

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
FLORESTAL

Leandro Vinícius da Luz

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E RESGATE DE PLANTAS ADULTAS
DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) POR ESTAQUIA**

Santa Maria, RS.
2016.

Leandro Vinícius da Luz

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E RESGATE DE PLANTAS ADULTAS DE ERVA-
MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) POR ESTAQUIA**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Engenharia Florestal**.

Orientador: Prof. Dilson Antônio Bisognin, PhD.

Santa Maria, RS
2016

Leandro Vinícius da Luz

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E RESGATE DE PLANTAS ADULTAS DE ERVA-
MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) POR ESTAQUIA**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Engenharia Florestal**.

Aprovado em 21 de dezembro de 2016.

Dilson Antônio Bisognin, PhD. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Dra. Cláudia Kaehler Sauter
(Departamento de Tecnologia Alimentos - UFSM)

Dra. Berta Maria Heinzmann
(Departamento de Engenharia Florestal - UFSM)

Dr. Cléber Witt Saldanha
(FEPAGRO)

Dra. Alice Teresa Valduga
(URI - Erechim)

Santa Maria, RS
2016

Nas entrelinhas desse trabalho existem inúmeras histórias de dificuldades vividas nesse período de doutorado. Por isso, dedico este trabalho a minha mãe Eloir da Luz, que nunca mediu esforços para viabilizar condições que me deram tranquilidade na realização desse sonho. As minhas irmãs Márcia e Adriana da Luz que sempre mandaram energias positivas. Aos meus sobrinhos João Vitor e Bruna que tiveram o “tio Lê” ausente ao longo desses anos. E, dedico também a Eliziane Pivoto Mello que conheci em sala de aula, se tornou uma amiga, namorada e meu maior porto seguro durante as grandes dificuldades que enfrentei. Fez-me crescer muito como homem e pessoa e sem ela não teria incorporado forças suficiente para chegar ao fim com êxito. Se hoje não estamos mais juntos, fica o meu reconhecimento da importância de ter tido você em minha vida. Por fim, de todos os aprendizados que tive nesse período, as lições de vida foram muito mais valiosas e há os ostentarei com mais orgulho do que o título de Doutor. Do íntimo do meu coração, muito obrigado a todos!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que se fez presente em todos os momentos de minha vida, sempre me guiando pelo melhor caminho e me dando forças para concluir essa etapa tão sonhada e tão especial da vida acadêmica.

Agradeço ao meu orientador, Prof. PhD Dilson Antonio Bisognin, por me orientar, ensinar e ajudar a crescer como acadêmico de doutorado. Mas, principalmente, pela oportunidade e ~~confiança depositada em mim diante das adversidades.~~

À Profa. Dra. Cláudia Kaehler Sauter, que me oportunizou aprender uma nova área de conhecimento e sempre me ajudou a encontrar caminhos para responder minhas dúvidas.

A colega, Ma. Clarissa Obem dos Santos, por sempre estar disponível a ensinar e ajudar a desenvolver as técnicas descritas nesse trabalho. Em especial, há boa convivência, que nos longos experimentos com certeza fez a diferença para o trabalho pesado parecer mais leve.

A colega e amiga, Dra Kelen Haygert Lencina, por ter me apresentado ao Laboratório de Melhoramento e Propagação Vegetativa de Plantas (MPVP) e ao prof. Dilson, além de sempre dar palavras de apoio e incentivo enquanto escutava os meus desabafos.

Aos colegas, Paula, Eliseo, Nathália, Uilian, Claudia, Thamires, Marina, Lucas, Sohaila, Marjana, Mhaiandry, Jonas e Joane pela ajuda na montagem e avaliação dos experimentos e principalmente pela convivência nesse período que o MPVP se tornou minha segunda casa.

À todos meus familiares, amigos e pessoas que, mesmo não mencionadas, contribuíram para a realização desse sonho. À Universidade Federal de Santa Maria, por meio do Programa de Pós Graduação em Engenharia Florestal, pela contribuição a minha formação acadêmica, e a CAPES, pelo fornecimento do apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

A gratidão é a memória do coração.
Antístenes (440 - 365 a.C.)

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria

ANÁLISE FITOQUÍMICA E RESGATE DE PLANTAS ADULTAS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) POR ESTAQUIA

AUTOR: LEANDRO VINÍCIUS DA LUZ
ORIENTADOR: DILSON ANTÔNIO BISOGNIN

Local e data: Santa Maria, 21 de dezembro de 2016.

A análise fitoquímica e o resgate de plantas adultas selecionadas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) constituem um grande desafio para viabilizar a clonagem massal. Os objetivos deste estudo foram definir um método rápido e eficiente de extração por ultrassom de compostos fenólicos e flavonoides totais e quantificar a capacidade antioxidante de folhas de *Ilex paraguariensis*, utilizando solvente menos agressivo e de baixo custo no Brasil (etanol) e comparar com os solventes mais utilizados na literatura (metanol e acetona), visando o uso em larga escala; quantificar os teores destes compostos e dos nutrientes do solo e folhas de plantas em produção de erva-mate; e resgatar plantas adultas de erva-mate por estaquia. O meio extrator consistiu em água destilada e as soluções aquosas de etanol, acetona e metanol, acidificadas ou não com ácido clorídrico a 1 %. Foram avaliados os compostos fenólicos totais, flavonoides e a atividade antioxidante pelos métodos 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)6-ácido-sulfônico (ABTS) e *ferric reducing antioxidant power* (FRAP). Amostras de folhas e solo de 61 plantas pré-selecionadas foram coletados e analisados quanto aos teores fitoquímicos, e, determinados os valores de macro e micronutrientes das folhas e solo. No resgate de plantas adultas, outras sete plantas de erva-mate foram submetidas ao anelamento para estimular a emissão de brotos epicórmicos e essas, seccionadas em estacas de gema única, tratadas com ácido indolbutírico (AIB). As estacas foram avaliadas quanto às porcentagens de sobrevivência e enraizamento aos 60 dias de cultivo em câmara úmida. As duas plantas com o maior potencial de enraizamento de estacas foram utilizadas para avaliar o efeito da posição de coleta das brotações, tratadas ou não com AIB, no enraizamento das mesmas. As condições de extração ideal para compostos fenólicos totais, flavonoides e a quantificação da capacidade antioxidante foram encontradas utilizando o método FRAP com amostras de erva-mate tratadas com solvente hidroetanol 70 % acidificado, submetidas a 15 min. de ultrassom e 30 min. de agitação mecânica. Os compostos fenólicos e flavonoides totais apresentam alta estimativa de correlação. Esses compostos também apresentam alta correlação com a capacidade antioxidante, principalmente quando determinados pelo método FRAP. Os teores de compostos fenólicos totais, flavonoides e a capacidade antioxidante apresentam grande variação entre plantas em produção de erva-mate, possibilitando a distribuição das mesmas em cinco grupos distintos voltados para a seleção de plantas para esses caracteres. Estes compostos são correlacionados positivamente entre si e com o pH e a disponibilidade de fósforo e o zinco no solo. É possível resgatar plantas adultas de erva-mate por estaquia de brotações adventícias. O AIB promove o aumento da porcentagem de enraizamento, o que facilita o resgate de plantas adultas de erva-mate. A planta matriz afeta a sobrevivência das estacas e a competência ao enraizamento, além de alterar o efeito de posição de coleta das brotações.

Palavras-chave: Método de extração; Tecnologia alternativa; Química verde; Seleção de plantas; Árvores matrizes; Produção de Mudas.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Graduate Program of Forest Engineering
Federal University of Santa Maria

PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND RESCUE OF ADULT ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* ST. HILL.) PLANTS BY CUTTING

AUTHOR: LEANDRO VINÍCIUS DA LUZ
ADVISER: DILSON ANTÔNIO BISOGNIN

Place and date: Santa Maria, December 21th, 2016.

The phytochemical analysis and rescue of selected adult plants of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) constitute a great challenge to enable mass cloning. The objectives of this research were to define a fast and efficient method of ultrasonic extraction of total phenolic compounds and flavonoids and to quantify the antioxidant capacity of *Ilex paraguariensis* leaves using less aggressive and low cost solvent in Brazil (ethanol) and compare with most used solvents (methanol and acetone) found in the literature, aiming at the large scale use; to quantify the contents of these compounds and of the nutrients of the soil and leaves of plants in production of mate; and rescue adult plants by cuttings. The extractor solvents were distilled water and aqueous solutions of ethanol, acetone and methanol, acidified or not with 1% hydrochloric acid. We evaluated the phenolic compounds and the total flavonoid and antioxidant activity with the methods 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolin) 6-sulfonic acid (ABTS) and *ferric reducing antioxidant power* (FRAP). Leaf and soil samples from 61 preselected plants were collected and analyzed for phytochemical contents, and the macro and micronutrient values of leaves and soil were determined. In the rescue of adult plants, seven other mate plants were submitted to girdling to stimulate the emission of epicormic shoots. Shoots were sectioned in single node cuttings, treated with indolebutyric acid (IBA). The cuttings were evaluated for percentages of survival and rooting at 60 days of cultivation in a humid chamber. The two plants with the greatest potential for rooting of cuttings were used to evaluate the effect of the position of collection of the shoots, treated or not with IBA, in the rooting of the same ones. The ideal extraction conditions for total phenolic compounds, flavonoids and the quantification of the antioxidant capacity were found using the FRAP method with mate samples treated with 70 % acidified hydroethanol solvent, submitted to 15 min. of ultrasound and 30 min. of mechanical agitation. Phenolic compounds and flavonoids have high correlation estimations. These compounds also have a high correlation with antioxidant capacity, especially when determined by the FRAP method. The contents of total phenolics, flavonoids and antioxidant capacity show great variation between mate plants in production, enabling the distribution of the same in five different groups aiming selecting for these characters. These compounds are positively correlated with each other and the pH and the availability of phosphorus and zinc in the soil. It is possible to rescue adult plants of mate by cuttings from adventitious shoots. The AIB promotes an increase in the percentage of rooting, which facilitates the rescue of adult plants of mate. The genetic affects the survival of the cuttings and the competence for rooting, besides changing the effect of position of collection of the shoots.

Keywords: Extraction method; Phytochemicals; Alternative technology; Green chemical; Plant Selection; Stock plants; Seedling production.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Área de distribuição natural de erva-mate..... 18

Figura 2 – Ramo com folhas de erva-mate..... 19

CAPÍTULO 3

Figura 3 – Divisão da planta matriz de erva-mate em quatro porções para coleta de brotações (A), brotações epicórmicas formadas abaixo do anelamento (B), estacas em bandejas de 128 alvéolos para o enraizamento (C), estaca enraizada no momento da retirada da câmara úmida (D)..... 68

Figura 4 – Incremento médio diário (IMD) e incremento corrente diário (ICD) da porcentagem de enraizamento das estacas de erva-mate coletadas em diferentes posições da planta 13SM01 (A, C, E, G) e da planta 13SM05 (B, D, F e H) em função do tempo de permanência em câmara úmida..... 72

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 – Aplicações industriais e usos alternativos da erva mate.....	20
--	----

CAPÍTULO 2

Table 2 – Content of total phenolic compounds and total flavonoids in leaves of erva-mate extracted in ultrasound with different solvents and extraction times. Santa Maria, RS, 2015.....	38
---	----

Table 3 – Antioxidant capacity in leaves of erva-mate extracted with different solvents and ultrasound extraction times using DPPH, ABTS and FRAP methods. Santa Maria, RS, 2015.....	39
--	----

Table 4 – Pearson correlations for contents of total phenolic compounds, flavonoids and antioxidant capacity by DPPH, ABTS and FRAP in leaves of erva-mate. Santa Maria, RS, 2015.....	40
---	----

CAPÍTULO 3

Tabela 5 – Agrupamento de plantas em produção de erva-mate pelo método das K-médias, com base nos teores de compostos fenólicos e de flavonoides totais e da capacidade antioxidante.....	54
--	----

Tabela 6 – Média dos teores de compostos fenólicos, flavonoides e capacidade antioxidante em folhas de erva-mate dos diferentes grupos formados por plantas em produção de erva-mate.....	55
--	----

Tabela 7 – Correlação linear de Person (ρ) entre pH em água e as concentrações de zinco e fósforo no solo e os teores de compostos fenólicos, flavonoides totais e capacidade antioxidante pelo método de FRAP em folhas de plantas em produção erva-mate.....	56
--	----

CAPÍTULO 4

Tabela 8 – Porcentagem de sobrevivência e enraizamento de estacas de erva-mate aos 60 dias de cultivo em câmara úmida.....	68
---	----

Tabela 9 – Porcentagem de sobrevivência e de enraizamento das estacas de erva-mate de diferentes plantas matrizes tratadas ou não com ácido indolbutírico (AIB) aos 60 dias de cultivo em câmara úmida.....	73
--	----

Tabela 10 – Área abaixo da curva de progressão da porcentagem de enraizamento de estacas de duas plantas matrizes de erva-mate coletadas em diferentes posições e submetidas ou não a aplicação de ácido indolbutírico (AIB) até os 90 dias de cultivo em câmara úmida.....	75
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 OBJETIVO GERAL.....	17
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
CAPÍTULO 1.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 ERVA-MATE.....	18
2.2 COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA EM PLANTAS.....	21
2.2.1 Parâmetros de avaliação em métodos de extração.....	24
2.3 SELEÇÃO DE PLANTAS DE ERVA-MATE.....	25
2.4 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA.....	28
2.4.1 Fatores que influenciam a propagação por estaquia.....	29
CAPÍTULO 2 – EXTRACTION OF PHENOLIC AND FLAVONOID COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF <i>Ilex paraguariensis</i> LEAVES WITH ULTRASOUND.....	31
3 INTRODUCTION.....	33
3.1 MATERIAL AND METHODS.....	35
3.1.1 Reagents.....	35
3.1.2 Preparation of extracts.....	35
3.1.3 Determination of total phenolic compounds.....	35
3.1.4 Determination of flavonoids.....	36
3.1.5 Determination of antioxidant capacity in vitro.....	36
3.1.5.1 DPPH method (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).....	36
3.1.5.2 ABTS Method (2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid).....	36
3.1.5.3 FRAP Method (ferric reducing antioxidant power).....	37
3.1.6 Statistical analysis.....	37
3.2 RESULTS.....	37
3.3 DISCUSSION.....	40
3.4 CONCLUSIONS.....	44
REFERENCES.....	44
CAPÍTULO 3 – ANÁLISE FITOQUÍMICA DE PLANTAS EM PRODUÇÃO DE ERVA-MATE.....	49
4 INTRODUÇÃO.....	50
4.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1.1 Reagentes.....	51
4.1.2 Seleção das plantas e coleta das amostras.....	51
4.1.3 Preparo dos extratos.....	52
4.1.4 Determinação dos compostos fenólicos totais.....	52
4.1.5 Determinação dos flavonoides.....	52
4.1.6 Determinação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> pelo método FRAP.....	52
4.1.7 Determinação dos teores de macro e micronutrientes nas folhas e no solo....	53
4.1.8 Análise estatística.....	53
4.2 RESULTADOS.....	54
4.3 DISCUSSÃO.....	56
4.4 CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
CAPÍTULO 4 – RESGATE DE PLANTAS ADULTAS E PROPAGAÇÃO DE ERVA-MATE POR ESTAQUIA.....	62
5 INTRODUÇÃO.....	64
5.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	66

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
5.3 CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

1 INTRODUÇÃO

A *Ilex paraguariensis* St. Hill (Aquifoliaceae), conhecida popularmente como erva-mate, é espécie nativa do Sul do Brasil, da Argentina e do Paraguai. Cerca de 80 % da área de ocorrência pertence ao Brasil, sendo que a região Sul é a maior produtora e consumidora de erva-mate em virtude da tradição do chimarrão (HECK; MEJIA, 2007). Em razão dessa tradição, em 1980, a Lei estadual nº 7.439 instituiu a erva-mate como a árvore símbolo do Estado do Rio Grande do Sul. Atualmente, o Estado do Paraná é o maior produtor do país, sendo que a alta produtividade em alguns municípios é resultante de condições climáticas favoráveis, aliada à maior demanda pelo produto e bons preços de comercialização. Tais fatores foram responsáveis pelo aumento de 4,3 % na produção nacional de erva-mate nativa em 2010 e de 1 % no ano de 2011. Apesar do aumento de produção total da erva-mate, o Rio Grande do Sul, foi o único que reduziu a sua produção de 24.231 toneladas no ano de 2010 para 23.579 toneladas em 2011 (IBGE, 2011).

A erva-mate apresenta diversas aplicações industriais, tais como: corante, conservante de alimentos, em produtos de higiene e cosméticos, na produção de folhas utilizadas para a preparação do chimarrão e de chás (MACCARI; MAZUCHOWSKI, 2000), assim como extratos solúveis para bebidas (VALDUGA et al., 2003; RIBANI et al., 2011), apresentando, portanto, relevante importância econômica, social e ecológica (DONADUZZI et al., 2003). Diante do potencial desenvolvimento para o agronegócio da erva-mate e a ampliação do mercado para além do consumo na forma de chimarrão e chás, estudos que aprofundem a sua utilização enquanto planta fitoterápica são extremamente necessários. Segundo Melo e Guerra (2002), nos últimos anos, a procura por alimentos que possuam substâncias nutracêuticas e que sejam benéficas à saúde tem aumentado, contexto esse em que também se enquadra a erva-mate. Diante dos potenciais, destaca-se que os compostos da erva-mate atuam sobre a modulação lipídica normalizando os lipídios, com redução de colesterol LDL (RESENDE et al., 2015; MORAIS, 2009), estimulam o sistema nervoso central; atuam como um diurético; inibem *in vitro* a proliferação de células de carcinoma de cólon, possuem ação antioxidante (MEJÍA et al., 2010; BRAVO et al. 2014; GAO et al. 2013), inibindo os danos causados pelos radicais livres (BASTOS et al., 2007), além de ação antimicrobiana (BIASI et al., 2009).

Os principais compostos bioativos presentes na erva-mate são os fenólicos, as saponinas e metilxantinas. Entre os compostos fenólicos destaca-se o elevado conteúdo de derivados de cafeoilquínicos; os ácidos clorogênico, cafeico, gálico e p-cumárico; flavonoides como epicatequina e galocatequina aos quais se atribuem a ação adstringente do produto além de ação antioxidante, protegendo contra doenças cardiovasculares (FILIP et al., 2009;

CARDOSO-JÚNIOR et al. 2007; MORAIS et al., 2009). Dentre as classes de saponinas encontram-se triterpenoides glicosilados, os ácidos ursólicos e oleanóico (GNOATTO et al., 2005). Tais substâncias são responsáveis pelo sabor amargo e a formação da espuma do mate. As metilxantinas são alcaloides com alto poder estimulante do sistema nervoso central. Na erva-mate, estes compostos são encontrados em altas concentrações, sendo a cafeína a principal metilxantina, seguida da teobromina e teofilina (FILIP et al., 2009; MORAIS et al., 2009).

A extração dos compostos com propriedades farmacológicas é uma das etapas mais críticas nas pesquisas com produtos naturais (XYNOS et al., 2012). Isso ocorre porque a eficiência da extração depende de vários fatores, como o tipo de amostra utilizada, o tipo e localização dos analitos a serem extraídos (MUSTAFA; TURNER, 2011), o tipo de solvente extrator (XYNOS et al., 2012), o método e a temperatura de extração (GALANAKIS et al., 2010), o tempo e o pH de extração (NACZK; SHAHIDI, 2004; SILVA, et al., 2007).

A grande variabilidade genética da erva-mate associada às variações ambientais são consideradas os maiores responsáveis pela variação dos teores fitoquímicos da espécie (ATHAYDE et al., 2000). No entanto, há poucas informações em relação a estrutura genética das populações naturais de erva-mate em produção, e, a falta de critérios na seleção de plantas para a produção por propagação vegetativa acarreta num produto comercial despadronizado em relação aos valores nutracêuticos. Sendo assim, estratégias de melhoramento da espécie, devem priorizar a obtenção de matéria prima em quantidade e qualidade, produzindo informações e tecnologias que levem ao aumento da produção de biomassa/área, sem afetar as características comerciais desejáveis das plantas, diretamente relacionadas ao padrão fitoquímico (SCHEFFER, 1990), configurando maior competitividade ao produto final.

Independente da finalidade do cultivo, o aumento da demanda de matéria prima requer o estabelecimento de novos povoamentos a partir de mudas de qualidade. Apesar de ser uma espécie utilizada comercialmente há várias décadas, a germinação desuniforme, a dormência embrionária (FOWLER; STURION, 2000) e a baixa qualidade fisiológica das sementes (CUQUEL et al., 1994) têm limitado a produção em grande escala de mudas seminais dessa espécie. Além disso, mudas produzidas por sementes apresentam grande variabilidade genética, o que acarreta o estabelecimento de povoamentos desuniformes, com baixa produtividade e menor qualidade do produto final (CARVALHO, 2003). No entanto, esses problemas podem ser minimizados ou até solucionados pelo uso de mudas obtidas via propagação vegetativa, possibilitando a produção de indivíduos geneticamente idênticos à planta matriz selecionada que os originou (WENDLING, 2004).

A produção de plantas por propagação vegetativa oferece diversas vantagens, entre as quais se destacam a uniformidade e facilidade de propagação, a fixação de combinações genéticas de indivíduos selecionados, a antecipação do período de florescimento, a combinação de mais de um genótipo numa planta matriz e o maior controle das fases de desenvolvimento (HARTMANN et al. 2011; BISOGNIN, 2011). O sucesso da propagação vegetativa da erva-mate depende do genótipo, da estação do ano, das condições fisiológicas da planta-matriz, das variações nas condições meteorológicas, da posição do propágulo a ser coletado na planta matriz, da hora de coleta do propágulo, do substrato e ambiente de enraizamento, do uso de reguladores vegetais (WENDLING, 2004) e, especialmente, do estado de maturidade do material a ser propagado. No caso de material proveniente de árvores adultas, o primeiro passo após a seleção de matrizes é a promoção do revigoreamento e rejuvenescimento para a obtenção de brotos fisiologicamente aptos ao enraizamento (ALFENAS et al., 2009). Diversas técnicas podem ser utilizadas para essa finalidade, entre as quais se destacam a micropropagação, enxertia seriada, estaquia seriada, miniestaquia seriada e a poda drástica (WENDLING; XAVIER, 2001).

A relevância do presente trabalho se dá na medida em que são estudos voltados à avaliação fitoquímica e nutracêutica das folhas de erva-mate para avaliar e padronizar a qualidade da matéria-prima e também ser utilizada como parâmetro de seleção de plantas matrizes visando à produção massal de mudas. Nesse sentido, apresentando o diferencial de propor um método eficiente para a extração e quantificação dos teores dos compostos de modo rápido e com maior rendimento, sendo de extrema importância para a qualificação e padronização do extrato vegetal produzido, a fim de conhecer o efeito genético e definir as condições ambientais que maximizem os seus teores. E, através da utilização desse método realizar a caracterização fitoquímica de árvores de erva-mate em produção e assim propor estratégias de seleção de plantas. Não menos importante no atual contexto, o resgate de plantas adultas por estaquia apresenta-se como opção extremamente viável no que tange o revigoreamento e rejuvenescimento das plantas selecionadas. Tal prática poderá constituir-se como solução para a atual demanda por esse tipo de material, viabilizando a produção em grande escala de mudas com elevada qualidade genética e fitossanitária. Enfatiza-se que, atualmente, os povoamentos estabelecidos no Rio Grande do Sul são formados a partir de mudas de origem seminal, o que acarreta em baixa produtividade e menor qualidade e uniformidade. Em suma, o presente trabalho demonstra relevância por propor avanços no campo científico, econômico e social, visto que seus resultados poderão contribuir de forma efetiva para a obtenção de mudas com características fitoquímicas específicas, e,

supletivamente, garantir a melhoria das condições de emprego e renda para os produtores de erva-mate.

1.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivos otimizar o método de extração e quantificação de compostos fenólicos e de flavonoides totais e da capacidade antioxidante, para utilização como ferramenta de análise do teor destes compostos e dos nutrientes do solo e folhas de plantas em plantas em produção de erva-mate; e resgatar plantas adultas de erva-mate por estaquia.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Verificar o solvente e o tempo de extração em ultrassom mais adequado para otimizar a obtenção de compostos fenólicos, flavonoides totais e capacidade antioxidante em folhas de erva-mate,
- ii) Analisar os teores dos compostos fenólicos e dos flavonoides totais e da capacidade antioxidante e dos nutrientes do solo e folhas de plantas em produção de erva-mate,
- iii) Identificar plantas adultas de erva-mate com competência ao enraizamento de estacas, e
- iv) Avaliar o efeito da posição de coleta de brotações e do uso de AIB na propagação de erva-mate por estaquia.

CAPÍTULO 1

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ERVA-MATE

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) é uma espécie dióica, subtropical, perene, nativa da América do Sul, pertencente à família Aquifoliaceae (SANTOS, 2004). A área de ocorrência natural compreende o Nordeste Argentino, Leste do Paraguai e, predominantemente, na região Sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) (Figura 1). Em menor quantidade, a erva-mate ocorre no Mato Grosso do Sul e associada com reduzidos nichos de pinheiro-do-paraná (*Araucaria angustifolia* Bertol. Kuntze) em Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (PASINATO, 2004).

