all stratification methods, pyrenes viability remained above 60% and non-viable pyrenes had percentages below 30%. Stratification at 5 °C and 15 °C for 90 days favored embryonic development in *Ilex paraguariensis* pyrenes up to the post-heart stage. Conventional stratification was the only method that presented mature embryos. The lots responded in a similar way to stratification methods and showed similar embryonic development. The electrical conductivity was higher in fresh pyrenes.

Keywords: Stratification. Germination of forest seeds. *Ilex paraguariensis*. Seminal propagation. Tetrazolium test.

3.1 INTRODUÇÃO

A evolução permitiu que as plantas desenvolvessem diversas adaptações, especialmente para sobrevivência e continuidade das espécies. Dentre as adaptações mais interessantes observadas nas plantas fanerógamas está a dormência de suas sementes, adquirida por inúmeras espécies durante o processo evolutivo, por seleção natural (BEWLEY et al., 2013, p. 248). A dormência é uma estratégia que impede que a germinação aconteça em ambientes desfavoráveis, como por exemplo em períodos muito quentes, frios ou de seca, permitindo que o processo germinativo e o desenvolvimento das plântulas ocorram no tempo e ambiente adequados (BEWLEY et al., 2013, p. 248; MARCOS-FILHO, 2015, p. 245).

Apesar de ser uma vantagem ecológica para as espécies, a dormência pode ser um empecilho quando observada pelo ponto de vista silvicultural, especialmente na produção de mudas seminais. Exemplo disto é a propagação de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., importante espécie de ocorrência natural no Brasil, e que traz consigo destaque econômico, social e ecológico para os três estados da região sul brasileira (PIRES et al. 2016, p. 208). A partir das folhas e ramos finos da erva-mate são produzidas bebidas estimulantes bastante apreciadas no mercado nacional, tais como chimarrão, tererê e chá mate (BARZOTTO; ALVES, 2013, p. 458), além disso, nota-

se um crescente potencial de aplicabilidade da espécie nos setores alimentício e farmacológico.

Para atender a demanda do mercado é indispensável que os plantios de erva-mate sejam realizados com mudas de alta qualidade genética, fisiológica e sanitária, que irão resultar em ervais mais produtivos e de elevado padrão da matéria-prima (DUARTE et al., 2019, p. 06). Atualmente, a produção de mudas provenientes de sementes ainda é a mais utilizada, entretanto, é de amplo conhecimento que a propagação seminal da erva-mate é dificultada pela dormência de suas sementes, sendo a germinação lenta e irregular (SANSBERRO et al., 1998, p. 101; DOLCE; MROGINSKI; REY, 2010, p. 445; MIRESKI et al., 2019, p. 1358). Apesar da importância da espécie, estudos visando a superação da dormência ainda são incipientes, necessitando de métodos que busquem acelerar e homogeneizar o desenvolvimento embrionário e consequente processo germinativo.

Ainda, há grande variedade fenotípica entre as plantas de *I. paraguariensis* (RESENDE; STURION; MENDES, 1995, p. 02), especialmente com relação a cor das folhas, sendo classificadas como morfotipos (WENDLING et al., 2018, p. 280). Apesar das evidentes diferenças morfológicas para as folhas, não há estudos relatando variações na qualidade de sementes de morfotipos. A constatação de tal variação, especialmente relacionadas aos estágios de desenvolvimento embrionário, seria útil para orientar a coleta de sementes e a produção de mudas da espécie.

Às sementes de erva-mate atribuem-se dois tipos de dormência: embrionária e mecânica. A dormência embrionária é caracterizada por embriões morfologicamente imaturos, que não estão completamente desenvolvidos no momento da dispersão dos frutos (BEWLEY; BLACK, 1982, p. 75; SANSBERRO et al., 1998, p. 101; MARCOS-FILHO, 2015, p. 264). Após dispersas, essas sementes ainda irão requerer um período de desenvolvimento adicional antes que possam germinar, estando seu mecanismo de superação de dormência relacionado com as alterações anatômicas que irão ocorrer no embrião (BEWLEY; BLACK, 1982, p. 75). Já a dormência mecânica é imposta pelo endocarpo lenhoso que recobre as sementes de erva-mate, formando uma barreira física, que impede a expansão dos tecidos embrionários (FERREIRA; BORGHETTI, 2004, p. 106 DOLCE; MROGINSKI; REY, 2010, p. 445; MARCOS-FILHO, 2015, p. 269).

De maneira usual, a dormência de *I. paraguariensis* é superada com o método de estratificação em areia, que consiste basicamente na distribuição de uma camada

de sementes entre duas camadas de areia, alocadas em uma caixa, com fundo perfurado (DANIEL, 2009, p. 82). De acordo com Cuquel; Carvalho; Chamma (1994, p. 416) esse método evita o dessecamento das sementes, além de baixar a tensão de oxigênio e aumentar a tensão de CO₂, proporcionando condições favoráveis para maturação ou superação dos bloqueios impostos ao embrião. Esse tipo de estratificação é convencional para a espécie, sendo aplicado pela maioria dos viveiristas, entretanto, é um método que demanda um longo período, de cinco a seis meses, apresenta grande incidência de fungos, degradação das sementes (ZANON, 1988, p. 6 e 8) e não proporciona homogeneidade na germinação e formação das plântulas.

A literatura demonstra métodos alternativos para superação de dormência para diversas espécies de *Ilex*, como por exemplo, a exposição de frutos e/ou sementes a baixas temperaturas (CUQUEL; CARVALHO; CHAMMA, 1994, p. 417; SANSBERRO; REY; MROGINSKI, 2000, p. 444; DOLCE; MROGINSKI; REY, 2010, p. 447; SCHAPARINI; VIECELLI, 2011, p. 167). Muitas espécies requerem períodos de baixas temperaturas para a superação da dormência embrionária de suas sementes, devido à transferência de material do endosperma para o crescimento do embrião ocorrer de maneira mais eficiente em temperaturas mais baixas (BEWLEY; BLACK, 1982, p. 77). Entretanto, apesar dos resultados promissores observados, ainda são necessários estudos visando conhecer a influência do frio no desenvolvimento embrionário da erva-mate.

A fim de verificar a efetividade dos métodos de estratificação, recomenda-se a aplicação de testes de viabilidade e vigor. Esses testes são largamente utilizados para verificação do potencial fisiológico das sementes, destacando-se o teste do tetrazólio, pela sua facilidade e rapidez de aplicação na determinação da viabilidade (MARCOS-FILHO, 2015, p. 619). As Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009, p. 262) determinam a metodologia para a realização do teste de tetrazólio em erva-mate. Aliado a esse teste, pode-se também realizar a determinação dos estágios embrionários das sementes submetidas ao tetrazólio, sendo eles: globular, coração, pós-coração, torpedo e maduro (CATAPAN, 1998, p. 31; MIRESKI et al., 2019, p. 1357).

De maneira complementar, a determinação dos estágios embrionários permite verificar se a estratificação foi efetiva no processo de desenvolvimento embrionário. Na literatura são observadas algumas divergências entre a relação do tamanho e

estágio de desenvolvimento dos embriões (FERREIRA; ALMEIDA-CORTEZ; CUNHA, 1995, p. 163), sendo que por vezes embriões pequenos podem encontrar-se em estado morfofisiológico mais adiantado do que os intervalos determinados na literatura (NIKLAS, 1987, p. 51; MIRESKI et al., 2019, p. 1357). De forma geral, o teste de tetrazólio pode ser considerado um método bastante útil, pela facilidade e rapidez na aplicação, embora se exija habilidade e treinamento.

Ainda, é possível a realização do teste de condutividade elétrica, a fim de verificar o vigor das sementes submetidas aos processos de estratificação. Essa análise é amplamente utilizada por ser objetiva, de fácil condução e rápida obtenção de resultados (DIAS; MARCOS-FILHO, 1996, p. 31), permitindo determinar o processo de deterioração das sementes já na sua fase inicial (RIBEIRO et al., 2009, p. 773). A condutividade elétrica é determinada a partir da mensuração da lixiviação de íons, e de maneira geral, quanto maior for a liberação de exsudatos, maior é a condutividade elétrica, correspondendo a um menor vigor das sementes, resultado do grau de desestruturação das membranas (FERREIRA; BORGHETTI, 2004, p. 293; MARCOS-FILHO, 2015, p. 627;). Cabe destacar que não há metodologias preestabelecidas para condutividade elétrica em sementes de *I. paraguariensis*.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar diferentes temperaturas, substratos e períodos, como métodos alternativos de estratificação, na superação da dormência embrionária de pirênios de *Ilex paraguariensis*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Coleta e beneficiamento de frutos

Os frutos de erva-mate foram coletados em março de 2019, no município de Ivaí - PR, provenientes de um teste procedências e progênies (WENDLING et al., 2018, p. 280). Foram estudados quatro lotes, dentre estes, três morfotipos (sassafrás, verde escuro e verde fosco, descritos por WENDLING et al., 2016, p. 243) e um lote denominado mix, composto pela mistura aleatória de vários indivíduos. Foram selecionados 10 indivíduos de cada morfotipo e aproximadamente 30 indivíduos para o lote mix (sem considerar o morfotipo), sendo respeitada a distância mínima de 30 metros entre plantas coletadas.

Os frutos ficaram armazenados em câmara fria por um período máximo de quatro dias até o beneficiamento, e todas as análises foram realizadas no Laboratório de Sementes Florestais da Universidade Federal do Paraná. Após despolpa em água corrente, os pirênios (endocarpo + semente) foram colocados para secar em ambiente natural de laboratório (aproximadamente cinco dias), e posteriormente acondicionados em sacos plásticos semipermeáveis, selados e armazenados em câmara fria (5 ± 2 °C) até a instalação dos experimentos (aproximadamente 5 dias).

3.2.2 Métodos alternativos de estratificação

Foram realizados três experimentos a fim de estudar métodos alternativos para superação da dormência embrionária dos pirênios de erva-mate. A Tabela 3.1 apresenta o esquema dos experimentos, os lotes estudados e métodos de superação aos quais foram submetidos.

TABELA 3.1 - LOTES E MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA EMBRIONÁRIA EM PIRÊNIOS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.

Experimento	Lote	Temperatura (ambiente)	Substrato	Tempo (dias)
1	Mix	5 ± 2 °C (Câmara fria)	Papel	90
		15 ± 2 °C (Câmara seca)	Areia	180
		Convencional em viveiro (adicional)	Areia	180
2	Sassafrás Verde escuro Verde fosco Mix	5 ± 2 °C (Câmara fria)	Papel	0
				90
				180
3	Sassafrás Verde escuro Verde fosco Mix	Convencional em viveiro	Areia	0
				180

FONTE: A autora (2020).

A estratificação a 5° C, em câmara fria, consistiu em pirênios alocados em caixas do tipo gerbox (11 x 11 x 3,5 cm) e dois substratos (entre areia e entre papel germitest), acondicionados em ambiente com temperatura controlada (5 ± 2 °C), por 90 e 180 dias. Na estratificação a 15° C, em câmara seca, os pirênios foram alocados em caixas do tipo gerbox (11 x 11 x 3,5 cm) em dois substratos (entre areia e entre

papel germitest) e foram acondicionados em ambiente com temperatura controlada (15 ± 2 °C) e umidade relativa do ar média de 40%, por 90 e 180 dias.

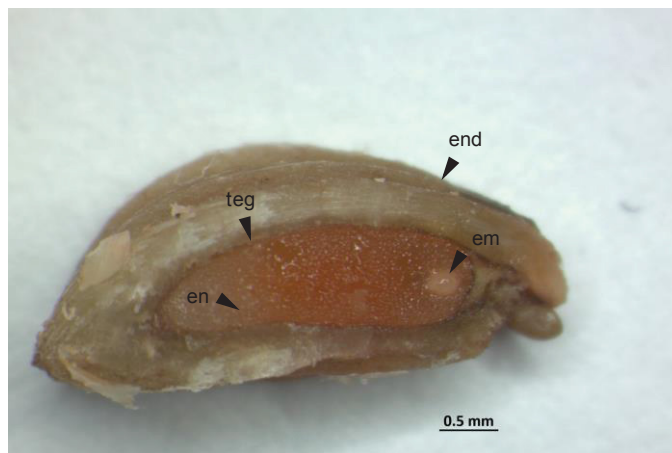
O substrato areia foi uniformizado em peneira de malha de 0,8 mm, lavada e esterilizada em estufa a 200 °C, por duas horas. Em cada gerbox foram adicionadas 150 g de areia, e logo acima foram acomodados os pirênios em única camada e então cobertos por mais 50 g de areia. O conteúdo de cada gerbox foi umedecido com água destilada (60% da capacidade de retenção da areia). O substrato papel germitest foi esterilizado em estufa a 105 °C, por 2 horas. Em cada gerbox foram utilizadas duas folhas de papel saturadas em água destilada, os pirênios dispostos logo acima em única camada, e cobertos por mais uma folha de papel germitest. Em todos substratos foi realizada a reposição da água sempre que necessário.

Para a estratificação convencional, pirênios acondicionados em envelopes de tecido voal foram dispostos entre duas camadas de 4 centímetros de areia grossa, acomodados em caixas de polietileno perfuradas e mantidos em casa de vegetação com irrigação automatizada (três irrigações diárias de 10 minutos, com vazão média de 56 L/h) e sem controle de temperatura, por 180 dias. A areia utilizada para estratificação convencional foi lavada em água corrente e deixada para secar ao ar. Para melhor compreensão textual foi utilizada a nomenclatura “ambiente” como sinônimo para tratar as duas temperaturas testadas - “câmara fria” relacionada à temperatura de 5 °C e “câmara seca” a 15 °C.

3.2.3 Viabilidade e estágio embrionário dos pirênios

Para determinação da eficiência dos tratamentos de superação de dormência foi utilizado o teste de tetrazólio, sendo determinadas a viabilidade e o estágio de desenvolvimento embrionário dos pirênios (FIGURA 3.1). A viabilidade inicial e as fases do desenvolvimento de todos os lotes foram realizadas com pirênios frescos, 20 dias após a colheita e beneficiamento. Após cada método de estratificação, novos pirênios foram submetidos ao teste de tetrazólio. As análises foram realizadas a partir de quatro repetições de 50 pirênios.

FIGURA 3.1 - PIRÊNIO (ENDOCARPO + SEMENTE) DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., EM CORTE LONGITUDINAL, DEMONSTRANDO: ENDOCARPO (end), TEGUMENTO (teg), ENDOSPERMA (en) E EMBRIÃO (em).



FONTE: A autora (2020).
NOTA: Pirênio colorido em tetrazólio.

O teste do tetrazólio seguiu as etapas descritas nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009, p. 226), com adaptações: 1) pré-condicionamento – pirênios inteiros imersos em água destilada a 35 °C por 18 h; 2) Exposição dos tecidos para coloração – corte com bisturi no eixo longitudinal dos pirênios expondo levemente o endosperma; 3) Coloração em solução de 2, 3, 5-trifenil cloreto de tetrazólio - pirênios excisados foram imersos em solução 1% de tetrazólio e acondicionados no escuro, a 30 °C por 18 horas; 4) Avaliação - com auxílio de lupa estereoscópica e bisturi, os embriões foram avaliados quanto a sua coloração (brancos: inviáveis; rosa a vermelho: viáveis; e deteriorados: pirênios que se já se encontravam em deterioração ou vazios) e quanto ao estágio de desenvolvimento embrionário: globular, coração, pós-coração, torpedo ou maduro (CATAPAN, 1998, p. 31; MIRESKI et al., 2019 p. 1357).

3.2.4 Grau de umidade

O grau de umidade de todos os lotes foi determinado inicialmente e após cada método de estratificação, a partir do método de estufa a 105 ± 3 °C por 24 h (BRASIL, 2009, p. 309), utilizando-se quatro repetições de 100 pirênios para cada tratamento.

3.2.5 Condutividade elétrica

Determinou-se a condutividade elétrica (CE) inicial e após cada método de estratificação, para cada lote. Foram utilizadas quatro repetições com 50 pirênios, pesados em balança de precisão (0,001 g), embebidos em 50 mL de água destilada e acondicionados em câmara B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*). Foram mantidos a temperatura de 25 °C, com luz branca, sendo a condutividade elétrica mensurada após 24 horas de embebição (MARCOS-FILHO, 2015, p. 627). Utilizou-se condutivímetro portátil Digimed DM-3 (0,01 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 200 mS/cm), sendo que os resultados obtidos foram divididos pelo peso respectivo de cada amostra, e expressos em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$.

3.2.6 Análise estatística

Todos os experimentos seguiram a premissa de um delineamento inteiramente casualizado: *Experimento 1*: realizado em esquema fatorial triplo com tratamento adicional [(2 x 2 x 2) + 1], sendo duas temperaturas (5° C - câmara fria e 15° C - câmara seca) x dois substratos (papel e areia) x dois períodos de avaliação (90 e 180 dias) + tratamento adicional (convencional em viveiro). *Experimento 2*: em esquema fatorial duplo (4 x 3), consistindo em quatro lotes (sassafrás, verde escuro, verde fosco e mix) x três períodos de avaliação (0, 90 e 180 dias). *Experimento 3*: esquema fatorial duplo (4 x 2), sendo quatro lotes (sassafrás, verde escuro, verde fosco e mix) x dois períodos de avaliação (0 e 180 dias). *Condutividade elétrica*: 22 tratamentos, cada um com quatro repetições de 50 pirênios.

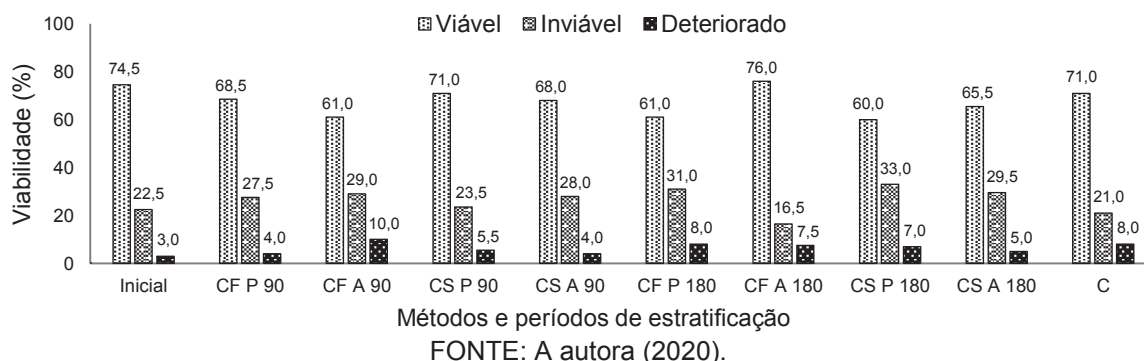
Os dados dos tratamentos foram testados quanto à homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett) e a normalidade dos resíduos (teste de Shapiro-Wilk). Quando necessário foram transformados por $\log(1 + X)$ e posteriormente submetidos a análise de variância. Havendo diferença significativa, a comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, exceto para condutividade elétrica, que foi utilizado o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Para as variáveis que não atenderam os pressupostos da ANOVA foram realizadas apenas estatística descritiva. Para os resultados das fases de desenvolvimento embrionário foram contabilizados somente pirênios viáveis.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Experimento 1 - Temperaturas, substratos e períodos de estratificação na superação de dormência embrionária

Não houve diferença significativa entre as temperaturas, substratos e períodos testados para as variáveis porcentagem de pirênios viáveis, inviáveis e deteriorados. Além disso, não houve interação entre os fatores, tampouco foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos alternativos de estratificação e a convencional. Em todos tratamentos é possível observar que a média das porcentagens de pirênios viáveis (67%), inviáveis (27%) e pirênios deteriorados (6%), permaneceram constantes (FIGURA 3.2).

FIGURA 3.2 - PORCENTAGEM DE EMBRIÕES VIÁVEIS, INVIÁVEIS E DETERIORADOS EM DIFERENTES TEMPERATURAS, SUBSTRATOS E PERÍODOS DE ESTRATIFICAÇÃO DE PIRÊNIOS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. CF = CÂMARA FRIA (5 °C); CS = CÂMARA SECA (15 °C); P = SUBSTRATO PAPEL; A = SUBSTRATO AREIA; 90 DIAS; 180 DIAS; C = CONVENCIONAL (CASA DE VEGETAÇÃO POR 180 DIAS).



Com relação as fases de desenvolvimento embrionário, para o estágio de coração houve interação entre os fatores temperatura e período de estratificação, sendo que a estratificação realizada em câmara seca (15 °C) após 180 dias apresentou menor número de pirênios neste estágio de desenvolvimento (12,5%) (TABELA 3.2). Ainda, para essa variável não houve diferença significativa entre os tratamentos alternativos de estratificação e o convencional (TABELA 3.3). A maior proporção de pirênios analisados após a estratificação em ambiente controlado encontrou-se no estágio de pós-coração (36%), indicando que houve desenvolvimento embrionário quando comparado com a caracterização inicial do lote estudado (TABELA 3.2 e TABELA 3.3).

TABELA 3.2 - PORCENTAGEM DE EMBRIÕES EM ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE CORAÇÃO, PÓS-CORAÇÃO E TORPEDO, EM PIRÊNIOS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS, SUBSTRATOS E PERÍODOS DE ESTRATIFICAÇÃO. CF = CÂMARA FRIA (5 °C); CS = CÂMARA SECA (15 °C).

Coração* (%)	Ambiente		Período	
			90 dias	180 dias
	CF	-	22,00 a A	23,75 a A
	CS	-	30,95 a A	12,50 a B

Pós-coração (%)	Ambiente		Substrato	
			90 dias	180 dias
	CF	Papel	43,00 a A	33,00 a A
	CF	Areia	36,50 a A	37,00 a A
	CS	Papel	35,00 a A	31,50 a A
	CS	Areia	32,50 a A	39,50 a A

Torpedo* (%)	Ambiente		Substrato	
			Papel	Areia
	CF	-	5,25 b A	7,50 a A
	CS	-	12,25 a A	7,25 a B

FONTE: A autora (2020).

NOTA: Média seguida por letras iguais, maiúscula na mesma linha e minúscula na mesma coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade; *: Interação significativa entre os fatores.

O estágio torpedo, apresentou interação entre temperatura e substrato, sendo a combinação entre câmara seca (15 °C) e papel proporcionou a maior média de embriões nesta fase de desenvolvimento (12,25%) (TABELA 3.2). Ainda, para essa variável foi observada diferença significativa entre os tratamentos alternativos de estratificação e o convencional, sendo que neste último (em viveiro) apresentou maior porcentagem média de torpedos (19,5%). Embriões maduros foram observados somente em pirênios submetidos a estratificação convencional (2,5%) (TABELA 3.3).

TABELA 3.3 - FASES DE DESENVOLVIMENTO DO ESTÁGIO EMBRIONÁRIO (%) EM PIRÊNIOS VIÁVEIS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS, SUBSTRATOS E PERÍODOS DE ESTRATIFICAÇÃO. CF = CÂMARA FRIA (5 °C); CS = CÂMARA SECA (15 °C); P = PAPEL; A = AREIA.

Estágio embrionário	Pirênios frescos	CF		CS		CF		CS		Convencional (180)
		90		90		180		180		
		P	A	P	A	P	A	P	A	
Globular	0,5	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0
Coração	48,5	22,5	21,5	28,5	33,0	20,5	27,0	11,0	14,0	21,0
Pós-coração	24,0	43,0	36,5	35,0	32,5	33,0	37,0	32,0	39,5	28,0
Torpedo	1,5	3,0	3,0	7,0	2,5	7,5	12,0	18,0	12,0	19,5
Maduro	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,5

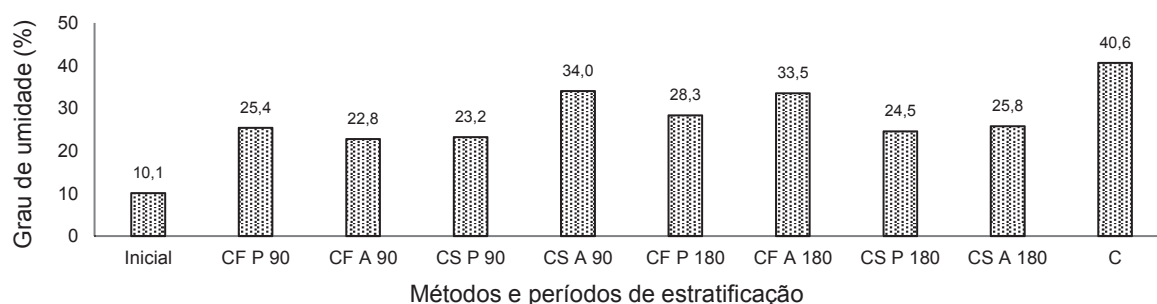
FONTE: A autora (2020).

O estágio globular foi observado em 0,5% dos pirênios frescos viáveis, e após 90 dias nos pirênios submetidos à câmara seca (15 °C) e substrato papel. Aos 90 dias após o início da estratificação já foi possível observar maior porcentagem média de

pirênios em estágio de pós-coração, em todos os tratamentos estudados (TABELA 3.3). Entretanto, especialmente nos pirênios submetidos à câmara fria (5 °C), verificou-se após 180 dias, porcentagens elevadas de embriões em estágio de coração (20,5% em substrato papel e 27% em areia).

Ainda, o teor de água inicial dos pirênios foi de 10,1% (FIGURA 3.3). Após 90 dias de estratificação os pirênios submetidos a câmara seca (15 °C) e substrato areia, apresentaram 34% de umidade. Transcorridos 180 dias, os pirênios em substrato areia e alocados em câmara fria (5 °C) apresentaram os maiores teores de água, com 33,5%. A estratificação convencional obteve o maior grau de umidade geral, com 40,6% (FIGURA 3.3).

FIGURA 3.3 - GRAU DE UMIDADE (%) DE PIRÊNIOS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS, SUBSTRATOS E PERÍODOS DE ESTRATIFICAÇÃO. CF = CÂMARA FRIA (5 °C); CS = CÂMARA SECA (15 °C); P = SUBSTRATO PAPEL; A = SUBSTRATO AREIA; 90 DIAS; 180 DIAS; C = CONVENCIONAL (CASA DE VEGETAÇÃO POR 180 DIAS).

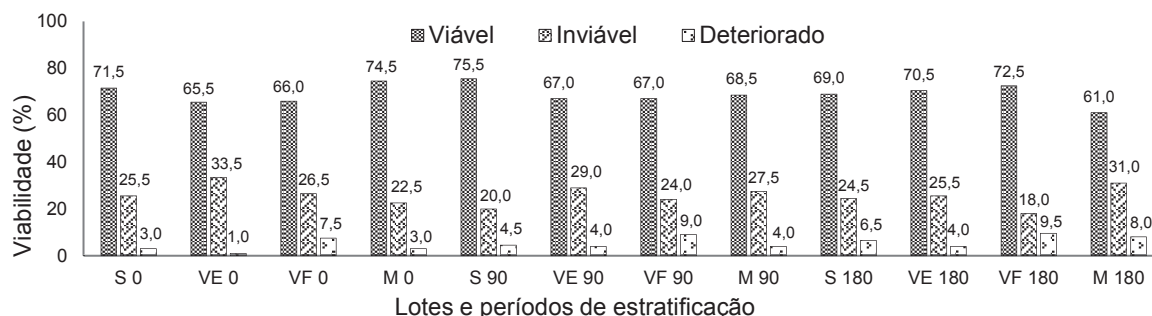


FONTE: A autora (2020).

3.3.2 Experimento 2 - Lotes e períodos de estratificação na superação de dormência embrionária

A análise de variância demonstrou não haver interação e nem diferença significativa entre lotes e períodos de estratificação para as variáveis pirênios viáveis e inviáveis. A média de pirênios viáveis se manteve acima de 60% para todos os lotes. Pirênios inviáveis apresentaram médias abaixo dos 30% (FIGURA 3.4). Já para a variável pirênios deteriorados houve diferença significativa entre os lotes e entre os períodos de estratificação. O lote do morfotipo verde fosco apresentou maior porcentagem média de pirênios deteriorados (8,67%), diferindo significativamente dos morfotipos sassafrás (4,67%) e verde escuro (3%) (TABELA 3.4).

FIGURA 3.4 - PORCENTAGEM DE EMBRIÕES VIÁVEIS, INVIÁVEIS E DETERIORADOS EM DIFERENTES LOTES E PERÍODOS DE ESTRATIFICAÇÃO DE PIRÊNIOS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. S = SASSAFRÁS; VE = VERDE ESCURO; VF = VERDE FOSCO; M = MIX; 0 = SEMENTES FRESCAS; 90 DIAS DE ESTRATIFICAÇÃO; 180 DIAS DE ESTRATIFICAÇÃO.



FONTE: A autora (2020).

Os pirênios frescos apresentaram menor porcentagem de deterioração (3,63%), sendo significativamente inferior a avaliação final, aos 180 dias (7%) (TABELA 3.4). Com relação aos estágios embrionários, houve diferença significativa entre os períodos de estratificação para os estágios de coração, pós-coração e torpedo (TABELA 3.4). Embriões globulares obtiveram média geral abaixo de 1% e embriões maduros não foram observados em nenhum dos lotes estudados neste experimento.

