



UDESC

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC

CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE - CEO

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Compostos fenólicos totais,
atividades antimicrobiana e alelopática em
função dos métodos de extração e da
época do ano em progênies de erva-mate**

BRUNA CARIOLATO MOREIRA

PINHALZINHO, 2020

BRUNA CARIOLATO MOREIRA

**COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E
ALELOPÁTICA EM FUNÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E DA ÉPOCA
DO ANO EM PROGÊNIES DE ERVA-MATE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia em Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Cassandro Vidal Talamini do Amarante

Coorientador: Prof. Dr. Weber da Silva Robazza

PINHALZINHO, SC

2020

Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CEO/UDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Moreira, Bruna Cariolato

Compostos fenólicos totais, atividades antimicrobiana e alelopática em função dos métodos de extração e da época do ano em progênies de erva-mate / Bruna Cariolato Moreira. -- 2021. 61 p.

Orientador: Cassandro Vidal Talamini do Amarante

Coorientador: Weber da Silva Robazza

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação , Chapecó, 2021.

1. Ilex paraguariensis St. Hill. 2. compostos fenólicos. 3. atividade alelopática. 4. atividade antimicrobiana. 5. análise de componentes principais. I. Amarante, Cassandro Vidal Talamini do. II. Robazza, Weber da Silva. III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação . IV. Título.

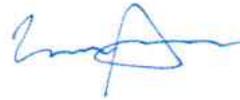
BRUNA CARIOLATO MOREIRA

**COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E
ALELOPÁTICA EM FUNÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E DA ÉPOCA
DO ANO EM PROGÊNIES DE ERVA-MATE.**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade do Estado de Santa Catarina.

Banca Examinadora

Orientador:



Prof. Dr. Cassandro Vidal Talamini do Amarante
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Membros



Prof. Dr. Alessandro Cazonatto Galvão
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)



Dr. Paulo Alfonso Floss
Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural
de Santa Catarina (EPAGRI)

PINHALZINHO, 30 DE SETEMBRO DE 2020

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus...

Aos meus pais, Jorge e Rosângela, minha eterna gratidão, pelo apoio, carinho e compreensão, em toda a minha vida e em especial nesse momento.

Ao meu irmão, Maurício, por todo apoio e carinho em todos os momentos da minha vida.

Ao meu marido, Estefan, obrigada por estar comigo sempre e me acompanhar em todas as empreitadas da vida.

A minha filha, Maria Luisa, minha inspiração para sempre crescer e ser melhor, te agradeço por tudo que me ensina diariamente.

À UDESC e ao Programa de Pós – graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, meu muito obrigada, pela aprovação no programa de mestrado e por todo conhecimento a mim oferecido.

À UFSM, pela autorização de afastamento para o cumprimento das atividades do mestrado, e aos professores Arci Dirceu Wastowski, Genésio Mário da Rosa, Stela Maris Kulczynski e Hilda Hildebrand Soriani por sua amizade e por manterem abertas as portas de seus laboratórios para a execução dos experimentos desta pesquisa.

À EPAGRI, na pessoa de Paulo Alfonso Floss, pela parceria e por ceder o material vegetal, alvo desta pesquisa.

Ao Professor Cassandro, por ter me aceito como mestranda, por toda a orientação e ensinamentos.

Ao Professor Weber, minha eterna gratidão, por todos seus ensinamentos e paciência em ouvir e guiar, és um exemplo de ser humano e profissional.

Aos meus amigos e colegas, que de uma maneira e de outra, contribuíram com o meu crescimento pessoal, acadêmico e profissional.

Novamente, minha eterna e imensa gratidão a todos, citados ou não.

RESUMO

Esta pesquisa teve como objetivo principal avaliar o efeito alelopático e antibacteriano de 10 progênies de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). Além disso, foram identificados os compostos bioativos e quantificada a concentração de cafeína das progênies. Os extratos foram obtidos através de dois métodos: infusão e sohxlet, os quais foram aplicados em dois perfis foliares (maduro e jovem). A ação antibacteriana foi testada frente ao patógeno *Escherichia coli* ATCC 25922 tendo sido empregadas as concentrações de 0%, 20% e 50% de extrato e o antibiótico Ciprofloxacina como controle. Para o teste alelopático foram aplicados os extratos na planta – teste *Lactuca sativa* nas concentrações de 0%, 20% e 50% e como parâmetros de avaliação foram usados o comprimento de raiz, comprimento da parte aérea e taxa de germinação. Para complementar as análises, foram determinados os Compostos Fenólicos Totais (CFT) e foram avaliados os parâmetros da cor instrumental das amostras com base no Sistema Cielab. A concentração média de cafeína, que foi 4,980 mg de cafeína por g de amostra na progênie 7. Essa mesma progênie se destacou também no experimento de potencial antibacteriano, com halos de inibição de 18 mm e 10,33 mm, dependendo da concentração do extrato. Além disso, em conjunto com a progênie 5, a progênie 7 apresentou os melhores resultados na avaliação alelopática. Foram quantificados mais compostos bioativos na progênie 1 em relação às demais, sendo que todas apresentaram cafeína em sua constituição. Conclui-se que o material genético de erva-mate pode ser usado como agente antibacteriano e como um produto com efeito alelopático, sendo necessários mais estudos para otimizar os resultados.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis* St. Hill, compostos fenólicos, cafeína, *Escherichia coli*, *Lactuca sativa*, Alelopatia, ação bactericida

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the allelopathic and antibacterial effect of 10 different genotypes of yerba-mate. The identification of the bioactive compounds and quantification of the caffeine of the samples were also conducted. Two extractive methods (infusion and soxlet) were applied in two leaf profiles (mature and young). In the antibacterial test, the bacterium tested was *Escherichia coli* ATCC 25922 at the following concentrations of extract (0%, 20%, 50%) and the antibiotic Ciprofloxin as control. For the allelopathic test, extracts were applied to the *Lactuca sativa* test plant, in the concentrations of (0%, 20%, 50%) and as evaluation parameters, the germination rate, root length and shoot length were used. To complement the analysis, a colorimetry reading was performed based on the Cielab System and determination of Total Phenolic Compounds was conducted. From the results obtained, the average amount of caffeine stands out, of 4,980 mg of caffeine per g of sample, found in genotype 7. This same sample also stood out in the experiment of antibacterial potential, with inhibition halos, of 18 mm and 10.33mm. It was also highlighted in the allelopathic evaluation of the extracts together in sample 5. In chromatographic analysis, genotype 1, quantified more compounds than the others, all of which had caffeine in their constitution. It is concluded that the genetic material of yerba mate is an excellent plant. The yerba mate antibacterial and allelopathic effects can be further explored in next studies for its use.

Keywords: Yerba mate genotypes, phenolic compounds, caffeine, *Escherichia coli*, *Lactuca sativa*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da clorofila.....	22
Figura 2 – Representação esquemática das cores de acordo com o padrão CIELAB.....	23
Figura 3 – Folha coletada no inverno (esquerda) e folha coletada no primavera (direita)....	27
Figura 4 – <i>Scree plot</i> indicando a percentagem de variância explicada por cada dimensão.....	39
Figura 5 – Diagrama mostrando correlações entre os elementos para as duas primeiras dimensões.....	40
Figura 6 – Diagrama mostrando correlações entre as progênie para as duas primeiras dimensões.....	41
Figura 7 – Cromatograma correspondendo à Progênie 1.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados das progênies avaliadas.....	27
Tabela 2 – Comparação dos valores da luminosidade (L^*) entre as progênies, perfis foliares e métodos de extração.....	33
Tabela 3 – Comparação dos valores da vermelhidão (a^*) entre as progênies, perfis foliares e métodos de extração.....	34
Tabela 4 – Comparação dos valores do parâmetro b^* entre as progênies, perfis foliares e métodos de extração.....	35
Tabela 5 – Comparação dos valores do parâmetro Croma (C^*) entre as progênies, perfis foliares e métodos de extração.....	36
Tabela 6 – Comparação dos valores do Ângulo de Hue (h^0) entre as progênies, perfis foliares e métodos de extração.....	37
Tabela 7 – Teor de compostos fenólicos totais entre as progênies, perfis foliares e métodos de extração.....	42
Tabela 8 – Concentração de cafeína para cada progênie.....	44
Tabela 9 – Índice de germinação em função da progênie e da concentração dos extrato.....	46
Tabela 10 – Comprimento da raiz em função da progênie e da concentração dos extratos.....	48
Tabela 11 – Comprimento da parte aérea em função da progênie e da concentração dos extratos.....	49
Tabela 12 – Halo de inibição (cm) para cada progênie e concentrações de 20% e 50% de extratos.....	50

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1. ERVA-MATE.....	15
2.1.1. PRODUÇÃO DA PLANTA.....	15
2.1.2. COMPOSTOS BIOATIVOS DA ERVA-MATE.....	16
2.1.3. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS.....	17
2.2. ATIVIDADE ALELOPÁTICA DOS COMPOSTOS BIOATIVOS.....	17
2.3. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS COMPOSTOS BIOATIVOS.....	19
2.3.1. <i>Escherichia coli</i>	19
2.4. COR.....	20
2.5. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP).....	23
3. OBJETIVOS.....	25
3.1. OBJETIVO GERAL.....	25
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1. COLETA E PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	26
4.1.1. CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO E SELEÇÃO DAS AMOSTRAS.....	26
4.2. EXTRATOS DE ERVA-MATE.....	28
4.3. ANÁLISE DE COR.....	28
4.4. DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS.....	29
4.5. ENSAIO DE ATIVIDADE ALELOPÁTICA.....	29
4.6. ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	30
4.6.1. ANTIBIOGRAMA.....	30
4.7. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	31
4.7.1. QUANTIFICAÇÃO DA CAFEÍNA.....	31
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1. PARÂMETROS COLORIMÉTRICOS.....	32
5.2. COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	41
5.3. TEOR DE CAFEÍNA E COMPOSIÇÃO DAS PROGÊNIES.....	43
5.4. COMPORTAMENTO ALELOPÁTICO DOS EXTRATOS.....	45
5.4.1. TAXA DE GERMINAÇÃO.....	45
5.4.2. COMPRIMENTO DA RAIZ.....	47

5.4.3. COMPRIMENTO DA PARTE AÉREA.....	48
5.5. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	50
6. CONCLUSÕES.....	52
7. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

1. INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) é uma planta endêmica da Floresta Ombrófila Mista. O consumo desta planta foi iniciado pelos indígenas, na forma de infusão com as folhas e ramos jovens secos, torrados e moídos, usando uma cuia e uma bombilha, para sorver o que é hoje chamado de chimarrão ou também de mate. Essa cultura de consumo passou para os não-indígenas e acabou por se disseminar junto a população no limite do endemismo da planta, compreendendo a região Sul do Brasil, nos estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná (DE BIASI, GRAZZIOTIN, HOFMANN JR., 2009; DE BONA et al., 2010; FERNANDES, 2012; AFONSO et al., 2017; PIMENTEL et al., 2019).

Após ter sido adquirido o hábito de consumo da bebida, surgiu a necessidade de produzir e comercializar a planta. Por essa razão, nos meados de 1890, o empresário Thomas Laranjeira, obteve a concessão de exploração da erva-mate, pelo sistema de arrendamento em uma extensa área em terras devolutas localizadas na região sul do Mato Grosso do Sul e na fronteira com a República do Paraguai. A partir deste momento, começou a exportação do produto na forma cancheada para a Argentina, maior consumidor do insumo brasileiro (FERNANDES, 2012; 2015). Nos anos seguintes se estabeleceu uma sólida economia na região, tendo a erva-mate um papel de destaque. Por volta de 1915, houve um grande salto no número de produtores independentes da planta, não ficando somente a cargo do Mate Laranjeira de forma que o comércio da erva se projetou cada vez mais adiante (FERNANDES, 2012; 2015).

Atualmente os maiores produtores brasileiros se concentram nos estados de Paraná e Rio Grande do Sul, sendo a erva-mate usada principalmente na forma cacheada, para chimarrão e tererê. Além destes produtos, ela pode ser utilizada em chás e bebidas em geral, na incorporação de alguns alimentos e como insumo nas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética (DE BIASI, GRAZZIOTIN, HOFMANN JR., 2009; BLUM-SILVA et al., 2015; KUNDEL et al., 2018).

O consumo de erva-mate pode trazer muitos benefícios à saúde do consumidor, tais como ação estimulante do sistema nervoso central, atividade diurética, vasodilatadora e manutenção do percentual de gordura corporal. Esses benefícios despertaram a curiosidade da comunidade científica sobre como a planta age no organismo e as substâncias que geram esses resultados (DE BIASI, GRAZZIOTIN, HOFMANN JR., 2009; KUNDEL et al., 2018).

A composição química da planta é variável, dependendo muito da espécie, constituição genética, solo, incidência solar e época de colheita, entre outros fatores. Mas, via de regra, em sua composição são encontrados compostos fenólicos, metilxantinas, saponinas derivados do cafeoil, flavonóides, polissacarídeos, proteínas, sais minerais e vitaminas (DE BIASI, GRAZZIOTIN, HOFMANN JR., 2009; COSTA, RACANICCI, SANTANA, 2017; GULLON et al., 2018).

Em adição a esses grupos de compostos fitoquímicos, se apresentam a cafeína, teobromina, teofilina, taninos, ácido clorogênico, ácido ursólico e ácido oleanólico como os principais constituintes de plantas do Gênero *Ilex*. Essas substâncias são responsáveis pelas propriedades estimulantes, vasodilatadoras, antivirais, antimutagênicas, anticarcinogênicas, antidiabéticas, nutricionais, diuréticas e manutenção de baixos índices gordura corporal (DE BONA et al., 2010; AFONSO et al., 2017; HEEMAN et al., 2019; TONET, ZARA, TIUMAN, 2019).

Outro composto de grande importância é o ácido clorogênico, que é um dos principais compostos responsáveis pela ação antimicrobiana, além de ser um ótimo antioxidante. A ação do ácido clorogênico contra bactérias de diferentes gêneros, tais como: *Listeria sp.*, *Bacillus sp.*, *Escherichia sp.*, *Brevibacterium sp.*, *Streptococcus sp.*, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Candida sp.*, *Proteus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Enterococcus sp.* e *Shigella sp.* já foi relatada (DE BONA et al., 2010; BURRIS, HIGGINBOTHAM, STEWART JR., 2015, COSTA, RACANICCI, SANTANA, 2017; TONET, ZARA, TIUMAN, 2019).