Figura 1 - Área de distribuição natural da erva-mate.



Fonte: Oliveira e Rotta (1985).

Segundo Reitz et al. (1983) e Carvalho (2003), a espécie classifica-se em arvoreta até árvore perenifólia de 10 a 15 m de altura, de tronco reto e de coloração acinzentada e bastante curto, com diâmetro a altura do peito (DAP) de 20 a 40 cm de diâmetro. Na floresta pode atingir até 25 m de altura e 70 cm de diâmetro; os ramos são cilíndricos ou subcilíndricos, também cinzentos, sendo que os terminais são densamente tomados por pequenas lenticelas;

apresentam folhas simples, alternas, geralmente estipuladas, subcoriáceas, glabras, verde-escuras em cima e claras em baixo; limbo foliar obovado com 5 a 10 cm de comprimento, por 3 a 4 cm de largura; margem irregular serrilhada ou dentada (Figura 2); pecíolo relativamente curto com 7 a 15 mm de comprimento; flores brancas, pequenas; fruto do tipo globoso.

No Sul do Brasil, a erva-mate é uma espécie clímax tolerante à sombra, característica da Floresta Ombrófila Mista Montana (Floresta de Araucária), em associações nitidamente evoluídas com o pinheiro-do-paraná (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze), acompanhada de outras espécies como imbuia (*Ocotea porosa* (Nees et Martius ex Nees)), cedro (*Cedrela fissilis* Vell.), pinho bravo (*Podocarpus sp.*), canjerana (*Cabranea canjerana* (Vell) Mart), além de plantas das famílias das Mirtaceas, Leguminosas e Lauraceas (REITZ; EDWIN, 1967; OLIVEIRA; ROTTA, 1985). Regenera-se com facilidade quando o estrato arbóreo superior e, principalmente, os estratos arbustivo e herbáceo são raleados (CARVALHO, 2003).

Figura 2 – Ramo com folhas de erva mate.



Fonte: Leandro da Luz (2015)

Habitualmente é encontrada em solos com baixo teor de nutrientes trocáveis e alto teor de alumínio, sendo tolerante a solos de baixa fertilidade natural (OLIVEIRA e ROTTA, 1985; MAZUCHOWSKI, 1991). Segundo Medrado (2004), a espécie se desenvolve bem em solos com pH baixo. Porém, não suporta solos compactados, encharcados ou pedregosos, em virtude de 80 % do sistema radicular se concentrar na camada superficial (MEDRADO et al., 2000). A espécie ocorre naturalmente em solos profundos, bem drenados, ácidos ou ligeiramente ácidos, argilosos e intemperizados (DEDECEK, 1997).

A erva-mate se constitui em uma excelente fonte de geração de emprego e de renda, especialmente entre os médios e pequenos produtores rurais. A erva-mate forma um dos sistemas agroflorestais característicos da região sul do Brasil. É uma espécie perene bastante apreciada em todo Brasil na forma de mate, uma bebida estimulante usada tanto como infusão quente (chimarrão) ou fria (tererê). As folhas se constituem em matéria-prima para corantes naturais, antioxidantes, cosméticos, medicamentos, entre outros (PASINATO, 2004) (Tabela 1). A madeira tem uso secundário, sendo empregada na fabricação de lâminas de boa qualidade, entretanto, não é recomendada para lenha e produção de celulose e papel (CARVALHO, 2003).

Tabela 1- Aplicações industriais e usos alternativos da erva mate.

Aplicação industrial	Produtos comerciais	Forma de utilização
Bebidas	Chimarrão, tererê e chá mate;	Infusão quente e fria
	Refrigerantes, sucos, cerveja e vinho;	Extrato de folhas
Insumo de alimentos	Corante natural, conservante alimentar; sorvete; balas, bombons caramelos; chicletes e gomas;	Clorofila e óleo essencial
Medicamentos	Estimulante do sistema nervoso central, compostos para o tratamento de hipertensão, pneumonia e bronquite;	Extrato de cafeína e teobromina
Higiene geral	Bactericida e antioxidante hospitalar e doméstico; esterilizante, emulsificante; tratamento de esgoto, reciclagem do lixo urbano;	Extrato de saponinas e óleos essenciais
Produtos de uso pessoal	Perfumes, desodorantes, cosméticos e sabonetes.	Extrato de folhas e clorofila

Fonte: Anuário brasileiro de erva-mate (1999).

Segundo o Anuário brasileiro de erva-mate (1999), há um campo enorme para o crescimento do consumo da erva-mate, tanto no Brasil quanto no exterior. Contudo, o setor ervateiro ainda depende, quase que exclusivamente, da comercialização da erva-mate na forma de chimarrão (RUCKER, 2003), o que limita o mercado às regiões onde é produzida. Depois do Uruguai, os maiores mercados compradores em potencial são Alemanha, Espanha, Itália, Estados Unidos (BOGUSZEWSKI, 2007), Canadá e Japão (ANDRADE, 1999), além

do Oriente Médio, especialmente a Síria, sendo exportada sob diversas formas: cancheada, beneficiada, solúvel e em extrato/essência/concentrado (GOVERNO DO PARANÁ, 2016).

Problemas ainda são apontados por ervateiros no que diz respeito à silvicultura, como novas formas e períodos de podas, adubação, correção do solo, doenças e pragas; e ao social, como à mão de obra e à comercialização (WENDT; FRIEDRICH, 2010). Salienta-se que no Brasil a maior parte da produção é extrativista, demonstrando que a atividade ainda é muito dependente de ervais nativos (MARTINS, 2009). E ainda, por conta da variação natural das condições ambientais e do manejo dos ervais, ocorre uma diferenciação da matéria-prima (MERCOMATE, 1993). Estudos têm sido conduzidos com o intuito de identificar aplicações e usos alternativos da erva-mate, visando agregar valor à essa importante matéria-prima regional (VALDUGA, 1994). Assim, por meio de técnicas criteriosas de seleção de indivíduos geneticamente superiores, que apresentem potencial de rejuvenescimento, será possível produzir matéria-prima uniforme, além de se ampliar a utilização de ervais plantados.

2.2 COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA EM PLANTAS

As plantas têm se constituído numa rica fonte de obtenção de moléculas para exploração nutricional e terapêutica. Muitas substâncias isoladas de plantas continuam sendo fontes de medicamentos, resultando, nos últimos anos, no crescente interesse da pesquisa nessa área. Dentre os fatores que têm contribuído para a intensificação dessas pesquisas está o aumento do consumo *in natura* de produtos de espécies vegetais, estando essas, associadas a benefícios à saúde humana.

Nesse sentido, a investigação nutracêutica e fitoquímica das plantas presentes nos biomas brasileiros pode ser uma alternativa para o setor florestal. O Brasil, com sua enorme biodiversidade, abriga 55 mil espécies catalogadas e apresenta-se com um grande potencial para a pesquisa e exploração de plantas medicinais (ALVES et al., 2000; GASPARRI, 2005), podendo contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos produzidos a partir de plantas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Além disso, sabe-se que as angiospermas, nas quais inclui-se a erva-mate, são as mais promissoras quando se trata de desenvolvimento de novos fármacos (SOEJARTO, 2001).

A pesquisa fitoquímica é importante, principalmente, pelo fato de muitas espécies de interesse popular ainda serem desconhecidas sob a ótica química. Esse ramo de pesquisa objetiva conhecer e quantificar os constituintes químicos presentes nas plantas, identificando relevantes grupos de metabólitos secundários (SIMÕES et al., 2004). Ainda considera os

aspectos agrotecnológicos, direcionando-os para o campo da bioatividade das plantas medicinais (FOGLIO et al., 2006), tornando-se úteis no monitoramento das plantas medicinais em processo de domesticação (LEITE, 2009), na qualidade da matéria prima medicinal e na prospecção da biodiversidade (BRAGA, 2009). Assim como em outras ciências, perante a pesquisa fitoquímica, a atuação interdisciplinar demonstra-se fundamental para o melhor desempenho de identificação, purificação, isolamento e caracterização de princípios ativos, assim como para a realização de estudo dos efeitos nutracêuticos de extratos e dos constituintes químicos isolados (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006).

A triagem fitoquímica é um procedimento importante para espécies vegetais de interesse nutracêutico. A composição química de um extrato pode ser conhecida preliminarmente por meio de testes químicos quantitativos rápidos e de baixo custo, sugerindo as possíveis classes de metabólitos secundários de interesse (MATTOS, 1997). Caso o interesse esteja restrito a uma classe específica de constituintes ou às substâncias responsáveis por certa atividade biológica, a investigação deverá ser direcionada para o isolamento e a elucidação estrutural da mesma. Entre as classes de princípios ativos vegetais podemos citar os metabólitos secundários: alcaloides, cumarinas, esteroides, flavonoides, glicosídeos cardioativos, lignanas, óleos essenciais, saponinas, metilxantinas, triterpenos, entre outros.

Compostos fenólicos são geralmente importantes metabólitos secundários sintetizados pelas plantas durante o desenvolvimento normal e em resposta a condições de estresse, exercendo a função de proteção contra microrganismos, bactérias e insetos. Além disso, são responsáveis pela pigmentação da maioria das flores e frutos e por algumas características organolépticas dos alimentos, como a maturidade dos frutos (ESCARPA; GONZALES, 2001). São, portanto, encontrados em alimentos como frutas e vegetais consumidos rotineiramente em nossa dieta. Nutricionalmente, exercem uma ação preponderante no desenvolvimento de características sensoriais como a cor e sabor de certos alimentos (HASLAM, 1980). Além disso, exibem uma ampla faixa de propriedades biológicas, como atividade antialérgica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, antitrombótica, cardioprotetora e efeitos vaso dilatadores (KIM et al., 2003).

Em função das atividades benéficas à saúde, estudos são realizados objetivando aumentar o teor de compostos fenólicos por meio do desenvolvimento de novas cultivares (PRIOR et al., 1998; CEVALLOS-CASALS et al., 2005) ou com técnicas de manejo mais adequadas, como adubações diferenciadas (BUSSI et al., 2003; BRUULSEMA et al., 2004). Entretanto, as práticas de manejo da produção que influenciam diretamente nos níveis de

metabólitos secundários ainda não são bem conhecidas e, no caso da erva-mate, nem mesmo em quais quantidades estão presentes e os níveis de variação entre indivíduos da população.

Entre as diversas classes que compõem os compostos polifenólicos, os flavonoides despertaram interesse econômico, inicialmente decorrente de suas diferentes propriedades nas plantas e do valor nutracêutico (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003), estes, com ampla distribuição em frutas, hortaliças e legumes, além dos grãos, cereais e leguminosas. O termo flavonoide é coletivamente aplicado a uma série de pigmentos vegetais, sendo que a maioria dos tecidos vegetais é capaz de sintetizar flavonoides (MARTINEZ-FLOREZ, 2002), responsáveis pela cor e pelo sabor.

A biossíntese dos flavonoides é estimulada pela luz e, por essa razão, acumulam-se nos tecidos aéreos (ARCHIVIO et al., 2007). Um dos mais importantes mecanismos de ação dos flavonoides deve-se a sua propriedade antioxidante (MAJCHRZAK et al., 2004), com potencialidades para prevenção de doenças (GONZÁLEZ-GALLEGO, 2010). No entanto, recentemente, descobriu-se que a importância dos flavonoides não é apenas quanto à atividade antioxidante, estando, também, atrelados à atividade antimutagênica, induzindo a apoptose (morte programada) de algumas células mutantes (ARCHIVIO et al., 2007).

Antioxidantes são compostos que, quando presentes em baixas concentrações comparadas à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação ou propagação das reações de oxidação em cadeia no mesmo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). A defesa inata do corpo humano pode não ser suficiente para neutralizar danos oxidativos e uma proteção adicional é crítica para a prevenção de doenças (REYNERTSON et al., 2008). Isso torna os antioxidantes obtidos pela dieta indispensáveis para a defesa do organismo e manutenção da saúde (CERQUEIRA et al., 2007).

O crescente conhecimento sobre os benefícios dos antioxidantes da dieta na promoção da saúde tem levado a um aumento nas investigações no campo de antioxidantes naturais (ABDALLA; ROOZEN, 1999; MOLYNEUX, 2004) e, além disso, um grande número de métodos tem sido desenvolvido com o objetivo de avaliar a capacidade antioxidante dos alimentos. Contudo, devido à complexidade da composição de cada tipo de alimento, tendo em vista que os antioxidantes não atuam separadamente, a possível interação entre eles pode fazer com que a determinação da capacidade antioxidante individualmente seja menos efetiva do que o status antioxidante total (PRIOR; CAO, 1999). Com isso, tornam-se numerosas as metodologias para a determinação da capacidade antioxidante além de estarem sujeitas a interferências, sendo necessário o emprego de duas ou mais técnicas, pois é pouco provável

que apenas um método possa refletir exatamente a capacidade antioxidante total de uma amostra (HUANG et al., 2005).

2.2.1 Parâmetros de avaliação em métodos de extração

A extração de princípios ativos vegetais pode ser efetuada a partir de diversas partes da planta como folhas, caules, raízes e flores (MACIEL et al., 2002). No entanto, a estratégia analítica apropriada para o estudo de fenólicos bioativos em vegetais depende do propósito do estudo, bem como, da natureza da amostra e do analito. Para os compostos com propriedades nutracêuticas é uma das etapas mais críticas nas pesquisas com produtos naturais (XYNOS et al., 2012), pois a solubilidade dos fenólicos é dependente da natureza química na planta, que pode variar de substâncias simples até altamente polimerizadas.

Assim como a extração, a quantificação também é influenciada pela natureza química dos compostos fenólicos em que o tipo de solvente e a polaridade podem afetar a transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio. Do mesmo modo, pode ser influenciada pela escolha do método de extração a ser empregado, com base nos mecanismos químicos diferentes, pelo tamanho das partículas das amostras, tempo e condições de armazenamento, bem como pelo método de análise, seleção de padrões e presença de substâncias interferentes (NACZK; SHAHIDI, 2006). Prolongados tempos de extração aumentam a chance de oxidação dos fenólicos, a menos que agentes redutores sejam adicionados ao sistema solvente. Além disso, a razão amostra/solvente também influencia diretamente a extração de compostos fenólicos de plantas (NACZK; SHAHIDI, 2004).

O desenvolvimento de procedimentos de extração que possibilitem a utilização de solventes menos agressivos ao meio ambiente, e que sejam usados em menor quantidade, tem sido proposto como uma alternativa na chamada química verde (HERRERO et al., 2010; RODRÍGUEZ-ROJO et al., 2012). Para tanto, os procedimentos convencionais vêm sendo substituídos ou modificados de acordo com o surgimento de procedimentos alternativos, tais como a extração assistida por micro-ondas (JAPÓN-LUJÁN et al., 2006a), extração com fluido supercrítico ou pressurizado (XYNOS et al., 2012) e extração assistida por ultrassom (JAPÓN-LUJÁN et al., 2006b).

A extração assistida por ultrassom é um processo que utiliza a energia de ondas sonoras geradas em frequência superior à capacidade auditiva do ser humano. Estas ondas sonoras criam uma variação na pressão do líquido empregado no processo, gerando o colapso de milhões de pequenas bolhas (ou cavidades) microscópicas em um líquido, chamado de

cavitação. O efeito de cavitação é produzido pela alternância entre zonas de alta e baixa pressão das ondas ultrassônicas difundindo-se pelo líquido. Nas zonas de baixa pressão (vales) as moléculas do líquido separam-se, formando bolhas/cavidades microscópicas, que são comprimidas e implodem ao serem atingidas por uma zona de alta pressão (pico) da onda sonora (CHEN et al., 2007). A eficiência desta técnica de extração apresenta vantagens da fácil reprodutibilidade, possibilidade de utilização para uma ampla gama de tamanhos de amostra, rapidez de processamento da amostra e baixo custo (SARGENTI et al., 2000).

A extração assistida por ultrassom é um método de extração sólido-líquido em que os efeitos das ondas ultrassônicas possibilitam o aumento da permeabilidade da parede celular, numa maior penetração do solvente no interior das células vegetais, favorecendo, assim, a redução do tempo e o aumento do rendimento dos extratos produzidos (FILGUEIRAS et al., 2000). Esse método tem sido cada vez mais utilizado na extração de compostos como flavonoides (SUN et al., 2011), esteróis (SUN et al., 2010), terpenos (PÉRES et al., 2006), taninos e fenólicos totais (ASPÉ; FERNÁNDEZ, 2011).

2.3 SELEÇÃO DE PLANTAS DE ERVA-MATE

As áreas em produção de erva-mate, na sua maioria, são formadas de plantas naturalmente estabelecidas ou pelo plantio de mudas produzidas por sementes. Para a coleta de sementes, as plantas são selecionadas com base nas suas características fenotípicas. Por meio deste tipo de seleção, incorre-se no risco de selecionar indivíduos que apresentem características superiores devido às condições ambientais nas quais se desenvolvem, ou ainda pela sua idade mais avançada. Nesse caso, pouco ou nenhum avanço em produtividade e/ou qualidade da matéria-prima são obtidos, a não ser que boas condições de cultivo sejam fornecidas (MELO, 2012).

Isto se deve ao fato da variação biológica ou fenotípica total de um caráter ser composta pelo componente genético, ambiental e suas interações. A variação fenotípica e seus componentes são descritos pela variância, e métodos estatísticos apropriados são utilizados para esse fim, especialmente para caracteres de interesse econômico (BUENO et al., 2006). Assim, a seleção deve ser embasada nas características genéticas, pois estas sim são transferidas de geração para geração, resultando em ganhos genéticos relacionados com os caracteres desejados.

O estudo da variabilidade genética em populações naturais compreende a descrição dos níveis de diversidade genética mantida dentro das populações, bem como, a forma em que

a variação genética é dividida entre as populações (HAMRICK, 1983; LOVELESS; HAMRICK, 1987), e, quando presente em uma população, é essencial para a sobrevivência e adaptação a possíveis mudanças do ambiente.

A variabilidade genética é fundamental para os melhoristas, a qual possibilita conhecer como está distribuída, predominantemente entre ou dentro das populações, além das interações com o ambiente (SEBBENN et al., 1999). É essencial a preservação da variabilidade através de sementes nativas e exóticas, bem como a preservação de germoplasma com a finalidade de se tornarem fonte de estudos sobre melhoramento genético e conservação genética (VENCOVSKY, 1987). Entretanto, Shimizu, Kageyama e Higa (1982) salientaram que as seleções devem se concentrar em um ou poucos caracteres, dependendo da finalidade da matéria-prima ou mesmo das propriedades atribuídas às características nos diferentes ciclos de seleção.

A seleção é dificultada pela complexidade da base genética do material experimental, bem como a influência ambiental proveniente da interação. Portanto, os programas de melhoramento precisam escolher os genitores para composição da população, selecionar os indivíduos superiores, avaliar estes indivíduos com o objetivo de selecionar os genótipos que apresentarem alta produtividade e que serão recomendados comercialmente (CARRIJO et al., 2008).

A identificação dos níveis de variabilidade genética permite a definição das estratégias de seleção visando os caracteres de interesse. No caso da erva-mate, as plantas são selecionadas para a produção de biomassa e a qualidade específica para a utilização comercial, visando as diversas formas de consumo. Considerando os principais usos desta espécie, infusão e extrato das folhas para a produção de bebidas, priorizam-se plantas com alto conteúdo de compostos com propriedades antioxidantes benéficos a saúde. Portanto, os programas de melhoramento precisam escolher os genitores para composição da população, selecionar os indivíduos superiores e avaliar estes indivíduos relacionados com os caracteres desejados, como a composição fitoquímica em folhas de erva-mate, bem como, aspectos da propagação vegetativa para a formação de minijardim clonal.

A estimativa de parâmetros genéticos permite obter informações sobre a natureza da ação gênica na herança dos caracteres fornecendo base para avaliação requerida pelo melhoramento (VENCOVSKY e BARRIGA, 1992; DUDA, 2003), além de fornecer informações essenciais à seleção e definição do programa de melhoramento de uma população (PINTO JUNIOR, 2004). Estas estimativas são necessárias quando se deseja

predizer ganhos, avaliar a viabilidade do programa de melhoramento, bem como auxiliar de forma efetiva o progresso genético.

Quando se trata de plantas perenes, estas estimativas são ainda mais importantes que em plantas anuais, pois a decisão do melhorista deve ser a mais precisa possível considerando o longo ciclo dessas espécies (CANUTO, 2009). Dentre os parâmetros mais importantes se destacam os coeficientes de variação genética, herdabilidades e correlações genéticas e fenotípicas entre caracteres e a acurácia seletiva (DUDA, 2003; CRUZ, 2005).

A herdabilidade corresponde a proporção da variabilidade de origem genética, a qual pode ser considerada o parâmetro genético de maior importância e aplicação nos programas de melhoramento de plantas. Sua compreensão ampara as tomadas de decisões sobre os melhores procedimentos e estratégias a serem adotadas nas diferentes etapas no desenvolvimento de uma cultivar (FALCONER, 1987; REIS, 2000). A sua relevância está no fato de poder mostrar o quanto os efeitos genéticos estão presentes no fenótipo do indivíduo, pois é o valor genotípico que interessa e que influenciará a próxima geração (FALCONER; MACKAY, 1996).

A herdabilidade pode ser classificada em sentido amplo e restrito. Em espécies de reprodução sexuada, sob seleção seguida de recombinação, a herdabilidade no sentido restrito é a que deve ser usada (a razão entre a variância genética aditiva e a fenotípica), enquanto naquelas propagadas assexuadamente utiliza-se a herdabilidade no sentido amplo (a razão entre a variância genotípica e a fenotípica), pois os genótipos são herdados integralmente pelos descendentes (SOUZA JÚNIOR, 2011). O importante na avaliação da herdabilidade, como indicativo da predição, é saber quanto do diferencial de seleção se espera reter, em virtude da seleção, na geração seguinte. Assim, para os caracteres que apresentam alto coeficiente de herdabilidade restrito, associado a um diferencial de seleção elevado, espera-se maior ganho com a seleção (ROSSMANN, 2001).

Os ganhos com seleção provêm da variação genética herdável existente nas populações, bem como, do controle genético dos caracteres que se deseja melhorar além da acurácia seletiva. Portanto, é de fundamental importância estimar parâmetros genéticos a fim de predizer os ganhos com a seleção (BERTI, 2010), pois serve para aferir a eficiência dos métodos de seleção que estão sendo empregados. Caso estes métodos não estejam propiciando os resultados esperados, o melhorista poderá replanejar as estratégias seletivas subsequentes. Sendo esse parâmetro, sem dúvida, uma das aplicações mais importantes da genética quantitativa no fitomelhoramento (VENCOVSKY; BARRIGA, 1992; RANGEL et al., 2000).

2.4 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA

A propagação vegetativa ou clonagem vem sendo utilizada para a produção de mudas de espécies arbóreas de interesse comercial (HARTMANN et al., 2011). Esse método consiste em multiplicar assexuadamente partes das plantas (células, tecidos e órgãos) de modo a gerar indivíduos geneticamente idênticos à planta matriz (FERRARI et al., 2004). Nesse contexto, a totipotência celular, que é a capacidade que certas células vegetais possuem de formar um novo indivíduo completo, possibilita a produção de grande quantidade de plantas geneticamente idênticas a partir de um indivíduo selecionado em função de algumas características desejáveis, como a sanidade e a produtividade da planta matriz (QUADROS, 2009).

Por meio desse método existe possibilidade de produção de mudas durante o ano todo a partir de plantas matrizes mantidas em casa de vegetação (ELDRIDGE et al., 1994), destacando-se como principal vantagem a possibilidade de ganhos genéticos maiores do que na reprodução via semente (GRAÇA et al., 1990). Em mudas produzidas por propagação vegetativa, a parte aérea e as raízes formadas não se originam de embriões, portanto, sendo denominadas de adventícias (FACHINELLO et al., 2005). Dentre as técnicas de clonagem, a estaquia, miniestaquia, microestaquia, mergulhia, enxertia e micropropagação apresentam grande potencial para a produção de mudas em maior escala. No entanto, a escolha da técnica varia de acordo com o objetivo da propagação, a espécie envolvida, a habilidade do executor, o tipo e a quantidade de material disponível, as condições ambientais e a disponibilidade de recursos físicos e financeiros (WENDLING et al., 2005).

A estaquia constitui-se uma das técnicas cujos princípios já estão bem conhecidos para espécies do gênero *Eucalyptus*, tendo, portanto, ampla adoção na clonagem de árvores dessa espécie, o que permitiu o desenvolvimento da silvicultura clonal de forma intensiva em diversas partes do mundo (XAVIER et al., 2009). A estaquia é, ainda, a técnica da qual se têm o maior domínio e conhecimento científico, representando um dos maiores avanços tecnológicos na área florestal. Alguns estudos têm mostrado que a estaquia pode ser alternativa para a produção de mudas de espécies florestais nativas, tais como corticeira-da-serra (*Erythrina falcata* Benth) e pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.), louro-pardo (*Cordia trichotoma*) (NEVES et al., 2006; ENDRES et al., 2007; KIELSE et al., 2015).

