

3.16- PARÂMETROS GENÉTICOS DOS TEORES DE METILXANTINAS EM PROGÊNIES DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) CULTIVADAS NO BRASIL.

G. H. Cassol⁵⁶; J. C. Friedrich¹; E. L. Cardozo Junior¹; C. M. Donaduzzi¹; J. A. Sturion²; O. Ferrarese-Filho⁵⁷; M. Mitsui³; L. Cardozo Filho⁴.

Resumo

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) tem sido consumida tradicionalmente em todo o Cone Sul da América Latina como bebida estimulante para reduzir a fadiga e suprimir o apetite. Considerando a importância das propriedades da erva-mate, este trabalho teve como finalidade analisar teores de cafeína e teobromina presente nas folhas de erva-mate. A concentração de cafeína e teobromina foi avaliada em cinquenta e uma progênies de erva-mate, oriundas de cinco procedências distintas (Pinhão/PR, Ivai/PR, Barão de Cotegipe/RS, Cascavel/PR e Quedas do Iguaçu/PR), cultivadas na região de Ivai/PR - Brasil. Os compostos foram avaliados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os resultados revelaram diferenças estatísticas nos teores de cafeína e teobromina, sendo que os valores mínimos e máximos encontrados foram de 0,107-1,542% para cafeína e 0,055-0,943% para teobromina. Observou-se que os valores encontrados para cafeína e teobromina foram inversamente proporcionais. Diferenças significativas destes compostos foram constatadas nas progênies de erva-mate, com relação às procedências. Foram encontrados valores elevados de herdabilidade e do coeficiente de variação genética aditiva.

Palavras-Chave: *Ilex paraguariensis*; erva-mate; metilxantinas; cafeína; teobromina.

GENETIC PARAMETERS OF METHYLXANTHINES CONTENTS IN MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) PROGENIES GROWN IN BRAZIL

Abstract

Mate has long been a part of South Cone of Latin America culture where it is traditionally consumed as tonic and as stimulant to reduce fatigue and to suppress appetite. Considering the importance of the properties of mate, this paper aimed to analyze caffeine and theobromine contents in mate leaves (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). The concentration of these methylxanthines was evaluated in fifty-one progenies, from five distinct origins (Pinhão/PR, Ivai/PR, Barão de Cotegipe/RS, Cascavel/PR and Quedas do Iguaçu/PR), cultivated in Ivai/PR - Brazil. The compounds were evaluated by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The results revealed statistical differences in caffeine and theobromine contents, with the minimum and maximum values found 0,107-1,542% for caffeine and 0,055-0,943% for theobromine. Significant differences of these compounds were evidenced in the progenies of mate, with regard to the origin. The values of heritability and the additive genetic variance coefficient were high.

Key Words: *Ilex paraguariensis*; mate; methylxanthines, caffeine; theobromine.

Introdução

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) é explorada comercialmente pela sua capacidade de produzir bebidas tônicas e estimulantes, sendo seu consumo um hábito característico da população do Cone Sul da América Latina. Uma noção de todo o potencial da planta como alimento, ou na produção destes, é obtida através da composição química da erva-mate. Os componentes presentes possuem muitas aplicações, como nutrientes e atuando no metabolismo humano. Importantes propriedades biológicas têm sido associadas a esta espécie como a atividade antioxidante (Schinella *et al.*, 2000; Gugliucci, 1996), eupéptica e colerética (Gorzalczany *et al.*, 2001).

⁵⁶ Universidade Paranaense – UNIPAR – Av. Parigot de Souza, 3636, Jd. Prada, Toledo-Paraná-Brasil, Telefone (045) 3277-8500; euchdesle@unipar.br.

² FMBRAPA – Florestas – Estrada da Ribeira, Km 111, CP 319, 83411-000, Colombo/PR – Brasil.

¹ Prati, Donaduzzi & Cia Ltda – Rua Mitsugoro Tanaka, 145, C. I. Nilton Arruda, 85903-630, Toledo/PR – Brasil.

