

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS QUÍMICOS E  
BIOTECNOLÓGICOS**

**KELLEN NASCIMENTO DOS SANTOS**

**COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DE FOLHAS DE ERVA-MATE (*ILEX  
PARAGUARIENSIS*): INFLUÊNCIA DAS ESTAÇÕES E DA  
VARIABILIDADE CLONAL**

**DISSERTAÇÃO**

**TOLEDO**

**2026**

**KELLEN NASCIMENTO DOS SANTOS**

**COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DE FOLHAS DE ERVA-MATE  
(*ILEX PARAGUARIENSIS*): INFLUÊNCIA DAS ESTAÇÕES E DA  
VARIABILIDADE CLONAL**

**Phytochemical composition of yerba mate (*Ilex paraguariensis*)  
leaves: influence of seasons and clonal variability**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Processos químicos e biotecnológicos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Fiori Zara

**TOLEDO**

**2026**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es).

Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



**Ministério da Educação  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Campus Toledo**



KELLEN NASCIMENTO DOS SANTOS

**COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DE FOLHAS DE ERVA-MATE (ILEX PARAGUARIENSIS): INFLUÊNCIA DAS ESTAÇÕES E DA VARIABILIDADE CLONAL**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Processos Químicos E Biotecnológicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Processos Químicos E Biotecnológicos.

Data de aprovação: 20 de Fevereiro de 2026

Dr. Clayton Antunes Martin, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Silvia Renata Machado Coelho, Doutorado - Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 20/02/2026.

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças ao apoio e colaboração de diversas pessoas e instituições, às quais expresso minha profunda gratidão.

Ao meu orientador, Dr. Ricardo Fiori Zara, expresso minha profunda gratidão pela confiança, orientação e pelos valiosos ensinamentos compartilhados ao longo desta jornada. Sua dedicação, conhecimento e conselhos foram fundamentais desde o início, contribuindo significativamente para o desenvolvimento e aprimoramento deste projeto.

À Embrapa, pelo suporte técnico-científico e pelo fornecimento de materiais laboratoriais essenciais, incluindo padrões analíticos, colunas cromatográficas e solventes, bem como pela disponibilização do material vegetal que subsidiou este estudo.

Ao Viveiro Golden Tree, pelo apoio logístico e pela organização das atividades de coleta das amostras, contribuindo de forma fundamental para a obtenção do material experimental.

À Sustentec e à Itaipu Binacional, pelo suporte financeiro por meio da bolsa concedida e pelo fornecimento de materiais necessários, que possibilitaram o desenvolvimento desta pesquisa e viabilizaram a realização das atividades acadêmicas e experimentais.

Ao Laboratório Multiusuário – Central Analítica (LABCA), pelo espaço cedido para a condução dos experimentos, bem como pela disponibilidade dos equipamentos necessários para a realização das análises.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o andamento e sucesso deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

SANTOS, Kellen Nascimento dos. **Composição fitoquímica de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*): influência das estações e da variabilidade clonal**. 2026. 95 f. Dissertação (Mestrado em Processos químicos e biotecnológicos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2026.

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) é uma espécie de elevada relevância econômica e cultural na América do Sul, amplamente reconhecida por sua composição fitoquímica, rica em metilxantinas, como cafeína e teobromina, e em compostos fenólicos, incluindo flavonoides e ácidos clorogênicos, associados a propriedades estimulantes e antioxidantes. No entanto, a concentração desses metabólitos pode variar significativamente em função de fatores genéticos e ambientais, especialmente da sazonalidade, impactando diretamente a qualidade da matéria-prima e dos produtos derivados. Este trabalho teve como objetivo quantificar e comparar os teores de compostos fenólicos totais, flavonoides, cafeína, teobromina e ácidos clorogênicos em quatro clones de erva-mate (C26, C27, C33 e Aupaba), avaliando a influência da variabilidade clonal e das estações do ano (inverno, primavera, verão e outono). Folhas e galhos finos foram coletados nas quatro estações, submetidos à secagem, moagem e extração com etanol 70 % (v/v). A quantificação de compostos fenólicos totais e flavonoides foi realizada por espectrofotometria UV-Vis, enquanto cafeína, teobromina e seis derivados do ácido cafeoilquínico foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). Os dados foram inicialmente submetidos a testes de normalidade e homocedasticidade e, em seguida, avaliados estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA) fatorial, seguida do teste de Tukey. Os resultados evidenciaram variações significativas entre clones e estações do ano. Para a cafeína, o verão foi a estação de maior acúmulo, destacando-se o clone C27, que atingiu  $2,41 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ , enquanto o clone C33 apresentou baixos teores em todas as estações ( $0,25$  a  $0,39 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ), confirmando um perfil metabólico distinto. A teobromina apresentou maiores concentrações no clone Aupaba, com destaque para o inverno ( $0,46 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ), e comportamento variável entre estações nos demais clones. Os teores de compostos fenólicos totais variaram de  $3,34$  a  $6,01 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ , com maior acúmulo no verão para o clone C27, enquanto os flavonoides apresentaram concentrações mais elevadas no inverno e no outono, especialmente no clone C26 ( $0,88 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ). Em relação aos ácidos clorogênicos, observou-se elevada contribuição do 3-CQA e do 3,5-di-CQA, com destaque para o clone C27 na primavera, que apresentou até  $4,81 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  de 3,5-di-CQA, evidenciando sensibilidade metabólica à sazonalidade. Conclui-se que a composição fitoquímica da erva-mate é fortemente modulada pela interação entre genótipo e estação do ano. O clone C27 mostrou-se promissor para aplicações que demandam elevados teores de cafeína e compostos fenólicos, enquanto o clone C33 apresentou potencial para produtos com baixo teor de cafeína. Esses resultados contribuem para o manejo agrônomo, a seleção clonal e a definição de épocas de colheita estratégicas, visando à padronização da qualidade da matéria-prima e à agregação de valor à cadeia produtiva da erva-mate.

**Palavras-chave:** cafeína. ácido clorogênico. compostos fenólicos. CLAE. sazonalidade.

## ABSTRACT

SANTOS, Kellen Nascimento dos. **Phytochemical composition of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves: influence of seasons and clonal variability**. 2026. 95 p. Dissertation (Master's Degree in Chemical and Biotechnological Processes) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2026.

Yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) is a species of high economic and cultural relevance in South America, widely recognized for its phytochemical composition, rich in methylxanthines, such as caffeine and theobromine, and in phenolic compounds, including flavonoids and chlorogenic acids, associated with stimulant and antioxidant properties. However, the concentration of these metabolites may vary significantly as a function of genetic and environmental factors, especially seasonality, directly impacting the quality of the raw material and derived products. This study aimed to quantify and compare the levels of total phenolic compounds, flavonoids, caffeine, theobromine, and chlorogenic acids in four yerba mate clones (C26, C27, C33, and Aupaba), evaluating the influence of clonal variability and seasons (winter, spring, summer, and autumn). Leaves and thin stems were collected in the four seasons, subjected to drying, grinding, and extraction with 70 % (v/v) ethanol. The quantification of total phenolic compounds and flavonoids was performed by UV-Vis spectrophotometry, while caffeine, theobromine, and six caffeoylquinic acid derivatives were identified and quantified by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). The data were initially subjected to normality and homoscedasticity tests and subsequently statistically evaluated by factorial analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test. The results revealed significant variations among clones and seasons. For caffeine, summer was the season with the highest accumulation, with clone C27 standing out, reaching  $2,41 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ , whereas clone C33 showed low levels in all seasons ( $0,25$  to  $0,39 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ), confirming a distinct metabolic profile. Theobromine showed higher concentrations in clone Aupaba, especially in winter ( $0,46 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ), and a variable seasonal behavior in the other clones. Total phenolic compound levels ranged from  $3,34$  to  $6,01 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ , with higher accumulation in summer for clone C27, while flavonoids showed higher concentrations in winter and autumn, particularly in clone C26 ( $0,88 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ). Regarding chlorogenic acids, a high contribution of 3-CQA and 3,5-di-CQA was observed, with emphasis on clone C27 in spring, which presented up to  $4,81 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  of 3,5-di-CQA, evidencing metabolic sensitivity to seasonality. It is concluded that the phytochemical composition of yerba mate is strongly modulated by the interaction between genotype and season. Clone C27 proved to be promising for applications requiring high levels of caffeine and phenolic compounds, whereas clone C33 showed potential for products with low caffeine content. These results contribute to agronomic management, clonal selection, and the definition of strategic harvesting periods, aiming at standardizing raw material quality and adding value to the yerba mate production chain.

**Keywords:** caffeine. chlorogenic acid. phenolic compounds. HPLC. seasonality.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Área de distribuição natural da erva-mate . . . . .	17
Figura 2 – Folhas e galhos finos de erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> A. St-Hil) . . . . .	18
Figura 3 – Ácido quínico e os principais derivados cinâmicos para produção de CGAs: ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido <i>p</i> -cumárico. . . . .	22
Figura 4 – Estrutura dos derivados cafeoil: ácido clorogênico (ácido-3- <i>O</i> -cafeoilquínico e ácido-5- <i>O</i> -cafeoilquínico), ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico, ácido 3,4-di- <i>O</i> -cafeoilquínico, ácido 3,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico e ácido 4,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico. . . . .	23
Figura 5 – Estrutura molecular da cafeína . . . . .	25
Figura 6 – Estrutura molecular da teobromina . . . . .	26
Figura 7 – Fatores ambientais e fisiológicos que regulam o acúmulo de metabólitos secundários em <i>Ilex paraguariensis</i> . . . . .	27
Figura 8 – Rotas metabólicas de biossíntese e degradação de xantinas metiladas em <i>Ilex paraguariensis</i> . . . . .	29
Figura 9 – Rotas metabólicas de biossíntese do ácido clorogênico e derivados via fenilpropanoides em <i>Ilex paraguariensis</i> . . . . .	31
Figura 10 – Etapas da cromatografia líquida de alta eficiência . . . . .	35
Figura 11 – Vista interna da estufa do viveiro Golden Tree, evidenciando o sistema de cultivo das matrizes clonais de erva-mate em canaletas com fertirrigação. . . . .	42
Figura 12 – Processamento das amostras: (A) Classificação; (B) Moagem da amostra seca; (C) Peneiramento; e (D) Acondicionamento em embalagem a vácuo. . . . .	44
Figura 13 – Temperaturas máxima, média e mínima diárias registradas na estufa durante o período experimental (agosto de 2024 a maio de 2025). . . . .	53
Figura 14 – Distribuição percentual da frequência de ocorrência das faixas de temperatura registradas na estufa, por estação do ano, no período de agosto de 2024 a maio de 2025. . . . .	54
Figura 15 – Teores médios de compostos fenólicos totais (a) e flavonoides (b) em diferentes clones de erva-mate, expressos em $\text{g}\cdot 100\cdot \text{g}^{-1}$ (base seca), de acordo com a estação de coleta. . . . .	57
Figura 16 – Mapa de calor dos teores médios de compostos fenólicos totais (a) e flavonoides (b) em clones de erva-mate, expressos em $\text{g}\cdot 100\cdot \text{g}^{-1}$ (base seca), em função das estações do ano. . . . .	58
Figura 17 – Teores médios de compostos teobromina (a) e cafeína (b) em diferentes clones de erva-mate, expressos em $\text{g}\cdot 100\cdot \text{g}^{-1}$ (base seca), de acordo com a estação de coleta. . . . .	63
Figura 18 – Mapa de calor dos teores médios de compostos teobromina (a) e flavonoides (b) cafeína na erva-mate, expressos em $\text{g}\cdot 100\cdot \text{g}^{-1}$ (base seca), em função das estações do ano. . . . .	65
Figura 19 – Teores médios de CQA's: 5-CQA (a), 3-CQA (b), 4-CQA (c), 3,4-di-CQA (d), 3,5-di-CQA (e) e 4,5-di-CQA (f) em diferentes clones de erva-mate, expressos em $\text{g}\cdot 100\cdot \text{g}^{-1}$ (base seca), de acordo com a estação de coleta. . . . .	71
Figura 20 – Mapa de calor dos teores médios de CQA's: 5-CQA (a), 3-CQA (b), 4-CQA (c), 3,4-di-CQA (d), 3,5-di-CQA (e) e 4,5-di-CQA (f) em diferentes clones de erva-mate, expressos em $\text{g}\cdot 100\cdot \text{g}^{-1}$ (base seca), de acordo com a estação de coleta. . . . .	74

Figura 21 – Curvas de calibração para quantificação de antioxidantes: fenólicos totais e flavonoides. . . . .	91
Figura 22 – Curva analítica para quantificação de teobromina . . . . .	91
Figura 23 – Curvas analíticas para quantificação de cafeína . . . . .	92
Figura 24 – Curvas analíticas para ácido clorogênico e os seus derivados. . . . .	92
Figura 25 – Cromatogramas dos clones C26, C27, C33 e Aupaba no verão. Sinal em 265 nm. Os compostos indicados são: (1) teobromina, (2) cafeína. . . . .	93
Figura 26 – Cromatogramas dos clones C26, C27, C33 e Aupaba no verão. Sinal em 325 nm. Os compostos indicados são: (1) ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico (3-CQA), (2) ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico ácido (5-CQA), (3) ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico (4-CQA), (4) ácido 3,4-di- <i>O</i> -cafeoilquínico (3,4- diCQA), (5) ácido 3,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico (3,5-diCQA) e (6) 4,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico (4,5-diCQA). . . . .	94
Figura 27 – Cromatogramas dos padrões utilizados para quantificar os compostos presentes nos extratos de erva-mate. Sinal em 265 e 325 nm. . . . .	95

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos clones de erva-mate de acordo com o teor de cafeína. . . .	41
Tabela 2 – Temperaturas registradas nos dias de coleta das amostras de erva-mate em diferentes estações do ano dentro da estufa. . . . .	43
Tabela 3 – Massas molares e fatores de correção utilizados para os derivados do ácido clorogênico. . . . .	48
Tabela 4 – Umidade residual ( $\% \pm$ desvio-padrão) das amostras secas de diferentes clones de erva-mate, analisadas em três estações do ano. . . . .	55
Tabela 5 – Teores médios (média $\pm$ desvio padrão, $n = 3$ ) em $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ em base seca de compostos fenólicos totais e flavonoides nos clones de erva-mate ao longo das estações do ano. . . . .	56
Tabela 6 – Parâmetros das curvas analíticas obtidas por CLAE-DAD. . . . .	61
Tabela 7 – Teores médios (média $\pm$ desvio padrão, $n = 3$ ) em $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ em base seca de teobromina e cafeína nos clones de erva-mate ao longo das estações do ano. . . . .	62
Tabela 8 – Teores médios (média $\pm$ desvio padrão, $n = 3$ ) em $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ em base seca de ácidos clorogênicos nos clones de erva-mate ao longo das estações do ano. . . . .	69
Tabela 9 – Somatório total dos ácidos clorogênicos (mono- e di-CQA) nos diferentes clones de <i>Ilex paraguariensis</i> ao longo das estações do ano ( $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ , base seca). . . . .	75

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIACÕES E SIGLAS

### SÍMBOLOS

<b>%</b>	Porcentagem
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>L</b>	Litro
<b>g</b>	Gramas
<b>g·100g<sup>-1</sup></b>	Gramas por 100 gramas
<b>λ</b>	Comprimento de onda
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficiente de determinação
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>NH<sub>3</sub></b>	Amônia
<b>μL</b>	Microlitro
<b>μm</b>	Micrômetro
<b>mg·L<sup>-1</sup></b>	Miligrama por litro
<b>g·mol<sup>-1</sup></b>	Gramas por mol
<b>(mAU·min)</b>	Milésimos de Unidade de Absorbância multiplicado pelo tempo (minutos)

### ABREVIACÕES

<b>5-CQA ou CQA</b>	Ácido 5-O-cafeoilquínico (ácido clorogênico)
<b>3-CQA</b>	Ácido 3-O-cafeoilquínico
<b>4-CQA</b>	Ácido 4-O-cafeoilquínico
<b>dica-3,4-CQA</b>	Ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico
<b>dica-3,5-CQA</b>	Ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico
<b>dica-4,5-CQA</b>	Ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico
<b>CGA</b>	<i>Chlorogenic Acids</i> (Ácidos Clorogênicos)
<b>AMP</b>	Adenosina monofosfato
<b>GMP</b>	Guanosina monofosfato
<b>XMP</b>	Xantosina monofosfato

## SIGLAS

<b>ANOVA</b>	Análise de Variância ( <i>Analysis of Variance</i> )
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
<b>ICH</b>	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
<b>IUPAC</b>	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<b>LIBS</b>	Espectroscopia de Emissão Óptica com Plasma Induzido por Laser ( <i>Laser-Induced Break-down Spectroscopy</i> )
<b>LOD</b>	Limite de Detecção ( <i>Limit of Detection</i> )
<b>LOQ</b>	Limite de Quantificação ( <i>Limit of Quantification</i> )
<b>UTFPR</b>	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
<b>FC</b>	Fator de correção
<b>FD</b>	Fator de diluição total
<b>DAD</b>	Detector de Arranjos de Diodos ( <i>Diode Array Detector</i> )

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA</b>	<b>15</b>
2.1	OBJETIVOS	15
2.1.1	Objetivo geral	15
2.1.2	Objetivos específicos	15
2.2	JUSTIFICATIVA	15
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>17</b>
3.1	ERVA-MATE	17
3.2	ASPECTOS HISTÓRICOS E SOCIOCULTURAIS DO CONSUMO DA ERVA-MATE	19
3.3	COMPOSTOS FITOQUÍMICOS PRESENTES NA ERVA-MATE	20
3.3.1	Compostos fenólicos	21
3.3.1.1	Ácidos fenólicos	21
3.3.1.1.1	<i>Derivados cafeoilquínicos</i>	22
3.3.1.2	Flavonoides	24
3.3.2	Metilxantinas	24
3.3.2.1	Cafeína	25
3.3.2.2	Teobromina	25
3.4	VARIAÇÃO COMPOSICIONAL DA ERVA-MATE	26
3.5	TÉCNICAS DE QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA ERVA-MATE	32
3.5.1	Espectrofotometria de absorção no ultravioleta e visível (UV-Vis)	33
3.5.2	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	34
3.5.2.1	Tipos de detectores na CLAE	35
3.5.2.2	Validação de metodologias analíticas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)	37
3.5.2.2.1	<i>Seletividade</i>	38
3.5.2.2.2	<i>Linearidade</i>	39
3.5.2.2.3	<i>Limites de detecção e quantificação</i>	39
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>41</b>
4.1	MATERIAIS	41
4.1.1	Amostras	41
4.2	MÉTODOS	44
4.2.1	Processamento das amostras	44
4.2.2	Determinação de umidade residual	45
4.2.3	Preparo dos extratos	45
4.2.4	Determinação de compostos fenólicos totais	45
4.2.4.1	Determinação de flavonoides	47
4.2.5	Determinação de cafeína, teobromina e ácido clorogênico por CLAE dos extratos	47
4.2.5.1	Seletividade do método	49
4.2.5.2	Linearidade	50

4.2.5.3	Determinação dos limites de detecção e quantificação . . . . .	50
4.2.6	Análise estatística . . . . .	52
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO . . . . .</b>	<b>53</b>
5.1	CONDIÇÕES TÉRMICAS NO INTERIOR DA ESTUFA AO LONGO DO PERÍODO EXPERIMENTAL . . . . .	53
5.2	DETERMINAÇÃO DE UMIDADE RESIDUAL . . . . .	55
5.3	DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONOIDES . . . . .	56
5.3.1	Influência da sazonalidade sobre os compostos fenólicos totais e flavonoides nos clones modificados de erva-mate . . . . .	56
5.4	DETERMINAÇÃO DE TEOBROMINA, CAFEÍNA E CQAS POR CLAE-DAD . . . . .	60
5.4.1	Desempenho analítico do método . . . . .	60
5.4.2	Influência da sazonalidade sobre a teobromina, cafeína, ácido clorogênico e seus derivados nos clones modificados de erva-mate. . . . .	62
5.4.2.1	Metilxantinas . . . . .	62
5.4.2.2	Ácido clorogênico e seus derivados . . . . .	68
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO . . . . .</b>	<b>78</b>
	<b>REFERÊNCIAS . . . . .</b>	<b>80</b>
	<b>APÊNDICE . . . . .</b>	<b>91</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A *Ilex paraguariensis*, popularmente conhecida como erva-mate, é uma espécie arbórea nativa da região subtropical da América do Sul, com distribuição predominante nos territórios do Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai (HECK; MEJIA, 2007). Tradicionalmente cultivada e consumida por populações indígenas e comunidades rurais, a erva-mate adquiriu, ao longo dos séculos, expressiva importância econômica, social e cultural para esses países. No Brasil, o estado do Paraná se destaca como o maior produtor, tanto em sistemas de cultivo agrícola quanto em extrativismo nativo, sendo responsável por uma significativa parcela da produção nacional e exportações IBGE. Essa relevância se reflete em programas públicos de incentivo à produção e na organização de uma cadeia produtiva consolidada, que envolve desde pequenos agricultores até indústrias de beneficiamento.

O consumo da erva-mate ocorre principalmente na forma de infusões, como chimarrão, tereré e chá, as quais apresentam grande aceitação no mercado nacional e crescente internacional. Recentemente, o interesse científico e industrial pela erva-mate tem-se intensificado devido à sua rica composição fitoquímica, especialmente em compostos fenólicos, flavonoides e metilxantinas, como cafeína, teobromina e teofilina. Tais metabólitos secundários têm sido amplamente estudados em função de suas propriedades biológicas, como atividade antioxidante, anti-inflamatória, neuroprotetora, hepatoprotetora e termogênica (CROGE *et al.*, 2021; HECK; MEJIA, 2007). Além disso, estudos vêm apontando seu potencial como ingrediente funcional na formulação de suplementos alimentares, cosméticos e medicamentos fitoterápicos (GEBARA *et al.*, 2020).

A variabilidade na composição química da erva-mate pode ser atribuída a uma combinação de fatores genéticos, ambientais, fisiológicos e tecnológicos. Clones e progênies distintos apresentam perfis metabólicos variados, e essa diversidade genética pode ser explorada para fins de melhoramento e padronização (WENDLING, 2004). Condições ambientais como luminosidade, temperatura, precipitação e estação do ano também influenciam a produção e acúmulo dos compostos bioativos (AGUIAR *et al.*, 2024). Além disso, os métodos de cultivo, práticas agrícolas e o manejo pós-colheita, incluindo técnicas de secagem, armazenamento e moagem são determinantes para a estabilidade e preservação dos constituintes químicos (BUTIUK *et al.*, 2016).

Nesse cenário, a caracterização química da erva-mate por meio de métodos analíticos confiáveis é essencial para o desenvolvimento de estratégias de controle de qualidade e para a

valorização da matéria-prima vegetal. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), especialmente quando acoplada a detectores como o de arranjo de diodos (DAD), tem-se destacado como ferramenta eficiente na separação e quantificação de compostos como cafeína, teobromina e ácidos clorogênicos, inclusive seus isômeros e derivados (BASTOS *et al.*, 2005; LIMA, 2019; MEINHART *et al.*, 2010) . Em paralelo, técnicas espectrofotométricas como a UV-Vis são amplamente empregadas para a determinação de fenóis e flavonoides totais, fornecendo uma estimativa global da atividade antioxidante potencial da amostra.

Considerando a importância econômica da erva-mate para o estado do Paraná e a escassez de estudos sistemáticos que integrem os efeitos sazonais e genéticos sobre seu perfil fitoquímico, este estudo avaliou os níveis de compostos fenólicos totais, flavonoides, cafeína, teobromina e ácidos clorogênicos em diferentes clones de *Ilex paraguariensis*, cultivados em estufa sob condições controladas de irrigação e sombreamento, ao longo das quatro estações do ano. A análise quantitativa dos compostos foi realizada por espectrofotometria UV-Vis e cromatografia líquida de alta eficiência, visando contribuir com dados que fundamentem o uso direcionado da erva-mate em diferentes aplicações industriais.

## 2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

### 2.1 OBJETIVOS

#### 2.1.1 Objetivo geral

Quantificar os compostos fenólicos totais, flavonoides e componentes fitoquímicos de maior importância comercial, como a teobromina, cafeína e ácido clorogênico, de clones de quatro progênies da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) nas quatro estações do ano.

#### 2.1.2 Objetivos específicos

- Realizar a coleta de amostras de clones pertencentes a 4 progênies de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) nas quatro estações do ano.
- Preparar extratos padronizados das amostras de erva-mate utilizando etanol 70 %.
- Adaptar metodologia para a quantificação dos compostos da erva-mate em cromatografia líquida de alta eficiência CLAE-DAD.
- Quantificar os teores de compostos fenólicos totais nas amostras de erva-mate por espectrofotometria UV-Vis.
- Comparar a influência da sazonalidade e avaliar estatisticamente os teores de compostos fenólicos totais, teobromina, cafeína e ácido clorogênico nas amostras de erva-mate.

### 2.2 JUSTIFICATIVA

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St-Hil) é amplamente consumida na América do Sul e valorizada por suas propriedades nutricionais e terapêuticas, devido à presença de compostos bioativos como fenólicos, flavonoides, teobromina, cafeína e ácido clorogênico. No entanto, a concentração desses compostos varia conforme fatores genéticos, ambientais e sazonais, impactando diretamente a qualidade dos produtos derivados da planta.

A cafeína e a teobromina são metilxantinas com reconhecida ação estimulante, vasodilatadora e diurética, que contribuem para o aumento da atenção e o bem-estar cardiovascular. Já o ácido clorogênico possui potente atividade antioxidante e anti-inflamatória, além de estar associado à regulação do metabolismo da glicose e à prevenção de doenças crônicas.

Diante disso, torna-se essencial aprofundar o conhecimento sobre a composição química da erva-mate, considerando suas diferentes progênies, a fim de otimizar o cultivo, o processamento e o controle de qualidade. A caracterização detalhada dos compostos fitoquímicos permitirá compreender melhor a influência da sazonalidade e da genética, bem como desenvolver estratégias que potencializem os benefícios à saúde.