O termo estaquia é usado para designar o processo de propagação no qual ocorre indução do enraizamento adventício em segmentos destacados da planta matriz, que em condições favoráveis, originam uma nova planta. Assim, estacas que não enraízam, ou que

não produzem brotos, são eliminadas do processo, assim como àquelas que apresentam dificuldade de enraizamento e rebrota, já que limitam a quantidade de mudas a serem produzidas (FLORIANO, 2004).

2.4.1 Fatores que influenciam a propagação por estaquia

O processo de formação de raízes adventícias em estacas é influenciado por inúmeros fatores que podem atuar isoladamente ou em conjunto. Dentre esses, destacam-se fatores relacionados à planta matriz fornecedora de propágulos como a idade ontogenética e cronológica, as condições fisiológicas e as características genéticas, assim como, a posição das estacas no ramo, o estiolamento e/ou a presença de folhas e gemas, o período de coleta das estacas, a luminosidade, a umidade, a temperatura, a composição do substrato e a aplicação de fitorreguladores (HARTMANN et al., 2011).

A maturação em plantas lenhosas é um assunto de extrema importância tendo em vista, principalmente, as variações na capacidade de propagação vegetativa. Essas estão atreladas às mudanças nas taxas e formas de crescimento, na qualidade e rapidez na formação de raízes das mudas, nas características de crescimento, na morfologia foliar, nas alterações fisiológicas e bioquímicas com a transição para o estado maduro (WENDLING; XAVIER, 2001) e, sobretudo, com variação da alta para a baixa capacidade de enraizamento de estacas caulinares e foliares (HACKETT, 1987a; ELDRIDGE et al., 1994).

A idade cronológica vem sendo frequentemente confundida com a maturação (HUANG et al., 1990), embora, a maturação esteja ligada à idade ontogenética, que é correspondente à passagem da planta por sucessivas fases de desenvolvimento (germinação, crescimento vegetativo e sexual, senescência), nas quais a planta passa de um estágio juvenil para um maduro, enquanto que a idade cronológica se refere ao tempo decorrido desde a germinação da semente até a data da observação (WENDLING; XAVIER, 2001). Com o avanço da idade, a planta ou o órgão tende à senescência e morte, entretanto, o meristema apical maduro de plantas pode ter sua juvenilidade restaurada, ou seja, rejuvenescida.

A identificação de quais indivíduos ou órgãos e tecidos que apresentam juvenilidade ou que podem ser rejuvenescidos é um procedimento importante para o sucesso da propagação vegetativa por estaquia e outras fases da silvicultura clonal. (WENDLING; XAVIER, 2001). O grau de juvenilidade dos propágulos tem sido determinante ao enraizamento adventício de espécies lenhosas devido sua relação com as mudanças morfológicas e fisiológicas que ocorrem durante o desenvolvimento da planta (HACKETT,

1987b). Normalmente, estacas obtidas de plantas jovens enraízam com maior facilidade se comparadas às estacas provenientes de plantas adultas.

Existem várias técnicas para reverter ou manter a juvenilidade das plantas, sendo que, dentre os mais utilizados, podem-se citar a estaquia e miniesquia seriada e as podas sucessivas (ZOBEL; TALBER, 1984; HACKETT, 1987a; ELDRIDGE et al., 1994). O rejuvenescimento pela miniestaquia seriada pode vir a ser eficiente para clones menos exigentes, servindo, desta forma, como alternativa às técnicas mais sofisticadas de rejuvenescimento como a micropropagação. A implantação de minijardins clonais com minicepas rejuvenescidas pode permitir a obtenção de maior vigor e qualidade dos brotos produzidos, principalmente em relação ao maior potencial de enraizamento das miniestacas pela juvenilidade.

Dentre as formas de resgate de árvores adultas, a decepa da árvore para a indução de brotações basais é mais comumente usada, assim como o anelamento de caule e o uso do fogo aplicados em zonas basais para a obtenção de estacas mais aptas ao enraizamento. A maior juvenilidade da região basal das plantas se deve ao fato de que os meristemas mais próximos da base formarem-se em épocas mais próximas à germinação que o das regiões terminais (HARTMANN et al., 2011). As brotações adventícias emitidas nas plantas possuem características morfológicas e fisiológicas de plantas juvenis, o que é de fundamental importância para a recuperação da competência ao enraizamento adventício (ALFENAS et al., 2009). Assim, a propagação vegetativa por estaquia, juntamente com a aplicação de práticas como adubação, sombreamento, podas, controle de pragas e doenças, visam retornar a planta a um estado de alto vigor fisiológico, ou seja, revigoradas.

O estímulo hormonal também é fator de forte influência no enraizamento adventício (SMART et al., 2003), e tem como objetivo aumentar a porcentagem e a qualidade das raízes, além de acelerar e uniformizar o enraizamento (OLIVEIRA et al., 2001). Os reguladores do grupo das auxinas são os mais utilizados, com destaque para o ácido naftaleno acético (ANA) e o ácido indolbutírico (AIB), além do ácido indolacético (AIA), que atua em conjunto com carboidratos, compostos nitrogenados e vitaminas auxiliando a formação de raízes adventícias (HARTMANN et al., 2011). Nesse sentido, os compostos fenólicos merecem destaque pois alguns desses têm sido investigados para promover o aumento da taxa de enraizamento em estacas e os diidroxiacetofenonas têm se destacado. Tais fenóis atuam como inibidores da formação da auxina conjugada (LEE; STARRATT, 1986) e até mesmo como inibidores da ação da enzima oxidativa do AIA oxidase (LEE et al., 1981).

CAPÍTULO 2

EXTRACTION OF PHENOLIC AND FLAVONOID COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Ilex paraguariensis* LEAVES WITH ULTRASOUND

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram definir um método rápido e eficiente de extração por ultrassom de compostos fenólicos e flavonoides totais e quantificar a capacidade antioxidante de folhas de *Ilex paraguariensis*, utilizando solvente menos agressivo e de baixo custo no Brasil (etanol) e comparar com os solventes mais utilizados na literatura (metanol e acetona), visando o uso em larga escala. As amostras foram obtidas a partir de folhas de plantas adultas de quatro genótipos. Utilizou-se água destilada e soluções aquosas de etanol, acetona e metanol, acidificados ou não com ácido clorídrico, como solventes extratores. As extrações foram realizadas em banho ultrassônico em diferentes tempos (15, 30 e 45 min.) e seguidas de agitação mecânica por 30 min. O experimento consistiu de um delineamento fatorial inteiramente casualizado, com três repetições e leituras em triplicata. Os compostos fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante foram avaliados utilizando 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolona-6-sulfônico) (ABTS) e *ferric reducing antioxidant power* (FRAP). As amostras tratadas com solventes hidroalcoólicos acidificados apresentaram valores mais elevados para os níveis de compostos fenólicos totais e flavonoides. A capacidade antioxidante variou entre os métodos DPPH, ABTS e FRAP. Os compostos fenólicos e os flavonoides totais estão altamente correlacionados entre si e com a capacidade antioxidante, especialmente quando determinados pelo método FRAP. Uma alternativa potencial foi proposta para um processo industrial de extração. As condições de extração ideal para compostos fenólicos totais e flavonoides e a quantificação da capacidade antioxidante utilizando o método FRAP, foram encontradas quando as amostras foram tratadas com solvente hidroetanólico acidificado a 70%, submetidas a 15 min. de ultrassom e 30 min. de agitação mecânica.

Palavras-chave: Extratos naturais; Fitoquímicos; Polaridade; Solventes.

ABSTRACT

The objectives of this study were to define a fast and efficient method of ultrasound extraction of total phenolic and flavonoid compounds and to quantify antioxidant capacity of *Ilex paraguariensis* leaves, using less aggressive and low cost solvent in Brazil (ethanol) and compare with the solvents most used in the literature (methanol and acetone), aiming at the large scale use. The samples were obtained from the leaves of adult plants of four genotypes. Distilled water and aqueous solutions of ethanol, acetone and methanol, acidified or not with hydrochloric acid, were used as solvent extractors. The extractions were performed in an ultrasonic bath at different times (15, 30 and 45 min) and followed by mechanical agitation for 30 min. The experiment consisted of a completely randomized factorial design, with three replicates and readings in triplicate. Phenolic compounds, total flavonoids and antioxidant activity were evaluated using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and *ferric reducing antioxidant power* (FRAP) methods. The samples treated with acidified hydroalcoholic solvents presented higher values for total phenolic compounds and flavonoid levels. The antioxidant capacity varied among the methods of DPPH, ABTS and FRAP. Phenolic compounds and total flavonoids are highly

correlated with each other and with the antioxidant capacity, especially when determined by FRAP method. A potential alternative was proposed for an industrial extraction process. The ideal extraction conditions for total phenolic compounds and flavonoids and the quantification of the antioxidant capacity were found using the FRAP method when samples were treated with 70 % acidified hydroethanol solvent, subjected to 15 min. of ultrasound and 30 min. of mechanical agitation.

Keywords: Natural extracts; Phytochemicals; Polarity; Solvents.

3 INTRODUCTION

Ilex paraguariensis St. Hill (Aquifoliaceae), popularly known as erva-mate (LORENZI, 2000), is a species native to southern Brazil, Argentina and Paraguay (HECK; MEJIA, 2007) with economic, social and ecological importance (SANSBERRO et al., 2001). Erva-mate has many industrial applications and patents found in the National Institute of Industrial Property of Brazil related to the following themes: processing and beneficiation of leaves, concentrated production for use in infusions, production of ice cream, candies, sweets, soft drinks and syrups, antiseptic properties and use of the extract for deodorization, among others (INPI, 2016).

Phenolic, saponin and methylxanthine compounds are the main bioactive compounds present in erva-mate. Among the phenolic compounds, there is a high content of caffeoylquinic acid derivatives, such as chlorogenic acid, caffeic acid, p-coumaric acid and gallic acid. Of the flavonoids, epicatechin and galocatechin provide antioxidant and astringent actions and are recognized for prevention of cardiovascular diseases (FILIP et al., 2009; MORAIS et al., 2009). Since erva-mate extract is a natural product and safe from a nutraceutical point of view, identification of genotypes with higher levels of these classes of compounds would result in the production of raw materials with desirable characteristics for the application and development of new industrialized foods.

The extraction of bioactive compounds is one of the most critical steps in natural products research (XYNOS et al., 2012). This is because the extraction efficiency depends on several parameters, such as the type of sample used, the type and location of analytes to be extracted (MUSTAFA; TURNER, 2011), the type of extractor solvent (XYNOS et al., 2012), the method and extraction temperature (GALANAKIS et al., 2010) and extraction time and pH (NACZK; SHAHIDI, 2004; SILVA, et al., 2007).

The type of solvent is investigated with regard to chemical composition and yield of the extracts obtained. In many systems, extraction solvents are used in their pure form. However, it may be convenient to use mixtures, aiming at improved extraction power (ALOTHMAN et al., 2009). Based on this principle, studies using solvents of varying polarity on vegetable matrices aim to identify different chemical classes present in the extracts produced from different solvents (RABABAH et al., 2010; MICHIELS et al., 2012). Since the solubility of phenolic compounds in a given solvent is a peculiar feature of the chemical composition of the plant or the fruit, there is a lack of a universal standard procedure and, consequently, a need to carry out a careful check of the extraction method for each natural source of antioxidant (CAETANO et al., 2009). Solvents such as methanol, ethanol and

acetone can be used to extract phenolic compounds (NACZK; SHAHIDI, 2004; BUNEA et al., 2012; MICHIELS et al., 2012).

The development of extraction procedures that allow the use of solvents that are less aggressive to the environment and that can be used in smaller quantities has been proposed as an alternative in the so-called green chemistry (HERRERO et al., 2010; RODRIGUEZ-ROJO et al., 2012). Toward this aim, conventional procedures have been replaced or modified with the emergence of alternative methods, such as microwave-assisted extraction (JAPÓN-LUJÁN et al., 2006a), supercritical or pressurized fluid extraction (XYNOS et al., 2012) and ultrasound-assisted extraction (JAPÓN-LUJÁN et al., 2006b). Ultrasound-assisted extraction is a solid-liquid method in which the effects of ultrasound waves provide a greater penetration of the solvent inside the plant cells, in reduced time and with increased yields (FILGUEIRAS et al., 2000). This method has been increasingly used in the extraction of compounds such as flavonoids (Sun et al., 2011), sterols (Sun et al., 2010), terpenes (PÉRES et al., 2006), tannins and total phenols (ASPÉ; FERNÁNDEZ, 2011).

Ultrasound-assisted extraction has the advantage of decreasing analyte extraction time, mainly due to physical and chemical effects caused by the cavitation phenomenon (SORIA; VILLAMIEL, 2010). Knowing the ideal analyte extraction time allows the obtainment of the maximum content of compounds present in the shortest possible time of extraction (LAPORNIK et al., 2005). Determination of extraction time can prevent the degradation of analytes, due to prolonged exposure to factors such as light and oxidation (CHAN et al., 2009).

The evaluation of variables involved in the extraction process is very important for the production of plant extracts (ASPÉ; FERNÁNDEZ, 2011) and, therefore, has been increasingly studied. In the case of *erva-mate*, the vast majority of extractions of phenolic compounds uses hot water as a solvent, however, the only factors that are employed in these extractions are temperature and time, both of which have been employed with large variations (MEJIA et al., 2005; STREIT et al., 2007; DELADINO et al., 2008; PAGLIOSA et al., 2010). Because it is a natural product, the great challenge for the extract processing industry is the standardization of bioactive compounds, which guarantees the performance of the industrialized product. In this context, in order to improve product quality, it is important to invest in the development of an efficient and quick method for the extraction of these compounds in high yields aiming to qualify and standardize the vegetable extract. In addition, the definition of the method is essential for the quantification of contents in a large number of genotypes of *erva-mate*, making it possible to know the genetic effect and define the environmental conditions that

maximize the production of the active compounds. Thus, the objectives of this study were to define an efficient method of ultrasound extraction of total phenolic compounds and flavonoids and quantification of antioxidant capacity in erva-mate leaves.

3.1 MATERIAL AND METHODS

3.1.1 Reagents

The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical, 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine) (TPTZ), 6-hydroxyl-2,5,7,8,-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), folin-ciocalteu, catechin and gallic acid were acquired from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Ethanol, methanol, acetone, hydrochloric acid, sodium carbonate, sodium nitrite, sodium hydroxide, aluminum chloride, sodium acetate trihydrate, acetic acid, iron chloride hexahydrate were all of analytical grade.

3.1.2 Preparation of extracts

Adult plant leaves were collected from four genotypes of erva-mate, mixed and dried in an oven with forced air circulation at 65° C until reaching constant weight. The leaves were ground in a micro mill (Marconi[®], model MA-630), until reaching the granulometry of commercial thick-grind erva-mate and used for the separation of the samples.

The choice of extraction conditions for phenolic compounds was determined considering the procedures of Tsai et al. (2014) and the preliminary studies, adopting standard procedures of the laboratory where the extraction conditions (concentration of solvent and extraction method by mechanical agitation, ultrasound and ultrasound followed by mechanical agitation) were analyzed. Distilled water and aqueous solutions of ethanol, acetone and methanol (70:30, v/v, solvent: water) and the same solutions acidified with HCl 6M at a 70:30:1 ratio (v/v/v solvent: water: acid) were used as extractors solvent.

The extractions were performed in an ultrasonic bath with a frequency of 40 KHz (Ultra Sonic Clean, USC 1600 model) at a ratio of 1:50 (p/v-sample: solvent) for 15, 30 and 45 min., at room temperature (21° C ± 2° C) and in the dark. Then, the extracts were subjected to agitation for 30 min. (microplate Shaker, Marconi[®], model MA562). Then, the extracts were filtered in filter paper and placed in amber glass bottles, properly identified, and stored at -18°C until the analysis.

3.1.3 Determination of total phenolic compounds

The total phenol content produced in the extracts of erva-mate was the result of the oxidation-reduction reaction with Folin-Ciocalteu reagent, which reacts with the hydroxyls present in polyphenols. The extracts were left in the dark and at room temperature for 2 hours. Absorbance readings were performed in triplicate, at a wavelength of 765 nm in a UV-visible spectrophotometer (HOMIS SF, 200DM model), as described in Singleton and Rossi (1965). The calibration curve was performed using gallic acid as standard, at concentrations of 0; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70 and 80 mg L⁻¹. The content of phenolic compounds was obtained with the regression equation (content of phenolic compounds = 88.385 x absorbance - 2.9158, with R² = 0.995) and expressed in gallic acid equivalents per liter (mg EAG L⁻¹).

3.1.4 Determination of flavonoids

The content of flavonoids was analyzed by the colorimetric method described by Zhishen, et al. (1999). The absorbance readings were performed in triplicate in a UV-visible spectrophotometer (HOMIS SF, 200DM model), at a wavelength of 510 nm. The flavonoid content was determined using a standard catechin curve, at concentrations of 0; 50; 100; 150; 200 and 250 mg L⁻¹. The results were determined from a calibration curve (flavonoid content = 414.91 x absorbance - 1.7368; R² = 0.995) and expressed in mg of catechin equivalents per liter (mg L⁻¹ CAT).

3.1.5 Determination of antioxidant capacity in vitro

3.1.5.1 DPPH method (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

The methodology was adapted from Brand-Williams, et al. (1995). The method is based on the reduction of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH •+) by antioxidants in the sample, producing a decrease in absorbance at 517 nm, after remaining in the dark for 24 hours at room temperature. Absorbance readings were performed in triplicate, at a wavelength of 517 nm, in a UV-visible spectrophotometer (HOMIS SF, 200DM model) against a blank control. The content of DPPH was calculated from a calibration curve (trolox content = 0.0184 x absorbance - 0.1366; R² = 0.985) using Trolox as standard. The results were expressed in mM Trolox (antioxidant capacity equivalent to Trolox).

3.1.5.2 ABTS Method (2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

Antioxidant activity was determined according to the ABTS•+ radical method, as described by Re et al. (1999). This method is based on the generation of the ABTS •+, which presents a blue-green color, via the reaction of ABTS with potassium persulphate and with the addition of an antioxidant, ABTS•+ is reduced to ABTS, promoting the loss of color.

Absorbance readings were performed in triplicate at a wavelength of 750 nm, in a UV-visible spectrophotometer (HOMIS SF, 200DM model), after 6 min. of reaction. The synthetic antioxidant Trolox (1mM) was used at concentrations of 0; 0.025; 0.05; 0.075; 0.100 and 0.150 mM in ethanol, to construct a calibration curve (% of deactivation of absorbance corrected = $632.6 \times$ ability to reduce ABTS $\bullet+$ in mM Trolox - 2.5084, $R^2 = 0.995$). The results were expressed in mM Trolox (antioxidant capacity equivalent to Trolox).

3.1.5.3 FRAP Method (*ferric reducing antioxidant power*)

Total antioxidant capacity was determined by the iron reduction method (FRAP) as described by Benzie and Strain (1996). This assay is based on direct measurement of the antioxidant capacity (reducers) of the sample to reduce, in an acid medium (pH 3.6), the complex Fe^{3+} /tripirydyltriazine (TPTZ), to form Fe^{2+} , of intense blue color, after incubation in a water bath at 37° C for 30 min. The absorbance readings of samples were performed in triplicate in a UV-visible spectrophotometer (HOMIS SF, 200DM model), at a wavelength of 593 nm. Trolox (1 mM) was used as standard to construct a calibration curve (Trolox content = $22.759 \times$ absorbance - 0.9019; $R^2 = 0.997$), at concentrations of 0; 0.025; 0.05; 0.075; 0.100 0.150 mM Trolox with results expressed in mM Trolox (antioxidant capacity equivalent to Trolox).

3.1.6 Statistical analysis

The experiments were performed using a completely randomized design, with three replicates and readings in triplicate. The data were subjected to analysis of variance and means were compared by Tukey test at 5 % probability of error. Pearson correlation analysis was performed for content of phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity. The analyses were performed using Statistica software, version 7.0 (StatSoft, Inc., 1984-2004).

3.2 RESULTS

The levels of total phenolic compounds and flavonoids of the erva-mate extracts varied depending on the solvent and ultrasound extraction time evaluated (Table 2). The samples treated with acidified hydroalcoholic solvents presented higher values of total phenolic compounds and flavonoids, when compared to the corresponding non-acidified treatments. Extraction in 70 % acidified hydroacetone solvent for 45 min. in ultrasound yielded the highest content (747.39 mg L^{-1} GAE) of phenolic compounds, although there was no significant difference when the time in ultrasound was reduced to 30 min.. For the extraction of flavonoids, extraction time in ultrasound was found to be important for the 70 %

acidified hydromethanol solvent (552.20 mg L⁻¹ CAT), where 45 min. in ultrasound resulted in the highest content, with no difference from the same extraction time in 70 % acidified hydroacetone solvent (502.7 mg L⁻¹ CAT).

Table 2 - Content of total phenolic compounds and total flavonoids in leaves of erva-mate extracted in ultrasound with different solvents and extraction times. Santa Maria, RS, 2015.

Solvent type	Ultrasound extraction time		
	15 (min.)	30 (min.)	45 (min.)
Total phenolic compounds (mg GAE L⁻¹)			
70 % Hydromethanol	340.8±5.84 Cb*	374.5±3.11 Bc	405.2±5.57 Ac
70 % Hydroethanol	265.3±23.35 Bc	307.5±6.37 ABd	331.9±34.87 Ac
70 % Hydroacetone	341.2±10.67 Cb	388.1±10.01 Bc	427.9±7.87 Ac
Aqueous Sol.	366.4±10.44 Ab	368.3±10.93 Ac	381.3±14.26 Abc
70 % Acidified Hydromethanol**	618.1±24.52 Aa	612.8±16.83 Ab	634.4±27.86 Ab
70 % Acidified Hydroethanol**	608.6±40.37 Aa	591.9±17.68 Ab	640.9±10.67 Ab
70 % Acidified Hydroacetone**	669.1±46.76 Ba	689.3±14.44 ABa	747.4±12.16 Aa
Acidified Aqueous Sol.**	331.4±10.71 Abc	316.6±19.10 Ad	337.4±13.97 Ac
Total Flavonoids (mg CAT L⁻¹)			
70 % Hydromethanol	336.0±10.68 Bb	372.7±4.00 Ab	384.2±12.94 Acd
70 % Hydroethanol	277.0±6.65 Cc	311.3±7.91 Bc	345.4±11.11 Ad
70 % Hydroacetone	327.7±26.42 Bbc	292.9±14.08 Bc	421.1±18.03 Ac
Aqueous Sol.	332.7±32.86 Abc	299.2±13.29 Ac	291.2±12.36 Ae
70 % Acidified Hydromethanol**	491.6±17.95 Ba	490.5±9.62 Ba	552.2±23.47 Aa
70 % Acidified Hydroethanol**	503.0±27.40 Aa	453.7±26.98 Aa	471.4±14.76 Ab
70 % Acidified Hydroacetone**	445.1±24.74 Ba	471.3±1.76 ABa	502.7±19.80 Aab
Acidified Aqueous Sol.**	184.9±8.83 Ad	174.6±4.89 Ad	178.7±10.76 Af

* Treatments with different, lowercase letters in columns and uppercase letters in rows, differ from one other by Tukey test at 5 % probability. ** Solutions acidified with HCl 6M at a 1%.

The antioxidant capacity of erva-mate extracts, evaluated by DPPH, ABTS and FRAP, varied with the type of solvent and extraction time in ultrasound (Table 3). Quantifying the antioxidant capacity by the DPPH method, acidified extraction solutions resulted in higher values, with no difference between solvents and times in ultrasound. When evaluated by ABTS, the highest value obtained for antioxidant action (1.79 mM Trolox) occurred in the treatment with 70 % hidro-methanol solution for 45 min. in ultrasound. This treatment did not differ statistically from the treatments with 70 % hydroethanol, 70 % hydroacetone, 70 % acidified hydromethanol and 70 % acidified hydroethanol, all for 45 min. in ultrasound 70 % hydromethanol and 70 % hydroethanol, both acidified, also did not present differences for any

of the ultrasound extraction times evaluated. For the FRAP method, the different solvents and extraction times were important for the determination of antioxidant capacity in extracts of erva-mate, with the highest value found (6.68 mM Trolox) in the treatment with 70 % hydroacetone solvent for 45 min. in ultrasound.

Table 3 - Antioxidant capacity in leaves of erva-mate extracted with different solvents and ultrasound extraction times using DPPH, ABTS and FRAP methods. Santa Maria, RS, 2015.