⁴ Universidade Estadual de Maringá – UEM – Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá/PR – Brasil.

Análises da composição química do gênero *Ilex*, que inclui cerca de 400 espécies nativas principalmente da Ásia e América do Sul, demonstraram a presença de polifenólicos e ácidos fenólicos, metilxantinas, aminoácidos e outros compostos nitrogenados, ácidos graxos, antocianinas, flavonóides, compostos terpênicos, alcanos e álcoois, carboidratos, vitaminas e carotenóides. Dentre estes compostos, os mais conhecidos são as metilxantinas cujos estudos iniciais remontam ao final do século XIX (Alikaridis, 1987). A principal metilxantina encontrada na erva-mate é a cafeína (0,89 a 1,73%), seguida da teobromina (0,26 a 0,88%) e de pequenas quantidades de teofilina (Clifford e Ramirez-Martinez, 1990; Maccari Junior, 2000).

Tem sido sugerido que a biossíntese de cafeína, nas folhas de erva-mate, ocorre somente em tecidos novos, sendo as vias biossintéticas semelhantes àsquelas de plantas como o chazeiro e o café (Suzuki *et al.*, 1992). Além disso, tem sido amplamente aceito que a síntese a partir de nucleotídeos da adenina é a rota mais importante (Ashihara, 1993). Sua biossíntese ocorre via xantosina → 7-metilxantosina → 7-metilxantina → teobromina → cafeína embora outras vias menos importantes possam ocorrer (Ashihara e Crozier, 2001). As metilxantinas acumulam-se tanto intracelularmente quanto na cera epicuticular das folhas de erva-mate (Athayde *et al.*, 2000) e seus teores têm sido relacionados com a variabilidade genética, a influência de variáveis ambientais, a época de colheita e o tipo de processamento. Além disso, os teores variam com a época do ano, sendo menores nos meses de setembro a dezembro (Da Croce, 2002). Diferenças nos conteúdos de cafeína e teobromina também podem ocorrer em função da variedade. Por exemplo, *I. paraguariensis* var. *paraguariensis* contém em média 0,65% de cafeína e 0,12% de teobromina enquanto *I. paraguariensis* var. *vestita* - variedade de erva-mate pubescente de pequena dispersão geográfica nativa do Brasil - contém 0,003% de cafeína e 0,22% de teobromina (Reginatto *et al.*, 1999).

Apesar da importância econômica desta espécie, o melhoramento genético da erva-mate é relativamente recente, tendo-se iniciado nos anos 90 no Brasil pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA (Sturion e Resende, 1997). Neste programa tem-se enfatizado características silviculturais como adaptação, produção de massa verde, resistência a pragas e doenças, desfolhamento e tipo de ramificação ou arquitetura como critérios passíveis de melhoramento (Sturion *et al.* 2003). Na atualidade busca-se incluir no programa de melhoramento desenvolvido pela EMBRAPA, características associadas à qualidade dos produtos da erva-mate. Dentre estas características, o teor de compostos químicos apresenta relevância por influenciar diretamente a qualidade dos produtos comerciais derivados desta espécie e seus efeitos biológicos. Considerando a importância econômica e as propriedades biológicas da erva-mate, este trabalho teve como finalidade analisar os teores de cafeína e teobromina presentes nas folhas de progênies oriundas de cinco procedências e cultivadas na cidade de Ivaí/PR - Brasil. Também buscou-se investigar os parâmetros genéticos relacionados aos compostos químicos, visando o melhoramento genético.