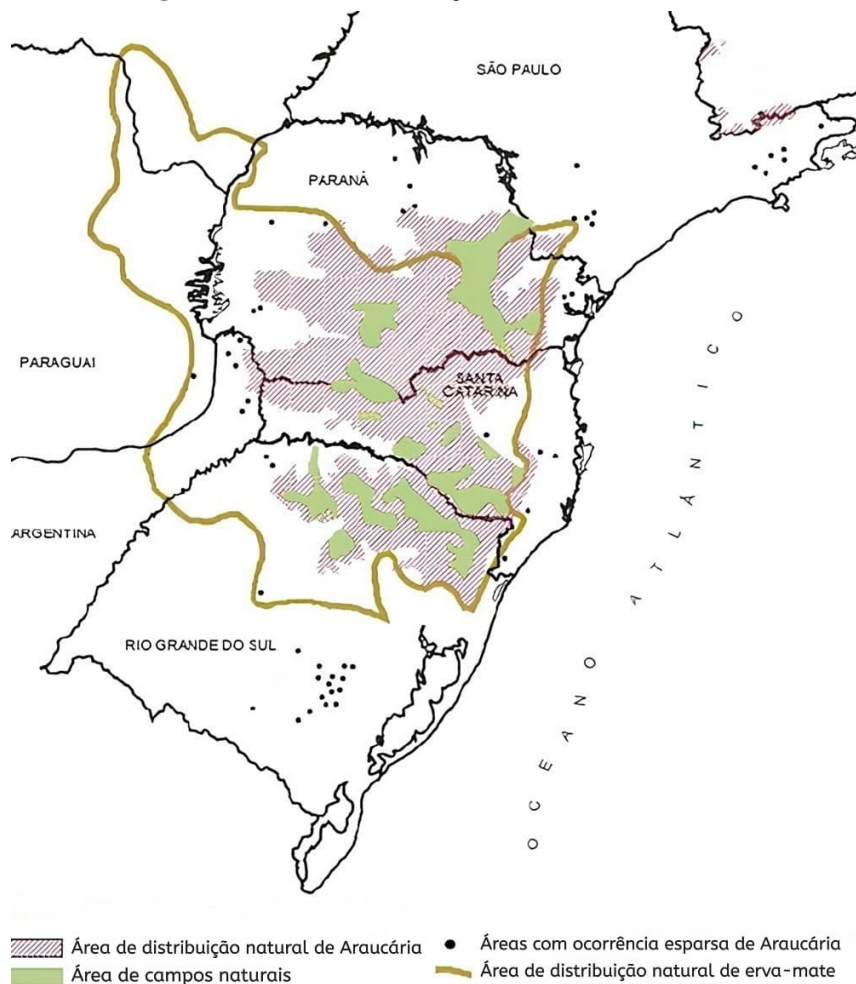
Além do reconhecimento tradicional como bebida cultural, a valorização comercial da erva-mate vem ganhando destaque, especialmente no contexto da crescente demanda por alimentos funcionais e ingredientes naturais de alto valor agregado. A padronização e o controle dos níveis de compostos bioativos podem impulsionar sua inserção em novos mercados, como os de suplementos alimentares, nutracêuticos, cosméticos e produtos farmacêuticos. Assim, a erva-mate deixa de ser apenas um símbolo regional para se consolidar como matéria-prima na economia, com potencial de gerar inovação, renda e sustentabilidade.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 ERVA-MATE

A erva-mate, cientificamente denominada *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil, é uma planta arbórea perene da família Aquifoliaceae, nativa da região subtropical da América do Sul (GOLDENBERG *et al.*, 2003). Amplamente distribuída no Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai, seu cultivo ocorre predominantemente em regiões subtropicais e temperadas (Figura 1), localizadas entre as latitudes 21°S e 30°S e as longitudes 48°30'W e 56°10'W (VOGT *et al.*, 2016).

Figura 1 – Área de distribuição natural da erva-mate



Fonte: Adaptado de Croge *et al.* (2021)

Em seu habitat natural, a planta pode atingir até 15 metros de altura; no entanto, em cultivos comerciais, ela é conduzida entre 4 e 8 metros por meio de podas regulares, com o objetivo de facilitar a colheita (COSTA, 1995). As folhas são simples, alternadas, de coloração

verde-escuro, com bordas serrilhadas e textura coriácea (Figura 2 ), sendo a parte utilizada na elaboração de infusões como chimarrão e tereré. A planta apresenta melhor adaptação a altitudes entre 300 e 800 metros, em temperaturas médias anuais entre 18 °C e 22 °C, e precipitação anual variando entre 1.500 mm e 2.000 mm, distribuída ao longo do ano. O solo ideal é profundo, bem drenado, levemente ácido e rico em matéria orgânica. Durante os primeiros anos, especialmente em cultivos implantados por sementes, o desenvolvimento é relativamente lento e requer sombreamento; posteriormente, a planta exibe bom vigor vegetativo e alta capacidade de rebrota após a poda (STURION *et al.*, 2014).

**Figura 2 – Folhas e galhos finos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St-Hil)**



**Fonte: Autoria própria (2026).**

Do ponto de vista reprodutivo, a erva-mate pode ser propagada por meio de progênies ou clones. As progênies são obtidas a partir de sementes oriundas da reprodução sexuada entre plantas selecionadas, o que gera populações com variabilidade genética. Já os clones são resultantes da propagação vegetativa, como estaquia ou enxertia, de indivíduos superiores, o que assegura a reprodução fiel das características da planta matriz. O uso de clones permite maior uniformidade nas plantações e pode proporcionar melhores resultados em produtividade, qualidade química e resistência a pragas ou estresses ambientais (WENDLING, 2004). Além disso, técnicas de propagação vegetativa, como a estaquia, são amplamente utilizadas para a obtenção de clones, o que facilita o manejo e a padronização genética das plantas cultivadas (WENDLING; SANTIN, 2015).

### 3.2 ASPECTOS HISTÓRICOS E SOCIOCULTURAIS DO CONSUMO DA ERVA-MATE

A importância da erva-mate transcende suas características botânicas ou agrícolas, refletindo um papel histórico e sociocultural marcante nas regiões onde é tradicionalmente consumida. O uso da planta remonta às populações indígenas da América do Sul, que reconheciam suas propriedades estimulantes e terapêuticas muito antes da colonização europeia.

Os povos indígenas Guarani, Caingangue e Quechua foram os primeiros a utilizar a erva-mate, consumindo-a sob a forma de infusão quente, em práticas comunitárias. Para esses grupos, a bebida tinha não apenas função nutritiva, mas também espiritual e social, estando presente em rituais religiosos, cerimônias de cura e como símbolo de hospitalidade e coesão social (FILIP *et al.*, 2001). Acreditava-se que a erva possuía propriedades medicinais e energéticas, sendo utilizada para o alívio da fadiga e o fortalecimento físico durante atividades como caça e deslocamentos extensos (CONTINI *et al.*, 2012).

Com o avanço do processo colonial e, posteriormente, o declínio das missões jesuíticas no século XIX, a produção e o comércio da erva-mate foram incorporados pela elite rural. A partir de então, a planta passou a ser explorada economicamente, o que impulsionou a adoção de novas técnicas de cultivo e beneficiamento. A bebida também foi gradativamente assimilada pelas culturas locais de diferentes maneiras. No Brasil, popularizou-se o consumo do chimarrão, enquanto no Paraguai e na região nordeste da Argentina predominou o tereré, uma infusão fria mais adequada ao clima quente dessas regiões (BALZAN *et al.*, 2013).

Brasil, Argentina e Paraguai mantêm-se, até hoje, como os principais centros de produção e exportação de erva-mate. No cenário brasileiro, os estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul concentram a maior parte da produção, tanto por meio do extrativismo vegetal quanto pelo cultivo agrícola. Segundo IBGE (2023b) o modelo extrativo, o Paraná se destaca como o principal produtor nacional, sendo responsável por cerca de 87 % do total no ano de 2023. No cultivo agrícola, o estado também lidera com 49,8 % da produção, seguido pelo Rio Grande do Sul (36,5 %) e por Santa Catarina (13,6 %). No mesmo ano, a produção brasileira totalizou 736.893 toneladas, consolidando o país como o maior produtor mundial de erva-mate, com o Paraná assumindo protagonismo em ambas as modalidades produtivas (IBGE, 2023a).

Além de seu valor econômico, a erva-mate tem papel central na vida social das populações que a consomem. O compartilhamento da bebida está fortemente associado a práticas de convívio e hospitalidade, simbolizando laços de amizade e identidade cultural, especialmente nas

regiões sul e centro-oeste do Brasil e em outras áreas da América do Sul (HECK; MEJIA, 2007).

Nos últimos anos, a crescente valorização da erva-mate como produto funcional tem impulsionado sua inserção em mercados nacionais e internacionais. Estima-se que a planta contenha mais de 200 compostos bioativos, incluindo cafeína, teobromina, polifenóis e saponinas (SONG *et al.*, 2025). Essa complexidade fitoquímica tem despertado o interesse da indústria de alimentos, bebidas e suplementos, especialmente na busca por fontes naturais de antioxidantes (EMBRAPA, 2020). A partir desse potencial, iniciativas têm sido direcionadas ao desenvolvimento de cultivares com teores específicos de compostos de interesse, promovendo avanços em melhoramento genético e agregação de valor ao produto final (WENDLING; SANTIN, 2015).

A diversificação dos produtos derivados da erva-mate, como chás prontos, extratos concentrados e suplementos, aliada à adoção de técnicas modernas de secagem e armazenamento, tem possibilitado a preservação das propriedades bioativas da planta, garantindo maior qualidade para os consumidores. Esse movimento tem sido impulsionado, ainda, pela expansão do mercado global, especialmente em países como Estados Unidos e nações europeias, onde cresce a demanda por alternativas naturais e saudáveis. Nesse contexto, os investimentos em inovação, certificação e controle de qualidade fortalecem a posição do Brasil como referência mundial no setor, ao mesmo tempo em que ampliam as perspectivas de crescimento sustentável da cadeia produtiva da erva-mate (EMBRAPA, 2020).

### 3.3 COMPOSTOS FITOQUÍMICOS PRESENTES NA ERVA-MATE

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St-Hil) é conhecida por sua rica composição de compostos fitoquímicos que desempenham papéis importantes para a saúde humana, principalmente por suas propriedades antioxidantes. Entre os compostos bioativos presentes nas folhas e ramos da planta, destacam-se os polifenóis (ácido fenólico, flavonoides e o ácido clorogênico) e as xantinas, como a cafeína e a teobromina, que estão entre os componentes com maior concentração (MEINHART *et al.*, 2010). Além disso, encontra-se uma ampla variedade de constituintes, incluindo minerais e vitaminas solúveis em água, como vitaminas do complexo B, vitamina C, potássio, manganês e magnésio (HECK; MEJIA, 2007).

### 3.3.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são uma das principais classes de metabólitos secundários presentes nas plantas e são amplamente reconhecidos por suas potentes propriedades antioxidantes. Eles desempenham um papel importante na defesa das plantas contra estresses ambientais e patógenos, além de serem altamente benéficos para a saúde humana devido à sua capacidade de neutralizar radicais livres, reduzindo os danos oxidativos nas células. Esses compostos estão presentes em uma grande variedade de alimentos de origem vegetal, como frutas (uva, maçã, pitanga), leguminosas (feijão, soja), hortaliças (cebola, pimentão), além de bebidas como café, chá verde, vinho e na própria erva-mate (ROSS; KASUM, 2002) .

Na erva-mate, os compostos fenólicos, como flavonoides, ácido cafeico e os ácidos clorogênicos, são amplamente estudados por suas propriedades antioxidantes. Eles ajudam a proteger o organismo humano contra o estresse oxidativo, que está associado ao desenvolvimento de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Além disso, estudos têm demonstrado que esses compostos fenólicos também possuem propriedades anti-inflamatórias, anticancerígenas e imunomoduladoras, tornando-os alvo de crescente interesse na pesquisa científica e terapêutica (VIEIRA *et al.*, 2010).

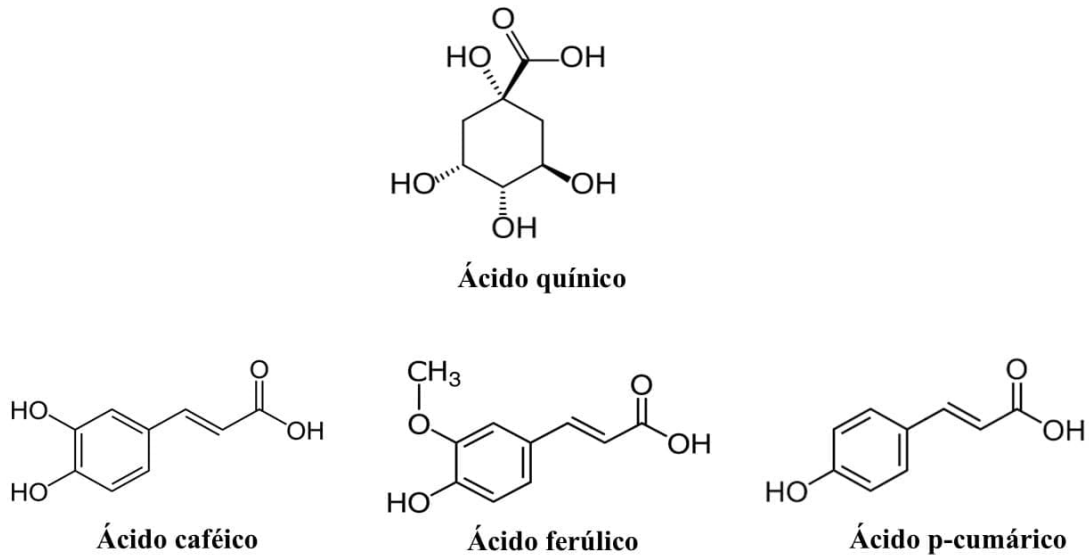
De acordo com a estrutura química, podem ser realizadas distinções entre os tipos de compostos fenólicos e estes podem ser classificados em dois grandes grupos: os ácidos fenólicos e os flavonoides (SIMÕES *et al.*, 2007).

#### 3.3.1.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos, além de ocorrerem sob sua forma natural, podem também ligar-se entre si ou com outros compostos. A família de compostos mais importantes destas combinações, devido à sua alta bioatividade, são os ácidos clorogênicos (*chlorogenic acids- CGA*).

Os derivados do ácido cinâmico consistem em compostos aromáticos com uma cadeia lateral de três carbonos (C6-C3) (Figura 3), tendo os ácidos cafeico, ferúlico, *p*-cumárico e sinápico como principais representativos da classe (ANGELO; JORGE, 2007).

Figura 3 – Ácido quínico e os principais derivados cinâmicos para produção de CGAs: ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico.

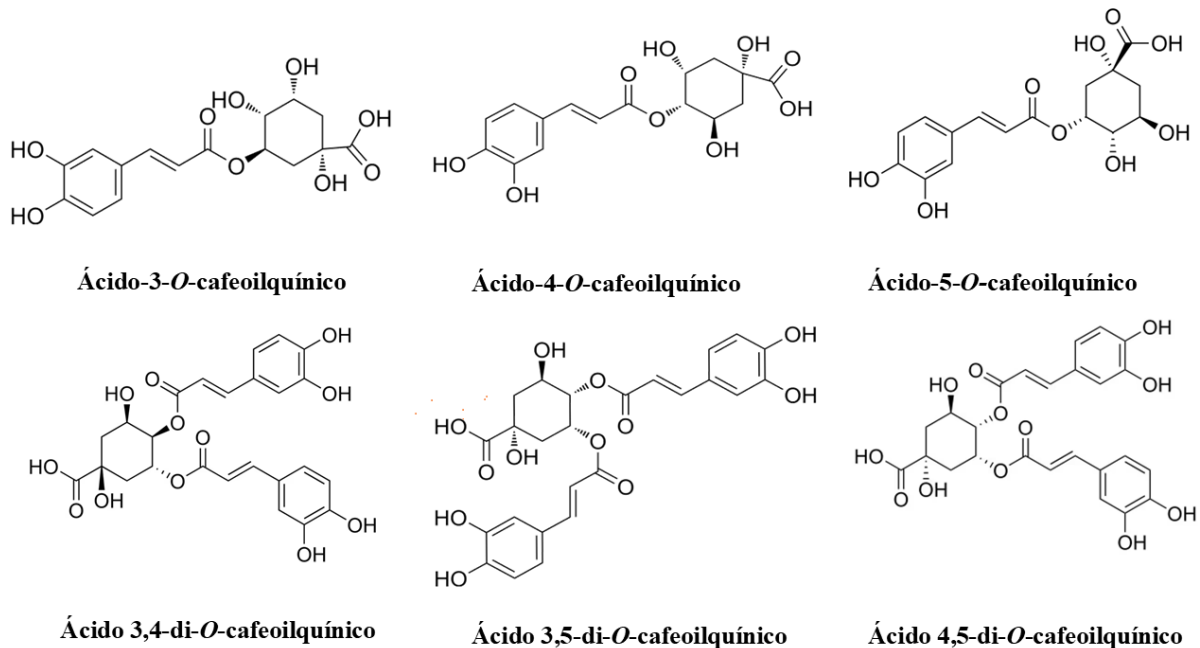


Fonte: Autoria própria (2026).

#### 3.3.1.1.1 Derivados cafeoilquínicos

O ácido cafeico e seus derivados são os principais representantes dos compostos fenólicos na erva-mate. Cerca de 10 % do peso seco de seu extrato é composto por derivados do ácido cafeoilquínico que são particularmente notáveis por sua atividade antioxidante (FILIP *et al.*, 2001). Esses ácidos são eficazes na neutralização de radicais livres, ajudando a prevenir danos celulares e o estresse oxidativo, que estão associados ao envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças crônicas (BRAVO *et al.*, 2014). A Figura 4 apresenta as estruturas químicas dos derivados do ácido cafeoilquínico, como o ácido clorogênico (ácido-3-*O*-cafeoilquínico (3-CQA) e ácido-5-*O*-cafeoilquínico (5-CQA)), ácido 4-*O*-cafeoilquínico (4-CQA), ácido 3,4-di-*O*-cafeoilquínico (3,4-diCQA), ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico (3,5-diCQA) e ácido 4,5-di-*O*-cafeoilquínico (4,5-diCQA).

**Figura 4 – Estrutura dos derivados cafeoil: ácido clorogênico (ácido-3-*O*-cafeoilquínico e ácido-5-*O*-cafeoilquínico), ácido 4-*O*-cafeoilquínico, ácido 3,4-di-*O*-cafeoilquínico, ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico e ácido 4,5-di-*O*-cafeoilquínico.**



**Fonte: Autoria própria (2026).**

O ácido clorogênico, um derivado do ácido cafeico, é outro composto fenólico que se destaca e é presente em grandes quantidades na erva-mate. O ácido clorogênico mais comum é o ácido 5-*O*-cafeoilquínico (5-CQA) (CLIFFORD, 2000).

Os CGAs são formados pela reação de esterificação entre o ácido quínico e derivados do ácido cinâmico, como o ácido cafeico (ROBBINS, 2003). Ele está diretamente envolvido na alta capacidade antioxidante da planta, protegendo as células contra os danos oxidativos. Os CGAs possuem uma grande importância, estando presentes em diversos vegetais e sendo responsáveis por características organolépticas relevantes em determinados alimentos, como, por exemplo, o amargor característico da erva-mate (PESCHEL *et al.*, 2006).

Além disso, o ácido clorogênico ajuda no controle da glicemia e no metabolismo de lipídios em seres humanos, sendo útil na prevenção de doenças metabólicas, como diabetes tipo 2 e obesidade (BRAVO *et al.*, 2014).

### 3.3.1.2 Flavonoides

Outro grupo importante de compostos fenólicos encontrados na erva-mate são os flavonoides. Os flavonoides pertencem a uma classe de compostos naturais que, nos últimos anos, têm despertado grande interesse tanto na pesquisa científica quanto na área terapêutica. Eles são amplamente distribuídos em alimentos de origem vegetal, como frutas, vegetais, cereais e bebidas, e têm sido associados a uma variedade de benefícios para a saúde, principalmente por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e cardioprotetoras (HAVSTEEN, 2002).

Na erva-mate, entre os principais flavonoides identificados estão a quercetina, rutina e kaempferol, compostos que são bem conhecidos por suas funções na redução do risco de doenças cardiovasculares, controle de inflamações e pelo fortalecimento do sistema imunológico. Esses compostos, amplamente distribuídos em alimentos vegetais, estão associados à proteção contra doenças cardiovasculares, além de apresentarem propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras (HECK; MEJIA, 2007). Estudos clínicos demonstraram que suplementação de quercetina pode reduzir pressão arterial sistólica e diastólica e diminuir marcadores inflamatórios em humanos, sugerindo efeitos cardioprotetores desses flavonoides (DABEEK; MARRA, 2019).

### 3.3.2 Metilxantinas

Estruturalmente, são classificadas como pseudoalcaloides, pois derivam de bases purínicas e apresentam caráter anfótero. No entanto, alguns autores as consideram alcaloides verdadeiros, conhecidos como alcaloides purínicos, devido à sua atividade biológica expressiva, distribuição restrita e presença de nitrogênio em sua estrutura heterocíclica (SIMÕES *et al.*, 2007).

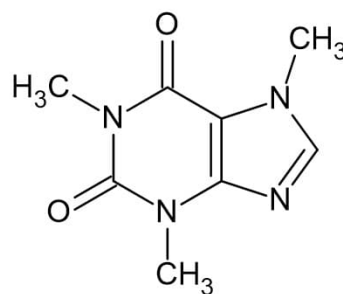
As principais metilxantinas presentes na erva-mate são a cafeína (1,3,7-trimetilxantina), a teobromina (3,7-dimetilxantina) e a teofilina (1,3-dimetilxantina). Nas folhas de erva-mate, a cafeína é a metilxantina predominante, com concentrações em base seca variando entre (0,89 - 1,73 %), seguida pela teobromina (0,26 - 0,88 %) e, em menor quantidade, pela teofilina, um isômero da teobromina; no entanto, as condições e métodos de extração exercem uma forte influência nos teores desses compostos mensurados (CLIFFORD; RAMIREZ-MARTINEZ, 1990).

### 3.3.2.1 Cafeína

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é caracterizada por ser uma xantina metilada, o que significa que possui três grupos metil ( $\text{CH}_3$ ) ligados à sua estrutura de base xantina (Figura 5), é amplamente conhecida por suas propriedades estimulantes e é um dos principais compostos bioativos presentes na erva-mate (SIMÕES *et al.*, 2016). Além de ser uma das substâncias mais consumidas no mundo, sua presença na erva-mate contribui significativamente para o perfil funcional desta planta que é amplamente consumida em países da América do Sul (HECK; MEJIA, 2007).

A quantidade de cafeína consumida em 100 mL da bebida preparada a frio (tereré) é menor do que a da bebida chimarrão preparada em água quente, dependendo do método de preparo da bebida e do tipo de processamento industrial. Estudos indicam que a quantidade de cafeína em uma infusão de chimarrão pode ser suficiente para proporcionar efeitos estimulantes similares aos do chá verde, mas com uma menor concentração em relação ao café. No entanto, o consumo regular de erva-mate, seja no formato de chimarrão ou tereré, oferece uma dose moderada de cafeína, o que torna a bebida uma alternativa viável para aqueles que buscam os benefícios da cafeína sem os efeitos estimulantes mais intensos que o café pode causar (BASTOS *et al.*, 2005).

**Figura 5 – Estrutura molecular da cafeína**



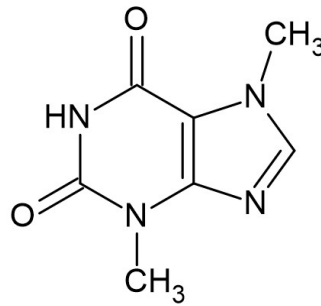
**Cafeína**

**Fonte: Autoria própria (2026).**

### 3.3.2.2 Teobromina

A teobromina (3,7-dimetilxantina) é um composto importante encontrado na erva-mate, pertencente à metilxantinas, assim como a cafeína. Sua estrutura molecular é bastante semelhante à da cafeína, com a diferença de que possui apenas dois grupos metil em vez de três (Figura 6).

**Figura 6 – Estrutura molecular da teobromina**



**Teobromina**

**Fonte: Autoria própria (2026).**

Devido a essa variação estrutural, a teobromina apresenta efeitos fisiológicos distintos e menos estimulantes em comparação à cafeína. A teobromina é conhecida por suas propriedades vasodilatadoras e diuréticas, o que a torna particularmente interessante do ponto de vista medicinal. Ela tem um efeito mais suave no sistema nervoso central, mas age eficazmente no relaxamento dos músculos lisos, o que pode contribuir para a redução da pressão arterial e melhorar a circulação sanguínea (HECK; MEJIA, 2007).

### 3.4 VARIAÇÃO COMPOSICIONAL DA ERVA-MATE

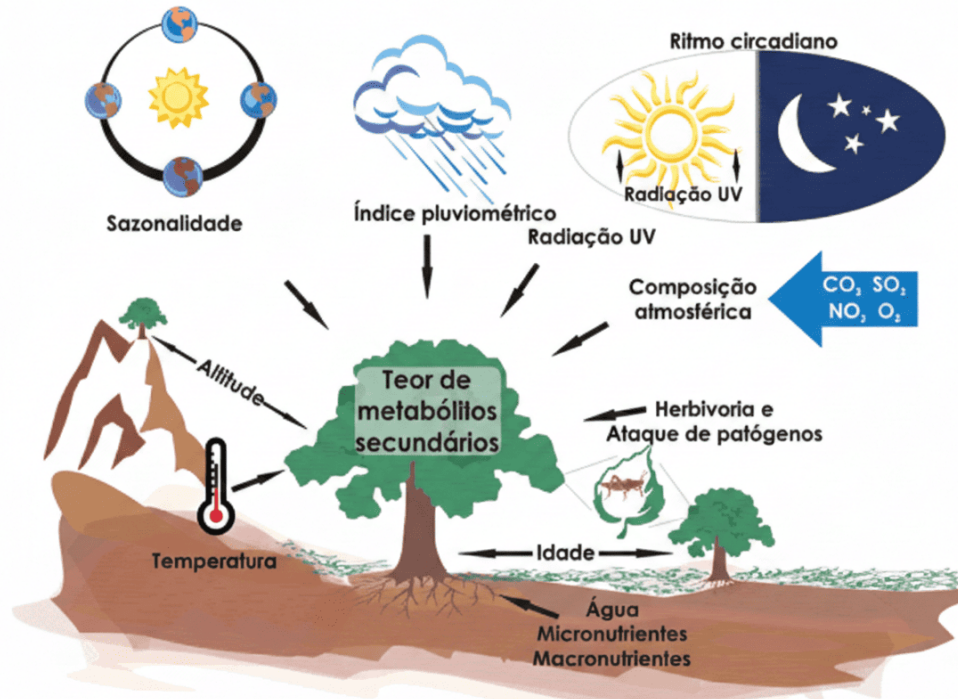
A composição química da erva-mate é resultado da interação entre fatores genéticos, ambientais e tecnológicos. Esses elementos atuam de forma sinérgica, determinando o perfil de metabólitos secundários, como cafeína, teobromina e polifenóis, que conferem às propriedades biológicas e sensoriais características da planta (BASTOS *et al.*, 2005; HECK; MEJIA, 2007).