Solvent type	Ultrasound extraction time		
	15 (min.)	30 (min.)	45 (min.)
DPPH¹ (mM Trolox)			
70 % Hydromethanol	0.06±0.02 Abc*	0.08±0.01 Ab	0.08±0.00 Ab
70 % Hydroethanol	0.01±0.00 Bc	0.08±0.01 Ab	0.11±0.02 Ab
70 % Hydroacetone	0.10±0.01 Bb	0.14±0.01 Ab	0.14±0.01 Ab
Aqueous Sol.	0.08±0.01 Ab	0.09±0.01 Ab	0.10±0.01 Ab
70 % Acidified Hydromethanol**	0.29±0.02 Aa	0.30±0.02 Aa	0.29±0.03 Aa
70 % Acidified Hydroethanol**	0.29±0.01 Aa	0.29±0.03 Aa	0.29±0.03 Aa
70 % Acidified Hydroacetone**	0.29±0.03 Aa	0.31±0.01 Aa	0.27±0.00 Aa
Acidified Aqueous Sol. **	0.34±0.04 Aa	0.29±0.08 Aa	0.24±0.04 Aa
ABTS² (mM Trolox)			
70 % Hydromethanol	1.40±0.15 Babc	1.62±0.02 Aba	1.79±0.09 Aa
70 % Hydroethanol	1.18±0.01 Bbc	1.34±0.12 Bbc	1.57±0.06 Aab
70 % Hydroacetone	1.46±0.02 Bab	1.73±0.05 Aa	1.76±0.12 Aa
Aqueous Sol.	1.16±0.01 Ac	1.21±0.11 Ac	1.20±0.10 Ac
70 % Acidified Hydromethanol**	1.63±0.05 Aa	1.59±0.06 Aa	1.63±0.04 Aab
70 % Acidified Hydroethanol**	1.52±0.04 Aa	1.55±0.08 Aab	1.58±0.14 Aab
70 % Acidified Hydroacetone**	1.47±0.20 Aab	1.25±0.11 Ac	1.44±0.05 Abc
Acidified Aqueous Sol. **	0.69±0.14 Ad	0.77±0.03 Ad	0.58±0.19 Ad
FRAP³ (mM Trolox)			
70 % Hydromethanol	2.72±0.04 Ccd	3.04±0.10 Bd	3.33±0.06 Ab
70 % Hydroethanol	2.23±0.03 Be	2.78±0.00 Ae	2.73±0.15 Ae
70 % Hydroacetone	3.00±0.08 Bc	3.32±0.06 Bc	5.72±0.19 Ab
Aqueous Sol.	2.68±0.09 Ad	2.28±0.10 Bf	2.24±0.08 Bf
70 % Acidified Hydromethanol**	5.08±0.22 Ab	5.17±0.09 Ab	5.66±0.09 Ab
70 % Acidified Hydroethanol**	5.15±0.06 Ab	5.09±0.03 Ab	5.13±0.04 Ac
70 % Acidified Hydroacetone**	5.60±0.03 Ca	6.14±0.15 Ba	6.68±0.08 Aa
Acidified Aqueous Sol. **	2.18±0.10 Be	2.70±0.01 Ae	2.66±0.05 Ae

¹ DPPH - 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ² ABTS - 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); ³FRAP - ferric reducing antioxidant power.

* Treatments with different, lowercase letters in columns and uppercase letters in rows, differ from one other by Tukey test at 5 % probability. ** Solutions acidified with HCl 6M at a 1%.

The phenolic compounds and total flavonoids presented a high correlation ($r = 0.852$) (Table 4). These compounds also showed high correlation with antioxidant capacity, but this correlation depended on the method of quantification. The highest linear correlations between total phenolic compounds and antioxidant capacity were obtained by DPPH ($r = 0.690$) and FRAP ($r = 0.930$), whereas the highest correlations for total flavonoids were obtained by ABTS ($r = 0.716$) and FRAP ($r = 0.859$). Among the methods for antioxidant capacity quantification, FRAP presented the highest values of linear correlation both with DPPH ($r = 0.630$) and with ABTS ($r = 0.429$).

Table 4 – Pearson correlations for contents of total phenolic compounds, flavonoids and antioxidant capacity by DPPH, ABTS and FRAP in leaves of *erva-mate*. Santa Maria, RS, 2015.

	Flavonoids	A.C. - DPPH ¹	A.C. - ABTS ²	A.C.- FRAP ³
Phenolic Compounds	0.852	0.690	0.384	0.930
Flavonoids		0.405	0.716	0.859
A.C. - DPPH			-0.136	0.630
A.C. - ABTS				0.429

A.C. – *Antioxidant Capacity*.

¹ DPPH - 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl;

² ABTS - 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid);

³ FRAP - Ferric reducing antioxidant power.

3.3 DISCUSSION

The development of an effective method for quantifying total phenolic compounds and flavonoids and antioxidant capacity is critical to qualify and standardize extracts of *erva-mate*, as well as to identify genotypes and define the environmental conditions that maximize their levels. The identification of genotypes with appropriate levels of these compounds would result in the production of high quality raw materials for the industry and for the development of new products with nutraceuticals properties. This study made it possible to define the solvent, optimize conditions and extraction time and verify their influence on the extraction of total phenolic compounds and flavonoids and antioxidant capacity in leaves of *erva-mate* using ultrasound.

Acidification of the solvent during the extraction process can increase the extraction of polyphenols, which was observed in the present study. This occurs because acidity favors the stability of the phenolic extraction target, due to the non-release of the hydroxyl proton. Vinification residue studies also demonstrated that the acidification of the solvent increases extraction capacity and, consequently, provides detection of higher levels of total polyphenols (LAFKA et al., 2007). These authors found higher levels of total polyphenols in vinification

residues when using an aqueous ethanol solvent 1:1, followed by methanol, ethanol and acetone; however, the greatest antioxidant activity was observed for the ethanol solvent, followed by methanol, acetone and aqueous ethanol solvents.

Several studies have employed variations in the process of extraction of total phenolic compounds and flavonoids in leaves of erva-mate (BLUM-SILVA et al., 2015; GRUJIC et al., 2012; BASTOS et al. 2007). Optimization of extraction conditions resulted in a total phenolic compound content of 428.31 mg GAE L⁻¹ and a flavonoid content of 421.75 content mg CAT L⁻¹ CAT in leaves of erva-mate (BASSANI et al., 2014). In another study, analyzing the contents of different teas, the content of phenolic compounds in erva-mate was 672.87 mg GAE L⁻¹ and total flavonoid content was 176.04 mg CAT L⁻¹ (ZIELINSKI et al. , 2014). The combination of an acidified solution, agitation, and extraction in ultrasound resulted in high amounts of total phenolic compounds and flavonoids in leaves of erva-mate, which may be an indicative of the increased extraction capacity of this new method. It is noteworthy that in this study, when comparing the highest and lowest contents found, there was a 2.8-fold extraction gain for phenolic compounds and a 3.2-fold gain for flavonoids. These results demonstrate the importance of understanding the effect of different solvents and ultrasound extraction times in order to improve the technique and standardize the content of total phenolic compounds and flavonoids.

It is hard to find a single method that is suitable for the analysis of a diverse group of phenolic compounds, due to the great diversity of chemical structures, the variation of sensitivity of compounds to extraction conditions, extraction method, particle size of the sample, the time and conditions of storage, as well as the presence of interfering substances that affect the efficiency of the methods (NACZK; SHAHIDI, 2004). Methods of measuring antioxidant activity have been reviewed in other works, and have been clearly found to exhibit great diversity (ANTOLOVICH et al., 2002) with activity depending on the analytical procedure (PEREZ et al., 2013). This was also verified in the present study, as there was great variation in the antioxidant activity measured by different methods. With the DPPH method, the solvent that presented the greatest extraction provided 34 times greater antioxidant potential than that found with the solvent giving the lowest extraction. Similarly, for the ABTS method, extraction with 70 % hydromethanol for 45 min. in ultrasound presented 3.1 times higher antioxidant potential than that found for the solvent with the lowest extraction yield. For the FRAP method, which presented the greatest activity among the methods analyzed, 70 % acidified hydroacetone for 45 min. in ultrasound (6.68 mM Trolox) resulted in a value of 3.1 times greater antioxidant potential than that found for the solvent with the

lowest content. A higher content of antioxidant activity was also found for the FRAP method when compared to the DPPH method in leaves of *erva-mate* (ZIELINSKI et al. 2014).

The system of solvents used for extraction exerts a direct influence on the antioxidant capacity of the extract, since the type of solvent and its polarity can affect the transfer of hydrogen atoms and electrons, which directly impacts the antioxidant capacity (ROCKENBACH et al., 2007). Thus, it was observed that the antioxidant capacity evaluated by FRAP is more correlated to the extraction of total phenolic compounds (0.930) and total flavonoids (0.859). The high correlation found between total phenolic compounds and flavonoids and the antioxidant action (Table 4) is of great importance, demonstrating that total phenolic compounds produced are mostly flavonoids that are associated with antioxidant capacity, especially when quantified by FRAP method. On the other hand, the antioxidant activity determined by DPPH method presents a high correlation (0.690) with the total phenolic compounds and a low correlation (0.405) with total flavonoids. Correlation differences were expected, since the DPPH method is subject to interference from anthocyanin compounds, mainly found in red fruits, presenting a color spectrum from red to blue, or a mixture of the two, resulting in shades of purple, which absorbs at 515 nm (ROGINSKY; LISSI, 2005).

Because of the characteristics of phenolic acids and their form in nature, they can be extracted from a matrix using polar solvents such as water and ethanol, whereas solvents of increasing polarity can be used for the extraction of flavonoids (BIMAKR et al., 2011). In this study, it was found that the polarity of the solvent influences the extraction of phenolic compounds. A 70 % acidified hydroacetone solvent was better for total phenolic extraction, whereas 70 % acidified hydromethanol solvent was more effective for the extraction of total flavonoids (Table 2). Acetonic solvents (50 and 70 %) are more effective to extract low-polarity compounds, such as proanthocyanidins and some flavonoids, while methanol solvents (70 and 50 %) are better for more polar compounds such as glycosilated flavonoids (ROBARDS, 2003; AGOSTINI-COSTA, 2003).

It is noteworthy that in this study, diluted acetone was found to be more effective for extraction of phenolic compounds and antioxidant action in the FRAP method, whereas for the DPPH and ABTS methods, both diluted methanol and acetone were effective for extraction of flavonoids, and acetone, methanol and ethanol were equally effective for extraction of antioxidant activity by which method. Nevertheless, acetone and methanol pose several problems, mainly in that they are highly toxic. Methanol can be fatal or cause blindness if ingested or inhaled. In the same sense, these solvents cause environmental

damage, especially to aquatic life, in addition to the higher cost of raw materials (50 %, and 13 % more expensive than ethanol, respectively). Another important aspect was the higher content of antioxidant activity with acetone as a solvent for the FRAP method. This result may be related to interference from non-phenolic compounds, such as chlorophyll from the leaves, and associated pigments, such as carotenoids (STREIT et al., 2005). These compounds are easily extracted in polar solvents like 80 % acetone (HU et al., 2013), being detected in the same range of wavelength used in this methodology (BERG et al., 2002), masking the antioxidant activity and possibly leading to overestimation of its content. Hydroalcoholic solvents containing methanol and ethanol have shown better efficiency in extraction of phenolic compounds, with ethanol being used in concentrations between 50 and 80 % (v/v) (RANA-ROJO et al., 2012). Ethanol has been preferred to methanol, since it is generally considered a safe solvent with low toxicity. In this study, for the FRAP method, the acidified ethanol solvent had the best performance after acidified acetone. Therefore, for the evaluation of the antioxidant capacity of erva-mate leaves by FRAP, acidified ethanol should be used as the extraction solvent.

Accordingly, in order to find effective solvents with lower toxicity, respecting the environment and the analyst, as well as to reduce operation time, the content obtained with 70 % acidified hydroethanol solvent for 15 min. in ultrasound was compared to the highest results found for each analysis. The extraction using 70 % acidified hydroacetone for 45 min. in ultrasound gave 0.23 times the total phenolic content. The extraction of total flavonoids in 70 % acidified hydromethanol solvent for 45 min. in ultrasound gave a value of 0.1 times greater. For antioxidant capacity, contents of 0.17, 0.18 and 0.30 times greater were found for extraction by DPPH, ABTS and FRAP, respectively. These results indicate that 70 % acidified hydroethanol solvent for 15 min. in ultrasound, followed by mechanical agitation for 30 min., is sufficient to extract the bioactive compounds, which reduces the possibility of degradation.

The results of this study have provided an effective delineation of suitable extraction conditions, solvents and times for the determination of total phenolic compounds and flavonoids and antioxidant capacity in erva-mate leaves. In addition, by using ultrasound as an alternative technology to advance green chemistry, it was possible to define a technique using inexpensive solvents that are less aggressive to the environment and easy to use to generate relevant data for the selection of genotypes with higher contents of these compounds and make it possible to determine the environmental conditions that maximize the production of active compounds.

3.4 CONCLUSIONS

A potential alternative was proposed for an industrial process of solid-liquid extraction of total phenolic compounds and flavonoids and antioxidant capacity in mate leaves. The ideal extraction conditions for total phenolic compounds and flavonoids and the quantification of the antioxidant capacity were found using the FRAP method with erva-mate samples treated with 70 % acidified hydroethanol solvent, subjected to 15 min. of ultrasound and 30 min. of mechanical agitation. Total phenolic compounds and flavonoids are highly correlated with each other and with the antioxidant capacity in erva-mate, especially when determined by the FRAP method.

REFERENCES

- AGOSTINI-COSTA TS, LIMA A and LIMA MV. 2003. Determinação de taninos em pedúnculo de caju: método da vanilina versus método do butanol ácido. **Quim. Nova**, 26: 763-765.
- ALOTHMAN M, BHAT R and KARIM AA. 2009. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. **Food Chem.** 115: 785-788.
- ANTOLOVICH M, PRENZLER KR and RYAN D. 2000. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Critical Review.* **Analyst**, 125: 989-1009.
- ANTOLOVICH M, PRENZLER PD, PATSALIDES E, MCDONALD S and ROBARDS K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, 127: 183-198.
- ASPÉ E and FERNÁNDEZ K. 2011. The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata* Bark. **Ind Crop Prod**, 34 (1): 838-844.
- BASSANI DC, NUNES DS and GRANATO D. 2014. Optimization of phenolics and flavonoids extraction conditions and antioxidant activity of roasted erva-mate leaves (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) using response surface methodology. **An Acad Bras Cienc.**, 86 (2): 923-933.
- BASTOS DHM, SALDANHA LA, CATHARINO RR, Sawaya ACHF, Cunha IBS, Carvalho PO and EBERLIN MN. 2007. Phenolic antioxidants identified by esi-ms from erva maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. **Molecules**, 12: 423-432.
- BENZIE IFF and STRAIN JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. **Anal Biochem**, 239: 70-76.
- BERG MJ, TYMOCZKO JL and STRYER L. 2002. Transducing and storing energy. The light reactions of photosynthesis. In: FREEMAN WH. et al. **Biochemistry**. p. 475-477.

BIMAKR M, RAHMANA RA, TAIPA FS, GANJLOO A, SALLEHA LM, SELAMAT J, HAMIDC A and ZAIDUL ISM. 2011. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. **Food Bioprod Process**. 89: 67-72.

BLUM-SILVA CH, CHAVES VC, SCHENKEL EP, COELHO GC and REGINATTO FH. 2015. The influence of leaf age on methylxanthines, total phenolic content, and free radical scavenging capacity of *Ilex paraguariensis* aqueous extracts. **Rev Bras Farmacogn**, 25: 1–6.

BRAND-WILLIAMS W, CUVELIER ME and BERSET C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm Wiss Technol**, 22: 25-30.

BUNEA CI, POP N, BABEŞ AC, MATEA C, DULF FV and BUNEA A. 2012. Carotenoids, total polyphenols and antioxidant activity of grapes (*Vitis vinifera*) cultivated in organic and conventional systems. **Chem Cent J**, 6(1): 26.

CAETANO ACS, MELO EA, LIMA VLAG and ARAUJO CR. 2012. Extração de antioxidantes de resíduos agroindustriais de acerola. **Braz J Food Techn**, Campinas, 12(2) – 155-1609.

CHAN EWC, LIM YY, WONG SK, LIM KK, TAN SP, LIANTO FS and YONG MY. 2009. Effects of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species. **Food Chem**, 113: 166–172.

DELADINO L, ANBINDER OS, NAVARRO AS and MARTINO MN. 2008. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. **Carbohydr Polym**, 71: 126-134.

FILGUEIRAS AV, CAPELO JL, LAVILLA I and BENDICHO C. 2000. Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, 53: 433–441.

FILIP R, FERRARRO G, BANDONI A, BRACESCO N, NUNES E, GUGLIUCCI A and DELLACASSA E. 2009. Mate (*Ilex paraguariensis*). In: IMPERATO, F. (eds), **Recent adv Phytochem**. Research Signopost: Kerala, p.113.

GALANAKIS CM, TORNBERG E and GEKAS V. 2010. Recovery and preservation of phenols from olive waste in ethanolic extracts. **J Chem Technol Biot**, 85: 1148–1155

GRUJIC N, LEPOJEVIC Z, SRDJENOVIC B, VLADIC J and SUDJI J. 2012. Effects of different extraction methods and conditions on the phenolic composition of mate tea extracts. **Molecules**, 17: 2518-2528.

HECK CI and MEJIA EG. 2007. Erva-mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, healthy implications, and technological considerations. **J Food Sci**, 72: 138-151.

HERRERO M, PLAZA M, CIFUENTES A and IBÁÑEZ E. 2010. Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays. **J. Chromatogr. A**, 1217: 2512–2520.

HU X, TANAKA A and TANAKA R. 2013. Simple extraction methods that prevent the artifactual conversion of chlorophyll to chlorophyllide during pigment isolation from leaf samples. **Plant Method**. 9 (19): 1-13.

INPI. Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Disponível em: <https://gru.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController>, acesso em junho 2016.

JAPÓN-LUJÁN R, LUQUE-RODRÍGUEZ JM and LUQUE De CASTRO MD. 2006 (a). Multivariate optimisation of the microwave-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. **Anal Bioanal Chem**, 385: 753–759.

JAPÓN-LUJÁN R, LUQUE-RODRÍGUEZ JM and LUQUE De CASTRO MD. 2006. (b). Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. **J. Chromatogr. A**, 1108: 76–82.

LAFKA TI, SINANOGLU, V and LAZOS ES. 2007. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. **Food Chem**, 104: 1206-1214.

LAPORNIK B, PROSEK M and WONDRA AG. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **J Food Eng**, 71: 214-222.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 1, 3º Ed. São Paulo: Instituto Plantarum. 2000. 368p.

MEJIA EG, YOUNG SS, RAMIREZ-MARES MV and KOBAYASHI H. 2005. Effect of erva-mate (*Ilex paraguariensis*) tea on topoisomerase inhibition and oral carcinoma cell proliferation. **J Agric Food Chem**, 53: 1966-1973.

MICHIELS JA, KEVERS C, PINCEMAIL J, DEFRAIGNE JO and DOMMES J. 2012. Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. **Food Chem**. 130: 986-993.

MORAIS EC, STEFANUTO A, KLEIN GA, BOAVENTURA BCB, ANDRADE F, WAZLAWIK E, DI PIETRO PF, MARASCHIN, M and Da SILVA EL. 2009. Consumption of Erva-mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **J Agric Food Chem**. 57: 8316–8324.

MUSTAFA A and TURNER C. 2011. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Anal Chim Acta**, 703: 8– 18.

NACZK M and SHAHIDI F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. **J. Chromatogr. A**, 1054: 95-111.

- PAGLIOSA CM, VIEIRA MA, PODESTÁ R, MARASCHIN M, Zeni ALB, AMANTE ER and AMBONI RDMC. 2010. Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **Food Chem**, 122: 173-178.
- PERES RG, TONIN FG, TAVARES MFM and RODRIGUEZ-AMAYA DB. 2013. HPLC-DAD-ESI/MS Identification and quantification of phenolic compounds in *Ilex paraguariensis* beverages and on-line evaluation of individual antioxidant activity. **Molecules**, 18: 3859-3871.
- PÉRES VF, SAFFI J, INÊS M, MELECCHI S, ABAD FC, JACQUES RA, MARTINEZ M, OLIVEIRA EC and CARAMÃO EB. 2006. Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes: fatty acids and vitamin e from *Piper gaudichaudianum* kunth. **J. Chromatogr. A**, 1105: 115–118.
- RABABAH TM, BANAT F, RABABAH A, EREIFEJ K and YANG W. 2010. Optimization of extraction conditions of total phenolics, antioxidant activities, and anthocyanin of oregano, thyme, terebinth, and pomegranate. **J Food Sci**. 75: 626-632.
- RE R, PELLEGRINI N, PROTEGGENTE A, PANNALA A, YANG M and RICE-EVANS C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Bio Med**. 26: 1231-1237.
- ROBARDS K. 2003. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. **J. Chromatogr. A**. 1000 (1–2): 657-691.
- RODRIGUEZ-ROJO S, VISENTIN A, MAESTRI D and COCERO MJ. 2012. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. **J Food Eng**. 109: 98–103.
- ROCKENBACH II, SILVA GL, RODRIGUES E, GONZAGA LV and FETT R. 2007. Atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva das variedades regente e pinot noir (*Vitis vinifera*). **Rev Inst Adolfo Lutz**. 66 (2): 158-163.
- ROGINSKY V and LISSI EA. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chem**. 92: 235-254.
- SANSBERRO PA, REY HY, MROGINSKI LA and KRIVENKI MA. 2001. Plant regeneration from *Ilex* spp. (Aquifoliaceae) *in vitro*. **Biocell**, 25(2): 139-146.
- SILVA EM, ROGEZ H and LARONDELLE Y. 2007. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. **Sep Purif Technol**. 55: 381-387.
- SINGLETON VL and ROSSI JA. 1965. Colorimetry of phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Am J Enol Viticult**. 16 (3): 144-158.
- SORIA AC and VILLAMIEL M. 2010. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. **Trends Food Sci Tech**. 21: 323-331.
- STREIT NM, CANTERLE LP, CANTO MW and HECKTHEUER LHR. 2005. The chlorophylls. **Ciência Rural**. 35 (3): 748-755.

STREIT NM, HECKTHEUER LHR, CANTO MW, MALLMANN CA, STRECK L, PARODI TV and CANTERLE LP. 2007. Relation among taste-related compounds (phenolics and caffeine) and sensory profile of erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Food Chem.** 102: 560-564.

SUN Y, LIU Z and WANG J. 2011. Ultrasound-assisted extraction of five isoflavones from *Iris tectorum* Maxim. **Sep Purif Technol.** 78: 49–54.

SUN YJ, MA GP, YE XQ, KAKUDA Y and MENG RF. 2010. Stability of all-trans- β -carotene under ultrasound treatment in a model system: Effects of different factors, kinetics and newly formed compounds. **Ultrason Sonochem.** 17: 654–661.

TSAI CC, CHOU CH, LIU YC and HSIEH CW. 2014. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Phyllanthus emblica* L. and evaluation of antioxidant activities. **Int J Cosmetic Sci.** 36(5): 471–476.

XYNOS N, PAPAEFSTATHIOU G, PSYCHIS M, ARGYROPOULOU A, ALIGIANNIS N and SKALTSOUNIS AL. 2012. Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. **J Supercrit Fluids.** 67: 89– 93.

ZIELINSKI AAF, HAMINIUK CWI, ALBERTI A, NOGUEIRA A, DEMIATE IM and GRANATO D. 2014. A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. **Food Res Int.** 60: 246–254.

ZHISHEN J, MENGCHENG T and JIANMING W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chem.** 64: 555-559.

CAPÍTULO 3

ANÁLISE FITOQUÍMICA DE PLANTAS EM PRODUÇÃO DE ERVA-MATE

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os teores dos compostos fenólicos e dos flavonoides totais e da capacidade antioxidante em folhas de plantas em produção de erva-mate. Foram identificadas 61 plantas com características superiores de produção e qualidade de acordo com os interesses dos produtores e coletada uma amostra representativa de folhas e do solo ao redor de cada uma das plantas. As extrações foram realizadas em banho ultrassônico por 15 minutos (min.), seguido de agitação mecânica por 30 min. em solução aquosa de etanol e acidificada. O experimento foi um fatorial no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições e leituras em triplicata. Foram avaliados os compostos fenólicos e os flavonoides totais e a atividade antioxidante pelos métodos *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP). Também foram determinados os valores de macro e micronutrientes das folhas e solo. Os teores de compostos fenólicos e flavonoides totais e a capacidade antioxidante apresentam grande variação entre plantas em produção de erva-mate. Estes compostos são correlacionados positivamente entre si e com o pH e a disponibilidade de fósforo e o zinco no solo.

Palavras-chave: Árvores matrizes. Agrupamento de plantas. Seleção. Nutrientes.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the contents of phenolic compounds and total flavonoids and the antioxidant capacity in leaves of plants in production of erva mate. Were identified 61 plants with superior characteristics of production and quality according to the interests of the producers and were collected a representative sample of leaves and soil around each of the plants. Extractions were performed in ultrasonic bath for 15 minutes (min.), followed by mechanical stirring for 30 min. The extractive solvent was composed of aqueous ethanol solution and acidified. The experiment was a completely randomized design, with three replicates and readings in triplicate. Phenolic compounds and total flavonoids and antioxidant activity were evaluated by Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) methods. The macro and micronutrient values of leaves and soil were also determined. The contents of phenolic compounds and total flavonoids and the antioxidant capacity varied among plants. These compounds are positively correlated with each other and with pH and availability of phosphorus and zinc in the soil.

Keywords: Stock plants. Grouping of plants. Selection. Nutrients.