Materiais e Métodos

Condução experimental: As amostras analisadas correspondem a material genético proveniente de cinco procedências de erva-mate cultivadas na localidade de Ivaí/PR (mar/1997), dentro de um teste combinado de procedência e progênie de meios-irmãos (Tabela 1). O delineamento experimental empregado foi o de blocos ao acaso com dez repetições de parcelas lineares com seis plantas por parcela. As progênies foram aleatorizadas independentemente das procedências, ou seja, não se adotou o arranjo hierárquico de progênies dentro de procedência. O espaçamento adotado foi de 3 m x 2 m. A poda de formação foi efetuada por volta de dois anos de idade (jul/1999). Foram executadas duas podas de produção em jul/2001 e ago/2003. As podas para obtenção das amostras foram efetuadas com folhas de um ano (ago/2004), um ano e meio (nov/2004) e dois anos (jun/2005) respectivamente.

As progênies apresentavam-se sob a influência do tipo climático Cfb - clima subtropical úmido mesotérmico. A região apresenta verões quentes e geadas pouco frequentes, com tendência de concentração das chuvas nos meses de verão e sem estação seca definida. A média das temperaturas dos meses mais quentes é superior a 22 °C e a dos meses mais frios é inferior a 18 °C. Temperatura média anual entre 17 °C e 18 °C, precipitação média anual em torno dos 1.500 mm e excedente hídrico variando de 500 a 800 mm (Godoy *et al.*, 1976).

Tabela 1. Localização geográfica das procedências de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) selecionadas para análise dos parâmetros genéticos dos teores de ácido clorogênico e ácido cafeico.

Procedências	Coordenadas		Nº Progênes	
	Lat. (S)	Long. (O)	Alt (m)	
Ivaí/PR	25°01'	50°48'	600	11
Barão de Cotegipo/RS	27°38'	52°23'	530	10
Quedas do Iguaçu/PR	25°25'	52°55'	590	10
Pinhão/PR	25°41'	51°40'	1.050	10
Cascavel/PR	24°57'	53°27'	750	10

Para as análises foram selecionadas 10/11 progênes com maior produção de massa foliar, oriundas das procedências mais produtivas. Cerca de 100g de folhas foram coletadas do terço mediano da planta e enviadas para análise. As coletas foram realizadas no inverno (jun/ago) de 2001, em três blocos e as amostras foram enviadas imediatamente ao laboratório para processamento.

Após a coleta, cada amostra foi submersa em água fervente por 10 segundos. A seguir, foram separadas as folhas verdes, sem manchas e sujidades. As folhas foram secas em estufa com circulação de ar numa temperatura de 45°C por um período de 48 horas. Posteriormente, as folhas foram moídas, acondicionadas em embalagens de papel, envoltas em embalagem plástica e armazenadas em geladeira.

Quantificação de metilxantinas: Após a maceração de 1,0g de cada amostra, extraída com metanol-água (70:30) sendo o volume final completado para 50 mL. A quantificação de cafeína e teobromina foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O cromatógrafo (Shimadzu Mod. SCL-10A) foi equipado com injetor (SIL-10AF), bomba (LC-10 AT), misturador (FCV-10AL), degaseificador (DGL-14^a) e forno (CTO-10AS). Para a separação cromatográfica utilizou-se a coluna C₁₈ (Supelcosil LC-18 - 4,6 x 250 mm, 5 µm). A fase móvel empregada foi um gradiente de (A): água acidificada com 0,3% de ácido acético e (B): metanol. Gradiente: 15% B para 20% B, 20 min; 20% B para 85% B, 5 min; 85% B 5 min. Os solventes utilizados foram da marca J.T.Beacker e Merck. O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min na temperatura constante de 30°C. A detecção foi conduzida a 265 nm num detector ultravioleta UV-Vis (SPD-10A). As amostras foram injetadas em triplicata e as áreas dos picos foram comparadas com padrões de cafeína e teobromina (Sigma Chemical Co, USA).

Curvas de calibração foram efetuadas com os citados padrões após serem diluídos na fase móvel. Após a injeção dos padrões, as áreas dos respectivos picos foram avaliadas. A linearidade foi determinada por regressão e a precisão e acurácia foram determinadas pelo coeficiente de variação (CV < 3%). Os coeficientes obtidos para a regressão foram $R^2 = 0,9999$ para cafeína e $R^2 = 0,9976$ para teobromina.