Além do efeito antimicrobiano e do potencial nutracêutico, a erva-mate também apresenta atividade alelopática, a qual pode inibir a germinação ou prejudicar o crescimento de outras plantas. Essa ação com viés ecológico tem grande importância para a agronomia, uma vez que no futuro os compostos derivados de vegetais com essa propriedade, podem chegar a substituir os herbicidas. Atualmente, a maioria dos herbicidas é de fonte sintética, apresentando alto risco para a saúde humana e animal, gerando grande impacto ambiental (NISHIMUTA et al., 2019).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi quantificar e identificar os compostos fenólicos e o teor de cafeína de 10 diferentes progênies de erva-mate e avaliar sua atividade bacteriana frente à *Escherichia coli* e a atividade alelopática de seus extratos. Serão utilizados dois métodos para obtenção dos extratos, Soxhlet e por infusão em amostras obtidas em duas épocas do ano. Espera-se obter um entendimento mais detalhado da diferença das composições dos extratos das 10 progênies obtidas por cada

método e a influência dessa composição sobre as propriedades antibacterianas e alelopáticas de cada progênie.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ERVA-MATE

2.1.1. PRODUÇÃO DA PLANTA

A erva-mate é uma árvore perene nativa da floresta ombrófila mista, conhecida cientificamente pelo nome *Ilex paraguariensis* St.Hill, a qual pertence à família botânica *Aquifoliaceae*. Segundo Burris, Higginbotham, Stewart Jr., (2015) popularmente seu uso se dá por infusão ou decocção de folhas e ramos jovens e/ou finos, sendo assim conhecida como chimarrão ou mate, muito comum e frequente na região Sul do Brasil. Por essa razão, ela ocupa um papel de destaque na cultura e na economia regionais, abrangendo desde o plantio até a entrega do produto final ao consumidor, participando de um dos grandes ciclos econômicos do país, onde deixou sua fama como ouro verde. Atualmente, sua produção gira em torno do chimarrão, tererê, sucos, chás e cosméticos (DE BONA et al., 2010).

A produção da erva-mate se dá: através de áreas cultivadas e de extrativismo nativo. O cultivo é responsável por 602.899 de toneladas e o extrativismo por 515.451 toneladas por ano, toda essa produção concentrada na região Sul do Brasil, em maior quantidade produzida no estado do Paraná, seguido do Rio Grande do Sul e por último Santa Catarina (AFONSO et al., 2017; EMBRAPA, 2019; WEDLING et al., 2018).

Mesmo apresentando números expressivos de produção de matéria prima, o setor ervateiro ainda busca iniciativas para aumentar a produção e amenizar os problemas vivenciados pelos produtores. Dentre estas dificuldades, é possível mencionar a baixa qualidade das mudas e sementes, susceptibilidade das plantas a infecções e pragas e baixa resistência às intempéries do clima. Tais estratégias visam obter um produto de maior qualidade, com uma maior vida de prateleira e melhor conteúdo nutricional (PIMENTEL et al., 2019).

Na década de 90, a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri) e a Embrapa Florestas (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) iniciaram programas de melhoramento genético. A erva-mate teve sua base inserida em materiais de polinização aberta. Nesse contexto, a partir das populações de material genético, iniciou-se uma batelada de avaliações para avaliar as propriedades da planta em relação às condições ambientais de cultivo, fatores abióticos

e bióticos, produção de massa foliar e resistência às pragas e ao clima (WEDLING et al., 2018).

Com toda a base tecnológica adquirida com o passar dos anos, a cultura da erva-mate se mostra bastante avançada em comparação a muitas outras. Devido ao aprendizado adquirido com os programas de melhoramento genético, houve uma melhoria significativa na produção de mudas e sementes. Por causa da genética melhorada, as plantas são mais resistentes às adversidades climáticas, nutrição e época de plantio e colheita (EMBRAPA, 2019).

2.1.2. COMPOSTOS BIOATIVOS DA ERVA-MATE

No que diz respeito à sua composição química, a erva-mate possui compostos de grande interesse com diversas propriedades benéficas para o organismo. Por essa razão, muitos pesquisadores buscam explorar todo o potencial benéfico da planta e aplicá-lo em diferentes áreas da ciência (EMBRAPA, 2019). Dessas propriedades, se destacam: ação antioxidante, efeito diurético, propriedade vasodilatadora, além de capacidade antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral e antimutagênica (HEEMAN et al., 2019).

Os principais responsáveis por essas propriedades são os compostos fitoquímicos presentes na planta. Podem ser encontrados na erva-mate inúmeros grupos químicos com diversas atividades benéficas ao ser humano de diferentes maneiras, tais como, as metilxantinas, compostos fenólicos, saponinas e flavonoides. Esses grupos químicos podem ser encontrados de diferentes formas e concentrações, dependendo da exposição ao sol, do solo, da espécie e idade da folha, entre outras variáveis (COSTA, RACANICCI, SANTANA, 2017).

Os compostos fenólicos podem também apresentar a nomenclatura de polifenóis, e sua estrutura pode se apresentar simples ou complexa, derivada da fenilalanina e da tirosina com a presença de um anel aromático e um ou mais grupamentos hidroxila. Os polifenóis mais encontrados na erva-mate são: o ácido cafeico e derivados do cafeoil, dentre eles: ácido clorogênico, os ácidos 3,5 dicafeoilquínico, 4,5 dicafeoilquínico e 3,4 dicafeoilquínico (ROSSA et al., 2017).

Esses compostos interagem diretamente com as enzimas oxidativas provocando modificações da permeabilidade da membrana celular e a produção de lignina, contribuindo para a redução de crescimento radicular e conferindo um efeito alelopático

ao vegetal receptor (PEREIRA et al., 2018). Além disso, eles são responsáveis principalmente pelas atividades antibacterianas, antifúngicas e antivirais da planta (BLUM-SILVA et al., 2015; COSTA, RACANICCI, SANTANA, 2017)

Assim como os compostos fenólicos, as metilxantinas são metabólitos secundários das plantas que possuem muitas funções ecológicas e fisiológicas. Elas também podem apresentar atividade alelopática e atrair polinizadores. Do ponto de vista químico, elas derivam do nucleotídeo purina, podendo ser denominadas de alcaloides purínicos (ROSSA et al., 2017). As metilxantinas mais conhecidas são a cafeína, a teobromina e a teofilina. Na erva-mate a xantina encontrada em maior concentração é a cafeína. A cafeína (1,3,7 trimetilxantina) é um alcalóide de ampla importância por conta de seus efeitos no organismo, sendo um ótimo estimulante ao sistema nervoso fornecendo uma melhor concentração e aumento do estado de alerta. Além do efeito estimulante, ela detém de antioxidantes (SANTANA et al., 2018).

De uma perspectiva fisiológica, a cafeína é um antagonista não seletivo da adenosina nos receptores A1 e A2. No receptor A1, o impedimento faz com que seja elevada a liberação de noradrenalina, gerando um efeito vasopressor indireto e no receptor A2 ocorre um efeito contrário, de vasopressão direta, causando uma leve elevação da pressão arterial. Portanto, mesmo apresentando inúmeros efeitos benéficos, ela deve ser consumida com parcimônia, sendo indicado como limite máximo de 400 mg por dia (MANRIQUE et al., 2018; MOREYRA et al., 2018).

A quantidade e a qualidade dos compostos fenólicos dependem do tamanho das partículas das substâncias presentes na folha da erva-mate e da presença de enzimas como celulases, pectinases, xilanases e proteases. Estas proteínas degradam os compostos e também as paredes celulares das células vegetais. Entretanto, apesar de otimizar a extração dos polifenóis, elas podem alterar alguns aspectos físicos do extrato, como a cor (HEEMAN et al., 2019).

2.1.3. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

Alguns fatores podem influenciar a eficiência da obtenção dos extratos vegetais. Dentre estes se incluem o tamanho da molécula do composto, tipo de solvente, pH, tempo, temperatura e agitação. Portanto, a extração de compostos bioativos é uma das etapas mais críticas da pesquisa com produtos naturais, pois há inúmeros parâmetros que devem ser considerados.

Dependendo do solvente, o extrato pode possuir uma composição diferente, dependendo da afinidade dos componentes da amostra com o solvente (BISOGNIN et al., 2019). Quimicamente, o solvente utilizado e sua polaridade podem influenciar a transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio. Esta transferência é o principal evento bioquímico do processo extrativo de polifenóis e afeta na qualidade do extrato em si e na efetividade de seu potencial antioxidante, antimicrobiano, entre outros (OLIVEIRA et al., 2016).

Grosso modo, existem duas categorias para classificar os métodos para a confecção de extratos vegetais: os convencionais e os alternativos (HEEMAN et al., 2019). Entre os métodos extrativos mais conhecidos para a obtenção de extratos vegetais se destacam: maceração, infusão, percolação, decocção, soxhlet (extração contínua em alta temperatura), extração contracorrente, ultrassom e turbólise, fluido supercrítico e extração assistida por micro-ondas. Todos esses métodos são caracterizados como processos extrativos convencionais, sendo os mais utilizados na obtenção dos produtos de interesse (OLIVEIRA et al., 2016).

Entre os métodos convencionais citados, também recomendados pela farmacopeia de plantas medicinais, alguns conseguem extrair uma fração oleosa junto ao extrato. Entretanto, eles possuem alguns pontos negativos que devem ser levados em conta para se determinar a metodologia mais adequada para determinada planta. Alguns pontos negativos incluem o uso excessivo de solvente, tempo longo de extração, alto consumo de água para o arrefecimento do equipamento e alto gasto de energia elétrica. Por conta disso, há novas abordagens visando minimizar esses problemas, sendo essas utilizadas como técnicas alternativas e adaptações das técnicas tradicionais (CONTE et al., 2016). No presente estudo, as extrações de compostos bioativos foram realizadas por dois métodos convencionais: infusão e soxhlet.

2.2. ATIVIDADE ALELOPÁTICA DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

Alguns compostos bioativos atuam de forma mimética com a auxina. De uma perspectiva fisiológica, eles se ligam aos receptores do hormônio vegetal, impedindo o crescimento e desenvolvimento da planta. Dessa forma, mesmo que haja crescimento, ele será falho e o indivíduo acaba se tornando defeituoso. Além disso, os compostos bioativos podem impedir funções fisiológicas importantes, como a fotossíntese,

respiração, atividade de água, processos enzimáticos e hormonais (NISHIMUTA et al., 2019; ANWAR et al., 2020).

A atividade alelopática tem motivado estudos para substituição de compostos sintéticos herbicidas por compostos naturais com o mesmo fim, e assim reduzir de forma significativa os custos, os riscos à saúde e a poluição das águas e do solo. Além desses benefícios, o controle de plantas daninhas provocaria um aumento na produção de grãos, frutas e hortaliças de forma menos agressiva ao meio ambiente (ANWAR et al., 2020).

Outra ferramenta eficiente envolve o uso de plantas com efeito alelopático conhecidas como cobertura verde. Nesse caso, além de cobrir e proteger o solo, compostos alelopáticos são liberados continuamente e por um longo prazo. Ecologicamente, esses compostos não possuem somente a atividade alelopática, podem conter poder de proteção contra patógenos e herbívoros, além de atrair polinizadores (SOUZA et al., 2019). A planta doadora é aquela identificada como portadora de compostos com efeito alelopático, enquanto a receptora é aquela que recebe o tratamento. As plantas receptoras mais utilizadas, são *Lactuca sativa* (alface) e as espécies daninhas *Digitaria insularis* (capim amargoso), *Emilia coccinia* (falsa-seralha) e *Portulaca orelacea* (beldroega). Os motivos de essas plantas serem definidas como receptoras são velocidade de crescimento conhecida, germinação rápida e uniforme e sensibilidade aos tratamentos propostos (PEREIRA et al., 2018).

2.3. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

O uso de produtos químicos sintéticos e conservantes é uma das maneiras mais tradicionais de se prolongar a vida útil dos alimentos. Entretanto, em muitas ocasiões, estes produtos são prejudiciais à saúde, uma vez que podem gerar efeitos carcinogênicos, teratogênicos e resíduos tóxicos. Dessa forma, é de extrema importância a busca por produtos oriundos de fontes naturais que desempenham a mesma função, ou seja, conservar o alimento e protegê-lo de contaminações. Uma alternativa promissora envolve o uso de compostos fitoquímicos de plantas, os quais têm obtido bastante êxito nesse papel e, além disso, enriquecem nutricionalmente o produto tratado (OLIVEIRA et al., 2018).

Uma classe de compostos de interesse são os polifenóis, os quais apresentam atividade antimicrobiana de conservação nos alimentos. Estes compostos provocam a ruptura da membrana celular do micro-organismo, e assim inativam e matam o micróbio em questão (OLIVEIRA et al., 2018).

Além dos polifenóis, existem outras substâncias presentes na erva-mate como a cafeína, derivados do cafeoil, ácido clorogênico, rutina e quercetina entre outras que já tiveram seus efeitos antibacterianos relatados contra diferentes patógenos alimentares como: *Streptococcus*, *Listeria*, *Candida*, *Proteus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Staphilococcus*, *Enterococcus* e *Shigella* (COSTA, RACANICCI, SANTANA, 2017).

Entretanto, os resultados relatados referentes à ação antimicrobiana de extratos de compostos vegetais nem sempre convergem. Essa discrepância se deve a diversos parâmetros que afetam a composição dos extratos, tais como, solo, exposição ao sol, o ambiente em que a planta está cultivada, genética, a época de sua colheita, e fenologia, entre outros. Além disso, a composição dos extratos é influenciada por fatores como a metodologia utilizada para a extração dos compostos, o tipo de solvente usado e a concentração do extrato utilizado no ensaio (COSTA, RACANICCI, SANTANA, 2017).

Outro aspecto que merece ser mencionado sobre a importância do uso dos compostos naturais como agentes antimicrobianos é a crescente resistência das bactérias aos antibióticos, devido ao uso indiscriminado destes ao longo dos anos (BURRIS, HIGGINBOTHAM, STEWART JR., 2015). Finalmente, deve ser considerada a contaminação da água pelos fármacos, por inúmeras fontes, sendo um grande problema ambiental, que pode afetar a microbiota positiva do solo e da água, podendo afetar a vida humana também (DE BONA et al., 2010).

2.3.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria gram negativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Esta bactéria é encontrada no interior do trato gastrointestinal de mamíferos, sendo a maioria de suas cepas inofensivas. Entretanto, algumas cepas se apresentam bastante virulentas e desencadeiam intoxicações alimentares, sendo causa frequente de surtos de contaminação dos alimentos e da água (MARTINEZ et al., 2011; MA, GLASSMAN, CHUI, 2020).

Além das intoxicações alimentares, a *Escherichia coli* pode ser responsável por outras infecções quando alojada em diferentes partes do corpo, como, por exemplo, inflamação das vias urinárias, cistite, meningite, peritonite, mastite e septicemia (MARTINEZ et al., 2011).

2.4. COR

A cor é o primeiro atributo sensorial no julgamento da qualidade de um determinado alimento. Através da análise da cor, o consumidor pode intuir se o produto está fresco e bom para o consumo, sendo um parâmetro importante para a comercialização do insumo (KIDMOSE et al., 2002; HARDER, BRAZACA, ARTHUR, 2007).

Em conjunto com o sabor e aroma, a cor forma um complexo sistema sensorial, baseado nas percepções adquiridas pelo observador, que define o melhor alimento a ser consumido, de forma simples e rápida. Isso impulsiona um grande leque de tecnologias a ser estudadas e ampliadas, como a pós-colheita de frutas e hortaliças, que através de inúmeras ferramentas, buscam prolongar a vida útil do alimento, sem perder seu vigor e qualidade (KADER, 2008).