4 INTRODUÇÃO

Ilex paraguariensis St. Hill. (Aquifoliaceae) é uma árvore perene, dióica, nativa do Brasil, Argentina e Paraguai, onde o cultivo tem grande importância cultural, social e econômica (COSTA et al., 2005). Tradicionalmente é utilizada no preparo de chimarrão e tererê, bebidas muito populares na América do Sul (SCHINELLA et al., 2005; REGINATTO et al., 1999). Devido à grande diversidade de compostos fitoquímicos a espécie pode ser considerada fonte de matéria-prima capaz de suprir o setor industrial de insumos alimentícios, produtos de higiene e cosméticos, bebidas, produtos farmacêuticos e fitoterápicos (JACQUES et al., 2007).

Além de apresentar aptidão em aplicações industriais, a erva-mate exhibe benefícios potenciais para saúde, atuando como agente antimicrobiano, antioxidante, anti-obesidade, anti-diabético, na melhoria da digestão, estimulante e propriedades cardiovasculares (BURRIS et al., 2012), assim como, citotástico frente a células de carcinoma de colon *in vitro* (MEJÍA et al., 2010) e reduz o risco de trombose (DAHMER et al., 2012). Estudos revelaram que a erva-mate possui propriedades antioxidantes importantes (COLPO et al., 2007, FILIP et al., 2007, LANZETTI et al., 2008, MIRANDA et al., 2008). Essas características também foram encontradas quando comparado com chás verde e preto (LUNCEFORD; GUIGLUICCI 2005), e também, em estudos de Vanderjagt et al. (2002) com 30 plantas medicinais, onde a erva-mate apresentou a maior atividade antioxidante entre estas. Estas propriedades permitem que a erva-mate seja enquadrada como alimento funcional de produto alimentício saudável (ANVISA, 2010).

A triagem fitoquímica é um procedimento importante, principalmente quando ainda não estão dispostos todos os estudos químicos com espécies de interesse popular, tendo como objetivo conhecer os compostos químicos das espécies vegetais e avaliar a presença nos mesmos, identificando grupos de metabólitos secundários relevantes (SIMÕES et al., 2004). Isso também é importante para prospectar a biodiversidade das espécies vegetais de interesse farmacológico e para definir padrões de qualidade da matéria prima medicinal (BRAGA, 2009) ou como produto nutracêutico (MORAIS et al., 2009). Entretanto, vários fatores podem influenciar os teores de fitoquímicos na erva-mate, como por exemplo, a origem vegetal, a variabilidade genética e ambiental e a época de colheita e processamento (ATHAYDE et al., 2000). Mais especificamente, diferenças genéticas dentro da espécie (COELHO et al., 2001; SCHERER et al, 2002), entre progênies (CARDOZO JUNIOR et al, 2007), entre estações do ano (Da CROCE, 2002; SCHUBERT et al., 2006) e de disponibilidade de nutrientes (GOBBO NETTO; LOPES, 2007) afetam os teores de fitoquímicos na erva-mate.

Esforços foram feitos para avaliar a composição química da erva-mate em programas de melhoramento (CARDOZO JUNIOR et al., 2007), entretanto, pouca informação encontra-se disponível sobre os componentes genéticos desta variabilidade. O êxito no melhoramento, para uma dada característica, se deve a capacidade de escolher corretamente os indivíduos superiores, os quais serão genitores das próximas gerações (CRUZ e CARNEIRO, 2003), tornando necessário avaliar e identificar os genótipos que apresentam os caracteres e em níveis desejáveis. Além disso, a quantificação da variabilidade natural na espécie é importante para conhecer a estrutura genética das populações, possibilitando estabelecer estratégias racionais para a conservação da espécie e, conseqüentemente, o melhoramento genético (DIAS, 1988).

Considerando que o melhoramento genético da erva-mate tem sido focado no aumento da produção e na resistência a algumas pragas e doenças (COSTA et al., 2005) e que a erva-mate é um alimento funcional de produto alimentício saudável (ANVISA, 2010), análises quantitativas e qualitativas dos teores das possíveis classes de metabólitos secundários de interesse são necessários para a seleção de genótipos (JACQUES et al., 2006), para conhecer a variabilidade existente e definir os padrões de qualidade. Portanto, estudos sobre a quantificação e variação dos fitoquímicos de plantas em produção de erva-mate são de extrema relevância para orientar futuros trabalhos que visam definir estratégias de seleção para explorar a erva-mate como produto nutracêutico. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar os teores dos compostos fenólicos totais, flavonoides e da capacidade antioxidante e dos nutrientes do solo e folhas de plantas em produção de erva-mate.

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Reagentes

Radical 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetramethylchromano-2-carboxílico (Trolox), reagente de Folin-Ciocalteu, catequina e ácido gálico foram adquiridos da Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). O etanol, ácido clorídrico, carbonato de sódio, nitrito de sódio, hidróxido de sódio, cloreto de alumínio, acetato de sódio trihidratado, ácido acético glacial, cloreto férrico hexahidratado eram todos de grau analítico.

4.1.2 Seleção das plantas e coleta das amostras

Em povoamentos provenientes de cultivos uniformes, no município de Ilópolis-RS, e manejados para a produção de erva-mate foram identificadas plantas fenotipicamente com características superiores de produção e qualidade de acordo com os interesses dos

produtores. Assim, foram coletadas amostras representativas de folhas, colhidas da parte intermediária do ramo e de forma homogênea ao redor de toda a planta, de 61 plantas adultas selecionadas. Também foi coletada uma amostra do solo ao redor de cada uma das plantas.

4.1.3 Preparo dos extratos

As folhas provenientes das plantas em produção de erva-mate foram secadas em estufa com circulação forçada de ar a 65°C até atingir massa constante. Após, foram trituradas em micro moinho (Marconi[®], modelo MA-630), até atingirem a granulometria da erva-mate comercial moída grossa e utilizada para a separação das amostras.

A condição de extração dos compostos fenólicos e flavonoides totais e da ação antioxidante pelo método de FRAP foi determinada considerando os procedimentos descrito no artigo 1 deste documento. O solvente extrator utilizado foi composto de solução aquosa de etanol e acidificadas com HCl 6M na proporção 70:30:1 (v/v/v, etanol:água:ácido). As extrações foram realizadas em banho ultrassônico com frequência de 40 KHz (*Ultra Sonic Clean*, modelo USC 1600) na proporção de 1:50 (p/v - amostra:solvente) por 15 min., na temperatura ambiente (21 °C ± 2 °C) e no escuro. Após, os extratos foram submetidos a agitação por 30 min. (agitador de microplacas, Marconi[®], modelo MA562). Em seguida, os extratos foram filtrados em papel filtro e acondicionados em frasco de vidro âmbar, devidamente identificados, e estocados a – 18 °C até o momento das análises.

4.1.4 Determinação dos compostos fenólicos totais

O teor dos compostos fenólicos totais produzidos nos extratos de erva-mate foi o resultado da reação de oxirredução com Folin-Ciocalteu, o qual reage com as hidroxilas presentes nos polifenóis. Os extratos foram deixados no escuro e em temperatura ambiente por 2 horas. As leituras da absorbância foram realizadas em triplicata, em comprimento de onda de 765 nm, em espectrofotômetro UV-visível (HOMIS SF, modelo 200DM), conforme descrito em Singleton e Rossi (1965). A curva de calibração foi realizada utilizando o padrão ácido gálico, nas concentrações de 0; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70 e 80 mg L⁻¹. O teor de compostos fenólicos foi obtido com a regressão (Teor de compostos fenólicos = 88,385 x absorbância – 2,9158, com R² = 0,995) e expresso em equivalentes de ácido gálico por litro (mg EAG L⁻¹).

4.1.5 Determinação dos flavonoides

O teor de flavonoides foi analisado conforme o método colorimétrico descrito por Zhishen, et al. (1999). As leituras das absorvâncias das amostras foram realizadas em triplicata em espectrofotômetro UV-visível (HOMIS SF, modelo 200DM), em comprimento de onda de 510 nm. O teor de flavonoides foi determinado utilizando-se uma curva padrão de catequina, nas concentrações de 0; 50; 100; 150; 200 e 250 mg L⁻¹. Os resultados foram determinados a partir de uma curva de calibração (Teor de flavonoides = 414,91 x absorvância - 1,7368; R² = 0,995) e expressos em miligramas de equivalentes de catequina por litro (mg CAT L⁻¹).

4.1.6 Determinação da capacidade antioxidante *in vitro* pelo método FRAP

Para a determinação da capacidade antioxidante total pelo método de redução do ferro (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) ou FRAP foi utilizado o procedimento descrito por Benzie e Strain (1996). Este ensaio se baseia na medida direta de habilidade dos antioxidantes (redutores) da amostra em reduzirem, em meio ácido (pH 3,6), o complexo Fe³⁺/tripiridiltriazina (TPTZ), para formar Fe²⁺, de intensa cor azul, após incubação em banho-maria a 37 °C durante 30 min. As leituras das absorvâncias das amostras foram realizadas em triplicata em espectrofotômetro UV-visível (HOMIS SF, modelo 200DM), em comprimento de onda de 593 nm. O Trolox (1 mM) foi utilizado como padrão para construir uma curva de calibração (Teor de trolox = 22,759 x absorvância - 0,9019; R² = 0,997), nas concentrações de 0; 0,025; 0,05; 0,075; 0,100 e 0,150 mM de Trolox sendo os resultados expressos em mM de Trolox (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox).

4.1.7 Determinação dos teores de macro e micronutrientes nas folhas e no solo

As amostras de solo e foliar, das 61 plantas selecionadas, foram encaminhadas para análise no Laboratório de Análise de Solos da Universidade Federal de Santa Maria (LAS/UFSM). Os valores analíticos das amostras de solo foram registrados para cobre, zinco, fósforo, potássio, magnésio, cálcio, alumínio, boro, matéria orgânica (MO), pH em água e pH SMP e para as folhas, nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, cobre, manganês, ferro, zinco, boro e alumínio conforme a descrita por Tedesco et al. (1995).

4.1.8 Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos segundo o delineamento inteiramente casualizado, com três repetições e leituras em triplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade de erro. Foi

realizada a análise de correlação linear de Pearson entre os teores de compostos fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante em folhas de erva-mate e os teores de cobre, zinco, fósforo, potássio, magnésio, cálcio, alumínio, boro, MO, pH em água e pH SMP no solo e nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, cobre, manganês, ferro, zinco, boro e alumínio das folhas em produção de erva-mate. Com base no teor de compostos fenólicos, flavonoides e na ação antioxidante pelo método de FRAP, as plantas de erva mate foram separadas em cinco grupos pelo método das K-médias (BARROSO E ARTES, 2003; MINGOTI, 2005). Para validar o agrupamento, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias de grupo comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade de erro.

4.2 RESULTADOS

O total de 61 plantas em produção de erva-mate em diferentes condições de manejo foram avaliadas quanto aos teores de compostos fenólicos totais, flavonoides e da capacidade antioxidante pelo método FRAP e foi possível separar em cinco grupos pelo método das k-médias. Os grupos de diferentes plantas foram distribuídos de forma decrescente em relação ao teor médio encontrado. Com isso, as plantas do grupo 1 são aquelas que resultaram no maior valor médio dos teores de compostos analisados e assim sucessivamente até o grupo 5, formado pelas plantas com o menor valor médio. O número de plantas em cada grupo variou de 7 a 17 (Tabela 5), sendo que o grupo com maior número de plantas foi o grupo 3.

Tabela 5 - Agrupamento de plantas em produção de erva-mate pelo método das K-médias, com base nos teores de compostos fenólicos totais e de flavonoides totais e da capacidade antioxidante.

Grupos	Nº de plantas	Plantas de erva-mate
Grupo 1	7	M1, M3, M8, M17, M22, M33, M34
Grupo 2	10	M2, M5, M9, M12, M13, M18, M21, M47, M55, M56
Grupo 3	17	M4, M6, M7, M11, M14, M20, M23, M24, M30, M35, M38, M39, M42, M51, M54, M62, U5
Grupo 4	16	M16, M19, M25, M26, M27, M28, M29, M31, M36, M40, M41, M43, M44, M46, M49, M53
Grupo 5	11	M10, M15, M32, M37, M45, M48, M50, M52, L3, L4, U1

Foram verificadas diferenças significativas entre os grupos para os teores de compostos fenólicos totais, flavonoides e capacidade antioxidante pelo método de FRAP extraídos das folhas das plantas em produção de erva-mate (Tabela 6). Além disso, o teste de Tukey confirmou que todos os grupos são significativamente diferentes. O valores médios do teor de compostos fenólicos variou de 1636,8 para 389,0 mg EAG L⁻¹; do teor de flavonoides

totais de 1339,3 para 213,7 mg CAT L⁻¹; e para a capacidade antioxidante de 18,7 para 2,6 mM Trolox.

Tabela 6 - Média dos teores de compostos fenólicos totais, flavonoides e capacidade antioxidante em folhas de erva-mate dos diferentes grupos formados por plantas em produção de erva-mate.

Grupos	C. Fenólicos (mg EAG L ⁻¹)	Flavonoides (mg CAT L ⁻¹)	C.A. FRAP (mM Trolox)
Grupo 1	1636,8 a ⁽¹⁾	1339,3 a	18,7 a
Grupo 2	1090,8 b	875,6 b	12,9 b
Grupo 3	802,6 c	603,8 c	8,1 c
Grupo 4	584,8 d	367,2 d	5,0 d
Grupo 5	389,0 e	213,7 e	2,6 e

⁽¹⁾ Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Os teores de compostos fenólicos totais, flavonoides e capacidade antioxidante apresentaram alta estimativa de correlação positiva e significativa entre si. Os compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante apresentaram o maior valor de correlação linear ($r = 0,977$), sendo que os compostos fenólicos também apresentaram correlação com os flavonoides, assim como, os flavonoides com a capacidade antioxidante (Tabela 7). Em relação às concentrações de zinco e fósforo, essas apresentaram correlação positiva e significativa ($P < 0,01$), respectivamente, com os compostos fenólicos totais ($r = 0,301$ e $r = 0,281$) e flavonoides ($r = 0,320$ e $r = 0,295$), enquanto que para a capacidade antioxidante apenas o fósforo apresentou correlação significativa ($r = 0,298$). O pH em água apresentou correlação positiva e significativa ($P < 0,01$) com os teores de flavonoides ($r = 0,263$) e a capacidade antioxidante ($r = 0,284$). Além desses, o pH em água apresentou correlação positiva e significativa com as concentrações de zinco e fósforo. No entanto, não foi encontrada correlação significativa entre os nutrientes do solo (cobre, potássio, magnésio, cálcio, alumínio, boro, MO, pH SMP) e das folhas (nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, cobre, manganês, ferro, zinco, boro e alumínio), assim como, estes não apresentaram correlação significativa com os teores de compostos fenólicos totais, flavonoides e capacidade antioxidante.

Tabela 7 – Correlação linear de Person (ρ) entre pH em água e as concentrações de zinco e fósforo no solo e os teores de compostos fenólicos totais, flavonoides e capacidade antioxidante pelo método de FRAP em folhas de plantas em produção erva-mate.

	Zinco (mg kg ⁻¹)	Fósforo (mg kg ⁻¹)	C. Fenólicos (mg EAG L ⁻¹)	Flavonoides (mg CAT L ⁻¹)	C.A. FRAP (mM Trolox)
pH em água	0,409**	0,385**	0,244ns	0,263*	0,284*
Zinco		0,259ns	0,301*	0,320*	0,262ns
Fósforo			0,281*	0,295*	0,298*
C. Fenólicos				0,966**	0,977**
Flavonoides					0,955**

*Significância menor que 0,05; **Significância menor que 0,01; ns = não significativo.

4.3 DISCUSSÃO

O método não hierárquico das K-médias foi utilizado para separar as plantas adultas de erva-mate em cinco grupos (Tabela 5). Essa é uma técnica exploratória de análise multivariada de dados que permite classificar um conjunto de categorias em grupos homogêneos, observando apenas as similaridades ou dissimilaridades entre as mesmas (BARROSO e ARTES, 2003; MINGOTI, 2005). A análise de agrupamento foi eficiente em separar as plantas de erva-mate com base nos teores de compostos fenólicos totais, flavonoides e da capacidade antioxidante. O maior número de plantas (27,9 % do total) formaram o grupo 3, que é intermediário, que casualmente correspondeu ao número de plantas dos grupos 1 e 2 juntos, com os maiores teores de fitoquímicos. Portanto, com base neste agrupamento, um maior número de plantas em produção de erva-mate apresentaram comparativamente os menores teores de fitoquímicos (grupos 4 e 5). Esses resultados evidenciam que altos teores de compostos fenólicos totais, flavonoides e da capacidade antioxidante são encontrados em menor número de plantas de erva-mate em produção e que estratégias de melhoramento devem ser desenvolvidas com o objetivo de identificar adequadamente estes genótipos.

O teste de Tukey mostrou que existem diferenças significativas entre os grupos de plantas para os teores de compostos fenólicos totais, flavonoides e da capacidade antioxidante (Tabela 6), o que indica boa eficiência no processo de agrupamento. As diferenças entre os valores médios de cada grupo são elevadas, indicando que existe grande variabilidade genética entre plantas de erva-mate para todos os compostos fitoquímicos avaliados. As maiores diferenças entre os valores médios do grupo 1 e do 5 foram observadas para a capacidade antioxidante pelo método FRAP (7,3 vezes), seguida dos teores de flavonoides (6,3 vezes) e dos teores de compostos fenólicos totais (4,3 vezes). O estabelecimento de grupos com homogeneidade dentro e heterogeneidade entre os mesmos assume grande

importância por ser o ponto de partida para uma avaliação mais minuciosa dos genótipos, a fim de definir o seu aproveitamento nos programas de melhoramento (VIEIRA et al., 2007).

Os resultados encontrados na literatura sobre compostos fitoquímicos não permitem comparações com os obtidos neste trabalho, devido a grande variação existente entre as metodologias empregadas para extração e para a quantificação dos mesmos (SCHUBERT et al., 2006). Em outro trabalho realizado nas mesmas condições e utilizando uma mistura de folhas de diferentes plantas de erva-mate foram obtidos teores de compostos fenólicos totais de 608,6 mg EAG L⁻¹ e flavonoides de 503,0 mg CAT L⁻¹ (Artigo 1), representando 2,7 vezes menos do que o teor médio obtido no grupo de maior teor de compostos fenólicos totais (1636,8 mg EAG L⁻¹) e de flavonoides (1339,3 mg CAT L⁻¹) (Tabela 6). No caso da capacidade antioxidante pelo método de FRAP foi encontrada uma diferença ainda maior (3,6 vezes), pois o teor obtido foi de 5,15 mM Trolox comparado com 18,67 mM Trolox encontrado neste trabalho. Cabe ressaltar que a maior diferença entre os grupos de maior e menor valor médio (7,3 vezes) foi encontrada justamente para a capacidade antioxidante, o que justifica esta maior discrepância de valores. Portanto, os resultados deste trabalho fundamentam a necessidade de se conhecer a variabilidade genética existente entre plantas de erva-mate a fim de desenvolver estratégias para a seleção de genótipos com os teores adequados para cada uso específico da matéria prima.

Diferenças entre os teores de compostos fitoquímicos também foram encontrados em outros trabalhos (DONADUZZI et al., 2000; COSTA et al., 2005; NAKAMURA et al., 2009; SCHERER et al., 2002;). Isto demonstra que os constituintes do metabolismo secundário podem, para a mesma espécie, apresentar variações como parte das respostas dos diferentes genótipos à adaptação ao ambiente (LEITE, 2009; DA CROCE 2002), sendo que esse fator pode influenciar significativamente as vias metabólicas secundárias relacionadas à produção dos compostos fenólicos e metilxantínicos (ASHIHARA; CROZIER, 2001). Borille (2004) enfatiza a importância da seleção de progênies de erva-mate com alto teor de compostos antioxidantes para formação de pomar clonal, onde avaliações sucessivas poderão confirmar o desempenho dos referidos materiais genéticos, propondo fazer a análise da herdabilidade desses caracteres de modo a isolar o componente genético da variabilidade fenotípica.

A alta correlação positiva e significativa entre os compostos fenólicos totais, flavonoides e capacidade antioxidante pode estar envolvida com a estrutura química e composição dos fitoquímicos fenólicos e a posição e número de hidroxilas presentes nas moléculas dos polifenóis. Acredita-se que a orto-hidroxilação influencia positivamente no efeito da atividade antioxidante dos compostos fenólicos (SHAHIDI et al., 1992). No entanto,

o fato do pH ter apresentado correlação positiva e significativa com os teores de flavonoides totais e com a capacidade antioxidante, assim como o fósforo estar correlacionado com os compostos fitoquímicos analisados (Tabela 7), indicam que o aumento do pH e a disponibilidade de fósforo pode estar promovendo o estresse das plantas de erva-mate. A erva-mate é uma espécie que tem sido caracterizada de ocorrência em solos ácidos e de baixa fertilidade natural (CARVALHO, 2003), atribuindo possibilidade à adaptação genética a baixa exigência nutricional, especialmente de fósforo (REISSMANN et al., 1983).

As diferenças quanto à absorção de nutrientes e o desenvolvimento se manifestam entre espécies, procedências, progênies e clones de espécies florestais, onde os genótipos que crescem bem em solos de baixa fertilidade devem ser selecionados (GUIMARÃES, 1993). Assim, torna-se indispensável o conhecimento de genótipos com maior capacidade na aquisição e translocação de nutrientes (BENITE et al., 2007), visto que os plantios de erva-mate se encontram em solos de baixa fertilidade, necessitando um processo de absorção eficiente.

A caracterização fitoquímica das plantas em produção de erva-mate é relevante para a sequência das pesquisas que enfocam os compostos fitoquímicos. O conhecimento desses caracteres e as exigências nutricionais das plantas para a produção de erva-mate permitirá compreender a variabilidade genética existente a fim de selecionar genótipos mais responsivos à absorção e utilização de nutrientes, apontando as melhores plantas dentro das melhores progênies. Fatores do ambiente e a influência destes no fenótipo também devem ser investigados para melhor atender as demandas dos consumidores que procuram produtos com propriedades nutracêuticas, além de qualificar a matéria prima para melhor atender às demandas da indústria dos produtos atualmente no mercado bem como daqueles inovadores.

4.4 CONCLUSÃO

Os teores de compostos fenólicos e flavonoides totais e a capacidade antioxidante apresentam grande variação entre plantas em produção de erva-mate. Estes compostos são correlacionados positivamente entre si e com o pH e a disponibilidade de fósforo e o zinco no solo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATHAYDE, M. L.; COELHO, G. C.; SCHENKEL, E. P. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 853-857, 2000.

ASHIHARA, H.; CROZIER, A. Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 9, p. 407-413, 2001.

BARROSO, L.P.; ARTES, R. **Análise multivariada**. Lavras: UFLA, 2003.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. de P.; BARREIRO, E. J. Uma visão da química bioinorgânica medicinal. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 2062, 2007.

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

BRAGA, F.C de. Pesquisa Fitoquímica. In: Leite, J.P.V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. 1. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2009, 328p.

BURRIS, K. P.; et al. Composition and bioactive properties of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.): a review. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 72, n. 2, p. 268, 2012.

CARDOZO JUNIOR, E. L, et al. Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) progenies grown in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 7, p. 553-558, 2007.

CARVALHO, P. H. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2003. 1039p

COELHO, G. C.; ATHAYDE, M. L.; SCHENKEL, E. P. Methylxanthines of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hill. var. *vestita* Loes. and var. *paraguariensis*. **RBCF, Rev. Bras. Ciênc. Farm.(Impr.)**, v. 37, n. 2, p. 153-158, 2001.

COLPO, G.; et al. *Ilex paraguariensis* has antioxidant potential and attenuates haloperidol-induced orofacial dyskinesia and memory dysfunction in rats. **Neurotoxicity Research**, v. 12, n. 3, p. 171-180, 2007.

COSTA, R. B.; et al. Avaliação genética de indivíduos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) na região de Caarapó, MS, pelo procedimento reml/blup. **Ciência Florestal**, v. 15, n. 4, p. 371-376, 2005.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. A. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Editora UFV, Viçosa, 2003. 585p.

DA CROCE, D. M. The physical and chemical characteristics of tea (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) in Santa Catarina state. **Ciência Florestal**, v. 12, p. 107-113, 2002.

DAHMER, T.; et al. Antithrombotic effect of Chikusetsusaponin Iva isolated from *Ilex paraguariensis* (Maté). **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 12, p. 1073-1080, 2012.

DIAS, I. S. **Variabilidade genética de diferentes tipos de populações naturais de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham)**. 1988. 62 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1988.

DONADUZZI, C. M.; COELHO, S. R. M.; CARDOSO JUNIOR, E. L.; GALLO, A. G.; HUPPES, G. K.; KUHN, I. M. V.; SCHICHEL, C. Teores de cafeína, polifenóis totais e taninos em amostras de erva-mate comercializadas na região de Toledo Paraná. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA MATE, 2.; REUNIAO TECNICA DA ERVA MATE, 3., 2000, Encantado. **Anais**. Porto Alegre: Comissão dos Organizadores; Universidade do Rio Grande do Sul; Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, 2000. p. 158-161.

FILIP R, et al. Effect of *Ilex* extracts and isolated compounds on peroxidase secretion of rat submandibular glands. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 4, p. 649-655, 2007.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374, 2007.

GUIMARÃES, H. S. **Variabilidade genética para eficiência nutricional em progênies de *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus citriodora***. 1993. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1993.