Análise estatística: Todas as análises foram realizadas em duplicata e os resultados expressos em percentagem sobre a matéria seca (g composto / 100 g matéria seca). Os parâmetros estatísticos foram obtidos com o auxílio do programa estatístico SISVAR versão 4.3, utilizando-se "Análise Conjunta em Blocos ao Acaso" dos experimentos, aplicando-se o teste de agrupamento Scott-Knott a 5 % de significância.

Análise genética quantitativa: As estimativas dos parâmetros genéticos e fenotípicos foram efetuadas através do programa genético-estatístico "Software SELEGEN-REML/BLUP" desenvolvido por Resende (2002). Utilizou-se o Modelo 5 do referido software que inclui experimentos realizados em blocos ao acaso, progênes de meios-irmãos, várias plantas por parcela, várias populações.

Resultados e Discussão

Na Figura 1 é possível visualizar o cromatograma obtido com os padrões analisados em 265 nm. Os tempos de retenção (min.) para os padrões foram de 7,8 (teobromina) e 19,8 (cafeína). Portanto, pode-se constatar que o uso do gradiente permitiu excelente separação e integração dos picos dos dois padrões. Foram encontradas diferenças significativas para os dois compostos. Os resultados nos teores de cafeína e teobromina das cinquenta e uma progênes analisadas estão presentes na Tabela 2, onde os valores representam as médias da determinação de cada progêne.

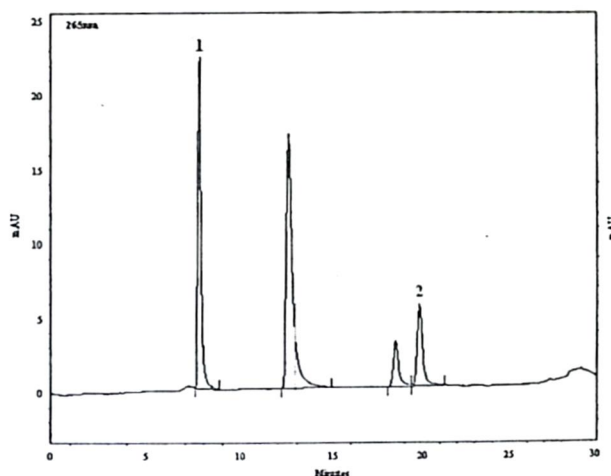


Figura 1. Cromatograma dos padrões de teobromina (1) e cafeína (2). Condições cromatográficas: Coluna: Supelcosil LC-18 - 4,6 x 250 mm, 5 µm. Fase Móvel: Gradiente MeOH : H₂O (AcOH-0,3%). Fluxo: 1,0 mL/min. Temp.: 30°C e Detecção: 265 nm.

Os valores mínimos e máximos encontrados foram de 0,107-1,542% para cafeína e 0,055-0,943% de teobromina. A progênie 106 possui a menor concentração de cafeína enquanto a progênie 1171 apresentou maior concentração deste composto. Para teobromina a progênie 65 apresentou menor concentração e a progênie 121 obteve o maior valor.

Tabela 2. Teores de cafeína e teobromina de cinquenta e uma progênes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Os valores representam as médias das determinações de cada progênie expressos em %.