Embriões em estágio coração diferiram significativamente em todos os períodos de estratificação, sendo aos 180 dias inferior aos demais (25,13%) e a maior porcentagem média observada nos pirênios frescos (46,5%). Para a variável pós-coração as maiores médias foram observadas aos 90 e 180 dias (34,25 e 37%, respectivamente), não diferindo significativamente entre si, mas superior ao observado nos pirênios frescos. A maior média de embriões em fase de torpedo foi observada aos 180 dias, significativamente superior aos outros dois períodos estudados (TABELA 3.4).

TABELA 3.4 - PORCENTAGEM DE PIRÊNIOS DETERIORADOS E EMBRIÕES EM FASE DE CORAÇÃO, PÓS-CORAÇÃO E TORPEDO EM QUATRO LOTES DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. SUBMETIDOS A DIFERENTES PERÍODOS DE ESTRATIFICAÇÃO. S = SASSAFRÁS; VE = VERDE ESCURO; VF = VERDE FOSCO; M = MIX.

Viabilidade e Estágio Embrionário (%)	Lotes	Período de estratificação (dias)			Média
		0	90	180	
Deteriorado ^s	S	3,00	4,50	6,50	4,67 b
	VE	1,00	4,00	4,00	3,00 b
	VF	7,50	9,00	9,50	8,67 a
	M	3,00	4,00	8,00	5,00 ab

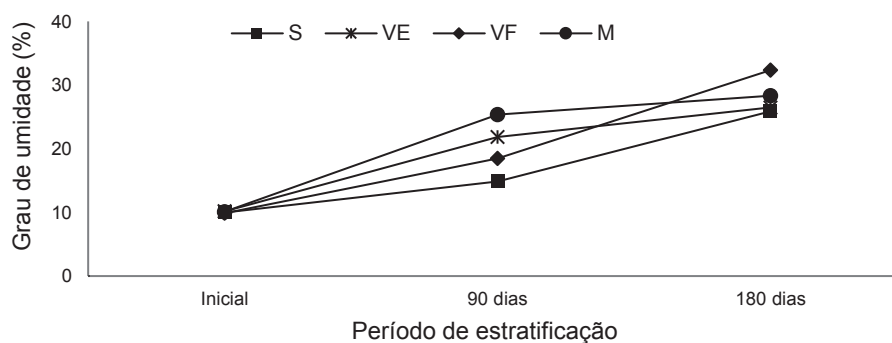
Coração	Média	3,63 B	5,38 AB	7,00 A	-
	S	45,00	38,50	28,00	37,17 a
	VE	48,00	34,00	27,00	36,33 a
	VF	44,50	37,00	25,00	35,50 a
	M	48,50	22,50	20,50	30,50 a
Pós-Coração*	Média	46,50 A	33,00 B	25,13 C	-
	S	23,50	34,00	36,00	31,17 a
	VE	17,00	32,00	37,50	28,83 a
	VF	15,00	28,00	41,50	28,17 a
	M	24,00	43,00	33,00	33,33 a
Torpedo	Média	19,88 B	34,25 A	37,00 A	-
	S	1,00	3,00	5,00	3,00 a
	VE	0,50	0,50	6,00	2,33 a
	VF	3,50	1,50	6,00	4,67 a
	M	1,50	3,00	7,50	4,00 a
	Média	1,63 B	2,00 B	6,13 A	-

FONTE: A autora (2020).

NOTA: Média seguida por letras iguais, maiúscula na mesma linha e minúscula na mesma coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade; * variável transformada por log (1+x).

O grau de umidade inicial dos pirênios para todos os lotes foi de aproximadamente 10%. Após 90 dias, o morfotipo sassafrás apresentou 14,8%, seguido por 18,5% para os pirênios de verde fosco, 21,8% para o lote do morfotipo verde escuro e 25,4% para o lote mix. Aos 180 dias, o grau de umidade aumentou para todos os lotes, sendo 25,9 e 26,5% para os morfotipos sassafrás e verde escuro e 28,3 e 32,4% para o lote mix e verde fosco, respectivamente (FIGURA 3.5).

FIGURA 3.5 - GRAU DE UMIDADE MÉDIO, EM PORCENTAGEM, DE PIRÊNIOS DE MORFOTIPOS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. SUBMETIDOS A DIFERENTES PERÍODOS DE ESTRATIFICAÇÃO. S = SASSAFRÁS; VE = VERDE ESCURO; VF = VERDE FOSCO; M = MIX.



FONTE: A autora (2020).

3.3.3 Experimento 3 - Estratificação convencional na superação da dormência embrionária em lotes de erva-mate

Na Tabela 3.5 observa-se a interação significativa entre os fatores lote e período de avaliação para as variáveis porcentagem de pirênios viáveis, inviáveis e

estágio embrionário pós-coração. Para as variáveis porcentagem de pirênios deteriorados, estágio embrionário de coração e torpedo houve diferença significativa entre os pirênios frescos e após 180 dias de estratificação.

TABELA 3.5 - PORCENTAGEM MÉDIA DE PIRÊNIOS VIÁVEIS, INVIÁVEIS, DETERIORADOS E ESTÁGIO EMBRIONÁRIO EM FASE DE CORAÇÃO, PÓS-CORAÇÃO E TORPEDO, NA ESTRATIFICAÇÃO CONVENCIONAL DE QUATRO LOTES DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. S = SASSAFRÁS; VE = VERDE ESCURO; VF = VERDE FOSCO; M = MIX.

Viabilidade (%)	Lotes	Período (dias)			Estágio (%)	Lotes	Período (dias)		
		0	180	Média			0	180	Média
Viáveis ¹	S	71,50 a A	65,00 a B	68,25	Coração	S	45,00	9,50	27,25 a
	VE	65,50 b A	80,00 a A	72,75		VE	48,00	26,50	37,25 a
	VF	66,00 b A	80,50 a A	73,25		VF	44,50	14,50	29,50 a
	M	74,50 a A	72,00 a AB	73,25		M	48,50	13,00	30,75 a
	Média	69,38	74,38	-		Média	46,5 A	15,88 B	
Inviáveis ¹	S	25,50 a A	26,50 a A	26,00	Pós-coração ^{1*}	S	23,50 a A	27,50 a A	25,50
	VE	33,50 a A	12,50 b B	23,00		VE	17,00 b A	29,50 a A	23,25
	VF	26,50 a A	11,50 b B	19,00		VF	15,00 b A	40,50 a A	27,75
	M	22,50 a A	17,50 a AB	20,00		M	24,00 a A	33,50 a A	28,75
	Média	27,00	17,00	-		Média	19,86	32,75	-
Deteriorados	S	3,00	8,50	5,75 a	Torpedo [*]	S	1,00	21,50	11,25 a
	VE	1,00	7,50	4,25 a		VE	0,50	17,50	9,00 a
	VF	7,50	8,00	7,75 a		VF	3,50	24,00	13,75 a
	M	3,00	10,50	6,75 a		M	1,50	22,00	11,75 a
	Média	3,63 B	8,63 A			Média	1,63 B	21,25 A	-

FONTE: A autora (2020).

NOTA: Média seguida por letras iguais, maiúscula na mesma linha e minúscula na mesma coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade; ¹ Interação estatística entre os fatores; * variável transformada por log (1+x).

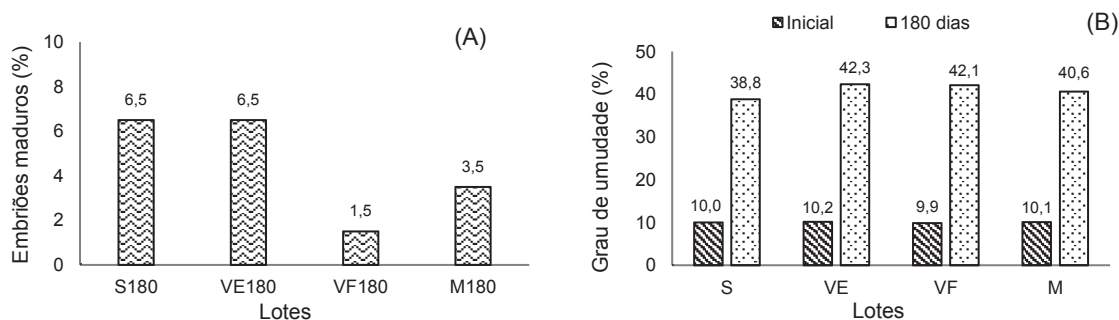
Inesperadamente, os lotes dos morfotipos verde escuro e fosco apresentaram as maiores médias de pirênios viáveis após 180 dias, significativamente superior ao observado para os pirênios frescos. Da mesma maneira, para os morfotipos verde escuro e fosco a porcentagem de pirênios inviáveis reduziu drasticamente, apresentando resultados significativamente inferiores aos observados nos pirênios frescos (TABELA 3.5). Com relação aos pirênios deteriorados, a avaliação inicial diferiu significativamente das demais, com menor porcentagem média (3,63%).

Aos 180 dias após a estratificação, observou-se 15,88% de embriões no estágio embrionário de coração, sendo essa média significativamente inferior a verificada para pirênios frescos. Com relação aos embriões em fase de pós-coração, os lotes dos morfotipos verde escuro e fosco, ambos na avaliação inicial,

apresentaram interação significativa, sendo as médias significativamente inferiores aos demais lotes e período. Para o estágio torpedo foram observados 21,25% de embriões nesta fase após 180 dias de estratificação, sendo a média significativamente superior a observada nos pirênios frescos (TABELA 3.5).

Embriões maduros foram observados em todos os lotes, entretanto, em baixas porcentagens (FIGURA 3.6A). Os morfotipos sassafrás e verde escuro apresentaram as maiores médias (ambas 6,5%), seguidos do lote mix (3,5%) e posteriormente verde fosco, com 1,5% dos embriões maduros. Com relação ao grau de umidade, os pirênios de todos os lotes apresentaram média de 10% de água, e transcorridos 180 dias de estratificação o morfotipos sassafrás apresentou 38,8%, verde escuro e verde fosco com aproximadamente 42% e o lote mix com 40% (FIGURA 3.6B).

FIGURA 3.6 - PORCENTAGEM MÉDIA DE EMBRIÕES MADUROS, AOS 180 DIAS (A), E GRAU DE UMIDADE INICIAL E AOS 180 DIAS (B) DE PIRÊNIOS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. SUBMETIDOS A ESTRATIFICAÇÃO CONVENCIONAL. S = SASSAFRÁS; VE = VERDE ESCURO; VF = VERDE FOSCO; M = MIX.



FONTE: A autora (2020).

3.3.4 Condutividade elétrica

A Tabela 3.6 apresenta os resultados de condutividade elétrica avaliados após 24 horas de imersão dos pirênios. A maior CE foi observada no tempo zero (pirênios frescos), sendo o verde fosco o lote com maior média ($62,27 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$), diferindo significativamente do lote do morfotipo sassafrás ($53,81 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$). Posteriormente, seguem as médias de CE dos lote mix e verde escuro ($49,3$ e $47,11 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$), não diferindo significativamente entre si e dos pirênios verde fosco submetidos a estratificação em câmara fria e substrato papel, aos 180 dias ($47,18 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$).

As menores médias de CE foram observadas nos pirênios do lote mix, submetidos a câmara seca, em substrato papel, aos 90 dias, seguidas pelos pirênios

em estratificação convencional, e aos submetidos a câmara seca, substrato areia, aos 90 e 180 dias, não diferindo significativamente entre si (TABELA 3.6).

TABELA 3.6 - CONDUTIVIDADE ELÉTRICA (CE), APÓS 24 HORAS, DE PIRÊNIOS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS, SUBSTRATOS E PERÍODOS DE ESTRATIFICAÇÃO CF = CÂMARA FRIA (5 °C); CS = CÂMARA SECA (15 °C).

Lote	Temperatura	Substrato	Tempo (dias)	CE ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$)
Sassafrás	-	-	0	53,81 b
	CF	Papel	90	26,28 f
			180	28,01 f
	Convencional	Areia	180	26,18 f
Verde escuro	-	-	0	47,11 c
	CF	Papel	90	26,24 f
			180	31,37 e
	Convencional	Areia	180	29,72 f
Verde fosco	-	-	0	62,27 a
	CF	Papel	90	31,44 e
			180	47,18 c
	Convencional	Areia	180	22,36 g
MIX	-	-	0	49,30 c
	CF	Papel	90	27,43 f
			180	33,59 d
		Areia	90	23,25 g
			180	23,40 g
	CS	Papel	90	20,34 h
			180	35,72 d
		Areia	90	17,16 h
180			18,55 h	
Convencional	Areia	180	19,19 h	

FONTE: A autora (2020).

3.4 DISCUSSÃO

Os resultados de viabilidade dos pirênios observados no presente estudo são considerados satisfatórios e muito promissores. Quando comparados aos valores iniciais de pirênios frescos, em todos experimentos e tratamentos, observa-se a tendência de estabilização das porcentagens médias de pirênios viáveis, independente do período de estratificação. Cabe destacar que a porcentagem média de pirênios degradados mantida abaixo de 10% também é considerada satisfatória

(CATAPAN, 1998, p. 60), demonstrando que houve controle adequado dos tratamentos.

As porcentagens de pirênios viáveis, acima de 60% em todos os tratamentos, são superiores aos encontrados em outras pesquisas. Catapan (1998, p. 55) observou média geral de 40,8% de embriões viáveis, em três épocas de coleta. Ao submeter pirênios frescos ao teste de tetrazólio, Galíndez et al. (2018, p. 03) obtiveram a porcentagem de 40% de viabilidade. Mireski et al. (2019, p. 1359) observaram viabilidade inicial de 66%, reduzindo para 50% após 49 dias de secagem em câmara fria e seca (25% UR e 10 °C).

Ainda, os resultados do presente estudo refletem a qualidade genética das sementes utilizadas, obtidas a partir da polinização aberta entre matrizes de diferentes progênies de várias procedências, conferindo uma provável alta taxa de cruzamento, associada aos tratos silviculturais aplicados na área produtora de sementes. Melhores resultados ainda podem ser obtidos a partir de polinização controlada, onde as sementes de erva-mate podem atingir cerca de 99% de viabilidade (SOUSA; AGUIAR; SPOLADORE, 2015, p. 315).

Os lotes dos morfotipos verde escuro e fosco apresentaram resultados inesperados, com maiores porcentagens de pirênios viáveis após a estratificação (TABELA 3.5). Teoricamente, a viabilidade deveria ser mantida constante ou até mesmo ser reduzida com o período de estratificação, quando comparada aos resultados iniciais. Um fator que pode ser considerado para esses resultados é a variabilidade genética das sementes. Mesmo com a homogeneização adequada dos lotes estudados, o teste de tetrazólio é uma avaliação destrutiva, sendo que os pirênios avaliados em cada período não são os mesmos. Desta maneira, não seria totalmente improvável observar resultados de viabilidade final superiores aos verificados nos pirênios frescos.

Outra perspectiva seria de que os pirênios expostos a estratificação convencional teriam o endocarpo e a semente como um todo mais amolecidos, por estarem em ambiente quente e úmido por 180 dias. Desta forma, a solução de tetrazólio a 1% poderia ter mascarado os resultados, por ser muito forte, colorindo de rosa até mesmo sementes inviáveis, sendo erroneamente avaliadas como viáveis. Não foram encontrados na literatura relatos semelhantes, tornando-se necessária a abordagem de uma metodologia diferenciada do teste de tetrazólio para pirênios estratificados em viveiro. Para estes casos, pode-se pensar em reduzir e/ou eliminar

a etapa de pré-condicionamento ou até mesmo reduzir a concentração inicial do tetrazólio.

Os teores de água observados nos pirênios permitem afirmar que não há impermeabilidade do endocarpo, pois ocorreu aumento no grau de umidade em todos os métodos de estratificação, comprovando a absorção da água pela semente (GALÍNDEZ et al., 2018, p. 04; MIRESKI et al., 2019, p. 1358). O estudo desenvolvido por Dolce; Mroginski; Rey (2010, p. 445), destaca que pirênios de *I. paraguariensis* intactos não germinam, enquanto nos pirênios seccionados ocorre germinação. Para os autores isso demonstra que o endocarpo forma apenas uma barreira mecânica, impedindo que os tecidos do embrião se expandam e o processo germinativo ocorra. Entretanto, Ferreira e Borghetti (2004, p. 106) questionam a atuação do endocarpo como restrição mecânica, sugerindo que quando há condições adequadas para o embrião maduro, não haveria impedimentos ao crescimento, e sim bloqueios fisiológicos que acompanham o embrião.

A erva-mate apresenta floração, frutificação e amadurecimento dos frutos irregulares (ZANON, 1988, p. 05). Com base nos resultados pode-se afirmar que o mesmo acontece com os estágios embrionários de suas sementes, visto que nos pirênios frescos foram observados embriões em praticamente todos os estágios, incluindo torpedo, fase que antecede a maturação embrionária. Niklas (1987, p. 51) relata que em frutos maduros de *I. paraguariensis* foram observados 2,6% de embriões em estágio embrionário globular, aproximadamente 70,2 e 23,6% em estágios de coração e pós-coração, respectivamente, seguidos de 2,6% em estágio de torpedo e menos de 1% dos embriões maduros, assemelhando-se com os resultados do presente estudo. Ferreira e Borghetti (2004, p. 112) atribuem essa heterogeneidade embrionária ao fato de que o bloqueio de desenvolvimento dos embriões em *lex* se dá em diferentes estágios durante a embriogênese.

Os resultados observados para desenvolvimento embrionário, nos métodos alternativos de estratificação, denotam grande potencial de aplicação. Inicialmente, no pirênios frescos, foram observados 24% de embriões viáveis em estágio de pós-coração, e após 90 dias, em câmara fria e em substrato papel, essa média subiu para 43% (TABELA 3.3). Esse comportamento indica que as baixas temperaturas associadas a umidade auxiliam no desenvolvimento embrionário da erva-mate, e esses tratamentos podem ser aplicados em conjunto com outros métodos a fim de acelerar e homogeneizar o processo de germinação das sementes. Ainda, esses

resultados aliados a manutenção da viabilidade ao longo dos tratamentos traz a possibilidade de manter pirênios em ambiente úmido e em desenvolvimento embrionário, obtendo-se diferentes lotes de semeadura, auxiliando no planejamento das atividades em viveiro.

Inúmeras espécies são favorecidas quanto à superação da dormência de suas sementes ao serem expostas a temperaturas relativamente baixas, geralmente na faixa de 1 a 15 °C (BEWLEY et al., 2013, p. 278). A aplicação de baixas temperaturas contribuiu para a manutenção da viabilidade e para o desenvolvimento embrionário das sementes de *I. paraguariensis* até o estágio de pós-coração (TABELA 3.3). Em função dos resultados promissores, é necessário investigar associações de tratamentos junto as baixas temperaturas, a fim de superar de maneira efetiva a dormência embrionária. Estudos relatam que os efeitos da estratificação a baixas temperaturas em sementes do gênero *Ilex* podem apresentar uma ampla variação (SANSBERRO; REY; MROGINSKI, 2000, p. 444; DOLCE; MROGINSKI; REY, 2010, p. 447; CHIEN et al., 2011, p. 163; DOLCE; MROGINSKI; REY, 2011, p. 278; TEZUKA et al., 2013, p. 352).

Para Galíndez et al. (2018, p. 08), em função das características de lento desenvolvimento embrionário, baixas porcentagens de germinação após 360 dias e a ausência de respostas ao ácido giberélico (GA₃), as sementes de erva-mate são incluídas na classe de espécies que apresentam profunda dormência morfofisiológica. Ainda, os autores não observaram desenvolvimento embrionário no frio, mas a alternância de temperatura de 25/15 °C promoveu crescimento lento. Além da dormência morfológica, o estudo desenvolvido por Mireski et al. (2018, p. 598) sugere a dormência fisiológica para *I. paraguariensis*, relacionando com a atuação de compostos fenólicos em suas sementes. Em contrapartida, Dolce; Mroginski; Rey (2010, p. 444) afirmam que o endosperma não inibe o desenvolvimento dos embriões de erva-mate, descartando a possibilidade da presença de inibidores.

De maneira geral, a resposta hormonal a exposição das sementes a baixas temperaturas é a redução do conteúdo endógeno de ácido abscísico (ABA) e aumento dos níveis de giberelinas (GA) e citocininas (CK), que interagem de maneira sequencial na superação da dormência (BEWLEY et al., 2013, p. 248; MARCOS-FILHO, 2015, p. 282). Além da redução do ABA, fisiologicamente, o frio parece desencadear reações de modo a induzir genes que codificam enzimas da biossíntese de giberelinas, que irão ativar GA's que estavam inativas (BEWLEY et al., 2013, p.

280). O frio pode ainda aumentar a sensibilidade aos fatores ambientais, como presença de luz, nitrato e a aplicação de giberelinas exógenas (BEWLEY et al., 2013, p. 279), desenvolvendo o embrião e promovendo a germinação. Contudo, as questões hormonais para sementes com embriões imaturos ainda não estão bem elucidadas.

Outras técnicas de estratificação para *I. paraguariensis* são observadas na literatura. Após a realização de vários tratamentos, Catapan (1998, p. 40) afirma que a temperatura é fator preponderante na germinação, observando porcentagens de germinação acima dos 50% com utilização de temperatura alternada (20-30 °C). No mesmo sentido, Cuquel; Carvalho; Chamma (1994, p. 420) obtiveram os melhores resultados de estratificação com alternância de luz e temperatura (35-15 °C), entretanto, as porcentagens de germinação ficaram abaixo dos 20% após o período de 6 meses.

No presente estudo, a estratificação convencional foi o único tratamento com a presença de embriões já maduros, após 180 dias. Além disso, não houve redução significativa da viabilidade, indicando que quando bem executada, essa técnica permite um bom percentual de germinação. Cabe destacar que durante a estratificação convencional as sementes passaram pelo período de inverno, havendo oscilação nas temperaturas, além da manutenção constante da umidade. De acordo com Medeiros et al. (1997, p. 420) outro fator importante na estratificação convencional é a presença de fungos, que podem auxiliar na degradação da celulose do endocarpo, melhorando as porcentagens de germinação.

A condutividade elétrica é inversamente proporcional à qualidade fisiológica das sementes, ou seja, os maiores valores de CE estão relacionados aos lotes de sementes de menor qualidade (BEWLEY et al., 2013, p. 144; MARCOS-FILHO, 2015, p. 627). Entretanto, no presente estudo observou-se maiores valores de CE para os pirênios frescos, sendo que a passagem pelos métodos de estratificação proporcionou valores menores. Dentre os fatores que influenciam no teste de CE estão o genótipo, a desestruturação das membranas, temperatura e tempo de embebição (MARCOS-FILHO, 2015, p. 627). Os elevados resultados de CE para os pirênios frescos estão possivelmente relacionados com a baixa integridade das membranas decorrente da imaturidade embrionária. O maior grau de estabilização das membranas se dá na maturação fisiológica das sementes (MARCOS-FILHO, 2015, p. 406), e para erva-mate isso irá ocorrer após o período de estratificação, explicando os resultados encontrados.

Diante dos resultados, enfatiza-se a necessidade de mais estudos voltados à superação e compreensão da dormência embrionária de *Ilex paraguariensis*. É importante que sejam determinadas alternativas para essa problemática, especialmente com objetivo de acelerar e uniformizar a germinação, proporcionando uma produção de mudas e consequente produto de melhor qualidade. Para tanto, recomenda-se estudos que combinem o uso de baixas temperaturas com a estratificação convencional. Ainda é importante destacar a similaridade entre os resultados observados para os morfotipos, especialmente nos experimentos 2 e 3, que pode ser atribuída a já mencionada heterogeneidade em todos os aspectos da reprodução da espécie.

3.5 CONCLUSÃO

A estratificação em temperaturas de 5 °C e 15 °C por 90 dias possibilitou o desenvolvimento embrionário em *Ilex paraguariensis* até o estágio de pós-coração. A estratificação convencional foi o único método que possibilitou embriões em estágio maduro. Os lotes estudados responderam de maneira semelhante aos métodos de estratificação e também apresentaram desenvolvimento embrionário semelhantes.

3.6 REFERÊNCIAS

BARZOTTO, I. L. M.; ALVES, L. F. A. Bioecologia e manejo de *Gyropsylla spegazziniana* em erva-mate. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 4, p. 457-464, 2013.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M.; NONOGAKI, H. **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy**. 3rd Edition, Springer, New York, 2013. 392 p.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination**: 2. viability, dormancy and environmental control. Berlin: Springer-Verlag, vol.2, 1982. 375 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399 p.

CATAPAN, M. I. S. **Influência da temperatura, substrato e luz na germinação de sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil.** 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1998.

CHIEN, C. T.; CHEN, S. Y.; CHIEN, T. Y.; BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. Nondeep simple morphophysiological dormancy in seeds of *Ilex maximowicziana* from northern (subtropical) and southern (tropical). **Ecological Research**, Taiwan, v. 26, n. 1, p. 163-171, 2011.

CUQUEL, F. L.; CARVALHO, M. L. M.; CHAMMA, H. M. C. P. Avaliação de métodos de estratificação para a quebra de dormência de sementes de erva-mate. **Scientia Agricola**, v. 51, n. 3, p. 415-421, 1994.

DANIEL, O. **Erva-mate: Sistema de produção e processamento industrial.** 1ª Ed. Dourados: UFGD, 2009.

DIAS, D. C. F. S; MARCOS-FILHO, J. Testes de condutividade elétrica para avaliação do vigor de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Scientia Agricola**, v. 53, n. 1, p. 31-42, 1996.

DOLCE, N. R.; MROGINSKI, L. A.; REY, H. Y. Endosperm and endocarp effects on the *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (Aquifoliaceae) seed germination. **Seed Science and Technology**, v. 38, n. 2, p. 441-448, 2010.

DOLCE, N. R.; MROGINSKI, L. A.; REY, H. Y. Enhanced seed germination of *Ilex dumosa* R. (Aquifoliaceae) through in vitro culture of cut pyrenes. **HortScience**, v. 46, n. 2, p. 278-281, 2011.

DUARTE, M. M.; MIRESKI, M. C.; OLISZESKI, A.; WENDLING, I.; STUEPP, C. A. Rooting of yerba mate cuttings with different lengths. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 5, n. 1, p. 05-11, 2019.

FERREIRA, A. G.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S.; CUNHA, G. G. Fisiocologia de *Ilex paraguariensis* com ênfase na embriologia experimental. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. A.; TARASCONI, L. C. **Erva-mate: biologia e cultura no Cone Sul.** Porto Alegre, Editora Universidade UFRGS, 1995. p. 161-172.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado.** Porto Alegre: Artmed, 2004. 323 p.

GALÍNDEZ, G.; CECCATO, D.; BUBILLO, R.; LINDOW-LÓPEZ, L.; MALAGRINA, G.; ORTEGA-BAES, P.; BASKIN, C. C. Three levels of simple morphophysiological dormancy in seeds of *Ilex* (Aquifoliaceae) species from Argentina. **Seed Science Research**, v. 28, n. 2, p. 131-139, 2018.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2 ed. Londrina, Paraná: ABRATES, 2015. 660 p.

MEDEIROS, A. C. S.; AMAZONAS, M. A. L. A.; GRIGOLETTI JUNIOR, A.; URBEN, A. F. Identificação de fungo lignocelulolítico em sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: I Congresso Sul-Americano da erva-mate; II Reunião Técnica do Cone Sul sobre a cultura da erva-mate, 1997, Curitiba, PR. **Anais...** 1997. p. 420.

MIRESKI, M. C.; BUHRER, C. B.; HELM, C. V.; WENDLING, I.; VIEIRA, E. S. N.; SANTOS, A. F.; NOGUEIRA, A. C. Polyphenols in yerba mate seeds: potential inhibitors of germination. **Floresta**, Curitiba, v. 48, n. 4, p. 593-600, 2018.

MIRESKI, M. C.; GUEDES, R. S.; WENDLING, I.; PEÑA, M. L. P.; MEDEIROS, A. C. S. Secagem na viabilidade e desenvolvimento embrionário de sementes de *Ilex paraguariensis*. **Ciência Florestal**, v. 29, n. 3, p. 1354-1362, 2019.

NIKLAS, C. O. Estudios embriológicos y citológicos em la yerba mate - *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). **Bonplandia**, v. 6, n. 1, p. 45-56, 1987.

PIRES, D. A. C. K.; PEDRASSANI, D.; DALLABRIDA, V. R.; BENEDETTI, E. L. A erva-mate no planalto norte catarinense: os compostos bioativos como variável na determinação das especificidades necessárias ao reconhecimento como indicação geográfica. **Desenvolvimento Regional em Debate**, v. 6, n. 2, p. 207-227, 2016.

RESENDE, M. D. V.; STURION, J. A.; MENDES, S. **Genética e melhoramento da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Curitiba: Embrapa-CNPQ, 1995. 33 p.

RIBEIRO, D. M.; BRAGANÇA, S. M.; GONELI, A. L. D.; DIAS, D. C. F. S.; ALVARENGA, E. M. Teste de condutividade elétrica para avaliar o vigor de sementes em milho-pipoca (*Zea mays* L.). **Revista Ceres**, v. 56, n. 6, p. 772-776, 2009.

SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A.; COLLAVINO, M. M. *In vitro* culture of rudimentary embryos of *Ilex paraguariensis*: responses to exogenous cytokinins. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 17, n. 2, p. 101-105, 1998.

SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y; MROGINSKI, L. A. (2000). Efectos de bajas temperaturas en la germinación in vitro de embriones inmaduros de yerba mate. In: II Congresso Sul-Americano da Erva-Mate e III Reunião Técnica da Erva-Mate, 2000, UFRGS and FEPAGRO, Porto Alegre, RS. **Anais...** 2000. p. 443-446.

SCHAPARINI, P. S.; VIECELLI, C. A. Superação de dormência de sementes de erva-mate. **Cultivando o Saber**, v. 4, n. 4, p. 163-170, 2011.

SOUSA, V. A.; AGUIAR, A. V.; SPOLADORE, J. Metodologia para a polinização controlada em *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. - Aquifoliaceae. **Revista Árvore**, v. 39, n. 2, p. 315-323, 2015.

TEZUKA, T.; YOKOYAMA, H.; HIDEYUKI, T.; SHIOZAKI, S.; ODA, M. Factors affecting seed germination of *Ilex latifolia* and *I. rotunda*. **HortScience**, v. 48, n. 3, p. 352-356, 2013.

WENDLING, I.; STURION, J. A.; REIS, C. A. F; STUEPP, C. A.; PEÑA, M. L. P. Indirect and expedite assessment of *Ilex paraguariensis* commercial yield. **Cerne**, v. 22, n. 3, p. 241-248, 2016.

WENDLING, I.; STURION, J. A.; STUEPP, C. A.; REIS, C. A. F.; RAMALHO, M. A. P.; RESENDE, M. D. V. Early selection and classification of yerba mate progenies. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, n. 3, p. 279-286, 2018.

ZANON, A. Produção de sementes de erva-mate. Curitiba, EMBRAPA-CNPQ, 1988. 08 p. (Circular técnica n° 17).

CAPÍTULO III

4 VARIAÇÃO SAZONAL DE COMPOSTOS BIOATIVOS E DO ENRAIZAMENTO EM GENÓTIPOS DE ERVA-MATE

RESUMO

Ilex paraguariensis é uma espécie de grande importância ecológica, cultural, econômica e social para a região sul do Brasil. O consumo da erva-mate traz inúmeros benefícios à saúde humana, e a crescente demanda por esse produto é atrelada à necessidade de renovação e implantação de novos ervais, com base em materiais genéticos selecionados, a fim de proporcionar maior produtividade dos plantios e maior qualidade do produto final. Assim, objetivou-se avaliar a influência da sazonalidade e de genótipos nos teores de compostos bioativos e no enraizamento de estacas, bem como a correlação entre esses compostos na rizogênese de *Ilex paraguariensis*. Para tanto, foram estudados 19 genótipos nas quatro estações do ano. Os experimentos de enraizamento utilizaram estacas tratadas com 6000 mg.L⁻¹ de ácido indolbutírico, em casa de vegetação. Após 100 dias foram avaliados a porcentagem de enraizamento, número de raízes por estaca, porcentagem de emissão de novos brotos e porcentagem de estacas com folhas originais. Para as análises químicas foram utilizadas folhas maduras de cada genótipo, sendo analisados a capacidade antioxidante via radicais ABTS e DPPH, teores de compostos fenólicos, metilxantinas e ácidos cafeoilquínicos, a partir de extrato aquoso. A análise estatística foi realizada a partir dos Modelos Lineares Generalizados e os genótipos que apresentaram enraizamento igual ou superior a 70% foram submetidos a testes de comparação de médias. Utilizou-se a correlação de Pearson para verificar a influência dos compostos químicos no enraizamento das estacas. O potencial de enraizamento e os teores de compostos bioativos apresentaram variação entre os genótipos e entre as épocas do ano. Os compostos bioativos estudados não apresentaram correlação com o enraizamento das estacas. Os genótipos estudados mostraram comportamentos diferenciados em relação ao enraizamento das estacas, obtendo-se oito com médias acima de 70% em pelo menos uma época do ano. Com relação à cafeína, os genótipos EC38, EC40 e EC53 apresentaram os teores mais elevados, enquanto EC19, EC22 as menores médias desse composto. De maneira geral, primavera e verão proporcionaram as maiores porcentagens de enraizamento e também os maiores teores de cafeína. Os resultados do presente estudo indicam a potencialidade de implantação de ervais com clones que atendam demandas específicas de determinados produtos e aplicações potenciais, bem como a programação de melhores épocas de colheita para propagação ou para obtenção de determinado perfil químico.

Palavras-chave: Clonagem. *Ilex paraguariensis*. Melhoramento genético. Metilxantinas. Teores de cafeína.

ABSTRACT

Ilex paraguariensis is a species of great ecological, cultural, economic and social importance for Brazil's southern region. The consumption of yerba mate brings a human health benefits, and the growing demand for this product is linked to the need

for recovery and implantation of new areas, based on selected genetic materials, in order to provide greater plantations productivity and higher final product quality. Thus, we evaluated the influence of seasonality and genotypes in bioactive compounds and cuttings rooting, as well as the correlation between these compounds in *Ilex paraguariensis* rhizogenesis. Therefore, 19 genotypes were studied for rooting potential and chemical composition in four seasons. Rooting experiments used cuttings treated with 6000 mg.L⁻¹ of indolebutyric acid, placed in a greenhouse. After 100 days were evaluated rooting percentage, number of roots per cutting, emission of new shoots percentage and original leaves maintenance percentage. For chemical analyses, mature leaves of each genotype were used, being analyzed the antioxidant capacity via ABTS and DPPH radicals, phenolic compounds, methylxanthines and caffeoylquinic acids by aqueous extract. Statistical analysis was performed by Generalized Linear Models and genotypes that showed rooting equal to or greater than 70% were subjected to means comparison tests. Pearson's correlation was used to verify the influence of chemical compounds on cuttings rooting. Rooting potential and bioactive compounds contents varied between genotypes and between seasons. Bioactive compounds studied did not correlate with cuttings rooting. Genotypes showed different potential in relation to cuttings rooting, and eight genotypes showed averages above 70% in at least one time of the year. Regarding caffeine, genotypes EC38, EC40 and EC53 had the highest levels, while EC19, EC22 the lowest levels of this compound. In general, spring and summer provided the highest percentages of rooting and levels of caffeine. The present results indicated the potential for implanting areas with clones that meet specific demands for certain products and potential applications, as well as the scheduling of better harvest times for propagation or obtaining a certain chemical profile.

Keywords: Cloning. *Ilex paraguariensis*. Breeding. Methylxanthines. Caffeine content.

4.1 INTRODUÇÃO

A silvicultura da erva-mate impulsiona a economia de muitos municípios do Sul do Brasil, sendo em 2018 responsável por uma área plantada de 72 mil hectares, com mais de 540 mil toneladas de folhas verdes colhidas (IBGE, 2019). Somando-se áreas plantadas e de extrativismo, a erva-mate torna-se o principal produto não madeireiro na Região Sul, e seu potencial econômico, social e ecológico gera emprego e renda, especialmente para pequenos e médios produtores rurais (MOSELE; RODIGHERI; PENTEADO JUNIOR, 1994, p. 07).

Além do tradicional consumo como chimarrão, tererê e chá mate, *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. vem se destacando no cenário mundial com múltiplos usos, como no setor culinário e de suplementos, farmacológico, fitoterápicos e cosmético (HECK; DE MEJIA, 2007, p. 138; BARZOTTO; ALVES, 2013, p. 458; GODOY et al., 2013, p. 801; ALKHATIB; ATCHESON, 2017, p. 882; BARBOZA; CAZAL, 2018, p. 01). O potencial de utilização da espécie provém da gama de compostos químicos e

bioativos presentes nas suas folhas, como metilxantinas, saponinas, minerais, ácidos fenólicos e seus derivados (HECK; DE MEJIA, 2007, p. 140), que apresentam inúmeros benefícios à saúde humana.

A importância econômica aliada à crescente demanda e potencialidades da espécie têm proporcionado um novo ciclo de crescimento na cultura da erva-mate, fazendo com que haja maior preocupação com relação aos plantios, buscando atender as expectativas de produtividade e do padrão de qualidade exigidos pelo mercado mundial. Para atingir esses objetivos é indispensável a utilização de mudas de elevado padrão genético, obtidas a partir de seleção de genótipos superiores, além da qualidade fisiológica e sanitária, que irão contribuir para maior produtividade e melhor perfil da matéria-prima a ser produzida (DUARTE et al., 2019, p. 06).

A formação ou renovação dos ervais ainda se dá em grande parte por mudas provenientes de propagação sexuada, entretanto, a dormência embrionária das sementes de *I. paraguariensis* torna a germinação lenta e irregular (SANSBERRO et al., 1998, p. 101; MIRESKI et al., 2019, p. 1358b), fator que pode resultar em heterogeneidade e baixa qualidade dos plantios (DIAS et al., 2012, p. 454; WENDLING; SANTIN, 2015, p. 24). Contudo, essas limitações podem ser minimizadas ou até mesmo extintas por meio da produção de mudas clonais de indivíduos geneticamente superiores (BRONDANI et al., 2009, p. 42). A propagação vegetativa, especialmente pelas técnicas de estaquia e miniestaquia, tem se mostrado promissora para erva-mate, como demonstram os estudos de Santin et al. (2015, p. 571), Sturion; Stuepp; Wendling (2017, p. 492), Stuepp et al. (2017a, p. 01; 2017b, p. 1409) e Duarte et al. (2019, p. 05).

Estaquia e miniestaquia visam atender os objetivos da silvicultura clonal, proporcionando plantios homogêneos, de maior produtividade e com material genético selecionado (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009, p. 13). Dentre as características que podem ser alvo de seleção para a erva-mate estão a qualidade da bebida, em função da composição química das plantas, produtividade e persistência foliar, arquitetura de copa e resistência a pragas (STURION; RESENDE, 2010, p. 58; PIRES et al., 2011, p. 289; WENDLING; SANTIN, 2015, p. 36). O sucesso da estaquia e miniestaquia para erva-mate está relacionado a diversos fatores, destacando-se o material genético, a idade e sexo das plantas matrizes (WENDLING; SANTIN, 2015, p. 26), além de fatores ambientais (NORBERTO et al., 2001, p. 534), sendo que o principal empecilho está relacionado a variação de enraizamento entre as plantas matrizes.

Dentre os fatores intrínsecos ao genótipo, os reguladores de crescimento e outros grupos químicos exercem influência direta e indireta na formação de raízes adventícias, como as auxinas, giberelinas, citocininas, etileno, ácido abscísico e compostos fenólicos, além de cofatores de enraizamento (ALFENAS et al., 2009, p. 41; HARTMANN et al., 2011, p. 295). Dentre as características de interesse em *I. paraguariensis* está a gama de compostos químicos, presentes especialmente em suas folhas, entretanto, pouco se conhece sobre a variação dessas substâncias nos genótipos e da influência que podem exercer no processo de enraizamento das estacas. A sazonalidade ainda tem se apresentado como fator relevante, com influência tanto no processo de enraizamento (FACHINELLO; HOFFMANN; NACHTIGAL, 2005, p. 81; HARTMANN et al., 2011, p. 315; STUEPP et al., 2015, p. 524; SÁ et al., 2018, p. 1434), quanto na composição química da erva-mate (COELHO; ATHAYDE; SCHENKEL, 2001, p. 155; SCHUBERT et al., 2006, p. 1235).

A clonagem, por sua vez, além de uma alternativa para obtenção de mudas, é indispensável para o melhoramento e conservação, sendo primordial para o resgate de genótipos adultos selecionados em campo (BRONDANI et al., 2009, p. 42). Na busca por um estilo de vida mais saudável e por alimentos funcionais, a erva-mate se destaca por ser matéria-prima potencial, e a seleção de genótipos com determinado perfil químico, aliados à técnica de clonagem, pode permitir a implantação de ervais que forneçam produtos diferenciados e de maior valor agregado (WENDLING et al., 2004, p. 35). Dentre os inúmeros compostos bioativos, a cafeína se destaca por ser um composto estimulante do sistema nervoso central, e seu consumo moderado traz inúmeros benefícios à saúde (TFOUNI et al., 2018, p. 661; VALDUGA et al., 2019, p. 480), sendo alvo de interesse para mercados específicos.

A cafeína apresenta elevada herdabilidade, sendo possível que essa característica seja trabalhada com sucesso no melhoramento genético (SCHERER et al., 2002, p. 208; STURION et al., 2004, p. 13; NAKAMURA et al., 2009, p. 120). Desta maneira, torna-se importante selecionar materiais genéticos diferenciados, que possam fornecer produtos específicos e também propágulos para produção de mudas. A partir disso é possível planejar a formação de ervais para produtos preestabelecidos, como chimarrão mais suave ou mais amargo, chás descafeinados ou até mesmo produção isolada desses compostos. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da sazonalidade e de genótipos nos

teores de compostos bioativos e no enraizamento de estacas, bem como a correlação destes compostos com a rizogênese de *Ilex paraguariensis*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Coleta do material vegetal

A área de coleta está localizada em um teste de procedências e progênes, no município de Ivaí, Paraná, Brasil (25°01'S, 50°47'W e 650-750 m altitude) (WENDLING et al., 2016, p. 242). Foram selecionados 19 genótipos (TABELA 4.1), com aproximadamente 23 anos de idade, sendo o material vegetal coletado no final de cada estação, nas datas: 26/09/18 (inverno), 13/12/18 (primavera), 14/03/19 (verão) e 19/06/19 (outono).

TABELA 4.1 - IDENTIFICAÇÃO DOS GENÓTIPOS E CLASSIFICAÇÃO QUANTO AO TEOR DE CAFEÍNA.

Genótipo	Código	Teor de cafeína
1	EC18	Baixo
2	EC19	Descafeinado
3	EC21	Médio
4	EC22	Descafeinado
5	EC24	Alto
6	EC25	Alto
7	EC26	Médio
8	EC28	Alto
9	EC30	Baixo
10	EC32	Médio
11	EC33	Alto
12	EC36	Alto
13	EC38	Alto
14	EC40	Alto
15	EC43	Alto
16	EC45	Alto
17	EC51	Baixo
18	EC53	Alto
19	EC65	Alto

FONTE: A autora (2020).

As matrizes foram selecionadas pela produtividade e pelos teores de cafeína, baseando-se em estudos prévios (HELM et al., 2015, p. 01), na normativa Anvisa - RDC N° 277, de 22 de setembro de 2005 (BRASIL, 2005): produtos descafeinados podem apresentar máximo de 0,1% de cafeína ($\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$) e de acordo com Schuhli; Pentead Junior; Wendling (2019, p. 20). Assim, foram considerados neste estudo: alta cafeína - genótipos com teores superiores a 1,6% ($16 \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$); média cafeína –

genótipos entre 1,0 e 1,5% (10 a 15 mg.g⁻¹); baixa cafeína: 0,20 a 0,99% (2 a 9,99 mg.g⁻¹) e descafeinados: menor que 0,1% (1 mg.g⁻¹).

4.2.2 Estaquia

Foram coletadas brotações semilenhosas, do terço superior e em toda a circunferência da copa (altura média de 1,5 m), sendo o material acondicionado em caixas de isopor contendo água e gelo e transportados até o local da instalação do experimento. As estacas foram preparadas com 12 ± 1 cm, com corte em bisel na base e reto acima da última gema, mantendo-se um par de folhas na porção terminal, reduzidas pela metade.

Após o preparo, as estacas foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 0,5% por 10 minutos e, posteriormente, lavadas em água corrente por 5 minutos e então imersas em fungicida Bendazol® (1 mL.L⁻¹), por 10 minutos. As bases das estacas foram tratadas com solução hidroalcoólica (50% v/v) de 6000 mg.L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB), por 10 segundos. As estacas foram plantadas em caixas de polietileno com fundo perfurado, contendo vermiculita de granulometria média como substrato. Os experimentos foram mantidos em casa de vegetação com nebulização intermitente por 15 segundos a cada 6 a 10 minutos (80% de umidade relativa e temperatura entre 20-30 °C).

Transcorridos 100 dias da instalação, foram avaliados: porcentagem de enraizamento (estacas com raízes de no mínimo 2 mm de comprimento); número de raízes por estaca; porcentagem de emissão de novos brotos (brotações com no mínimo 5 mm de comprimento); e porcentagem de estacas que mantiveram as folhas originais. Os experimentos de estaquia foram realizados no Laboratório de Propagação de Espécies Florestais da Embrapa Florestas.

4.2.3 Compostos bioativos

4.2.3.1 Preparo do extrato

Folhas maduras, livres de injúrias, em toda a circunferência da copa foram coletadas, armazenadas em sacos de papel craft, colocadas para congelar em ultra freezer (-80 °C) e posteriormente liofilizadas a -40 °C por 72 horas. Posteriormente,

as amostras foram trituradas até a obtenção de pó fino e homogêneo. Para a correção da massa utilizada nas análises químicas, o grau de umidade das amostras foi determinado em triplicada, com secagem em estufa a 105 °C até peso constante.

O extrato aquoso foi preparado a partir de 10 mg de amostra moída e 2 ml de água ultrapura e agitado em vórtex por 30 segundos. Os tubos contendo as amostras foram acondicionados em equipamento Thermomixer® e a extração realizada a 60 °C e 300 rpm por 1 hora e posterior filtragem em filtro de nylon de 0,22 µm. A partir do extrato foram determinados o teor de compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante via radical ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) e radical DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazil), metilxantinas (cafeína e teobromina) e ácidos cafeoilquínicos. As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia da Universidade Federal do Paraná e no Laboratório de Tecnologia de Produtos Não Madeiráveis da Embrapa Florestas.

4.2.3.2 Capacidade antioxidante (radicais ABTS e DPPH)

A determinação da capacidade antioxidante do extrato via radical ABTS seguiu as metodologias de Re et al. (1999, p. 1233) e Yim et al. (2013, p. 277), com modificações. Inicialmente, a reação de 10 mL de ABTS (7 mmol.L⁻¹) com 176 µL de persulfato de potássio (140 mmol.L⁻¹) foi mantida por 16 horas no escuro. Em seguida, 1 mL dessa solução foi adicionada em tampão de acetato de sódio (80 mmol.L⁻¹; pH 4,5), sendo a absorbância da solução ajustada para 0,70 ± 0,05. A alíquota de 3 mL da solução ajustada foi adicionada a 30 µL de extrato. As amostras foram mantidas no escuro por 2 horas, em temperatura ambiente e as absorbâncias tomadas em espectrofotômetro a 734 nm.

A capacidade antioxidante do extrato via radical livre DPPH foi determinada pela metodologia de Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995, p. 26), com modificações. Utilizou-se 0,1 mL de extrato diluído em 3,9 mL de solução metanólica de DPPH (0,06 mmol.L⁻¹) (ajustada para absorbância de 0,50 ± 0,05), mantidas por 30 minutos no escuro e em temperatura ambiente. Posteriormente, as absorbâncias foram tomadas em espectrofotômetro a 515 nm.

As curvas analíticas foram obtidas com Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), entre as concentrações de 0 a 2500 µmol.L⁻¹ (R² = 0,9896) para a conversão da absorbância do sequestro de radicais ABTS e entre as

concentrações entre 0 e 1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ($R^2 = 0,9868$) para a conversão da absorbância do sequestro de radicais DPPH. Os resultados foram expressos em μmol de Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox por grama de amostra seca ($\mu\text{molTEAC.g}^{-1}$).

4.2.3.3 Compostos fenólicos totais

Seguiu-se metodologia espectrofotométrica Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965, p. 144), com modificações. Em balão volumétrico foram adicionados 0,1 mL de extrato, 6 mL de água destilada e 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu, agitando-se por 1 minuto. Após, adicionou-se 2 mL de solução aquosa de Na_2CO_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 ácido gálico (ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzóico) entre as concentrações de 0,25 e 13 mg.L^{-1} ($R^2 = 0,9988$) e os resultados expressos em mg Equivalentes ao Ácido Gálico por grama de amostra seca (mgEAG.g^{-1}).

4.2.3.4 Metilxantinas e ácidos cafeoilquínicos

Foram quantificados a partir de 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, \varnothing 5 μm), com pré-coluna Shim-Pack CLC G-ODS® (10 x 4,0 mm, \varnothing 5 μm), ambos Shimadzu®. As condições de separação dos compostos presentes no extrato aquoso (20 μL de injeção) foram: 30 °C com fluxo de 0,5 mL.min^{-1} de eluente com a fase móvel A (H_2O :ácido acético Alphatec® - 99,9:0,1 v/v) e B (acetonitrila Merck® - 100%). O comprimento de onda utilizado para detecção do composto foi 280 nm (fixo). O programa de eluição com gradiente foi: 0-15 min (3% B), 15-20 min (3-20% B), 20-40 min (20% B), 40-45 min (20-30% B), 45-55 min (30-100% B), 55-75 min (100% B), 75-80 min (100-3% B) e 80-95 min (3% B).

A identificação e quantificação das metilxantinas cafeína (1,3,7-trimetilxantina) e teobromina (3,7-dimetilxantina) foi realizada a partir de curvas

analíticas obtidas com padrões Sigma[®], entre as concentrações de 0 a 1,0 mg.mL⁻¹ ($R^2 = 0,9933$) e de 0 a 0,5 mg.mL⁻¹ ($R^2 = 0,9827$) para cafeína e teobromina, respectivamente. A identificação dos ácidos cafeoilquínicos (ácido 3-cafeoilquínico (3-CQA), ácido 4-cafeoilquínico (4-CQA), ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA)) também foi realizada com padrão Sigma[®] e a semi quantificação foi obtida a partir de curva analítica entre as concentrações de 0 e 10 mg.mL⁻¹ de 3-CQA ($R^2 = 0,9914$). Os resultados foram expressos em mg de composto por grama de amostra (mg.g⁻¹), em base seca.

4.2.4 Análise estatística

O experimento de estaquia seguiu um delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições de 10 estacas, em esquema fatorial duplo (19 genótipos e 4 estações do ano). As análises de capacidade antioxidante, compostos fenólicos totais, metilxantinas e ácidos cafeoilquínicos foram realizadas em triplicatas para cada genótipo, também em esquema fatorial duplo. Para verificar a tendência de comportamento geral entre os 19 genótipos nas quatro estações do ano, para as variáveis relacionadas ao enraizamento e de composição química, foram utilizados os Modelos Lineares Generalizados.

Posteriormente, em função da grande variabilidade dos dados, e baseando-se na literatura (BITENCOURT et al., 2009, p. 278; STUEPP et al., 2017b, p. 03; DUARTE et al., 2019, p. 08), as matrizes que apresentaram enraizamento igual ou superior a 70%, em pelo menos uma época do ano, foram submetidas novamente aos Modelos Lineares Generalizados e comparação múltipla entre os tratamentos por contrastes ortogonais, pelo teste de Tukey ao nível de 5%, para as variáveis que permitiram ajuste dentro da distribuição gaussiana (porcentagem de enraizamento, número de raízes, emissão de brotos e manutenção de folhas) e gama (capacidade antioxidante via radicais ABTS e DPPH e compostos fenólicos totais). As variáveis teor de cafeína e de teobromina foram analisadas utilizando-se o teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$) e teste de Fisher (*post-hoc*) para comparação das médias (para cada fator individualmente).

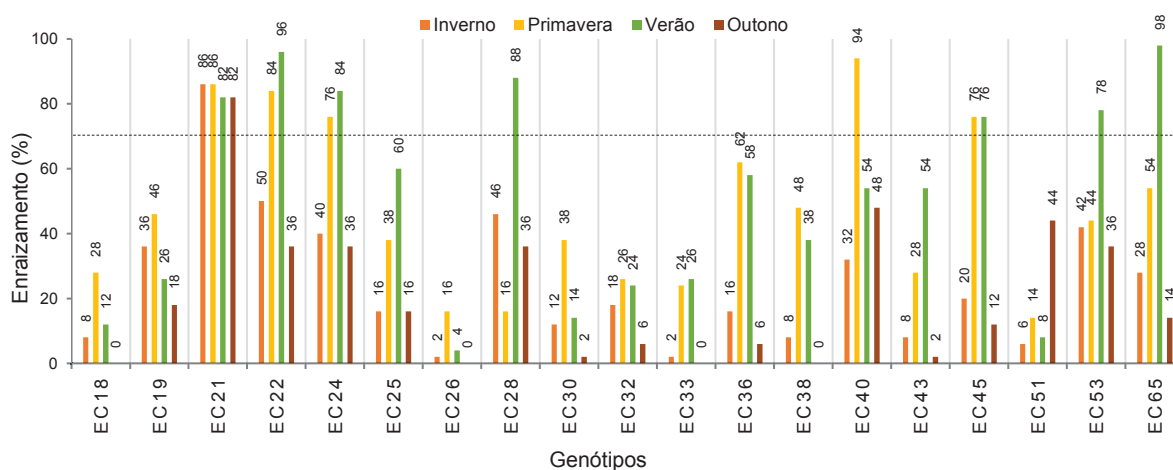
Para verificar as relações entre as variáveis estudadas para estaquia e para os compostos bioativos, realizou-se a análise de correlação de Pearson ($p < 0,05$). Utilizou-se como classificação o sistema de Shimakura (2006, p.71), atribuindo-se os valores qualitativos aos valores numéricos do coeficiente de correlação de Pearson

(r), onde: $r = |0,00|$ a $|0,19|$ - correlação bem fraca; $r = |0,20|$ a $|0,39|$ - correlação fraca; $r = |0,40|$ a $|0,69|$ - correlação moderada; $r = |0,70|$ a $|0,89|$ - correlação forte; $r = |0,90|$ a $|1,00|$ - correlação muito forte.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as variáveis estudadas, relacionadas ao enraizamento e aos compostos bioativos, apresentaram interação significativa entre os fatores genótipos e estação do ano, exceto para a variável teobromina, que apresentou diferenças somente entre os genótipos. Houve variação no comportamento rizogênico entre e dentro dos genótipos, em todas as épocas do ano estudadas (FIGURA 4.1). De maneira geral, a porcentagem de enraizamento variou de 0 a 98%, independente da estação, sendo o mesmo comportamento já relatado por Tavares; Picheth; Maschio (1992, p. 627). Apenas o genótipo EC21 apresentou enraizamento superior a 70% em todas as épocas do ano. De maneira geral, as matrizes EC18, EC26, EC32, EC33, obtiveram as médias de enraizamento mais baixas, não atingindo 30% em nenhuma das coletas.

FIGURA 4.1 - PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO AO LONGO DAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO EM 19 GENÓTIPOS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.



FONTE: A autora (2020).

Estudos de estaquia para erva-mate realizados na última década reportam porcentagens de enraizamento variadas, independente dos métodos de obtenção dos propágulos. Bitencourt et al. (2009, p. 278) obtiveram maiores porcentagens de enraizamento em estacas provenientes de rebrota (65,5%) quando comparadas as

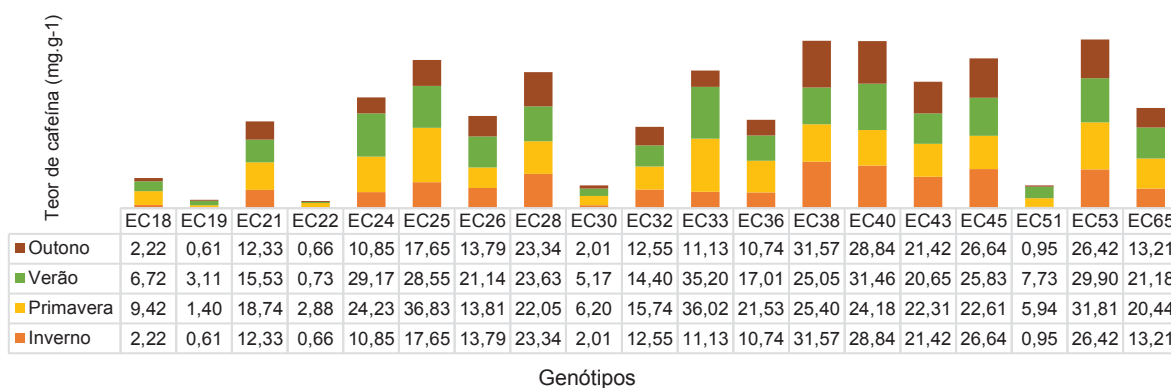
brotações do ano coletadas da copa (8,5%). Nascimento et al. (2018, p. 245) obtiveram 37% de enraizamento em estacas provenientes de brotações epicórmicas e 26% com utilização de brotos da copa das árvores. Stuepp et al. (2017b, p. 03), utilizando brotações da copa das árvores, obtiveram percentual de enraizamento entre 0 e 87,5%. Duarte et al. (2019, p. 08) observaram variação de 22,5 a 86,2% de enraizamento em estacas obtidas após cinco meses de poda drástica das matrizes. No mesmo sentido, Stuepp et al. (2017a, p. 1411) encontraram valores médios de 52,5 e 88,7% de enraizamento em estacas provenientes de decepa e anelamento, respectivamente. Esses resultados corroboram com os obtidos no presente estudo e confirmam a potencialidade da estaquia para erva-mate.