A progênie é o fator intrínseco mais relevante sobre a composição química da planta. Resultante do cruzamento de matrizes previamente selecionadas, a progênie define a base genética dos clones desenvolvidos em programas de melhoramento para que tenham características agrônômicas e químicas desejáveis, como alto teor de cafeína ou antioxidantes e os propagam vegetativamente para garantir uniformidade (WENDLING; SANTIN, 2015). Estudos comparativos entre clones revelam que diferenças genéticas alteram a expressão de enzimas do metabolismo secundário, impactando diretamente a síntese de alcaloides e fenóis (AGUIAR *et al.*, 2024; CROGE *et al.*, 2021). Por exemplo, clones selecionados para alta produtividade podem apresentar até 10 vezes mais cafeína que genótipos convencionais (AGUIAR *et al.*, 2024).

As condições edafoclimáticas (solo, clima, luminosidade) modulam esse potencial genético. Temperatura, umidade e radiação UV influenciam a atividade de enzimas como

polifenol oxidase e metiltransferases, que participam da biossíntese de compostos bioativos (Figura 7). Plantas cultivadas em regiões de altitude elevada, por exemplo, tendem a acumular mais polifenóis como resposta ao estresse oxidativo causado pela radiação ultravioleta (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

**Figura 7 – Fatores ambientais e fisiológicos que regulam o acúmulo de metabólitos secundários em *Ilex paraguariensis*.**



Fonte: Adaptado de Gobbo-Neto e Lopes (2007).

O estágio de desenvolvimento das folhas é outro determinante crítico. Folhas jovens produzem mais cafeína que folhas maduras, que atuam como defesa química contra herbívoros durante a fase vulnerável de crescimento (AGUIAR *et al.*, 2024; TOMASI *et al.*, 2025). Essa estratégia é particularmente evidente em ambientes sombreados, onde plantas jovens compensam a menor eficiência fotossintética com maior produção de metabólitos de defesa (YIN *et al.*, 2015).

A sazonalidade exerce impacto marcante: no verão, a combinação de alta irradiância e temperaturas elevadas intensifica o metabolismo secundário (SHARMA *et al.*, 2019). Nesse período, a erva-mate aumenta a produção de cafeína através de um mecanismo bioquímico específico: enzimas metiltransferases adicionam grupos metil à xantina (um composto natural da planta), transformando-a sequencialmente em teobromina e depois em cafeína (AGUIAR *et al.*, 2024; ASHIHARA; CROZIER, 2001; YIN *et al.*, 2015). A energia para essas reações vem

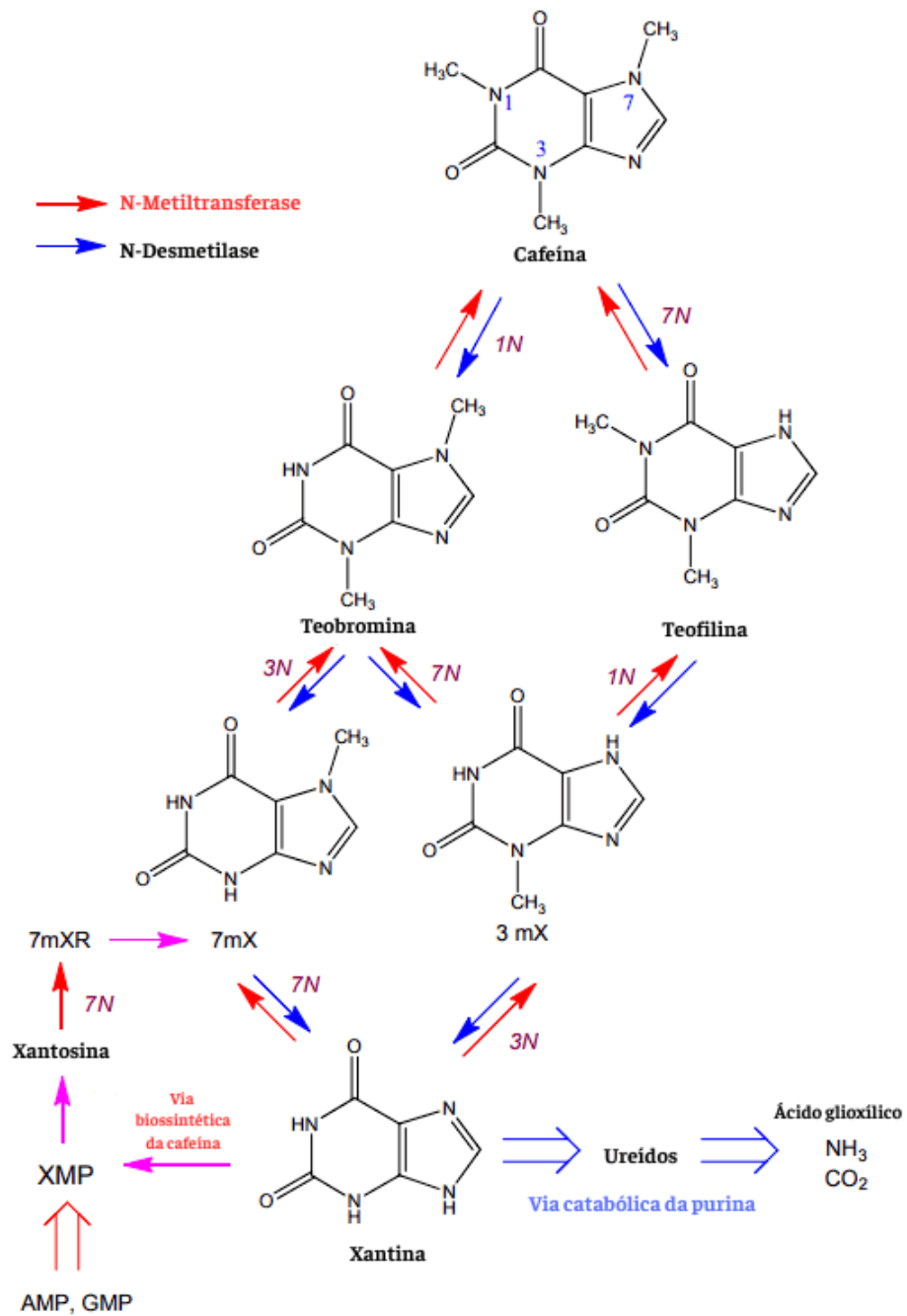
da fotossíntese, que é mais ativa no verão, fornecendo ATP (molécula energética) e precursores químicos em abundância (ASHIHARA; CROZIER, 2001; YIN *et al.*, 2015). Simultaneamente, a cafeína cumpre dupla função: protege as folhas dos danos da radiação UV e age como repelente natural contra insetos, cuja incidência aumenta nessa estação (SHARMA *et al.*, 2019). Genes reguladores associados à síntese de alcaloides são ativados pelo calor e pelo fotoperíodo prolongado, resultando em teores de cafeína até 30% superiores no verão em comparação com outras estações (AGUIAR *et al.*, 2024; SHARMA *et al.*, 2019; YIN *et al.*, 2015).

A complexa interação entre sazonalidade, atividade enzimática e regulação genética é sintetizada de forma esquemática na Figura 8. Este diagrama integra as vias metabólicas, os fluxos energéticos e os fatores ambientais que regulam a síntese e o acúmulo de cafeína em *Ilex paraguariensis*.

A Figura 8 apresenta as principais etapas do metabolismo das xantinas metiladas nas folhas de *Ilex paraguariensis*, abrangendo compostos como cafeína, teobromina e teofilina. O composto central desse metabolismo é a xantina, que atua como substrato inicial nas reações de metilação. Diferentemente de outras espécies produtoras de cafeína, como *Coffea spp.* e *Camellia sinensis*, que utilizam a xantosina como precursor primário, a erva-mate emprega a xantina diretamente em sua via biossintética, evidenciando uma rota metabólica distinta.

Segundo Yin *et al.* (2015), a biossíntese de cafeína em *Ilex paraguariensis* representa um modelo singular de plasticidade metabólica e convergência evolutiva. A xantina é submetida a reações de metilação sequencial em diferentes posições do anel purínico (1N, 3N e 7N), catalisadas por enzimas N-metiltransferases (setas vermelhas), originando os intermediários 3-metilxantina, 7-metilxantina, teobromina e teofilina, até culminar na formação da cafeína. No sentido oposto, enzimas N-desmetilases (setas azuis) catalisam reações de desmetilação, que participam tanto da reciclagem metabólica quanto da degradação desses compostos.

Figura 8 – Rotas metabólicas de biossíntese e degradação de xantinas metiladas em *Ilex paraguariensis*.



Fonte: Adaptado de Yin *et al.* (2015).

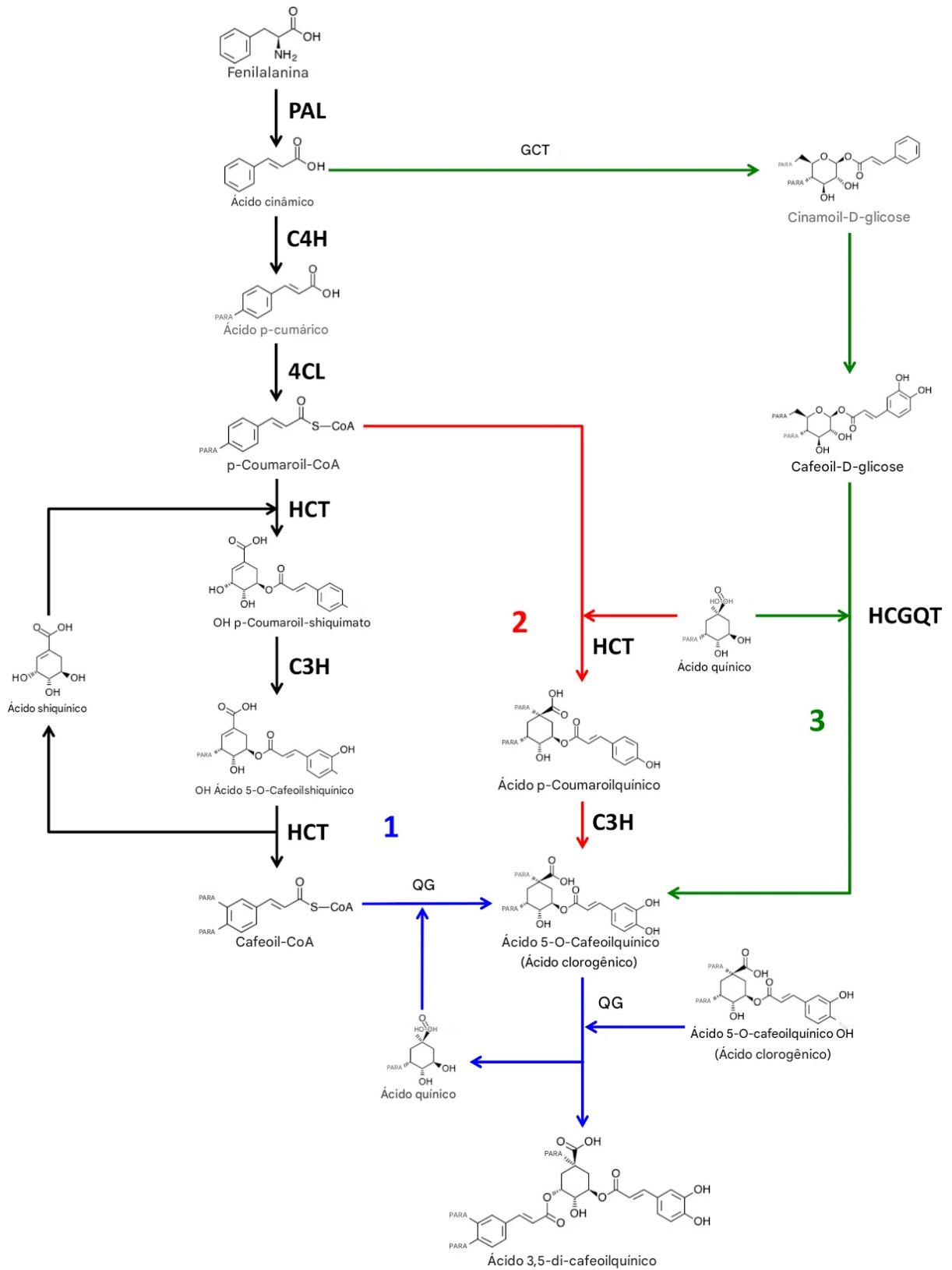
Na rota biossintética pode-se observar a conexão entre o metabolismo de nucleotídeos (AMP e GMP) e a formação de xantósina, sugerindo uma possível rota alternativa de suprimento para a biossíntese de cafeína. Já na rota catabólica das purinas, a xantina é degradada em ureídeos, os quais são posteriormente convertidos em moléculas simples como ácido glicóxico, amônia e dióxido de carbono, completando o ciclo de degradação de compostos nitrogenados.

No entanto, a composição química final da erva-mate não depende exclusivamente dos processos bioquímicos intrínsecos. Fatores tecnológicos aplicados após a colheita também desempenham um papel fundamental. Se, por um lado, as vias metabólicas regulam a síntese e degradação de compostos como cafeína e ureídeos, por outro, métodos de processamento pós-colheita, em especial a secagem, atuam como moduladores críticos da estabilidade e preservação desses metabólitos.

Se a biossíntese de cafeína exemplifica a plasticidade do metabolismo das purinas em *Ilex paraguariensis*, a síntese de ácido clorogênico ilustra, de forma complementar, a complexidade da via dos fenilpropanoides na planta. Ambos os grupos de metabólitos respondem a estímulos ambientais semelhantes como radiação UV, temperatura e estresse biótico, porém por meio de rotas bioquímicas distintas e com funções fisiológicas específicas (HECK; MEJIA, 2007; CLIFFORD, 2000). Enquanto os alcaloides atuam predominantemente como defesa química contra herbívoros e reguladores do metabolismo energético, os ácidos clorogênicos exercem papel central na proteção contra o estresse oxidativo e na resposta a patógenos (SHARMA *et al.*, 2019; CLIFFORD *et al.*, 2017). Essa complementaridade metabólica é, portanto, determinante para o perfil bioativo característico da espécie.

O ácido clorogênico representa outro grupo de metabólitos secundários de grande relevância em *Ilex paraguariensis*, sendo sintetizado por meio da via dos fenilpropanoides, cujas etapas estão sintetizadas na Figura 9. O precursor inicial dessa rota é a fenilalanina, um aminoácido aromático convertido em ácido cinâmico pela enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), representando o ponto de entrada no metabolismo fenólico (VOGT, 2010). A partir daí, reações catalisadas sequencialmente pelas enzimas cinamato 4-hidroxilase (C4H) e 4-cumaroil-CoA ligase (4CL) convertem o ácido cinâmico em ácido p-cumárico e, posteriormente, em p-Cumaroil-CoA, respectivamente (VOGT, 2010; CLIFFORD *et al.*, 2017). Este último composto constitui o nó central da via, a partir do qual se ramificam ao menos três rotas distintas (indicadas pelos numerais 1, 2 e 3 na Figura 9) que conduzem à formação do ácido 5-O-cafeoilquínico, principal isômero do ácido clorogênico na espécie (D'ORSO *et al.*, 2023).

**Figura 9 – Rotas metabólicas de biossíntese do ácido clorogênico e derivados via fenilpropanoides em *Ilex paraguariensis*.**



Fonte: Adaptado de D'Orso *et al.* (2023).

Na rota predominante (rota 1), a enzima hidroxicinamoil transferase (HCT) incorpora o grupamento cumaroil ao ácido shiquímico, gerando o intermediário OH p-Cumaroil-shiquimato, que é subsequentemente hidroxilado pela cinamato 3-hidroxilase (C3H) a OH Ácido 5-O-Cafeoilshiquímico. A HCT então catalisa a transferência reversa do grupamento cafeoil ao CoA, formando o Cafeoil-CoA, que reage com o ácido quínico por ação da quinato:hidroxicinamoil CoA transferase (QG), produzindo o ácido 5-O-cafeoilquínico (KOFTON *et al.*, 2022; SOVI-GUIDI *et al.*, 2022). Rotas alternativas envolvem a transferência direta do grupamento p-cumaroil ao ácido quínico via HCT (rota 2), com posterior hidroxilação pela C3H, ou ainda a via mediada por intermediários glicosídicos de cinamoil e cafeoil (rota 3), que converge para o produto final pela ação da enzima HCGQT (D'ORSO *et al.*, 2023). Adicionalmente, a via pode prosseguir com a incorporação de um segundo resíduo cafeoil ao ácido clorogênico, também pela enzima QG, resultando no ácido 3,5-di-cafeoilquínico, um dicafeoilquinato abundante em erva-mate e associado a elevada capacidade antioxidante (BASTOS *et al.*, 2005; CLIFFORD *et al.*, 2017; D'ORSO *et al.*, 2023).

Compreender a variação composicional da erva-mate, portanto, é condição prévia para explorá-la de forma racional. A diversidade química observada entre genótipos, ambientes e estações não é ruído, mas informação e seu aproveitamento sistemático, por meio da integração entre melhoramento genético, manejo agrônomico e tecnologia pós-colheita, é o que viabiliza a produção de matérias-primas com perfil bioativo previsível e reprodutível (WENDLING; SANTIN, 2015; AGUIAR *et al.*, 2024; BASTOS *et al.*, 2005).

### 3.5 TÉCNICAS DE QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA ERVA-MATE

A quantificação de compostos da erva-mate é um processo essencial para garantir a padronização, segurança e eficácia dos produtos derivados dessa planta. Compostos bioativos presentes na planta, como cafeína, teobromina e ácidos clorogênico e seus derivados, desempenham um papel central nesse processo, uma vez que esses componentes são responsáveis pelas propriedades funcionais e terapêuticas amplamente reconhecidas da *Ilex paraguariensis* (CROGE *et al.*, 2021; FILIP *et al.*, 2001).

### 3.5.1 Espectrofotometria de absorção no ultravioleta e visível (UV-Vis)

A espectrofotometria UV-Vis é amplamente utilizada como técnica analítica para o controle de qualidade de matrizes quimicamente complexas, como extratos de própolis, sendo frequentemente aplicada na quantificação de flavonoides em materiais vegetais (TOMAZZOLI *et al.*, 2015). Os flavonoides apresentam espectros de absorção característicos na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), os quais são determinados pela estrutura química do núcleo benzopirona. Esses compostos exibem dois máximos de absorção, um na faixa de 240 nm a 285 nm e outro entre 300 nm e 400 nm (TANIGUCHI *et al.*, 2023).

Na espectrofotometria, a luz proveniente da fonte é direcionada através da amostra contida em uma cubeta transparente, sendo a intensidade da luz transmitida medida por um detector. A absorvância registrada é diretamente proporcional à concentração da substância na amostra, de acordo com os princípios da Lei de Lambert-Beer. Além da capacidade de quantificar substâncias que absorvem radiação, a técnica pode ser utilizada para análises indiretas, após a realização de modificações químicas nos analitos. A utilização de reagentes específicos permite aumentar a sensibilidade e seletividade da detecção, especialmente para espécies que apresentam baixa absorção, possibilitando a quantificação precisa de analitos em menores concentrações (PERKAMPUS, 1992).

A Equação 1 é fundamental na espectrofotometria e descreve como a luz é absorvida por uma substância em solução, sendo diretamente proporcional à concentração da espécie absorvente e ao caminho óptico percorrido pela luz.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (1)$$

onde:

- $A$  = absorvância (adimensional),
- $\varepsilon$  = coeficiente de absorção molar ( $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),
- $c$  = concentração da substância ( $\text{mol L}^{-1}$ ),
- $l$  = caminho óptico (cm).

Na prática analítica, é comum utilizar a equação da reta na forma  $y = a + bx$ , onde  $y$  representa a absorvância e  $x$  a concentração. Nesse contexto, o coeficiente angular  $b$  corresponde

ao produto  $\varepsilon \cdot l$ , ou seja, está diretamente relacionado à sensibilidade do método, indicando o quanto a absorvância varia em função da concentração. Quanto maior o valor de  $b$ , mais sensível é o método à variação de concentração.

A sensibilidade analítica influencia diretamente a precisão do método, pois métodos mais sensíveis conseguem detectar pequenas variações na concentração com maior clareza, reduzindo a incerteza associada à leitura. No entanto, vale destacar que a sensibilidade sozinha não garante precisão, esta também depende da reprodutibilidade dos dados e do controle dos parâmetros experimentais (SKOOG *et al.*, 2020).

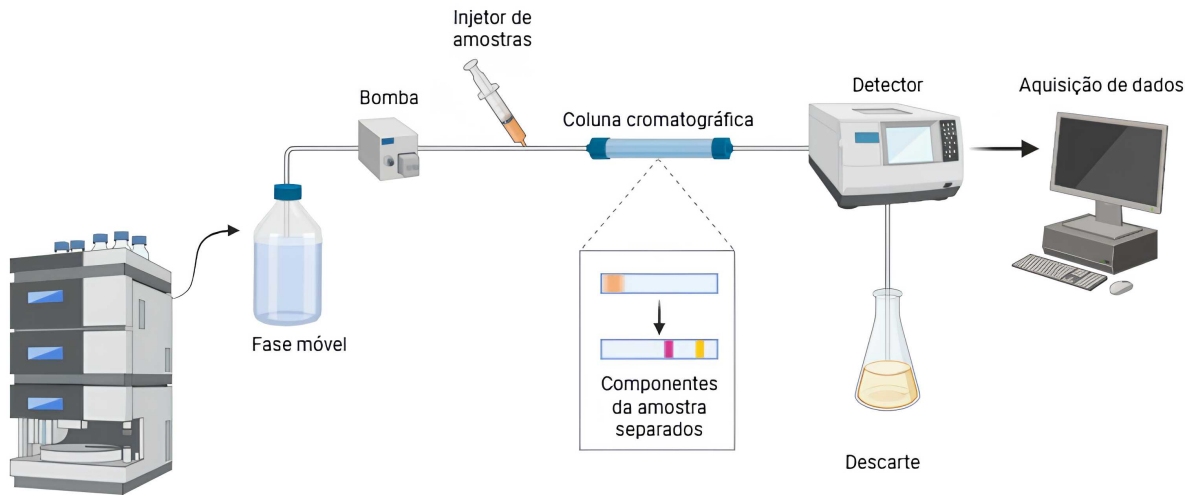
### 3.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A CLAE, também conhecida como *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC), é uma técnica analítica de grande importância na separação e quantificação de componentes presentes em misturas complexas devido à sua elevada sensibilidade, resolução e precisão (SKOOG *et al.*, 2020).

É uma técnica analítica muito utilizada para a separação de compostos orgânicos, como vitaminas, agroquímicos, metabólitos e fármacos. O processo de separação ocorre pela distribuição dos compostos entre duas fases: a fase estacionária (FE), geralmente composta por um material adsorvente de grande área superficial empacotado em uma coluna, e a fase móvel (FM), um fluido que é bombeado através da coluna junto com os analitos. A interação diferencial dos compostos com a FE, baseada em suas polaridades, permite a separação eficiente dos componentes da amostra. Essa técnica é amplamente aplicada não apenas na química, mas também em áreas como ciências ambientais, farmacologia e indústria de alimentos, devido à sua capacidade de separar substâncias com propriedades similares em diferentes matrizes (HARRIS, 2017; LANÇAS, 2016).

O sistema de CLAE (Figura 10) é composto por um conjunto de módulos: reservatórios de solventes, bomba de alta pressão, injetor de amostras, coluna cromatográfica, detector e sistema de aquisição e processamento de dados. A fase móvel, impulsionada pela bomba, percorre o sistema e carrega os analitos pela coluna, onde ocorre a separação. Em seguida, os compostos eluídos são detectados por meio de diferentes tipos de detectores, dependendo da natureza da análise e dos analitos-alvo (SKOOG *et al.*, 2020).

**Figura 10 – Etapas da cromatografia líquida de alta eficiência**



**Fonte: Autoria própria (2026).**

A resolução e a precisão obtidas na CLAE podem ser influenciadas por diversos fatores relacionados tanto ao sistema cromatográfico quanto às características da amostra. Entre os principais, destacam-se as propriedades físico-químicas da fase estacionária, a composição e o pH da fase móvel, a temperatura da coluna, bem como o tamanho e a homogeneidade das partículas de empacotamento. A vazão da fase móvel, o volume de injeção e o preparo adequado da amostra também são determinantes para evitar efeitos indesejados, como alargamento de picos ou coeluições. Além disso, condições inadequadas de manutenção do sistema, como desgaste da coluna ou contaminação de solventes, podem comprometer significativamente o desempenho da separação (GUIOCHON, 2006; NEUE *et al.*, 2003).

### 3.5.2.1 Tipos de detectores na CLAE

O desempenho analítico da CLAE está intrinsecamente ligado à escolha do sistema de detecção, etapa crucial para a identificação e quantificação dos compostos eluídos. A seleção do detector adequado deve considerar suas especificidades quanto à sensibilidade, seletividade e compatibilidade com as propriedades físico-químicas dos analitos investigados.