Progênie	Cafeína	Teobromina	Cafeína/ Teobromina	Progênie	Cafeína	Teobromina	Cafeína/ Teobromina
106	0,107 ^{a1}	0,905 ^{a3}	0,114 ^{a1}	163	1,010 ^{a3}	0,167 ^{a1}	6,627 ^{a2}
25	0,114 ^{a1}	0,318 ^{a1}	0,685 ^{a1}	162	1,021 ^{a3}	0,113 ^{a1}	10,276 ^{a3}
8	0,146 ^{a1}	0,429 ^{a2}	0,423 ^{a1}	155	1,023 ^{a3}	0,138 ^{a1}	8,044 ^{a2}
105	0,170 ^{a1}	0,664 ^{a3}	0,281 ^{a1}	125	1,039 ^{a3}	0,081 ^{a1}	15,030 ^{a3}
102	0,238 ^{a1}	0,699 ^{a3}	0,415 ^{a1}	88	1,047 ^{a3}	0,267 ^{a1}	7,471 ^{a2}
101	0,239 ^{a1}	0,666 ^{a3}	0,557 ^{a1}	80	1,090 ^{a3}	0,187 ^{a1}	8,305 ^{a2}
15	0,311 ^{a1}	0,594 ^{a2}	0,899 ^{a1}	69	1,124 ^{a3}	0,076 ^{a1}	15,957 ^{a1}
121	0,354 ^{a1}	0,943 ^{a3}	0,471 ^{a1}	3	1,147 ^{a3}	0,206 ^{a1}	9,015 ^{a2}
107	0,427 ^{a1}	0,686 ^{a3}	0,821 ^{a1}	1	1,153 ^{a3}	0,143 ^{a1}	11,152 ^{a3}
10	0,435 ^{a1}	0,475 ^{a2}	1,083 ^{a1}	70	1,166 ^{a3}	0,116 ^{a1}	12,762 ^{a3}
110	0,475 ^{a2}	0,457 ^{a2}	1,559 ^{a1}	81	1,172 ^{a3}	0,190 ^{a1}	7,995 ^{a2}
104	0,554 ^{a2}	0,438 ^{a2}	1,569 ^{a1}	87	1,172 ^{a3}	0,176 ^{a1}	9,656 ^{a3}
7	0,666 ^{a2}	0,462 ^{a2}	3,474 ^{a1}	11	1,176 ^{a3}	0,097 ^{a1}	13,731 ^{a1}
51	0,702 ^{a2}	0,116 ^{a1}	7,324 ^{a2}	93	1,184 ^{a3}	0,214 ^{a1}	7,414 ^{a2}
152	0,703 ^{a2}	0,243 ^{a1}	6,720 ^{a2}	165	1,196 ^{a3}	0,185 ^{a1}	6,769 ^{a3}
57	0,723 ^{a2}	0,152 ^{a1}	7,419 ^{a2}	122	1,219 ^{a3}	0,098 ^{a1}	15,515 ^{a1}
4	0,761 ^{a2}	0,420 ^{a1}	2,952 ^{a2}	59	1,260 ^{a3}	0,094 ^{a1}	15,382 ^{a2}
5	0,780 ^{a2}	0,241 ^{a1}	5,544 ^{a2}	151	1,267 ^{a3}	0,171 ^{a1}	7,705 ^{a3}
68	0,835 ^{a3}	0,127 ^{a1}	7,430 ^{a2}	164	1,292 ^{a3}	0,133 ^{a1}	12,281 ^{a3}
65	0,851 ^{a3}	0,055 ^{a1}	14,676 ^{a3}	58	1,334 ^{a3}	0,080 ^{a1}	17,977 ^{a3}
21	0,893 ^{a3}	0,328 ^{a1}	5,459 ^{a2}	86	1,342 ^{a3}	0,152 ^{a1}	11,394 ^{a3}
91	0,912 ^{a3}	0,122 ^{a1}	7,210 ^{a3}	84	1,343 ^{a3}	0,099 ^{a1}	16,044 ^{a2}
61	0,932 ^{a3}	0,095 ^{a1}	11,839 ^{a2}	53	1,360 ^{a3}	0,284 ^{a1}	6,903 ^{a3}
100	0,956 ^{a3}	0,178 ^{a1}	5,636 ^{a2}	159	1,386 ^{a3}	0,104 ^{a1}	14,415 ^{a3}
157	1,010 ^{a3}	0,087 ^{a1}	13,479 ^{a3}	92	1,443 ^{a3}	0,096 ^{a1}	16,324 ^{a3}
				171	1,542 ^{a3}	0,285 ^{a1}	7,714 ^{a2}

Valores com mesma notação na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de agrupamento de Scott-Knott ($\alpha = 0,05$).