Os resultados evidenciam que a estação do ano exerce papel fundamental para o enraizamento via estaquia, sendo que primavera e verão resultaram em maiores porcentagens de estacas enraizadas, até mesmo para as matrizes com menor potencial rizogênico, exceto para EC51 que obteve maior enraizamento no outono (FIGURA 4.1). De acordo com Fachinello; Hoffmann; Nachtigal (2005, p. 81) e Hartmann et al. (2011, p. 315) a influência da estação do ano no sucesso da estaquia está relacionada a consistência das brotações utilizadas. Para os autores, as estacas coletadas em período de crescimento vegetativo intenso (primavera e verão) são mais herbáceas, potencializando a capacidade de enraizamento, enquanto brotações coletadas no inverno apresentam maior grau de lignificação e a tendência de menor taxas de enraizamento, fato confirmado no presente estudo.

Wendling; Santin (2015, p. 29) relatam que a idade das plantas também é fator crítico para o enraizamento da erva-mate, em função da baixa juvenildade das brotações de plantas mais velhas, indicando técnicas de rejuvenescimento e, ou revigoração para obtenção de melhores resultados. Entretanto, apesar do erval utilizado no presente estudo ter sido implantado a mais de duas décadas, muitas plantas matrizes respondem satisfatoriamente ao enraizamento, sugerindo que neste caso, o material genético apresentou maior influência no sucesso na rizogênese da espécie do que a maturidade da planta. Além disso, as matrizes sofrem podas bianuais, mantendo-se a copa rebaixada, fornecendo propágulos mais juvenis. No mesmo sentido, Stuepp et al. (2017a, p. 1411) obtiveram enraizamento acima de 50% em propágulos oriundos de matrizes com 80 anos. Duarte et al. (2019, p. 09) também destacam o potencial de enraizamento e a efetividade de utilização de material adulto (>50 anos) para propagação vegetativa da espécie.

Com relação aos teores de cafeína, também foi possível verificar que a sazonalidade afeta diretamente seu conteúdo, havendo variação significativa entre e dentro dos 19 genótipos avaliados (FIGURA 4.2). Os valores variaram de próximos de 0 mg.g⁻¹ (descafeinados) até próximos de 37 mg.g⁻¹, consideradas genótipos com elevados teores de cafeína, e de maneira geral, primavera e verão resultaram em maior conteúdo desse composto (FIGURA 4.2). A variação genotípica observada para os teores de cafeína e a alta herdabilidade dessa característica (SCHERER et al., 2002, p. 208; STURION et al., 2004, p. 13), permite a seleção de indivíduos com diferentes perfis fitoquímicos, possibilitando mercados e produtos diferenciados a partir dessas plantas. De acordo com Kadu et al. (2012, p. 73) o conhecimento da variação dos compostos químicos entre indivíduos facilita a seleção e auxilia na adoção de estratégias de melhoramento genético.

FIGURA 4.2 - TEORES DE CAFEÍNA AO LONGO DAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO EM 19 GENÓTIPOS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.



FONTE: A autora (2020).

Ainda são poucos os estudos que relatam a cafeína como alvo do melhoramento genético da erva-mate, mas os resultados observados na literatura para esse e outros compostos, indicam a possibilidade de ganhos genéticos com a seleção de genótipos (SCHERER et al., 2002, p. 208; STURION et al., 2004, p. 13; NAKAMURA et al., 2009, p. 120; CARDOZO JUNIOR et al., 2010, p. 176). A cafeína fornece produtos estimulantes, e o seu consumo está associado a resistência física, redução da fadiga e aumento da atenção e concentração mental (HECKMAN; WEIL; DE MEJIA, 2010, p. 77). Por outro lado, consumo de produtos cafeinados é contraindicado em casos de doenças cardiovasculares graves, úlceras, tensão nervosa e insônia (CASSEL et al., 2010, p. 656) e a busca por produtos com baixos

teores ou até mesmo descafeinados, tem sido cada vez mais frequente. Assim, conhecer o perfil de compostos de interesse de cada genótipo traz a possibilidade de implantação de ervais selecionados, a fim de desenvolver produtos que atendam públicos mais específicos.

Dentre os 19 genótipos estudados, oito apresentam enraizamento considerado satisfatório a nível comercial, acima de 70% (demonstrado na linha de corte na FIGURA 4.1), e poderiam ser utilizados de imediato para propagação vegetativa. Em contrapartida, as matrizes que apresentam menores taxas de enraizamento podem ser alvo de mais estudos, a partir de soluções simples como utilização de diferentes concentrações de auxinas, maior período no leito de enraizamento, tamanho de estacas, substratos e posição de coleta na planta, entre outras (BRONDANI et al., 2009, p. 41; WENDLING et al., 2013, p. 117; STUEPP et al., 2017a, p. 01; DUARTE et al., 2019, p. 09). Entretanto, cabe salientar que os resultados demonstram a viabilidade da estaquia para propagação vegetativa da erva-mate e que o investimento em pesquisa e adequação da técnica tende a alcançar resultados ainda mais expressivos, visto que a técnica de miniestaquia, teoricamente mais eficiente pelo maior vigor dos propágulos, tem apresentado resultados semelhantes aos de estaquia (BRONDANI et al., 2007, p. 257; BRONDANI et al., 2008, p. 29; KRATZ et al., 2015, p. 609; SÁ et al., 2018, p. 1431; PIMENTEL et al., 2019, p. 559).

Em caso de plantas de extremo interesse comercial e de difícil enraizamento, como os genótipos EC18, EC19, EC30 e EC51 por apresentarem reduzidos teores de cafeína, e os genótipos EC25 e EC38 por apresentarem elevados teores, pode-se aplicar outras técnicas de resgate vegetativo, como podas drásticas, decepa total ou de galhos, anelamento e até mesmo enxertia (WENDLING; SANTIN, 2015, p. 37; STUEPP et al., 2018, p. 986; DUARTE et al., 2019, p. 09). Essas técnicas visam reestabelecer a juvenilidade e/ou o vigor de plantas que já se encontram na fase adulta, recuperando a competência das células com relação ao seu poder de totipotência (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009, p. 47), reestabelecendo condições fisiológicas e bioquímicas, melhorando assim a capacidade de enraizamento (WENDLING; TRUEMAN; XAVIER, 2014, p. 481).

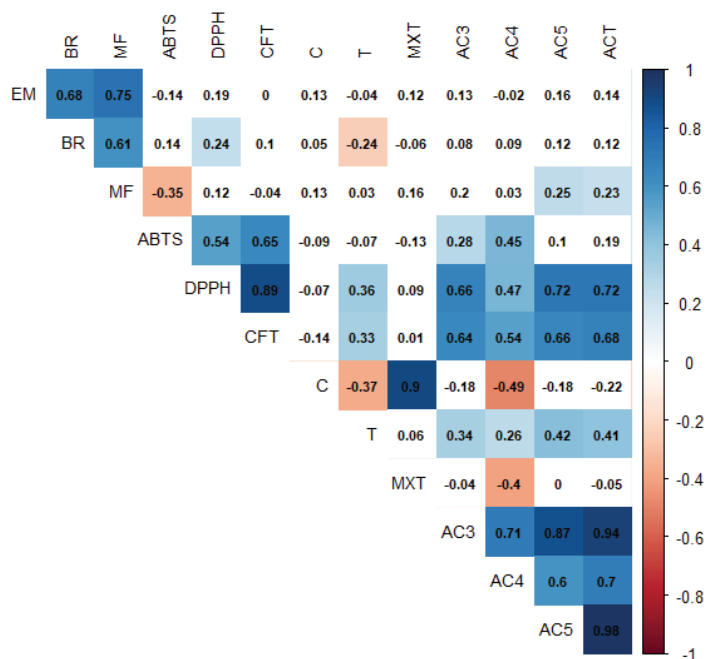
Vários são os fatores que controlam ou estão atrelados ao potencial de enraizamento das espécies, destacando-se especialmente a presença de substâncias químicas endógenas. Na classe dos reguladores de crescimento, o balanço hormonal

entre auxinas, giberelinas e citocininas exerce grande influência na rizogênese (FACHINELLO; HOFFMANN; NACHTIGAL, 2005, p. 82; ALFENAS et al., 2009, p. 41). Ainda, os chamados cofatores de enraizamento, são compostos que atuam na estabilização das auxinas, auxiliando na promoção e formação das raízes adventícias, como por exemplo, os compostos fenólicos (ALFENAS et al., 2009, p. 42). Em contrapartida, Fachinello; Hoffmann; Nachtigal (2005, p. 82) ressaltam que a oxidação de fenólicos compostos nos propágulos pode dificultar o enraizamento. Apesar do largo conhecimento sobre os compostos de interesse para erva-mate, pouco se sabe sobre a influência desses na propagação vegetativa da espécie.

A matriz de correlação de Pearson (FIGURA 4.3) demonstra não haver correlação entre os dois grupos de variáveis estudadas (enraizamento e compostos bioativos). Contudo, há correlações de moderadas a muito fortes entre as variáveis de cada grupo. O enraizamento se correlaciona de maneira positiva, significativa e de moderada a forte com a emissão de brotos ($p = 0,68$) e a manutenção das folhas originais nas estacas ($p = 0,75$). A variável enraizamento não apresentou qualquer correlação com os compostos químicos, destacando a correlação nula com compostos fenólicos totais, indicando que a presença destes não exerce influência sobre o processo rizogênico dos genótipos estudados.

Existem diferentes classes de compostos fenólicos, e dentro disso Lee; Starratt; Jevnikar (1982, p. 517) ressaltam que monofenóis e m-difenóis estimulam a oxidação da auxina endógena, enquanto o-difenóis, p-difenóis e polifenóis inibem essa reação, agindo diretamente no processo de formação de raízes. Entretanto, nenhum indício de atuação dos fenólicos totais no enraizamento foi observada no presente estudo. Sá (2018, p. 102) também não observou correlação entre enraizamento e compostos fenólicos totais em miniestaquia de erva-mate, entretanto, a autora salienta que isso não indica por si só, que esses compostos não afetam o desenvolvimento radicial, pois a atuação destes pode ocorrer de maneira associada a outros compostos.

FIGURA 4.3 - CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE ENRAIZAMENTO (EM), BROTAÇÃO (BR), MANUTENÇÃO DE FOLHAS (MF), CAPACIDADE ANTIOXIDANTE (RADICAIS ABTS E DPPH), COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT), CAFEÍNA (C), TEOBROMINA (T), METILXANTINAS TOTAIS (MXT), ÁCIDO-3-CAFEIOLQUÍNICO (AC3), ÁCIDO-4-CAFEIOLQUÍNICO (AC4), ÁCIDO-5-CAFEIOLQUÍNICO (AC5) E ÁCIDOS CAFEIOLQUÍNICOS TOTAIS (ACT) PARA 19 GENÓTIPOS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.



FONTE: A autora (2020).

NOTA: Valores de correlação sinalizados com cor apresentam significância ao nível de 5% (azul: correlação positiva; vermelho: correlação negativa).

A capacidade antioxidante presente na erva-mate também não influenciou no processo de formação de raízes, bem como as metilxantinas e os ácidos cafeoilquínicos (FIGURA 4.3). O consumo desses compostos em produtos oriundos de *I. paraguariensis* traz inúmeros benefícios a saúde mental (HECKMAN; WEIL; DE MEJIA, 2010, p. 77) e a ausência de correlação entre os compostos químicos e a rizogênese pode ser considerada como um aspecto positivo para as questões de produção de mudas. Esses resultados indicam que possivelmente a presença desses compostos, sejam em elevadas ou reduzidas quantidades, não são um empecilho para a propagação vegetativa via estaquia, e o baixo potencial de enraizamento observado em alguns genótipos não está associado a esses compostos.

Além das características de interesse, para produção de mudas em escala comercial, são necessários materiais genéticos que apresentem elevadas taxas de multiplicação ao longo de todo o ano, sendo essas associadas a altas porcentagens de enraizamento adventício (PIMENTEL et al., 2019, p. 560), tornando importante a identificação de matrizes que respondam satisfatoriamente a essas condições. Neste

sentido, com base em resultados de enraizamento para propagação vegetativa da erva-mate, via estaquia, observados na literatura, pode-se afirmar que os genótipos EC21, EC22, EC24, EC28, EC40, EC45, EC53 e EC65 (FIGURA 4.1; TABELA 4.2) apresentam elevado potencial para propagação massal. No presente estudo, para as variáveis porcentagem de enraizamento, número de raízes, emissão de brotações e manutenção de folhas houve interação significativa entre genótipos e épocas do ano (TABELA 4.2).

TABELA 4.2 - PORCENTAGEM MÉDIA DE ENRAIZAMENTO, NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES, EMISSÃO DE NOVAS BROTAÇÕES E MANUTENÇÃO DE FOLHAS EM ESTAQUIA DE OITO GENÓTIPOS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. EM QUATRO ÉPOCAS DO ANO.

Genótipo	Época do ano			
	Inverno	Primavera	Verão	Outono
Enraizamento (%)				
EC21	86,0 a A	86,0 a A	82,0 ab A	82,0 a A
EC22	50,0 ab BC	84,0 ab AB	96,0 a A	36,0 b C
EC24	40,0 b BC	76,0 ab AB	84,0 ab A	36,0 b C
EC28	46,0 b B	16,0 d C	88,0 a A	36,0 b BC
EC40	32,0 b B	94,0 a A	54,0 b B	48,0 ab B
EC45	20,0 b B	76,0 ab A	76,0 ab A	12,0 b B
EC53	42,0 b B	44,0 cd B	78,0 ab A	36,0 b BC
EC65	28,0 b C	54,0 bc B	98,0 a A	14,0 b C
Número de raízes				
EC21	12,1 a AB	16,1 ab A	8,1 ab B	7,2 ab B
EC22	8,1 a BC	18,7 ab A	12,4 a AB	5,0 ac C
EC24	8,9 a A	13,3 ab A	8,8 ab A	3,1 ac B
EC28	10,6 a A	1,4 c C	7,9 ab AB	4,1 ac BC
EC40	9,5 a AB	15,1 ab A	12,1 ab AB	8,5 a B
EC45	12,1 a A	9,8 b A	7,6 b AB	1,4 c B
EC53	9,8 a B	18,2 a A	9,8 ab B	7,8 a B
EC65	6,1 a B	17,3 a A	8,0 ab B	1,8 bc C
Brotação (%)				
EC21	98,0 a A	58,0 a B	88,0 a A	16,0 bc C
EC22	58,0 bc AB	44,0 ab AB	64,0 ab A	26,0 ac B
EC24	70,0 ab A	54,0 ab A	84,0 ab A	2,0 c B
EC28	40,0 bc A	38,0 ab A	50,0 ab A	30,0 ab A
EC40	28,0 c A	44,0 ab AB	50,0 ab A	52,0 a A
EC45	28,0 c BC	58,0 a AB	88,0 a A	10,0 bc C
EC53	32,0 bc AB	14,0 b B	42,0 b A	16,0 bc AB
EC65	36,0 bc B	36,0 ab B	78,0 ab A	28,0 ac B
Manutenção de folhas (%)				
EC21	76,0 a A	88,0 a A	92,0 ab A	90,0 a A
EC22	68,0 ab A	92,0 a AB	96,0 ab A	66,0 abc B
EC24	42,0 ab C	86,0 a B	98,0 a AB	100,0 a A
EC28	22,0 cd B	80,0 a A	74,0 ab A	34,0 cd B
EC40	20,0 cd C	86,0 a A	58,0 b AB	40,0 bd BC
EC45	0,0 d C	72,0 ab AB	94,0 ab A	46,0 bd B
EC53	14,0 cd B	38,0 b B	72,0 ab A	22,0 d B
EC65	14,0 cd C	56,0 ab B	98,0 a A	74,0 ab B

FONTE: A autora (2020).

NOTA: Média seguida por letras iguais, maiúscula na mesma linha e minúscula na mesma coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

De maneira geral, o processo de formação de raízes adventícias foi favorecido nas coletas de primavera e verão, com as maiores médias para todos os genótipos. Dentre esses, EC21 se destaca por manter médias acima de 80% de enraizamento em todas as épocas do ano, EC22 e EC24 expressam os melhores resultados na primavera e no verão. Alguns materiais genéticos apresentam maiores porcentagens de enraizamento em determinada época do ano, como EC40 na primavera (94%) e EC65 no verão (98%), reduzindo drasticamente o enraizamento nas outras estações (TABELA 4.2). Esses resultados reforçam a ideia de que o sucesso da propagação vegetativa de erva-mate está intimamente atrelado ao material genético utilizado, à época de estaquia e de coleta do material. Cabe ressaltar que, de maneira geral, estudos de miniestaquia com estes genótipos poderão gerar resultados melhores para todos os genótipos tendo em vista um melhor controle ambiental e nutricional das minicepas (WENDLING; SANTIN, 2015, p. 48).

Sá et al. (2018, p. 1434) observaram taxas de enraizamento acima de 68% em miniestacas colhidas na primavera. De acordo com os autores, as plantas podem ter acumulado reservas nas estações mais frias do ano, que foram disponibilizadas na primavera, contribuindo para a iniciação radicial. Stuepp et al. (2015, p. 524) obtiveram 85% de enraizamento em estacas provenientes de decepa de matrizes de 80 anos, no período de verão, reduzindo-se para 46,2% nas brotações de inverno. De acordo com Xavier; Wendling; Silva (2009, p. 111) observou-se menor enraizamento no inverno e outono pela redução do metabolismo com as baixas temperaturas, não proporcionando as condições adequadas para indução, desenvolvimento e crescimento radicial nas estacas.

Apesar da porcentagem de enraizamento ser a principal variável levada em consideração para a seleção dos genótipos propagados, há outras variáveis de importância e que são indispensáveis para a produção de mudas de qualidade, como o número de raízes produzidos pela estaca, a emissão de brotações e a manutenção das folhas originais. O número de raízes demonstra, sobretudo, o potencial de crescimento que a nova planta terá, pois de nada adianta uma estaca enraizar, mas não apresentar um sistema radicial bem formado e passível de sustentar a nova planta. Assim, de maneira geral, pode-se afirmar que a primavera proporcionou estacas com maior número de raízes, exceto para as matrizes EC28 e EC45. Ainda, as estacas de outono apresentaram os menores número de raízes.

Em contexto geral, as médias de emissão de brotos foram superiores no verão. Com relação à manutenção de folhas originais, as estacas da primavera e do verão apresentaram as maiores médias, exceto para EC24, que apresentou 100% de estacas brotadas no outono. A tendência dessas duas variáveis corrobora com as médias observadas para porcentagem de enraizamento, e confirmam as fortes correlações positivas observadas entre as mesmas (FIGURA 4.3). Fisiologicamente, a emissão de novos brotos pode estar correlacionada com o balanço auxina/citocininas, que quando em concentrações adequadas favorecem o enraizamento, entretanto, quando citocinina se encontra em altas concentrações pode inibir a iniciação da formação das raízes (ALFENAS et al., 2009, p. 42).

O processo rizogênico é favorecido pela manutenção de folhas nas estacas, pois fornecem carboidratos e hormônios indispensáveis para o enraizamento (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009, p. 94; HARTMANN et al., 2011, p. 301). Assim, a perda precoce das folhas cessa o transporte de substâncias favoráveis ao enraizamento para a base das estacas (MIRESKI et al., 2019a, p. 620), o que, possivelmente esteja relacionado às menores taxas de enraizamento observadas no inverno e outono. Os carboidratos fornecidos pelas folhas são fonte de energia disponível para a síntese de outras substâncias essenciais na indução de raízes adventícias (HARTMANN et al., 2011, p. 313), podendo favorecer o efeito das auxinas, hormônios diretamente relacionados à emissão de raízes (WIESMAN; LAVEE, 1995, p. 189).

Para as variáveis capacidade antioxidante via radical ABTS e radical DPPH e teores de compostos fenólicos totais houve interação entre os fatores genótipos e época do ano (TABELA 4.3). A capacidade antioxidante via radical ABTS foi significativamente superior no inverno para todos os genótipos. Já para o radical DPPH houve grande variação tanto entre os genótipos quanto entre as épocas do ano. De maneira geral, para ambos testes de capacidade antioxidante, EC40 e EC53 se destacam com as maiores médias entre os demais genótipos, entretanto sem diferir significativamente de EC22 e EC65 na primavera. Esses resultados podem ser aplicados como ferramenta de seleção para obtenção de plantas com maiores valores nutricionais (VALDUGA et al., 2016, p. 119).

TABELA 4.3 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE (RADICAIS ABTS E DPPH) E TEORES DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DE OITO GENÓTIPOS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. EM QUATRO ÉPOCAS DO ANO.

Genótipo	Época do ano			
	Inverno	Primavera	Verão	Outono
ABTS ($\mu\text{molTEAC.g}^{-1}$)				
EC21	939,0 bc A	384,1 bc C	501,2 ac B	332,7 cd C
EC22	960,8 bc A	498,7 a B	440,5 cd BC	398,0 bc C
EC24	883,3 c A	378,9 c C	558,3 ab B	308,1 ce D
EC28	992,2 bc A	368,4 c B	399,4 de B	273,5 de C
EC40	1253,3 a A	544,2 a B	582,0 a B	665,1 a B
EC45	915,6 bc A	479,2 ab B	443,8 cd B	459,7 b B
EC53	1120,9 ab A	547,4 a BC	488,3 bc C	633,1 a B
EC65	851,3 c A	551,5 a B	366,7 e C	239,0 e D
DPPH ($\mu\text{molTEAC.g}^{-1}$)				
EC21	313,3 cd AB	288,9 c AB	344,7 ad A	255,8 b B
EC22	354,0 bc A	422,0 ab A	356,1 abc A	231,4 b B
EC24	272,6 d B	359,9 bc A	364,7 ab A	117,0 e C
EC28	330,4 bd A	285,8 c AB	258,8 d B	154,2 cd C
EC40	525,8 a A	449,5 ab A	450,3 a A	340,8 a B
EC45	295,2 cd B	388,0 ab A	267,1 cd B	168,8 c C
EC53	407,7 b AB	454,1 ab A	384,7 ab B	134,5 de C
EC65	258,7 d B	481,8 a A	292,9 bd B	96,6 f C
Compostos Fenólicos Totais (mgEAG.g^{-1})				
EC21	46,1 b A	43,2 a A	44,7 a A	33,8 b B
EC22	51,0 b A	52,1 a A	44,8 a AB	38,9 b B
EC24	44,1 bc A	46,2 a A	40,9 ab AB	35,5 b B
EC28	48,9 b A	42,7 a B	37,1 b C	33,7 b C
EC40	63,6 a A	53,9 a AB	46,5 a B	46,5 a B
EC45	45,2 b A	47,3 a A	36,5 b B	37,0 b B
EC53	52,0 b A	53,1 a A	41,0 ab B	37,9 b B
EC65	37,6 c B	52,2 a A	34,4 b B	34,4 b B

FONTE: A autora (2020).

NOTA: Média seguida por letras iguais, maiúscula na mesma linha e minúscula na mesma coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

De maneira geral, os teores de compostos fenólicos totais foram maiores nas coletas de inverno e primavera, percebendo-se poucas diferenças entre genótipos dentro de cada época estudada. Novamente a matriz EC40 se destaca com as maiores médias para essa variável, sendo significativamente superior às demais para as coletas de inverno e outono (TABELA 4.3). A presença de compostos fenólicos em produtos fabricados a partir da erva-mate traz vários benefícios à saúde, como a ação anti-inflamatória, antialérgica e até mesmo a inibição de tumores (HECK; DE MEJIA, 2007, p. 138; CHAICOUSKI et al., 2014, p. 34; CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016, p. 442). A partir da correlação positiva significativa observada entre compostos fenólicos totais e ABTS ($p = 0,65$) e DPPH ($p = 0,89$) pode-se atribuir grande parte da ação antioxidante da espécie a essa gama de compostos fenólicos encontrados, especialmente pela classe dos ácidos clorogênicos (RIACHI; DE MARIA, 2017, p. 309).

As variáveis cafeína e teobromina totais não apresentaram interação entre os fatores, entretanto, há diferença significativa dentro dos fatores genótipo e época do ano (TABELA 4.4). As maiores médias de cafeína foram observadas para EC53, no outono ($34,47 \text{ mg.g}^{-1}$) e primavera ($31,81 \text{ mg.g}^{-1}$), seguido de EC40, no verão ($31,46 \text{ mg.g}^{-1}$) e inverno ($28,84 \text{ mg.g}^{-1}$), respectivamente. O genótipo EC22 demonstrou os menores teores desse composto em todas as épocas estudadas (TABELA 4.4). Em contrapartida, EC22 apresentou médias significativamente superiores de teobromina em todas as épocas do ano, enquanto EC24 e EC65, no inverno e outono, e EC21 no inverno, apresentaram teores indetectáveis desse composto.

TABELA 4.4 - TEORES DE CAFEÍNA E TEOBROMINA DE OITO GENÓTIPOS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. EM QUATRO ÉPOCAS DO ANO.

Genótipo	Época do ano			
	Inverno	Primavera	Verão	Outono
Cafeína* (mg.g^{-1})				
EC21	12,33 e C	18,74 d A	15,53 f B	19,43 e A
EC22	0,66 g B	2,88 e A	0,73 g B	0,02 g C
EC24	10,85 f D	24,23 b B	29,17 b A	19,54 e C
EC28	23,34 c A	22,05 c B	23,63 d A	21,74 d B
EC40	28,84 a B	24,18 b D	31,46 a A	25,61 c C
EC45	26,64 b B	22,61 c C	25,83 c B	30,14 b A
EC53	26,42 b D	31,81 a B	29,90 b C	34,47 a A
EC65	13,21 d C	20,44 d A	21,18 e A	18,27 f B
Teobromina* (mg.g^{-1})				
EC21	0,00 e C	1,84 d A	1,36 d B	1,65 f A
EC22	2,88 a C	7,59 a B	7,26 a B	8,53 a A
EC24	0,00 e C	2,40 cd A	1,42 d B	0,00 g C
EC28	1,55 cd D	3,81 a A	2,92 c B	2,58 e C
EC40	2,33 ab C	3,57 b A	3,34 b A	2,76 d B
EC45	1,25 d D	2,77 c C	3,16 b B	3,32 c A
EC53	1,74 bc D	3,72 b B	3,01 c C	4,59 b A
EC65	0,00 e C	3,62 b A	0,09 e B	0,00 g C

FONTE: A autora (2020).

NOTA: Média seguida por letras iguais, maiúscula na mesma linha e minúscula na mesma coluna, não diferem significativamente entre si; * Teste de Kruskal Wallis.

O estudo desenvolvido por Schubert et al. (2006, p.1235) ressalta diferenças nos teores de metilxantinas para *I. paraguariensis*, afirmando que o conteúdo total desses compostos é maior nos meses de verão, reduzindo-se nos meses de inverno. Da mesma maneira, Coelho; Athayde; Schenkel (2001, p. 155) observaram maiores teores de cafeína e teobromina em amostras coletadas no verão quando comparadas às coletadas no início da primavera, embora ambos os estudos não tenham sido realizados com clones. Entretanto, não é possível afirmar que a mesma tendência aconteceu no presente trabalho, visto que cada clone apresentou comportamento diferenciado nas diferentes épocas de coleta, ressaltando que este é o primeiro estudo

a avaliar os mesmos genótipos (clones) em diferentes épocas do ano quanto ao conteúdo de compostos bioativos. Ainda, de acordo com Cardozo Junior et al. (2010, p. 175), a variação nos conteúdos de cafeína e teobromina pode ser explorada de maneira satisfatória em programas de melhoramento genético.

Os resultados observados para a teobromina podem ser explicados pela principal rota de biossíntese da cafeína para *I. paraguariensis* (YIN; KATAHIRA; ASHIHARA, 2015, p. 709), sendo a teobromina seu precursor direto. Assim, os teores de teobromina observados no presente estudo, por exemplo, para EC22 poderiam tanto estar disponíveis para transformação em cafeína, como ser resultado do catabolismo, ou seja, da quebra da cafeína. Em contrapartida, os valores nulos (0,00 mg.g⁻¹), observados para EC21, EC24 e EC65, estão relacionados com teores tão baixos que a análise cromatográfica não conseguiu detectar (TABELA 4.4). Ainda, cabe destacar que houve correlação negativa e significativa entre cafeína e teobromina ($p = -0,37$) (FIGURA 4.3), sendo o mesmo comportamento observado por Nakamura et al. (2009, p. 121) e Cardozo Junior et al. (2010, p. 174), que destacam a síntese de cafeína e teobromina como responsáveis por essa correlação inversa.

Os resultados tanto de enraizamento quanto compostos químicos do presente estudo indicam a potencialidade de implantação de ervais com clones que atendam demandas específicas de determinados produtos e aplicações potenciais, bem como a programação de melhores épocas de colheita para propagação ou para obtenção de determinado perfil químico. Especialmente relacionado aos teores de cafeína, pode-se pensar em produtos com elevado poder energético e estimulantes, bem como produtos alternativos, com baixos teores desse composto, atingindo públicos que tenham algum problema associado ao consumo de cafeína ou prefiram produtos mais suaves (HECKMAN; WEIL; DE MEJIA, 2010, p. 81; VALDUGA et al., 2019, p. 481). Ainda, de acordo com Nakamura et al. (2009, p. 121), genótipos como EC38, EC40 e EC53, que apresentaram elevados teores de cafeína em todas as épocas do ano, podem ser fonte de matéria-prima para a purificação destes compostos e utilização terapêutica.