- **Detector de Absorção no ultravioleta-visível (UV-Vis):** É um dos detectores mais comuns em CLAE. Baseia-se na absorção de radiação por compostos que possuem cromóforos, ou seja, estruturas químicas com ligações duplas conjugadas capazes de realizar transições eletrônicas quando expostas à luz em determinados comprimentos de onda, principalmente

nas regiões do UV e do visível. Essas transições permitem a detecção dos analitos, tornando o detector UV-Vis amplamente utilizado na análise de fármacos e compostos fenólicos, devido à sua boa sensibilidade (HARRIS, 2017).

- O detector de arranjo de diodos (DAD – *Diode Array Detector*) é uma evolução do detector UV-Vis tradicional. Diferentemente do UV-Vis, que mede a absorbância em apenas um comprimento de onda por vez, o DAD é capaz de adquirir dados simultaneamente em um espectro amplo de comprimentos de onda (geralmente entre 190 e 800 nm). Isso permite a obtenção dos espectros de absorção dos analitos em tempo real durante a eluição, o que é extremamente útil tanto para sua identificação quanto para o monitoramento de coeluições (LANÇAS, 2016; SKOOG *et al.*, 2020).

A principal vantagem do DAD é sua versatilidade e seletividade em amostras complexas, como extratos vegetais. No caso da erva-mate, compostos como cafeína, teobromina e ácido clorogênico possuem absorção na faixa do UV, podendo ser facilmente identificados e quantificados com esse detector. Além disso, o DAD permite realizar análises de pureza de pico e verificar a presença de compostos desconhecidos por meio da sobreposição de espectros (PERES *et al.*, 2013).

- O detector de fluorescência (FLD) é altamente sensível e seletivo, ideal para a detecção de analitos que emitem fluorescência natural ou que podem ser derivatizados para apresentar essa propriedade. O princípio de funcionamento baseia-se na excitação do analito em um comprimento de onda específico, resultando na emissão de luz em outro comprimento de onda (geralmente maior), que é então detectada. É comumente empregado em análises farmacêuticas, biomédicas e ambientais, sendo capaz de detectar compostos em concentrações da ordem de  $\text{ng.mL}^{-1}$  (HARRIS, 2017; SKOOG *et al.*, 2020).

No entanto, sua aplicação é limitada àqueles analitos fluorescentes ou que possam ser submetidos à derivatização, o que nem sempre é viável ou desejável dependendo da matriz. Ainda assim, sua sensibilidade supera significativamente a dos detectores UV e DAD em determinadas aplicações.

- Detector de refratometria diferencial (RID): Mede alterações no índice de refração da fase móvel ao passar por diferentes analitos. Ele é útil para compostos que não absorvem radiação UV ou fluorescência, como açúcares, álcoois, ácidos graxos e alguns polímeros.

No entanto, apresenta baixa sensibilidade e não permite o uso de gradientes na fase móvel, o que limita sua aplicação em comparação com os outros detectores (LANÇAS, 2016).

- Detector acoplado à espectrometria de massas (LC-MS): Combina a separação cromatográfica com a alta sensibilidade e especificidade da espectrometria de massas. Permite a identificação de compostos, mesmo em baixas concentrações, sendo amplamente utilizado em análises metabolômicas e de compostos bioativos em matrizes complexas. Apesar de sua alta performance, o custo elevado e a necessidade de equipamentos especializados limitam seu uso rotineiro (PERES *et al.*, 2013).

Para as análises propostas neste trabalho, que envolvem a quantificação de compostos fenólicos e alcaloides purínicos presentes em diferentes clones de *Ilex paraguariensis*, foi utilizado o detector DAD, devido à sua versatilidade, sensibilidade e capacidade de monitoramento simultâneo em diferentes comprimentos de onda, características que o tornam ideal para matrizes vegetais com grande complexidade química. A CLAE acoplada ao detector DAD tem sido amplamente aplicada na análise de compostos bioativos, como os encontrados na erva-mate. Compostos como a cafeína, teobromina e ácidos fenólicos (como o ácido clorogênico) são frequentemente analisados por essa técnica, devido à sua capacidade de oferecer alta resolução e precisão, mesmo em misturas complexas de compostos naturais (BASTOS *et al.*, 2005; PERES *et al.*, 2013).

### 3.5.2.2 Validação de metodologias analíticas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)

A validação de metodologias analíticas constitui uma etapa essencial na aplicação da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), assegurando que os resultados obtidos sejam confiáveis, consistentes e adequados ao objetivo analítico proposto. Em métodos cromatográficos aplicados a matrizes vegetais complexas, como a erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.), a validação torna-se particularmente relevante devido à elevada diversidade de metabólitos secundários presentes, os quais podem ocasionar interferências analíticas e comprometer a correta identificação e quantificação dos compostos de interesse.

Diretrizes internacionais amplamente consolidadas, como as propostas pelo ICH Q2 (R1) (2005), estabelecem parâmetros fundamentais para a validação de métodos analíticos, incluindo seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação e

robustez. Entretanto, a literatura reconhece que a extensão da validação deve ser definida de acordo com a finalidade do método e o contexto de aplicação, sendo aceitável, em estudos de caracterização química e avaliação comparativa, a ênfase em parâmetros diretamente relacionados à confiabilidade da identificação e da quantificação dos analitos (SNYDER *et al.*, 2010; OLIVIERI, 2015).

No caso de métodos baseados em CLAE acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), a seletividade e a linearidade assumem papel central, uma vez que a combinação do tempo de retenção com a análise espectral no ultravioleta permite a confirmação da identidade dos analitos e a avaliação de possíveis coeluições (SNYDER *et al.*, 2010). Adicionalmente, a determinação adequada dos limites de detecção e quantificação fornece informações essenciais sobre a sensibilidade do método, especialmente em estudos envolvendo variações sazonais e diferenças metabólicas entre clones, nos quais determinados compostos podem estar presentes em baixos teores (OLIVIERI, 2015).

Dessa forma, a validação analítica em CLAE-DAD, quando conduzida de maneira alinhada aos objetivos do estudo, constitui uma ferramenta indispensável para garantir a qualidade dos dados gerados, subsidiando interpretações confiáveis sobre a composição fitoquímica da erva-mate e sua variação em função de fatores genéticos e ambientais.

A aplicação desses critérios em métodos de CLAE destinados à análise de compostos bioativos em matrizes vegetais contribui para uma avaliação mais rigorosa da capacidade do método em detectar e quantificar analitos presentes em diferentes níveis de concentração, especialmente em estudos comparativos envolvendo variabilidade genética e sazonal.

#### 3.5.2.2.1 *Seletividade*

A seletividade é definida como a capacidade do método analítico em distinguir o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz, como interferentes, impurezas ou produtos de degradação (ICH Q2 (R1), 2005). Em métodos cromatográficos acoplados a detectores espectroscópicos, como o detector de arranjo de diodos (DAD), a seletividade pode ser avaliada não apenas pela separação cromatográfica, mas também pela análise espectral dos picos obtidos.

Em matrizes vegetais, a avaliação da seletividade é particularmente relevante, uma vez que compostos estruturalmente semelhantes podem apresentar tempos de retenção próximos. Nesse contexto, a comparação entre os tempos de retenção e a sobreposição dos espectros de

absorção no ultravioleta dos padrões analíticos e das amostras constitui uma abordagem amplamente aceita para confirmar a identidade dos analitos (SNYDER *et al.*, 2010). A estabilidade espectral ao longo do pico cromatográfico é indicativa da ausência de coeluição significativa, reforçando a seletividade do método.

#### 3.5.2.2.2 *Linearidade*

A linearidade expressa a capacidade do método analítico em produzir respostas proporcionais à concentração do analito dentro de uma faixa previamente definida. Em CLAE, a linearidade é usualmente avaliada por meio da construção de curvas analíticas obtidas a partir de soluções padrão em diferentes níveis de concentração, seguidas de regressão linear do sinal cromatográfico em função da concentração (ICH Q2 (R1), 2005).

Embora o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) seja amplamente utilizado como critério inicial de avaliação da linearidade, abordagens estatísticas modernas recomendam a análise complementar dos resíduos e a verificação da homocedasticidade como critérios adicionais para a validação do modelo de calibração (OLIVIERI, 2015). A presença de resíduos aleatoriamente distribuídos e com variância aproximadamente constante ao longo da faixa de calibração indica a adequação do modelo linear adotado e contribui para a confiabilidade das estimativas quantitativas.

A linearidade, assegura a proporcionalidade entre a resposta do detector e a concentração do analito dentro das faixas de trabalho, permitindo comparações quantitativas confiáveis entre amostras coletadas em diferentes estações do ano. Em estudos de erva-mate, nos quais os teores de cafeína, teobromina e compostos fenólicos podem variar amplamente em função do genótipo e das condições ambientais, a definição adequada das faixas lineares é essencial para evitar erros sistemáticos de quantificação.

#### 3.5.2.2.3 *Limites de detecção e quantificação*

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) representam parâmetros fundamentais na avaliação da sensibilidade de um método analítico. O LOD corresponde à menor quantidade de analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada com precisão aceitável, enquanto o LOQ representa a menor concentração que pode ser determinada quantitativamente com incerteza controlada (ICH Q2 (R1), 2005).

Abordagens contemporâneas para a determinação dos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), como as recomendadas pela IUPAC, incorporam conceitos estatísticos mais robustos, considerando explicitamente os erros do tipo I e do tipo II associados às decisões analíticas (OLIVIERI, 2015). O erro do tipo I ( $\alpha$ ) corresponde à probabilidade de um falso positivo, isto é, indicar a presença do analito quando ele está ausente, enquanto o erro do tipo II ( $\beta$ ) representa a probabilidade de um falso negativo, quando o analito está presente, mas não é detectado. Essas metodologias utilizam parâmetros derivados da regressão linear, como a inclinação da curva analítica e o desvio padrão residual, proporcionando estimativas mais realistas e evitando a subestimação frequentemente observada em métodos baseados exclusivamente no sinal do branco.

Os limites de detecção e quantificação assumem papel estratégico na análise de erva-mate ao permitir a identificação e quantificação de compostos presentes em baixos teores, bem como na avaliação de variações sazonais sutis e diferenças metabólicas entre clones. A adoção de abordagens estatisticamente robustas para a determinação desses parâmetros contribui para a confiabilidade dos dados gerados, fortalecendo a interpretação dos resultados e sua aplicação em programas de melhoramento genético, controle de qualidade e desenvolvimento de produtos à base de erva-mate.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

#### 4.1.1 Amostras

As análises foram realizadas a partir de folhas e galhos finos de quatro materiais clonais de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.), desenvolvidos pela Embrapa. Foram avaliados os clones experimentais 26, 27 e 33, além da cultivar registrada Aupaba.

Os clones 26, 27 e 33 correspondem a materiais em fase de validação agrônômica e multiplicação vegetativa. A Aupaba, por sua vez, é uma cultivar oficialmente registrada e amplamente difundida em sistemas produtivos comerciais, sendo utilizada neste estudo como material de referência comparativa. A classificação dos materiais quanto ao teor de cafeína encontra-se apresentada na Tabela 1, organizada de modo a evidenciar diferenças entre materiais de baixo, médio e alto teor.

**Tabela 1 – Classificação dos clones de erva-mate de acordo com o teor de cafeína.**

Clone	Classificação por teor de cafeína
Clone 33	Baixo
Clone 26	Médio
Clone 27	Alto
Aupaba	Comercial

**Fonte: A autoria própria (2026).**

As plantas utilizadas para coleta não eram mudas comerciais, mas sim plantas matrizes clonais adultas, mantidas exclusivamente para fins de multiplicação vegetativa. Essas matrizes apresentavam idade aproximada entre dois e cinco anos, caracterizando-se como plantas em estágio adulto de desenvolvimento vegetativo. O cultivo dessas matrizes destinava-se unicamente à produção de estaquias para propagação clonal, não sendo as próprias plantas objeto de comercialização.

Todas as amostras foram obtidas no viveiro Golden Tree Viveiro Florestal, localizado no Logradouro 63-A, Gleba Cachoeira, s/n, distrito de Entre Rios, Guarapuava, Paraná, Brasil. As coordenadas geográficas do local são 25,567101° S (latitude) e 51,510537° W (longitude), com altitude média de aproximadamente 1.100 m. A região caracteriza-se por clima subtropical

úmido, com variações térmicas bem definidas ao longo do ano.

O cultivo das matrizes foi conduzido em ambiente protegido (Figura 11), em estufa agrícola com estrutura metálica arqueada e cobertura plástica translúcida, equipada com sistema interno de sombreamento. As plantas estavam dispostas em canaletas elevadas, organizadas em fileiras paralelas, sendo que cada clone ocupava uma canaleta específica, o que permitiu a individualização do material experimental.

**Figura 11 – Vista interna da estufa do viveiro Golden Tree, evidenciando o sistema de cultivo das matrizes clonais de erva-mate em canaletas com fertirrigação.**



**Fonte: Autoria própria (2026).**

O sistema de cultivo adotado foi hidropônico, utilizando pedrisco fino como substrato inerte. O manejo nutricional foi realizado por fertirrigação via gotejamento, aplicada duas vezes ao dia, garantindo fornecimento uniforme de nutrientes a todas as matrizes. A solução nutritiva empregada foi composta por fontes de macro e micronutrientes, incluindo fosfato monoamônico (MAP), nitrato de potássio, nitrato de cálcio, sulfato de amônio, sulfato de magnésio, sulfato de manganês, sulfato de zinco, molibdato de sódio, boro e ferro. Todas as plantas receberam a mesma quantidade de formulação nutritiva ao longo do período experimental.

A irrigação complementar foi realizada por aspersão, com frequência ajustada de acordo com as condições ambientais e o estado fisiológico das plantas. Em dias de temperaturas mais elevadas, a irrigação ocorreu, em média, três vezes ao dia, enquanto em dias mais amenos a

frequência foi reduzida. O ajuste da irrigação considerou principalmente a temperatura ambiente, mantendo-se condições hídricas adequadas e homogêneas entre os clones.

As coletas foram realizadas entre 10 h e 11 h da manhã, abrangendo as quatro estações do ano (inverno, primavera, verão e outono). A primeira coleta correspondeu ao inverno de 2024, realizada no final do mês de agosto, enquanto a última coleta ocorreu no outono de 2025, no final do mês de maio. A padronização do horário de coleta teve como objetivo minimizar variações associadas ao ciclo diurno e às oscilações térmicas ao longo do dia. As temperaturas registradas nos dias de coleta são apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2 – Temperaturas registradas nos dias de coleta das amostras de erva-mate em diferentes estações do ano dentro da estufa.**

Estação	Temperatura mínima (°C)	Temperatura média (°C)	Temperatura máxima (°C)
Inverno	11	24	32
Primavera	20	33	40
Verão	19	32	40
Outono	19	26	30

**Fonte: Autoria própria (2026).**

Em cada estação, foram coletados aproximadamente 200,00 g de material vegetal por clone, constituídos por folhas e galhos finos. A amostragem foi realizada de forma distribuída ao longo de toda a extensão da canaleta correspondente a cada clone, visando obter material representativo da matriz e reduzir possíveis variações intra-planta ou intra-canaleta.

Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em sacos de papel tipo *Kraft*, com o objetivo de reduzir a transpiração e evitar condensação de umidade, sendo posteriormente transportadas ao laboratório multiusuário da Central Analítica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), campus Toledo-PR, onde foram conduzidas as análises químicas.

Com o intuito de caracterizar as condições térmicas às quais os clones foram submetidos ao longo do período experimental, foram considerados os valores de temperatura mínima, média e máxima correspondentes a intervalos representativos de cada estação do ano. O monitoramento da temperatura interna da estufa foi realizado por meio de leituras manuais registradas a cada hora, em dias comerciais, no intervalo das 8h às 18h. A partir desses registros foram determinadas as temperaturas máxima, média e mínima diárias utilizadas nas análises subsequentes.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Processamento das amostras

Em laboratório, realizou-se a classificação das amostras, que envolveu a seleção e higienização das folhas com água destilada, removendo resíduos de fertilizantes, folhas em estado não adequado ou outras substâncias estranhas, assegurando a pureza do material a ser analisado.

Seguindo a metodologia adaptada de Balzan *et al.* (2013), o material foi seco em estufa com circulação de ar por 24 horas a  $45 \pm 1$  °C. Posteriormente, as amostras foram trituradas em moinho de facas e peneiradas em peneira N° 20 (mesh Tyler), para a padronização da granulometria. O material foi acondicionado em sacos transparentes de polietileno a vácuo e armazenado em congelador em temperatura de -20 °C, de modo a preservar a sua integridade até a realização das análises laboratoriais.

A Figura 12 apresenta as etapas do processamento das amostras de erva-mate, incluindo a classificação e higienização das folhas, moagem, peneiramento e acondicionamento a vácuo.

**Figura 12 – Processamento das amostras: (A) Classificação; (B) Moagem da amostra seca; (C) Peneiramento; e (D) Acondicionamento em embalagem a vácuo.**



Fonte: A autoria própria (2026).

#### 4.2.2 Determinação de umidade residual

A determinação de umidade residual foi realizada conforme descrito em BRASIL (2019). Os cadinhos foram previamente submetidos à dessecação em estufa por 30 minutos e, em seguida, resfriados até atingirem a temperatura ambiente em um dessecador. Posteriormente, alíquotas de 2,5 g, em duplicata, da amostra pulverizada foram pesadas em balança analítica e submetidas à secagem em estufa a 105 °C por um período de 5 horas. Após a secagem, as amostras foram novamente resfriadas até a temperatura ambiente em um dessecador e, então, pesadas em uma balança analítica para a determinação da perda de massa.

#### 4.2.3 Preparo dos extratos

O preparo dos extratos foi realizado em triplicata, conforme a metodologia descrita por Balzan *et al.* (2013), com adaptações. Para cada ensaio, pesou-se  $1,000 \pm 1,001$  g de amostra triturada e seca em balança analítica, adicionando-se 10 mL de solução extratora etanol:água (70:30, v/v). A extração foi conduzida sob agitação em um shaker orbital, a  $25 \pm 1$  °C, com velocidade de 175 rpm, durante 24 horas, sob proteção da luz. Após o período de maceração, os extratos foram filtrados em papel filtro qualitativo (J. Prolab) e armazenados em tubos Falcon, sob proteção da luz, em congelador a -20 °C até a realização das análises.

A escolha da mistura etanol:água como solvente extrator deve-se ao fato de o etanol apresentar elevada eficiência na extração de compostos fenólicos e alcaloides de matrizes vegetais, incluindo a erva-mate, conforme demonstrado por KRAKOWSKA-SIEPRAWKA *et al.* (2020) que compararam diferentes solventes e confirmaram o bom desempenho do etanol para esse fim. Já o período de 24 horas de maceração foi adotado com base em protocolos descritos na literatura, nos quais esse tempo mostrou-se suficiente para garantir a extração eficiente e reprodutível, sem degradação significativa dos compostos bioativos, como observado em extratos de erva-mate obtidos por Ribeiro *et al.* (2023) e também descrito por Balzan *et al.* (2013).

#### 4.2.4 Determinação de compostos fenólicos totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada segundo o método descrito por Boroski *et al.* (2015), com adaptações. Inicialmente, preparou-se uma solução padrão de ácido gálico ( $\geq 95$  %, HPLC, Sigma Aldrich) sob proteção da luz, dissolvendo-se 0,010 g do

reagente em 50 mL de água destilada, obtendo-se uma concentração de  $200 \text{ mg L}^{-1}$ . A partir dessa solução, foram realizadas diluições sucessivas para construção da curva analítica, com concentrações variando de 0 a  $200 \text{ mg L}^{-1}$ .

Para a reação, pipetou-se  $250 \mu\text{L}$  da solução de extrato da amostra (diluída 1:100 v/v em etanol 70 %) ou da solução padrão, adicionando-se  $250 \mu\text{L}$  do reagente de Folin-Ciocalteu de grau P.A. (diluído 1:1 v/v em água destilada),  $500 \mu\text{L}$  de solução saturada de carbonato de sódio (P.A.) e 4,0 mL de água destilada. As misturas foram agitadas para homogeneização e mantidas à temperatura ambiente, protegidas da luz, por 25 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos.

O branco foi preparado utilizando  $250 \mu\text{L}$  do solvente empregado na extração (etanol 70 %), submetido às mesmas condições experimentais.

As medições de absorvância foram realizadas em um espectrofotômetro *Thermo Scientific GENESYS 40*, equipamento de feixe duplo que opera na faixa do visível (325–1100 nm) com largura de banda espectral de 5 nm. As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 725 nm.

O teor de compostos fenólicos totais foi calculado com base nas absorvâncias obtidas por espectrofotometria UV-Vis, considerando os parâmetros da curva analítica (inclinação e intercepto), o fator de diluição aplicado, o volume final do extrato preparado e a massa seca da amostra analisada. Os resultados foram expressos em  $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  (%) de amostra seca, representando a quantidade de compostos fenólicos totais (Equação 2).

$$\text{Fenólicos Totais} = \frac{\left(\frac{A-b}{a} \times FD \times V_{\text{extrato}}\right)}{m_{\text{amostra}} \times 10} \quad (2)$$

Em que:

$A$  = absorvância do extrato;

$a$  = inclinação da curva analítica ( $\text{mg L}^{-1}$ );

$b$  = intercepto da curva analítica;

$FD$  = fator de diluição total aplicado à amostra;

$V_{\text{extrato}}$  = volume total do extrato preparado (L);

$m_{\text{amostra}}$  = massa da amostra seca (g).

#### 4.2.4.1 Determinação de flavonoides

A quantificação de flavonoides foi realizada segundo o método descrito por Boroski *et al.* (2015), com adaptações. A solução padrão de quercetina (Sigma Aldrich) foi preparada sob proteção da luz, dissolvendo 10 mg do reagente em balão volumétrico e completando o volume para 5 mL com metanol (P.A.), obtendo-se uma concentração de  $2000 \text{ mg L}^{-1}$ . A partir desta solução, foram realizadas diluições sucessivas em metanol para construção da curva analítica, com concentrações variando de 0 a  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . O branco foi preparado nas mesmas condições.

Para a análise, as amostras foram previamente diluídas na proporção 1:10 (v/v) em metanol, correspondendo a um fator de diluição de 10. Em seguida, pipetou-se  $500 \mu\text{L}$  da solução de extrato diluída, adicionando-se  $250 \mu\text{L}$  de solução de cloreto de alumínio 5 % (v/v em metanol) e 4,25 mL de metanol. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente sob proteção da luz por 30 minutos. A absorbância máxima foi determinada em espectrofotômetro UV-Vis a 425 nm, utilizando o branco como referência.

O teor de flavonoides nos extratos foi calculado de forma análoga aos fenólicos totais, considerando o fator de diluição ( $\text{FD} = 10$ ) da amostra, o volume final do extrato preparado e a massa seca analisada, conforme a Equação 2. Os resultados foram expressos em  $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  (%) de amostra seca, representando a quantidade de flavonoides presentes.

#### 4.2.5 Determinação de cafeína, teobromina e ácido clorogênico por CLAE dos extratos

Seguiu-se a metodologia descrita por Gebara *et al.* (2020), com algumas adaptações. A análise dos compostos foi realizada por CLAE, utilizando o sistema UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific), equipado com detector UV-Vis (Dionex UltiMate 3000 RS Diode Array Detector), bomba quaternária (LPG-3400SD), compartimento de coluna termostaticado (TCC-3400RS) e válvula injetora manual de  $20 \mu\text{L}$ . A separação cromatográfica foi realizada em coluna de fase reversa C18 (ZORBAX Eclipse XDB,  $250,0 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm} \times 5,0 \mu\text{m}$ ), mantida a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Os extratos foram previamente diluídos (1:10) em diluente composto por água ultrapura e metanol (85:15, v/v) e filtrados em membranas de nylon de  $0,45 \mu\text{m}$ . O sistema de eluição foi constituído por fase móvel A (água acidificada com 0,3 % de ácido acético) e fase B (metanol grau HPLC), com vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , em gradiente: 15-20 % B (20 min), 20-40 % B (25 min), 40-85 % B (50 min), retornando a 15 % B (10 min). A detecção foi realizada a 265 nm para cafeína e teobromina, e a 325 nm para os ácidos clorogênicos mono e di-cafeoilquínicos (3-CQA,

5-CQA, 4-CQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA e 4,5-diCQA).

A identificação dos compostos cafeína, teobromina e ácido clorogênico foi realizada por comparação dos tempos de retenção com os padrões analíticos comerciais (Sigma-Aldrich e Supelco; pureza  $\geq 99\%$ ), além da confirmação espectral via detector de arranjo de diodos (DAD). Os derivados dos ácidos clorogênicos (3-CQA, 4-CQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA e 4,5-diCQA) foram identificados com base na literatura especializada Gebara *et al.* (2020), considerando os tempos de retenção relativos e o perfil espectral UV-Vis característico de cada composto. Foram utilizados cálculos de razão entre massas molares e comparação com padrões estruturais para confirmar a identidade dos derivados, mesmo na ausência de padrões comerciais individuais (GEBARA *et al.*, 2017).

Para a quantificação dos derivados do ácido clorogênico, foi utilizada a curva analítica do 5-CQA como referência. As concentrações foram ajustadas aplicando-se um fator de correção (FC) baseado na razão entre a massa molar do derivado e a do 5-CQA, conforme a Equação 3 e Tabela 3, assumindo comportamento espectrofotométrico semelhante a 325 nm. Essa abordagem é comum em estudos fitoquímicos, permitindo estimar com precisão os teores de compostos relacionados.

$$FC = \frac{Mm_{\text{derivado}}}{Mm_{5\text{-CQA}}} \quad (3)$$

Em que:

$FC$  = fator de correção;

$Mm_{\text{derivado}}$  = massa molar do derivado do ácido clorogênico considerado ( $\text{g mol}^{-1}$ );

$Mm_{5\text{-CQA}}$  = massa molar do ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) ( $\text{g mol}^{-1}$ ).