Os pigmentos responsáveis pela cor dos alimentos podem sofrer inúmeras interferências, sejam pela ação da luz, calor, processamento, armazenamento, ação enzimática ou até mesmo pela ação natural do tempo. A clorofila contida em maior concentração nas folhas verdes (Figura 1), quando degradada, ganha um aspecto verde amarronzado, conhecido como verde-oliva. A mesma molécula, quando exposta à luz, pode se tornar incolor. Essas mudanças na coloração se devem a reações químicas, as quais provocam a substituição de íons (KIDMOSE et al., 2002).

O escurecimento enzimático é outro processo causado principalmente pelas enzimas clorofilase, peroxidase, lipoxidase que, degradam os pigmentos que dão a coloração ao alimento. Dessa forma, são gerados tons escurecidos devido à conversão de polifenóis em complexos coloridos e escuros. Estes eventos são agravados pela temperatura e pela ação da luz (KIDMOSE et al., 2002).

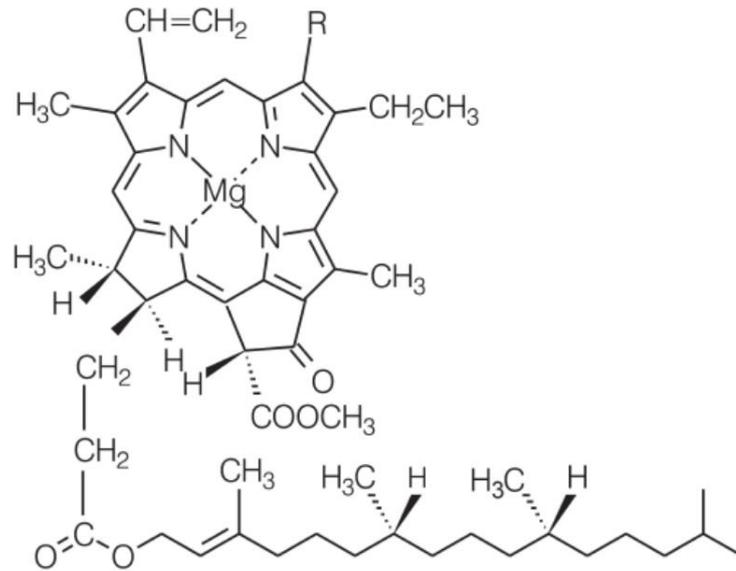


Figura 1. Estrutura química da clorofila.

FONTE: ROCHA, ROYO, (2015).

A cor de uma dada amostra é avaliada com o auxílio de colorímetro e espectrofotômetro, os quais expressam a cor de acordo com parâmetros numéricos organizados por padrões definidos por normas internacionais (NEIRO et al., 2013). O padrão mais utilizado é o espaço de cores conhecido como CIELAB, o qual foi estabelecido pela CIE (*Commission Internationale de l'Eclairage*). Trata-se de um sistema tridimensional expresso, através das coordenadas L^* , a^* e b^* , que definem a luminosidade (L^*), intensidade de vermelho (a^* positivo) /verde (a^* negativo) e de amarelo (b^* positivo) e azul (b^* negativo) (SANTOS, 2011).

Dependendo do estudo feito, essas três variáveis não são suficientes, sendo necessárias a adição de dois novos parâmetros para a descrição da cor: o croma (C^*) e o Ângulo Hue (h°). O Ângulo de tonalidade, h° , é um atributo qualitativo da colorimetria, expresso em graus e que interpreta as diferenças de tonalidade, cobrindo todo o comprimento de onda, enquanto que o C^* expressa a saturação de cor, em toda sua pureza, concluindo que seus valores mais baixos definem cores pálidas e os mais altos com cores saturadas (SANTOS, 2011). A Figura 2 apresenta um diagrama indicando o significado dos parâmetros de cor segundo o padrão CIELAB,

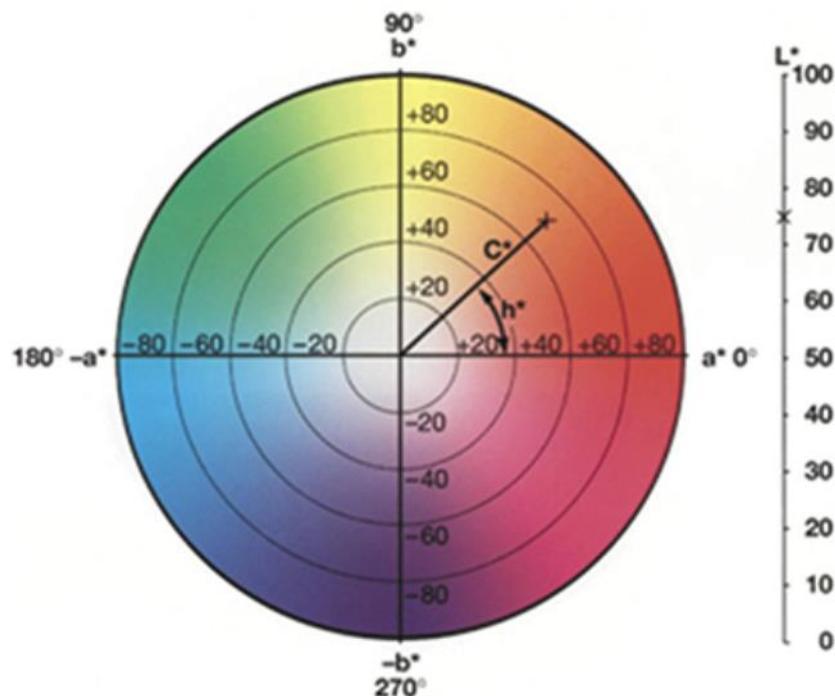


Figura 2. Representação esquemática das cores de acordo com o padrão CIELAB.

Legenda: L^* (luminosidade), a^* (coordenada a/vermelhidão), b^* (coordenada b^* /amarelo), C^* (croma/saturação), h° (ângulo hue).

FONTE: FERREIRA, SPRICIGO, (2017).

2.5. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP)

A Análise de Componentes Principais (ACP) é uma ferramenta eficaz ao agrupar inúmeras variáveis e expressar a variância do conjunto de dados e a correlação entre os diferentes fatores. Sendo uma análise multivariada, é possível compreender a relação intrínseca entre as variáveis avaliadas e salientar as pequenas variações do estudo. A variância de cada variável é expressa em autovalores, mostrando como elas se comportam e como influenciam no valor da variância total do conjunto de dados. Gurgel et al., (2021) aplicou essa técnica em desempenho de novilhos de corte em pastagens de capim Mombaça com residual da fertilização com Nitrogênio.

De acordo com Machado et al., (2020), esse método estatístico pode ser usado na qualidade pós-colheita de frutas e hortaliças, na determinação de parâmetros representativos na construção de índices de qualidade. Através dos índices colorimétricos é possível diferenciar os estágios de maturação de tomates.

Podendo ser usada em várias situações, Alberti et al., (2020) aplicou essa técnica em erva-mate, mais precisamente, nos níveis de metilxantinas, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante *in vitro*, organizando as amostras realçando as correlações entre as variáveis e as semelhanças entre elas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Pesquisar os compostos fenólicos, atividade antibacteriana e alelopática de extratos de diferentes progênies de erva-mate.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar o valor dos compostos fenólicos totais (CFT) das diferentes progênies em duas estações do ano (inverno e primavera).

Avaliar como se comportam os extratos com melhores valores de CFT nos ensaios antibacteriano e alelopático.

Avaliar os parâmetros de cor dos extratos produzidos e se há diferença na cor entre os diferentes materiais genéticos e o que isso influencia nas atividades avaliadas.

Quantificar a cafeína das diferentes progênies com intuito de certificar qual progênie apresenta maiores concentrações.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. COLETA E PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

4.1.1. ÁREA DE ESTUDO E SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras das progênies de erva-mate foram cedidas pela unidade da EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina) localizada no município de Chapecó/SC, especificamente na FLONA (Floresta Nacional de Chapecó), onde a instituição possui uma área experimental. Seu solo foi caracterizado como Latossolo Vermelho Distroférico (Embrapa, 2004) e o Clima Cfa - clima subtropical como úmido mesotérmico, com verões quentes e geadas pouco frequentes (ROLIM et al., 2007). A precipitação média anual da região gira em torno dos 2000 mm e suas coordenadas geográficas são , Latitude: 27 graus, 05' 51" Longitude: 52 graus 47' 79", com altitude de 590 m.

As plantas foram selecionadas aleatoriamente, sendo 5 do sexo feminino e 5 do sexo masculino, todas a pleno sol e com média de 20 anos de idade, sendo a cobertura vegetal com predominância de amendoim forrageiro e gramíneas em geral. As coletas das amostras foram realizadas nos meses de agosto e novembro de 2019, sendo colhidas folhas e ramos jovens do entorno das 10 árvores, uma de cada progênie de erva-mate.

Portanto, foram obtidos dois perfis foliares, sendo o primeiro perfil foliar caracterizado por folhas mais maduras com coloração de verde mais escura, coriácea e suscetíveis a infecções, as quais foram coletadas em agosto (inverno). Já o segundo perfil corresponde à coleta realizada em novembro (primavera). Neste caso, as amostras possuem um perfil foliar mais jovem, com coloração verde um pouco mais clara. As folhas são maleáveis por serem provenientes de novas brotações, em decorrência da primavera. A figura 3 apresenta os dois perfis foliares utilizados nesta dissertação. Dados relativos às origens de cada uma das 10 progênies utilizadas estão apresentados na Tabela 1.



Figura 3. Esquerda: folha coletada no inverno e Direita: folha coletada no verão.

FONTE: Elaborada pela própria autora.

Tabela 1. Dados das progênies avaliadas, cultivadas a pleno sol.

Progênies	Sexo	Origem
1	Feminino	Ivaí/ PR
2	Feminino	Ivaí/PR
3	Feminino	Quedas do Iguaçu/PR
4	Feminino	Quedas do Iguaçu/PR
5	Feminino	Ivaí/PR
6	Masculino	Ivaí/PR
7	Masculino	Ivaí/PR
8	Masculino	Ivaí/PR
9	Masculino	Barão de Cotegipe/ RS
10	Masculino	Barão de Cotegipe/ RS

FONTE: Elaborada pela própria autora.

4.2. EXTRATOS DE ERVA-MATE

Os extratos foram obtidos no Laboratório de Química Geral da UFSM (Universidade Federal de Santa Maria) campus Frederico Westphalen RS, em duplicata. Para a desinfecção do material vegetal, foi usada uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por 5 minutos e triplo enxague com água destilada. A secagem foi realizada via micro-ondas (Eletrolux Modelo MEF41, Potência 1600 W), por três ciclos de 2 minutos e um de ciclo 1 minuto, de acordo com a metodologia proposta por Marcante et al., (2010). Seguida do ponto de verificação da matéria seca. A moagem foi executada em processador doméstico (Couri Modelo CUO 3110). A granulometria do material vegetal após a moagem, obedeceu o tamanho de partículas de 20 mesh.

Os extratos foram obtidos pelos métodos convencionais de soxhlet e infusão, conforme descrito por Oliveira et al., 2016. O solvente selecionado para a preparação dos extratos, foi o álcool etílico 70%, (Marca Araucária), pela baixa toxicidade, fácil acesso e preço acessível em comparação com outros solventes. Para a extração por Soxhlet, foram pesadas 8 gramas da amostra seca, as quais foram trituradas, empacotadas em cartuchos de papel filtro e inseridas no extrator do sistema de soxhlet. No balão de fundo chato do sistema, foram adicionados 150 mL de álcool etílico 70%. O tempo total da extração foi de 6 horas e, na sequência, o extrato foi levado ao evaporador rotativo (Biothec BT 351) para se obter uma amostra mais concentrada, reduzindo 50% do seu volume inicial, o volume final foi de 40 mL, para ambos os métodos de extração.

Para a obtenção do extrato por infusão, foram aquecidos 150 ml de álcool etílico 70% com auxílio de chapa elétrica até atingir 80 °C. Em seguida, foram adicionados 8 g da amostra e a mistura foi mantida em repouso por 30 minutos, protegida da luz. Finalmente, a mistura foi filtrada em papel filtro e concentrada em evaporador rotativo (Biothec BT 351).

4.3. ANÁLISE DE COR

A análise de cor dos extratos foi realizada no Laboratório de Nutrição Animal (LANA) da UDESC, campus Chapecó SC. A determinação da cor das amostras foi realizada em duplicata com o auxílio de colorímetro (Minolta CR 400), com sistema CIELAB. As amostras foram colocadas em placas de Petri com uma folha de papel

toalha em baixo da placa, para a total padronização do experimento. Foram medidos os valores dos parâmetros de cor instrumental (L^* , a^* , e b^*) e os valores do croma (C^*) e do ângulo de Hue (h^0) foram calculados a partir das Equações 1 e 2, respectivamente.

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (1)$$

$$h^0 = \text{tg}^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (2)$$

4.4. DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

A quantificação dos compostos fenólicos (CFT) foi determinada em duplicata através do método de Folin-Ciocalteu de Bonoli et al., 2004. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Recursos Hídricos da Universidade Federal de Santa Maria campus Frederico Westphalen RS.

Foi preparada uma solução com 10 μL de cada extrato e 500 μL de reagente Folin-Ciocalteu, a qual foi agitada manualmente por 1 minuto. Adicionaram-se 10 mL de água destilada e 2 mL de Carbonato de Sódio 20% m/v. Em seguida, foram adicionados 90 mL de água destilada em um balão volumétrico de 100 mL. Após a incubação de 2 horas protegidas da luz, foi realizada a leitura de absorvância em espectrofotômetro (Bel Photonics/Aaker, modelo SP 2000 UV) no comprimento de onda de 720 nm. Para construir a curva padrão foi utilizado ácido gálico (25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300 $\mu\text{g/mL}$), o branco foi determinado com água destilada, e a partir da reta resultante calculou-se o teor de compostos fenólicos (CFT) equivalentes ao ácido gálico P.A (Marca Dinâmica, Grau de pureza 98%). O R^2 resultante da curva padrão determinou o valor de $y = 0.0651x - 0.0436$ $R^2 = 0.9972$.

4.5. ENSAIO DE ATIVIDADE ALELOPÁTICA

Para a avaliação da ação alelopática dos extratos de erva-mate, foram adaptados os métodos de Nishimuta et al., (2019) e Carvalho et al., (2019), mudando apenas a forma de diluição do extrato e o número de sementes por placa. O experimento foi realizado no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Santa Maria campus Frederico Westphalen RS.

Foi selecionado um extrato de cada progênie, tendo sido escolhidos aqueles que forneceram maiores valores de compostos fenólicos totais (CFT). A planta receptora selecionada foi *Lactuca sativa*, alface cultivar Americana, porque sua taxa de crescimento e germinação são conhecidas. As diluições do extrato foram de 0% (branco/controle) e 20%. Lembrando que as diluições foram realizadas com água destilada. As placas de Petri com duas folhas de papel filtro receberam os extratos diluídos e foram mantidas em BOD por 24 horas à temperatura de 27 °C para evaporação da fração alcoólica da solução extrativa. Após a evaporação, cada placa recebeu 20 sementes e 0,5 ml de água destilada, sendo as amostras mantidas em BOD com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 24°C. As mesmas foram monitoradas diariamente observando umidade e germinação e, após 7 dias, foram mensuradas com auxílio de paquímetro (Marca MTX) a taxa de germinação, comprimento de plântulas (SL) e comprimento de raiz (SR). As medidas foram realizadas em duplicata, sendo cada placa de Petri, uma repetição.