4.4 CONCLUSÃO

Os compostos bioativos e o poder rizogênico de estacas foram influenciados pelo genótipo e pela época do ano. Primavera e verão proporcionaram maiores

porcentagens de enraizamento e maiores teores de cafeína. Não houve correlação entre compostos químicos e a rizogênese das estacas. Os genótipos estudados apresentam potencial para propagação vegetativa e como matéria-prima para produtos diferenciados.

4.5 REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MARIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e Doenças do Eucalipto**. 2ª ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2009.

ALKHATIB, A.; ATCHESON, R. Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) metabolic, satiety and mood state effects at rest and during prolonged exercise. **Nutrients**, v. 9, n. 8, p. 882-896, 2017.

BARBOZA, H. C.; CAZAL, M. M. Avaliação da influência de características sensoriais e do conhecimento nutricional na aceitação do chá-mate. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, p. 01-06, 2018.

BARZOTTO, I. L. M.; ALVES, L. F. A. Bioecologia e manejo de *Gyropsylla spegazziniana* em erva-mate. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 4, p. 457-464, 2013.

BITENCOURT, J.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; WENDLING, I.; KOEHLER, H. S. Enraizamento de estacas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hill.) provenientes de brotações rejuvenescidas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 277-281, 2009.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel - Wissenschaft und -Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N° 277 de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2005.

BRONDANI, G. E.; ARAUJO, M. A.; WENDLING, I.; KRATZ, D. Enraizamento de miniestacas de erva-mate sob diferentes ambientes. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 57, p. 29-38, 2008.

BRONDANI, G. E.; WENDLING, I.; ARAÚJO, M. A.; SANTIN, D.; BENEDETTI, E. L.; ROVEDA, L. F. Composições de substratos e ambientes de enraizamento na estaquia de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. **Floresta**, v. 39, n. 1, p. 41-49, 2009.

BRONDANI, G. E.; WENDLING, I.; SANTIN, D.; BENEDETTI, E. L.; ROVEDA, L. F.; ORRUTÉA, A. G. Ambientes de enraizamento e substratos na miniestquia da erva-mate. **Scientia Agraria**, v. 8, n. 3, p. 257-267, 2007.

CARDOZO JUNIOR, E. L.; DONADUZZI, C. M.; FERRARESE-FILHO, O.; FRIEDRICH, J. C.; GONELA, A.; STURION, J. A. Quantitative genetic analysis of methylxanthines and phenolic compounds in mate progenies. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 2, p. 171-177, 2010.

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.

CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F.; BRUN, G. W.; ALMEIDA, D. E.; COGOI, L.; FERRARO, G.; FILIP, R. Supercritical fluid extraction of alkaloids from *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Journal of Food Engineering**, v. 100, n. 4, p. 656-661, 2010.

CHAICOUSKI, A.; SILVA, J. E.; TRINDADE, J. L. F.; CANTERI, M. H. G. Determinação da quantidade de compostos fenólicos totais presentes em extratos líquido e seco de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 16, n. 1, p. 33-41, 2014.

COELHO, G. C.; ATHAYDE, M. L.; SCHENKEL, E. P. Methylxanthines of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. var. *vestita* Loes. and var. *paraguariensis*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 2, p. 153-158, 2001.

DIAS, P. C.; OLIVEIRA, L. S.; XAVIER, A.; WENDLING, I. Estquia e miniestquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 32, p. 72, p. 453-462, 2012.

DUARTE, M. M.; MIRESKI, M. C.; OLISZESKI, A.; WENDLING, I.; STUEPP, C. A. Rooting of yerba mate cuttings with different lengths. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 5, n. 1, p. 05-11, 2019.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: EMBRAPA, 2005. 221p.

GODOY, R. C. B.; DELIZA, R.; GHENO, L. B.; LICODIEDOFF, S.; FRIZON, C. N. T.; RABANI, R. H.; SANTIS, G. G. Consumer perceptions, attitudes and acceptance of new and traditional mate tea products. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 801-807, 2013.

HARTMANN, H. T.; KERSTER, D. E.; DAVIES JR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: principles and practices**. 9th ed. Boston: Prentice Hal. 2011. 1024 p.

HECK, C.; DE MEJIA, E. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, health implications and technological considerations. *Journal of Food Science*, v.72, n.9, p.138-151, 2007.

HECKMAN, M. A.; WEIL, J.; DE 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, C. V.; RUIZ, H. Z.; HANSEL, F. A.; STUEPP, C. A.; WENDLING, I. **Efeito do solvente na extração de teobromina e cafeína em progênies de erva-mate**. Colombo: Embrapa Florestas, 2015, 6 p. (Comunicado Técnico, 363).

IBGE. **Produção Agrícola Municipal – PAM 2018**. Rio de Janeiro, 2019.

KADU, C. A. C.; PARICH, A.; SCHUELER, S.; KONRAD, H.; MULUVI, G. M.; EYOG-MATIG, O.; MUCHUGI, A.; WILLIAMS, V. L.; RAMAMONJISOA, L.; KAPINGA, C.; FOAHOM, B.; KATSVANGA, C.; HAFASHIMANA, D.; OBAMA, C.; VINCETI, B.; SCHUMACHER, R.; GEBUREKA, T. Bioactive constituents in *Prunus africana*: geographical variation throughout Africa and associations with environmental and genetic parameters. **Phytochemistry**, v. 83, p. 70-78, 2012.

KRATZ, D.; PIRES, P. P.; STUEPP, C. A.; WENDLING, I. Produção de mudas de erva-mate por miniestaquia em substratos renováveis. **Floresta**, v. 45, n. 3, p. 609-616, 2015.

LEE, T. T.; STARRATT, A. N.; JEVNIKAR, J. J. Regulation of enzymic oxidation of indole-3-acetic acid by phenols: Structure-activity relationships. **Phytochemistry**, v. 21, n. 3, p. 517–523, 1982.

MIRESKI, M. C.; DUARTE, M. M.; STUEPP, C. A.; WENDLING, I. Rooting of *Ficus enormis* mini-cuttings with different lengths. **Floresta**, v. 49, n. 4, p. 615-622, 2019a.

MIRESKI, M. C.; GUEDES, R. S.; WENDLING, I.; PEÑA, M. L. P.; MEDEIROS, A. C. S. Secagem na viabilidade e desenvolvimento embrionário de sementes de *Ilex paraguariensis*. **Ciência Florestal**, v. 29, n. 3, p. 1354-1362, 2019b.

MOSELE, S. H.; RODIGHERI, H. R.; PENTEADO JUNIOR, J. Diagnóstico da erva-mate na região do Alto Uruguai gaúcho. **Perspectiva**, v. 18, n. 64, p. 7-17, 1994.

NAKAMURA, K. L.; CARDOZO JUNIOR, E. L.; DONADUZZI, C. M.; SCHUSTER, I. Genetic variation of phytochemical compounds in progenies of *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Crop Breeding Applied Biotech**, v. 9, p. 116-123, 2009.

NASCIMENTO, B.; SÁ, A. C. S.; LEMOS, L. B.; ROSA, D. P.; PEREIRA, M. O.; NAVROSKI, M. C. Three epicormic shoot techniques in *I. paraguariensis* mother trees and its cutting according to the material rejuvenation degree. **Cerne**, v. 24, n. 3, p. 240-248, 2018.

NORBERTO, P. M.; CHALFUN, N. N. J.; PASQUAL, M.; VEIGA, R. D.; PEREIRA, G. E.; MOTA, J. H. Efeito da época de estaquia e do AIB no enraizamento de estacas de figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 3, p. 533-54, 2001.

PIMENTEL, N.; LENCINA, K. H.; KIELSE, P.; RODRIGUES, M. B.; SOMAVILLA, T. M.; BISOGNIN, D. A. Produtividade de minicepas e enraizamento de miniestacas de clones de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). **Ciência Florestal**, v. 29, n. 2, p. 559-570, 2019.

PIRES, E. L.; RESENDE, M. D. V.; SILVA, R. S.; RESENDE, M. F. R. Jr. **Genética florestal**. Viçosa, MG: Arka, 2011. 318p.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231-1237, 1999.

RIACHI, L. G.; DE MARIA, C. A. B. Yerba mate: An overview of physiological effects in humans. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 308-320, 2017.

SÁ, F. P. ***Ilex paraguariensis* A.St.-Hil: miniestaquia, caracterização anatômica e bioquímica e, estimativa do enraizamento por espectroscopia NIR**. 143 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Produção Vegetal) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2018.

SÁ, F. P.; PORTES, D. C.; WENDLING, I.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Minicutting technique of yerba mate in four seasons of the year. **Ciência Florestal**, v. 28, n. 4, p. 1431-1442, 2018.

SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A.; COLLAVINO, M. M. *In vitro* culture of rudimentary embryos of *Ilex paraguariensis*: responses to exogenous cytokinins. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 17, n. 2, p. 101-105, 1998.

SANTIN, D.; WENDLING, I.; BENEDETTI, E. L.; MORANDI, D.; DOMINGOS, D. M. Sobrevivência, crescimento e produtividade de plantas de erva-mate produzidas por miniestacas juvenis e por sementes. **Ciencia Florestal**, v. 25, n. 3, p. 571-579, 2015.

SCHERER, R.; URFER, P.; MAYOL, M. R.; BELINGHERI, L. D.; MARX, F.; JANSSENS, M. J. J. Inheritance studies of caffeine and theobromine content of Mate (*Ilex paraguariensis*) in Misiones, Argentina. **Euphytica**, v. 126, n. 2, p. 203-210, 2002.

SCHUBERT, A.; ZANIN, F. F.; PEREIRA, D. F.; ATHAYDE, M. L. Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* A. St. - Hil. (erva-mate) em Ijuí e Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1233-1236, 2006.

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. (Documentos, 333).

SHIMAKURA, S. **Correlação**. In: CE003 - Estatística II. Paraná: Departamento de Estatística da Universidade Federal do Paraná, 2006. 71-78 p. Disponível em: <<http://leg.ufpr.br/~paulojus/CE003/ce003/node8.html>>. Acesso em 14 de fevereiro de 2020.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

STUEPP, C. A.; BITENCOURT, J.; WENDLING, I. KOEHLER, H. S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Age of stock plants, seasons and iba effect on vegetative propagation of *Ilex paraguariensis*. **Revista Arvore**, v. 41, n. 2, p.01-07, 2017a.

STUEPP, C. A.; BITENCOURT, J.; WENDLING, I.; KOEHLER, H. S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Métodos de resgate e idades cronológicas de plantas-matrizes no

enraizamento de brotações epicórmicas de *Ilex paraguariensis*. **Ciência Florestal**, v. 27, n. 4, p. 1409-1413, 2017b.

STUEPP, C. A.; DE BITENCOURT, J.; WENDLING, I.; KOEHLER, H. S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Propagação de erva-mate utilizando brotações de anelamento e decepa em matrizes de duas idades. **Cerne**, v. 21, n. 4, p. 519-526, 2015.

STUEPP, C. A.; WENDLING, I.; XAVIER, A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. 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.; CORREA, G.; RESENDE, M. D. V.; CARDOZO JUNIOR, E. L.; DONADUZZI, C. M. **Controle genético dos teores de polifenóis totais, taninos e cafeína em progênies de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) cultivadas em três classes de solos**. Colombo: Embrapa Florestas, 2004. 16 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 16).

STURION, J. A.; RESENDE, M. D. V. **Melhoramento genético da erva-mate**. 1 Ed. Colombo: Embrapa Florestas, 2010. 274 p.

STURION, J. A.; STUEPP, C. A.; WENDLING, I. Genetic parameters estimates and visual selection for leaves production in *Ilex paraguariensis*. **Bragantia**, v. 76, n. 4, p. 492-500, 2017.

TAVARES, F. R.; PICHETH, J. A.; MASCHIO, L. M. A. Alguns fatores relacionados com a estaquia da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) St. Hil. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 7., 1992, Nova Prata. **Anais...** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1992. p. 626-639.

TFOUNI, S. A. V.; CAMARA, M. M.; KAMIKATA, K.; GOMES, F. M. L.; FURLANI, R. P. Z. Caffeine in teas: levels, transference to infusion and estimated intake. **Food Science Technology**, v. 38, n. 4, p. 661-666, 2018.

VALDUGA, A. T.; GONÇALVES, I. L.; DARTORA, N.; MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; SOUZA, L. M. Phytochemical profile of morphologically selected yerba-mate progenies. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 1, p. 114-120, 2016.

VALDUGA, A. T.; GONÇALVES, I. L.; MAGRI, E.; FINZER, J. R. D. Chemistry, pharmacology and new trends in traditional functional and medicinal beverages. **Food Research International**, v. 120, p. 478-503, 2019.

WENDLING, I. Propagação Vegetativa de Erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire): estado da arte e tendências futuras. Colombo: Embrapa Florestas, 2004. 46p. (Documentos 91).

WENDLING, I.; BRONDANI, G. E.; BIASSIO, A.; DUTRA, L. F. Vegetative propagation of adult *Ilex paraguariensis* trees through epicormics shoots. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 1, p. 117-125, 2013.

WENDLING, I.; SANTIN, D. **Propagação e nutrição de erva-mate**. 1 Ed. Brasília: EMBRAPA, 2015. 195p.

WENDLING, I.; STURION, J. A.; REIS, C. A. F.; STUEPP, C. A.; PEÑA, M. L. P. Indirect and expedite assessment of *Ilex paraguariensis* commercial yield. **Cerne**, v. 22, n. 3 p. 241-248, 2016.

WENDLING, I.; TRUEMAN, S. J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry-part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. **New Forests**, v. 45, p. 473-486, 2014.

WIESMAN, Z.; LAVEE, S. Enhancement of IBA stimulatory effect on rooting of olive cultivar stem cutting. **Scientia Horticulturae**, v.65, p.189-198, 1995.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2009. 272 p.

YIM, H. S.; CHYE, F. Y.; RAO, V.; LOW, J. Y.; MATANJUN, P.; HOW, S. E.; HO, C. W. Optimization of extraction time and temperature on antioxidant activity of *Schizophyllum commune* aqueous extract using response surface methodology. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 275-283, 2013.

YIN, Y.; KATAHIRA, R.; ASHIHARA, H. Metabolism of purine alkaloids and xanthine in leaves of mate (*Ilex paraguariensis*). **Natural Product Communications**, v. 10, n. 5, p. 707-712, 2015.

CAPÍTULO IV

5 CHÁ MATE CAFEINADO E DESCAFEINADO: EFEITO DA TOSTA NOS TEORES DE COMPOSTOS BIOATIVOS E ACEITAÇÃO POR CONSUMIDORES

RESUMO

O consumo de chá mate é crescente, bem como a busca por produtos de melhor qualidade, com composição fitoquímica de interesse, para o benefício da saúde humana. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar a influência da tosta da erva-mate nos teores de compostos bioativos, de diferentes genótipos, e a aceitação por consumidores de chá mate quente com diferentes teores de cafeína: cafeinados e descafeinados. Para avaliar a influência da tosta foram estudados 11 genótipos e uma amostra controle, analisando-se a capacidade antioxidante (radicais DPPH e ABTS), teores de compostos fenólicos totais, metilxantinas e ácidos cafeoilquínicos a partir do extrato aquoso, antes e após a tosta. Para os testes de aceitação foram avaliadas cinco amostras de chás descafeinados e seis cafeinados, separadamente, além de chás controle (amostra controle e chá mate comercial), sendo cada categoria provada por 110 consumidores. O processo de tosta influenciou significativamente nos teores de compostos bioativos dos chás, bem como houve diferença entre os genótipos. Dentre os genótipos, na categoria cafeinado, EC40 apresentou maior média de compostos fenólicos (81 mgEAG.g^{-1}) e elevada capacidade antioxidante ($\text{ABTS} = 3502 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1}$; $\text{DPPH} = 1047 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1}$), após a tosta. Para os descafeinados, EC51 apresentou maior teor de compostos fenólicos (65 mgEAG.g^{-1}) e também elevada capacidade antioxidante ($\text{ABTS} = 2755 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1}$; $\text{DPPH} = 935 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1}$), após a tosta. Para cafeína, EC49 e EC37 apresentaram os maiores teores ($10,18$ e $7,38 \text{ mg.g}^{-1}$, respectivamente), enquanto EC29 e EC51 os menores teores ($0,09$ e $0,10 \text{ mg.g}^{-1}$, respectivamente), ambos após a tosta. Com relação a aceitação do chá mate, no segmento dos descafeinados os genótipos EC29 e EC51 tiveram bom desempenho e, no segmento dos cafeinados, destacaram-se EC43 e EC33. Em ambos os casos, os genótipos foram iguais ou superiores aos produtos comerciais. De maneira geral, os chás descafeinados tiveram melhor aceitação do que os chás cafeinados.

Palavras-chave: Capacidade antioxidante. Compostos fenólicos. *Ilex paraguariensis*. Teor de cafeína. Teste de aceitação.

ABSTRACT

The consumption of mate tea is increasing, as well as the search for better quality products, with phytochemical composition of interest and with human health benefits. Thus, this study aimed to analyze the influence of yerba mate toast on bioactive compounds levels in different genotypes and the acceptance by consumers of hot mate tea with different levels of caffeine: caffeinated and decaffeinated. To evaluate the influence of toast, 11 genotypes and a control sample were studied, analyzing the antioxidant capacity (DPPH and ABTS radicals), total phenolic compounds contents, methylxanthines and caffeoylquinic acids from the aqueous extract, before and after toasting. For acceptance tests, five samples of decaffeinated and six of caffeinated teas were evaluated separately, in addition to control teas

(control sample and commercial mate tea), with each category being tested by 110 consumers. The toasting process influenced significantly the bioactive compound levels in teas, as well as showed differences between genotypes. Among the plus genotypes, in the caffeinated category, EC40 had the highest average of phenolic compounds (81 mgEAG.g^{-1}) and high antioxidant capacity (ABTS = $3502 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1}$; DPPH = $1047 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1}$), after toasting. For decaffeinated, EC51 showed a higher content of phenolic compounds (65 mgEAG.g^{-1}) and a high antioxidant capacity (ABTS = $2755 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1}$; DPPH = $935 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1}$), after toasting. For caffeine, EC49 and EC37 showed the highest levels (10.18 and 7.38 mg.g^{-1} , respectively), while EC29 and EC51 the lowest levels (0.09 and 0.10 mg.g^{-1} , respectively), both after toasting. In relation to mate tea acceptance, in the decaffeinated segment, the genotypes EC29 and EC51 performed well and, in the caffeinated segment, EC43 and EC33 stood out. In both cases, the genotypes were equal or superior to commercial products. In general, decaffeinated teas were better accepted than caffeinated ones.

Keywords: Antioxidant capacity. Phenolic compounds. *Ilex paraguariensis*. Caffeine content. Acceptance test.

5.1 INTRODUÇÃO

As folhas de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. (Aquifoliaceae) contém inúmeros compostos bioativos, podendo ser responsáveis por diversos benefícios a saúde humana (HECK; DE MEJIA, 2007, p. 138). Estudos recentes apontam que o extrato aquoso da erva-mate apresenta propriedades antioxidantes, anti-inflamatória, anticarcinogênica, auxiliando também no controle da obesidade, além de ser diurético e energético. Esses e outros benefícios são atribuídos à erva-mate graças a uma ampla gama de compostos químicos, especialmente aos pertencentes a classe das metilxantinas e compostos fenólicos, especialmente os ácidos clorogênicos e seus derivados (HECK; DE MEJIA, 2007, p. 138; CARDOZO JÚNIOR; MORAND, 2016, p. 442; ALKHATIB; ATCHESON, 2017, p. 01; GÓMEZ-JUARISTI et al., 2018, p. 1028).

O principal consumo da erva-mate se dá pelo uso das folhas e ramos no preparo de bebidas tônicas e estimulantes, a partir da infusão à quente, o chimarrão, ou a frio, o tererê, e da tosta das folhas, obtendo-se o chá mate (SAIDELLES et al., 2010, p. 259). É sabida a importância e abundância dos compostos encontrados na erva-mate, entretanto, durante o processamento para produção de chá mate a matéria-prima passa por diferentes etapas, como a pré-secagem ou sapeco, secagem em secador rotativo ou em esteira, moagem (ISOLABELLA et al., 2010, p. 696), e posterior tosta, em temperaturas de 180 a $215 \text{ } ^\circ\text{C}$. Assim, torna-se indispensável o conhecimento das alterações químicas durante esse processo, para que se obtenha

produtos com perfil fitoquímico conhecido, possibilitando o direcionamento para mercados específicos.

A exploração eficaz do potencial comercial do chá mate exige perfis de consumidor cuidadosamente projetados, focando no comportamento e preferências, a fim de traçar estratégias mais eficazes de marketing e produção que atendam às necessidades do público alvo (GODOY et al., 2013, p. 802). Assim, um ponto de suma relevância que pode ser considerado para a produção de chá mate é a obtenção de produtos oriundos de genótipos selecionados, com base em perfis de interesse comercial, como por exemplo chás cafeinados e descafeinados, proporcionando a obtenção de produtos com maior valor agregado e aceitabilidade no mercado. Neste sentido, Embrapa Florestas iniciou um programa de melhoramento genético de erva-mate, em 1997, visando a seleção de materiais genéticos de elevada produtividade foliar (RESENDE et al., 2000, p. 10), e nos últimos anos tem conciliado estudos relacionados aos compostos bioativos de interesse (CARDOZO JUNIOR et al., 2010, p. 172; HELM et al., 2015, p. 01).

A cafeína é um composto estimulante encontrado em diversas bebidas e suplementos, e sua presença é muitas vezes requerida pelos benefícios conferidos a ela, tais como resistência física, redução da fadiga e aumento da atenção e concentração mental (HECKMAN et al., 2010, p. 77). Em contrapartida, os baixos teores desse composto são alvo da preferência de outros consumidores, que buscam produtos descafeinados, dado a ocorrência de problemas associados à insônia, hiperatividade, azia e taquicardia (HECKMAN et al., 2010, p. 81; VALDUGA et al., 2019, p. 481). O consumo de produtos cafeinados é contraindicado em casos de doenças cardiovasculares graves, úlceras, tensão nervosa e insônia (CASSEL et al., 2010, p. 656) e a versão de produtos com baixos teores de cafeína é uma alternativa para esse público.

A cafeína contribui para o sabor amargo de infusões de erva-mate (PAGLIOSA et al., 2009, p. 416; VALDUGA et al., 2019, p. 484) e está presente no chá mate, mas pouco se sabe sobre os níveis encontrados após processamento e o quanto esse composto afeta as características da bebida, especialmente o sabor. Alguns trabalhos relacionados ao consumo e aceitabilidade de chá mate já vem sendo realizados (BARBOZA; CAZAL, 2018, p. 01; GODOY et al. 2013, p. 801), entretanto, este é o primeiro estudo que relata a aceitação de bebidas elaboradas a partir de genótipos cafeinados e não cafeinados. Neste sentido, objetivou-se analisar a

influência da tosta da erva-mate nos teores de compostos bioativos de diferentes genótipos e a aceitação de chá mate cafeinado e descafeinado por consumidores.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Coleta e secagem da erva-mate

O total de 11 genótipos foram selecionados com base nos teores de cafeína, sendo cinco descafeinados (EC17, EC19, EC22, EC29 e EC51) e seis cafeinados (EC25, EC33, EC37, EC40, EC43 e EC49). A categorização da cafeína foi realizada de acordo com os critérios da norma Anvisa - RDC N° 277, de 22 de setembro de 2005 (BRASIL, 2005), onde produtos descafeinados podem apresentar máximo de 0,1% de cafeína (g/100g), e com Schuhli; Penteadó Junior; Wendling (2019, p. 20). Os genótipos utilizados estão localizados em um teste de procedências e progênies (RESENDE et al., 2000, p. 30; WENDLING et al., 2018, p. 280), no município de Ivaí, Paraná, Brasil (25°01'S, 50°47'W e 650-750 m altitude).

Folhas e ramos foram coletados por meio da poda das plantas e encaminhadas para processamento na Empresa Baldo S/A de São Mateus do Sul-PR. Para a secagem do material e posterior obtenção dos chás, 15 kg de material vegetal de cada genótipo foi processado em equipamentos industriais, individualmente para cada planta, seguindo-se as etapas de: sapeco, em temperatura de 140 °C durante 2 min; remoção dos galhos acima de 7 mm e embalagem em sacos de ráfia; e secagem, realizadas sobre secador rotativo, com temperaturas entre 40 e 50 °C. Os sacos foram constantemente virados para secagem uniforme, por um período de cinco dias.

Após secagem, a moagem foi realizada em moedor mecânico industrial. Neste processo foi obtido o material denominado de chá mate verde. A tosta foi realizada em equipamento industrial (Probat®), com temperatura de entrada e saída de 160 e 205 °C, respectivamente, durante 10 min, obtendo-se assim o chá mate tostado. Além dos 11 genótipos cafeinados e descafeinados, também foi analisada uma amostra comercial de erva-mate para chimarrão, tida como amostra-controle (denominada AC), sendo submetida ao mesmo processo de tosta acima descrito, para obtenção do chá tostado.

5.2.2 Preparo dos extratos aquosos

Foram pesados 10 mg de amostra moída fina e uniformizada (chá mate verde e chá mate tostado) de cada um dos 12 tratamentos (11 genótipos e AC), acrescidos de 2 mL de água ultrapura. O material foi agitado em vórtex por 30 segundos e a extração foi realizada no equipamento Thermomixer® por 1 hora, a 60 °C e 450 rpm. Os extratos foram filtrados em filtro de nylon de 0,22 µm e utilizados para a determinação do teor de compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante via radical ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) e radical DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazil), metilxantinas (cafeína e teobromina) e ácidos cafeoilquínicos.

Para a correção da massa utilizada nas análises químicas, o grau de umidade das amostras foi determinado em triplicada, com secagem em estufa a 105 °C até peso constante (Método 920.151 - AOAC, 2000). Todas as análises químicas foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia da Universidade Federal do Paraná, e no Laboratório de Tecnologia de Produtos Não Madeiráveis da Embrapa Florestas.

5.2.3 Capacidade antioxidante (radicais ABTS e DPPH)

A capacidade antioxidante dos extratos via radical livre ABTS foi determinada pela reação de 10 mL de ABTS (7 mmol.L⁻¹) com 176 µL de persulfato de potássio (140 mmol.L⁻¹), por 16 horas no escuro. Posteriormente, 1 mL dessa solução foi adicionada em tampão de acetato de sódio (80 mmol.L⁻¹; pH 4,5), sendo a absorbância da solução ajustada para 0,7 ± 0,05. Tomou-se uma alíquota de 3 mL de solução ajustada, adicionando-se à 30 µL de extrato. As amostras foram mantidas no escuro por 2 horas, em temperatura ambiente e a leitura das absorbâncias realizada a 734 nm (RE et al., 1999, p. 1233; YIM et al., 2013, p. 277 - com modificações).

A capacidade antioxidante do extrato via radical livre DPPH foi determinada de acordo com o protocolo estabelecido por Brand-Willians et al. (1995, p. 26), com modificações. Para as análises foram utilizados 0,1 mL de extrato diluído em 3,9 mL de solução metanólica de DPPH (0,06 mmol.L⁻¹) (ajustada para absorbância de 0,5 ± 0,05), mantidos por 30 minutos no escuro e em temperatura ambiente. Posteriormente, a leitura das absorbâncias foi tomada a 515 nm.

As análises de capacidade antioxidante foram realizadas em espectrofotômetro Shimadzu®-1800 UV/VIS. As curvas analíticas foram obtidas com Trolox [6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico] entre as concentrações de 0 a 2500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para a conversão da absorbância do sequestro de radicais ABTS ($R^2 = 0,9952$) e entre as concentrações de 0 e 1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ($R^2 = 0,9918$) para a conversão da absorbância do sequestro de radicais DPPH. Os resultados foram expressos em μmol de Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox por grama de amostra seca ($\mu\text{molTEAC.g}^{-1}$).

5.2.4 Teor de compostos fenólicos

O conteúdo total de compostos fenólicos foi determinado pelo método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965, p. 144), com modificações. Foram adicionados em balão volumétrico 0,1 mL de extrato, 6 mL de água destilada e 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu e agitados por 1 minuto. Posteriormente, 2 mL de solução aquosa de Na_2CO_3 a 15% foi adicionada e agitada por mais 30 segundos. O volume final foi ajustado para 10 mL, com água destilada. Os balões permaneceram no escuro, em temperatura ambiente por 2 horas, e posteriormente a leitura das absorbâncias foi observada em espectrofotômetro Shimadzu®-1800 UV/VIS à 760 nm. A curva analítica de referência foi obtida com ácido gálico [ácido 3,4,5-triidroxibenzóico], com concentrações entre 0,25 e 13 mg.L^{-1} ($R^2 = 0,9941$). Os resultados foram expressos em mg Equivalentes de Ácido Gálico por grama de amostra seca (mgEAG.g^{-1}).

5.2.5 Metilxantinas e ácidos cafeoilquínicos

A determinação de metilxantinas e ácidos cafeoilquínicos foi realizada a partir de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), utilizando-se 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, \varnothing 5 μm), com pré-coluna Shim-Pack CLC G-ODS® (10 x 4,0 mm, \varnothing 5 μm), ambos Shimadzu®.