**Tabela 3 – Massas molares e fatores de correção utilizados para os derivados do ácido clorogênico.**

Composto	Massa molar ( $\text{g.mol}^{-1}$ )	Fator de correção (FC)
5-CQA (base)	354,31	1,00
3-CQA	354,31	1,00
4-CQA	354,31	1,00
3,4-diCQA	516,44	1,46
3,5-diCQA	516,44	1,46
4,5-diCQA	516,44	1,46

**Fonte: Autoria própria (2026).**

As curvas analíticas foram construídas dentro das faixas de trabalho estabelecidas: 0 a 75  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para teobromina, 0 a 400  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para cafeína, e 0 a 400  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para ácido clorogênico

(5-CQA), permitindo a quantificação das amostras dentro dos limites lineares do método. Os teores dos compostos foram calculados a partir da área dos picos cromatográficos, utilizando-se as respectivas curvas analíticas e aplicando, quando necessário, o fator de diluição (FD), considerando o volume total do extrato ( $V_{\text{extrato}}$ ) e a massa da amostra seca ( $m_{\text{amostra}}$ ), sendo os resultados expressos em  $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ , conforme a Equação 4:

$$\text{Teor (\% m/m)} = FC \times \frac{\left(\frac{A-b}{a}\right) \times FD \times V_{\text{extrato}}}{m_{\text{amostra}} \times 10} \quad (4)$$

onde:

- $A$  = área do pico obtida (mAU min);
- $a$  = inclinação da curva analítica (mAU min L  $\text{mg}^{-1}$ );
- $b$  = intercepto da curva analítica (mAU min);
- $FD$  = fator de diluição total da amostra;
- $V_{\text{extrato}}$  = volume total do extrato preparado (L);
- $m_{\text{amostra}}$  = massa da amostra seca (g).
- $FC$  = fator de correção aplicado ao teor calculado.

#### 4.2.5.1 Seletividade do método

A avaliação da seletividade seguiu as recomendações internacionais para validação de métodos cromatográficos, conforme descrito pelo ICH Q2 (R1) (2005) e também por Snyder *et al.* (2010), sendo realizada por meio da comparação dos tempos de retenção e dos espectros de absorção no ultravioleta obtidos pelo detector de arranjo de diodos (DAD) para os padrões analíticos de teobromina, cafeína e ácido clorogênico (5-CQA), bem como para os extratos de erva-mate analisados.

A identificação dos analitos foi realizada por meio da concordância entre os tempos de retenção dos padrões analíticos e aqueles observados nas amostras, associada à comparação dos espectros de absorção UV-Vis extraídos no intervalo de tempo correspondente a cada pico cromatográfico, obtidos pelo detector DAD.

A ausência de coeluição significativa foi avaliada por meio da análise da consistência espectral ao longo do perfil do pico, comparando-se os espectros registrados em diferentes pontos

do tempo de retenção (início, região central e final do pico). A invariabilidade do perfil espectral indicou que o sinal analítico corresponde predominantemente ao composto de interesse, sem evidências de interferências detectáveis por variação espectral.

#### 4.2.5.2 Linearidade

A linearidade do método cromatográfico foi avaliada de acordo com as recomendações do ICH Q2 (R1) (2005) e com abordagens estatísticas para calibração analítica descritas por Olivieri (2015), por meio da construção de curvas analíticas a partir de soluções padrão de teobromina, cafeína e ácido clorogênico (5-CQA), abrangendo faixas de concentração compatíveis com os níveis esperados nas amostras de erva-mate.

Para a cafeína e o 5-CQA, foram construídas curvas analíticas distintas para as faixas de baixo e alto teor, enquanto para a teobromina foi utilizada uma única faixa de calibração. As curvas foram obtidas por regressão linear do sinal cromatográfico em função da concentração dos analitos.

A avaliação da linearidade incluiu a análise do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), a inspeção gráfica dos resíduos e a verificação da homocedasticidade ao longo das faixas de calibração. A homogeneidade da variância residual foi investigada por meio do teste de Breusch–Pagan.

Adicionalmente, foram avaliados diferentes modelos de regressão, incluindo regressão linear simples (não ponderada) e regressões ponderadas pelos fatores  $1/x$  e  $1/x^2$ , com o objetivo de investigar possíveis efeitos de heterocedasticidade ao longo das faixas de concentração.

#### 4.2.5.3 Determinação dos limites de detecção e quantificação

A determinação dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foi realizada a partir dos parâmetros das curvas analíticas previamente avaliadas quanto à linearidade e ao comportamento dos resíduos, conforme descrito na subseção anterior. A homocedasticidade dos resíduos das regressões lineares foi verificada por meio do teste de Breusch–Pagan, assegurando a adequação do modelo linear para a estimativa estatística desses limites.

Os valores de LOD e LOQ foram calculados segundo as recomendações modernas da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), conforme descrito por Olivieri (2015). Essa abordagem adota um tratamento estatístico mais rigoroso do que a definição clássica,

ao considerar explicitamente os riscos de erro do tipo I (*falsos positivos*,  $\alpha$ ) e do tipo II (*falsos negativos*,  $\beta$ ).

O limite de detecção univariado ( $\text{LOD}_u$ ) foi calculado a partir da expressão geral apresentada na Equação 5.

$$\text{LOD}_u = \frac{t(\alpha, \nu)s_{c,0} + t(\beta, \nu)s_{c,\text{LOD}}}{A} \sqrt{1 + h_0 + \frac{1}{I}} \quad (5)$$

em que:

- $t(\alpha, \nu)$  e  $t(\beta, \nu)$  são os coeficientes da distribuição  $t$  de Student, associados às probabilidades  $\alpha$  e  $\beta$ , com  $\nu$  graus de liberdade;
- $s_{c,0}$  e  $s_{c,\text{LOD}}$  correspondem aos erros padrão das concentrações para o branco e para o nível de detecção, respectivamente;
- $A$  é a inclinação (*slope*) da curva de calibração;
- $I$  é o número de pontos de calibração utilizados;
- $h_0$  é a alavancagem (*leverage*) do branco, calculada conforme a Equação 6.

$$h_0 = \frac{(c_{\text{cal}} - \bar{c})^2}{\sum_{i=1}^I (c_i - \bar{c})^2} \quad (6)$$

onde  $c_{\text{cal}}$  é a concentração do branco,  $c_i$  são as concentrações individuais empregadas na calibração e  $\bar{c}$  é a concentração média do conjunto calibrado.

Assumindo  $s_{c,0} = s_{c,\text{LOD}}$ , níveis de confiança de 95% ( $\alpha = \beta = 0,05$ ) e número elevado de graus de liberdade, a Equação 5 simplifica-se para a forma apresentada na Equação 7.

$$\text{LOD}_u = \frac{3,3 s_{y/x}}{A} \sqrt{1 + h_0 + \frac{1}{I}} \quad (7)$$

O termo  $s_{y/x}$  representa o desvio padrão residual da regressão, calculado conforme a Equação 8.

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I (y_i - \hat{y}_i)^2}{I - 2}} \quad (8)$$

sendo  $y_i$  os sinais experimentais medidos e  $\hat{y}_i$  os valores previstos pela equação da reta.

O limite de quantificação ( $\text{LOQ}_u$ ) foi calculado de forma análoga, substituindo o fator 3,3 por 10, conforme a Equação 9, de modo a garantir uma incerteza relativa máxima de 10% na quantificação.

$$\text{LOQ}_u = \frac{10 s_{y/x}}{A} \sqrt{1 + h_0 + \frac{1}{I}} \quad (9)$$

Essa metodologia, descrita por Olivieri (2015), permitiu uma estimativa estatisticamente mais realista dos limites de detecção e quantificação, evitando a subestimação comum na definição clássica baseada em  $3\sigma_{\text{branco}}$ .

#### 4.2.6 Análise estatística

Para avaliar a influência da sazonalidade e da variabilidade entre clones na composição química de *Ilex paraguariensis*, foi conduzida uma análise estatística visando comparar os teores de compostos bioativos (fenólicos totais, flavonoides, cafeína, teobromina, ácido clorogênico e seus derivados) em um delineamento fatorial  $4 \times 4$ , considerando quatro clones (C26, C27, C33 e Aupaba) e quatro estações do ano (inverno, primavera, verão e outono). Essa abordagem é mais adequada ao objetivo do estudo, pois permite avaliar simultaneamente os efeitos principais do clone e da estação, bem como a interação entre esses dois fatores, verificando se o comportamento dos compostos bioativos ao longo das estações difere conforme o clone avaliado. Todas as análises foram conduzidas no ambiente computacional R (R CORE TEAM, 2025), versão 4.4.3, utilizando a interface RStudio (POSIT TEAM, 2025).

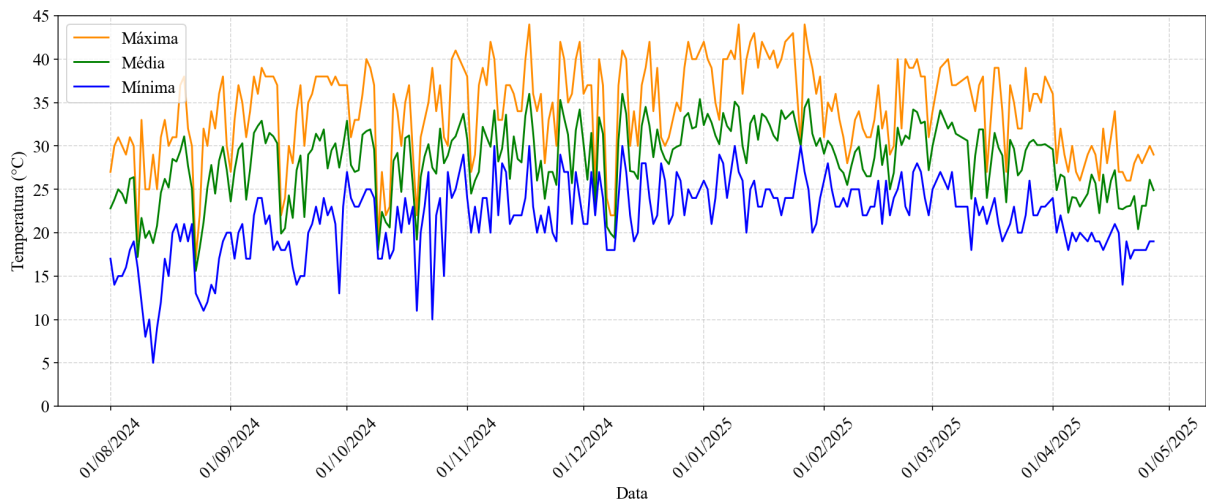
Para cada composto bioativo, foram verificados os pressupostos de normalidade dos resíduos por meio do teste de Shapiro-Wilk e de homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene, ambos com nível de significância de  $\alpha = 0,05$ . Atendidos esses pressupostos, aplicou-se a ANOVA fatorial com os fatores clone e estação do ano. Em caso de significância estatística ( $p < 0,05$ ), procedeu-se ao teste de comparações múltiplas de Tukey para identificação das diferenças entre os grupos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CONDIÇÕES TÉRMICAS NO INTERIOR DA ESTUFA AO LONGO DO PERÍODO EXPERIMENTAL

O comportamento térmico diário registrado na estufa de cultivo durante os períodos associados ao inverno, primavera, verão e outono é apresentado na Figura 13.

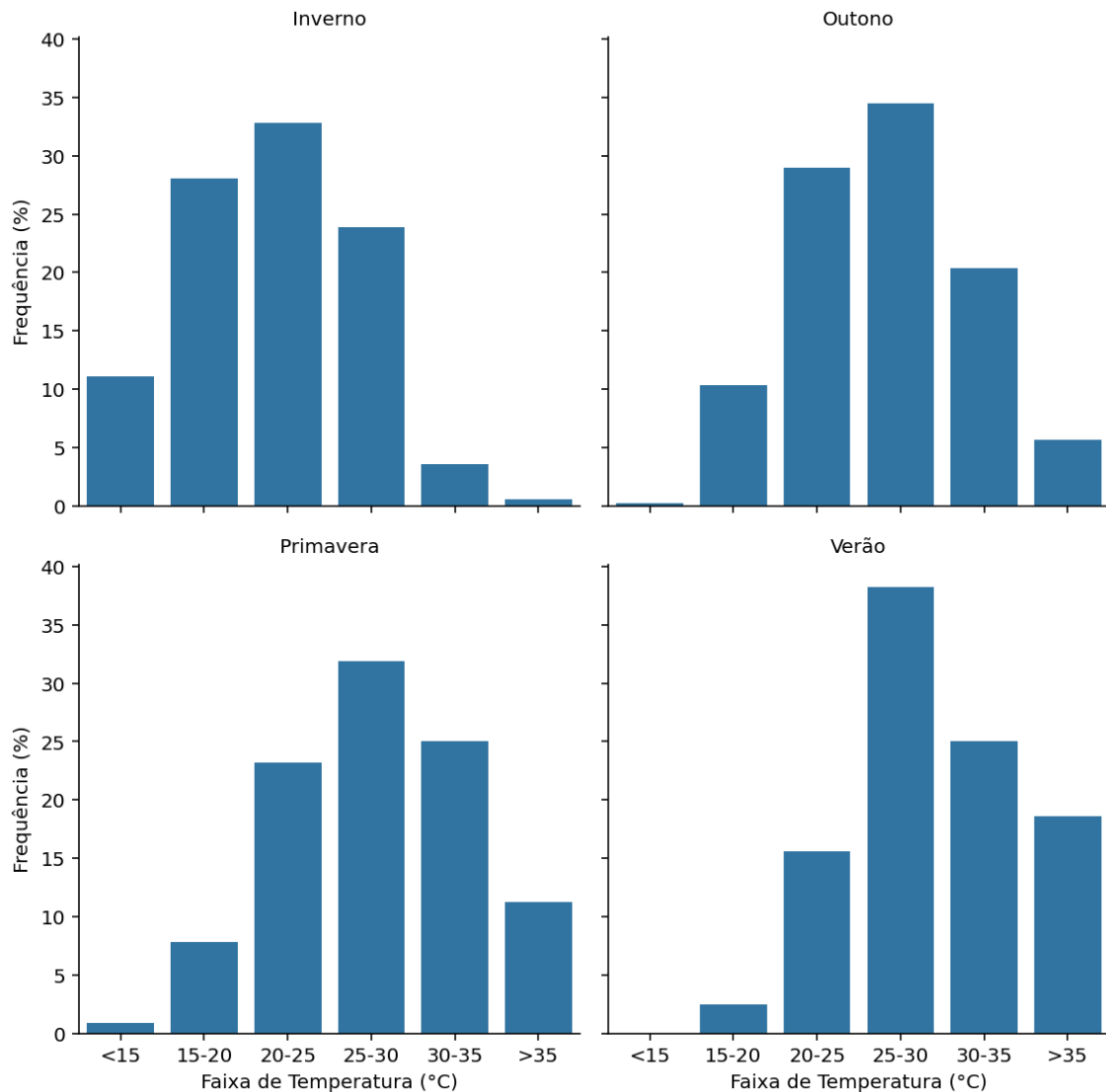
**Figura 13 – Temperaturas máxima, média e mínima diárias registradas na estufa durante o período experimental (agosto de 2024 a maio de 2025).**



**Fonte: Autoria própria (2026).**

A distribuição percentual das faixas de temperatura registradas na estufa ao longo das estações do ano está apresentada na Figura 14. Observa-se variação sazonal bem definida na frequência das classes térmicas, evidenciando mudanças expressivas no regime térmico do ambiente experimental ao longo do ciclo avaliado.

**Figura 14 – Distribuição percentual da frequência de ocorrência das faixas de temperatura registradas na estufa, por estação do ano, no período de agosto de 2024 a maio de 2025.**



**Fonte: Autoria própria (2026).**

Durante o inverno, predominou a faixa de 20–25 °C, seguida da faixa de 25–30 °C, com baixa ocorrência de temperaturas superiores a 30 °C, configurando as condições térmicas mais amenas do período experimental e menor exposição das plantas a episódios de calor. No outono, verificou-se distribuição mais equilibrada entre essas duas faixas, com aumento discreto da frequência de temperaturas acima de 30 °C em comparação ao inverno, sinalizando uma transição gradual no regime térmico do ambiente de cultivo.

Na primavera, houve intensificação progressiva do aquecimento no interior da estufa, expressa pelo aumento na frequência das faixas de 25–30 °C e 30–35 °C. Esse comportamento tornou-se ainda mais acentuado no verão, estação que concentrou a maior frequência de registros na faixa de 25–30 °C e elevada ocorrência de temperaturas entre 30–35 °C e acima de 35 °C,

caracterizando o período de maior carga térmica sobre as plantas ao longo de todo o experimento.

## 5.2 DETERMINAÇÃO DE UMIDADE RESIDUAL

A determinação da umidade residual das amostras secas é essencial para garantir a estabilidade e conservação do material armazenado, além de permitir a correta quantificação dos compostos bioativos, uma vez que os teores são expressos com base na massa seca. Essa umidade refere-se à quantidade remanescente de água após o processo de secagem padronizado realizado previamente à análise.

A Tabela 4 apresenta os valores médios e os respectivos desvios-padrão dos teores de umidade residual (%) das amostras dos clones C26, C27, C33 e Aupaba de erva-mate, analisadas nas estações de inverno, primavera e verão.

**Tabela 4 – Umidade residual (%  $\pm$  desvio-padrão) das amostras secas de diferentes clones de erva-mate, analisadas em três estações do ano.**

Estação	C26	C27	C33	Aupaba
Inverno	4,52 $\pm$ 0,27	4,86 $\pm$ 0,19	4,71 $\pm$ 0,26	4,11 $\pm$ 0,22
Primavera	4,16 $\pm$ 0,08	4,49 $\pm$ 0,08	4,42 $\pm$ 0,05	4,14 $\pm$ 0,09
Verão	5,31 $\pm$ 0,18	5,68 $\pm$ 0,10	5,59 $\pm$ 0,06	5,07 $\pm$ 0,07
Outono	5,09 $\pm$ 0,07	5,21 $\pm$ 0,04	5,01 $\pm$ 0,03	5,27 $\pm$ 0,09

**Fonte: A autoria própria (2026).**

Os teores de umidade observados nos diferentes clones e estações do ano apresentaram valores consistentemente baixos, como esperado para amostras de erva-mate já processadas. Conforme mostrado na Tabela 4, os valores médios variaram entre 4,11  $\pm$  0,22 % (Aupaba no inverno) e 5,68  $\pm$  0,04 % (C27 no verão). Todos os valores obtidos encontram-se significativamente abaixo do limite máximo de 10 % estabelecido pela Resolução RDC n.º 277, de 22 de setembro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2005), confirmando que as amostras secas a 45 °C por 24 horas atendem plenamente aos critérios oficiais de controle de qualidade e são adequadas para análises laboratoriais subsequentes.

Resultados semelhantes foram relatados por Tomasi *et al.* (2021), que observaram teores médios de umidade em torno de 7,52 % em folhas de *Ilex paraguariensis* secas a 40 °C em estufa. Já Frizon *et al.* (2017) relataram variações entre 5,4 % e 6,5 % em folhas submetidas ao mesmo tipo de tratamento térmico. Assim, os valores obtidos neste estudo encontram-se dentro da faixa esperada para a espécie e corroboram os dados disponíveis na literatura, reforçando a

eficiência do processo de secagem empregado quanto à redução da umidade para níveis ideais de conservação e posterior extração dos compostos bioativos.

### 5.3 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONOIDES

#### 5.3.1 Influência da sazonalidade sobre os compostos fenólicos totais e flavonoides nos clones modificados de erva-mate

A Tabela 5 apresenta os teores médios ( $\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ , base seca) de compostos fenólicos totais e flavonoides nos clones C26, C27, C33 e Aupaba, avaliados nas quatro estações do ano. Observa-se clara variação sazonal associada ao clone genético, evidenciando uma forte interação entre o genótipo e os fatores sazonais.

As curvas analíticas apresentaram linearidade nos intervalos de concentração utilizados. Para a determinação de compostos fenólicos totais, a curva construída com o padrão de ácido gálico foi descrita pela equação  $y = 0,0052x + 0,0258$ , com coeficiente de determinação  $R^2 = 0,9983$ . Já para os flavonoides, a curva obtida com o padrão de quercetina apresentou a equação  $y = 0,0080x - 0,0084$ , com  $R^2 = 0,9961$ .

**Tabela 5 – Teores médios (média  $\pm$  desvio padrão, n = 3) em  $\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$  em base seca de compostos fenólicos totais e flavonoides nos clones de erva-mate ao longo das estações do ano.**

Composto / Clone	Inverno	Primavera	Verão	Outono
<b>Fenólicos Totais</b>				
C26	5,01 $\pm$ 0,43 fg	4,04 $\pm$ 0,09 bc	4,56 $\pm$ 0,23 cdef	4,77 $\pm$ 0,11 defg
C27	4,46 $\pm$ 0,31 cdef	5,05 $\pm$ 0,20 fg	6,01 $\pm$ 0,31 h	4,93 $\pm$ 0,34 fg
C33	4,20 $\pm$ 0,36 cde	3,34 $\pm$ 0,08 ab	4,89 $\pm$ 0,25 efg	5,38 $\pm$ 0,11 gh
Aupaba	5,29 $\pm$ 0,19 g	4,12 $\pm$ 0,12 cd	5,32 $\pm$ 0,08 gh	2,81 $\pm$ 0,06 a
<b>Flavonoides</b>				
C26	0,88 $\pm$ 0,04 f	0,77 $\pm$ 0,03 e	0,52 $\pm$ 0,03 ab	0,76 $\pm$ 0,02 e
C27	0,75 $\pm$ 0,04 e	0,72 $\pm$ 0,02 de	0,59 $\pm$ 0,01 bc	0,74 $\pm$ 0,03 e
C33	0,62 $\pm$ 0,02 c	0,65 $\pm$ 0,05 cd	0,49 $\pm$ 0,01 a	0,65 $\pm$ 0,02 cd
Aupaba	0,53 $\pm$ 0,01 ab	0,49 $\pm$ 0,01 a	0,51 $\pm$ 0,02 ab	0,50 $\pm$ 0,02 a

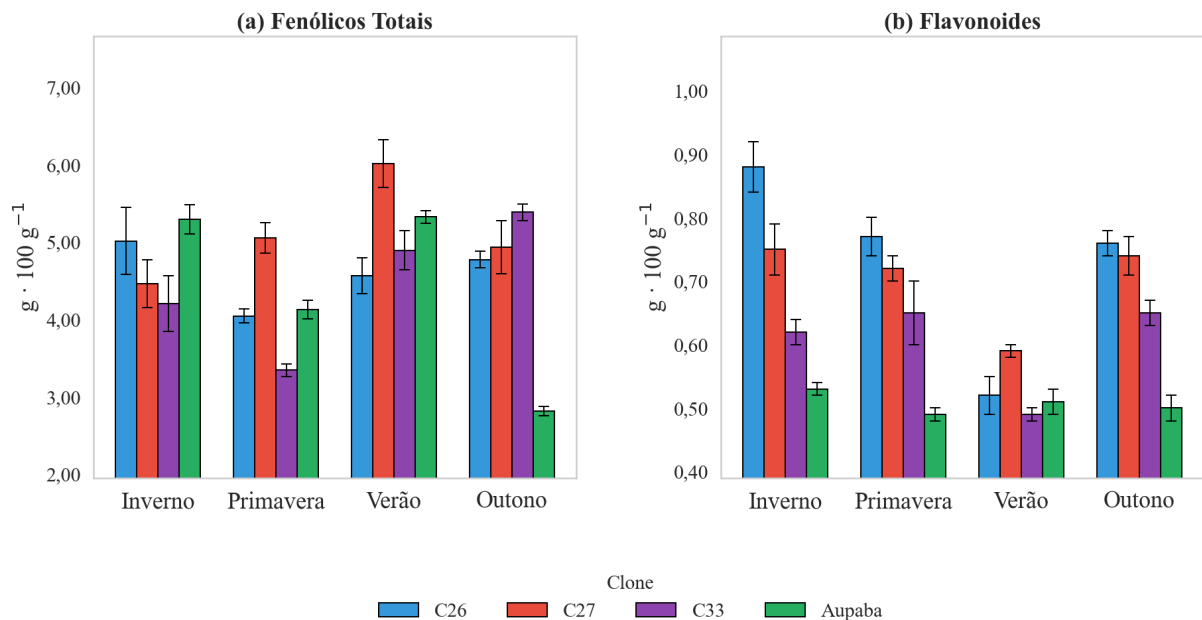
*Letras minúsculas iguais indicam ausência de diferença significativa entre os tratamentos (clone  $\times$  estação), pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, aplicado à ANOVA fatorial.*

**Fonte: A autoria própria (2026).**

Os resultados apresentados na Tabela 5 mostram variação sazonal consistente e de-

pendente do genótipo para ambos os grupos de compostos. Em relação aos fenólicos totais, o clone C27 atingiu o maior teor durante o verão (6,01 g·100 g<sup>-1</sup>), o que representa um incremento de aproximadamente 35 % em relação ao inverno (4,46 g·100 g<sup>-1</sup>). O clone C26 apresentou pico no inverno (5,01 g·100 g<sup>-1</sup>), cerca de 24 % superior ao observado na primavera (4,04 g·100 g<sup>-1</sup>). O comportamento do clone C33 difere dos demais: o menor teor foi registrado na primavera (3,34 g·100 g<sup>-1</sup>) e o maior no outono (5,38 g·100 g<sup>-1</sup>), correspondendo a um aumento aproximado de 61 % entre essas estações. Já o clone Aupaba manteve valores próximos entre inverno (5,29 g·100 g<sup>-1</sup>) e verão (5,32 g·100 g<sup>-1</sup>), mas sofreu redução acentuada no outono (2,81 g·100 g<sup>-1</sup>), equivalente a cerca de 47 % em relação ao verão. Para os flavonoides observou-se tendência inversa em relação à sazonalidade: maiores teores no inverno e diminuição nas estações mais quentes. O clone C26, por exemplo, apresentou 0,88 g·100 g<sup>-1</sup> no inverno e 0,52 g·100 g<sup>-1</sup> no verão (redução 41 %); o clone C27 reduziu de 0,75 para 0,59 g·100 g<sup>-1</sup> (21 %). Os clones C33 e Aupaba exibiram variações menos pronunciadas, sugerindo maior estabilidade sazonal nesses genótipos. A Figura 15 sintetiza esses padrões.