A análise da variância dos teores de cafeína e teobromina nas progênies de erva-mate resultou em três grupamentos distintos quando compararam-se as cinco procedências analisadas. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 3 e demonstram que progênies oriundas de Pinhão/PR apresentaram menor teor de cafeína e maior teor de teobromina em relação às demais procedências. As progênies oriundas de Ivaí/PR diferiram estatisticamente das demais, apresentando teores intermediários de cafeína e teobromina. Já as progênies originárias de Barão de Cotegipe/RS, Cascavel/PR e Quedas do Iguaçu/PR, apresentaram maior teor de cafeína e menor teor de teobromina.

Tabela 3. Teores de cafeína e teobromina de cinco procedências de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Os valores representam as médias das determinações de cada procedência expressos em %.

Procedências	Cafeína	Teobromina
Pinhão/PR	0.482 ^{a1}	0.564 ^{a3}
Ivaí/PR	0.689 ^{a2}	0.338 ^{a2}
Barão de Cotegipe/RS	1.029 ^{a3}	0.119 ^{a1}
Cascavel/PR	1.145 ^{a3}	0.162 ^{a1}
Quedas do Iguaçu/PR	1.166 ^{a3}	0.168 ^{a1}

Valores com mesma notação na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de agrupamento de Scott-Knott ($\alpha = 0,05$).

Desta forma, pode-se dizer que os valores médios encontrados para cafeína e teobromina nas cinco procedências são inversamente proporcionais, com o aumento da concentração de cafeína nestas progênies, observa-se uma queda da concentração da teobromina. Na Tabela 4 observa-se os valores relacionados aos parâmetros genéticos, o qual afeta diretamente no teor de metilxantinas presentes em erva-mate. A partir dos resultados demonstrados nesta tabela, observam-se altos valores de herdabilidade para cafeína e teobromina.

Tabela 4. Parâmetros genéticos estimados para cafeína e teobromina em progênies de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.).

Parâmetros Genéticos	Cafeína	Teobromina
Va	0,277	0,064
V _{parc.}	0,022	0,012
V _{proc}	0,080	0,031
h ² a	0,650 ± 0,214	0,550 ± 0,205
c ² _{parc}	0,091	0,142
c ² _{proc}	0,281	0,371
Cv _{gi}	38,91	68,05
CV _{gp}	29,03	46,77
Cv _e	23,10	47,03

Va = Variância Genética Aditiva; V_{parc.} = Variância Ambiental entre Parcelas; V_{proc} = Variância Ambiental entre Procedências; h²a = Herdabilidade Individual; c²_{parc} = Coeficiente de determinação dos efeitos da parcela; c²_{proc} = Coeficiente de determinação dos efeitos da procedência; CV_{gi} = Coeficiente de variação genética aditiva de indivíduos; CV_{gp} = Coeficiente de variação genética aditiva de progênies; Cv_e = Coeficiente de Variação Experimental.

Os valores elevados de herdabilidade para cafeína (h²a de 0,650 ± 0,214) e para teobromina (h²a de 0,550 ± 0,205) demonstram que estas características apresentam alto controle genético nas condições avaliadas. Valores elevados de herdabilidade para teor de cafeína também foram encontrados em progênies de erva-mate na região de Missiones/AR (Scherer *et al.*, 2002). Os mesmos autores apresentam valores de herdabilidade no sentido restrito para teobromina abaixo do encontrado neste trabalho. Os valores encontrados para a cafeína e teobromina sugerem que esforços para a seleção de indivíduos baseados nestas características são bastante promissores em erva-mate.