As condições de separação dos compostos presentes no extrato aquoso (20 μL de injeção) foram: 30 °C com fluxo de 0,5 mL.min^{-1} de eluente com a fase móvel A

(H₂O:ácido acético Alphatec[®] - 99,9:0,1 v/v) e B (acetonitrila Merck[®] - 100%). O comprimento de onda utilizado para detecção do composto foi 280 nm (fixo). O programa de eluição com gradiente foi (minutos): 0-15 (3% B), 15-20 (3-20% B), 20-40 (20% B), 40-45 (20-30% B), 45- 55 (30-100% B), 55-75 (100% B), 75-80 (100-3% B) e 80-95 (3% B).

A identificação e quantificação das metilxantinas cafeína (1,3,7-trimetilxantina) e teobromina (3,7-dimetilxantina) foi realizada a partir de curvas analíticas obtidas com padrões Sigma[®], entre as concentrações de 0 a 1,0 mg.mL⁻¹ (R² = 0,9933) e de 0 a 0,5 mg.mL⁻¹ (R² = 0,9827) para cafeína e teobromina, respectivamente. A identificação dos ácidos cafeoilquínicos (ácido 3-cafeoilquínico (3-CQA), ácido 4-cafeoilquínico (4-CQA), ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA)) também foi realizada com padrão Sigma[®] e a semi quantificação foi obtida a partir de curva analítica entre as concentrações de 0 e 10 mg.mL⁻¹ de 3-CQA (R² = 0,9914). Os resultados foram expressos em mg de composto por grama de amostra (mg.g⁻¹), em base seca.

5.2.6 Preparo dos chás para teste de aceitação

Foram utilizados 16 g do chá mate tostado de cada tratamento (11 genótipos e AC), adicionados em 1 litro de água fervente, permanecendo em ebulição por 3 minutos. O chá foi filtrado e o volume ajustado com água fervente para 1 litro. Como tratamento controle utilizou-se um chá mate tostado comercial a granel (COM), preparado da mesma maneira.

5.2.7 Teste de aceitação

Foram realizados dois testes de aceitação, separadamente, no Mercado Municipal de Curitiba, recrutando-se 110 consumidores de chá mate em cada teste. No primeiro, cada consumidor avaliou cinco chás descafeinados e duas amostras controle (AC e COM). No segundo, cada consumidor avaliou seis chás cafeinados, além das duas amostras controle (AC e COM). O questionário de recrutamento abrangeu questões sobre o perfil dos consumidores (sexo, idade, escolaridade), hábitos de consumo e disponibilidade para participar da pesquisa. Os participantes classificaram os chás com um grau geral de aceitação, usando escalas hedônicas

estruturadas de 9 pontos, variando de 1 (desgostei extremamente) a 9 (gostei extremamente), de acordo com a NBR 14141 (ABNT, 1998).

Cada participante assinou o termo de consentimento livre para participar do teste, recebendo aproximadamente 30 mL de cada amostra de chá mate cafeinado ou descafeinado, a 60 °C, codificados com números aleatórios de três dígitos, seguindo uma ordem de balanceamento (MACFIE; BRATCHELL, 1989, p.132). Os consumidores com preferência por chá doce foram instruídos a adicionar a mesma quantidade de açúcar (ou adoçante) em todas as amostras avaliadas. Foram oferecidos biscoitos água e sal e água mineral para limpar o paladar entre as provas de cada amostra.

A realização dos testes de aceitação passou pela aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa das Faculdades Pequeno Príncipe (CEP/FPP), certificado pelo processo nº 17644719.2.0000.5580, referente ao Certificado de Apresentação para Consideração Ética (CPEC - Número do Parecer: 3.472.239).

5.2.8 Análises estatísticas

As análises de capacidade antioxidante, compostos fenólicos totais, metilxantinas e ácidos cafeoilquínicos foram realizadas em três repetições. Utilizando-se os Modelos Lineares Generalizados, com distribuição gama e comparação múltipla entre os tratamentos por contrastes ortogonais, pelo teste de Tukey a 5%. Para os dados não paramétricos utilizou-se o teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$) e teste de Fisher (*post-hoc*) para comparação das médias (para cada fator individualmente). A correlação de Pearson ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) foi utilizada para verificar a relação entre compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante dos extratos.

Para as análises de aceitação de chá mate por consumidores os dados foram analisados utilizando-se o Mapa Interno de Preferência, com base na Análise de Componentes Principais (distância Euclidiana). A fim de identificar os segmentos de consumidores que possuíam o mesmo padrão de preferência para cada chá estudado, utilizando-se a Análise Hierárquica de Cluster (método de Ward). Para observar as diferenças dentro de segmento gerado, foi utilizado o teste de Tukey com 5% de probabilidade.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Influência da tosta nos compostos bioativos

O processo de tosta influenciou no conteúdo de compostos bioativos presentes no extrato aquoso de erva-mate. Na Tabela 5.1 observa-se a redução significativa da capacidade antioxidante dos radicais ABTS e DPPH e do total de compostos fenólicos após a tosta, bem como as diferenças significativas entre os genótipos estudados. Dentre os genótipos cafeinados, EC40 se destaca por apresentar maior capacidade antioxidante (ABTS= 3502 $\mu\text{molTEAC.g}^{-1}$; DPPH= 1047 $\mu\text{molTEAC.g}^{-1}$) e maior teor de compostos fenólicos totais (81 mgEAG.g⁻¹) após o processo de tosta. Para os materiais descafeinados, EC51 apresentou o maior teor de compostos fenólicos totais (65 mgEAG.g⁻¹) e também elevada capacidade antioxidante (ABTS= 2755 $\mu\text{molTEAC.g}^{-1}$; DPPH= 935 $\mu\text{molTEAC.g}^{-1}$), mesmo após a tosta.

De maneira geral, os genótipos estudados apresentaram potencial para produção de chá mate, especialmente pela elevada capacidade antioxidante e compostos fenólicos totais observados (TABELA 5.1). A erva-mate é conhecida pelos seus efeitos terapêuticos, sendo que a caracterização da atividade antioxidante de chás é indispensável para a determinação de seus benefícios a saúde humana (ZIELINSKI et al., 2014, p. 246). A preocupação atual e adoção de um estilo de vida mais saudável têm levado os consumidores a observarem com maior atenção a escolha de produtos, aumentando a busca por alimentos mais funcionais, como é o caso de *I. paraguariensis* (YANG; LEE, 2020, p. 01), demonstrando a importância da abordagem realizada neste estudo.

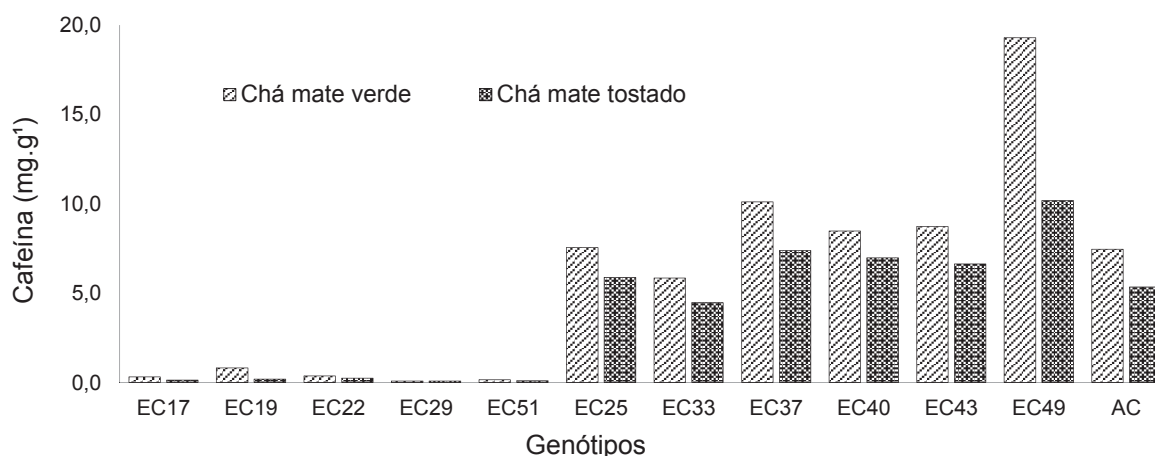
No trabalho desenvolvido por Valduga et al. (2016, p. 118) observam-se diferenças na atividade antioxidante entre diferentes matrizes de erva-mate, corroborando com os resultados observados na Tabela 5.1. Os autores destacam a importância desses resultados, podendo ser aplicados como ferramenta de seleção para obtenção de plantas com maiores valores nutricionais e econômicos. Os resultados do presente estudo demonstram correlação positiva e significativa ($p < 0,01$) entre a capacidade antioxidante e os compostos fenólicos totais para os genótipos estudados (ABTS $p = 0,81$; DPPH $p = 0,58$), evidenciando que os compostos fenólicos são os grandes protagonistas da ação antioxidante na erva-mate, especialmente pela

presença dos ácidos clorogênicos e seus derivados, como mencionado por Riachi; De Maria (2017, p. 309).

Os teores de cafeína, teobromina e metilxantinas totais foram influenciados significativamente pelo processo de tosta, bem como houve diferenças significativas entre os genótipos estudados (TABELA 5.2). Com relação à cafeína, antes do processo de tosta, verificaram-se teores abaixo de 1 mg.g^{-1} , considerados materiais genéticos descafeinados, até teores próximos de 20 mg.g^{-1} , considerados genótipos com altos teores desse composto (SCHUHLI; PENTEADO JUNIOR; WENDLING, 2019, p. 20) (TABELA 5.2; FIGURA 5.1).

Após o processo de tosta, os genótipos EC49 e EC37 apresentaram os maiores teores de cafeína ($10,18$ e $7,38 \text{ mg.g}^{-1}$, respectivamente), enquadrando-se na classificação de baixo teor, enquanto EC29 e EC51 apresentaram os menores teores desse composto ($0,09$ e $0,10 \text{ mg.g}^{-1}$, respectivamente), sendo classificados como genótipos descafeinados (FIGURA 5.1). Ashihara; Crozier (1999, p. 3430) relatam que baixos teores de cafeína em espécies de *Coffea* estão relacionados à reduzida atividade de biossíntese do composto. Já Zhu et al. (2019, p. 3408) justificam que os baixos teores de cafeína para *Camellia sinensis* (L.) Kuntze estão correlacionados com a elevada expressão genética na via de degradação desse composto.

FIGURA 5.1 - INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE TOSTA NOS TEORES DE CAFEÍNA EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.



FONTE: A autora (2020).

TABELA 5.1 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE VIA RADICAIS ABTS E DPPH E TEORES DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM EXTRATO AQUOSO DE CHÁ MATE VERDE E TOSTADO, OBTIDOS A PARTIR DE GENÓTIPOS CAFEINADOS E DESCAFEINADOS.

Genótipos	ABTS ¹ * (µmolTEAC.g ⁻¹)		DPPH ² (µmolTEAC.g ⁻¹)		Compostos Fenólicos Totais ¹ * (mgEAG.g ⁻¹)	
	Verde	Tostado	Verde	Tostado	Verde	Tostado
EC 17	3363,27 ± 427,02 a AB	2043,80 ± 247,71 b E	1136,18 ± 6,56 a DEF	872,74 ± 97,41 b B	80,59 ± 0,10 a BC	55,40 ± 1,03 b B
EC 19	3700,99 ± 67,49 a A	2180,63 ± 160,48 b DE	1128,17 ± 2,16 a G	975,28 ± 45,43 b AB	85,20 ± 5,14 a B	58,05 ± 3,19 b B
EC 22	3196,30 ± 254,25 a ABC	2341,44 ± 221,92 b BCDE	1157,86 ± 3,40 a AB	955,01 ± 75,23 b B	83,40 ± 8,53 a BC	54,54 ± 5,55 b B
EC 29	2705,65 ± 411,23 a BC	2056,15 ± 222,47 b DE	1156,44 ± 3,39 a AB	985,47 ± 48,18 b AB	60,88 ± 5,54 a D	57,72 ± 3,43 a B
EC 51	3644,18 ± 219,29 a A	2755,02 ± 5,14 b BC	1169,70 ± 1,29 a A	935,86 ± 0,75 b B	79,63 ± 13,29 a BC	65,18 ± 2,47 b AB
EC 25	3731,43 ± 93,05 a A	2870,50 ± 22,68 b AB	1140,07 ± 1,26 a CD	1011,57 ± 37,47 b AB	85,27 ± 3,73 a B	66,28 ± 7,36 b AB
EC 33	2616,93 ± 187,13 a C	2261,34 ± 255,13 a CDE	1132,52 ± 5,76 a FG	968,22 ± 57,11 b AB	53,18 ± 0,71 a D	58,23 ± 6,88 a B
EC 37	3287,63 ± 348,36 a ABC	2426,66 ± 241,09 b BCDE	1139,71 ± 1,26 a CDE	963,39 ± 135,35 b AB	89,28 ± 8,90 a AB	61,51 ± 7,83 b B
EC 40	3622,63 ± 136,03 a A	3502,38 ± 83,69 a A	1151,13 ± 1,28 a BC	1047,04 ± 11,71 b A	111,27 ± 2,97 a A	81,17 ± 8,41 b A
EC 43	2952,59 ± 376,40 a ABC	2386,84 ± 240,46 b BCDE	1134,64 ± 5,04 a EFG	973,91 ± 61,44 b AB	60,95 ± 7,37 a D	56,68 ± 5,84 a B
EC 49	3334,90 ± 246,36 a AB	2583,69 ± 231,41 b BCDD	1130,32 ± 2,17 a FG	985,80 ± 118,33 b AB	79,30 ± 6,17 a BC	65,47 ± 4,88 b AB
AC	2966,05 ± 165,63 a ABC	2151,85 ± 182,88 b DE	1135,49 ± 8,29 a DEF	1001,39 ± 40,23 b AB	66,83 ± 4,89 a CD	54,95 ± 3,79 b B

FONTE: A autora (2020).

NOTA: Média seguida por letras iguais, minúsculas na mesma linha e maiúscula na mesma coluna, não diferem significativamente entre si; ¹: Modelos Lineares Generalizados; ²: Kruskal Wallis; *: Interação significativa entre os fatores processo de secagem (seco e tostado) e genótipos.

TABELA 5.2 - TEORES DE METILXANTINAS EM EXTRATO AQUOSO DE CHÁ MATE VERDE E TOSTADO, OBTIDOS A PARTIR DE GENÓTIPOS CAFEINADOS E DESCAFEINADOS.

Genótipos	Cafeína ¹ (mg.g ⁻¹)		Teobromina ¹ (mg.g ⁻¹)		Metilxantinas Totais ¹ (mg.g ⁻¹)	
	Verde	Tostado	Verde	Tostado	Verde	Tostado
EC 17	0,32 ± 0,01 a H	0,14 ± 0,02 b H	0,19 ± 0,02 b HI	0,24 ± 0,02 a GH	0,51 ± 0,02 a G	0,38 ± 0,03 b I
EC 19	0,83 ± 0,11 a F	0,20 ± 0,02 b G	1,47 ± 0,07 b CD	1,82 ± 0,11 a B	2,30 ± 0,04 a E	2,02 ± 0,09 b FG
EC 22	0,37 ± 0,01 a G	0,25 ± 0,03 b F	0,58 ± 0,07 a E	0,24 ± 0,00 b G	0,95 ± 0,07 a FG	0,49 ± 0,03 b HI
EC 29	0,09 ± 0,01 a J	0,09 ± 0,02 a I	2,15 ± 0,11 a AB	1,64 ± 0,08 b CD	2,24 ± 0,12 a EF	1,73 ± 0,06 b GH
EC 51	0,16 ± 0,00 a I	0,10 ± 0,02 b I	6,09 ± 0,16 a A	4,91 ± 0,18 b A	6,25 ± 0,16 a D	5,00 ± 0,20 b E
EC 25	7,55 ± 0,28 a D	5,89 ± 0,35 b D	0,93 ± 0,02 b D	1,16 ± 0,09 a D	8,48 ± 0,27 a C	7,05 ± 0,30 b D
EC 33	5,85 ± 0,32 a E	4,47 ± 0,20 b E	0,09 ± 0,01 b I	0,16 ± 0,06 a H	5,94 ± 0,32 a D	4,63 ± 0,25 b EF
EC 37	10,11 ± 0,91 a B	7,38 ± 0,26 b B	0,59 ± 0,02 a EF	0,37 ± 0,03 b F	10,70 ± 0,89 a A	7,75 ± 0,23 b B
EC 40	8,48 ± 0,62 a C	6,97 ± 0,11 b C	0,52 ± 0,07 b FG	0,65 ± 0,02 a E	9,00 ± 0,69 a BC	7,63 ± 0,12 b BCD
EC 43	8,72 ± 0,39 a C	6,64 ± 0,33 b C	0,49 ± 0,08 a G	0,65 ± 0,08 a E	9,21 ± 0,46 a B	7,30 ± 0,36 b CD
EC 49	19,29 ± 0,63 a A	10,18 ± 0,39 b A	0,35 ± 0,05 a H	0,25 ± 0,11 a G	19,64 ± 0,61 a A	10,43 ± 0,46 b A
AC	7,45 ± 0,46 a D	5,35 ± 0,24 b D	1,62 ± 0,13 a BC	1,81 ± 0,13 a BC	9,08 ± 0,52 a BC	7,16 ± 0,35 b D

FONTE: A autora (2020).

NOTA: Média seguida por letras iguais, minúsculas na mesma linha e maiúscula na mesma coluna, não diferem significativamente entre si; ¹: Kruskal Wallis.

A cafeína é um dos compostos de maior interesse e observada em maiores quantidades quando comparada às outras metilxantinas (teobromina e teofilina) encontradas na erva-mate (VALDUGA et al., 2019, p. 489). A redução significativa nos teores de cafeína ao longo do processamento industrial da erva-mate, como observadas no presente estudo, é de certa forma esperada e relatada na literatura (ESMELINDRO et al., 2002, p. 203; HECK; DE MEJIA, 2007, p. 140), sendo em sua maioria justificada pela degradação dos compostos em função das elevadas temperaturas utilizadas durante o processo. De acordo com Isolabella et al. (2010, p. 697), os parâmetros fitoquímicos são diretamente influenciados pelo processamento da matéria-prima, sendo que as etapas de sapeco e secagem, especificamente, proporcionam as maiores taxas de perdas no conteúdo de cafeína. Neste sentido, cabe destacar que o processo de tosta, realizado no presente estudo, ocasionou uma redução média de 32% no conteúdo de cafeína para os genótipos estudados (FIGURA 5.1).

De maneira geral, os teores de teobromina sofreram alterações após o processo de tosta, sendo que em alguns genótipos foi possível verificar um aumento significativo desse composto e, em outros, sua redução (TABELA 5.2). A redução pode ser explicada pela degradação, especialmente em função das elevadas temperaturas (ESMELINDRO et al., 2002, p. 203; HECK; DE MEJIA, 2007, p. 140). Em contrapartida, não há relatos na literatura sobre o aumento desse composto após processamento. No entanto, esse comportamento pode estar relacionado com a disponibilidade inicial da teobromina na planta. As elevadas temperaturas e impactos mecânicos utilizados no processamento da erva-mate podem levar à ruptura celular (BASTOS et al., 2006, p. 401), liberando compostos que possivelmente estariam conjugados, por exemplo, na parede celular (MARTINEZ et al, 2014, p. 842). Além disso, os processos que envolvem temperaturas elevadas reduzem o grau de umidade do material, havendo um aumento de sólidos solúveis, ocasionando maior quantidade de compostos dissolvidos no extrato (BASTOS et al., 2006, p. 401; HECK; DE MEJIA, 2007, p. 141).

Com relação as diferenças entre as matrizes, pode ser considerada a abordagem realizada por Athayde et al. (2007, p. 277), que ao reportarem diferenças no conteúdo de metilxantinas em cinco populações nativas de *I. paraguariensis*, relatam que a acumulação de teobromina é relativamente independente do acúmulo de cafeína, corroborando com os resultados apresentados na Tabela 5.2. Em

contrapartida, pode-se perceber que os genótipos EC29 e EC51 apresentaram os menores teores de cafeína no chá mate verde (0,09 e 0,16 mg.g⁻¹) e os maiores teores de teobromina (2,15 e 6,09 mg.g⁻¹). Esse comportamento foi observado para *Coffea arabica* L., sendo que Silvarolla et al. (2004, p. 826) sugerem a inatividade da enzima cafeína sintase, indicando um maior acúmulo de teobromina como compensação, em função de não haver a biossíntese da cafeína.

Os resultados obtidos para os ácidos cafeoilquínicos mostram redução significativa após a tosta, bem como diferenças significativas dentre os genótipos (TABELA 5.3).

TABELA 5.3 - ÁCIDOS CAFFEOILQUÍNICOS EM EXTRATO AQUOSO DE CHÁ MATE VERDE E TOSTADO, OBTIDOS A PARTIR DE GENÓTIPOS CAFEINADOS E DESCAFEINADOS.

Genótipos	3-CQA ¹ * (mg.g ⁻¹)		4-CQA ¹ *(mg.g ⁻¹)	
	Verde	Tostado	Verde	Tostado
EC 17	21,52 ± 1,03 a ABC	11,24 ± 0,52 b C	13,87 ± 0,53 a DE	6,83 ± 0,04 b EF
EC 19	19,27 ± 1,30 a CD	12,43 ± 1,26 b BC	16,47 ± 0,82 a AB	7,51 ± 0,55 b DE
EC 22	24,92 ± 1,47 a A	11,46 ± 1,14 b C	17,74 ± 1,09 a A	6,33 ± 0,24 b F
EC 29	24,31 ± 1,71 a AB	14,17 ± 0,67 b B	15,89 ± 1,13 a ABCD	8,75 ± 0,42 b BC
EC 51	24,82 ± 2,63 a A	13,28 ± 0,60 b B	15,46 ± 0,54 a ABCD	6,72 ± 0,26 b EF
EC 25	21,88 ± 0,28 a ABC	14,35 ± 0,34 b B	16,21 ± 1,18 a ABC	8,21 ± 0,57 b BCD
EC 33	22,21 ± 0,98 a ABC	13,29 ± 0,46 b B	14,01 ± 0,12 a CDE	6,79 ± 0,27 b EF
EC 37	20,29 ± 0,48 a CD	12,65 ± 0,42 b BC	12,87 ± 1,04 a E	7,57 ± 0,74 b DE
EC 40	19,23 ± 0,28 a CD	18,19 ± 1,09 a A	16,53 ± 0,62 a AB	12,90 ± 0,24 b A
EC 43	21,03 ± 1,81 a BCD	13,56 ± 0,35 b B	13,85 ± 0,72 a DE	9,29 ± 0,47 b B
EC 49	21,64 ± 0,56 a ABC	13,71 ± 0,27 b B	14,21 ± 1,10 a BCDE	7,60 ± 0,18 b CDE
AC	18,11 ± 1,23 a D	11,16 ± 0,41 b C	13,78 ± 0,81 a DE	7,15 ± 0,44 b DF
	5-CQA ¹ * (mg.g ⁻¹)		CQA Totais ¹ * (mg.g ⁻¹)	
EC 17	41,90 ± 2,20 a AB	5,80 ± 0,31 b E	77,29 ± 2,97 a AB	23,87 ± 0,86 b FG
EC 19	45,73 ± 2,22 a A	6,11 ± 0,50 b CDE	81,47 ± 3,85 a A	26,05 ± 2,09 b DEF
EC 22	34,96 ± 1,28 a DE	5,52 ± 0,06 b E	77,62 ± 2,62 a AB	23,32 ± 1,07 b G
EC 29	31,12 ± 1,57 a EF	7,52 ± 0,30 b B	71,32 ± 2,30 a BCD	30,44 ± 0,85 b B
EC 51	33,39 ± 2,00 a DE	6,00 ± 0,17 b DE	73,67 ± 4,55 a BC	25,99 ± 0,37 b DEF
EC 25	35,57 ± 1,04 a CD	7,08 ± 0,60 b BC	73,67 ± 1,91 a BC	29,64 ± 0,35 b BC
EC 33	28,71 ± 1,59 a F	5,68 ± 0,16 b E	64,93 ± 2,49 a D	25,75 ± 0,89 b DEFG
EC 37	35,52 ± 0,18 a CD	6,82 ± 0,47 b BCD	68,67 ± 1,62 a CD	27,04 ± 1,62 b CDE
EC 40	39,62 ± 2,19 a BCD	10,54 ± 0,43 b A	75,39 ± 1,71 a AC	41,63 ± 1,20 b A
EC 43	33,89 ± 1,81 a DE	7,00 ± 0,42 b BC	68,76 ± 3,40 a CD	29,85 ± 1,10 b BC
EC 49	36,96 ± 1,48 a CD	7,07 ± 0,37 b DE	72,81 ± 1,57 a BCD	28,38 ± 0,80 b BCD
AC	33,93 ± 1,21 a DE	6,27 ± 0,49 b CDE	65,82 ± 1,63 a D	24,58 ± 0,54 b EFG

FONTE: A autora (2020).

NOTA: Média seguida por letras iguais, minúsculas na mesma linha e maiúscula na mesma coluna, não diferem significativamente entre si; ¹: Modelos Lineares Generalizados; *: Interação significativa entre os fatores processo de secagem (seco e tostado) e genótipos.

Para o chá mate verde, o ácido 5-cafeoilquínico apresentou os teores mais elevados, seguidos pelo 3-CQA e 4-CQA. Após o processo de tosta foi possível verificar que o ácido 3-cafeoilquínico passou a ser predominante, indicando uma provável maior estabilidade desse composto (TABELA 5.3), contrariando os

resultados mencionados por Marques; Farah (2009, p. 1372). Mateos et al. (2018, p. 239) relatam que os ácidos cafeoilquínicos são a maior porção dos compostos fenólicos totais da erva-mate, sendo o ácido 3-cafeoilquínico o mais abundante, seguidos do 5-CQA e 4-CQA, respectivamente. Entretanto, Heck; Schmalko; De Mejia (2008, p. 8399) relatam 5-CQA como o ácido mais abundante em amostras de produtos de *I. paraguariensis*.

Cabe destacar que a amostra controle (AC) apresentou valores menores de compostos fenólicos, capacidade antioxidante, metilxantinas e ácidos cafeoilquínicos quando comparada às demais amostras cafeinadas. Assim, com os resultados desses compostos, tanto após tosta quanto entre os diferentes genótipos estudados, percebe-se a importância do conhecimento acerca dos materiais vegetais utilizados para produção de chá mate. Logo, a indústria deve se preocupar com as características iniciais da matéria-prima, considerando as perdas e diferenças existentes, podendo garantir ao consumidor produtos com maior quantidade de compostos bioativos de interesse. Conhecer quimicamente o perfil dos genótipos permite a elaboração de produtos diferenciados, agregando valor e qualidade aos chás produzidos.

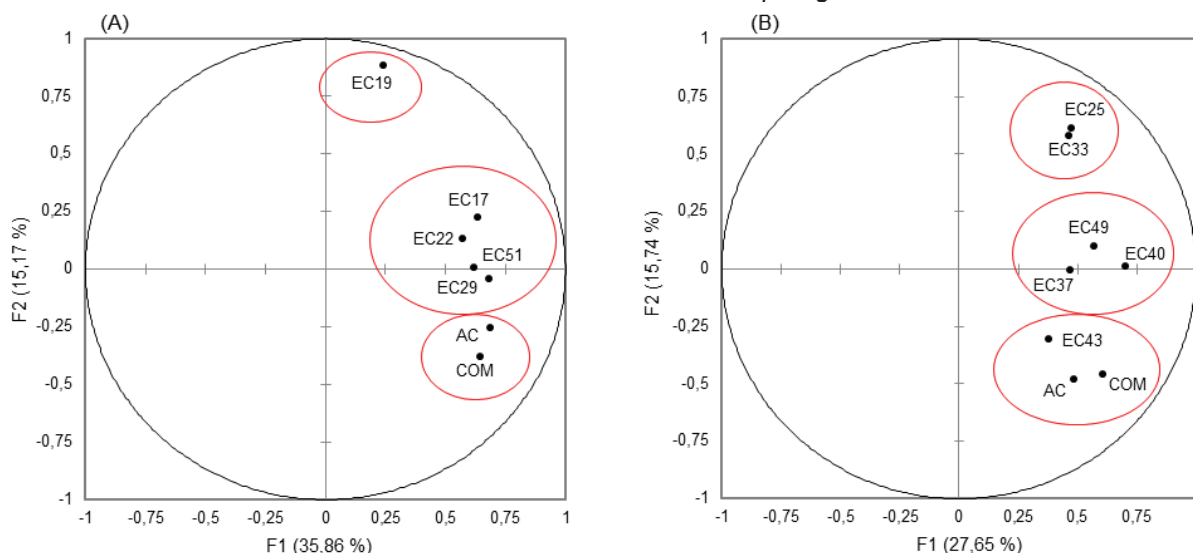
5.3.2 Aceitação de chá mate descafeinado e cafeinado

Para os chás descafeinados, o Mapa Interno de Preferência (FIGURA 5.2-A) mostrou que as duas primeiras dimensões explicaram 51,0% da variância, sendo a primeira componente responsável por 35,9% e a segunda por 15,2%. A separação espacial sugere diferenças na aceitação dos consumidores para essa classe de chás, estando os chás mate produzidos a partir de produtos comerciais formando um grupo (AC e COM), um segundo grupo formado pelos genótipos EC17, EC22, EC29 e EC51, e o genótipo EC19 formando um grupo isolado dos demais (FIGURA 5.2-A).