4.6. ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Para avaliar a atividade antibacteriana dos extratos de erva-mate, foi usada uma metodologia adaptada de De Biasi, Grazziotin, Hofmann Jr, (2009) e Afonso et al., (2017), onde foi modificado o tipo de meio de cultura e a temperatura da estufa bacteriológica. Foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 cedidas pela Prof. Leticia Trevisan do Instituto Federal Farroupilha de Frederico Westphalen. Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Recursos Hídricos e de Monitoramento e Planejamento Ambiental e Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Maria campus Frederico Westphalen.

Foram selecionadas 3 a 4 colônias de mesma morfologia de *Escherichia coli* ATCC 25922, as quais foram adicionadas a 10 ml de soro fisiológico 0,85, com o objetivo de se obter uma suspensão padrão McFarland 0,5 e com $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL.

4.6.1. ANTIBIOGRAMA

O ensaio de atividade antimicrobiana foi determinado pelo método do antibiograma ou difusão em disco, com discos de papel filtro (6 mm de diâmetro; 0,6 mm espessura) embebidos de extrato de erva-mate nas concentrações de 0, 20% e 50%

(diluições feitas em água destilada previamente autoclavada) e inseridos em Ágar Nutriente nas placas de Petri. Estas foram incubadas em estufa bacteriológica (Ethik/Multhitec, Ethiktechnology) por 24 horas à temperatura de 37 °C. O controle foi obtido com o uso de disco de antibiótico Ciprofloxacina como controle positivo e soro fisiológico como controle negativo. A medição dos controles (com auxílio de paquímetro) serviu de base comparativa para a avaliação da ação antibacteriana dos extratos e para a definição da suscetibilidade e resistência da *Escherichia coli* aos extratos. Os ensaios foram realizados em triplicata para as amostras de cada progênie que resultaram nos maiores valores de (CFT), sendo cada placa de Petri, uma repetição.

4.7. QUANTIFICAÇÃO DA CAFEÍNA

A cafeína foi quantificada nas amostras de cada progênie que forneceram maiores valores de CFT. Este procedimento foi realizado no Laboratório de Química Analítica da Universidade Federal de Santa Maria *campus* Frederico Westphalen (UFSM/FW). As amostras foram inseridas em um Cromatógrafo Gasoso (CG-3900) acoplado a um Espectrômetro de Massas (Saturn 2100 - CG/MS-SIS, Varian) e injetor automático (CP-8400, Autosampler). Foi utilizada uma coluna capilar VF-5MS de 30m x 0,25mm ID DF=0,25 com 5% de fenil e 95% de dimetilpolisiloxano.

Para a solução estoque, pesou-se 1 mg de cafeína em balança analítica (Sartorius modelo CP2 P). Em seguida, o material pesado foi transferido para um balão volumétrico de 10 ml, sendo o seu volume completado com Acetonitrila.

Para a solução 1, foram pipetados 100 µL da solução estoque em um balão volumétrico de 10 ml, o qual foi completado com Acetonitrila. Um procedimento similar foi repetido para as soluções de 2 a 5, sendo que, para essas, foram pipetados 200 µl, 400 µl, 700 µl e 1000 µl da solução estoque, respectivamente.

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação das médias foi feita por análise de variância e pelo teste *post-hoc* de Tukey com significância de 0,05. A análise de componentes principais para classificação das amostras quanto aos parâmetros de cor foi realizada com os pacotes factoMineR e factoExtra do software R versão 3.6.1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PARÂMETROS COLORIMÉTRICOS

De um ponto de vista geral, os parâmetros de cor são influenciados por diversos fatores, tais como a constituição genética da planta, tipo de solo, composição de metabólitos secundários e luz solar (DELGADO-VARGAS, JIMÉNEZ, PAREDES-LÓPEZ, 2000). Além disso, a metodologia do processo extrativo e o tipo de solvente podem afetar os valores dos parâmetros colorimétricos. A Tabela 2 apresenta os valores médios da luminosidade (L^*) entre as diferentes progênes para os dois processos de extração e para os dois perfis foliares. No presente estudo, observou-se que praticamente não houve diferença estatística para os valores da L^* entre as progênes de acordo com o Teste de Tukey HSD ao nível de 95% de significância. Além disso, a coloração de acordo com o sistema CIELAB, pode determinar o conteúdo de clorofila, antocianinas e carotenoides de uma amostra específica, contribuindo para resolução de sua qualidade, principalmente em frutas, hortaliças e demais derivados de vegetais como a erva-mate, já que a cor é algo determinante para a qualidade do chimarrão (CONESA et al., 2019).

Em um estudo com maracujás de coloração roxa, amarela e laranja, Reis et al., (2018) obtiveram resultados semelhantes ao do nosso estudo para L^* , (58,05) para o maracujá amarelo e (77,65) para o maracujá roxo, ambas referente a polpa das frutas, enquanto que para a pele (43,16). A coordenada a^* também apresentou dados em consonância, como para todas as variáveis avaliadas (pele, polpa e semente) e (roxo, amarelo e laranja). E na coordenada b^* , a compatibilidade nos dados foi verificada apenas pele e polpa do maracujá amarelo e pele da variável alaranjada.

Ainda na mesma linha de pensamento, Moyano et al., (2008) avaliaram a cor de azeites virgens de oliva em relação com o teor de clorofila e carotenóides, que mostrou-se semelhantes aos nossos dados de L^* (83,13), a^* (-3,44) e b^* (42,18).

Os extratos também podem ser materiais de estudo, quando o assunto é parâmetros de cor, como cita Rojas-Bedoya; Gómez-López; Marín-Pareja (2020) que avaliaram a extração de metabólitos de *Callendula officinalis*, resultando em dados de L^* de (72 a 85), valores semelhantes ao presente estudo.

Tabela 2. Comparação dos valores da luminosidade (L*) entre as progênes, perfis foliares e métodos de extração.

Progênie	Infusão de Perfil Foliar Maduro	Soxhlet de Perfil Foliar Maduro	Infusão de Perfil Foliar Jovem	Soxhlet de Perfil Foliar Jovem
1	62,65±9,60 ^{aA}	62,01±3,70 ^{aA}	59,43±12,77 ^{abA}	57,24±2,50 ^{Aa}
2	60,77±8,67 ^{aA}	52,63±14,93 ^{aAB}	46,46±1,41 ^{abB}	54,67±1,69 ^{Aa}
3	53,34±17,19 ^{aA}	59,72±6,68 ^{aA}	56,94±0,27 ^{abA}	62,92±5,98 ^{Aa}
4	53,19±11,50 ^{aAB}	58,74±11,37 ^{aA}	44,27±2,45 ^{abB}	48,37±2,89 ^{aAB}
5	65,30±10,26 ^{aA}	71,55±4,00 ^{aA}	45,35±2,97 ^{abB}	63,13±3,75 ^{Aa}
6	62,92±0,37 ^{aA}	66,40±2,46 ^{abB}	58,67±2,24 ^{abC}	57,59±2,51 ^{aC}
7	63,93±2,19 ^{aA}	66,19±3,15 ^{aA}	54,01±0,07 ^{abB}	40,87±7,62 ^{aC}
8	64,03±1,18 ^{aA}	61,79±3,08 ^{aA}	64,86±3,54 ^{bA}	57,37±3,94 ^{aA}
9	59,94±8,57 ^{aAB}	67,29±1,16 ^{aA}	57,59±3,86 ^{abB}	51,74±13,45 ^{abB}
10	60,20±14,98 ^{aAB}	71,04±7,25 ^{aA}	62,04±4,54 ^{abAB}	60,68±0,97 ^{abB}
Média	60,62	63,74	54,96	55,46

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ao nível de 95% dos valores entre as progênes enquanto que letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença ao nível de 95% entre os valores dos métodos de extração e perfil foliar.

FONTE: Elaborada pela própria autora.

A luminosidade foi menor para amostras com perfil foliar mais jovem (colhidas no verão) para a maioria das progênes. Nos processos extrativos de infusão e soxhlet no perfil foliar maduro (colhidas no inverno), a luminosidade não diferiu estatisticamente pelo Teste de Tukey, lembrando que, o solvente foi o mesmo em ambos os processos.

Também foi observado que para as amostras de perfil foliar maduro, o processo de extração não afetou a luminosidade. Entretanto, para as amostras de perfil foliar mais jovem, em média os extratos das progênes de 1 a 5 (sexo feminino) obtidos pelo processo de Soxhlet apresentaram maior luminosidade, enquanto que comportamento oposto foi observado para os extratos provenientes das progênes de 6 a 10 (sexo masculino). Embora não estejam disponíveis estudos que comparam a cor de diferentes

progênes de erva-mate, os resultados obtidos no presente estudo são compatíveis com os resultados de Nunes et al., (2015), que obtiveram valores entre 60 e 70 para a L* de extratos de erva-mate.

A Tabela 3 mostra os valores obtidos para a vermelhidão das amostras de todas as progênes. Devido ao grande desvio-padrão obtido para algumas amostras, na prática fica impossível distinguir estatisticamente se o valor de a* é positivo ou negativo para essas amostras. Em geral, os extratos correspondentes às amostras de perfil foliar mais jovem resultaram em menores valores de a* o que indica que essas amostras tendem a ser mais esverdeadas em relação àquelas com perfil foliar mais maduro. O processo de extração não afetou o valor da vermelhidão para as amostras coletadas no inverno, mas para as amostras coletadas no verão, o valor de a* foi mais negativo para os extratos obtidos por infusão, por apresentar os melhores resultados.

Conesa et al., (2019) encontraram em seu estudo com limões Fino 49, valores de coordenada a* variando de -9,53 a 8,44, dados que estão de acordo com o nosso estudo. Esses valores ressaltam a coloração verde, que para os limões determinam o equilíbrio entre clorofila, luteína e carotenoides. Esse trabalho também mostrou que os valores ideais de coordenada a* para a qualidade de limões não pode ultrapassar 5 (para não interferir na concentração de clorofilas). Acima disso, começa acentuar a cor avermelhada na fruta.

Tabela 3. Comparação dos valores da vermelhidão (a*) entre as progênes, perfis foliares e métodos de extração.

Progênie	Infusão de Perfil Foliar Maduro	Soxhlet de Perfil Foliar Maduro	Infusão de Perfil Foliar Jovem	Soxhlet de Perfil Foliar Jovem
1	31,62±53,08 ^{abcAB}	55,96±9,66 ^{aA}	-12,53±5,47 ^{abB}	-8,77±0,05 ^{aB}
2	30,97±32,18 ^{abcA}	5,48±5,53 ^{bA}	-13,18±1,24 ^{abB}	-8,57±0,23 ^{aB}
3	4,06±0,06 ^{aA}	-1,06±3,60 ^{bB}	-12,30±0,07 ^{aC}	-12,42±0,10 ^{bC}
4	26,17±34,71 ^{abcA}	-1,82±9,06 ^{bcAB}	-10,47±1,90 ^{aAB}	-11,41±0,28 ^{bB}
5	45,60±27,09 ^{bA}	6,91±24,43 ^{bcAB}	-15,29±1,75 ^{bB}	-13,80±2,35 ^{bB}
6	15,91±28,98 ^{abcAB}	39,91±16,96 ^{aA}	-14,70±1,13 ^{bB}	-11,56±1,45 ^{bB}

7	-7,78±2,31 ^{cA}	-9,11±1,07 ^{cA}	-14,16±2,08 ^{abB}	-8,89±0,54 ^{abA}
8	-7,43±1,13 ^{cA}	23,07±29,68 ^{abA}	-17,50±1,03 ^{bB}	-15,86±4,96 ^{bB}
9	45,49±14,50 ^{ba}	-10,71±2,47 ^{cBC}	-12,47±1,36 ^{abB}	-8,64±0,58 ^{aC}
10	-6,15±2,02 ^{cA}	-12,04±4,48 ^{cAB}	-13,43±1,60 ^{abB}	-8,57±1,59 ^{aA}
Média	-7,12	-6,95	-13,70	-10,85

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ao nível de 95% dos valores entre as progênes enquanto que letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença ao nível de 95% entre os valores dos métodos de extração e perfil foliar.

FONTE: Elaborada pela própria autora.

Tabela 4. Comparação dos valores do parâmetro b* entre as progênes, perfis foliares e métodos de extração.

Progênie	Infusão de Perfil Foliar Maduro	Soxhlet de Perfil Foliar Maduro	Infusão de Perfil Foliar Jovem	Soxhlet de Perfil Foliar Jovem
1	53,53±12,76 ^{abA}	60,22±21,72 ^{abcA}	54,93±32,04 ^{abA}	43,70±0,64 ^{aA}
2	45,52±19,59 ^{abA}	43,85±18,51 ^{acA}	53,31±1,42 ^{aA}	53,31±0,23 ^{aA}
3	52,80±9,72 ^{abA}	51,02±5,93 ^{aA}	51,85±0,22 ^{aA}	58,77±9,99 ^{aA}
4	61,19±10,47 ^{aAB}	69,10±2,58 ^{bA}	61,91±1,19 ^{bA}	47,32±4,43 ^{abB}
5	51,60±24,65 ^{abA}	47,32±20,35 ^{abcA}	60,86±9,26 ^{abA}	56,54±17,47 ^{aA}
6	45,29±3,51 ^{bA}	55,98±7,56 ^{abABC}	61,40±1,48 ^{bB}	54,92±2,04 ^{aC}
7	52,00±10,85 ^{abABC}	38,59±4,97 ^{cA}	62,92±9,43 ^{abB}	46,18±0,89 ^{aC}
8	38,87±10,60 ^{bA}	52,41±11,05 ^{abAB}	68,15±3,82 ^{bB}	64,18±7,33 ^{abB}
9	49,92±10,44 ^{abA}	36,20±8,85 ^{cA}	64,16±1,28 ^{bB}	64,34±3,12 ^{Ab}
10	54,86±19,29 ^{aAB}	55,03±18,28 ^{abcAB}	68,22±2,63 ^{bA}	42,75±6,00 ^{abB}
Média	50,56	50,97	60,78	53,20

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ao nível de 95% dos valores entre as progênes enquanto que letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença ao nível de 95% entre os valores dos métodos de extração e perfil foliar.

FONTE: Elaborada pela própria autora.

No que diz respeito ao parâmetro b^* , os valores ficaram positivos para todas as amostras evidenciando uma tonalidade amarelada (Tabela 4). Não foi observada diferença estatística entre as progênes, método de extração ou perfil foliar para este parâmetro.