**Figura 15 – Teores médios de compostos fenólicos totais (a) e flavonoides (b) em diferentes clones de erva-mate, expressos em g·100 g<sup>-1</sup> (base seca), de acordo com a estação de coleta.**



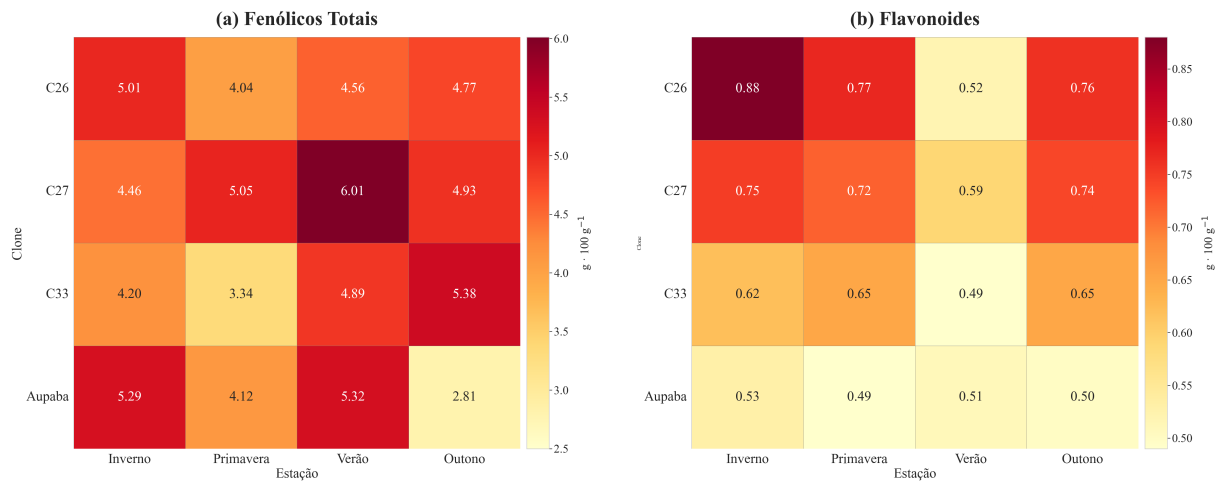
**Fonte: Autoria própria (2026).**

A Figura 15a reforça visualmente os padrões descritos na Tabela 5, evidenciando diferenças entre os clones e variações ao longo das estações. O clone C27 apresenta os maiores teores de fenólicos totais no verão, enquanto C26 demonstra valores relativamente elevados

ao longo do ciclo, com maior média observada no inverno. O clone C33 apresenta incremento gradual dos teores da primavera até o outono. Já o clone Aupaba apresenta redução no verão em comparação às demais estações, diferindo do padrão observado para os demais clones nesse período.

Para os flavonoides (Figura 15b), observa-se maior concentração no inverno, especialmente nos clones C26 e C27, com redução nas estações subsequentes. O clone C33 apresenta variação moderada ao longo das estações, enquanto Aupaba mantém os menores teores absolutos entre os clones avaliados.

**Figura 16 – Mapa de calor dos teores médios de compostos fenólicos totais (a) e flavonoides (b) em clones de erva-mate, expressos em  $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  (base seca), em função das estações do ano.**



**Fonte: Autoria própria (2026).**

A Figura 16a, aprofunda a visualização desses padrões, permitindo identificar de forma mais clara as variações sazonais relativas entre os clones. Nota-se que o clone C27 mantém teores consistentemente elevados de fenólicos totais, alcançando no verão o valor máximo entre todos os materiais ( $6,01 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ). O Aupaba exibe alta concentração no verão, mas queda acentuada no outono, enquanto o C33 apresenta um aumento gradual até atingir o pico nessa mesma estação. Essa distribuição destaca a influência conjunta da genética e da sazonalidade sobre a biossíntese desses compostos.

Na Figura 16b, observa-se um padrão inverso para os flavonoides, com predominância dos maiores teores no inverno e redução no verão. O clone C26 apresenta o valor mais elevado nesse período, seguido por C27, enquanto o Aupaba mantém teores mais constantes ao longo do ciclo. De modo geral, o mapa de calor evidencia de forma integrada as oscilações sazonais contrastantes entre fenólicos totais e flavonoides.

Os aumentos nos teores de fenólicos durante o verão podem ser explicados pelas respostas adaptativas das plantas aos diferentes tipos de estresse ambiental presentes em cada estação. No verão, a radiação solar intensa, juntamente com temperaturas elevadas, provoca um aumento na produção de fenólicos como estratégia de proteção contra o fotodano e o calor excessivo (CAO *et al.*, 2019; CLARO *et al.*, 2024; FERRERA *et al.*, 2016; GAUDE; JALMI, 2025). Esses compostos atuam como filtros solares naturais e antioxidantes, protegendo as células dos danos causados pelos radicais livres gerados durante o estresse oxidativo (GAUDE; JALMI, 2025).

Por outro lado, durante o inverno, as plantas enfrentam condições de frio extremo, que também estimulam a síntese de fenólicos e flavonoides como mecanismos de defesa (GAUDE; JALMI, 2025). Esses compostos ajudam a reduzir os danos causados pelo estresse oxidativo e contribuem para a manutenção da integridade celular em condições adversas (CAO *et al.*, 2019; CLARO *et al.*, 2024; GAUDE; JALMI, 2025).

Ao comparar com a literatura, observa-se ampla variabilidade nos teores de compostos fenólicos totais em *Ilex paraguariensis*, atribuída a diferenças genéticas, ambientais e metodológicas. Frizon *et al.* (2015) avaliaram amostras de diferentes regiões do Paraná, encontrando valores entre 2,31 e 16,85 g·100 g<sup>-1</sup>, evidenciando a influência ambiental e genética. Croge *et al.* (2021), em revisão abrangente que incluiu Mateos *et al.* (2018) e Souza *et al.* (2015), também relataram ampla variação nos teores, confirmada por Mendonça *et al.* (2025), que, ao otimizar extrações hidroetanólicas assistidas por ultrassom e ajustar a proporção sólido:líquido, obtiveram valores de até aproximadamente 11,2 g·100 g<sup>-1</sup> em determinados genótipos. Esses dados ressaltam que o método extrativo exerce papel decisivo na magnitude dos teores obtidos. Os níveis encontrados neste estudo (3,34–6,01 g·100 g<sup>-1</sup>) situam-se na faixa baixa a média da literatura, condizentes com o tipo de material analisado e a metodologia empregada.

A predominância foliar das amostras aqui analisadas justifica esses resultados, uma vez que as folhas concentram maiores níveis de compostos fenólicos devido ao seu papel na defesa contra radiação UV e estresses bióticos, conforme destacado por Croge *et al.* (2021) e Souza *et al.* (2015), que atribuíram os maiores teores foliares à elevada atividade antioxidante e maior presença de compostos de defesa (SOUZA *et al.*, 2015; AGUIAR *et al.*, 2024; YIN *et al.*, 2015).

Para flavonoides totais, os teores variaram de 0,49 a 0,88 g·100 g<sup>-1</sup> (base seca), situando-se na faixa inferior dos valores encontrados para *Ilex paraguariensis*. Estudos como Croge *et al.* (2021), Souza *et al.* (2015) e Mateos *et al.* (2018) indicam variações entre 0,003 e

0,757 g·100 g<sup>-1</sup>, atribuídas a fatores como condições de cultivo, estágio de desenvolvimento, genótipo e disponibilidade de luz. Bisognin *et al.* (2019) relataram valores mais elevados (8,73 a 25,15 mg·g<sup>-1</sup> ou 0,873 a 2,515 g·100 g<sup>-1</sup>), também em extratos foliares obtidos por ultrassom, reforçando o impacto da eficiência extrativa, aspecto confirmado por Mendonça *et al.* (2025) ao otimizar parâmetros na extração.

## 5.4 DETERMINAÇÃO DE TEOBROMINA, CAFEÍNA E CQAS POR CLAE-DAD

### 5.4.1 Desempenho analítico do método

A seletividade do método cromatográfico foi avaliada por meio da comparação dos tempos de retenção e dos espectros de absorção UV obtidos pelo detector DAD entre os padrões analíticos de teobromina, cafeína e ácido 5-*O*-cafeoilquínico (5-CQA) e os picos correspondentes presentes nos extratos das amostras de erva-mate. Não foram observadas interferências significativas provenientes da matriz vegetal nos tempos de retenção dos analitos de interesse, nem sobreposição relevante de picos, indicando que as condições cromatográficas empregadas permitiram a adequada identificação e quantificação dos compostos analisados.

Os parâmetros de calibração para teobromina, cafeína e 5-CQA obtidos por CLAE-DAD estão apresentados na Tabela 6. A tabela resume as equações das curvas analíticas para as faixas de baixo e alto teor, os coeficientes de determinação, os limites de detecção e quantificação, os valores de *p* do teste de Breusch–Pagan (BP) e o desvio residual.

Para a cafeína, a curva de calibração para baixo teor foi construída na faixa de 0,0 a 50,0 mg L<sup>-1</sup>, enquanto a curva de alto teor abrangeu concentrações de 20,0 a 400,0 mg L<sup>-1</sup>. Para o ácido clorogênico (5-CQA), a curva de baixo teor foi estabelecida no intervalo de 0,0 a 100,0 mg L<sup>-1</sup>, e a curva de alto teor entre 75,0 e 400,0 mg L<sup>-1</sup>. No caso da teobromina, foi utilizada uma única curva de calibração correspondente à faixa de 0,0 a 75,0 mg L<sup>-1</sup>.

**Tabela 6 – Parâmetros das curvas analíticas obtidas por CLAE-DAD.**

Parâmetro	Teobromina	Cafeína	5-CQA
Eq. (baixo)	$y = 0,9603x + 0,5958$	$y = 0,7270x + 0,0050$	$y = 0,9114x + 0,0774$
Eq. (alto)	–	$y = 0,7435x + 0,0404$	$y = 0,8287x + 7,7649$
$R^2$ (baixo)	0,9998	0,9999	0,9997
$R^2$ (alto)	–	0,9998	0,9996
Melhor ajuste	Linear simples	Linear simples	Linear simples
LOD (mg L <sup>-1</sup> )	1,8021	1,4889	3,2445
LOQ (mg L <sup>-1</sup> )	5,4609	4,5119	9,8318
BP (p-valor, baixo)	0,6745	0,1693	0,7008
BP (p-valor, alto)	–	0,3293	0,2309
Desvio residual ( $s_{y/x}$ )	0,5015	0,3062	0,8347

**Fonte: Autoria própria (2026).**

A análise dos resultados apresentados na Tabela 6 evidencia excelente linearidade para todos os compostos analisados, com coeficientes de determinação ( $R^2$ ) superiores a 0,999, indicando forte correlação entre a resposta do detector e a concentração dos analitos nas faixas avaliadas. A homocedasticidade dos resíduos foi verificada por meio do teste de Breusch–Pagan, cujos valores de  $p$  foram superiores a 0,05, indicando ausência de heterocedasticidade significativa e confirmando a adequação do modelo linear simples.

Diferentes modelos de ponderação, como  $1/x$  e  $1/x^2$ , foram avaliados, porém não resultaram em melhorias estatisticamente relevantes no ajuste das curvas analíticas. Assim, o modelo linear simples não ponderado foi selecionado como o mais adequado para a quantificação dos compostos. Os baixos valores de desvio residual ( $s_{y/x}$ ) corroboram a boa qualidade do ajuste e a consistência dos dados experimentais.

Os limites experimentais de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados a partir das curvas de baixo teor, por serem mais adequadas para a estimativa dos limites inferiores de resposta analítica. A sensibilidade do método foi avaliada por meio da inclinação das curvas analíticas, observando-se pequenas variações entre as faixas de concentração, sem comprometimento da linearidade do sistema dentro dos intervalos estudados. Ressalta-se que LOD e LOQ estão diretamente relacionados à sensibilidade e à variabilidade da resposta analítica, sendo dependentes da inclinação da curva e do desvio padrão do sinal. Os resultados indicaram desempenho adequado do método para a determinação de teobromina, cafeína e 5-CQA nas amostras de erva-mate. As curvas analíticas correspondentes encontram-se apresentadas no Apêndice (Figuras 22, 23 e 24), em conformidade com recomendações metodológicas para

validação de métodos analíticos baseados em calibração (OLIVIERI, 2015)..

#### 5.4.2 Influência da sazonalidade sobre a teobromina, cafeína, ácido clorogênico e seus derivados nos clones modificados de erva-mate.

##### 5.4.2.1 Metilxantinas

A Tabela 7 apresenta os teores médios de teobromina e cafeína nos diferentes clones de erva-mate ao longo das estações do ano. Observa-se que as estações do ano influenciaram significativamente a produção das metilxantinas, com variações distintas entre os clones, especialmente nos teores de cafeína durante o verão.

**Tabela 7 – Teores médios (média  $\pm$  desvio padrão, n = 3) em g.100 g<sup>-1</sup> em base seca de teobromina e cafeína nos clones de erva-mate ao longo das estações do ano.**

Composto / Clone	Inverno	Primavera	Verão	Outono
<b>Teobromina</b>				
C26	0,35 $\pm$ 0,01 cdef	0,17 $\pm$ 0,00 a	0,33 $\pm$ 0,00 cde	0,34 $\pm$ 0,01 cde
C27	0,15 $\pm$ 0,00 a	0,21 $\pm$ 0,01 ab	0,37 $\pm$ 0,00 ef	0,27 $\pm$ 0,01 bcd
C33	0,35 $\pm$ 0,01 def	0,32 $\pm$ 0,01 cde	0,44 $\pm$ 0,12 fg	0,57 $\pm$ 0,01 h
Aupaba	0,46 $\pm$ 0,01 g	0,26 $\pm$ 0,00 bc	0,43 $\pm$ 0,01 fg	0,31 $\pm$ 0,00 cde
<b>Cafeína</b>				
C26	1,05 $\pm$ 0,02 c	1,18 $\pm$ 0,07 de	1,42 $\pm$ 0,02 gh	1,13 $\pm$ 0,03 cd
C27	1,19 $\pm$ 0,04 de	1,58 $\pm$ 0,05 i	2,41 $\pm$ 0,02 j	1,25 $\pm$ 0,06 ef
C33	0,34 $\pm$ 0,01 ab	0,33 $\pm$ 0,01 ab	0,39 $\pm$ 0,01 b	0,25 $\pm$ 0,01 a
Aupaba	1,24 $\pm$ 0,02 e	1,51 $\pm$ 0,01 hi	1,34 $\pm$ 0,01 fg	1,39 $\pm$ 0,02 g

*Letras minúsculas iguais indicam ausência de diferença significativa entre os tratamentos (clone  $\times$  estação), pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, aplicado à ANOVA fatorial.*

**Fonte: Autoria própria (2026).**

A análise estatística dos resultados apresentados na Tabela 7 evidencia diferenças significativas tanto entre as estações do ano quanto entre os clones de *Ilex paraguariensis*. De forma geral, observou-se que as variações sazonais foram mais pronunciadas para a cafeína do que para a teobromina, especialmente nos clones C26 e C27. Em ambos, os teores de cafeína aumentaram significativamente do inverno para o verão, com destaque para o clone C27, que apresentou os maiores valores absolutos ao longo do período avaliado.

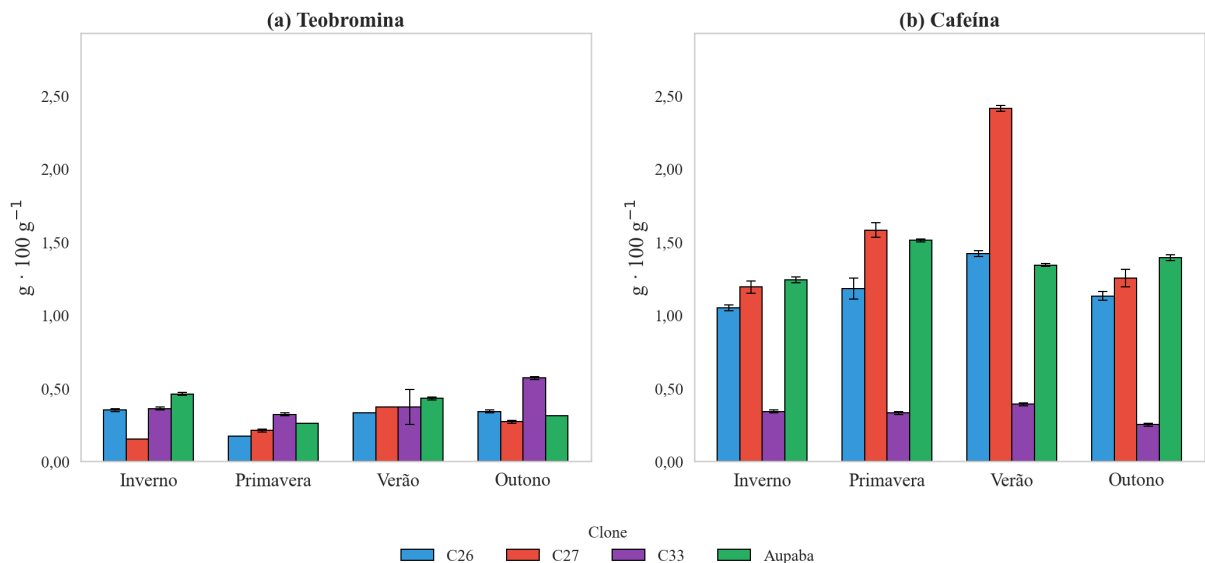
Para a teobromina, o comportamento foi menos uniforme entre os clones. O C33 destacou-se por apresentar maior teor no outono (0,57 g.100 g<sup>-1</sup>), diferindo estatisticamente das

demais estações, enquanto o Aupaba apresentou redução significativa da primavera em relação ao inverno, sugerindo sensibilidade moderada às variações sazonais. Já o clone C27 apresentou o maior acúmulo de teobromina no verão, coincidindo com o pico observado também para a cafeína, o que indica possível sincronismo metabólico na rota das metilxantinas sob condições de temperatura mais elevada.

Ao comparar os clones dentro de uma mesma estação, observou-se que o Aupaba manteve teores consistentemente superiores de teobromina, enquanto o C27 apresentou os maiores valores de cafeína na maior parte do período avaliado.

Como forma de complementar a análise estatística e facilitar a visualização das variações sazonais entre os clones, a Figura 17 apresenta os teores médios de teobromina e cafeína em formato de gráfico de barras. Essa representação gráfica permite observar com maior clareza as flutuações nos teores de metilxantinas ao longo das estações do ano, evidenciando os padrões individuais de cada clone e destacando as diferenças já indicadas pelos testes estatísticos.

**Figura 17 – Teores médios de compostos teobromina (a) e cafeína (b) em diferentes clones de erva-mate, expressos em  $\text{g}\cdot 100\cdot\text{g}^{-1}$  (base seca), de acordo com a estação de coleta.**



**Fonte: Autoria própria (2026).**

Os teores de teobromina (Figura 17a) apresentaram variações significativas entre os clones e as estações do ano, evidenciando influência tanto do fator genético quanto das condições sazonais sobre o metabolismo da planta. O clone C26 manteve níveis relativamente altos durante o inverno ( $0,35 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ), com redução acentuada na primavera ( $0,17 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ), correspondendo a uma diminuição de cerca de 51 % em relação ao período anterior. O C27 apresentou

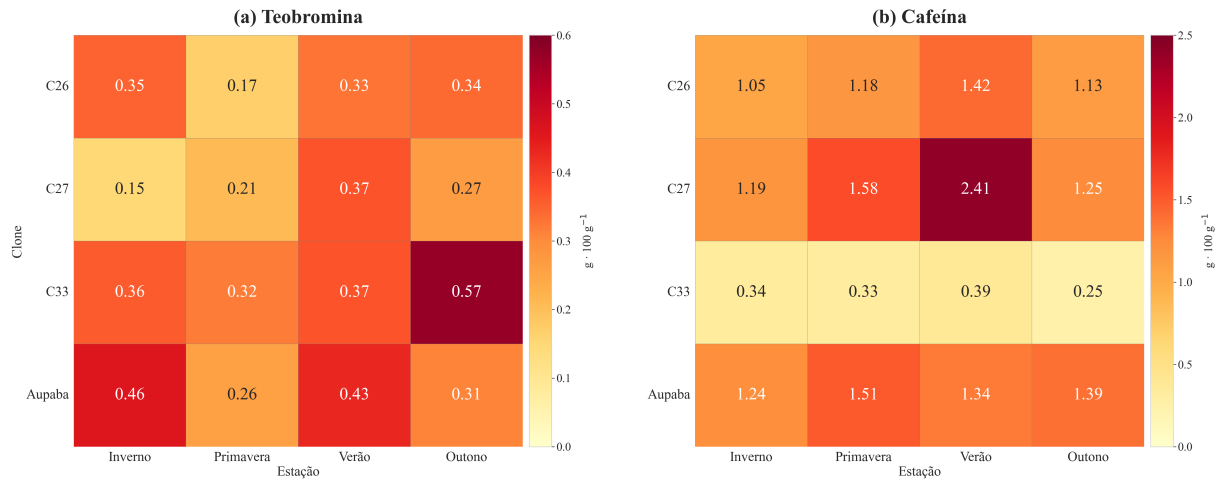
comportamento inverso, com teores mais baixos no inverno ( $0,15 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) e aumento acentuado no verão ( $0,37 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ), o que representa um acréscimo de aproximadamente 146 %. O clone C33 destacou-se pelo aumento progressivo dos teores, atingindo o valor máximo no outono ( $0,57 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ), o que corresponde a um acréscimo de cerca de 58 % em relação ao inverno. Por fim, o clone Aupaba apresentou o maior teor de teobromina no inverno ( $0,46 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ), enquanto na primavera observou-se uma redução expressiva para  $0,26 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ , representando uma queda de aproximadamente 43 % em relação ao inverno.

Em relação à cafeína (Figura 17b), observaram-se diferenças marcantes entre clones e estações. O C26 apresentou variação positiva ao longo do ano, com incremento de cerca de 35 % entre o inverno ( $1,05 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) e o verão ( $1,42 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ). O clone C27 destacou-se pelo aumento expressivo de  $1,19 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$  no inverno para  $2,41 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$  no verão, representando um acréscimo de aproximadamente 103 %. O C33, por outro lado, manteve os menores teores em todas as estações, variando discretamente entre  $0,25$  e  $0,39 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ , o que evidencia estabilidade metabólica e possivelmente menor capacidade biossintética de metilxantinas (ASHIHARA; CROZIER, 2001; YIN *et al.*, 2015; AGUIAR *et al.*, 2024).

O clone Aupaba apresentou comportamento distinto dos demais. Observou-se aumento de  $1,24 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$  no inverno para  $1,51 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$  na primavera, correspondendo a um acréscimo de aproximadamente 22 %. No verão, houve leve redução para  $1,34 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ , caracterizando uma flutuação sazonal menos acentuada em comparação aos demais clones.

Para complementar a interpretação visual dos resultados, a Figura 18 apresenta a distribuição dos teores médios de teobromina e cafeína em formato de mapa de calor. Essa abordagem gráfica permite uma análise integrada entre clones e estações do ano, facilitando a identificação de padrões gerais de acúmulo e a comparação simultânea entre os compostos. Além disso, a intensidade das cores evidencia de forma intuitiva as regiões de maior concentração, permitindo observar com clareza as tendências sazonais previamente indicadas nos gráficos de barras.

**Figura 18 – Mapa de calor dos teores médios de compostos teobromina (a) e flavonoides (b) cafeína na erva-mate, expressos em  $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  (base seca), em função das estações do ano.**



**Fonte: Autoria própria (2026).**

Para a teobromina Figura 18a, os teores oscilaram entre 0,15 e 0,57  $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  (0,15% a 0,57%), valores compatíveis com a faixa de 0,10% a 0,85% reportada por Friedrich *et al.* (2017). A similaridade na variação entre clones observada em ambos os estudos reafirma o papel significativo da base genética na regulação da via biossintética das metilxantinas (YIN *et al.*, 2015).

O perfil fitoquímico do clone C33 destaca-se pela baixa concentração de cafeína (máximo de 0,39  $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) contrastada com o acúmulo progressivo de teobromina, que atingiu 0,57  $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  no outono (Figura 18a). Esses dados sugerem uma baixa eficiência na etapa final da via biossintética, especificamente na atividade da enzima cafeína sintase (CS). O acúmulo do precursor teobromina aponta para um gargalo metabólico em que a conversão é inibida, caracterizando o clone C33 como um provável genótipo de expressão silenciada para essa enzima. Essa particularidade torna o material genético valioso para estudos de expressão diferencial, podendo funcionar como modelo natural para a compreensão da regulação da síntese de alcaloides na erva-mate.

No presente trabalho, os teores de cafeína em folhas de *Ilex paraguariensis* variaram de 0,25 a 2,41  $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  (0,25% a 2,41%), valores superiores aos descritos por Friedrich *et al.* (2017), que avaliaram 16 progênies em cinco localidades e encontraram teores entre 0,01% e 1,38%. A maior amplitude observada no presente estudo pode ser atribuída à especificidade dos clones analisados e à coleta das amostras em diferentes estações do ano, o que permite capturar de forma mais abrangente o efeito da sazonalidade sobre o metabolismo secundário da espécie. Estudos como o de Benedito *et al.* (2023) ampliam ainda mais essa variabilidade, indicando

gammas de cafeína de 0,035 a 2,385 g·100 g<sup>-1</sup> e de teobromina de 0,0004 a 1,772 g·100 g<sup>-1</sup>, reforçando a complexidade genética e a influência ambiental associadas à espécie.

No mapa de calor da cafeína (Figura 18b), as maiores concentrações são evidenciadas nas regiões correspondentes ao clone C27 durante o verão, seguidas pelos valores elevados do clone Aupaba na primavera. O clone C26 também apresenta destaque no verão, enquanto o C33 mantém coloração mais homogênea e de menor intensidade ao longo de todas as estações, confirmando os teores consistentemente baixos desse clone para esse composto.