Para os chás cafeinados, houve semelhança no comportamento (FIGURA 5.2-B), sendo que as duas componentes principais explicam 43,4% da variação total relacionada à aceitação dos consumidores. A primeira componente foi responsável por 27,7% da variância e a segunda por 15,7%. Pela separação espacial para os chás cafeinados observa-se a existência de três conjuntos, o primeiro formado pelos dois chás comerciais e EC43, o segundo por EC37, EC40 e EC49, e o terceiro agrupando os chás produzidos com os genótipos EC25 e EC33. O baixo valor explicativo dos dois

eixos principais, para ambas análises, pode ser atribuído aos consumidores, que não eram um grupo treinado para este fim.

FIGURA 5.2 - MAPA INTERNO DE PREFERÊNCIA DO CONSUMIDOR PARA CHÁ MATE QUENTE DESCAFEINADO (A) E CHÁ MATE QUENTE CAFEINADO (B) PRODUZIDOS A PARTIR DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.



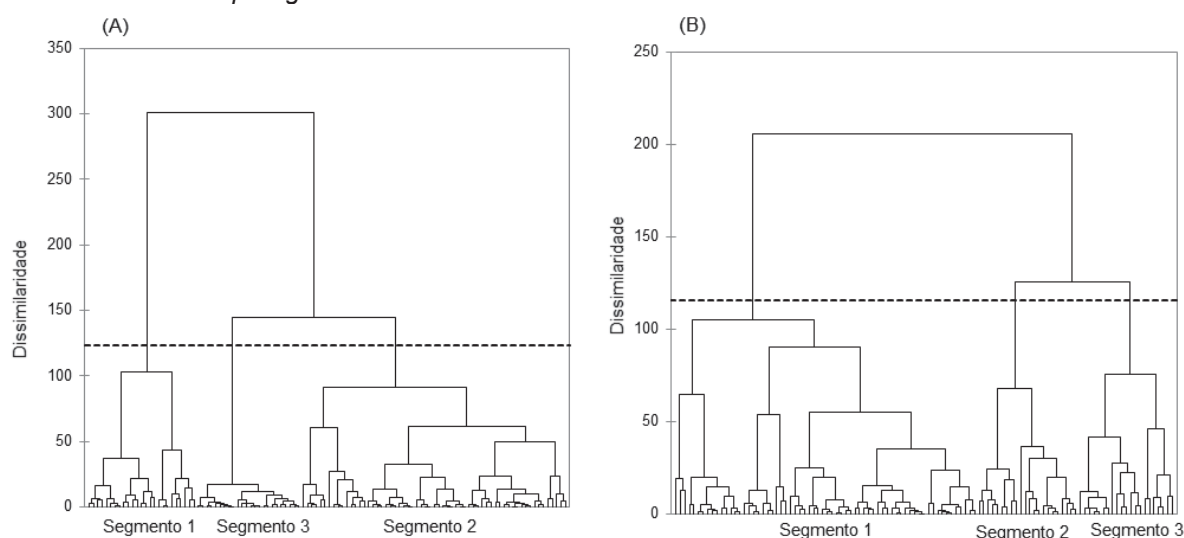
FONTE: A autora (2020).

Com relação às características químicas e agrupamentos formados pelos chás mate, cabe destacar os resultados dos chás comerciais (AC e COM) em ambos os testes de aceitação. Embora não se tenham os teores dos compostos químicos do chá mate COM, pode ser observada a semelhança entre o chá AC e o EC43 em todos os aspectos químicos após a tosta (TABELA 5.1, 5.2 e 5.3). Sabe-se ainda que os chás comerciais são provenientes de uma mistura de vários genótipos, justificando os resultados similares entre si e diferentes dos cafeinados e descafeinados. Os resultados obtidos no presente estudo também demonstram, de uma maneira geral, haver interesse em chá mate tanto cafeinado quanto de baixos teores de cafeína, em função das notas atribuídas aos chás testados (TABELA 5.4).

A segmentação, baseada nas similaridades dos gostos ou desgostos dos consumidores sobre os chás estudados, identificou três grupos tanto para os chás cafeinados quanto para o descafeinados, destacados abaixo das linhas de corte dos histogramas. A Figura 5.3-A apresenta as segmentações obtidas para os chás descafeinados, com 22,7% dos consumidores inseridos no primeiro segmento, 55,5% e 21,8% no segundo e terceiro segmentos, respectivamente ($n = 110$) (TABELA 5.4). Para os chás cafeinados (FIGURA 5.3-B), os segmentos foram compostos por 60,6%

dos consumidores no primeiro segmento, por 20,2% no segundo e 19,3% no terceiro ($n = 109$) (TABELA 5.4).

FIGURA 5.3 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA (ANÁLISE HIERÁRQUICA DE CLUSTER) DA SEGMENTAÇÃO DOS CONSUMIDORES DE CHÁ MATE DESCAFEINADO (A) E CAFEINADOS (B) PRODUZIDOS A PARTIR DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.



FONTE: A autora (2020).

As variações observadas nos produtos, tais como intensidade de sabor, cor e aroma, podem ser percebidas de maneira diferente por cada consumidor. O padrão de preferência dos consumidores repercute em diferentes respostas hedônicas, sendo que essas diferenças formarão grupos com padrões hedônicos compartilhados, segmentando os consumidores (VARELA; BELTRÁN; FISZMAN, 2014, p. 152), como observado na Tabela 5.4. Assim, a segmentação é importante na definição de oportunidades de mercado, pois caracteriza grupos de consumidores que compartilham de um conjunto semelhante de necessidades e desejos (KOTLER; KELLER, 2012, p. 228). O estudo desenvolvido por Li; Jervis; Drake (2015, p. 902) afirma que a preferência por determinado produto pode ser afetada pela idade, sexo e hábitos de consumo, havendo variação entre as escolhas realizadas por homens e mulheres ou entre jovens e adultos.

TABELA 5.4 - MÉDIAS DE ACEITAÇÃO, A PARTIR DA ESCALA HEDÔNICA, PARA CHÁS MATE DESCAFEINADOS E CAFEINADOS, PRODUZIDOS A PARTIR DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE *Ilex. paraguariensis* A. St.-Hil., EM CADA SEGMENTO.

Genótipo	Característica	Segmento 1	Segmento 2	Segmento 3
		(n = 25)	(n = 61)	(n = 24)
EC17	Chá mate descafeinado	3,40 ± 1,66 ab	5,21 ± 1,88 b	7,13 ± 0,90 ab
EC19		5,00 ± 1,96 a	5,21 ± 1,63 b	7,54 ± 0,83 a
EC22		4,88 ± 2,59 a	5,23 ± 1,86 b	6,65 ± 1,26 ab
EC29		3,60 ± 1,73 ab	6,13 ± 1,78 ab	7,25 ± 1,11 ab
EC51		4,72 ± 2,07 a	5,95 ± 1,73 ab	7,17 ± 0,82 ab
AC		4,84 ± 2,32 a	5,84 ± 1,94 ab	7,25 ± 0,94 ab
COM		2,92 ± 1,75 b	6,57 ± 1,28 a	6,50 ± 1,38 b
-----		(n = 66)	(n = 22)	(n = 21)
EC25	Chá mate cafeinado	5,86 ± 1,78 ab	4,05 ± 1,40 cde	5,14 ± 2,35 ab
EC33		6,38 ± 1,62 ab	5,45 ± 1,47 abc	5,62 ± 1,94 a
EC37		5,67 ± 1,57 b	3,36 ± 1,76 e	5,76 ± 1,55 a
EC40		5,97 ± 1,83 ab	3,59 ± 1,79 de	5,05 ± 1,88 ab
EC43		6,38 ± 1,42 ab	4,59 ± 1,62 bcde	5,76 ± 1,64 a
EC49		6,11 ± 1,74 ab	5,91 ± 1,82 ab	5,57 ± 2,46 a
AC		6,59 ± 1,30 a	6,41 ± 1,68 a	3,43 ± 1,47 b
COM		6,36 ± 1,45 ab	5,14 ± 1,96 abcd	4,24 ± 1,41 ab

FONTE: A autora (2020).

NOTA: Média seguida por letras iguais nas colunas não difere significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade; *n* = número de consumidores em cada segmento.

Na segmentação realizada para os chás mate descafeinados é possível perceber diferenças significativas entre os genótipos, dentro de todos os grupos segmentados (TABELA 5.4). O segmento 1 (*n* = 25) atribuiu as menores notas na escala hedônica (entre “desgostei moderadamente” e “nem gostei, nem desgostei”), grupo representado em sua maioria por pessoas entre 26 e 35 anos (36%), com pós-graduação (40%), sendo esses consumidores 68% mulheres. Um maior número de consumidores (*n* = 61) atribuiu notas consideradas médias na escala hedônica (“nem gostei, nem desgostei” e/ou “gostei ligeiramente”), na região de aceitação, em sua maioria entre 26 e 35 anos (31%), com pós-graduação (36%), sendo esses consumidores 57% mulheres. O segmento 3 apresenta as maiores notas na escala hedônica (“gostei ligeiramente” e/ou “moderadamente”), representados por consumidores em sua maioria entre 36 e 45 anos, mulheres e alto nível de escolaridade.

Ainda, com relação ao teste para chás descafeinados, é possível perceber que no primeiro e terceiro segmentos o chá COM obteve as menores médias e no segundo segmento ele foi o mais apreciado pelos consumidores, sem diferença significativa para os genótipos EC29, EC51 e AC (TABELA 5.4). Percebe-se assim, como já enfatizado, que as preferências dos consumidores são relativas a diferentes aspectos, podendo se relacionar com idade, classe social, sexo, grau de escolaridade

e estilo de vida, tornando os testes de aceitação uma análise bastante complexa, mas indispensável para determinação de públicos alvos e mercados em potencial. Para o segmento de genótipos descafeinados, EC29 e EC51 mostraram-se iguais ou superiores as amostras comerciais AC e COM.

Para os chás cafeinados, observou-se diferença significativa entre os genótipos em todos os segmentos (TABELA 5.4). As maiores notas atribuídas aos chás (“nem gostei/nem desgostei” e “gostei ligeiramente”) foram dos consumidores do segmento 1 ($n = 66$), entre os quais 33% apresentavam idade entre 26 a 35 anos, elevado grau de escolaridade, sendo a maioria mulheres (58%). No segmento 2 ($n = 22$) a amostra AC apresentou a maior média na escala hedônica (6,41), mas não diferiu significativamente das amostras EC33, EC49 e COM. Esse segmento foi composto por 55% de mulheres com nível superior e pós-graduação.

No terceiro segmento para os chás cafeinados ($n = 21$), composto por 48% de homens, estando a maioria dos consumidores entre 26 e 35 anos e 46 a 55 anos (ambos 24%), e 43% com pós-graduação, atribuíram-se notas na região de indiferença na escala hedônica. As médias das amostras ficaram entre “desgostei moderadamente” até “nem gostei/nem desgostei” para todas as amostras, com exceção do chá produzido por AC. De maneira geral, para os chás cafeinados, os genótipos EC43 e EC33 foram competitivos com as amostras comerciais AC e COM.

Nas médias gerais, apresentadas na Tabela 5.4, observa-se que os chás descafeinados, em geral, foram mais bem aceitos que os chás cafeinados, podendo essa preferência estar associada especialmente aos sabores mais suaves, em função das baixas concentrações de cafeína. A escolha por determinado produto pode ser atribuída a diferentes variáveis, especialmente ligadas aos hábitos desenvolvidos ao longo da vida dos consumidores. Entretanto, esse resultado deve ser considerado somente como uma tendência e não como afirmação, em função de os testes de aceitação para cada categoria não terem sido realizados pelos mesmos consumidores. Ainda é importante mencionar que alguns genótipos foram mais aceitos que os produtos disponíveis no mercado, o que reforça a necessidade de seleção de matérias-primas mais promissoras.

A partir das médias atribuídas para os dois tipos de chás, destaca-se a aceitação favorável e geral do chá mate por parte dos consumidores, da mesma maneira como já observado em outros estudos, tais como os de Heck; De Mejia (2007, p. 138), Godoy et al. (2013, p. 801) e Barboza; Casal (2018, p. 01). Assim, pelo

presente estudo, foi possível perceber que a tosta altera a composição química final do produto, e que os teores de cafeína proporcionam diferenças na percepção e aceitação do chá mate. Essas informações são de grande importância para o mercado, podendo-se assim produzir chás de melhor qualidade e padrão fitoquímico de interesse do consumidor.

Como recomendação, pode ser salientado que os testes de aceitação devem ser repetidos em outras regiões, e com maior número de provadores, para a ampliação da percepção dos gostos dos consumidores, e até mesmo a realização de estudos futuros com painel sensorial treinado. Além disso, seria pertinente a realização de testes de aceitação contendo amostras tanto descafeinadas quanto cafeinadas simultaneamente, permitindo melhor observação e comparação das amostras.

5.4 CONCLUSÃO

O processo de tosta reduziu a capacidade antioxidante, compostos fenólicos totais, as metilxantinas e os ácidos cafeoilquínicos dos genótipos estudados. De maneira geral, os chás descafeinados foram mais apreciados pelos consumidores que os cafeinados. Dentre os chás descafeinados e cafeinados, alguns genótipos foram igualmente ou mais bem apreciados pelos consumidores do que os chás comerciais, indicando a potencialidade para serem explorados comercialmente na produção de chá mate.

5.5 REFERÊNCIAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 14141**: escalas utilizadas em análise sensorial de alimentos e bebidas. Rio de Janeiro. 1998.

ALKHATIB, A.; ATCHESON, R. Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) metabolic, satiety and mood state effects at rest and during prolonged exercise. **Nutrients**, v. 9, n. 8, p. 882-896, 2017.

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. **Fruit and Fruit Products**. 17th ed. Fruit and Fruit Products, Gaithersburg: AOAC, 2000. 32 p.

ASHIHARA, H.; CROZIER, A. Biosynthesis and catabolism of caffeine in low-caffeine-containing species of *Coffea*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 47, p. 3425-3431, 1999.

ATHAYDE, M. L.; COELHO, G. C.; SCHENKEL, E. P. Populational diversity on methylxanthines content of mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil. Aquifoliaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26. n. 2. p. 275-279, 2007.

BARBOZA, H. C.; CAZAL, M. M. Avaliação da influência de características sensoriais e do conhecimento nutricional na aceitação do chá-mate. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, p. 01-06, 2018.

BASTOS, D. H. M.; FORNARI, A. C.; QUEIROZ, Y. S.; TORRES, E. A. F. S. Bioactive compounds content of Chimarrao infusions related to the moisture of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) leaves. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3; p. 399-404, 2006.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVÉLIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N° 277 de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2005.

CARDOZO JUNIOR, E. L.; DONADUZZI, C. M.; FERRARESE-FILHO, O.; FRIEDRICH, J. C.; GONELA, A.; STURION, J. A. Quantitative genetic analysis of methylxanthines and phenolic compounds in mate progenies. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 2, p. 171-177, 2010.

CARDOZO JÚNIOR, 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.

CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F.; BRUN, G. W.; ALMEIDA, D. E.; COGOI, L.; FERRARO, G.; FILIP, R. Supercritical fluid extraction of alkaloids from *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Journal of Food Engineering**, v. 100, n. 4, p. 656-661, 2010.

ESMELINDRO, M. C.; TONIAZZO, G.; WACZUK, A.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D. Caracterização físico-química da erva mate: influência das etapas do processamento industrial. **Food Science and Technology**, v. 22, n. 2, p. 199-204, 2002.

GODOY, R. C. B.; DELIZA, R.; GHENO, L. B.; LICODIEDOFF, S.; FRIZON, C. N. T.; RABANI, R. H.; SANTIS, G. G. Consumer perceptions, attitudes and acceptance of new and traditional mate tea products. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 801-807, 2013.

GÓMEZ-JUARISTI, M.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, S.; SARRIA, B.; BRAVO, L.; MATEOS, R. Absorption and metabolism of yerba mate phenolic compounds in humans. **Food Chemistry**, v. 240, p. 1028-1038, 2018.

HECK, C. I.; SCHMALKO, M.; DE MEJIA, E. G. Effect of growing and drying conditions on the phenolic composition of mate teas (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8394-8403, 2008.

HECK, C.; DE MEJIA, E. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, health implications and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 138-151, 2007.

HECKMAN, M. A.; WEIL, J.; DE 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, C. V.; RUIZ, H. Z.; HANSEL, F. A.; STUEPP, C. A.; WENDLING, I. **Efeito do solvente na extração de teobromina e cafeína em progênies de erva-mate**. Colombo: Embrapa Florestas, 2015, 6 p. (Comunicado Técnico, 363).

ISOLABELLA, S.; COGOI, L.; LÓPEZ, P.; ANESINI, C.; FERRARO, G.; FILIP, R. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 695-699, 2010.

KOTLER, P.; KELLER, K. L. **Administração de marketing**. 14. ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2012. 796 p.

LI, X. E.; JERVIS, S. M.; DRAKE, M. A. Examining extrinsic factors that influence product acceptance: A Review. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 5, p. 901-909, 2015.

MACFIE, H.J.; BRATCHELL, N. Designs to balance the effect of order of presentation. **Journal of Sensory Studies**, v. 4, n. 2, p. 129-148, 1989.

MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1370–1376, 2009.

MARTINEZ, H. E. P.; CLEMENTE, J. M.; LACERDA, J. S.; NEVES, Y. P.; PEDROSA, A. W. Nutrição mineral do cafeeiro e qualidade da bebida. **Revista Ceres**, v. 61, p. 838-848, 2014.

MATEOS, R.; BAEZA, G.; SARRIA, B.; BRAVO, L. 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.

PAGLIOSA, C. M.; PEREIRA, S. M.; VIEIRA, M. A.; COSTA, L. A.; TEIXEIRA, E.; AMBONI, R. D. M. C.; AMANTE, E. R. Bitterness in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves. **Journal of Sensory Studies**, v. 24, n. 3, p. 415-426, 2009.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v.26, n.9, p.1231-1237, 1999.

RESENDE, D. V. M.; STURION, A. J.; CARVALHO, P. A.; SIMEÃO, M. R.; FERNANDES, S. C. J. **Programa de melhoramento da erva-mate coordenado pela Embrapa: resultados da avaliação genética de populações, progênies, indivíduos e clones**. Colombo: Embrapa Florestas, 2000, 60 p. (Circular Técnica, 43).

RIACHI, L. G.; DE MARIA, C. A. B. Yerba mate: An overview of physiological effects in humans. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 308-320, 2017.

SAIDELLES, A. P. F.; KIRCHNER, R. M.; SANTOS, N. R. Z.; FLORES, E. M. M.; BARTZ, F. R. Análise de metais em amostras comerciais de erva-mate do sul do Brasil. **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 2, p. 259-265, 2010.

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. (Documentos, 333).

SILVAROLLA, M. B.; MAZZAFERA, P.; FAZUOLI, L. C. Plant biochemistry: a naturally decaffeinated arabica coffee. **Nature**, v. 429, p. 826, 2004.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

VALDUGA, A. T.; GONÇALVES, I. L.; DARTORA, N.; MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; SOUZA, L. M. Phytochemical profile of morphologically selected yerba-mate progenies. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 1, p. 114-120, 2016.

VALDUGA, A. T.; GONÇALVES, I. L.; MAGRI, E.; FINZER, J. R. D. Chemistry, pharmacology and new trends in traditional functional and medicinal beverages. **Food Research International**, v. 120, p. 478-503, 2019.

VARELA, P.; BELTRÁN, J.; FISZMAN, S. An alternative way to uncover drivers of coffee liking: Preference mapping based on consumers' preference ranking and open comments. **Food Quality and Preference**, v. 32, p. 152-159, 2014.

WENDLING, I.; STURION, J. A.; STUEPP, C. A.; REIS, C. A. F.; RAMALHO, M. A. P.; RESENDE, M. D. V. Early selection and classification of yerba mate progenies. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, n. 3, p. 279-286, 2018.

YANG, J. E.; LEE, J. Consumer perception and liking, and sensory characteristics of blended teas. **Food Science and Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 63-74, 2020.

YIM, H. S.; CHYE, F. Y.; RAO, V.; LOW, J. Y.; MATANJUN, P.; HOW, S. E.; HO, C. W. Optimization of extraction time and temperature on antioxidant activity of *Schizophyllum commune* aqueous extract using response surface methodology. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 275-283, 2013.

ZHU, B.; CHEN, L. B.; LU, M.; ZHANG, J.; HAN, J.; DENG, W. W.; ZHANG, Z. Z. 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.; HAMINIUK, C.W.I.; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A.; DEMIATE, I.M.; GRANATO, D. A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. **Food Research International**, v. 60, p. 246-254, 2014.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse foi um estudo pioneiro com relação a diferenciação e caracterização de frutos e sementes, anatomia foliar e compostos bioativos em morfotipos de erva-mate, abrindo perspectivas importantes para pesquisas futuras e usos potenciais. Especialmente no estado do Paraná, muito se fala de morfotipos de erva-mate, mas é necessário que esse conhecimento, ainda pouco explorado pelos ervateiros e produtores, seja alvo de mais estudos científicos. Como mencionado ao longo do Capítulo I, há grandes potencialidades na utilização silvicultural dos morfotipos, que vão desde a coleta de sementes e produção de mudas, até a indústria, proporcionando produtos diferenciados aos consumidores cada vez mais exigentes. Adicionalmente, essas características podem ainda ser incluídas como descritores morfológicos em registro de cultivares.

Além da relevância econômica e silvicultural, os morfotipos apresentam uma importância ecológica, e por que não paisagística? Essa gama de colorações e efeitos pode ser utilizada com sucesso na composição arbórea de parques e jardins. Para a continuidade dos estudos, recomenda-se a busca por populações naturais que apresentem essas diferentes características foliares, especialmente de cor e presença de tricomas, e a realização de estudos genéticos, para melhor compreender e desvendar essas diferenças morfológicas, se sofrem influência ambiental e se podem ser transferidas para seus descendentes. Ainda, como recomendação aos próximos pesquisadores, destaca-se que a identificação desses grupos de plantas é uma tarefa difícil, sendo necessário treinamento prévio, e a realização em dia ensolarado favorece a percepção e diferenciação dos morfotipos.

Com relação a propagação da espécie, o Capítulo II apresentou dados extremamente relevantes com relação a viabilidade das sementes, evidenciando a boa execução da estratificação e a qualidade fisiológica dos lotes estudados. A propagação seminal, além de ser o método tradicional e eficiente, é a alternativa mais barata para o pequeno produtor e viveirista, além de promover a manutenção da variabilidade genética da espécie. Entretanto, o período entre a coleta de sementes e a muda pronta para plantio pode ser maior que um ano, e pesquisas buscando redução desse tempo e homogeneidade na produção de mudas podem beneficiar esse setor.

Destacando-se a importância de solucionar esse empecilho silvicultural que é a dormência embrionária das sementes da erva-mate, a utilização da câmara fria demonstrou potencial para o desenvolvimento embrionário e manutenção da viabilidade, entretanto, são recomendados mais estudos a fim de combinar esse e outros métodos. Pode-se explorar, por exemplo, a alternância de temperaturas (15 - 25 °C) por um período de 30 a 60 dias e posteriormente realizar a estratificação convencional. Ou ainda a combinação entre estratificação a frio (5 °C) por 60 a 90 dias e posterior estratificação convencional, para verificar se há redução no período total.

Os resultados obtidos no Capítulo III permitem enfatizar que o conhecimento dos efeitos da sazonalidade e dos genótipos é de extrema relevância para a silvicultura da erva-mate. A partir disso é possível realizar amplo planejamento no âmbito do melhoramento genético, seleção dos melhores genótipos, implantação de ervais com características específicas, melhor época para a propagação vegetativa, e período onde há a maior ou menor síntese de compostos alvo, como a cafeína. Essas informações são relevantes para produtores e indústria ervateira em geral, podendo haver melhor programação e até mesmo o fracionamento das colheitas em função de um produto diferenciado, aplicação de tratamentos culturais específicos, e a seleção de matrizes e/ou o melhor período para obtenção da matéria-prima.

Para as questões da rizogênese, recomenda-se maiores estudos, especialmente para os genótipos que apresentam diferencial na síntese de compostos químicos, visando melhorar as porcentagens de enraizamento para posterior cultivo em campo, como por exemplo para EC18, EC19, EC30 e EC51, com reduzidos teores de cafeína, e os genótipos EC25, EC38 e EC40 por expressarem elevados teores. Como seguimento para essa proposta, pode-se pensar em trabalhos visando uma curva com concentrações de AIB, de modo a verificar se menores ou maiores concentrações poderiam melhorar o enraizamento dessas plantas. Além da coleta na primavera ou verão, pode-se explorar diferentes porções das brotações, a fim de verificar se há variação de enraizamento, ou também, deixar as estacas por um período de 130 dias em leito de enraizamento. A estaquia mostra-se viável para propagação de erva-mate, especialmente por ser fácil e de rápida aplicação, assim, o investimento em pesquisa e adequação da técnica tende a alcançar resultados ainda mais expressivos do que o observado neste estudo.

Esse também é o primeiro estudo que relata a aceitação por consumidores de chá mate proveniente de genótipos com diferentes teores de cafeína, demonstrando

o potencial, especialmente para os produtos considerados descafeinados. Além disso, o Capítulo IV permite enfatizar a importância de se conhecer a matéria-prima e os efeitos que a tosta traz para o produto final. Assim, a união dessas informações permite uma visão geral de mercado, e no caso da produção de chás, pode-se oferecer produtos de melhor qualidade e padrão fitoquímico de interesse do consumidor. Ressalta-se que esse perfil de estudo pode e deve ser aplicado para os diversos produtos provenientes da erva-mate. Ainda, a partir da realização dos testes de aceitação foi possível perceber uma significativa variação de sabores nos chás, e os relatos dos provadores permite afirmar que há um amplo mercado a ser explorado para este segmento.

REFERÊNCIAS GERAIS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 14141**: escalas utilizadas em análise sensorial de alimentos e bebidas. Rio de Janeiro. 1998.

ALBUQUERQUE, K. A. D.; SANTOS, G. J. S.; MACHADO, M. A. B. L. Influência do tamanho das sementes na germinação de *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *leiostachya* Benth. **Revista Ouricuri**, v. 8, n. 2, p.49-57, 2018.

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MARIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e Doenças do Eucalipto**. 2ª ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2009.

ALKHATIB, A.; ATCHESON, R. Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) metabolic, satiety and mood state effects at rest and during prolonged exercise. **Nutrients**, v. 9, n. 8, p. 882-896, 2017.

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. **Fruit and Fruit Products**. 17th ed. Fruit and Fruit Products, Gaithersburg: AOAC, 2000. 32 p.

ASHIHARA, H.; CROZIER, A. Biosynthesis and catabolism of caffeine in low-caffeine-containing species of *Coffea*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 47, p. 3425-3431, 1999.

ATHAYDE, M. L.; COELHO, G. C.; SCHENKEL, E. P. Populational diversity on methylxanthines content of mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 2, p. 275-279, 2007.

BARBOZA, H. C.; CAZAL, M. M. Avaliação da influência de características sensoriais e do conhecimento nutricional na aceitação do chá-mate. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, p. 01-06, 2018.

BARZOTTO, I. L. M.; ALVES, L. F. A. Bioecologia e manejo de *Gyropsylla spegazziniana* em erva-mate. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 4, p. 457-464, 2013.

BASTIAS, C. C.; VALLADARES, F.; RICOTE, N.; BENAVIDES, R. Local canopy diversity does not influence phenotypic expression and plasticity of tree seedlings exposed to different resource availabilities. **Environmental and Experimental Botany**, v. 156, n. 1, p. 38-47, 2018.

BASTOS, D. H. M.; FORNARI, A. C.; QUEIROZ, Y. S.; TORRES, E. A. F. S. Bioactive compounds content of Chimarrao infusions related to the moisture of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) leaves. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3; p. 399-404, 2006.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M; NONOGAKI, H. **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy**. 3rd Edition, Springer, New York, 2013. 392 p.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination: 2. viability, dormancy and environmental control**. Berlin: Springer-Verlag, vol.2, 1982. 375 p.

BISPO, J. S.; COSTA, D. C. C.; GOMES, S. E. V.; OLIVEIRA, G. M.; MATIAS, J. R.; RIBEIRO, R. C.; DANTAS, B. F. Size and vigor of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan seeds harvested in Caatinga areas. **Journal of Seed Science**, v. 39, n. 4, p. 363-373, 2017.

BITENCOURT, J.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; WENDLING, I.; KOEHLER, H. S. Enraizamento de estacas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hill.) provenientes de brotações rejuvenescidas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 277-281, 2009.

BLUM-SILVA, C. H.; CHAVES, V. C.; SCHENKEL, E. P.; COELHO, G. C.; REGINATTO, F. H. 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.

BORILLE, A. M. W.; REISSMANN, C. B.; FREITAS, R. J. S. Relação entre compostos fitoquímicos e nitrogênio em morfotipos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 23, n. 1, p. 183-198, 2005.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel - Wissenschaft und -Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N° 277 de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399 p.