As Tabelas 5 e 6 apresentam os resultados obtidos para os parâmetros Croma e Ângulo de Hue, respectivamente. Foi observado que os valores do C^* para as amostras de perfil foliar mais maduro, os extratos de plantas do sexo feminino são mais elevados indicando uma coloração mais intensa. Embora tenha sido observada diferença entre as progênes, os resultados não são conclusivos, pois dependem também do método de extração e do perfil foliar.

Tabela 5. Comparação dos valores do parâmetro Croma (C^*) entre as progênes, perfis foliares e métodos de extração.

Progênie	Infusão de Perfil Foliar Maduro	Soxhlet de Perfil Foliar Maduro	Infusão de Perfil Foliar Jovem	Soxhlet de Perfil Foliar Jovem
1	72,53±13,72 ^{abA}	83,65±9,17 ^{aA}	56,35±32,44 ^{abcAB}	44,57±0,64 ^{aB}
2	56,39±33,49 ^{abA}	44,56±17,54 ^{bA}	54,91±1,68 ^{aA}	53,99±1,68 ^{bA}
3	52,96±9,72 ^{abA}	51,11±5,81 ^{bA}	53,28±0,20 ^{aA}	60,08±9,79 ^{bA}
4	71,26±3,75 ^{Aa}	69,42±2,33 ^{cA}	62,81±0,86 ^{bB}	48,68±4,24 ^{abC}
5	68,93±36,37 ^{abA}	51,71±10,78 ^{bA}	62,75±9,41 ^{abcA}	58,21±17,53 ^{abA}
6	52,09±5,80 ^{bA}	69,07±15,93 ^{abAB}	63,14±1,71 ^{bB}	56,12±2,30 ^{bA}
7	52,65±10,37 ^{abABC}	39,68±4,59 ^{bA}	64,49±9,65 ^{abcB}	47,03±0,98 ^{aC}
8	39,63±10,18 ^{bA}	60,79±7,83 ^{bcB}	70,37±3,44 ^{cB}	66,15±8,29 ^{bB}
9	67,59±17,46 ^{abAB}	37,75±9,19 ^{bA}	65,36±1,52 ^{bB}	64,91±3,17 ^{bB}
10	55,29±18,92 ^{abAB}	56,33±18,81 ^{bcAB}	69,54±2,27 ^{cA}	43,59±6,20 ^{aB}
Média	58,94	56,41	62,30	54,34

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ao nível de 95% dos valores entre as progênes enquanto que letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença ao nível de 95% entre os valores dos métodos de extração e perfil foliar.

FONTE: Elaborada pela própria autora.

De acordo com essa faixa de valores, Viana et al., (2013) na observação da caracterização físico – química de novos híbridos de abacaxi resistentes à fusariose, encontraram no seu primeiro grupo de híbridos valores semelhantes ao deste trabalho para o parâmetro de Cromo (43,93), enquanto que, os dados referente á luminosidade e Ângulo Hue, foram compatíveis ao nosso estudo com os três grupos de híbridos do autor.

Para o ângulo de Hue, foi observado que os valores tenderam a ser positivos para os extratos das plantas com perfil foliar maduro (tendência mais avermelhada) e negativos para os extratos provenientes das plantas com perfil foliar jovem (tendência mais esverdeada). Não houve diferença aparente entre os métodos de obtenção do extrato e os valores do Ângulo de Hue e para as plantas de perfil mais jovem, as amostras provenientes de plantas do sexo feminino se mostraram mais avermelhadas enquanto que para as plantas do sexo masculino, os extratos foram mais esverdeados. López-Córdoba et al., (2014) prepararam um cristalizado de *blend* de erva-mate com sacarose com efeito antioxidante, produzindo dois produtos com concentrações diferentes de erva-mate e os valores do ângulo de Hue foram da ordem de 90°, o que foi compatível com extratos obtidos de plantas do sexo feminino com perfil foliar mais jovem neste estudo.

Tabela 6. Comparação dos valores do Ângulo de Hue (h^0) entre as progênies, perfis foliares e métodos de extração.

Progênie	Infusão de Perfil	Soxhlet de Perfil	Infusão de Perfil	Soxhlet de Perfil
	Foliar Maduro	Foliar Maduro	Foliar Jovem	Foliar Jovem
1	-25,91±82,99 ^{abAB}	46,26±15,15 ^{aA}	-76,52±2,19 ^{aB}	-78,66±0,10 ^{aB}
2	61,66±19,52 ^{aA}	80,72±10,89 ^{bA}	-76,13±0,90 ^{aB}	-80,87±0,21 ^{bC}
3	85,53±0,89 ^{cA}	1,93±123,02 ^{abcdAB}	-76,65±0,13 ^{aB}	-77,91±1,90 ^{abB}
4	67,66±29,67 ^{acA}	1,63±1,66 ^{cB}	-80,39±1,89 ^{aC}	-76,57±1,55 ^{aC}
5	49,55±3,84 ^{aA}	-13,38±94,86 ^{abcdAB}	55,45±8,05 ^{bA}	-78,14±1,02 ^{aB}
6	-17,45±94,86 ^{abAB}	55,45±8,05 ^{aA}	-76,55±0,68 ^{aB}	-78,14±1,02 ^{aB}

7	-81,07±4,31 ^{bA}	-76,53±3,18 ^{dA}	-77,31±0,04 ^{aA}	-79,11±0,45 ^{aA}
8	-78,58±4,64 ^{bA}	68,11±27,90 ^{abB}	-75,56±1,59 ^{aA}	-76,29±2,66 ^{aA}
9	48,08±3,23 ^{aA}	-73,49±0,22 ^{dB}	-79,02±0,96 ^{aC}	-82,35±0,14 ^{cD}
10	-82,83±4,57 ^{bA}	-77,74±0,51 ^{dA}	-78,84±1,71 ^{aA}	-78,70±0,50 ^{aA}
Média	2,67	1,29	-75,24	-78,67

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ao nível de 95% dos valores entre as progênes enquanto que letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença ao nível de 95% entre os valores dos métodos de extração e perfil foliar.

FONTE: Elaborada pela própria autora.

Para se identificar características em comum entre os parâmetros de cor estudados (L^* , a^* , b^* , C^* e h^0), foi aplicada a técnica de Análise de Componentes Principais (ACP) para agrupar os dados de acordo com os agrupamentos a que eles pertencem. O ACP busca reduzir o número de dimensões dos dados (no caso 20, já que são 4 grupos aplicados a cada um dos 5 parâmetros) através de suas características em comum. O *Scree plot* é um diagrama que indica o número de dimensões que pode ser empregado em função da porcentagem da variância total do conjunto explicada por essas dimensões. De acordo com o diagrama da figura 4, um total de 70% da variância pode ser explicado por 4 dimensões. Portanto, 4 dimensões são consideradas suficientes para descrever o comportamento dos parâmetros de cor obtidos nesta dissertação.

De forma análoga ao presente estudo, Zhao et al., (2020), explicaram em sua Análise de Componentes Principais, nas primeiras quatro dimensões 81,29% da variância, sendo distribuída com os seguintes valores: (1° 39,93, 2° 21,02, 3° 10,85 e 4° 9,49%).

Ainda em consonância com essa dissertação, Anjos, Frazão e Caldeira (2017) na caracterização físico-química e sensorial de aguardente de mel obteve nas suas duas primeiras dimensões, 75% de variância, sendo na primeira dimensão (49,6%) e na segunda dimensão (25,4%).

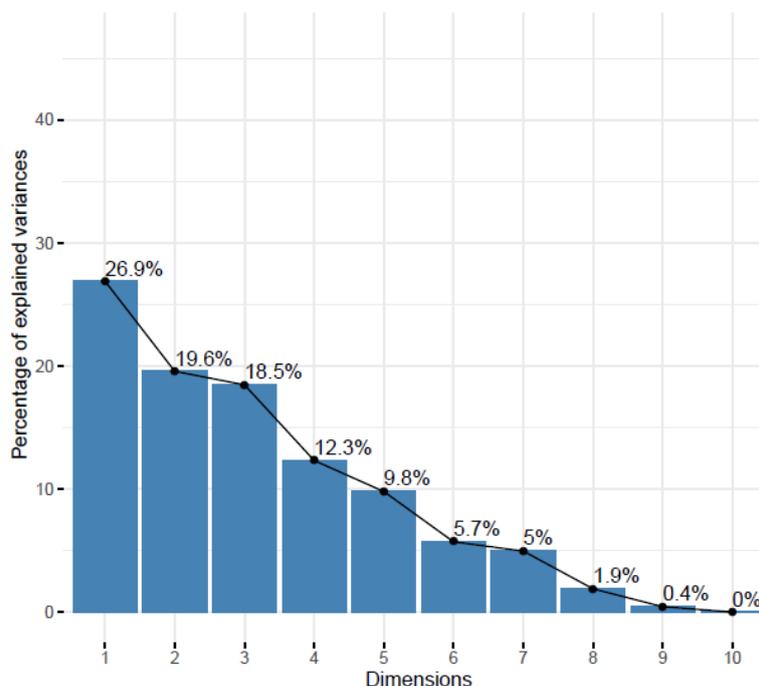


Figura 4. *Scree plot* indicando a porcentagem de variância explicada por cada dimensão.

FONTE: Elaborada pela própria autora.

A Figura 5 mostra um diagrama apontando as correlações e contribuições de cada grupo para as duas primeiras dimensões (que são responsáveis por 46,5% da variância total dos resultados). Nessa figura as letras H, L, C, a e b representam os parâmetros de cor, as letras J e M correspondem aos perfis foliares jovem e maduro, respectivamente, e as letras I e S representam os métodos de extração por Infusão e Soxhlet, respectivamente. Conforme pode ser observado, os elementos obtidos pelo método de extração Soxhlet e para as amostras foliares jovens estão localizados próximos entre si no primeiro ou no início do segundo quadrante, o que indica uma correlação entre este método e os valores globais dos parâmetros de cor. Já os elementos obtidos por Infusão ou com perfil foliar maduro não estão tão associados entre si, tendo em vista que estão mais espalhados pelo círculo. Um diagrama incluindo as progênies está apresentado na Figura 6. Neste diagrama, pode ser visualizada uma correlação entre os parâmetros de cor das progênies do sexo feminino (de 1 a 5), as quais estão localizadas bem próximas podendo ser consideradas um grupo com parâmetros em comum. No que diz respeito às progênies do sexo masculino, as progênies 7, 9 e 10 apresentam comportamento semelhante podendo ser reunidas em um único grupo, mas

as progênies 6 e 8 apresentam um comportamento distinto, devendo ser descritas separadamente.

Segundo Zhao et al., (2020), o ACP é conduzido para examinar o impacto da variável de forma individual e como a correlação entre os fatores se comporta e os agrupamentos se manifestam. As variedades de ervilhas estudadas pelo autor que apresentaram valores baixos ou altos de TPC, TFC, ABTS e FRAP foram classificadas em grupos separados.

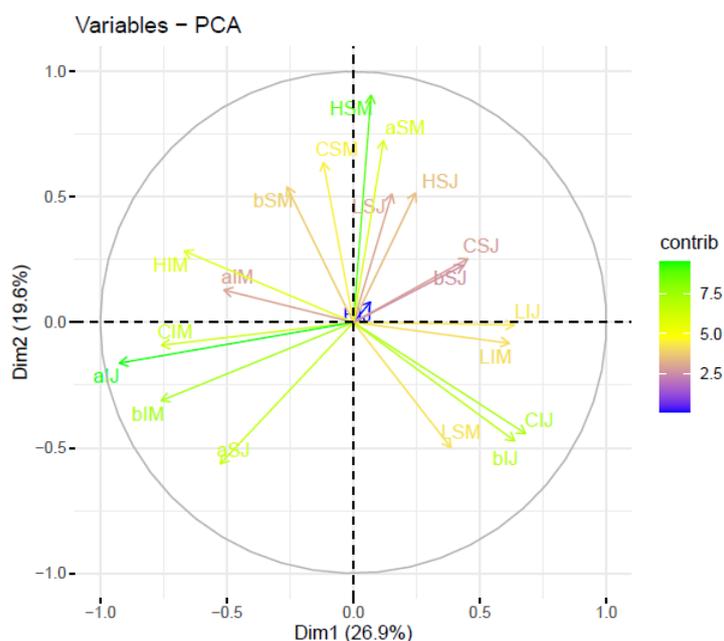


Figura 5. Diagrama mostrando correlações entre os elementos para as duas primeiras dimensões.

FONTE: Elaborada pela própria autora.

No conjunto de dados obtido por Anjos, Frazão e Caldeira (2017) que estudaram a caracterização físico-química de aguardentes de mel, duas amostras apresentaram comportamentos distintos entre si e que as mantiveram isoladas das demais amostras, isso mostra, que as não apresentaram afinidade com as demais nas variáveis estudadas, como podemos visualizar nesse estudo com a Progênie 8.

Dentre os atributos estudados por Almeida et al., (2020), para fermentados alcoólicos de mangaba, os seguintes: doçura, aparência, sabor, impressão global, aroma e intenção de compra, apresentaram um relação positiva com a amostra F3, comportamento não encontrado nas demais amostras testadas.

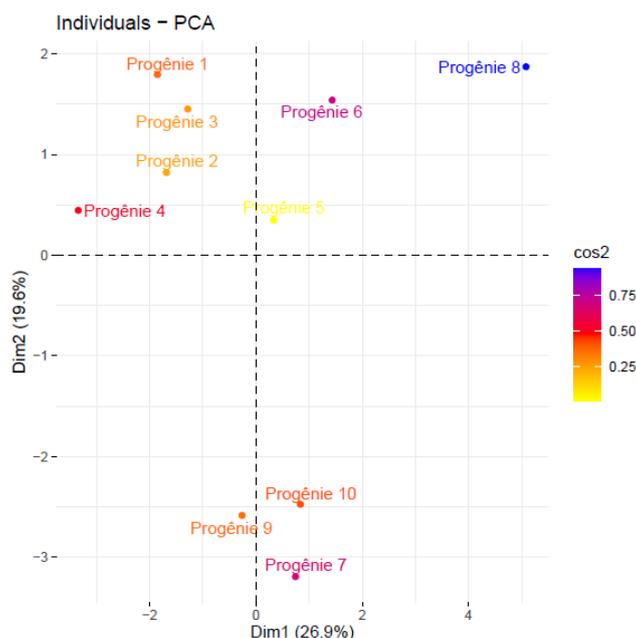


Figura 6. Diagrama mostrando correlações entre as progênies para as duas primeiras dimensões.

FONTE: Elaborada pela própria autora.

5.2. COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos para o teor de compostos fenólicos totais das 10 progênies e os tratamentos utilizados neste estudo. Os maiores valores obtidos para cada progênie estão destacado em negrito. Observou-se que, em geral, as maiores médias foram obtidas para as amostras com o perfil foliar jovem que foram extraídas pelo método da infusão. Isto pode ser explicado pelo método de Soxhlet, ser um processo extrativo de longos períodos e podem degradar alguns compostos da planta. Por sua vez, o método da infusão preserva melhor os compostos da planta. Além disso, a exposição solar aumenta a produção de fitoquímicos (FERREIRA et al., 2017; ROSSA et al., 2017). Não houve diferença estatística do teor de compostos fenólicos quanto ao sexo das plantas.