JACQUES, R. A. et al. GC/MS characterization of mate tea leaves extracts obtained from high-pressure CO₂ extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 40, n. 3, p. 354-359, 2007.

LANZETTI, M. et al. Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. **Nutrition**, v. 24, n. 4, p. 375-381, 2008.

LEITE, J. P. V. Química dos produtos naturais: Uma abordagem Biossintética. In: Leite, J.P.V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. 1. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2009, 328p.

LUNCEFORD N, GUGLIUCCI A. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, v. 76, n. 5, p. 419-427, 2005.

MEJÍA, E. G. et al. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 1, p. 23-34, 2010.

MINGOTI, S. A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada**. Belo Horizonte: UFMG, 2005. 297p.

MIRANDA, D. D. C. et al. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice. **Mutagenesis**, v. 23, n. 4, p. 261-265, 2008.

MORAIS, E. C. et al. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.18, p. 8316-24, 2009.

NAKAMURA, K. L. et al. Genetic variation of phytochemical compounds in progenies of *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 116-123, 2009.

REGINATTO, F. H. et al. Methylxanthines accumulation in *Ilex* species-caffeine and theobromine in erva-mate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, n. 6, p. 443-446, 1999.

REISSMANN, C. B.; ROCHA, H. O.; KOEHLER, C. W.; CALDAS, R. L. S.; HILDEBRAND, E. E. Bio-elementos em folhas e hastes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) sobre Cambissolo na região de Mandirituba – PR. **Revista Floresta**, v.14; p.49-54, 1983.

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

SCHINELLA, G. R.; FANTINELLI, J. C. AND MOSCA, S. M. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. **Clinical Nutrition**, v. 24, n. 3, p. 360-366, 2005.

SCHUBERT, A. et al. Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.(erva-mate) em Ijuí e Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Quim. Nova**, v. 29, n. 6, p. 1233-1236, 2006.

SHAHIDI F, JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Food Science & Nutrition**. V.32(1); p.67-103. 1992

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004. 1102p.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análise do solo, planta e outros materiais**. Porto Alegre: UFRGS, Departamento de Solos, 1995. 174 p. (Boletim técnico, 5).

VANDERJAGT, T. J. et al. Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico. **Life Sciences**, v. 70, n. 9, p. 1035-1040, 2002.

VIEIRA, E. A. et al. Association between genetic distances in wheat (*Triticum aestivum* L.) as estimated by AFLP and morphological markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 2, p. 392-399, 2007.

CAPÍTULO 4

RESGATE DE PLANTAS ADULTAS E PROPAGAÇÃO DE ERVA-MATE POR ESTAQUIA

RESUMO

O uso da propagação vegetativa pode ser uma alternativa viável a ser adotada para a produção de mudas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) com maior qualidade, possibilitando a obtenção de indivíduos geneticamente idênticos à planta matriz que os originou. Entretanto, o sucesso da propagação vegetativa depende das características genéticas e fisiológicas da planta matriz. Os objetivos deste trabalho foram avaliar sete plantas matrizes com relação à competência para fornecer estacas aptas ao enraizamento, resgatar plantas adultas de erva-mate a partir de brotações adventícias e epicórmicas e avaliar o efeito da posição de coleta das brotações e do uso de ácido indolbutírico (AIB) na propagação por estaquia. Inicialmente, sete plantas matrizes foram avaliadas quanto à porcentagem de sobrevivência e enraizamento das estacas oriundas de brotos adventícios induzidos pelo anelamento da base da planta. Posteriormente, as plantas matrizes que apresentaram a maior competência ao enraizamento foram submetidas a poda da parte aérea mantendo galhos com até 50 cm e ao anelamento na base para estimular a emissão de brotações adventícias e epicórmicas. Cada planta foi dividida em quatro posições para a coleta das brotações: abaixo do anelamento, do terço inferior, médio e superior da parte aérea. As brotações foram seccionadas em estacas de gema única, com uma folha reduzida a 50 % do comprimento original, tratadas ou não com 3.000 mg L⁻¹ de AIB e mantidas em câmara úmida para o enraizamento. Foram avaliadas as porcentagens de sobrevivência e enraizamento das estacas e estimados o ponto de máximo e o tempo ótimo de enraizamento. O percentual máximo de enraizamento de estacas foi obtido aos 60 dias de cultivo e o tempo ótimo de permanência em câmara úmida foi de 90 dias. O AIB promove o aumento da porcentagem de enraizamento, o que facilita o resgate de plantas adultas de erva-mate. A planta matriz afeta a sobrevivência das estacas e a competência ao enraizamento, além de alterar o efeito de posição de coleta das brotações.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*; Árvores matrizes; Brotos epicórmicos; Enraizamento; Produção de mudas.

ABSTRACT

The use of vegetative propagation may be a viable alternative to be used for the production of higher quality seedlings of yerba-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.), making it possible to obtain individuals genetically identical to the parent plant that originated them. However, the success of vegetative propagation depends on the genetic and physiological characteristics of the parent plant. The objectives of this work were to evaluate seven matrices with respect to the competence to provide cuttings suitable for rooting, to rescue adult plants of mate from adventitious and epicormic shoots and to evaluate the effect of the collection position of the shoots and the use of indolebutyric acid (AIB) in cutting propagation. Initially, seven matrix plants were evaluated for the percentage of survival and rooting of cuttings derived from adventitious shoots induced by ringing of the plant base. Later, the matrix plants that presented the greatest competence to the rooting were submitted to pruning of the aerial part maintaining branches with up to 50 cm and to the ringing in the base to stimulate the

emission of adventitious and epicormic shoots. Each plant was divided into four positions for the collection of shoots: below the ringing, the bottom, middle and upper third of the aerial part. Sprouts were sectioned in single yolk cuttings, with a leaf reduced to 50% of the original length, treated or not with 3,000 mg L⁻¹ of IBA and kept in moist chamber for rooting. The percentages of survival and rooting of the cuttings were evaluated and the maximum point and the optimal rooting time were estimated. The maximum percentage of rooting of cuttings was obtained at 60 days of cultivation and the optimal time of stay in humid chamber was of 90 days. The IBA promotes an increase in the percentage of rooting, which facilitates the rescue of adult plants of yerba-mate. The matrix plant is a component that affects the survival of the cuttings and the competence to the rooting, besides differentiating the competence to the rooting when using epicormic shoots.

Keywords: *Ilex paraguariensis*; Matrix trees; Epicormic shoots; Rooting; Seedling production.

5 INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraquariensis* St. Hill.) é uma espécie arbórea nativa do Sul do Brasil, instituída árvore símbolo do Rio Grande do Sul pela Lei nº 7.439, de 8 de dezembro de 1980. Apresenta relevante importância social e ecológica (SANSBERRO et al., 2001). Além disso, a espécie apresenta importância econômica em função do potencial para diversas aplicações industriais, tais como a produção de cosméticos e produtos de higiene, às propriedades antissépticas, e o uso na indústria alimentícia para o preparo de extratos solúveis para bebidas, corantes e conservantes de alimentos, produção de doces (sorvete, bala, entre outros), e especialmente para a preparação do chimarrão e de chá estimulante (MACCARI e MAZUCHOWSKI, 2000).

O desenvolvimento de produtos e o crescente interesse pela erva-mate sugerem um aumento na demanda por matéria-prima de qualidade para o emprego na indústria. Entretanto, a matéria-prima é obtida em povoamentos nativos e plantios comerciais, oriundos de mudas seminais, que resultam em grande variabilidade genética entre as plantas e conseqüentemente em alta heterogeneidade. Nesse caso, o uso de mudas produzidas por propagação vegetativa de clones selecionados pode ser uma alternativa viável a ser adotada para o estabelecimento de plantios de erva-mate, pois resulta em cultivos mais uniformes e produtivos, sendo vantajoso principalmente para as indústrias ervateiras (SILVA et al., 2007). As vantagens da muda clonal se devem à obtenção de indivíduos geneticamente idênticos à planta matriz selecionada que os originou (WENDLING et al., 2005). Além disso, a propagação vegetativa apresenta potencial para a conservação de genótipos superiores e permite a produção de mudas de alta qualidade genética e fitossanitária e ao longo do ano (ASSIS et al., 2004; XAVIER et al., 2013) características imprescindíveis para o estabelecimento de povoamentos comerciais uniformes e de alta produtividade. Entretanto, deve ser salientado que a propagação vegetativa deve ser realizada em indivíduos selecionados, pois a simples clonagem, sem ocorrer a seleção, não garante a produção de mudas com qualidade superior.

No caso da erva-mate, dentre as características almejadas nas árvores selecionadas destacam-se a produtividade e qualidade de massa verde, a resistência ao ataque de pragas e doenças e o tipo de ramificação ou arquitetura da copa (RESENDE et al., 2000). Tais características são expressas em indivíduos adultos, os quais apresentam uma série de modificações morfofisiológicas associadas à troca de fase do ciclo de vida da planta e ao envelhecimento ontogenético. Uma das mais consistentes expressões da maturidade do tecido vegetal é a redução ou perda da capacidade de enraizamento adventício das estacas (WENDLING et al., 2014), limitando o uso da propagação vegetativa para o resgate de

plantas arbóreas adultas (HARTMANN et al., 2011). Além disso, em espécies lenhosas, há um gradiente de maturação da base em direção ao ápice da árvore, sendo os meristemas apicais mais maduros em relação às porções basais da planta, embora ocorram grandes variações em níveis intra e interespecífico (XAVIER et al., 2013; HARTMANN et al., 2011). A região mais próxima da base é considerada mais juvenil, porque muitos meristemas basais são formados no momento da germinação, mantendo, nestes locais, algumas características associadas com a juvenilidade (HACKETT, 1987; HARTMANN et al., 2011).

Uma das possibilidades para o resgate de plantas adultas é a indução de brotações da região basal, as quais apresentam maior grau de juvenilidade, são fisiologicamente mais propensas ao enraizamento adventício e possuem maior vigor de crescimento (WENDLING et al., 2014). As principais metodologias empregadas para a indução de brotações em árvores adultas são o anelamento do caule, o uso do fogo na base, a poda e a decepa da árvore (ALMEIDA et al., 2007; WENDLING et al., 2013; XAVIER; SILVA, 2010). A indução de brotações basais pelo corte raso da planta matriz é a forma mais usual e que tem possibilitado resultados positivos no resgate de árvores adultas de araucária (*Araucaria angustifolia* Bertol. Kuntze) (WENDLING et al., 2009) e *Eucalyptus* spp. (ALMEIDA et al., 2007). Essa estratégia apresenta como desvantagem a supressão da parte aérea do indivíduo, o que pode acarretar a perda do genótipo selecionado (BITENCOURT et al., 2009; WENDLING et al., 2013). No caso da erva-mate, a indução de brotações pode ser feita por meio da poda e do anelamento da árvore (SANTIN et al., 2008). Visto que brotações oriundas da parte mais basal da planta são consideradas brotações adventícias, formadas a partir de células maduras diferenciadas, que retomam a atividade meristemática e reprogramam a expressão gênica celular. Já as brotações da parte superior da planta são consideradas brotações epicórmicas, oriundas de gemas axilares dormentes ou do colar de gemas, originadas a partir do tecido meristemático e localizadas na casca externa na maioria das angiospermas. (BURROWS, 2002; HARTMANN et al., 2011; MEIER et al., 2012)

Aliado as peculiaridades de resgate de espécies arbóreas, a carência de métodos eficientes de rejuvenescimento e revigoramento de material adulto de erva-mate também se constitui em um fator limitante para a propagação vegetativa (WENDLING et al., 2007), sendo observados valores médios de enraizamento em torno de 17 % quando utilizada a estaquia convencional (GRAÇA et al., 1988). Além da maturação da planta, existem evidências de que a formação de raízes adventícias é geneticamente controlada, sendo observada diferença entre espécies e genótipos (ASSIS; TEIXEIRA, 1998). Assim, a competência ao enraizamento varia entre genótipos de erva-mate (STURION; RESENDE,

1997). A identificação de genótipos de erva-mate mais responsivos ao enraizamento adventício e a definição de metodologias eficientes de resgate de plantas adultas selecionadas, desde a obtenção do material de propagação até o enraizamento da estaca, contribuem para o sucesso da produção de mudas. Assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar 7 plantas matrizes com relação à competência para fornecer estacas aptas ao enraizamento, resgatar plantas adultas de erva-mate a partir de brotações adventícias e avaliar o efeito da posição de coleta das brotações adventícias e epicórmicas e do uso de AIB na propagação por estaquia.

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no período de agosto de 2013 a abril de 2015, no Núcleo de Melhoramento e Propagação Vegetativa de Plantas (MPVP), Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Brasil. As plantas matrizes, com 18 anos de idade, foram estabelecidas em sub-bosque da área experimental do Departamento de Ciências Florestais da UFSM. Durante a condução dos experimentos, as estacas foram mantidas em câmara úmida, com temperatura média em seu interior de 27°C e umidade relativa do ar de aproximadamente 85 %, mantido por aspersores acionados automaticamente 12 vezes ao dia, durante 10 minutos, com fluxo de ar de 10 m³ min⁻¹.

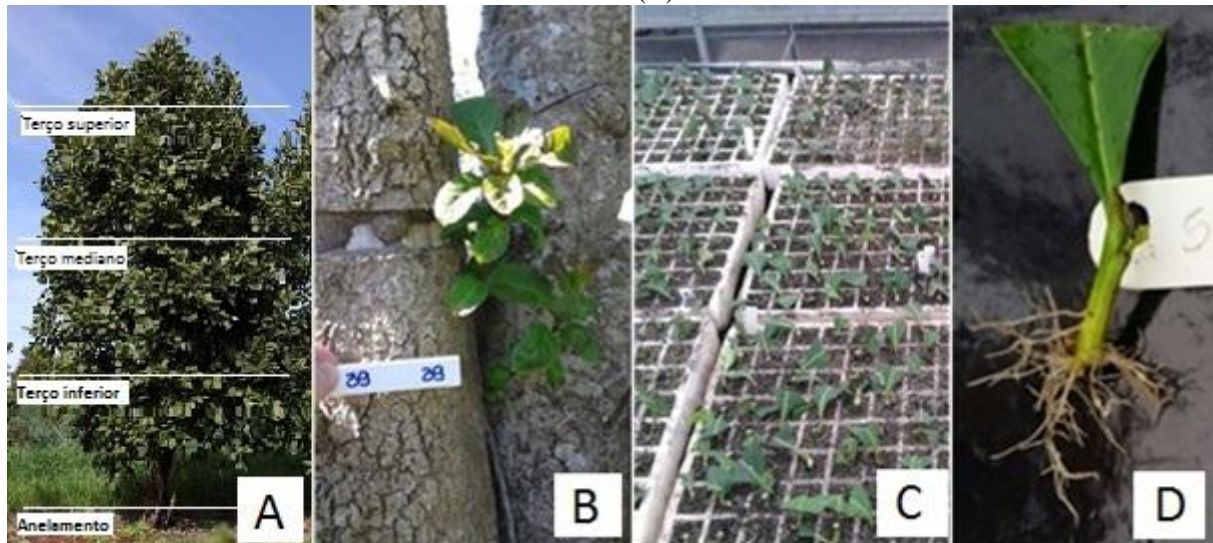
Para o resgate, sete plantas adultas de erva-mate (13SM01, 13SM03, 13SM05, 13SM06, 13SM07, 13SM08 e 13SM09) foram submetidas ao anelamento entre 5 e 10 cm do solo, para estimular a emissão de brotações adventícias, que se desenvolveram por aproximadamente sete meses. Os brotos formados foram coletados em fevereiro de 2014 e seccionados em estacas de gema única, contendo uma folha reduzida a 50 % do comprimento original. As estacas tratadas com auxina tiveram a base imersa por 10 s em solução hidroalcoólica de 3.000 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB), na proporção de 1:1:2 de AIB, álcool etílico (96°GL) e água destilada. As estacas foram cultivadas em bandejas de isopor de 128 alvéolos, contendo iguais proporções de substrato comercial (a base de turfa e casca de arroz carbonizada) e vermiculita. Aos 60 dias de cultivo em câmara úmida, as estacas foram avaliadas quanto às porcentagens de sobrevivência e enraizamento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 5 repetições de 5 estacas.

As duas plantas matrizes com maior porcentagem de enraizamento das estacas foram utilizadas para avaliar o efeito da posição de coleta das brotações adventícias e epicórmicas na propagação da erva-mate por estaquia. Para isso, as plantas matrizes 13SM01 e 13SM05 foram submetidas à poda da parte aérea mantendo galhos com até 50 cm e ao anelamento da base para estimular a emissão de novas brotações adventícias e epicórmicas. As brotações

formadas foram coletadas em dezembro de 2014, e identificadas de acordo com a posição de coleta na árvore: abaixo do anelamento, terço inferior, mediano e superior (Figura 3 A e 3 B). As brotações foram seccionadas em estacas de gema única, com uma folha reduzida a 50 % do comprimento original. As estacas foram tratadas ou não com solução hidroalcoólica de 3.000 mg L⁻¹ de AIB por 10 s e cultivadas em bandejas de 128 alvéolos, contendo igual proporção de substrato comercial e vermiculita (Figura 3C). As porcentagens de sobrevivência e de enraizamento foram avaliadas aos 60, 75, 90 e 105 dias de cultivo em câmara úmida (Figura 3D). Com a porcentagem de enraizamento foi calculado o incremento corrente diário (ICD) e o incremento médio diário (IMD) de enraizamento, conforme as seguintes equações: $ICD = X_{(i+1)} - X_{(i)}$ e $IMD = X_{(i)} / T_{(i)}$ onde: i = tempo de avaliação; $X_{(i+1)}$ = total de estacas enraizadas no tempo $(i+1)$; $X_{(i)}$ = total de estacas enraizadas no tempo; e $T_{(i)}$ = dias no tempo i . Com base no ICD foi determinado o ponto de máximo enraizamento em câmara úmida, assim como o tempo ótimo de permanência das estacas em câmara úmida definida pela interseção das curvas ICD e IMD (FERREIRA et al., 2004). Também foi calculada a área abaixo da curva da progressão do enraizamento até o tempo ótimo de permanência das estacas em câmara úmida. O experimento foi um fatorial 4 x 2 x 2 (posição de coleta, aplicação de AIB e genótipo) no delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições de oito estacas.

Para atender aos pressupostos da normalidade dos erros e homogeneidade das variâncias, os dados de porcentagem foram transformados para arcoseno $\sqrt{x/100}$ e submetidos à análise de variância. As médias dos tratamentos com diferenças significativas ($P \leq 0,05$) foram comparadas pelo teste de Tukey, com o auxílio do programa ESTAT (Unesp - Jaboticabal).

Figura 3 - Divisão da planta matriz de erva-mate em quatro porções para coleta de brotações (A), brotações epicórmicas formadas abaixo do anelamento (B), estacas em bandejas de 128 alvéolos para o enraizamento (C), estaca enraizada no momento da retirada da câmara úmida (D).



5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas avaliadas de erva-mate apresentaram diferenças significativas para as porcentagens de sobrevivência e enraizamento aos 60 dias de cultivo em câmara úmida (Tabela 8). Estacas obtidas das plantas 13SM01, 13SM05 e 13SM07 apresentaram a maior sobrevivência, sem diferir da 13SM03. Para a porcentagem de enraizamento foi observada uma grande variação entre as plantas matrizes, de 76 % de estacas enraizadas (13SM05) até a completa ausência de enraizamento (13SM08), apesar da alta porcentagem de sobrevivência (60 %) das estacas. As maiores porcentagens de enraizamento foram obtidas com as plantas 13SM05 e 13SM01, que também apresentaram 100 % de sobrevivência das estacas.

Tabela 8 – Porcentagem de sobrevivência e enraizamento de estacas de erva-mate aos 60 dias de cultivo em câmara úmida.

Planta matriz	Sobrevivência (%)	Enraizamento (%)
Planta 13SM05	100,0 a*	76,0 a
Planta 13SM01	100,0 a	68,0 a
Planta 13SM07	100,0 a	12,0 b
Planta 13SM03	88,0 ab	8,0 b
Planta 13SM06	60,0 bc	8,0 b
Planta 13SM09	52,0 c	4,0 b
Planta 13SM08	60,0 bc	0,0 b
Média	80,0	25,1
CV (%)	19,8	59,3

* Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade de erro.

Os resultados do presente estudo mostram que a erva-mate é uma espécie que apresenta grande variação para a competência ao enraizamento adventício e que estratégias de seleção precoce devem ser adotadas em um programa de desenvolvimento de clones, principalmente para eliminar aqueles recalcitrantes. Além disso, outros trabalhos também indicam que a competência ao enraizamento adventício das estacas é dependente do genótipo (GREENWOOD et al., 1991; MALAVASI, 1994; MOKOTEDI et al., 2000), o que justificaria o não enraizamento das estacas oriundas da planta 13SM08, e, para algumas espécies lenhosas, podendo ser fator limitante para a propagação vegetativa (KIBBLER et al., 2004). Diferenças entre genótipos também foram verificadas em estudo de enraizamento de estacas obtidas de genótipos de *Toona ciliata* var. *Australis* (PEREIRA et al., 2015) e *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* (BRONDANI et al., 2012b). Sendo assim, estacas de diferentes genótipos podem requerer distintas condições de cultivo para viabilizar a propagação vegetativa (MOKOTEDI et al., 2000). As diferenças entre os genótipos de *Quercus acutissima* são críticas para a propagação por estaquia, podendo haver variações de respostas ao enraizamento de até 80 % (MOON; YI, 1993), intervalo muito similar ao observado no presente trabalho (0 % a 76 %).

A identificação de genótipos com maior competência ao enraizamento adventício é extremamente importante para a propagação vegetativa, visto que aqueles que não enraízam ou não formam parte aérea são descartados do processo de produção de mudas. Oliveira et al. (2015) mostram que o enraizamento adventício pode ser usado como critério auxiliar nos programas de melhoramento de *Eucalyptus cloeziana* por ser um caráter de alta herdabilidade, proporcionando maiores ganhos de seleção, entretanto, os estudos relacionados à seleção de genótipos quanto ao enraizamento ainda são incipientes.

Vale salientar que, todas as brotações adventícias utilizadas nesse experimento foram retiradas abaixo do anelamento, a qual, por sua vez consiste na porção mais juvenil, por estar próxima ao dos meristemas basais formados no momento da germinação da planta. Entretanto, ao longo do tronco, no sentido do ápice caulinar, as células são progressivamente mais maduras, pois acumulam as diversas divisões celulares pelas quais passaram no decorrer do desenvolvimento. Plantas que não enraízam ou enraízam de maneira pouco eficiente a partir das brotações adventícias da base, também não devem enraizar as estacas obtidas de brotações epicórmicas da parte aérea (HARTMANN et al., 2011). Portanto, com base nessa premissa e nos resultados observados, as plantas 13SM01 e 13SM05 são superiores em sobrevivência e enraizamento das estacas do que às demais e, portanto, promissoras para a propagação por estaquia. Além disso, essas plantas apresentaram valores de enraizamento

semelhantes em estacas oriundas de brotações adventícias, podendo ser utilizados de forma comparativa para avaliar o efeito da posição de coleta das brotações de origens adventícias e epicórmicas na propagação da erva-mate por estaquia.