É fundamental destacar que a sazonalidade é um modulador chave da biossíntese dessas substâncias. Períodos de maior intensidade luminosa e temperatura, como observado no verão, estão associados ao aumento da atividade das enzimas metiltransferases, responsáveis pela produção de cafeína e teobromina (BLUM-SILVA *et al.*, 2015; RAKOCEVIC *et al.*, 2023; SHARMA *et al.*, 2019). Tal fato é corroborado por Aguiar *et al.* (2024) e Wendling e Santin (2015), que evidenciaram o impacto do sombreamento na diminuição do acúmulo de cafeína, demonstrando que a luminosidade elevada potencializa a rota biossintética das metilxantinas, provavelmente como mecanismo adaptativo da planta para o estresse oxidativo induzido pela radiação solar.

A relação entre os dados observados e a rota biossintética das metilxantinas é essencial para compreender as variações entre clones e estações. A biossíntese de cafeína e teobromina em *Ilex paraguariensis* segue a sequência metabólica típica descrita para outras espécies produtoras de metilxantinas, envolvendo a conversão de xantosina em 7-metilxantosina, depois em 7-metilxantina, seguida pela formação de teobromina e, finalmente, de cafeína (RAKOCEVIC *et al.*, 2023; VIGNALE *et al.*, 2025; YIN *et al.*, 2015). Essa via é catalisada por enzimas da família das *N*-metiltransferases, que utilizam S-adenosilmetionina (SAM) como doador de grupos metil. Entre as principais enzimas envolvidas destacam-se a xantosina metiltransferase (XMT), a teobromina sintase (TS) e a cafeína sintase (CS), que realiza a metilação final de teobromina em cafeína.

Os padrões observados nos diferentes clones refletem distintas eficiências e regulações ao longo dessa rota metabólica. No clone C27, por exemplo, o pico de cafeína observado no verão (2,41 g·100 g<sup>-1</sup>) acompanhado de teores moderados de teobromina sugere elevada atividade da cafeína sintase, estimulada por fatores ambientais como temperatura e luminosidade, que aumentam a expressão gênica das metiltransferases (AGUIAR *et al.*, 2024; VIGNALE *et al.*, 2025). Em contraste, o clone C33 apresentou baixos valores de ambas as metilxantinas, o que

pode indicar reduzida expressão dos genes da via biossintética ou elevada degradação de purinas, limitando a conversão de teobromina em cafeína. Já o clone Aupaba demonstrou estabilidade biossintética ao longo do ano, mantendo teores elevados de cafeína em todas as estações, o que sugere expressão constitutiva das enzimas da via e menor sensibilidade às variações ambientais sazonais.

Além dos fatores climáticos, a disponibilidade de nitrogênio também exerce influência sobre a via biossintética, uma vez que as metilxantinas estão associadas ao metabolismo do nitrogênio nas folhas (BENEDITO *et al.*, 2023; RAKOCEVIC *et al.*, 2023). Assim, períodos de maior atividade fotossintética, como o verão, tendem a aumentar a disponibilidade de precursores purínicos e de cofatores como a S-adenosilmetionina (SAM), intensificando a produção de cafeína e teobromina. Ressalta-se, contudo, que o manejo hídrico e a adubação foram mantidos constantes para todos os clones avaliados, de modo que as variações observadas podem ser atribuídas principalmente à sazonalidade e às diferenças genéticas entre os materiais.

A diversidade genética dos clones é outro fator determinante. Cardozo *et al.* (2010) relataram coeficientes elevados de herdabilidade para cafeína (75,19 %) e teobromina (66,87%), o que evidencia um forte componente genético na regulação dessa via. Polimorfismos nos genes que codificam enzimas metiltransferases, como DXMT1 e DXMT2, correspondem a variações naturais na sequência do DNA entre diferentes clones de *Ilex paraguariensis*. Essas enzimas atuam em etapas-chave da biossíntese das metilxantinas, sendo responsáveis pela metilação da teobromina para a formação da cafeína. Assim, diferenças genéticas nesses genes podem alterar a atividade ou a eficiência dessas enzimas, resultando em variações na conversão entre teobromina e cafeína e, conseqüentemente, nos perfis químicos observados entre os clones avaliados (YIN *et al.*, 2015).

Avanços genômicos recentes também forneceram novas evidências sobre a rota biossintética em *Ilex paraguariensis*. O sequenciamento genômico e análise funcional reportadas por Vignale *et al.* (2025) descreveram uma estrutura gênica complexa e particular para a biossíntese dessas metilxantinas, distinta de outras plantas produtoras de cafeína, reforçando a base genética diferenciada para os diferentes perfis metabólicos observados nos clones.

Dessa forma, os dados obtidos neste estudo e sua comparação com as evidências nacionais e internacionais mais recentes corroboram que a variação fenotípica dos teores de cafeína e teobromina em folhas de erva-mate resulta da combinação de fatores genéticos (diversidade e melhoramento), sazonais (estação e luz) e fisiológicos (idade da folha e mecanismo de defesa). A

integração dos resultados com o entendimento da rota biossintética das metilxantinas evidencia que o verão representa uma fase de máxima atividade enzimática para clones responsivos, como o C27, enquanto clones como Aupaba mantêm elevada eficiência metabólica independentemente da estação, e C33 apresenta um perfil de menor capacidade biossintética. Tais achados consolidam conhecimentos fundamentais para estratégias de manejo e melhoramento genético da espécie.

#### 5.4.2.2 Ácido clorogênico e seus derivados

A Tabela 8 apresenta os teores médios de ácido clorogênico e seus derivados nos diferentes clones de erva-mate ao longo das estações do ano.

**Tabela 8 – Teores médios (média ± desvio padrão, n = 3) em g.100 g<sup>-1</sup> em base seca de ácidos clorogênicos nos clones de erva-mate ao longo das estações do ano.**

Composto / Clone	Inverno	Primavera	Verão	Outono
<b>5-CQA</b>				
C26	0,70 ± 0,03 gh	0,45 ± 0,01 b	0,51 ± 0,01 bcd	0,54 ± 0,01 cde
C27	0,89 ± 0,01 j	0,58 ± 0,03 def	0,60 ± 0,01 ef	0,64 ± 0,03 fg
C33	0,50 ± 0,01 bc	0,35 ± 0,00 a	0,69 ± 0,03 gh	0,78 ± 0,02 i
Aupaba	0,97 ± 0,07 k	0,64 ± 0,00 fg	0,76 ± 0,01 hi	0,47 ± 0,01 b
<b>3-CQA</b>				
C26	2,64 ± 0,06 h	1,37 ± 0,05 b	1,65 ± 0,03 c	2,30 ± 0,03 g
C27	2,63 ± 0,03 h	1,91 ± 0,07 de	2,31 ± 0,06 g	1,82 ± 0,09 d
C33	1,63 ± 0,04 c	0,98 ± 0,02 a	2,00 ± 0,10 ef	2,07 ± 0,04 f
Aupaba	3,07 ± 0,08 i	1,75 ± 0,00 cd	2,40 ± 0,03 g	1,22 ± 0,02 b
<b>4-CQA</b>				
C26	0,31 ± 0,01 ij	0,16 ± 0,02 cd	0,29 ± 0,00 hi	0,24 ± 0,00 f
C27	0,33 ± 0,00 j	0,16 ± 0,01 cd	0,27 ± 0,01 gh	0,15 ± 0,01 bc
C33	0,19 ± 0,01 de	0,19 ± 0,00 e	0,33 ± 0,01 j	0,25 ± 0,01 fg
Aupaba	0,32 ± 0,02 j	0,12 ± 0,00 b	0,24 ± 0,00 f	0,06 ± 0,01 a
<b>3,4-di-CQA</b>				
C26	0,14 ± 0,01 bc	0,13 ± 0,00 bc	0,30 ± 0,01 h	0,17 ± 0,00 cde
C27	0,20 ± 0,01 ef	0,15 ± 0,01 bcd	0,36 ± 0,00 i	0,11 ± 0,00 b
C33	0,12 ± 0,00 b	0,13 ± 0,00 bc	0,25 ± 0,05 g	0,18 ± 0,00 de
Aupaba	0,18 ± 0,01 de	0,12 ± 0,00 b	0,23 ± 0,01 fg	0,05 ± 0,00 a
<b>3,5-di-CQA</b>				
C26	2,17 ± 0,12 bc	2,62 ± 0,13 de	2,18 ± 0,04 bc	2,66 ± 0,13 e
C27	2,07 ± 0,04 b	4,81 ± 0,12 j	4,39 ± 0,10 i	3,87 ± 0,14 gh
C33	2,31 ± 0,08 bcd	1,20 ± 0,05 a	2,44 ± 0,15 cde	3,72 ± 0,14 fg
Aupaba	3,55 ± 0,10 f	4,05 ± 0,06 h	3,42 ± 0,06 f	2,22 ± 0,06 bc
<b>4,5-di-CQA</b>				
C26	0,39 ± 0,02 bcd	0,43 ± 0,01 cd	0,78 ± 0,07 g	0,47 ± 0,01 d
C27	0,35 ± 0,01 bc	0,76 ± 0,06 g	1,16 ± 0,02 h	0,39 ± 0,01 bcd
C33	0,32 ± 0,01 b	0,57 ± 0,01 e	0,75 ± 0,02 g	0,64 ± 0,04 ef
Aupaba	0,36 ± 0,03 bc	0,40 ± 0,00 bcd	0,70 ± 0,02 fg	0,15 ± 0,01 a

*Letras minúsculas iguais indicam ausência de diferença significativa entre os tratamentos (clone × estação), pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, aplicado à ANOVA fatorial.*

**Fonte: Autoria própria (2026).**

A análise estatística dos resultados apresentados na Tabela 8 evidencia diferenças

significativas tanto entre os clones quanto entre as estações do ano para a maioria dos derivados do ácido clorogênico. De modo geral, os teores dos ácidos monocateoilquínicos (5-CQA, 3-CQA e 4-CQA) e dicafeoilquínicos (3,4-di-CQA, 3,5-di-CQA e 4,5-di-CQA) apresentaram padrões distintos de variação, refletindo a interação entre fatores genéticos e sazonais.

Iniciando pelo 5-CQA, observou-se que os clones Aupaba e C27 apresentaram os maiores teores no inverno (0,97 e 0,89 g·100 g<sup>-1</sup>, respectivamente), com redução nas estações subsequentes. O clone C26 apresentou valores intermediários ao longo do ciclo, enquanto C33 demonstrou incremento progressivo a partir da primavera, atingindo seus maiores teores no verão e no outono.

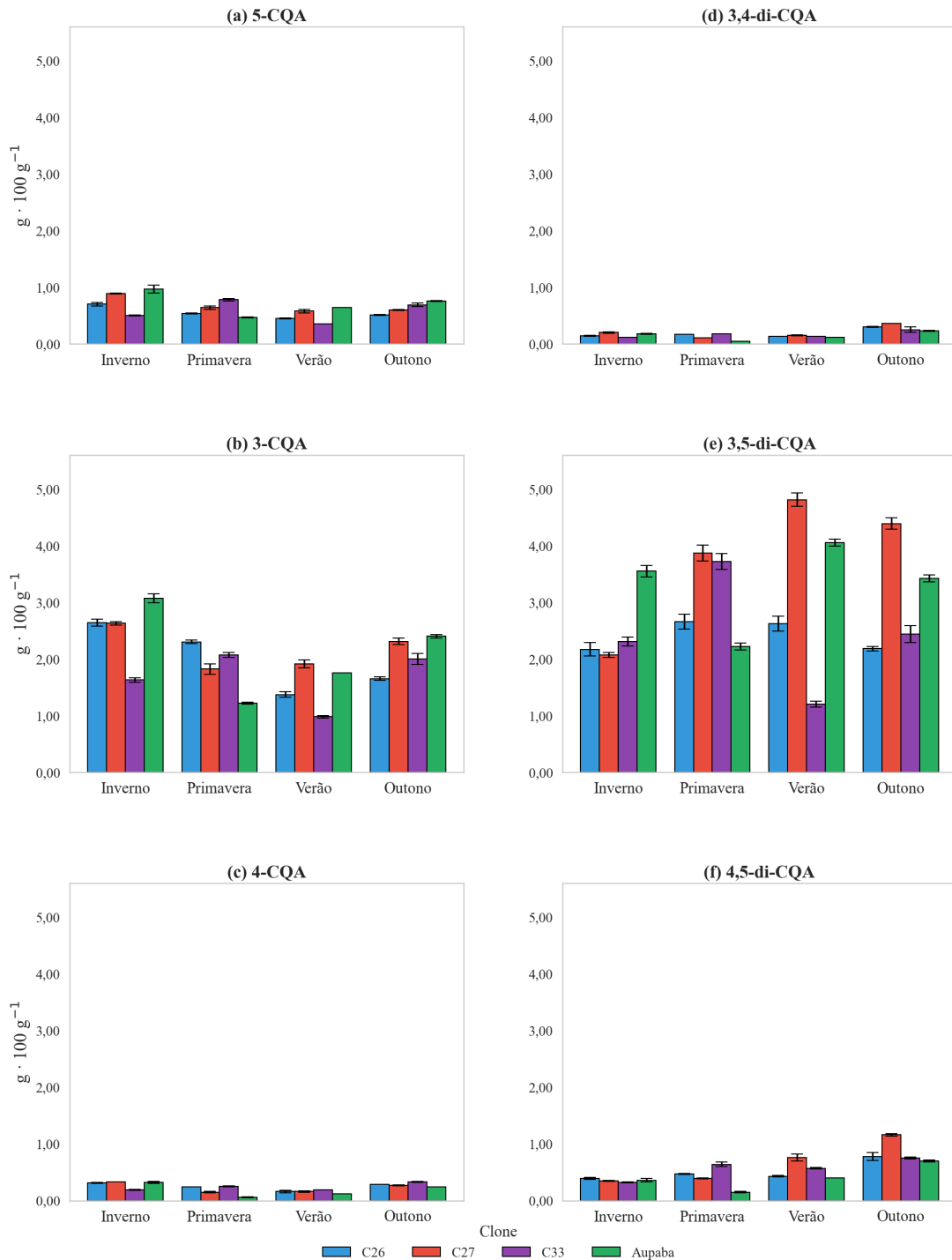
O 3-CQA apresentou concentrações mais elevadas no inverno para a maioria dos clones, especialmente em Aupaba (3,07 g·100 g<sup>-1</sup>) e C26 (2,64 g·100 g<sup>-1</sup>), com redução na primavera e incremento no verão. Para o clone C33, verificou-se redução na primavera e aumento no verão, sem diferença significativa entre verão e outono.

Em relação ao 4-CQA, os teores foram globalmente inferiores aos demais monocateoilquínicos. O clone C26 manteve valores próximos ao máximo (0,31 g·100 g<sup>-1</sup>) no inverno, enquanto Aupaba apresentou declínio acentuado no outono (0,06 g·100 g<sup>-1</sup>). O clone C33, por sua vez, deslocou seu máximo para o verão (0,33 g·100 g<sup>-1</sup>), diferindo do padrão dos demais.

Entre os derivados dicafeoilquínicos, o 3,5-di-CQA destacou-se pelas maiores concentrações absolutas, variando entre 1,20 e 4,81 g·100 g<sup>-1</sup>. O clone C27 apresentou teores significativamente mais elevados na primavera e no verão, Aupaba exibiu valores mais altos no inverno e na primavera, enquanto C33 apresentou pico no outono, evidenciando comportamentos distintos entre os genótipos. Para o 3,4-di-CQA e o 4,5-di-CQA, ambos mostraram tendência de incremento no verão, sobretudo nos clones C26 e C27, ao passo que C33 novamente se diferenciou dos demais.

Com o intuito de facilitar a visualização desses padrões de variação, a Figura 19 apresenta os teores médios de ácido clorogênico e seus derivados em formato de gráfico de barras, permitindo observar de forma mais intuitiva as flutuações sazonais e as diferenças entre clones.

**Figura 19 – Teores médios de CQA's: 5-CQA (a), 3-CQA (b), 4-CQA (c), 3,4-di-CQA (d), 3,5-di-CQA (e) e 4,5-di-CQA (f) em diferentes clones de erva-mate, expressos em  $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  (base seca), de acordo com a estação de coleta.**



**Fonte: Autoria própria (2026).**

A análise conjunta dos gráficos evidencia que os compostos fenólicos não apresentaram comportamento sazonal uniforme entre os clones, revelando predominante interação Clone  $\times$  Estação. Esse padrão indica que a modulação sazonal de cada derivado depende fundamentalmente do genótipo, não sendo possível estabelecer uma tendência aplicável a todos os clones de forma

simultânea. Com base no grau de consistência observado, os compostos podem ser agrupados em três categorias.

O único composto a exibir padrão consistente entre todos os genótipos foi o 3,4-di-CQA (Figura 19d), que apresentou pico no verão com diferença estatística em todos os clones (C26: 0,30; C27: 0,36; C33: 0,25; Aupaba: 0,23  $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ), com incrementos em relação ao inverno de aproximadamente 115 % em C26 e 80 % em C27. Embora os valores absolutos sejam os menores entre os derivados avaliados, a uniformidade da resposta sugere que a síntese desse dicafeoilquínico está vinculada a estímulos ambientais característicos do verão temperatura e irradiância elevadas de forma independente do fundo genético, indicando uma resposta fisiológica conservada entre os genótipos.

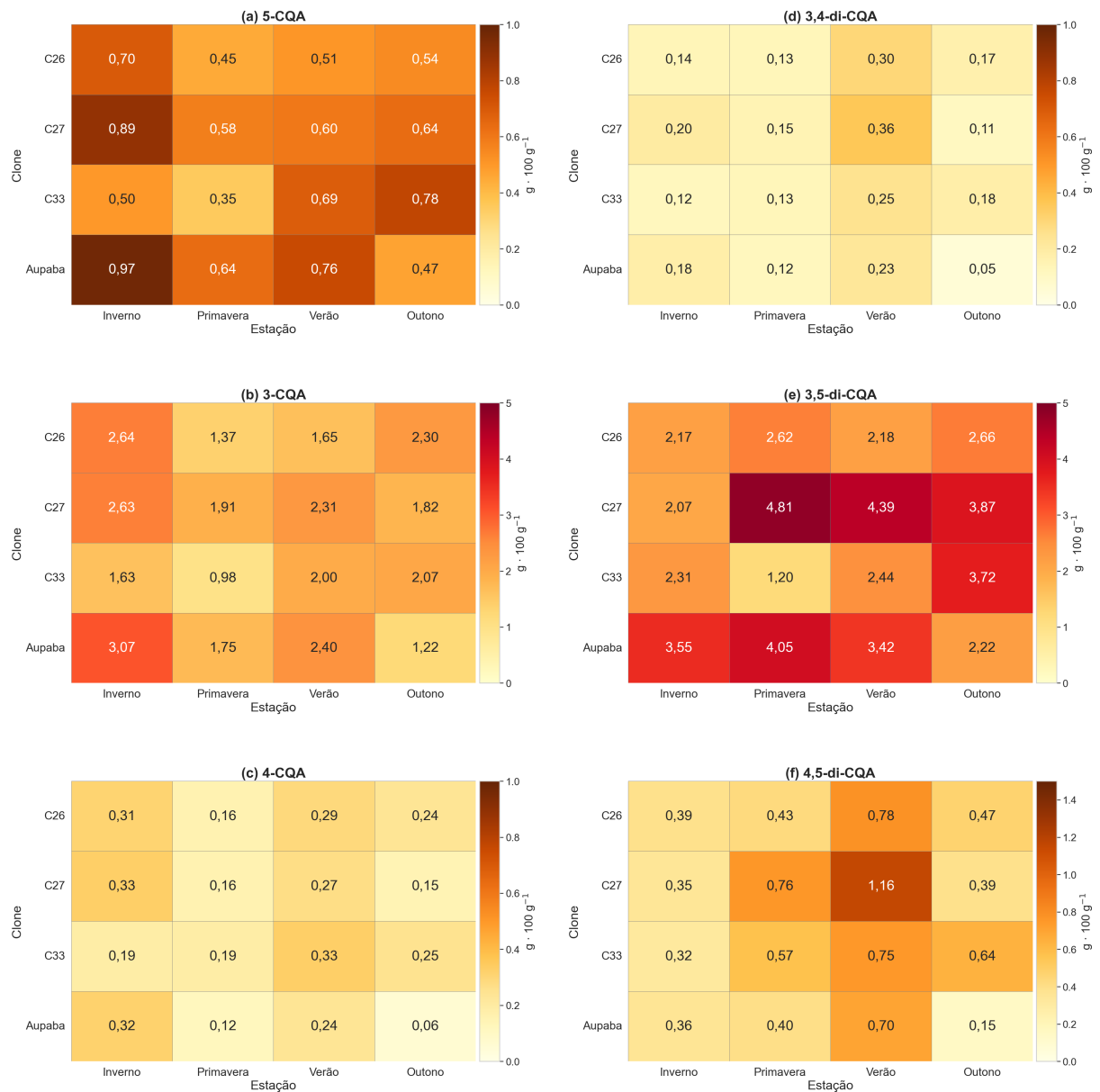
Em posição intermediária situam-se o 4-CQA (Figura 19c) e o 4,5-di-CQA (Figura 19f), cujos padrões foram parcialmente consistentes. Para o 4-CQA, C26, C27 e Aupaba apresentaram maiores teores no inverno (0,31, 0,33 e 0,32  $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ , respectivamente), enquanto C33 deslocou seu máximo para o verão (0,33  $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ), rompendo com a tendência dos demais. Para o 4,5-di-CQA, C26, C27 e Aupaba atingiram maiores concentrações no verão (0,78, 1,16 e 0,70  $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ), com destaque para C27, cujo teor aumentou cerca de 230 % em relação ao inverno, enquanto C33 apresentou pico no outono (0,64  $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ), impedindo a definição de um padrão geral para esse composto.

Os compostos 5-CQA (Figura 19a), 3-CQA (Figura 19b) e 3,5-di-CQA (Figura 19e) foram os que exibiram maior grau de interação Clone  $\times$  Estação, com inversão do clone predominante conforme a estação e picos ocorrendo em períodos distintos entre os genótipos. Para o 5-CQA, Aupaba liderou os teores no inverno (0,97  $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ), mas reduziu expressivamente no outono (0,47  $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ), enquanto C33 atingiu seu máximo justamente nessa estação (0,78  $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ), com redução de 36 % em C26 e 35 % em C27 entre inverno e primavera. O 3-CQA seguiu lógica similar: Aupaba foi dominante no inverno (3,07  $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) e apresentou queda de aproximadamente 43 % até o verão, enquanto C33 acumulou progressivamente, sem diferença estatística entre verão e outono. O 3,5-di-CQA, composto de maior concentração absoluta entre todos os derivados avaliados, foi também o que apresentou a mais pronunciada dependência genotípica: C27 atingiu pico na primavera (4,81  $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ , variação superior a 130 % em relação ao inverno), Aupaba exibiu maiores valores na primavera-verão, C33 acumulou progressivamente até o outono (3,72  $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) e C26 manteve relativa estabilidade ao longo de todo o ciclo, sem tendência definida.

Em conjunto, os resultados indicam que a sazonalidade dos ácidos cafeoilquínicos na erva-mate é mediada principalmente pelo genótipo e não pela estação de colheita de forma isolada. A predominância da interação Clone  $\times$  Estação reforça que estratégias de colheita e seleção clonal devem considerar o comportamento específico de cada genótipo ao longo do ciclo anual, especialmente quando o objetivo for maximizar o acúmulo de compostos bioativos de interesse.

De forma visual complementar, a Figura 20 apresenta o mapa de calor com a distribuição dos teores dos ácidos clorogênicos entre clones e estações, permitindo uma visualização integrada das variações sazonais e das relações entre compostos.

**Figura 20 – Mapa de calor dos teores médios de CQA's: 5-CQA (a), 3-CQA (b), 4-CQA (c), 3,4-di-CQA (d), 3,5-di-CQA (e) e 4,5-di-CQA (f) em diferentes clones de erva-mate, expressos em  $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  (base seca), de acordo com a estação de coleta.**



**Fonte: Autoria própria (2026).**

Observa-se na Figura 20a que o 5-CQA apresenta coloração intermediária e distribuição relativamente homogênea entre os clones e estações, confirmando sua estabilidade relativa ao longo do ano, ainda que com variações genóticas pontuais. O 3-CQA (Figura 20b) exibe coloração mais intensa em Aupaba no inverno e em C33 no outono, evidenciando o deslocamento sazonal característico desse composto conforme o genótipo. O 4-CQA (Figura 20c) apresenta coloração mais suave em toda a matriz, refletindo seus menores teores absolutos, com leve intensificação em C33 no verão consistente com o deslocamento de pico já descrito.

O 3,4-di-CQA (Figura 20d) destaca-se pela uniformidade da coloração mais intensa na coluna do verão para todos os clones, confirmando visualmente o padrão consistente identificado na análise estatística. O 3,5-di-CQA (Figura 20e) domina a coloração nas áreas correspondentes a C27 e Aupaba na primavera e verão, enquanto C33 apresenta intensificação no outono, reforçando a forte interação Clone  $\times$  Estação desse composto. Por fim, o 4,5-di-CQA (Figura 20f) exibe coloração mais intensa no verão para C26, C27 e Aupaba, com C33 deslocado para o outono, em consonância com os dados numéricos.

O mapa de calor sintetiza visualmente as tendências sazonais e genotípicas observadas, evidenciando que os derivados dicafeoilquínicos tendem a apresentar maiores oscilações ao longo das estações, enquanto os monocafeoilquínicos se mantêm relativamente mais estáveis. Essa diferenciação reforça a complexidade do metabolismo dos ácidos clorogênicos na erva-mate e destaca que a interação entre genótipo e sazonalidade é o principal determinante do perfil químico da espécie.

Para complementar a análise gráfica e permitir uma comparação quantitativa com a literatura, os resultados dos ácidos clorogênicos foram expressos como o somatório total dos isômeros mono e dicafeoilquínicos, conforme apresentado na Tabela 9. Essa forma de agrupamento é amplamente utilizada em estudos fitoquímicos por fornecer uma visão integrada do acúmulo total de compostos da classe dos ácidos clorogênicos, permitindo avaliar a influência conjunta de fatores genéticos e sazonais sobre o metabolismo fenólico.