Os compostos fenólicos são agentes responsáveis pela atividade antioxidante. As espécies antioxidantes inibem reações em cadeia e reparam lesões causadas no organismo por radicais livres. Portanto, sugere-se o consumo de erva-mate por ser uma forma barata e eficaz de nutrir o corpo com antioxidantes (COLPO et al., 2016).

Tabela 7. Teor de compostos fenólicos totais entre as progênie, perfis foliares e métodos de extração.

Progênie	Infusão de Perfil	Soxhlet de Perfil	Infusão de Perfil	Soxhlet de Perfil
	Foliar Maduro (mg EGA g ⁻¹)	Foliar Maduro (mg EGA g ⁻¹)	Foliar Jovem (mg EGA g ⁻¹)	Foliar Jovem (mg EGA g ⁻¹)
1	933±622 ^{aA}	1176±108 ^{abAB}	2350±626^{abB}	2120±1112 ^{abcAB}
2	933±188 ^{aA}	1160±744 ^{abA}	1573±735 ^{abA}	2056±080^{bcA}
3	940±160 ^{aA}	1600±173 ^{abAB}	2213±1027^{bB}	1440±433 ^{bcAB}
4	1190±840 ^{aA}	1456±278^{bA}	803±193 ^{Aa}	983±127 ^{bcA}
5	1236±532 ^{aA}	910±391 ^{abAB}	736±098 ^{Ab}	2640±047^{aC}
6	1566±763 ^{aAB}	830±089 ^{aAB}	1666±329^{bA}	436±471 ^{bB}
7	1226±339 ^{Aa}	1030±174 ^{abA}	1680±141^{abA}	2343±1286 ^{acA}
8	1033±103 ^{Aa}	633±292 ^{ab}	1536±070^{bC}	1173±414 ^{bcABC}
9	1463±614 ^{Aa}	1106±1074 ^{abA}	1760±292^{bA}	1650±447 ^{cA}
10	1663±614 ^{Aa}	933±245 ^{abA}	2170±1871^{abA}	2056±1296 ^{bcA}
Média	1218	1083	1649	1690

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ao nível de 95% dos valores entre as progênie enquanto que letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença ao nível de 95% entre os valores dos métodos de extração e perfil foliar.

FONTE: Elaborada pela própria autora.

Ferreira et al., (2016) prepararam extratos de folhas maduras de erva-mate com diferentes concentrações de álcool etílico via ultrassom, quantificando medias de (333 mg EAG L⁻¹), em comparação com esta dissertação, a amostra comparativa (folha madura) obteve médias de (1190 mg EAG L⁻¹) para infusão e (1030 mg EAG L⁻¹) para soxlet, esses métodos se mostraram melhores em comparação aos valores encontrados pelo autor.

Também adotando o método via ultrassom, Bisognin et al., (2019) usaram diferentes formulações mesclando metanol, água e acetona e em diferentes tempos de extração, obtendo médias de (21,39 mg EAG L⁻¹). Com resultados semelhantes, é possível citar Vera e Schmalko (2019), os quais avaliaram capsulas de erva-mate e o

teor de compostos fenólicos (19,93g EAG% ms), testando diferentes métodos de secagem e isotermas de adsorção.

5.3. TEOR DE CAFEÍNA E COMPOSIÇÃO DAS PROGÊNIES

A Tabela 8 apresenta as concentrações de cafeína encontradas para as amostras de cada progênie avaliada. A cafeína somente foi quantificada para as amostras de cada progênie que forneceram os maiores valores dos compostos fenólicos totais. Entretanto, uma tendência geral foi que as progênies do sexo masculino resultaram em um teor de cafeína mais alto que as progênies do sexo feminino. Segundo Borges et al., (2013) além do sexo da planta, a sua idade, genética, e fatores como a incidência de luz, temperatura, solo e condições de estresse, podem influenciar significativamente na quantidade de cafeína e demais metilxantinas.

A importância da cafeína reside no fato que trata-se do composto mais característico da erva-mate, além de seu consumo diário gerar benefícios medicinais (YUE et al., 2017) e proporcionar a diminuição da ingestão de açúcares e aumentar a produção de hormônios do bem-estar (serotonina e grelina), fazendo com que os níveis de gordura corporal diminuam (POURSHAHIDI et al., 2016). Entretanto, seu consumo excessivo pode gerar efeitos adversos tais como problemas cardiovasculares, osteoporose e aumento da ansiedade (WIKOFF et al., 2019).

Em uma análise do teor de cafeína das folhas de erva-mate em diferentes épocas do ano, Croce (2010) encontrou maior quantificação do composto nos meses de fevereiro e março, o que configura os meses mais quentes do ano (verão), contabilizando (1 g/100g).

Em um estudo semelhante a essa dissertação, Cardozo Júnior et al., (2010) avaliaram o teor de cafeína de progênies de erva-mate, com origem de Ivaí PR, Pinhão PR, Barão de Cotegipe RS, Quedas do Iguaçu PR, Cascavel PR, os valores do composto variaram (0,65 a 1,31 %, w/w), além da cafeína, foi encontrada teobromina, substância encontrada em nossa análise cromatográfica, nas progênies 4 a 10.

Apresentando a mesma conjuntura, Bastos et al., (2006) determinaram em progênies oriundas do estado do Paraná, Brasil, o conteúdo de cafeína, 5CQ e ácido cafeico, para a cafeína foi registrado (49.2 a 294.0 µg/mL), os demais compostos não foram identificados em nossas amostras.

Tabela 8. Concentração de cafeína para cada progênie.

Progênie	mg/g amostra
1	0,61±0,29 ^a
2	1,19±0,70 ^a
3	0,78±0,80 ^a
4	3,39±4,07 ^{ab}
5	2,52±3,26 ^{ab}
6	2,23±2,77 ^{ab}
7	4,98±5,57 ^{ab}
8	2,50±2,62 ^{ab}
9	4,28±0,10 ^b
10	0,90±0,11 ^a
Média	2,34

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ao nível de 95% dos valores entre as progênies.

FONTE: Elaborada pela própria autora.

Para a progênie 1, foram encontrados os seguintes componentes: α -cubebeno, eucaliptol, copaína, espatulenol, cafeína e cariofileno (ver Figura 7). É bem conhecido que estas substâncias apresentam potencial antibactericida, antifúngico, antitumoral, antioxidante e estimulante (SÓLIS et al., 2004; CERNA-CHÁVEZ et al., 2019; VELANDIA et al., 2019; DZUL-BEH et al., 2020; APARICIO-ZAMBRANO et al., 2019; TONET, ZARA, TIUMAN, 2019). Para a progênie 10, foram observadas as presenças de espatulenol, cariofileno, cafeína e terpineol. Dentre estas substâncias, recomenda-se o uso do terpineol para terapias de melanoma e alguns outros tipos de câncer (BATISTA et al., 2020; LIANG et al., 2020).

Print Date: 18 Nov 2020 16:07:29

Chromatogram Plot

File: ...ina 03\cafeina 04\cafeina 05\cafeina 06\cafeina 07\erva mate 01.sms
 Sample: ERVA MATE 01
 Scan Range: 1 - 3137 Time Range: 0.00 - 49.98 min. Operator: Arci Wastowski
 Date: 11/11/2020 22:44

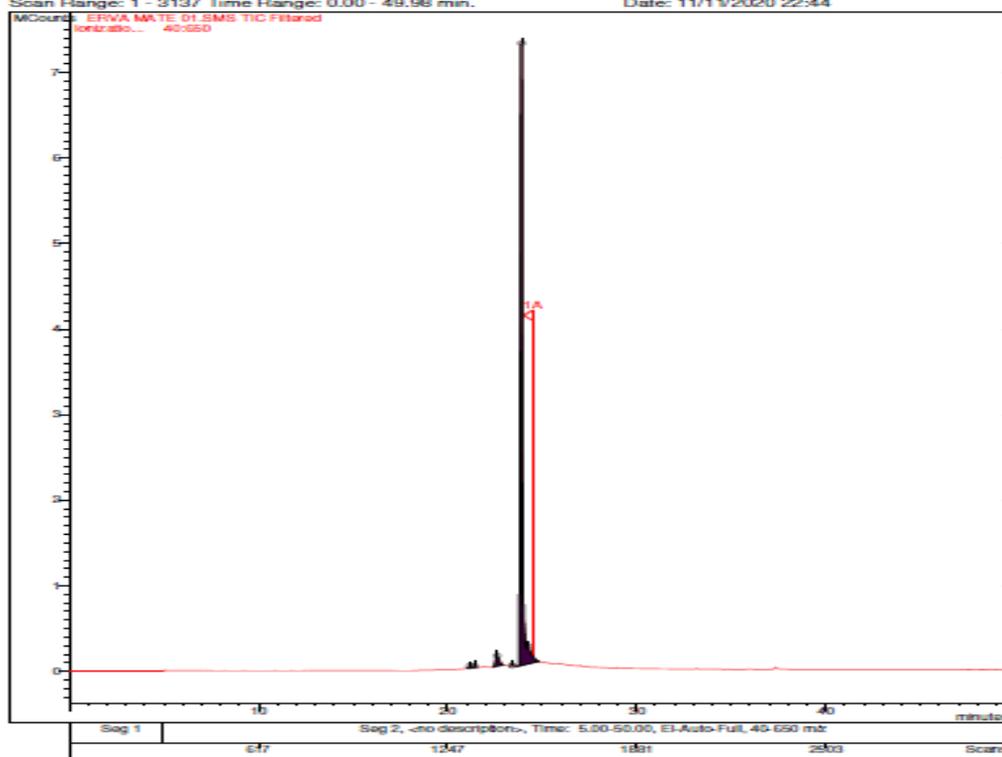


Figura 7. Cromatograma correspondendo à Progênie 1.

FONTES: Elaborada pela própria autora.

O phytol ou fitol, diterpeno encontrado na constituição da clorofila, muito usado na indústria cosmética, apresenta ação anticonvulsante em camundongos e seus análogos demonstraram ação antitubercular (SAIKA et al., 2010; COSTA et al., 2012). Esse composto foi identificado na constituição fitoquímica das progênies 4 e 7.

5.4. COMPORTAMENTO ALELOPÁTICO DOS EXTRATOS

5.4.1. TAXA DE GERMINAÇÃO

Os extratos referentes aos genótipos (progênies) de erva-mate apresentaram efeitos promissores para a taxa de germinação (Tabela 9). Foram utilizadas duas amostras como controle (sem adição de extrato) e seus valores foram iguais a $85,0 \pm 7,1\%$ e $80,0 \pm 14,1\%$.

Como se observa, com o aumento da concentração dos extratos, há uma redução do índice de germinação, conforme esperado. Dentre as progênies testadas, se observa que a Progênie 7 apresentou, em média, resultados mais satisfatórios para as duas concentrações de extrato empregadas. Essa progênie também é a que apresentou maior valor médio absoluto de cafeína, o que sugere que possa haver uma conexão entre esses fatos. Entretanto, são necessários mais estudos para se validar essa hipótese.

Em estudo similar, Wang et al., (2017) aplicaram extratos de folhas verdes e vermelhas de *Rhus tiphina*, encontrando resultados variando de 27.31 a 57.83% na taxa de germinação de *Lactuca sativa*. Em conformidade com o presente estudo, Carvalho et al., (2019) encontraram 95% de inibição da germinação em *Lactuca sativa* na maior parte de seus extratos, derivados da planta *Amaranthus spp.*

Tabela 9. Índice de germinação para cada progênie e concentrações de 20% e 50% de extratos.

Progênie	Concentração 20% (%)	Concentração 50% (%)
1	55,0±0,0 ^{aA}	5,0±0,0 ^{aB}
2	67,5±3,5 ^{beA}	7,5±3,5 ^{aB}
3	57,5±3,5 ^{cA}	5,0±0,0 ^{aB}
4	70,0±0,0 ^{eA}	5,0±0,0 ^{aB}
5	47,5±3,5^{dA}	7,5±3,5^{aB}
6	52,5±3,5 ^{acdA}	17,5±14,1 ^{aB}
7	47,5±3,5^{dA}	5,0±0,0^{aB}
8	65,0±0,0 ^{bA}	5,0±0,0 ^{aB}
9	60,0±14,1 ^{abcdeA}	5,0±0,0 ^{aB}
10	80,0±7,1 ^{fA}	5,0±0,0 ^{aB}
Média	55,5	6,75

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ao nível de 95% dos valores entre as progênies enquanto que letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença ao nível de 95% entre as concentrações.

FONTE: Elaborada pela própria autora.

O principal motivo do estudo da Alelopatia tem o intuito de entender o comportamento dos metabólitos secundários de uma planta em relação a outras plantas. A partir dessa informação, é possível desenvolver herbicidas de forma natural, sem produtos químicos sintéticos para amenizar o problema das plantas daninhas. Nesse contexto, Ximenez et al., (2019) elaborara, extratos de forma bruta e fracionada de *Machaerium hirtum* para aplicação sobre duas plantas daninhas: *Euphorbia heterophylla* L. (leiteira) e *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O' Donnel (corda-de-viola), resultando na redução do tamanho da raiz e parte aérea das plântulas testadas em todas as concentrações comparadas ao controle. Nishimuta et al., (2019), aplicaram extratos de *Vernonanthura brasiliiana*, conhecida como assa-peixe e testaram sobre *Lactuca sativa*. As taxas de germinação resultantes deste processo variaram de 68 a 99%.

5.4.2. COMPRIMENTO DA RAIZ

Dos parâmetros necessários para a avaliação da atividade alelopática de uma planta, o comprimento de raiz, complementa a taxa de germinação. Enquanto que o índice germinativo foca no comportamento dos metabólitos secundários para inibir a profusão de outras plantas, o comprimento de raiz e parte aérea estudam a redução e como o crescimento normal de determinado vegetal é afetado.

Nesse sentido, as progênes 5 e 7 apresentaram os melhores resultados de inibição do crescimento das raízes de *Lactuca sativa* nas concentrações testadas dos extratos hidroetanólicos de erva-mate (Tabela 10). Os valores do comprimento da raiz para as amostras controle foram iguais a $39,95 \pm 3,01$ cm e $42,71 \pm 10,34$ cm.

Baratelli et al., (2012) obtiveram um resultado de 14,48 cm com o seu extrato etanólico de folhas verdes de *Terminalia catappa* L. (*Combretaceae*) em *Lactuca sativa*. Às vezes, não é só o crescimento de raiz um fator importante a ser seguido para a descoberta do potencial bioherbicida. A planta inibidora pode afetar também a parte aérea da planta como mostrado por Tigre et al., (2015) que estudaram a influência de compostos fenólicos de *Cladonia verticillaris* em *Lactuca sativa*.

Tabela 10. Comprimento da raiz (cm) para cada progênie e concentrações de 20% e 50% de extratos.