Conclusões

Ocorreram diferenças significativas nos teores de cafeína e teobromina em relação às progênies e também nas cinco procedências analisadas. Foram encontrados altos valores para herdabilidade e para o coeficiente de variação genética aditiva.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Eng. Agr. Dalnei Neiverth e Sr. Afonso Oliszeski da Neiverth & Cia Ltda - Chimarrão Bitumirim - de Ivai/PR pela cessão de área física, colaboração na instalação, condução e avaliação dos testes combinados de procedência e progênie de erva-mate. Também agradecem ao Laboratório Pratti, Donaduzzi Ltda pela disponibilidade do HPLC.

Referências Bibliográficas

- Alikaridis, F. Natural constituents of *Ilex* species. In: Journal of Ethnopharmacology 20:121-144, 1987.
- Ashihara, H. Purine metabolism and the biosynthesis of caffeine in mate leaves. In: Phytochemistry 33:1427-1430, 1993.
- Ashihara, H., Crozier, A. Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. In: Trends in Plant Science 6:407-413, 2001.
- Athayde, M. L., Coelho, G. C., Schenkel, E. P. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. In: Phytochemistry 55:853-857, 2000.
- Clifford, M. N., Ramirez-Martinez, J. R. Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of mate (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. In: Food Chemistry 35:13-21, 1990.
- Da Croce, D. M. The physical and chemical characteristics of tea (*Ilex paraguariensis* St Hil) in Santa Catarina state. In: Ciencia Florestal 12: 107-113, 2002.
- Godoy H.; Correa A. R.; Santos D. Clima do Paraná. In: Manual Agropecuário para o Paraná. Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, 16-37, 1976.
- Gorzalczany, S., Filip, R., Alonso, M. R., Miño, J., Ferraro, G.E., Acevedo, C. Choleric effect and intestinal propulsion of 'mate' (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. In: Journal of Ethnopharmacology 75:291-294, 2001.
- Gugliucci, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: Induction of decreased oxidability of human LDL *in vivo*. In: Biochemical and Biophysical Research Communications 224:338-344, 1996.
- Maccari Junior, A. (org.). Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate. Curitiba: Câmara Setorial da Cadeia Produtiva da Erva-Mate do Paraná/MCT/CNPq/Projeto PADCT Erva-mate, n.1, 160, 2000.
- Reginato, F. H., Athayde, M. L., Gosmann, G., and Schenkel E. P. Methylxanthines accumulation in *Ilex* species - caffeine and theobromine in erva-mate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* species. In: Journal of Brazilian Chemistry Society 10: 443-446, 1999.
- Scherer, R., Urfer, P., Mayol, M. R., Belingheri, L. D., Marx, F., Janssens, M. J. J. Inheritance studies of caffeine and theobromine content of Mate (*Ilex paraguariensis*) in Misiones, Argentina. In: Euphytica 126:203-210, 2002.
- Schinella, G. R., Troiani, G., Dávila, V., Buschiazzi, P. M. de, and Tournier, H. A. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. In: Biochemical and Biophysical Research Communications 269:357-360, 2000.
- Sturion, J. A.; Resende, M. D. V. Programa de melhoramento genético da erva-mate no Centro Nacional de Pesquisa de Florestas da Embrapa. In: I Congresso Sul Americano da Erva-Mate. II Reunião Técnica do Cone Sul sobre a Cultura da Erva-Mate. Curitiba. Anais. Colombo. EMBRAPA-CNPQ. EMBRAPA-CNPQ, Documentos, 33, 2: 467, 1997.
- Sturion, J. A., Resende M. D. V. de, Neiverth, D. D., Oliszeski, A. Avaliação genética em teste de progênie de erva-mate por meio do software SELEGEN - REML/BLUP. In: III Congresso Sul Americano da Erva-Mate. Chapecó/SC. Anais. Chapecó. 3.10, 2003.
- Suzuki, T., Ashihara, H., Waller, G. R. Purine and purine alkaloid metabolism in *Camellia* and *Coffea* plants. In: Phytochemistry 31: 2575-2584, 1992.