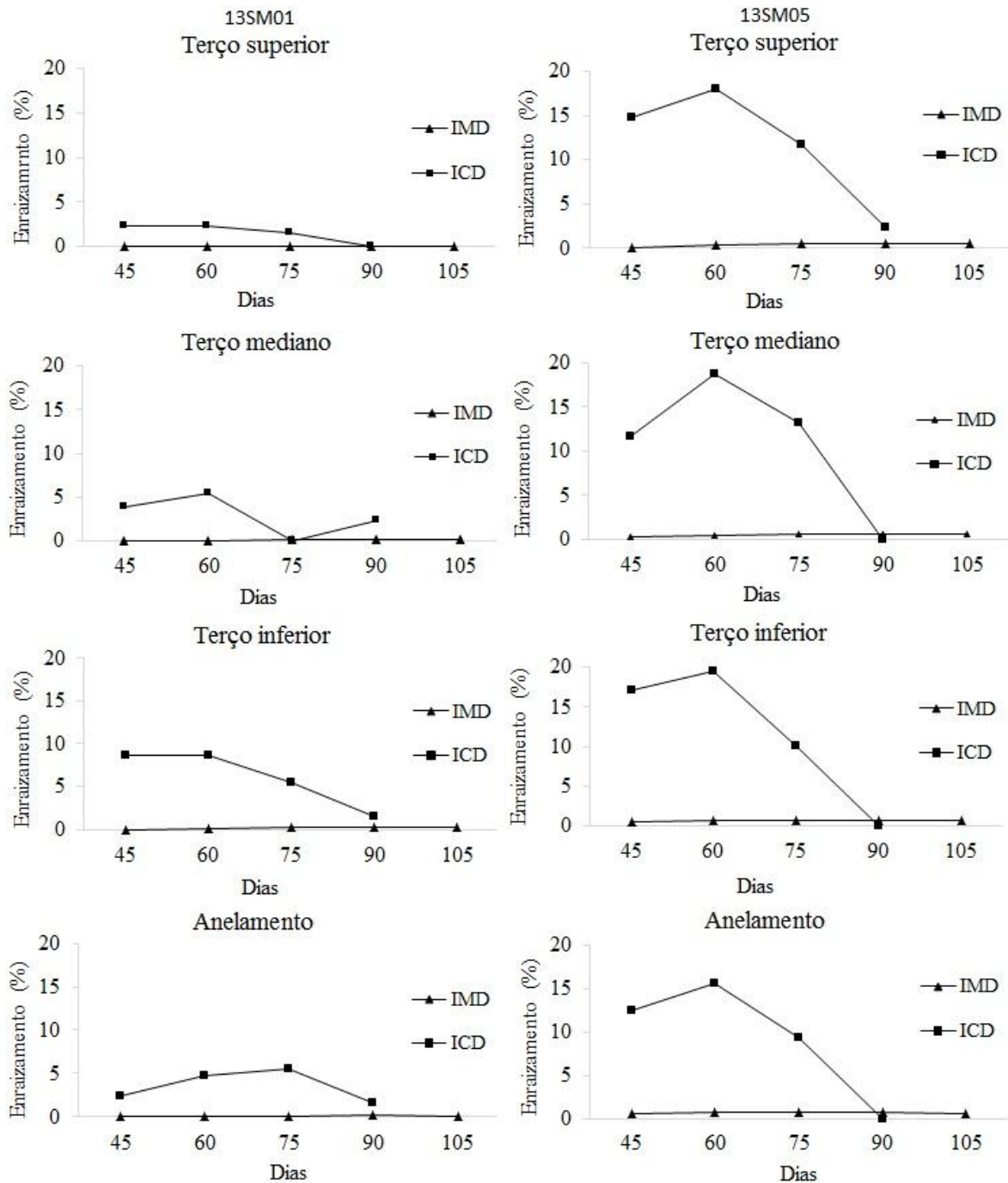
Nesse sentido, quanto ao efeito da posição de coleta das brotações para o enraizamento adventício, foi possível verificar por meio da análise da curva do ICD que, em geral, o ponto de máximo enraizamento das plantas 13SM01 e 13SM05 são similares, ocorrendo aos 60 dias para todas as posições avaliadas, exceto para as estacas coletadas na posição do anelamento da planta 13SM01, em que o máximo enraizamento se deu aos 75 dias (Figura 4). Sendo assim, embora existam diferenças em nível de genótipo, o máximo enraizamento das estacas de erva-mate se dá aos 60 dias de cultivo em câmara úmida e após este período, pouco acréscimo das porcentagens de enraizamento são esperados. O intercepto das curvas ICD e IMD nas diferentes posições de coleta das brotações possui forte tendência a ocorrer aos 90 dias, quando o mesmo já não ocorre nesse ponto, exceto para as estacas retiradas do terço mediano da planta 13SM01 que ocorreu aos 75 dias (Figura 4). Variações no tempo de permanência das estacas em câmara úmida também podem ser devido ao genótipo, pelo seu efeito na taxa de enraizamento (XAVIER et al., 2013). Neste trabalho, foi possível distinguir diferenças de comportamento das curvas de ICD e IMD entre as plantas avaliadas, em que a 13SM05 apresentou um comportamento similar entre as diferentes posições de coleta associado à maior competência ao enraizamento adventício, quando comparada a planta 13SM01 (Figura 4).

O intercepto das duas curvas corresponde ao tempo ótimo de enraizamento, ao qual condiz ao período ideal de permanência das estacas em câmara úmida (FERREIRA et al., 2004). Dentre os fatores limitantes para a clonagem de plantas por estaquia, o tempo de permanência dos propágulos vegetativos para o enraizamento em câmara úmida tem sido considerado como de grande importância (GOULART; XAVIER, 2008). Isso se deve ao fato de que é comum superestimar o tempo de permanência dos propágulos vegetativos em câmara úmida (FERREIRA et al., 2004), incidindo em efeitos negativos da alta umidade e da temperatura elevada do ar sobre as estacas e raízes adventícias, além de serem condições favoráveis para o surgimento de algumas doenças (BRONDANI et al., 2012b). Portanto, a definição do tempo ótimo pode contribuir para a produção de mudas de erva-mate, pois reduz a mortalidade das estacas enraizadas causada pelo apodrecimento e pela incidência de patógenos, além de maximizar o uso das estruturas de propagação.

Com base nesses resultados, as estacas de erva-mate podem ser mantidas em câmara úmida por 60 dias, momento em que as mesmas atingem o ponto de máximo enraizamento,

até um período máximo de 90 dias, que corresponde ao tempo ótimo de enraizamento. Sendo assim, aparentemente não é necessário manter as estacas de erva-mate por um período maior do que 60 dias em câmara úmida, possibilitando o máximo aproveitamento da área de produção de mudas em viveiros florestais. Estes dados corroboram com a metodologia empregada no estudo anterior e, em geral, para a propagação de erva-mate por estaquia, que eram empregadas de maneira empírica até o presente momento.

Figura 4 – Incremento médio diário (IMD) e incremento corrente diário (ICD) da porcentagem de enraizamento das estacas de erva-mate coletadas em diferentes posições da planta 13SM01 (A, C, E, G) e da planta 13SM05 (B, D, F e H) em função do tempo de permanência em câmara úmida.



Não foi observada interação entre a posição de coleta das brotações e do uso de AIB em duas plantas de erva-mate no ponto de máximo enraizamento (60 dias) para as porcentagens de sobrevivência e enraizamento. Entretanto, para as mesmas variáveis, o uso de AIB e de planta matriz apresentaram relação entre si, independente da posição de coleta (Tabela 9). A maior sobrevivência foi observada nas estacas da planta 13SM05, independente

do uso ou não de AIB. Já para a planta 13SM01, o uso de 3.000 mg L⁻¹ de AIB favoreceu a sobrevivência das estacas. A planta 13SM05 também apresentou maior competência ao enraizamento do que a 13SM01 e ainda respondeu ao tratamento com 3.000 mg L⁻¹ de AIB, resultando em 39,1 % de estacas enraizadas (Tabela 9).

Tabela 9 – Porcentagem de sobrevivência e de enraizamento das estacas de erva-mate de diferentes plantas matrizes tratadas ou não com ácido indolbutírico (AIB) aos 60 dias de cultivo em câmara úmida.

Tratamentos	Sobrevivência		Enraizamento	
	0 mg L ⁻¹ AIB	3.000 mg L ⁻¹ AIB	0 mg L ⁻¹ AIB	3.000 mg L ⁻¹ AIB
Planta 13SM01	44,1 Bb	62,1 Ab*	0,8 Bb	8,6 Ab
Planta 13SM05	89,8 Aa	89,4 Aa	21,9 Ba	39,1 Aa
Média	66,95	75,7	11,3	23,8
CV (%)	24,8		74,1	

*Tratamentos com letras diferentes, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade de erro.

Foi possível observar que o tratamento com AIB promoveu o aumento da porcentagem de enraizamento das estacas de ambas as plantas. Para a formação de raízes adventícias em estacas, além da presença de teores adequados de fitohormônios, a aplicação exógena de diversas substâncias pode ser fundamental, dentre as quais se destacam as auxinas (XAVIER et al., 2013). Além de promover a iniciação dos primórdios radiculares, as auxinas também podem atuar na movimentação de nutrientes em direção ao tecido em formação e interferir no acúmulo de outros compostos necessários para o enraizamento (COSTA et al., 2013). O AIB é uma auxina de alta eficiência na promoção de enraizamento adventício de espécies florestais, em razão da menor mobilidade e maior estabilidade química no interior da estaca, sendo utilizado em concentrações que variam de 20 a 20.000 mg L⁻¹ de acordo com a espécie, genótipo, estado de maturação, tipo de estaca, entre outras (XAVIER et al., 2013). Concentrações mais elevadas são geralmente utilizadas em estacas mais lenhosas e de difícil enraizamento, entretanto a aplicação de concentrações supra ótimas pode causar inibição do enraizamento ou morte do propágulo (HARTMANN et al., 2011). Dados obtidos por Picheth (1997) corroboram com esta premissa, visto que a maior sobrevivência de estacas de erva-mate, mesmo que em material mais lenhoso, foi obtida no tratamento sem uso de AIB, quando comparado com concentrações mais elevadas dessa substância (7.000, 9.000, 11.000, 13.000 e 15.000 mg L⁻¹).

Além de efeitos de fitotoxicidade, é necessário salientar que o uso de altas concentrações de indutores de enraizamento onera o processo produtivo e o valor final da muda. Para erva-mate, Picheth (1997) não verificou influência das altas concentrações testadas porcentagem de enraizamento das estacas, com médias que variaram entre 16,9 a

17,6 % aos 120 dias de cultivo, enquanto Xavier et al. (2013) afirma que a concentração de 6.000 mg L⁻¹ de AIB tem sido recomendada. Entretanto, neste estudo foi obtido até 39,1 % de enraizamento com o uso de 3000 mg L⁻¹ de AIB indicam que por meio da seleção de genótipos mais competentes ao enraizamento e da aplicação de técnicas de revigoração/rejuvenescimento, possivelmente avanços sejam alcançados na produção massal de mudas desta espécie.

Ao que se refere à área abaixo da curva de progressão da porcentagem de enraizamento até o tempo ótimo de permanência das estacas em câmara úmida (90 dias), também não houve interação entre os três fatores testados. A planta matriz apresentou interação significativa com a posição de coleta dos brotos, assim como também com o uso de AIB (Tabela 10). Para a planta 13SM01, estacas obtidas de brotações do terço inferior da planta apresentaram maiores porcentagens de enraizamento, mas sem diferir das estacas retiradas de brotações do terço mediano e abaixo do anelamento. Sendo assim, o terço superior da planta 13SM01 fornece estacas com menor competência ao enraizamento do que as demais posições, pois foi observado um valor de enraizamento 3,9 vezes menor do que no terço inferior. Em algumas espécies de plantas, especialmente as lenhosas, existe um gradiente de maturação em direção ao ápice da planta (ZOBEL; TALBERT, 1984; ELDRIDGE et al., 1994), corroborando com os dados observados no presente estudo. Brotações provenientes das gemas laterais formados na porção basal da planta possuem maior juvenilidade e vigor, o que favorece a formação de raízes nesse material vegetativo (HARTMANN et al., 2011). A maior juvenilidade da região basal se deve ao fato das gemas laterais presentes nessa região estarem mais próximas aos tecidos formados durante a germinação da semente (HARTMANN et al., 2011), evidenciando a hipótese de que a maturidade possui base celular e se dá em função das divisões celulares cumulativas (GREENWOOD; HUTCHISON, 1993). Desse modo, a menor competência para o enraizamento das estacas provenientes de brotações obtidas do terço superior da planta matriz 13SM01 deve ser em função do maior grau de maturidade dos tecidos formados nesta região.

Tabela 10 – Área abaixo da curva de progressão da porcentagem de enraizamento de estacas de duas plantas matrizes de erva-mate coletadas em diferentes posições e submetidas ou não a aplicação de ácido indolbutírico (AIB) até os 90 dias de cultivo em câmara úmida.

Tratamentos	Planta 13SM01		Planta 13SM05	
Posição na planta				
Anelamento	234,4	Bab*	2724,6	Aa
Terço Inferior	591,8	Ba	2490,2	Aa
Terço Mediano	304,7	Bab	3011,7	Aa
Terço Superior	152,3	Bb	2519,5	Aa
AIB (mg L ⁻¹)				
0	140,6	Bb	1356,4	Ab
3.000	501,0	Ba	4016,6	Aa
Média	320,8		2686,5	
CV (%)	81,3		19,9	

*Tratamentos com letras diferentes, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

A planta 13SM05 apresentou reposta de enraizamento significativamente superior à 13SM01 em todas as posições avaliadas, com ou sem aplicação de AIB (Tabela 10). Kramer e Kozłowski (1972) mencionam que diferenças na capacidade de enraizamento de estacas podem variar entre espécies, e entre plantas da mesma espécie. Tais variações na capacidade rizogênica podem ocorrer mesmo entre indivíduos geneticamente relacionados, pertinentes à influência de mecanismos endógenos vinculados ao enraizamento (MANKESSI et al., 2009). Devido ao fato das plantas matrizes apresentarem idade cronológica similar, acredita-se que as diferenças de competência ao enraizamento das estacas estejam relacionadas com características ontogenéticas (WENDLING; XAVIER, 2001) e condições fisiológicas distintas entre as plantas estudadas (HUSEN; PAL, 2007; LI et al., 2009). Essa hipótese é corroborada pelo fato da planta matriz 13SM05 não apresentar diferenças significativas entre as brotações adventícias e as posições de coleta das brotações epicórmicas (Tabela 10). Entretanto, deve ser salientado, que mesmo sem apresentar diferenças significativas de enraizamento entre as posições de coleta das brotações, existe diferença da parte basal em direção ao topo da planta, assim como foi observado mais claramente na planta 13SM01. Nessa perspectiva, a planta 13SM05 tem maior competência para o enraizamento do que a 13SM01, mostrando a existência de variabilidade genética para o enraizamento de estacas entre as mesmas, o que não havia sido detectado no primeiro experimento. Portanto, possivelmente existe um componente genético importante para os padrões de maturação ontogenética e os seus efeitos sobre o enraizamento de estacas de erva-mate, assim como para a origem das brotações utilizadas para o preparo das mesmas.

Os resultados deste trabalho assumem grande relevância, pois, enquanto algumas plantas podem ser resgatadas apenas a partir de brotações adventícias da porção basal da

planta, outras podem ser propagadas através de brotações epicórmicas ao longo de todo o tronco, maximizando a taxa de multiplicação e requerendo menor número de ciclos de propagação vegetativa para utilização comercial. Essas informações justificam a avaliação das plantas matrizes para a produção de propágulos, assim como para a capacidade de enraizamento das estacas retiradas de diferentes posições do tronco, quando o objetivo é utilizar o máximo possível de material vegetativo para a propagação. Além disso, a identificação de variações nos padrões de maturação de plantas perenes é pouco esperada, em função dos ciclos longos de vida. Resultados importantes quanto aos efeitos da idade ontogenética também foram verificados em miniestacas de *Solanum tuberosum*, espécie anual e altamente responsiva à propagação vegetativa por miniestaquia, em que propágulos provenientes de plantas juvenis apresentam maior capacidade de enraizamento em comparação com as estacas retiradas de plantas maduras (BISOGNIN et al., 2015).

O tratamento das estacas com 3.000 mg L⁻¹ de AIB promoveu o aumento do enraizamento em ambas as plantas (Tabela 10). O uso de AIB também resultou em acréscimo na indução do enraizamento adventício de estacas de *Spondias tuberosa* (DUTRA et al., 2012), *Gmelina arborea* (SINGH e ANSARI, 2014) e em estacas obtidas de brotos epicórmicos formados pela decepa de *Tectona grandis* Linn. F. (HUSEN e PAL, 2007). Diante disso, evidencia-se a necessidade do uso de AIB para o enraizamento de estacas provenientes de brotações epicórmicas, visando o resgate vegetativo de plantas adultas de erva-mate por estaquia.

Neste estudo foi possível o resgate de plantas adultas e a obtenção de mudas de erva-mate por estaquia de gema única de brotos epicórmicos, como indicado nos estudos realizados por Bisognin et al. (2016 – no prelo). O sucesso no resgate de plantas adultas de erva-mate por estaquia depende do genótipo, que por sua vez pode estar relacionado com padrões diferenciados de maturação. O máximo enraizamento ocorreu aos 60 dias de cultivo e o tempo ideal de permanência das estacas em câmara úmida foi de 90 dias, independente da planta matriz e da posição de coleta das brotações. Esses resultados indicam que as comparações de enraizamento de estacas de erva-mate devem ser realizadas aos 60 dias de cultivo em câmara úmida, pelo menos na época do ano que foi conduzido este experimento. Com relação à influência da porção de coleta das brotações, houve diferença de enraizamento apenas para a planta 13SM01. Além de não apresentar influência da posição de coleta, a planta 13SM05 apresentou maior competência ao enraizamento do que a 13SM01. Entretanto, mesmo aquelas plantas que apresentam elevadas taxas de enraizamento em brotações provenientes da base, as quais são posições mais juvenis, ainda apresentam diferenças em relação à porção apical.

Além disso, o tratamento das estacas com 3.000 mg L⁻¹ de AIB promoveu o aumento do enraizamento. Assim, as estratégias utilizadas no presente estudo demonstram que é possível identificar plantas matrizes com maior competência ao enraizamento adventício, compondo os critérios de seleção para o resgate de plantas adultas e, a partir da formação de mudas, ocorrer o estabelecimento de minijardim clonal para a produção contínua de mudas por miniestaquia.

5.3 CONCLUSÃO

É possível resgatar plantas adultas de erva-mate por estaquia de brotações adventícias. O percentual máximo de enraizamento de estacas foi obtido aos 60 dias de cultivo e o tempo ótimo de permanência em câmara úmida foi de 90 dias. O AIB promove o aumento da porcentagem de enraizamento, o que facilita o resgate de plantas adultas de erva-mate. A planta matriz afeta a sobrevivência das estacas e a competência ao enraizamento, além de alterar o efeito de posição de coleta das brotações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA FD de; XAVIER A, DIAS JMM. (2007) Propagação vegetativa de árvores selecionadas de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. por estaquia. **Revista Árvore**, 31, 445-453.

ASSIS, T. F.; FETT-NETO, A. G.; ALFENAS, A. C. Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on Eucalyptus. In: WALTER, C.; CARSON, M. (Ed.). **Plantation Forest Biotechnology for the 21st Century**, 2004. p. 303-333. (Research Signpost: Kerala).

ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v. 1, p. 183-260.

BITENCOURT J, ZUFFELLATO-RIBAS KC, WENDLING I, KOEHLER HS (2009) Enraizamento de estacas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hill.) provenientes de brotações rejuvenescidas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, 11(3), 277-281.

BISOGNIN DA, BANDINELLI MG, KIELSE P, FISCHER H. (2015) Rooting potential of mini-cuttings for the production of potato plantlets. **American Journal of Plant Sciences**, v. 06, 366-371,.

BISOGNIN DA, KIELSE P, LENCINA KH, SILVEIRA RT, FLEIG FD, GIMENES ES. Rescue of *Ilex paraguariensis* and *Cabralea canjerana* adult plants by cuttings from post-fire epicormic shoots. **Ciência Rural**, 2016. (no prelo)

- BRONDANI GE, BACCARIN FJB, WIT ONDAS HW de, GONÇALVES AN, ALMEIDA M de (2012a) Avaliação morfológica e produção de minijardim clonal de *Eucalyptus benthamii* em relação a Zn e B. **Pesquisa Florestal Brasileira**, 32, 151-164.
- BRONDANI GE, WENDLING I, BRONDANI AE, ARAUJO MA, SILVA ALL da, GONÇALVES AN (2012b) Dynamics of adventitious rooting in mini-cuttings of *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*. *Acta Scientiarum. Agronomy*, Maringá, 34(2), 169-178.
- COSTA CT da, ALMEIDA MR de, RUEDELL CM, SCHWAMBACH J, MARASCHIN FS, FETT-NETO AG (2013) When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. **Frontiers in Plant Science**, 4, 133.
- DUTRA TR, MASSAD MD, SARMENTO MFQ, OLIVEIRA JC (2012) Ácido indolbutírico e substratos na alporquia de umbuzeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, 42(4), 424-429.
- ELDRIDGE K, DAVIDSON J, HARDWIID C, VAN WYK G. (1994) *Eucalypt* domestication and breeding. (Oxford: Clarendon Press).
- FERREIRA EM, ALFENAS AC, MAFIA RG, LEITE HG, SARTORIO RC, PENCHEL FILHO RM (2004) Determination of the optimum time for rooting of mini-cuttings of *Eucalyptus* spp. clones. **Revista Árvore**, 28(2), 183-187.
- GOULART PB and XAVIER A (2008) Efeito do tempo de armazenamento de miniestacas no enraizamento de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Revista Árvore**, 32(4), 671-677.
- GRAÇA, M. E. C., COOPER, M. A., TAVARES, F. R., CARPANEZZI, A. A. **Estaquia de erva-mate**. Curitiba, EMBRAPA-CNPQ, 1988. 6p. (Circular Técnica, 18).
- GREENWOOD MS and HUTCHISON KW. (1993) Maturation as an developmental process. In: AHUJA, M. R.; LIBBY, W. J. **Clonal forestry: genetics and biotechnology**. Budapest: Springer-Verlag, 14-33.
- GREENWOOD, M. S.; SAM FOSTER, G.; AMERSON, H. V. (1991) Vegetative propagation of Southern pines. **Forest regeneration manual**. (Dordrecht: Kluwer Academic). 75-86.
- HARTMANN HT, KESTER DE, DAVIES JR. FT, GENEVE RL (2011) **Plant propagation: principles and practices**. 8th ed. (Boston: Prentice Hall).
- HUSEN A and PAL, M. (2007) Metabolic changes during adventitious root primordium development in *Tectona grandis* Linn. f. (teak) cuttings as affected by age of donor plants and auxin (IBA and NAA) treatment. **New Forests**, 33, 309-323.
- KIBBLER H, JOHNSTON ME, WILLIAMS RR (2004) Adventitious root formation in cuttings of *backhousia citriodora* F. Muell 1. Plant genotype, juvenility and characteristics of cuttings. **Scientia horticultrae**, Amsterdam, 102, 133-143.

KRAMER PJ and KOZLOWSKI TT (1972) **Fisiologia das árvores**. (Lisboa: Fundação Calourte Gulbenkian).

LI SW, XUE LG, XU SJ, FENG HY, AN LZ (2009) Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. **Botanical Review**, 75, 230-247.

MACCARI, JR. A.; MAZUCHOWSKI, J. Z. **Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate**. Curitiba: Câmara Setorial Produtiva da Erva-Mate do Paraná. 160 p. 2000.

MALAVASI UC (1994) Macropropagação vegetativa em coníferas – perspectivas biológicas e operacionais. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, 1(1), 131-135.

MANKESSI F, SAYA A, BAPTISTE C, NOURISSIER S, MONTEUUIS (2009) O. In vitro rooting of genetically related *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* clones in relation to the time spent in culture. **Trees**, 23, 931-940.

MEIER, A. R.; SAUNDERS, M. R.; MICHLER, C. H. (2012) Epicormic buds in trees: a review of bud establishment, development and dormancy release. **Tree Physiol.** May 32(5):565-84.

MOKOTEDI MEO, WATT MP, PAMMENTER NW, BLAKEWAY FC (2000) In vitro rooting and subsequent survival of two clones of cold-tolerant *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus nitens* Hybrid. **HortScience**, Alexandria, 35(6), 1163-1165.

MOON HK and YI YS (1993) Cutting propagation of *Quercus acutissima* clones after rejuvenation through serial grafting. **Annals of Forest Science**, Les Ulis, 50(1), 314-318.

Oliveira, L. S. DIAS, P. C. ALMEIDA, M. de. Avaliação genética do enraizamento de miniestacas de procedência de *Eucalyptus cloeziana*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 35, n. 84, p. 391-397, 2015.

PEREIRA MO, WENDLING I, NOGUEIRA AC, FILHO ANK, NAVROSKI MC (2015) Resgate vegetativo e propagação de cedro-australiano por estaquia. **Pesq. Agropec. Bras.** 50(4), 282-289.

PICHETH, JATF (1997) **Efeito de soluções alcoólicas do ácido indol-3-butírico no enraizamento de estacas adultas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Dissertação, Ciências Florestais, Universidade Federal do Paraná, UFPR.

RESENDE, M. D. V.; STURION, J. A.; CARVALHO, A. P.; SIMEÃO, R. M.; FERNANDES, J. S. C. **Programa de melhoramento da erva-mate coordenado pela Embrapa: resultados da avaliação genética de populações, progênes, indivíduos e clones**. Colombo: Embrapa Florestas, 2000. 65 p. (Embrapa Florestas. Circular técnica, 43).

SANSBERRO PA, REY HY, MROGINSKI LA, KRIVENKI MA (2001) Plant regeneration from *Ilex spp.* (Aquifoliaceae) in vitro. **Biocell**, 25(2), 139-146.

SILVA ET; BICCA NETO H, FOLTRAN BN. (2007) Materiais de cobertura na produção de mudas de erva-mate (*Ilex Paraguariensis* St. Hill). **Scientia Agraria**, 8(1), 103-109.

SANTIN D, WENDLING I, BENEDETTI EL, BRONDANI GE, REISSMANN DM, ROVEDA LF (2008) Poda e anelamento em erva-mate (*Ilex paraguariensis*) visando à indução de brotações basais. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, 56, 97-104.

SINGH S and ANSARI SA (2014) Mass multiplication of mature trees of *Gmelina arborea* Roxb. through ex vitro rooting of rejuvenated bud sprouts. **Research Journal of Forestry**, 8, 25-31.

STURION J. A.; RESENDE, M. D. Programa de melhoramento genético da erva-mate no centro nacional de pesquisa de florestas da Embrapa. In. CONGRESSO SUL AMERICANO DA ERVA-MATE, 1; REÚNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 2, 1997, Curitiba. **Anais**. Colombo: Embrapa- CNPF, 1997. P. 285-297. (Embrapa- CNPF. Documentos, 33).

WENDLING I, BRONDANI GE, BIASSIO A, DUTRA LF (2013) Vegetative propagation of adult *Ilex paraguariensis* trees through epicormic shoots. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, 35(1), 117-125.