Progênie	Concentração 20%	Concentração 50%
1	11,56±3,42 ^{aA}	0,15±0,07 ^{Ab}
2	5,68±1,46 ^{bA}	0,28±0,04 ^{Bb}
3	9,29±9,77 ^{abA}	0,25±0,07 ^{abB}
4	12,66±8,24 ^{abA}	0,15±0,07 ^{Ab}
5	4,52±1,69 ^{bA}	0,23±0,04 ^{abB}
6	6,56±0,57 ^{bA}	1,09±1,12 ^{abB}
7	4,98±2,19 ^{bA}	0,20±0,00 ^{abB}
8	12,84±3,49 ^{aA}	0,15±0,00 ^{abB}
9	10,97±9,67 ^{abA}	0,20±0,00 ^{abB}
10	13,68±1,91 ^{aA}	0,25±0,07 ^{bB}
Média	9,27	0,29

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ao nível de 95% dos valores entre as progênies enquanto que letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença ao nível de 95% entre as concentrações.

FONTE: Elaborada pela própria autora.

5.4.3. COMPRIMENTO DA PARTE AÉREA

Dentre as progênies avaliadas, a enumerada como 5, se mostrou com o melhor valor de redução de parte aérea. Jelassi et al., (2016) aplicaram extratos de vagens de *Acacia cyclops* em *Lactuca sativa*. Os autores relataram que o produto influenciou o crescimento das mudas com porcentagens de inibição de 63,68% e 88,21% para os comprimentos da parte aérea e da raiz, respectivamente. Ladhari et al., (2020) avaliaram a influência de extratos de folhas e galhos de cultivares de *Ficus carica* L. frente a diferentes plantas daninhas e *Lactuca sativa*, obtendo os melhores efeitos às concentrações de 40 g/L e 6 g/L, tanto na germinação, quanto no crescimento da raiz e da parte aérea. Os valores do comprimento da parte aérea pra as amostras controle foram iguais a 24,14±10,11 cm e 24,29±6.

Para o parâmetro de comprimento de parte aérea, o extrato de concentração de 50%, inibiu a produção de parte aérea das plântulas de alface, então foram obtidos os dados da concentração controle e da concentração de 20%.

Tabela 11. Comprimento da parte aérea (cm) para cada progênie à concentração de 20% de extrato.

Progênie	Concentração 20%
1	13,03±1,99 ^a
2	13,06±10,13 ^{ab}
3	13,87±3,75 ^a
4	13,93±5,54 ^a
5	5,98±1,56 ^b
6	10,16±1,19 ^a
7	9,12±0,81 ^a
8	12,20±2,69 ^a
9	13,25±6,51 ^{ab}
10	14,21±3,27 ^a
Média	11,88

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ao nível de 95% dos valores entre as progênies.

FONTE: Elaborada pela própria autora.

5.5. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

De forma análoga à atividade alelopática, o potencial antimicrobiano da erva-mate se dá graças aos metabólitos secundários da planta. O antibiograma é uma metodologia que tem como finalidade avaliar o crescimento bacteriano frente a antibióticos ou compostos que possuem essa função.

Os extratos hidroetanólicos de erva-mate foram testados para averiguar o potencial antibacteriano da planta em relação à *Escherichia coli* ATCC 25922, em

comparação com os tratamentos controle e com o antibiótico sintético Ciprofloxacina (Tabela 12). Os resultados médios para o tratamento controle e para o antibiótico sintético foram iguais a $0,00 \pm 0,00$ mm e $27,67 \pm 2,52$ mm, respectivamente.

Tabela 12. Halo de inibição (mm) para cada progênie e concentrações de 20% e 50% de extratos.

Progênie	Concentração (20%)	Concentração (50%)
1	$12,97 \pm 11,24^{abcA}$	$6,67 \pm 1,53^{aA}$
2	$4,93 \pm 7,00^{abA}$	$7,00 \pm 1,00^{aA}$
3	$0,00 \pm 0,00^{aA}$	$6,33 \pm 1,15^{aB}$
4	$0,00 \pm 0,00^{aA}$	$10,30 \pm 5,56^{aB}$
5	$9,00 \pm 1,00^{bA}$	$5,30 \pm 0,61^{aB}$
6	$0,00 \pm 0,00^{aA}$	$8,67 \pm 2,89^{aB}$
7	$08,00 \pm 3,46^{cA}$	$10,33 \pm 3,79^{aB}$
8	$16,67 \pm 7,64^{bcA}$	$6,33 \pm 2,52^{aA}$
9	$0,00 \pm 0,00^{aA}$	$6,67 \pm 2,08^{aB}$
10	$10,00 \pm 10,00^{abcA}$	$6,00 \pm 2,00^{aA}$
Média	6,15	7,36

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença ao nível de 95% dos valores entre as progênies enquanto que letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença ao nível de 95% entre as concentrações.

FONTE: Elaborada pela própria autora.

A partir da Tabela 12, observa-se que alguns dos genótipos avaliados se mostraram mais eficientes à concentração de 20% dos extratos do que à concentração de 50%, com a produção de halos de inibição maiores. Uma hipótese que pode justificar essa ocorrência, é que como os testes foram executados com tempo de 30 dias de diferença, o que ter degradado parte dos compostos. Verifica-se que, na média a progênie 7 resultou em maiores halos de inibição podendo ser classificada como tendo maior ação antibacteriana frente ao patógeno considerado.

Com resultados semelhantes, Girolometto et al., (2009), pelo método de diluição avaliaram extratos de erva-mate em relação à *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Salmonella enteritidis* ATCC 11076, *Escherichia coli* ATCC 11299. Dentre essas bactérias, *Salmonella* se mostrou mais sensível ao extrato que às demais.

Burris, Higginbotham e Stewart Jr (2015) aplicaram extratos aquosos de erva-mate em *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 33591 e ATCC 33593. Essas cepas são resistentes à metilicilina, mas foram inativadas em todas as concentrações testadas.

6. CONCLUSÃO

Foi obtido neste estudo que o composto predominante em todas as progênies for a cafeína, sendo que mais compostos foram encontrados nas progênies 1 e 10. A concentração de cafeína foi bastante variada entre as amostras estudadas, mas, na média, as progênies do sexo masculino apresentaram mais cafeína do que as progênies do sexo feminino. Não foi observada diferença no teor de compostos fenólicos totais entre as progênies, mas as maiores concentrações foram obtidas para os extratos obtidos por infusão para as amostras de perfil foliar jovem. Os extratos gerados pelas folhas com perfil foliar mais maduro apresentaram tendência a apresentarem uma cor mais avermelhada, enquanto que as provenientes de folhas com perfil foliar mais jovem apresentaram uma tendência mais esverdeada. A análise de componentes principais mostrou que os sexos das progênies também influenciam os parâmetros de cor das amostras.

O extrato da progênie 7 foi o que apresentou melhores resultados para a inativação de *Escherichia coli* e pode ser empregado como uma alternativa natural útil para a substituição de antibióticos sintéticos em trabalhos futuros, sendo necessário mais testes com a concentrações de extrato. Os extratos provenientes das progênies 5 e 7 foram os que apresentaram melhores resultados nos ensaios alelopáticos e, os resultados sugerem que estes extratos podem ser utilizados para a inibição do crescimento de ervas daninhas.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para pesquisas futuras sugere-se:

- Avaliar mais concentrações de extratos nos testes alelopático e antimicrobiano.
- Verificar a utilização de novos solventes para a obtenção dos extratos e observar seu desempenho frente aos testes verificadores de potencial do produto.
- Aplicar a mesma metodologia adotada em outras bactérias de interesse alimentar (*Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella entérica*, etc.) e deteriorantes de alimentos (*Pseudomonas*, *Serratia*, *Alteromonas*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Acetobacter*, etc.).
- Isolar cada composto encontrado e testá-lo em diferentes frentes para avaliar as suas potencialidades e existência de sinergia.
- Observar os extratos das progênes avaliadas na inibição de germinação e crescimento de plantas daninhas.
- Aplicar a metodologia em maior número de amostras e repetições.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, M.A; BONAPAZ, L.S.; DUTRA, M.S.; DIEL, V.B.N; FRANCESCATO, L.N.; VELHO, R.V. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo volátil e extratos etanólicos de folhas e ramos de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (Erva-mate). Revista de Ciências Ambientais, v. 11, n. 3, p. 33-41, 2017.

ALBERTI, A.; BONA, E.; BORTOLINI, D.G.; BENVENUTTI, L.; BACH, F., DEMIATE, I.M.; NOGUEIRA, A. A multivariate approach to differentiate yerba mate (*Ilex paraguariensis*) commercialized in the southern Brazil on the basis of phenolics, methylxanthines and in vitro antioxidant activity. Food Science and Technology, v. 40, n.3, p. 644-652, 2020.

ALMEIDA, F.L.C.; OLIVEIRA, E.N.A.; ALMEIRA, E.C.; SILVA, L.N.; SANTOS, Y.M.G.S.; LUNA, L.C. Sensory study of alcoholic beverages mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes). Brazilian Journal of Food Technology, v. 23, e2019208, 2020.

ANJOS, O.; FRAZÃO, D.; CALDEIRA, I. Physicochemical and sensorial characterization of honey spirits. Foods, v. 6, n. 58, p. 1- 14, 2017.

ANWAR, T.; QURESHI, H.; PARVEEN, N.; BASHIR, R.; QAISAR, U.; MUNAZIR, M.; YASMIN, S.; BASIT, Z.; MAHMOOD, R.T.; NAYYAR, B.G.; KHAN, S.; KHAN, S.A.; QURESHI, M.M.; WALI, M. Evaluation of herbicidal potential of *Carica papaya* leaves. Brazilian Journal of Biology, v. 80, n. 3, p. 565-573, 2020.

APARICIO-ZAMBRANO, R.; VELASCO-CARILLO, J.; PAREDES-UZCATEGUI, R.; ROJAS-FERMIN, L. Chemical characterization and antibacterial activity of the essential oil of *Mangifera indica* L. in three regions of Venezuela. Revista Colombiana de Química, v. 48, p. 13-18, 2019.

BARATELLI, T.G.; GOMES, A.C.C.; WESSJOHAN, L.A.; KUSTER, R.M.; SIMAS, N.K. Phytochemical and allelopathic studies of *Terminalia catappa* L. (Combretaceae). Biochemical Systematics and Ecology, v. 41, p. 119-125, 2012.

BATISTA, F.A.; FONTELE, S.B.C.; SANTOS, L.K.B.; FILGUEIRAS, L.A.; NASCIMENTO, S.Q.; SOUSA, J.M.C.; GONÇALVES, J.C.R.; MENDES, A.N. Synthesis, characterization of α -terpineol-loaded PMMA nanoparticles as proposed of therapy for melanoma. Materials Today Communications, v. 22, p. 100762. 2020.

BISOGNIN, D.A.; LUZ, L.V.; LENCINA, K.H.; SANTOS, C.O.; SAUTLER, C.K. Contents of total phenolics and flavonoids in and antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* leaves. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 54, p. 1-8, 2019.

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.

BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M.F. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 16, p. 195-200, 2004.

BORGES, A.C.P.; DARTORA, N.; RIL, F.T.; GONÇALVES, I.L.; VALDUGA, A.T. Evaluation of the caffeine content in the oxidation of *Ilex Paraguariensis* St. Hill Leaves. *Revista de Ciencia y Tecnología*, v. 15, n. 20, p. 38-43, 2013.

BURRIS, K.P.; HIGGINBOTHAM, K.L.; STEWART JR., C.N. Aqueous extracts of yerba mate as bactericidal agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a microbiological medium and ground beef mixtures. *Food Control*, v. 50, p. 748-753, 2015.

CARVALHO, M.S.S.; ANDRADE-VIEIRA, L.F.; SANTOS, F.E.; CORREA, F.F.; CARDOSO, M.G.; VILELA, L.R. Allelopathic potential and phytochemical screening of ethanolic extracts from five species of *Amaranthus spp.* in the plant model *Lactuca sativa*. *Scientia Horticulturae*, v. 245, p. 90-98, 2019.

CERNA-CHÁVEZ, E.; ALEJANDRO-ROJAS, G.; OCHOA-FUENTES, Y.M.; AGUIRRE-URIBE, L.; LANDEROS-FLORES, J.; HERNÁNDEZ-BAUTISTA, O. Evaluación in vitro de principios activos de origen botánico para el control de hongos fitopatógenos. *Scientia Fungorum*, v. 49, e1245, 2019.

COLPO, A.C.; ROSA, H.; LIMA, M.E.; PAZZINI, C.E.F.; CAMARGO, V.B.; BASSANTE, F.E.M.; PUNTEL, R.; ÁVILA, D.S.; MENDES, A.; FOLMER, V. Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)-based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. *Food Chemistry* v. 209, p. 185-195, 2016.

CONESA, A.; MANERA, F.C.; BROTONS, J.M.; FERNANDEZ-ZAPATA, J.C.; SIMÓN, I.; SIMÓN-GRAO, S.; ALFOSEA-SIMÓN, M.; MÁRTINEZ-NICOLÁS, J.J.; VALVERDE, J.M.; GARCÍA-SANCHEZ, F. Changes in the content of chlorophylls and carotenoids in the rind of Fino 49 lemons during maturation and their relationship

with parameters from the CIELAB color space. *Scientia Horticulturae*, v. 243, p. 252–260, 2019.

CONTE, R.; GULLICH, L.M.D.; BILIBIO, D.; ZANELLA, O.; BENDER, J.P.; CARNIEL, N.; PRIAMO, W.L. Pressurized liquid extraction and chemical characterization of safflower oil: A comparison between methods. *Food Chemistry*, v. 213, p. 425–430, 2016.

COSTA, D.E.M.; RACANICCI, A.M.C.; SANTANA, A.P. Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract against microorganisms isolated from chicken meat. *Ciência Animal Brasileira*, v. 18, p. 1-7, 2017.

COSTA, J.P.; FERREIRA, P.B.; SOUSA, D.P.; JORDAN, J.; FREITAS, R.M. Anticonvulsant effect of phytol in a pilocarpine model in mice. *Neuroscience Letters*, v. 523, n. 2, p. 115-118, 2012.

CROCE, D.M. The physical and chemical characteristics of tea (*Ilex paraguariensis* St Hil) in Santa Catarina State. *Ciência Florestal*, v. 12, n. 2, p. 107-113, 2010.

DE BIASI, B.; GRAZZIOTIN, N.A.; HOFMANN JR., A.E. Antimicrobial activity of extracts of the leaves and branches of *Ilex paraguariensis* (erva-mate) . *Brazilian Journal of Pharmacognosia*, v. 19, n. 2B, p. 582-585, 2009.

DE BONA, E.A.M.; PINTO, G.S., BORGES, A.M.C.; WEBER, L.D.; FRUET, T.K.; ALVES, L.F.A.; MOURA, A.C. Evaluation of antimicrobial activity of erva-Mate (*Ilex paraguariensis*) over serovars of *Salmonella spp.* of poultry origin. *UNOPAR Científica, Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 12, p. 45-48, 2010.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A.R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 40, n. 3, p. 173-289, 2000.

DZUL-BEH, A.J.; GARCÍA-SOSA, K.; UC-CACHÓN, A.H.; BÓRQUEZ, J.; LOYOLA, L.A.; BARRIOS-GARCÍA, H.B.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L.M.; MOLINA-SALINAS, G.M. In vitro growth inhibition and bactericidal activity of spathulenol against drug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 29, n. 6, p. 798-800, 2019.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Sistema de produção para erva-mate / Joel Ferreira Penteado Junior, Ives Clayton Gomes dos Reis Goulart. – Brasília, DF: Embrapa, 152p., 2019.