BRITO, F. C.; ÁVILA, S.; PACHECO, S. D. G.; LAZZAROTTO, M. **Estágios de maturação dos frutos de erva-mate, *Ilex paraguariensis***. Colombo: Embrapa Florestas, 2019. 10 p. (Comunicado Técnico, 433).

BRITO, F. C.; GOSMANN, G.; OLIVEIRA, G. T. Extracts of the unripe fruit of *Ilex paraguariensis* as a potential chemical control against the golden apple snail *Pomacea analiculata* (Gastropoda, Ampullariidae). **Natural Product Research**, v. 33, n. 16, p. 1-4, 2018.

BRONDANI, G. E.; ARAUJO, M. A.; WENDLING, I.; KRATZ, D. Enraizamento de miniestacas de erva-mate sob diferentes ambientes. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 57, p. 29-38, 2008.

BRONDANI, G. E.; WENDLING, I.; ARAÚJO, M. A.; SANTIN, D.; BENEDETTI, E. L.; ROVEDA, L. F. Composições de substratos e ambientes de enraizamento na estaquia de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. **Floresta**, v. 39, n. 1, p. 41-49, 2009.

BRONDANI, G. E.; WENDLING, I.; SANTIN, D.; BENEDETTI, E. L.; ROVEDA, L. F.; ORRUTÉA, A. G. Ambientes de enraizamento e substratos na miniestaquia da erva-mate. **Scientia Agraria**, v. 8, n. 3, p. 257-267, 2007.

CARDOZO JUNIOR, E. L.; DONADUZZI, C. M.; FERRARESE-FILHO, O.; FRIEDRICH, J. C.; GONELA, A.; STURION, J. A. Quantitative genetic analysis of methylxanthines and phenolic compounds in mate progenies. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 2, p. 171-177, 2010.

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.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Vol. 2. Brasília: Embrapa Informações Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2006. 627p.

CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F.; BRUN, G. W.; ALMEIDA, D. E.; COGOI, L.; FERRARO, G.; FILIP, R. Supercritical fluid extraction of alkaloids from *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Journal of Food Engineering**, v. 100, n. 4, p. 656-661, 2010.

CATAPAN, M. I. S. **Influência da temperatura, substrato e luz na germinação de sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil.** 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1998.

CHAICOUSKI, A.; SILVA, J. E.; TRINDADE, J. L. F.; CANTERI, M. H. G. Determinação da quantidade de compostos fenólicos totais presentes em extratos líquido e seco de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 16, n. 1, p. 33-41, 2014.

CHEOK, C. Y.; SALMAN, H. A. K.; SULAIMAN, R. Extraction and quantification of saponins: a review. **Food Research International**, v. 59, p. 16-40, 2014.

CHIEN, C. T.; CHEN, S. Y.; CHIEN, T. Y.; BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. Nondeep simple morphophysiological dormancy in seeds of *Ilex maximowicziana* from northern (subtropical) and southern (tropical). **Ecological Research**, Taiwan, v. 26, n. 1, p. 163-171, 2011.

COELHO, G. C.; ATHAYDE, M. L.; SCHENKEL, E. P. Methylxanthines of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. var. *vestita* Loes. and var. *paraguariensis*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 2, p. 153-158, 2001.

CUQUEL, F. L.; CARVALHO, M. L. M.; CHAMMA, H. M. C. P. Avaliação de métodos de estratificação para a quebra de dormência de sementes de erva-mate. **Scientia Agricola**, v. 51, n. 3, p. 415-421, 1994.

DANIEL, O. **Erva-mate: Sistema de produção e processamento industrial.** 1ª Ed. Dourados: UFGD, 2009.

DIAS, D. C. F. S.; MARCOS-FILHO, J. Testes de condutividade elétrica para avaliação do vigor de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Scientia Agricola**, v. 53, n. 1, p. 31-42, 1996.

DIAS, P. C.; OLIVEIRA, L. S.; XAVIER, A.; WENDLING, I. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 32, p. 72, p. 453-462, 2012.

DIAZ, V. S. **Diversidade genética, estrutura genética espacial e fluxo gênico da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.), em dois fragmentos florestais na área de entorno do Parque Nacional do Iguaçu.** 89 f. (Dissertação de Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/USP. Piracicaba, 2013.

DOLCE, N. R.; MROGINSKI, L. A.; REY, H. Y. Endosperm and endocarp effects on the *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (Aquifoliaceae) seed germination. **Seed Science and Technology**, v. 38, n. 2, p. 441-448, 2010.

DOLCE, N. R.; MROGINSKI, L. A.; REY, H. Y. Enhanced seed germination of *Ilex dumosa* R. (Aquifoliaceae) through in vitro culture of cut pyrenes. **HortScience**, v. 46, n. 2, p. 278-281, 2011.

DUARTE, M. M.; MIRESKI, M. C.; OLISZESKI, A.; WENDLING, I.; STUEPP, C. A. Rooting of yerba mate cuttings with different lengths. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 5, n. 1, p. 05-11, 2019.

DUARTE, M. R.; GOLAMBIUK, G. Ilustração de caracteres microscópicos de drogas vegetais para o controle de qualidade farmacognóstico. III. Erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae). **Visão Acadêmica**, v. 9, n. 1, p. 07-12, 2008.

ESMELINDRO, M. C.; TONIAZZO, G.; LOPES, D.; OLIVEIRA, D.; DARIVA, C. Effects of processing conditions on the chemical distribution of mate tea leaves extracts obtained from CO₂ extraction at high pressures. **Journal of Food Engineering**, v. 70, n. 4, p. 588-592, 2005.

ESMELINDRO, M. C.; TONIAZZO, G.; WACZUK, A.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D. Caracterização físico-química da erva mate: influência das etapas do processamento industrial. **Food Science and Technology**, v. 22, n. 2, p. 199-204, 2002.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: EMBRAPA, 2005. 221p.

FERMINO JÚNIOR, P. C.; FOCKINK, G. D. Anatomia foliar de plantas jovens de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hill.) sob diferentes níveis de sombreamento. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 16, n. 3, p. 335-341, 2017.

FERNANDES, C. E.; KUHN, F.; SCAPINELLO, J.; LAZAROTTO, M.; BOHN, A., BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; ZANATTA, M. S.; ZANATTA, L.; DAL MAGRO, J.; OLIVEIRA, J. V. Phytochemical profile, antioxidant and hypolipemiant potential of *Ilex paraguariensis* fruit extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 81, p. 139-146, 2016.

FERREIRA, A. G.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S.; CUNHA, G. G. Fisiocologia de *Ilex paraguariensis* com ênfase na embriologia experimental. In: WINGE, H.; FERREIRA,

A. G.; MARIATH, J. E. A.; TARASCONI, L. C. **Erva-mate: biologia e cultura no Cone Sul**. Porto Alegre, Editora Universidade UFRGS, 1995. p. 161-172.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323 p.

FLORES, A. V.; BORGES, E. E. L.; GONÇALVES, J. F. C.; GUIMARÃES, V. M.; ATAÍDE, G. M.; BARROS, D. P.; PEREIRA, M. D. Efeito do substrato, cor e tamanho de sementes na germinação e vigor de *Melanoxylon brauna*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 34, n. 78, p. 141-147, 2014.

GALÍNDEZ, G.; CECCATO, D.; BUBILLO, R.; LINDOW-LÓPEZ, L.; MALAGRINA, G.; ORTEGA-BAES, P.; BASKIN, C. C. Three levels of simple morphophysiological dormancy in seeds of *Ilex* (Aquifoliaceae) species from Argentina. **Seed Science Research**, v. 28, n. 2, p. 131-139, 2018.

GODOY, R. C. B.; DELIZA, R.; GHENO, L. B.; LICODIEDOFF, S.; FRIZON, C. N. T.; RABANI, R. H.; SANTIS, G. G. Consumer perceptions, attitudes and acceptance of new and traditional mate tea products. **Food Research Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 801-807, 2013.

GÓMEZ-JUARISTI, M.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, S.; SARRIA, B.; BRAVO, L.; MATEOS, R. Absorption and metabolism of yerba mate phenolic compounds in humans. **Food Chemistry**, v. 240, p. 1028-1038, 2018.

GOTTLIEB, A. M.; GIBERTI, G. C.; POGGIO, L. Molecular analyses of the genus *Ilex* (Aquifoliaceae) in southern South America, evidence from AFLP and ITS sequence data. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 2, p. 352-69, 2005.

HARTMANN, H. T.; KERSTER, D. E.; DAVIES JR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: principles and practices**. 9th ed. Boston: Prentice Hal. 2011. 1024 p.

HECK, C. I.; SCHMALKO, M.; DE MEJIA, E. G. Effect of growing and drying conditions on the phenolic composition of mate teas (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8394-8403, 2008.

HECK, C.; DE MEJIA, E. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, health implications and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 138-151, 2007.

HECKMAN, M. A.; WEIL, J.; DE 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, C. V.; RUIZ, H. Z.; HANSEL, F. A.; STUEPP, C. A.; WENDLING, I. **Efeito do solvente na extração de teobromina e cafeína em progênies de erva-mate**. Colombo: Embrapa Florestas, 2015, 6 p. (Comunicado Técnico, 363).

IBGE. **Produção Agrícola Municipal – PAM 2018**. Rio de Janeiro, 2019.

IBGE. **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura 2018 – PEVS 2018**. Rio de Janeiro, v. 33, p. 1-8, 2019.

ISOLABELLA, S.; COGOI, L.; LÓPEZ, P.; ANESINI, C.; FERRARO, G.; FILIP, R. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 695-699, 2010.

KADU, C. A. C.; PARICH, A.; SCHUELER, S.; KONRAD, H.; MULUVI, G. M.; EYOG-MATIG, O.; MUCHUGI, A.; WILLIAMS, V. L.; RAMAMONJISOA, L.; KAPINGA, C.; FOAHOM, B.; KATSVANGA, C.; HAFASHIMANA, D.; OBAMA, C.; VINCETI, B.; SCHUMACHER, R.; GEBUREKA, T. Bioactive constituents in *Prunus africana*: geographical variation throughout Africa and associations with environmental and genetic parameters. **Phytochemistry**, v. 83, p. 70-78, 2012.

KOTLER, P.; KELLER, K. L. **Administração de marketing**. 14. ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2012. 796 p.

KRATZ, D.; PIRES, P. P.; STUEPP, C. A.; WENDLING, I. Produção de mudas de erva-mate por miniestaquia em substratos renováveis. **Floresta**, v. 45, n. 3, p. 609-616, 2015.

KUNIYOSHI, Y. S. **Morfologia da semente e da germinação de 25 espécies arbóreas de uma floresta com Araucária**. 231 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1983.

LEE, T. T.; STARRATT, A. N.; JEVNIKAR, J. J. Regulation of enzymic oxidation of indole-3-acetic acid by phenols: Structure-activity relationships. **Phytochemistry**, v. 21, n. 3, p. 517-523, 1982.

LI, X. E.; JERVIS, S. M.; DRAKE, M. A. Examining extrinsic factors that influence

product acceptance: A Review. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 5, p. 901-909, 2015.

LUNA, C. V., GONZALEZ, A. M., MROGINSKI, L. A.; SANSBERRO, P. A. Anatomical and histological features of *Ilex paraguariensis* leaves under different *in vitro* shoot culture systems. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 129, p. 457-467, 2017.

MACFIE, H.J.; BRATCHELL, N. Designs to balance the effect of order of presentation. **Journal of Sensory Studies**, v. 4, n. 2, p. 129-148, 1989.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2 ed. Londrina, Paraná: ABRATES, 2015. 660 p.

MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1370–1376, 2009.

MARTINEZ, H. E. P.; CLEMENTE, J. M.; LACERDA, J. S.; NEVES, Y. P.; PEDROSA, A. W. Nutrição mineral do cafeeiro e qualidade da bebida. **Revista Ceres**, v. 61, p. 838-848, 2014.

MATEOS, R.; BAEZA, G.; SARRIA, B.; BRAVO, L. 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.

MEDEIROS, A. C. S.; AMAZONAS, M. A. L. A.; GRIGOLETTI JUNIOR, A.; URBEN, A. F. Identificação de fungo lignocelulolítico em sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: I Congresso Sul-Americano da erva-mate; II Reunião Técnica do Cone Sul sobre a cultura da erva-mate, 1997, Curitiba, PR. **Anais...** 1997. p. 420.

MIRESKI, M. C.; BUHRER, C. B.; HELM, C. V.; WENDLING, I.; VIEIRA, E. S. N.; SANTOS, A. F.; NOGUEIRA, A. C. Polyphenols in yerba mate seeds: potential inhibitors of germination. **Floresta**, Curitiba, v. 48, n. 4, p. 593-600, 2018.

MIRESKI, M. C.; DUARTE, M. M.; STUEPP, C. A.; WENDLING, I. Rooting of *Ficus enormis* mini-cuttings with different lengths. **Floresta**, v. 49, n. 4, p. 615-622, 2019a.

MIRESKI, M. C.; GUEDES, R. S.; WENDLING, I.; PEÑA, M. L. P.; MEDEIROS, A. C. S. Secagem na viabilidade e desenvolvimento embrionário de sementes de *Ilex paraguariensis*. **Ciência Florestal**, v. 29, n. 3, p. 1354-1362, 2019.

MOSELE, S. H.; RODIGHERI, H. R.; PENTEADO JUNIOR, J. Diagnóstico da erva-mate na região do Alto Uruguai gaúcho. **Perspectiva**, v. 18, n. 64, p. 7-17, 1994.

NAKAMURA, K. L.; CARDOZO JUNIOR, E. L.; DONADUZZI, C. M.; SCHUSTER, I. Genetic variation of phytochemical compounds in progenies of *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Crop Breeding Applied Biotech**, v. 9, p. 116-123, 2009.

NASCIMENTO, B.; SÁ, A. C. S.; LEMOS, L. B.; ROSA, D. P.; PEREIRA, M. O.; NAVROSKI, M. C. Three epicormic shoot techniques in *I. paraguariensis* mother trees and its cutting according to the material rejuvenation degree. **Cerne**, v. 24, n. 3, p. 240-248, 2018.

NERY, F. C.; ALVARENGA, A. A.; JUSTO, C. F.; CASTRO, E. M.; SOUZA, G. S.; ALVES, E. Aspectos anatômicos de folhas de plantas jovens de *Calophyllum brasiliense* Cambess. submetidas a diferentes níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 129-131, 2007.

NIKLAS, C. O. Estudios embriológicos y citológicos em la yerba mate - *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). **Bonplandia**, v. 6, n. 1, p. 45-56, 1987.

NORBERTO, P. M.; CHALFUN, N. N. J.; PASQUAL, M.; VEIGA, R. D.; PEREIRA, G. E.; MOTA, J. H. Efeito da época de estaquia e do AIB no enraizamento de estacas de figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 3, p. 533-54, 2001.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.

OLIVEIRA, Y. M. M.; ROTTA, E. Área de distribuição natural de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). In: Seminário Sobre Atualidades e Perspectivas Florestais, 10: Silvicultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), 1983, Curitiba. **Anais...Curitiba: EMBRAPA-CNPQ**, 1985. p. 17-36. (Documentos, 15).

PAGLIOSA, C. M.; PEREIRA, S. M.; VIEIRA, M. A.; COSTA, L. A.; TEIXEIRA, E.; AMBONI, R. D. M. C.; AMANTE, E. R. Bitterness in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves. **Journal of Sensory Studies**, v. 24, n. 3, p. 415-426, 2009.

PIMENTEL, N.; LENCINA, K. H.; KIELSE, P.; RODRIGUES, M. B.; SOMAVILLA, T. M.; BISOGNIN, D. A. Produtividade de minicepas e enraizamento de miniestacas de clones de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). **Ciência Florestal**, v. 29, n. 2, p. 559-570, 2019.

PIRES, D. A. C. K; PEDRASSANI, D.; DALLABRIDA, V. R.; BENEDETTI, E. L. A erva-mate no planalto norte catarinense: os compostos bioativos como variável na determinação das especificidades necessárias ao reconhecimento como indicação geográfica. **Desenvolvimento Regional em Debate**, v. 6, n. 2, p. 207-227, 2016.

PIRES, E. L.; RESENDE, M. D. V.; SILVA, R. S.; RESENDE, M. F. R. Jr. **Genética florestal**. Viçosa, MG: Arka, 2011. 318p.

PRYCHID, C. J.; RUDALL, P. J. Calcium oxalate crystals in monocotyledons: a review of their structure and systematics. **Annals of Botany**, v. 84, p. 725-739, 1999.

RAKOCEVIC, M.; BORSATO, A. V.; BONA, C.; MEDRADO, M. J. S. Distribuição de estômatos em folhas de diferentes idades de erva-mate cultivada em monocultura e subbosque. In: CONGRESO SUDAMERICANO DE LA YERBA MATE, 5, 2011. **Actas...** Posadas, INYM/INTA/INaM, 2011. p.45-50.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231-1237, 1999.

REGINATTO, F. H.; ATHAYDE, M. L.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Methylxanthines accumulation in *Ilex* species - Caffeine and theobromine in yerba-mate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, n. 6, p. 443-446, 1999.

REISSMANN, C. B.; DÜNISCH, O.; BOEGER, M. R. Beziehung Zwischen Ernährungsbiologischen (Fe, Mn, Ca) und Strukturellen Merkmalen Ausgewählter Morphotypen Der Mate-Pflanze (*Ilex paraguariensis* St. Hil). In: HÜTTTL, R. F. (Org.). Boden, **Wald und Wasser**. 1. ed. Germany: KLUVER, 2003, p. 146-171.

RESENDE, D. V. M.; STURION, A. J.; CARVALHO, P. A.; SIMEÃO, M. R.; FERNANDES, S. C. J. **Programa de melhoramento da erva-mate coordenado pela Embrapa: resultados da avaliação genética de populações, progênies, indivíduos e clones**. Colombo: Embrapa Florestas, 2000, 60 p. (Circular Técnica, 43).

RESENDE, M. D. V.; STURION, J. A.; MENDES, S. **Genética e melhoramento da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Curitiba: Embrapa-CNPQ, 1995. 33 p.

RIACHI, L. G.; DE MARIA, C. A. B. Yerba mate: An overview of physiological effects in humans. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 308-320, 2017.

RIBEIRO, D. M.; BRAGANÇA, S. M.; GONELI, A. L. D.; DIAS, D. C. F. S.; ALVARENGA, E. M. Teste de condutividade elétrica para avaliar o vigor de sementes em milho-pipoca (*Zea mays* L.). **Revista Ceres**, v. 56, n. 6, p. 772-776, 2009.

ROSSA, Ü. B.; ANGELO, A. C.; MAZUCHOWSKI, J. Z.; WESTPHALEN, D. J.; FRIZON, C. N. T.; MARTINS, C. E. N. Influência da luminosidade e fertilizantes nos teores de metilxantinas e compostos fenólicos em folhas de erva-mate. **Ciência Florestal**, v. 27, n. 4, p. 1365-1374, 2017.

SÁ, F. P. ***Ilex paraguariensis* A.St.-Hil: miniestaquia, caracterização anatômica e bioquímica e, estimativa do enraizamento por espectroscopia NIR**. 143 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Produção Vegetal) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2018.

SÁ, F. P.; PORTES, D. C.; WENDLING, I.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Minicutting technique of yerba mate in four seasons of the year. **Ciência Florestal**, v. 28, n. 4, p. 1431-1442, 2018.

SAIDELLES, A. P. F.; KIRCHNER, R. M.; SANTOS, N. R. Z.; FLORES, E. M. M.; BARTZ, F. R. Análise de metais em amostras comerciais de erva-mate do sul do Brasil. **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 2, p. 259-265, 2010.

SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A.; COLLAVINO, M. M. *In vitro* culture of rudimentary embryos of *Ilex paraguariensis*: responses to exogenous cytokinins. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 17, n. 2, p. 101-105, 1998.

SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A. (2000). Efectos de bajas temperaturas en la germinación in vitro de embriones inmaduros de yerba mate. In: II Congresso Sul-Americano da Erva-Mate e III Reunião Técnica da Erva-Mate, 2000, UFRGS and FEPAGRO, Porto Alegre, RS. **Anais...** 2000. p. 443-446.

SANTIN, D.; WENDLING, I.; BENEDETTI, E. L.; MORANDI, D.; DOMINGOS, D. M. Sobrevivência, crescimento e produtividade de plantas de erva-mate produzidas por

miniestacas juvenis e por sementes. **Ciencia Florestal**, v. 25, n. 3, p. 571-579, 2015.

SCHAPARINI, P. S.; VIECELLI, C. A. Superação de dormência de sementes de erva-mate. **Cultivando o Saber**, v. 4, n. 4, p. 163-170, 2011.

SCHERER, R.; URFER, P.; MAYOL, M. R.; BELINGHERI, L. D.; MARX, F.; JANSSENS, M. J. J. Inheritance studies of caffeine and theobromine content of Mate (*Ilex paraguariensis*) in Misiones, Argentina. **Euphytica**, v. 126, n. 2, p. 203-210, 2002.

SCHUBERT, A., PEREIRA, D. F.; ZANIN, F. F.; ALVES, S. H.; BECK, R. C. R.; ATHAYDE, M. L. Comparison of antioxidant activities and total polyphenolic and methylxanthine contents between the unripe fruit and leaves of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. **Pharmazie**, v. 62, p. 876-880, 2007.

SCHUBERT, A.; ZANIN, F. F.; PEREIRA, D. F.; ATHAYDE, M. L. Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* A. St. - Hil. (erva-mate) em Ijuí e Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1233-1236, 2006.

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. (Documentos, 333).

SHIMAKURA, S. **Correlação**. In: CE003 - Estatística II. Paraná: Departamento de Estatística da Universidade Federal do Paraná, 2006. 71-78 p. Disponível em: <<http://leg.ufpr.br/~paulojus/CE003/ce003/node8.html>>. Acesso em 14 de fevereiro de 2020.

SILVA, C. G. F.; CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F.; MARCZAK, L. D. F. Selective extraction of saponins from *Ilex paraguariensis* St.-Hil. unripe fruits. **Food and Bioproducts Processing**, v. 111, p. 72-82, 2018.

SILVAROLLA, M. B.; MAZZAFERA, P.; FAZUOLI, L. C. Plant biochemistry: a naturally decaffeinated arabica coffee. **Nature**, v. 429, p. 826, 2004.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SOUSA, V. A.; AGUIAR, A. V.; SPOLADORE, J. Metodologia para a polinização controlada em *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. - Aquifoliaceae. **Revista Árvore**, v. 39, n. 2, p. 315-323, 2015.

SPICHIGER, R.; SAVOLAINEN, V.; MANEN, JEAN-FRANÇOIS. Systematic affinities of *Aquifoliaceae* and *Icacinaceae* from molecular data analysis. **Candollea**, v. 48, n. 2, p. 459-464, 1993.

STUEPP, C. A.; BITENCOURT, J.; WENDLING, I. KOEHLER, H. S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Age of stock plants, seasons and iba effect on vegetative propagation of *Ilex paraguariensis*. **Revista Arvore**, v. 41, n. 2, p.01-07, 2017a.

STUEPP, C. A.; BITENCOURT, J.; WENDLING, I.; KOEHLER, H. S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Métodos de resgate e idades cronológicas de plantas-matrizes no enraizamento de brotações epicórmicas de *Ilex paraguariensis*. **Ciência Florestal**, v. 27, n. 4, p. 1409-1413, 2017b.

STUEPP, C. A.; DE BITENCOURT, J.; WENDLING, I.; KOEHLER, H. S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Propagação de erva-mate utilizando brotações de anelamento e de cepa em matrizes de duas idades. **Cerne**, v. 21, n. 4, p. 519-526, 2015.

STUEPP, C. A.; WENDLING, I.; XAVIER, A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. 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.; CORREA, G.; RESENDE, M. D. V.; CARDOZO JUNIOR, E. L.; DONADUZZI, C. M. **Controle genético dos teores de polifenóis totais, taninos e cafeína em progênies de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) cultivadas em três classes de solos**. Colombo: Embrapa Florestas, 2004. 16 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 16).

STURION, J. A.; RESENDE, M. D. V. **Melhoramento genético da erva-mate**. 1 Ed. Colombo: Embrapa Florestas, 2010. 274 p.

STURION, J. A.; STUEPP, C. A.; WENDLING, I. Genetic parameters estimates and visual selection for leaves production in *Ilex paraguariensis*. **Bragantia**, v. 76, n. 4, p. 492-500, 2017.

TAVARES, F. R.; PICHETH, J. A.; MASCHIO, L. M. A. Alguns fatores relacionados com a estaquia da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) St. Hil. In: CONGRESSO

FLORESTAL ESTADUAL, 7., 1992, Nova Prata. **Anais...** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1992. p. 626-639.

TEZUKA, T.; YOKOYAMA, H.; HIDEYUKI, T.; SHIOZAKI, S.; ODA, M. Factors affecting seed germination of *Ilex latifolia* and *I. rotunda*. **HortScience**, v. 48, n. 3, p. 352-356, 2013.

TFOUNI, S. A. V.; CAMARA, M. M.; KAMIKATA, K.; GOMES, F. M. L.; FURLANI, R. P. Z. Caffeine in teas: levels, transference to infusion and estimated intake. **Food Science Technology**, v. 38, n. 4, p. 661-666, 2018.

VALDUGA, A. T.; GONÇALVES, I. L.; DARTORA, N.; MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; SOUZA, L. M. Phytochemical profile of morphologically selected yerba-mate progenies. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 1, p. 114-120, 2016.

VALDUGA, A. T.; GONÇALVES, I. L.; MAGRI, E.; FINZER, J. R. D. Chemistry, pharmacology and new trends in traditional functional and medicinal beverages. **Food Research International**, v. 120, p. 478-503, 2019.

VARELA, P.; BELTRÁN, J.; FISZMAN, S. An alternative way to uncover drivers of coffee liking: Preference mapping based on consumers' preference ranking and open comments. **Food Quality and Preference**, v. 32, p. 152-159, 2014.

VIDOR, M. A.; RUIZ, C. P.; MORENO, S. V.; FLOSS, P. A. Marcadores moleculares em estudos de caracterização de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.): o sabor. **Ciência Rural**, v. 32, n. 3, p. 415-420, 2002.

WENDLING, I. Propagação Vegetativa de Erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire): estado da arte e tendências futuras. Colombo: Embrapa Florestas, 2004. 46p. (Documentos 91).

WENDLING, I.; BRONDANI, G. E.; BIASSIO, A.; DUTRA, L. F. Vegetative propagation of adult *Ilex paraguariensis* trees through epicormics shoots. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 1, p. 117-125, 2013.

WENDLING, I.; SANTIN, D. **Propagação e nutrição de erva-mate**. 1 Ed. Brasília: EMBRAPA, 2015. 195p.

WENDLING, I.; STURION, J. A.; REIS, C. A. F.; STUEPP, C. A.; PEÑA, M. L. P. Indirect and expedite assessment of *Ilex paraguariensis* commercial yield. **Cerne**, v. 22, n. 3 p. 241-248, 2016.

WENDLING, I.; STURION, J. A.; STUEPP, C. A.; REIS, C. A. F.; RAMALHO, M. A. P.; RESENDE, M. D. V. Early selection and classification of yerba mate progenies. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, n. 3, p. 279-286, 2018.

WENDLING, I.; TRUEMAN, S. J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry-part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. **New Forests**, v. 45, p. 473-486, 2014.

WIESMAN, Z.; LAVEE, S. Enhancement of IBA stimulatory effect on rooting of olive cultivar stem cutting. **Scientia Horticulturae**, v.65, p.189-198, 1995.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2009. 272 p.

XIAO, K.; MAO, X.; LIN, Y.; XU, H.; ZHU, Y.; CAI, Q; XIE, H; ZHANG, J. Trichome, a functional diversity phenotype in plant. **Molecular Biology**, v. 6, n. 1, p. 01-06, 2017.

YANG, J. E.; LEE, J. Consumer perception and liking, and sensory characteristics of blended teas. **Food Science and Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 63-74, 2020.

YANG, Y.; ZHANG, D.; LI, Z.; JIN, X.; DONG, J. Immature embryo germination and its micropropagation of *Ilex crenata* Thunb. **HortScience**, v. 50, p.733-737, 2015.

YIM, H. S.; CHYE, F. Y.; RAO, V.; LOW, J. Y.; MATANJUN, P.; HOW, S. E.; HO, C. W. Optimization of extraction time and temperature on antioxidant activity of *Schizophyllum commune* aqueous extract using response surface methodology. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 275-283, 2013.

YIN, Y.; KATAHIRA, R.; ASHIHARA, H. Metabolism of purine alkaloids and xanthine in leaves of mate (*Ilex paraguariensis*). **Natural Product Communications**, v. 10, n. 5, p. 707-712, 2015.

ZANON, A. **Produção de sementes de erva-mate**. Curitiba, EMBRAPA-CNPQ, 1988. 08 p. (Circular técnica n. 17).

ZHU, B.; CHEN, L. B.; LU, M.; ZHANG, J.; HAN, J.; DENG, W. W.; ZHANG, Z. Z. 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.; HAMINIUK, C.W.I.; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A.; DEMIATE, I.M.; GRANATO, D. A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. **Food Research International**, v. 60, p. 246-254, 2014.