WENDLING I, DUTRA LF, GROSSI F (2007) Produção e sobrevivência de miniestacas e minicepas de erva-mate cultivadas em sistema semi-hidropônico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 42(2), 289-292.

WENDLING I, DUTRA LF, HOFFMANN HÁ, BETTIO G, HANSEL F (2009) Indução de brotações epicórmicas ortotrópicas para a propagação vegetativa de árvores adultas de *Araucaria angustifolia*. **Agronomía Costarricense**, San José, 33, 309-319.

WENDLING, I.; PAIVA, H. N. & GONÇALVES, W. (2005) Técnicas de produção de mudas de plantas ornamentais. Viçosa, MG: **Aprenda Fácil**, 3, 223.

WENDLING I, TRUEMAN SJ, XAVIER A (2014) Maturation and related aspects in clonal forestry - Part I: concepts, regulation and consequences of phase change. **New Forest**, West Lafayette, 45, 449-471.

WENDLING I and XAVIER A (2001) Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado em espécies florestais. **Floresta e Ambiente**. 8(1), 187-194.

XAVIER A and SILVA RL (2010) Evolução da silvicultura clonal de Eucalyptus no Brasil. **Agronomía Costarricense**, San José, 34(1), 93-98.

XAVIER A, WENDLING I, SILVA RL (2013) **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. 2. ed. (UFV: Viçosa, Minas Gerais).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, quanto o aperfeiçoamento do método de extração dos compostos fenólicos totais, flavonoides e para a ação antioxidante pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP, fazendo o uso de uma tecnologia alternativa, que é o caso do ultrassom, foi observado que a condição ideal ocorre na utilização do solvente extrator hidroetanólico 70 % acidificado a 1%, submetido ao banho ultrassônico por 15 min. seguido de 30 min. de agitação mecânica. Sendo assim, foi possível definir uma técnica que utiliza solvente menos agressivo ao meio ambiente, de baixo custo e de fácil operação, com potencial para gerar dados de relevância direta na seleção de genótipos com maiores teores desses compostos.

Os compostos fenólicos totais e os flavonoides estão altamente correlacionados entre si e com a capacidade antioxidante em erva-mate, especialmente quando determinado pelo método FRAP. Isso indica que os compostos fenólicos presentes em folhas de erva-mate são, em sua maioria, flavonoides que estão associados à capacidade antioxidante, principalmente quando quantificada pelo método FRAP. Portanto, esse é o método mais indicado para a determinação da ação antioxidante em folhas de erva-mate.

Ao utilizar esse novo método de extração em diferentes plantas em produção de erva mate, foi possível caracterizar a existência da grande variação dos teores de compostos fenólicos totais, flavonoides e da capacidade antioxidante pelo método de FRAP entre as plantas. Estes compostos são correlacionados positivamente entre si e com o pH e a disponibilidade de fósforo e o zinco no solo, indicando a adaptação genética da espécie a solos ácidos e de baixa fertilidade. Com isso é possível afirmar que, por meio da seleção de plantas, podem ser identificados genótipos superiores para caracteres fitoquímicos possibilitando estabelecer estratégias racionais na formação de novos plantios, atendendo o padrão de qualidade para a exploração da erva-mate como produto nutracêutico.

O resgate de plantas adultas de erva-mate pode ser realizado por meio da estaquia de brotações adventícias, identificando plantas com competências ao enraizamento adventício das estacas. Aos 60 dias de cultivo em câmara úmida obtém-se o percentual máximo de enraizamento das estacas e aos 90 dias se configura o tempo ótimo de permanências das estacas em câmara úmida. A utilização do AIB promove o aumento da porcentagem de enraizamento, facilitando o resgate de plantas adultas de erva-mate. A planta matriz afeta a sobrevivência das estacas e a competência ao enraizamento, além de alterar o efeito de posição de coleta das brotações, possibilitando identificar plantas com capacidade de enraizamento de brotações epicórmicas, e assim, maximizar a produção de propágulos de uma

mesma matriz. Salienta-se que as estratégias utilizadas no presente estudo demonstram que é possível identificar plantas matrizes com maior competência ao enraizamento adventício, compondo os critérios de seleção para o resgate de plantas adultas.

A definição de um método de extração eficiente para a quantificação dos teores de compostos fitoquímicos em erva-mate e, o mesmo, utilizado na caracterização de genótipos, aliado as técnicas da propagação vegetativa que permitem identificar genótipos com competência ao enraizamento adventício certamente se tornarão ferramentas indispensáveis para a identificação e seleção de plantas que atendam as necessidades do setor ervateiro. No entanto, estudos adicionais devem ser realizados quanto à herdabilidade dos caracteres fitoquímicos e os fatores que influenciam seus teores na espécie de interesse, e assim, quantificar o ganho de seleção que compõe as estratégias de um programa de melhoramento de plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, A. E.; ROOZEN, J. P. Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. **Food Chemistry**, v. 64, p. 323-329, 1999.

ALBUQUERQUE, U. P; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.678-689, 2006.

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa, MG: Ed da UFV, 2009. 500 p.

ALVES, T. M. A; SILVA, A. F; BRANDÃO, M; GRANDI, T. S. M; SMÂNIA, E. F. A; SMÂNIA JR. A; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, p. 367-373, 2000.

ANDRADE, F. M. **Diagnóstico da cadeia produtiva de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. São Mateus do Sul-PR: Consultoria, 1999. 92p.

Anuário Brasileiro da erva-mate. Santa Cruz do Sul: Gazeta Grupo de comunicações, 1999.

ARCHIVIO, M. D; FILESI, C; BENEDETTO, R. D; GARGIULO, R; GIOVANNINI, C; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali del'Instituto Superiore di Sanità**, v.43(4); p.348-361, 2007.

ASPÉ, E; FERNÁNDEZ, K. The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata* Bark. **Ind Crop Prod**, v.34 (1); p.838-844. 2011.

ATHAYDE, M. L.; COELHO, G. C.; SCHENKEL, E. P. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 853-857, 2000.

BASTOS, M. D. H. et al. Yerba mate: Pharmacological properties, research and biotecnology. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, v. 1, p. 37-44, 2007.

BERTI, C. L. F. **Variação genética, herdabilidades e ganhos na seleção para caracteres de crescimento e forma, em teste de progênes de polinização aberta de *Eucalyptus cloeziana*, aos 24 anos de idade em Luiz Antônio – SP**. 2010. 79 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – SP.

BIASI.B. de; GRAZZIOTIN, N.A.; HOFMANN JÚNIOR, A.E. Atividade antimicrobiana dos extratos de folhas e ramos da *Ilex paraguariensis* St. Hil., Aquifoliaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 19; n.2b, 2009.

BISOGNIN, D. A. Breeding vegetatively propagated horticultural crops. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Brazilian Society of Plant Breeding, v.1, p. 35-43, 2011.

BOGUSZEWSKI, J. H. **Uma história cultural da erva-mate: o alimento e suas representações**. 2007. 130f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

BRAGA, F. C de. Pesquisa Fitoquímica. In: Leite, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. 1. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2009, 328p.

BRAVO, L.; MATEOS, R.; SARRIÁ, B.; BAEZA, G.; LECUMBERRI, E.; RAMOS, S.; GOYA, L. Hypocholesterolaemic and antioxidante effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in high-cholesterol fed rats. **Fitoterapia**, v.92, p.219-229, 2014.

BRUULSEMA, T. W; PALIYATH, G; SCHOFIELD, A; OKE, M. Phosphorus and phytochemicals. **Better Crops**, v. 88, n.2; p. 6-8, 2004.

BUENO, L. C. S.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, S. P. **Melhoramento genético de plantas: princípios e procedimentos**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 319 p.

BUSSI, C.; BESSET, J.; GERARD, T. Effects of fertilizer rates and dates of application on apricot (cv. Bergeron) cropping and pitburn. **Science Horticultural**, v.98; p. 139-147, 2003.

CANUTO, D. S. de. O. **Diversidade genética em populações de *Myracrodruon urundeuva* (F.F. & M.F. Allemão) utilizando caracteres quantitativos**. 2009. 113f. Tese. (Doutorado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista – SP.

CARDOSO-JÚNIOR, E. L.; FERRARESE-FILHO, O.; CARDOSO-FILHO, L.; FERRARESE, M. L. L.; DONADUZZI, C. M.; STURION, J. A. Methylxanthines and phenolic compounds contents in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**. V. 20; p. 1-10, 2007.

CARRIJO, P.R.M.; BOTREL, M.C.G.; FAGUNDES, R.S. Avaliação da distribuição da normalidade dos dados do diâmetro à altura do peito em florestas de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden na região de Cascavel – PR. **Cultivando o Saber Cascavel**, v.1(1); p.95-106, 2008.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, v. 1, 2003. 1039 p.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G. de; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 441-449, 2007.

CEVALLOS-CASALS, B., BYRNE, D., OKIE, W.R., CISNEROS-ZEVALLOS, L. Selecting new peach and plum genotypes rich in phenolic compounds and enhanced functional properties. **Food Chem**. V.96; p.273–280. 2005.

CHEN, F.; SUN, Y.; ZHAO, G.; XIAOJUN, L.; HU, X.; WU, J.; WANG, Z. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 14, p. 767- 778, 2007.

CRUZ, C.D. **Princípios de genética quantitativa**. 2 ed. Viçosa, MG: UFV, 2005. 394p.

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

DEDECEK, R. A. Manejo de Solos Florestais. In: CONGRESSO SUL-AMERICANODA ERVA-MATE, REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 2, 1997, Curitiba. **Anais...Curitiba**, 1997. p. 317–336.

DONADUZZI, C. M.; CARDOZO JÚNIOR, E. L.; DONADUZZI, E. M.; MANFIO, J. L. Avaliação da presença de contaminantes microbiológicos em amostras de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) comercializadas em embalagens de papel e laminados. In: 3º CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE: 1 Feira do Agronegócio da Erva-Mate, **Anais...** Disponível em CD-ROM. 2003.

DUDA, L. L. **Seleção Genética de Árvores de *Pinus Taeda* L. na Região de Arapoti, Paraná**. 2003. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Paraná, UFPR.

ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARDWOOD, C. & VAN WYK, G. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Clarendon Press, 1994, p. 228 - 246.

ENDRES, L. et al. Enraizamento de estacas de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam) tratadas com ácido indol butírico e ácido naftaleno acético. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 886-889, 2007.

ESCARPA, A.; GONZALES, M. C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.31; p.57-119, 2001.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. (Eds). **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas. 2005. 221 p.

FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa: UFV, 1987. 279 p.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. 4th ed. Essex: Longman, 1996. 464 p.

FERRARI, M. P.; GROSSI, F.; WENDLING, I. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Colombo: Embrapa Florestas - CNPF, 2004. 22 p. (Documentos, n.94).

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 163-168, 1997.

FILGUEIRAS, A. V; CAPELO, J. L; LAVILLA, I; BENDICHO, C. Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v.53; p.433–441. 2000.

FILIP, R. et al. Mate (*Ilex paraguariensis*). In: IMPERATO, F. (eds), **Recent advances in Phytochemistry**. Research Signpost: Kerala, 2009, 113p.

FLORIANO, E. P. **Produção de mudas clonais por via assexuada**. Santa Rosa: [s.n.], 2004. 37 p. (Caderno Didático, 3).

FOGLIO, M.A et al. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. 2006. In: Construindo a História dos Produtos Naturais. **MultiCiência**. CPQBA/UNICAMP.

FOWLER, J. A. P.; STURION, J. A. **Aspectos da formação do fruto e da semente na germinação de erva-mate**. Colombo: Embrapa Florestas, 2000. 5 p. (Comunicado Técnico, 45).

GALANAKIS, C. M.; TORNBERG, E.; GEKAS, V. Recovery and preservation of phenols from olive waste in ethanolic extracts. **J Chem Technol Biot**, v.85; p.1148–1155. 2010.

GAO, H.; LONG, Y.; JIANG, X.; LIU, Z.; WANG, D.; ZHAO, Y.; LI, D.; SUN, B. Beneficial effects os yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on hyperlipidemia in high-fat-fed hamsters. **Experimental Gerontology**, v.48, p.572-578, 2013.

GASPARRI, S. **Estudo das atividades antioxidante e mutagênica/antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal de *Costus spicatus***. 2005. Dissertação Universidade Luterana do Brasil, Mestrado - Diagnóstico Genético e Molecular, Canoas, 2005.

GNOATTO, S. C. B.; SCHENKEL, E. P.; BASSANI, V. L. HPLC method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. **Journal of the Brazilian Chemical Society**., v. 16, p. 723-726, 2005.

GONZÁLEZ-GALLEGO, J; GARCÍA-MEDIAVILLA, V; SÁNCHEZ-CAMPOS, S; TUÑÓN, M. J. Fruit polyphenols, immunity and inflammation. **The British Journal of Nutrition**, v.104(3); p.15-27, 2010.

GOVERNO DO PARANÁ. Parque Histórico do Mate. Disponível em: <<http://www.museuparanaense.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=59>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

GRAÇA, M. E. C.; TAVARES, F. R.; RODIGHERI, H. R.; COOPER, M. A. **Produção de mudas de erva-mate por estaquia**. Curitiba: Embrapa Florestas – EMATER, 1990. 20p.

HACKETT, W. P. Donor plant maturation and adventitious root formation. In: DAVIES, T. D., HAISSIG, B. E., SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1987b. p. 11-28.

HACKETT, W. P. Juvenility and maturity. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Kuwer Academic, 1987a. p.216-231.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.C. **Free radical in biology and medicine**. 3 rd. ed. Oxford, New York, 2000.

- HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. In: SCHONE-WALD-COX, C. M.; CHAMBERS, S. H.; MacBYDE, B.; THOMAS, L. **Genetics and conservation**. Menlo Park: Benjamin Cummings, p. 335-348. 1983.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR, F. T.; GENEVE, R. L. **Hartmann and Kester's Plant propagation: principles and practices**. 8th ed. Boston: Prentice Hall, 2011. 928p.
- HASLAM, E. Oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. **Phytochemistry**, Oxford, v. 19, p. 2577-2592, 1980.
- HECK, C. I.; MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 138-151, 2007.
- HERRERO, M.; PLAZA, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p. 2512–2520, 2010.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. I. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1881-1856, 2005.
- HUANG, L.; CHIU, D.; MURASHIGE, T.; GUNDY, R.; MAHDI, E. L. F. M.; NAGAI, K.; PLIEGO-ALFARRO, F. Rejuvenation of trees and other perennials for restoration of plant regeneration competence. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos em plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.252 - 264.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura 2011**. Rio de Janeiro. V. 26, 2011.
- JAPÓN-LUJÁN, R.; LUQUE-RODRÍGUEZ, J. M.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. **Journal of Chromatography A**, v.1108, p.76–82, 2006(a).
- JAPÓN-LUJÁN, R.; LUQUE-RODRÍGUEZ, J. M.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Multivariate optimisation of the microwave-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.385, p. 753–759, 2006(b).
- KIELSE, P. et al. Produção e enraizamento de miniestacas de louro-pardo - *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrab. ex Steud. coletadas de minicepas de origem assexuada e seminal. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 7, p. 1164-1166, July 2015.
- KIM D; JEOND S; LEE C. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chem.**, v.81; p.321-326. 2003.

LEE, T.T.; STARRATT, A.N. Inhibition of conjugation of indole-3-acetic acid with amino acids by 2,6-dihydroxyacetophenone in *Teucrium canadense*. **Phytochemistry**, Oxford, v.25, n.11, p.2457-2461. 1986.

LEE, T.T.; STARRATT, A.N.; JEVNIKAR, J.J. Effect of 3,4-dihydroxyacetophenone and some related phenols on the peroxidase-catalysed oxidation of indole-3-acetic acid. **Phytochemistry**, Oxford, v.20, n.9, p.2097-2100. 1981.

LEITE, J. P. V. **Química dos produtos naturais: Uma abordagem Biossintética**. In: LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. 1. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2009, 328p.

LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Distribucion de la variacion en espécies de arboles tropicales. **Revista Biología Tropicales**, v.35, n.1, p. 165-75, 1987.

MACCARI, JR. A.; MAZUCHOWSKI, J. Z. **Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate**. Curitiba: Câmara Setorial Produtiva da Erva-Mate do Paraná. 160 p. 2000.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3. 2002.

MAJCHRZAK, D; MITTER, S; ELMADFA, I. The effect of ascorbic acid on total antioxidant activity of black and green teas. **Food Chemistry**, v.88(3); p.447–451, 2004.

MARTINEZ-FLORES, S; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M; TUNÓN, M. J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, v. XVII, n. 6, p. 271-278, 2002.

MARTINS, J.V. **Variabilidade genética de procedências e progênes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. 33f. 2009. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal). Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, 2009.

MATTOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997, 141p.

MAZUCHOWSKI, J. Z. **Manual da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Curitiba: EMATER-PR, 1991. 104 p.

MEDRADO, M. J. **Trabalhos no cultivo de plantas industriais – erva - mate: produção**. Curitiba: SENAR-PR, 2004.

MEDRADO, M.J.S. LOURENÇO, R.S; RODIGHERI, H.R, DEDECEK, R.A, PHILIPOVSKY, J.F e CORREA, G. **Implantação de ervais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2000.

MEJÍA, G. E. et al. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 1, p. 23-34, 2010.

- MELO, L.A. **Seleção e resgate de árvores superiores de Candeia** (*Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish). 2012.165 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- MELO, E. A.; GUERRA, N. B. **Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos**. Boletim da SBCTA, v. 36, p. 1-11, 2002.
- MERCOMATE. **Economia ervateira no MERCOSUL**. Comitê de Cooperação Técnica. Agência Brasileira de Cooperação do Ministério das Relações Exteriores. Brasília, 1993.10 p.
- MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarín Journal of Science and Technology**. v. 26(2); p.211-219. 2004.
- MORAIS, E.C. et al. Consumption of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**. v. 57, p. 8316–8324, 2009.
- MUSTAFA, A.; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Anal. Chim. Acta**. v. 703, p.8– 18. 2011.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **J. Chromatogr. A**, v. 1054, p. 95-111. 2004.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1523-1542, 2006.
- NEVES, T. S. et al. Enraizamento de corticeira-da-serra em função do tipo de estaca e variações sazonais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1699-1705, 2006.
- OLIVEIRA, M. C. de; RIBEIRO, J. F.; RIOS, M. N. da S. **Enraizamento de estacas para a produção de mudas de espécies nativas de mata de galeria**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2001. 4 p. (Recomendação técnica, 41).
- OLIVEIRA, Y. M. M. de; ROTTA, E. Área de distribuição geográfica nativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, 10; Silvicultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), 1985, Curitiba. **Anais...** Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, 1985. p.17-36. (EMBRAPA-CNPQ. Documentos, 15).
- PASINATO, R. **Aspectos etno entomológicos, socioeconômicos e ecológicos relacionados à cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis*), no município de Lontra, Paraná, Brasil**. Dissertação de Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- PÉRES, V. F; SAFFI, J; INÊS, M; MELECCHI, S; ABAD, F. C; JACQUES, R. A; MARTINEZ, M; OLIVEIRA, E. C; CARAMÃO, E. B. Comparison of Soxhlet, ultrasound-

assisted and pressurized liquid extraction of terpenes: fatty acids and vitamin e from *Piper gaudichaudianum* Kunth. **J. Chromatogr. A**, v. 1105, p. 115–118. 2006.

PINTO JUNIOR, J. E. **REML/BLUP para a análise de múltiplos experimentos no melhoramento genético de *Eucalyptus grandis* ex Maiden**. 2004. 112f. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR.

PRIOR, R. L.; CAO, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, p. 1173-1181, 1999.

PRIOR, R. L; CAO, G; MARTIN, A; SOFIC, E; MCEWEN, J; O'BRIEN, C; LISCHNER, N; EHLENFELDT, M; KALT, W; KREWER, G; MAINLAND, C. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. **J. Agr. Food Chem.** V.46; p.2686–2693. 1998.

QUADROS, K. M. **Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire – Aquifoliaceae)**. 69 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

RANGEL, P.H.N.; PEREIRA, J.A.; MORAIS, O.P.; GUIMARAES, E.P.; YOKOKURA, T. Ganhos na produtividade de grãos pelo melhoramento genético do arroz irrigado no Meio-Norte do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 8, p. 1595-1604. 2000.

REIS, E.F. **Ganhos preditos e realizados, por diferentes estratégias de seleção, em populações de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 2000. 120 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Erva-mate**. In: Projeto madeira do Rio Grande do Sul. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1983. p.284-292.

REITZ, R; EDWIN, G. **Aquifoliaceae**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1967. 47p.

RESENDE, P. et al. Influence of crude extract and bioactive fractions of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (yerba mate) on the Wistar rat lipid metabolism. **Journal of Functional Foods**, [s.l.], v. 15, p.440-451, 2015.

REYNERSTON, K. A. et al. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v. 109, p. 883-890, 2008.

RIBANI, R. H. et al. Avaliação de dispersões coloidais de extrato solúvel de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Anais... 5º Congresso Sudamericano de La Yerba Mate**. Posadas: Argentina, 2011.

RODRIGUEZ-ROJO, S.; VISENTIN, A.; MAESTRI, D.; COCERO, M. J. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. **Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 98–103, 2012.

ROSSMANN, H. **Estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos de uma população de soja avaliada em quatro anos**. Piracicaba, 2001. 80p. Dissertação (Mestrado em Genética e

Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

RUCKER, N. G. A; MACARI, JR.; ROCHA JR., W. F. **Agronegócio da erva-mate no estado do Paraná**: diagnóstico e perspectivas para 2003. In: Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado do Paraná.

SANTOS, K. A. **Estabilidade da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) em embalagens plásticas**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

SARGENTI, S. R.; VICHNEWSI, W. Sonication and liquid chromatography as a rapid technique. for extraction and fractionation of plant material. **Phytochemical Analysis**, v.11, n.2, p.69-73. 2000.

SCHEFFER, M.C. Roteiro para estudos de aspectos agronômicos das plantas medicinais selecionadas pela fitoterapia do SUS-PR/CEMEPAR. **SOB Informa**, v. 11, n. 1, 1990.

SEBBENN, A.M.; SIQUEIRA, A.C.M.F.; VENCOSVSKY, R.; MACHADO, J.A.R. Interação genótipo x ambiente na conservação “ex-situ” de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub., em duas regiões do estado de São Paulo. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.11, n.1, p.75-89, 1999.

SHIMIZU, J. Y., KAGEYAMA, P. Y.; HIGA, A. R. **Procedimentos e recomendações para estudos de progênies de essências florestais**. Colombo: EMBRAPA-URPFCS, 1982. 33 p. (EMBRAPA-URPFCS. Documentos, 11).

SILVA, E. M.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. **Sep. Purif. Technol.** v. 55, p. 381-387. 2007.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. 1102p.

SMART, D. R. et al. Dormant buds and adventitious root formation by *Vitis* and other woody plants. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 21, p. 296-314, 2003.

SOEJARTO, D. D; KINGHORN, A. D; FARNSWORTH, N. R. Ethnobotanical approach in the pharmacognostic evaluation of medicinal plants. **Folha Med.** V.2; p.137-148. 2001.

SOUZA JR, C. L. Cultivar development of allogamous crops. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, S1, p. 8-15, 2011.

SUN, Y. J; MA, G. P; YE, X. Q; KAKUDA, Y; MENG, R. F. Stability of all-trans- β -carotene under ultrasound treatment in a model system: Effects of different factors, kinetics and newly formed compounds. **Ultrason Sonochem.** V.17; p.654–661. 2010.

SUN, Y; LIU, Z; WANG, J. Ultrasound-assisted extraction of five isoflavones from *Iris tectorum* Maxim. **Sep. Purif. Technol.** v. 78, p. 49–54. 2011.

VALDUGA, E., **Caracterização química e anatômica da folha de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) e de espécies utilizadas na adulteração do mate.** Dissertação de Mestrado em Tecnologia Química, Universidade Federal do Paraná (UFPR), 1994.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 496 p.

VENCOVSKY, R. Genética quantitativa. In. KERR, W. E. (org.) - **Melhoramento e Genética**, São Paulo, Melhoramentos, 1969. p. 17-28.

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

WENDLING, I.; PAIVA, H. N.; GONÇALVES, W. **Técnicas de produção de mudas de plantas ornamentais.** Viçosa, MG: Aprenda Fácil, v. 3, 223 p. 2005.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado em espécies florestais. **Floresta e Ambiente.** v. 8, n. 1, p. 187-194, 2001.

WENDT, J. G. N.; FRIEDRICH, F. **Diagnóstico do Setor Ervateiro na 26 Secretaria de Desenvolvimento Regional (SDR) do estado de Santa Catarina.** Floresta, Curitiba, PR, v. 40, n. 3, p. 555-558. 2010.

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

XYNOS, N.; PAPAEFSTATHIOU, G.; PSYCHIS, M.; ARGYROPOULOU, A.; ALIGIANNIS, N.; SKALTSOUNIS, A. L. Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 67, p. 89– 93, 2012.

ZOBEL, B.; TALBERT, J. **Applied forest tree improvement.** New York, North Carolina State University, 1984. 505 p.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O. [et al.] (organizadores). **Farmacognosia da planta ao medicamento.** 5.ed. ver. ampl. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2003.