FERNANDES, J.A. Erva-mate e frentes pioneiras: Dois mundos em um só espaço (1943 a 1970). Dissertação. Mestrado em História. Universidade Federal da Grande Dourados, 148p., 2012.

FERNANDES, J.A. A Produção de erva-mate na Colônia Agrícola Nacional de Dourados (CAND), Antigo Sul de Mato Grosso (1943 a 1965). XXVIII Simpósio Nacional de História. Florianópolis, 2015.

FERREIRA, M.D.; SPRICIGO, P.C. Colorimetria - princípios e aplicações na agricultura. Capítulo 1 – Livro: Instrumentação pós-colheita em frutas e hortaliças. Embrapa, 284p., 2017.

FERREIRA, T.S.; HELDWEIN, A.B.; DOS SANTOS, C.O.; SOMAVILLA, J.C.; SAUTTER, C.K. Substâncias fenólicas, flavonoides e capacidade antioxidante em erva-mate sob diferentes coberturas do solo e sombreamentos. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 18, n. 2, p. 588-596, 2016.

GIROLOMETTO, G.; AVANCINI, C.A.M.; CARVALHO, H.H.C.; WIEST, J.M. Atividade antibacteriana de extratos de erva mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 11, n. 1, p. 49-55, 2009.

GULLÓN, B.; EIBES, G.; MOREIRA, M.T.; HERRERA, R.; LABIDI, J.; GULLÓN, P. Yerba mate waste: A sustainable resource of antioxidant compounds. Industrial Crops & Products, v. 113, p. 398–405, 2018.

GURGEL, A.L.C.; DIFANTE, G.S.; MONTAGNER, D.B.; EUCLIDES, V.P.B.; ARAÚJO, A.R.; SANTANA, J.C.S. Principal component analysis of steers performance and structural and nutritional characteristics of Mombasa grass. Ciência Rural, v. 51, e20200306, 2021.

HARDER, M.N.C.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G.; ARTHUR, V. Avaliação quantitativa por colorímetro digital da cor do ovo de galinhas poedeiras alimentadas com urucum (*Bixa orellana*). Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, v. 102, p. 339-342, 2007.

HEEMAN, A.C.W.; HEEMAN, R.; KALEGARI, P.; SPIER, M.R.; SANTIN, E. Enzyme-assisted extraction of polyphenols from green yerba mate. Brazilian Journal of Food Technology, v. 22, e2017222, 2019.

JELASSI, A.; AYEB-ZAKHAMA, A.E.; NEJMA, A.B.; CHAARI, A.; HARZALLAH-SKHIRI, F.; JANNET, H.B.; Phytochemical composition and allelopathic potential of three Tunisian Acacia species. Industrial Crops and Products, v. 83, p. 339-345, 2016.

KADER, A.A. Perspective Flavor quality of fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 88, p. 1863–1868, 2008.

KIDMOSE, U.; EDELENBOS, M.; NORBACK, R.; CHRISTENSEN, L.P. Colour stability in vegetables. Chapter 8. In: *Color in food*: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, p. 179-232, 2002.

KUNGEL, P.T.A.N.; CORREA, V.G.; CORRÊA, R.C.G.; PERALTA, R.A.; SOKOVIC, M.; CALHELHA, R.C.; BRACHT, A.; FERREIRA, I.C.F.R.; PERALTA, R.M. Antioxidant and antimicrobial activities of a purified polysaccharide from yerba mate (*Ilex paraguariensis*). *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 114, p. 1161–1167, 2018.

LADHARI, A.; GAALICHE, B.; ZARRELLI, A.; GHANNEM, M.; MIMOUN, M.M. Allelopathic potential and phenolic allelochemicals discrepancies in *Ficus carica* L. cultivars. *South African Journal of Botany*, v. 130, p. 30-44, 2020.

LIANG, Y.; LI, S.; ZHENG, G.; ZHANG, L. β -Elemene suppresses the malignant behavior of esophageal cancer cells by regulating the phosphorylation of AKT. *Acta Histochemica*, v. 122, n. 4, 151538, 2020.

LÓPEZ-CÓRDOBA, A.; DELADINO, L.; AGUDELO-MESA, L.; MARTINO, M. Yerba mate antioxidant powders obtained by co-crystallization: Stability during storage. *Journal of Food Engineering*, v. 124, p. 158–165, 2014.

MA, A., GLASSMANN, H., CHUI, L. Characterization of *Escherichia coli* possessing the locus of heat resistance isolated from human cases of acute gastroenteritis. *Food Microbiology*, v. 88, 103400, 2020.

MACHADO, T.A.; COSTA, A.G.; ROGRIGUES, R.E.; SANTOS, M.A.; RIBEIRO, A.C.L.; MEGGUER, C.A. Quality of tomatoes under different transportation conditions by principal component analysis. *Revista Ceres*, v. 67, n. 6, p. 448-453, 2020.

MANRIQUE, C.I.; ARROYAVE-HOYOS, C.L.; GALVES-PAREJA, D. Bebidas cafeínadas energizantes: efectos neurológicos y cardiovasculares. *Iatreia*, v. 31, p. 65-75, 2018.

MARCANTE, N.C.; PRADO, R.M.; CAMACHO, M.A.; ROSSET, J.S.; ECCO, M.; SAVAN, P.A.L. Determination of dry matter and macronutrient content in leaves of fruit trees using different drying methods. *Ciência Rural*, v. 40, n. 11, p. 2398-2401, 2010.

MARTÍNEZ, M.M.; OCAMPO, D.M.; GALVIS, J.H.; VALENCIA, A. Antibacterial activity and in vivo cytotoxicity of ethanol extracts from *Bauhinia variegata* L. (*Fabaceae*). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, v. 16, p. 313-323, 2011.

MOYANO, M.J.; MÉNDELEZ-MÁRTINEZ, A.J.; ALBA, J.; HEREDIA, F.J.A comprehensive study on the colour of virgin olive oils and its relationship with their chlorophylls and carotenoids indexes (II): CIELUV and CIELAB uniform colour spaces. *Food Research International*, v. 41, p. 513–521, 2008.

MOREYRA, C.; CASTELLANOS, V.; TIBALDI, M.A.; ARIAS, V.; MOREYRA, E. Efecto de la cafeína sobre la presión arterial y parámetros de la rigidez vascular. *Insuficiência cardíaca*, v. 13, p. 67-71, 2018.

NEIRO, E.S.; NANNI, M.R.; ROMAGNOLI, F.; CAMPOS, R.M.; CEZAR, E.; CHICATI, M.L.; OLIVEIRA, R.B. Análise de cor de para discriminação de seis variedades de cana-de-açúcar em quatro épocas de colheita no ano. *Anais XVI Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto - SBSR*, Foz do Iguaçu, PR, Brasil, 2013, INPE.

NISHIMUTA, H.A.; ROSSI, A.A.B.; YAMASHITA, O.M.; PENA, G.F.; SANTOS, P.H.A.D.; GIUSTINA, L.D.; ROSSI, F.S. Leaf and Root Allelopathic Potential of the *Vernonanthura brasiliiana*. *Planta Daninha*, v. 37, e019208452, 2019.

NUNES, G.L.; BOAVENTURA, B.C.B.; PINTO, S.S.; VERRUCK, S.; MURAKAMI, F.S.; PRUDÊNCIO, E.S.; AMBONI, R.D.M.C. Microencapsulation of freeze concentrated *Ilex paraguariensis* extract by spray drying. *Journal of Food Engineering*, v. 151, p. 60–68, 2015.

OLIVEIRA, F.C.; MARQUES, T.R.; MACHADO, G.H.A.; CARVALHO, T.C.L.; CAETANO, A.A.; BATISTA, L.R.; CORRÊA, A.D. Jabuticaba skin extracts: phenolic compounds and antibacterial activity. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 21, e2017108, 2018.

OLIVEIRA, V.B., ZUCHETTO, M., OLIVEIRA, C.F., PAULA, C.S., DUARTE, A.F.S. MIGUEL, M.D., MIGUEL, O.G. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de *Dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, *dicksoniaceae*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 18, n. 1, p.230-239, 2016.

PEREIRA, J.C.; PAULINO, C.L.A.; ENDRES, L.; SANTANA, A.E.G., PEREIRA, F.R.S.; SOUZA, R.C. Allelopathic potential of ethanolic extract and phytochemical analysis of *Paspalum maritimum* Trind., *Planta Daninha*, v. 37, e019184596, 2018.

PIMENTEL, N.; LENCINA, K.H.; KIELSE, P.; RODRIGUES, M.B.; SOMAVILLA, T.M.; BISOGNIN, D.A. Productivity of mini-stumps and rooting of mini-cuttings of erva mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) clones. *Ciência Florestal*, v. 29, n. 2, p. 559-570, 2019.

POURSHAHIDI, L.K.; NAVARINI, L.; PETRACCO, M.; STRAIN, J.J. A Comprehensive Overview of the Risks and Benefits of Coffee Consumption. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.15, p. 671-684, 2016.

REIS, L.C.R.; FACCO, E.M.P.; SALVADOR, M.; FLÔRES, S.H.; RIOS, A.O. Antioxidant potential and physicochemical characterization of yellow, purple and orange passion fruit. *Journal of Food Science and Technology*, v. 55, n.7, p. 2679–2691, 2018.

ROCHA, J.A.; ROYO, V.A. Separação de clorofilas e carotenoides como ferramenta para o ensino de cromatografia preparativa. *Conexão ciência. UNIFOR-MG*, v. 10, n. 2, p. 40-46, 2015.

ROJAS-BEDOYA, L.; GÓMEZ-LÓPEZ, C.; MARÍN-PAREJA, N. Extraction of metabolites from *Calendula officinalis* and evaluation of their colorant and antibacterial capacity. *Revista Colombiana de Biotecnología*, v. 22, n. 1, p. 60 -69, 2020.

ROLIM, G.S.; CAMARGO, M.B.P.; LANIA, D.G.; MORAES, J.F.L. Classificação climática de Köppen e de Thornthwaite e sua aplicabilidade na determinação de zonas agroclimáticas para o estado de São Paulo. *Bragantia*, v. 66, n. 4, p. 711-720, 2007.

ROSSA, U.B.; ANGELO, A.C.; MAZUCHOWSKI, J.Z.; WESTPHALEN, D.J.; FRIZON, C.N.T.; MARTINS, C.E.N. Influence of light and fertilizers on methylxanthines and phenolic compounds in leaves of mate tea. *Ciência Florestal*, v. 27, n. 4, p. 1365-1374, 2017.

SAIKIA, D.; PARIHAR, S.; CHANDA, D.; OJHA, S.; KUMAR, J.K.; CHAMOTIYA, C.S.; SHANKER, K.; NEGI, A.S. Antitubercular potential of some semisynthetic analogues of phytol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 20, n. 2, p. 508-512, 2010.

SANTANA, P.M.; QUIJANO-AVILÉS, M.; CHOÉZ-GUARANDA, I.; LUCAS, A.B.; ESPINOZA, R.V.; MARTÍNEZ, D.; CAMACHO, C.; MARTÍNEZ, M.M. Effect of drying methods on physical and chemical properties of *Ilex guayusa* leaves. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, v. 71, p. 8617-8622, 2018.

SANTOS, M. Análise cromática de vinhos tintos da variedade Cabernet Sauvignon do Rio Grande do Sul. Dissertação. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 78 p., 2011.

SÓLIS, C.; BECERRA, J.; FLORES, C.; ROBLEDO, J.; SILVA, M. Antibacterial and antifungal terpenes from *Pilgerodendron uviferum* (D. Don) Florin. Journal of the Chilean Chemical Society, v. 49, p. 157-161, 2004.

SOUZA, M.; COMIN, J.J.; KURTZ, C.; LOVATO, P.E.; LIMA, A.P.; KUHNEN, S. Phenolic compounds with allelopathic potential of *Secale cereale* L. and *Raphanus sativus* L. grown under an agroecological No-Tillage System. Planta Daninha, v. 37, e019193842, 2019.

TIGRE, R.C.; PEREIRA, E.C.; SILVA, N.H.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.E. Potential phenolic bioherbicides from *Cladonia verticillaris* produce ultrastructural changes in *Lactuca sativa* seedlings. South African Journal of Botany, v. 98, p. 16-25, 2015.

TONET, A.; ZARA, R.F.; TIUMAN, T.S. Biological activity and quantification of bioactive compounds in yerba mate extract and its application in fish hamburger. Brazilian Journal of Food Technology, v. 22, n. 8, e2018054, 2019.

VELÂNDIA, S.A.; QUINTERO, E.; STASHENKO, E.E.; OCAZIONEZ, R.E. Antiproliferative activity of essential oils from colombian plants. Acta Biológica Colombiana, v. 23, n. 2, p. 189-198, 2018.

VERA, J.O.H; SCHIMALKO, M.E. Encapsulation of antioxidants from Yerba Mate concentrate: Influence of drying conditions. Revista de Ciencia y Tecnologia v. 21, n. 32, p. 48-55, 2019.

VIANA, E.S.; REIS, R.C.; JESUS, J.L.; JUNGHANS, D.T.; SOUZA, F.V.D. Physico-chemical characterization of new hybrids pineapple resistant to fusariosis. Ciência Rural. v. 43, n. 7, p. 1155-1161, 2013.

XIMENEZ, G.R.; SANTIN, S.M.O.; IGNOATO, M.C.; SOUZA, L.A.; PASTORINI, L.H. Phytotoxic potential of the crude extract and leaf fractions of *Machaerium hirtum* on the initial growth of *Euphorbia heterophylla* and *Ipomoea grandifolia*. Planta Daninha, v. 37, e019180433, 2019.

WANG, C.; ZHOU, J.; JIANG, K.; LIU, J. Differences in leaf functional traits and allelopathic effects on seed germination and growth of *Lactuca sativa* between red and green leaves of *Rhus typhina*. South African Journal of Botany, v. 111, p. 17-22, 2017.

WIKOFF, D.; WELSH, B.T.; HENDERSON, R.; BRORBY, G.P.; BRITT, J.; MYERS, E.; GOLDBERGER, J.; LIEBERMAN, H.R.; O'BRIEN, C.; PECK, J.; TENENBIEN, M.; WEAVER, C.; HARVEY, S.; URBANA, J.; DOEPKER, C. Systematic review of the potential adverse effects of caffeine consumption in healthy adults, pregnant women, adolescents, and children. *Food and Chemical Toxicology*, v. 109, p. 585-648, 2017.

WEDLING, I. Cloning systems of traditional and alternative Brazilian forest species. *International Conference of the IUFRO Working Party*, p. 32, 2018.

ZHAO, T.; SU, W.; QIN, Y.; WANG, L.; KANG, Y. Phenotypic diversity of pea (*Pisum sativum* L.) varieties and the polyphenols, flavonoids, and antioxidant activity of their seeds. *Ciência Rural*, v. 50, n. 5, e20190196, 2020.