**Tabela 9 – Somatório total dos ácidos clorogênicos (mono- e di-CQA) nos diferentes clones de *Ilex paraguariensis* ao longo das estações do ano ( $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ , base seca).**

Clone	Inverno	Primavera	Verão	Outono
C26	6,35	5,16	5,71	6,38
C27	6,47	8,37	9,09	6,98
C33	5,07	3,42	6,46	7,64
Aupaba	8,45	7,08	7,75	4,17

**Fonte: Autoria própria (2026).**

No presente estudo, os valores somados de ácidos clorogênicos (mono- e di-CQA) variaram conforme a estação, situando-se no inverno entre aproximadamente  $5,07 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$  (C33) e  $8,45 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$  (Aupaba) (Tabela 9). Quando comparados aos dados da literatura, observa-se que em folhas secas de erva-mate comercial os teores de CGA total foram reportados na faixa de  $8,7$  a  $13,2 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$  (LIMA *et al.*, 2016), enquanto outros autores observaram valores de  $4,58$  a  $8,08 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$  em frações submetidas à extração específica de ácidos clorogênicos (BUTIUK

*et al.*, 2016). Os resultados deste trabalho, embora situados dentro ou ligeiramente abaixo das faixas superiores, indicam que os clones avaliados apresentam perfil competitivo de acúmulo de CGA, especialmente o clone Aupaba, que se aproxima dos limites superiores descritos na literatura.

É importante ressaltar que os teores obtidos apresentaram-se inferiores em determinadas estações e clones quando comparados aos valores máximos relatados em outros trabalhos. Tal discrepância pode ser parcialmente atribuída a limitações intrínsecas ao protocolo de extração empregado. Mendonça *et al.* (2025) demonstrou que, para diferentes genótipos de erva-mate, variáveis como a razão massa/volume de amostra e solvente, a saturação do solvente e a eficiência do método influenciam de maneira significativa o rendimento de compostos fenólicos. Segundo os autores, proporções inadequadas, com volume reduzido de solvente em relação à massa de amostra, podem ocasionar saturação precoce, restringindo a difusão e a solubilização dos compostos. Assim, a razão massa/volume adotada neste trabalho pode ter limitado parcialmente a extração de CGA, refletindo em teores menores que os reportados por métodos mais eficientes.

A sazonalidade mostrou-se um fator modulador relevante da acumulação de CGA, porém com efeito dependente do genótipo, como evidenciado pela predominante interação Clone × Estação discutida anteriormente. Clones como Aupaba, que mantiveram valores elevados mesmo em períodos de menor luminosidade e temperatura, sugerem maior capacidade fisiológica de sustentar a via biossintética dos fenólicos sob condições menos favoráveis. Em contrapartida, o clone C33, que apresentou valores reduzidos na primavera ( $3,42 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ), indica maior sensibilidade ambiental e dependência de estímulos externos para ativar a síntese desses compostos.

Os perfis de acúmulo observados refletem a modulação ambiental das enzimas-chave da via fenilpropanoide, especialmente HCT e CQS, cuja expressão responde à intensidade luminosa, temperatura e disponibilidade de precursores metabólicos (MATEOS *et al.*, 2018; KOŦTON *et al.*, 2022). O maior acúmulo verificado no verão para o 3,4-di-CQA único composto com padrão uniforme entre os clones é consistente com o padrão relatado para condições de alta irradiância e temperatura elevada, quando o incremento fotossintético amplia a disponibilidade de fenilalanina e demais precursores da rota (KOŦTON *et al.*, 2022; SOVIGUIDI *et al.*, 2022), corroborando a hipótese de que essa resposta tem base enzimática conservada. Para os demais compostos, a variação genotípica na expressão dos genes codificadores das enzimas da rota fenilpropanoide (SOVIGUIDI *et al.*, 2022; MATEOS *et al.*, 2018) pode explicar os diferentes momentos de

acúmulo observados entre os clones, apontando para uma interação complexa entre genética e ambiente na regulação do metabolismo fenólico.

Portanto, os dados obtidos corroboram a importância dos fatores genéticos, ambientais e metodológicos na determinação dos teores de ácidos clorogênicos, reforçando a necessidade de estratégias integradas de manejo e seleção clonal para otimização da produção desses compostos bioativos na cadeia produtiva da erva-mate.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a composição fitoquímica da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é fortemente modulada pela interação entre fatores genéticos e sazonais, mesmo sob condições controladas de cultivo. A variabilidade clonal mostrou-se determinante para o acúmulo de metilxantinas e compostos fenólicos, evidenciando que a seleção do genótipo é uma ferramenta estratégica para a padronização e valorização da matéria-prima.

Entre os clones avaliados, o clone C27 destacou-se pelo elevado potencial de acúmulo de cafeína e compostos fenólicos totais, especialmente no verão, configurando-se como material genético promissor para aplicações que demandam maior efeito estimulante e atividade antioxidante. O clone Aupaba apresentou os maiores teores de teobromina e ácido 3-O-cafeoilquínico, sobretudo no inverno e no outono, enquanto o clone C26 distinguiu-se pelo maior acúmulo de flavonoides nessas mesmas estações. O clone C33, por sua vez, exibiu comportamento metabólico singular, caracterizado por baixos teores de cafeína e concentrações relativamente elevadas de teobromina ao longo de todas as estações, sugerindo regulação diferenciada nas etapas de metilação da via biossintética das metilxantinas e indicando potencial para o desenvolvimento de produtos com menor efeito estimulante.

A análise dos ácidos clorogênicos revelou predominante interação Clone  $\times$  Estação, com o 3,4-di-CQA sendo o único derivado a apresentar padrão sazonal consistente entre todos os genótipos, pico no verão em todos os clones, enquanto os demais compostos exibiram picos em estações distintas conforme o genótipo avaliado. Esse resultado reforça que a sazonalidade dos ácidos cafeoilquínicos é mediada principalmente pela base genética e não pela estação de colheita de forma isolada. O outono caracterizou-se como estação de transição metabólica, com manutenção de teores elevados de compostos fenólicos e redução gradual da cafeína, indicando seu potencial para colheitas voltadas ao equilíbrio entre diferentes classes de metabólitos.

De forma geral, os resultados demonstram que a escolha combinada do clone e da época de colheita constitui a principal estratégia para direcionar o perfil fitoquímico da erva-mate, permitindo a obtenção de matérias-primas com características químicas específicas e previsíveis. Essa abordagem está em consonância com a revisão de Tomasi *et al.* (2025), que destaca a complexa interação entre fatores genéticos, ambientais e tecnológicos na composição química da espécie. A metodologia padronizada adotada neste trabalho, ao minimizar vieses analíticos, permitiu capturar o comportamento fitoquímico intrínseco de cada genótipo, evidenciando a

consistência e a reprodutibilidade das comparações realizadas.

Como perspectivas futuras, recomenda-se a ampliação do estudo para diferentes localidades de cultivo, contemplando distintas condições climáticas, a fim de avaliar a influência do ambiente externo sobre a composição fitoquímica da erva-mate e distinguir de forma mais precisa os efeitos genéticos daqueles associados às condições ambientais. A comparação entre ambientes poderá contribuir para a compreensão de como variações de temperatura, fotoperíodo e regime hídrico afetam a regulação do metabolismo secundário da espécie, subsidiando a definição de zonas de cultivo mais adequadas conforme o perfil fitoquímico desejado e orientando estratégias de seleção de materiais genéticos mais adaptáveis.

A aplicação de técnicas analíticas mais abrangentes, como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, ampliará a caracterização química das amostras e viabilizará a obtenção de perfis metabolômicos mais completos. A geração de dados dessa natureza permitirá a análise de componentes principais (PCA), possibilitando uma avaliação integrada dos clones e estações do ano e revelando potenciais marcadores metabólicos associados à adaptação e ao desempenho químico de cada genótipo. A integração dessas abordagens com informações climáticas e sazonais tem potencial para aprofundar a compreensão dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na plasticidade metabólica da espécie, fortalecendo a base científica para programas de melhoramento genético e manejo racional da colheita na cadeia produtiva da erva-mate.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, Natalia Saudade de; GABIRA, Mônica Moreno; DUARTE, Manoela Mendes; TOMASI, Jéssica de Cássia; HANSEL, Fabricio Augusto; LAVORANTI, Osmir José; DESCHAMPS, Cicero; HELM, Cristiane Vieira; WENDLING, Ivar. How shading levels affect bioactive compounds in leaves of yerba mate clones. **Biochemical Systematics and Ecology**, Elsevier BV, v. 113, p. 104796, abr. 2024. ISSN 0305-1978. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2024.104796>.
- ANGELO, Priscila Milene; JORGE, Neuza. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, jan. 2007. ISSN 0073-9855. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.53393/rial.2007.66.32841>.
- ANVISA. Resolução rdc nº 277, de 22 de setembro de 2005. 2005. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*), destinada ao consumo humano. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0277\\_22\\_09\\_2005.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0277_22_09_2005.html). Acesso em: 22 mai. 2025.
- ASHIHARA, Hiroshi; CROZIER, Alan. Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. **Trends in Plant Science**, Elsevier BV, v. 6, n. 9, p. 407–413, set. 2001. ISSN 1360-1385. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)02055-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02055-6).
- BALZAN, Silvie; HERNANDES, Aline; REICHERT, Cristiane Loiva; DONADUZZI, Carmen; PIRES, Vanessa Aranega; GASPAROTTO, Arquimedes; CARDOZO, Euclides Lara. Lipid-lowering effects of standardized extracts of *ilex paraguariensis* in high-fat-diet rats. **Fitoterapia**, Elsevier BV, v. 86, p. 115–122, abr. 2013. ISSN 0367-326X. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2013.02.008>.
- BASTOS, Deborah Helena Markowicz; FORNARI, Ana Claudia; QUEIROZ, Yara Severino de; SOARES, Rosana Aparecida Manólio; TORRES, Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva. The chlorogenic acid and caffeine content of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) beverages. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, n. 3, p. 191–197, 2005.
- BENEDITO, Débora Caroline Defensor; STUEPP, Carlos André; HELM, Cristiane Vieira; LIZ, Marcus Vinicius de; MIRANDA, Amanda Coelho de; IMOSKI, Rafaela; LAVORANTI, Osmir José; WENDLING, Ivar. Bioactive compounds concentrations and stability in leaves of *Ilex paraguariensis* genotypes. **Forests**, MDPI AG, v. 14, n. 12, p. 2411, dez. 2023. ISSN 1999-4907. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/f14122411>.
- BISOGNIN, Dilson Antônio; LUZ, Leandro Vinícius da; LENCINA, Kelen Haygert; SANTOS, Clarissa Obem dos; SAUTTER, Cláudia Kaehler. Contents of total phenolics and flavonoids in and antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* leaves. **Pesquisa Agropecuária**

**Brasileira**, FapUNIFESP (SciELO), v. 54, 2019. ISSN 0100-204X. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2019.v54.00856>.

BLUM-SILVA, Carlos H.; CHAVES, Vitor C.; SCHENKEL, Eloir P.; COELHO, Geraldo C.; REGINATTO, Flávio H. The influence of leaf age on methylxanthines, total phenolic content, and free radical scavenging capacity of *Ilex paraguariensis* aqueous extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Springer Science and Business Media LLC, v. 25, n. 1, p. 1–6, jan. 2015. ISSN 0102-695X. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2015.01.002>.

BOROSKI, Marcela; VISENTANER, J. S.; COTTICA, S. M.; MORAIS, D. M. **Antioxidantes: Princípios e Métodos Analíticos**. Curitiba: Appris, 2015. ISBN 8581927300.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 6. ed. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2019. v. 1. V. 1.

BRAVO, Laura; MATEOS, Raquel; SARRIÁ, Beatriz; BAEZA, Gema; LECUMBERRI, Elena; RAMOS, Sonia; GOYA, Luis. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in high-cholesterol fed rats. **Fitoterapia**, v. 92, n. 0, p. 219–229, jan. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.11.007>.

BUTIUK, Ana P.; MARTOS, María A.; ADACHI, Osao; HOURS, Roque A. Study of the chlorogenic acid content in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): Effect of plant fraction, processing step and harvesting season. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, Elsevier BV, v. 3, n. 1, p. 27–33, mar. 2016. ISSN 2214-7861. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.12.003>.

CAO, Yanni; FANG, Shengzuo; FU, Xiangxiang; SHANG, Xulan; YANG, Wanxia. Seasonal variation in phenolic compounds and antioxidant activity in leaves of cyclocarya paliurus (batal.) iljinskaja. **Forests**, MDPI AG, v. 10, n. 8, p. 624, jul. 2019. ISSN 1999-4907. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/f10080624>.

CARDOZO, Euclides Lara; DONADUZZI, Carmen Maria; FERRARESE-FILHO, Osvaldo; FRIEDRICH, Juliana Cristhina; GONELA, Adriana; STURION, José Alfredo. Quantitative genetic analysis of methylxanthines and phenolic compounds in mate progenies. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, FapUNIFESP (SciELO), v. 45, n. 2, p. 171–177, fev. 2010. ISSN 0100-204X. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2010000200008>.

CLARO, Raquel Oliveira; RIVERO-WENDT, Carla Letícia Gediél; OLIVEIRA, Ademir Kleber Morbeck de; PEDRINHO, Denise Renata; BONO, José Antônio Maior; MATIAS, Rosemary. Efeitos da sazonalidade e da adubação na composição química de genipa americana l. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, Editora e Distribuidora Educacional, v. 28, n. 2, p. 209–217, jul. 2024. ISSN 1415-6938. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.17921/1415-6938.2024v28n2p209-217>.

CLIFFORD, Michael N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Wiley, v. 80, n. 7, p. 1033–1043, maio 2000. ISSN 1097-0010. Disponível em: [https://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1033::AID-JSFA595>3.0.CO;2-T](https://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1033::AID-JSFA595>3.0.CO;2-T).

CLIFFORD, Michael N.; JAGANATH, Indu B.; LUDWIG, Iziar A.; CROZIER, Alan. Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity. **Natural Product Reports**, v. 34, n. 12, p. 1391–1421, 2017.

CLIFFORD, M. N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J. R. Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of maté (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. **Food Chemistry**, v. 35, p. 13–21, 1990.

CONTINI, Adriana Zanirato; CASTILHO, Maria Augusta de; COSTA, Reginaldo Brito da. A erva-mate e os kaiowá e guarani: da abordagem etnobotânica à promoção do desenvolvimento local. **Interações (Campo Grande)**, v. 13, n. 2, p. 161–168, dez. 2012. ISSN 1518-7012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1518-70122012000200003>.

COSTA, Samuel Guimarães da. **A Erva-Mate**. Curitiba: Coleção Farol do Saber, 1995.

CROGE, Camila Pereira; CUQUEL, Francine Lorena; PINTRO, Paula Toshimi Matumoto. Yerba mate: cultivation systems, processing and chemical composition. a review. **Scientia Agricola**, v. 78, n. 5, 2021. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1590/1678-992x-2019-0259>.

DABEEK, Wijdan M.; MARRA, Melissa Ventura. Dietary quercetin and kaempferol: Bioavailability and potential cardiovascular-related bioactivity in humans. **Nutrients**, v. 11, n. 10, p. 2288, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu11102288>.

D'ORSO, Fabio; HILL, Laura; APPELHAGEN, Ingo; LAWRENSON, Tom; POSSENTI, Marco; LI, Jiesi; HARWOOD, Wendy; MORELLI, Giorgio; MARTIN, Cathie. Exploring the metabolic and physiological roles of HQT in *S. lycopersicum* by gene editing. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1124959, 2023.

EMBRAPA. Estudo analisa e identifica compostos no tecido de folhas de erva-mate. 2020. Notícia institucional. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/57848192/estudo-analisa-e-identifica-compostos-no-tecido-de-folhas-de-erva-mate>. Acesso em: 12 dez. 2024.

FERRERA, T.S.; HELDWEIN, A.B.; SANTOS, C.O. DOS; SOMAVILLA, J.C.; SAUTTER, C.K. Substâncias fenólicas, flavonoides e capacidade antioxidante em erva-mate sob diferentes coberturas do solo e sombreamentos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2 suppl 1, p. 588–596, 2016. ISSN 1516-0572. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/15\\_197](http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/15_197).

FILIP, R.; LÓPEZ, P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven south american ilex species. **Fitoterapia**, Elsevier BV, v. 72, n. 7, p. 774–778, nov. 2001. ISSN 0367-326X. Disponível em: [https://dx.doi.org/10.1016/S0367-326X\(01\)00331-8](https://dx.doi.org/10.1016/S0367-326X(01)00331-8).

FRIEDRICH, Juliana Cristhina; GONELA, Adriana; VIDIGAL, Maria Celeste Gonçalves; FILHO, Pedro Soares Vidigal; STURION, José Alfredo; JUNIOR, Euclides Lara Cardoso. Genetic and phytochemical analysis to evaluate the diversity and relationships of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) elite genetic resources in a germplasm collection. **Chemistry & Biodiversity**, v. 14, n. 3, 2017.

FRIZON, Cátia N.T.; OLIVEIRA, Gabrieli A.; PERUSSELLO, Camila A.; PERALTA-ZAMORA, Patrício G.; CAMLOFSKI, Ana M.O.; ROSSA, Überson B.; HOFFMANN-RIBANI, Rosemary. Determination of total phenolic compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) combining near infrared spectroscopy (nir) and multivariate analysis. **Food Science and Technology**, Elsevier BV, v. 60, n. 2, p. 795–801, mar. 2015. ISSN 0023-6438. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.030>.

FRIZON, Cláudia N. T.; LEMOS, Diego P.; ZARDO, Camila A.; BARCIA, Marcela T.; SALVADOR, Mauro; MICKE, Gustavo A. Influence of drying methods on the physicochemical characteristics and antioxidant activity of yerba mate leaves (*Ilex paraguariensis*). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, p. e2016094, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.9416>.

GAUDE, Aishwarya Ashok; JALMI, Siddhi Kashinath. Environmental stress induced biosynthesis of plant secondary metabolites- transcriptional regulation as a key. **Crop Design**, Elsevier BV, v. 4, n. 2, p. 100100, maio 2025. ISSN 2772-8994. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.crope.2025.100100>.

GEBARA, Karimi Sater; GASPAROTTO-JUNIOR, Arquimedes; SANTIAGO, Patricia Gonçalves; CARDOSO, Claudia Andrea Lima; SOUZA, Lauro Mera de; MORAND, Christine; COSTA, Telma Aparecida; CARDOZO-JUNIOR, Euclides Lara. Daily intake of chlorogenic acids from consumption of maté (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) traditional beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, American Chemical Society (ACS), v. 65, n. 46, p. 10093–10100, nov. 2017. ISSN 1520-5118. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04093>.

GEBARA, Karimi S.; JUNIOR, Arquimedes Gasparotto; PALOZI, Rhanany A. C.; MORAND, Christine; BONETTI, Carla I.; GOZZI, Paula T.; MELLO, Martha R. F. de; COSTA, Telma A.; JUNIOR, Euclides L. Cardozo. A randomized crossover intervention study on the effect a standardized maté extract (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) in men predisposed to cardiovascular risk. **Nutrients**, v. 13, n. 1, p. 14, 2020.

GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, FapUNIFESP

(SciELO), v. 30, n. 2, p. 374–381, abr. 2007. ISSN 0100-4042. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>.

GOLDENBERG, David; GOLZ, Avishay; JOACHIMS, Henry Zvi. The beverage maté: A risk factor for cancer of the head and neck. **Head & Neck**, Wiley, v. 25, n. 7, p. 595–601, jun 2003. ISSN 1097-0347. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1002/hed.10288>.

GUIOCHON, Georges. The limits of the separation power of unidimensional column liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Elsevier BV, v. 1126, n. 1–2, p. 6–49, set. 2006. ISSN 0021-9673. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2006.07.032>.

HARRIS, Daniel C. **Análise Química Quantitativa**. 9. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2017.

HAVSTEEN, Bent H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, Elsevier BV, v. 96, n. 2–3, p. 67–202, nov. 2002. ISSN 0163-7258. Disponível em: [https://dx.doi.org/10.1016/S0163-7258\(02\)00298-X](https://dx.doi.org/10.1016/S0163-7258(02)00298-X).

HECK, Claudio Inácio; MEJIA, Elvira Gonzalez de. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. R138–R151, nov. 2007.

IBGE. Erva-mate (cultivo agrícola) - instituto brasileiro de geografia e estatística. 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/erva-mate-cultivo/br>. Acesso em: maio de 2025.

IBGE. Produção da extração vegetal e da silvicultura (pevs 2023), instituto brasileiro de geografia e estatística. 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9105-producao-da-extracao-vegetal-e-da-silvicultura.html>. Acesso em: maio de 2025.

ICH Q2 (R1). Validation of analytical procedures: Text and methodology. 2005. Disponível em: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf). Acesso em: 25 maio 2025.

KOŁTON, Anna; DŁUGOSZ-GROCHOWSKA, Olga; WOJCIECHOWSKA, Renata; CZAJA, Monika. Biosynthesis regulation of folates and phenols in plants. **Scientia Horticulturae**, Elsevier BV, v. 291, p. 110561, jan. 2022. ISSN 0304-4238. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110561>.

KRAKOWSKA-SIEPRAWSKA, Aneta; RAFIŃSKA, Katarzyna; WALCZAK-SKIERSKA, Justyna; BUSZEWSKI, Bogusław. The influence of plant material enzymatic hydrolysis and

extraction conditions on the polyphenolic profiles and antioxidant activity of extracts: A green and efficient approach. **Molecules**, MDPI AG, v. 25, n. 9, p. 2074, abr. 2020. ISSN 1420-3049.

LANÇAS, Fernando M. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC / CLAE**. 2. ed. Campinas: Átomo, 2016. 354 p. ISBN 9788576702696.

LIMA, Juliana de Paula; FARAH, Adriana; KING, Benjamin; PAULIS, Tomas de; MARTIN, Peter R. Distribution of major chlorogenic acids and related compounds in brazilian green and toasted *Ilex paraguariensis* (maté) leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, American Chemical Society (ACS), v. 64, n. 11, p. 2361–2370, mar. 2016. ISSN 1520-5118. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00276>.

LIMA, L. E. M. Federal university of technology paraná academic works. 2019. Site do Overleaf. Disponível em: <https://www.overleaf.com/latex/templates/federal-university-of-technology-parana-academic-works/vvbtchwngcz>.

MATEOS, Raquel; BAEZA, Gema; SARRIÁ, Beatriz; BRAVO, Laura. Improved LC-MSn characterization of hydroxycinnamic acid derivatives and flavonols in different commercial mate (*Ilex paraguariensis*) brands. quantification of polyphenols, methylxanthines, and antioxidant activity. **Food Chemistry**, Elsevier BV, v. 241, p. 232–241, fev. 2018. ISSN 0308-8146.

MEINHART, Adriana Dillenburg; BIZZOTTO, Carolina Schaper; BALLUS, Cristiano Augusto; RYBKA, Ana Cecília Poloni; SOBRINHO, Merenice Roberto; CERRO-QUINTANA, Romina Sofia; TEIXEIRA-FILHO, José; GODOY, Helena Teixeira. Methylxanthines and phenolics content extracted during the consumption of mate (*Ilex paraguariensis* st. hil) beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 2188–2193, jan. 2010.

MENDONÇA, Gustavo Zambon; HAMINIUK, Charles Windson Isidoro; PEDRO, Alessandra Cristina; MARTINS, Lucia Regina Rocha; MOLIN, Fernando; LARSEN, Gabriel Oales Kaminski; HELM, Cristiane Vieira; WENDLING, Ivar; MACIEL, Giselle Maria. Extraction of bioactive compounds from different yerba mate genotypes and development of an antimicrobial gel. **Fitoterapia**, Elsevier BV, v. 183, p. 106582, jun. 2025. ISSN 0367-326X.

NEUE, Uwe D.; TRAN, Kim Van; IRANETA, Pamela C.; ALDEN, Bonnie A. Characterization of hplc packings. **Journal of Separation Science**, Wiley, v. 26, n. 3–4, p. 174–186, mar. 2003. ISSN 1615-9314. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200390025>.

OLIVIERI, Alejandro C. Practical guidelines for reporting results in single- and multi-component analytical calibration: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, Elsevier BV, v. 868, p. 10–22, abr. 2015. ISSN 0003-2670. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.01.017>.

PERES, Renato; TONIN, Fernando; TAVARES, Marina; RODRIGUEZ-AMAYA, Delia. Hplc-dad-esi/ms identification and quantification of phenolic compounds in *Ilex*

*paraguariensis* beverages and on-line evaluation of individual antioxidant activity. **Molecules**, MDPI AG, v. 18, n. 4, p. 3859–3871, mar. 2013. ISSN 1420-3049. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules18043859>.

PERKAMPUS, Heinz-Helmut. **Analytical Applications of UV-VIS Spectroscopy**. Springer Berlin Heidelberg, 1992. ISBN 9783642774775. Disponível em: [https://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-77477-5\\_4](https://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-77477-5_4).

PESCHEL, Wieland; Sánchez-Rabaneda, Ferran; DIEKMANN, Wilfried; PLESCHER, Andreas; Gartzía, Irene; Jiménez, Diego; Lamuela-Raventós, Rosa; BUXADERAS, Susana; CODINA, Carles. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 137–150, 2006. ISSN 0308-8146.

POSIT TEAM. **RStudio: Integrated Development Environment for R**. Boston, 2025. Disponível em: <https://posit.co/products/open-source/rstudio/>. Acesso em: 26 jan. 2026.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, 2025. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 26 jan. 2026.

RAKOCEVIC, Miroslava; MAIA, Aline de Holanda Nunes; LIZ, Marcus Vinicius de; IMOSKI, Rafaela; HELM, Cristiane Vieira; JUNIOR, Euclides Lara Cardozo; WENDLING, Ivar. Stability of leaf yerba mate (*Ilex paraguariensis*) metabolite concentrations over the time from the prism of secondary sexual dimorphism. **Plants**, MDPI AG, v. 12, n. 11, p. 2199, jun. 2023. ISSN 2223-7747. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/plants12112199>.

RIBEIRO, Juliana Andriolli; MAGRI, Ederlan; GONÇALVES, Itamar Luís; PAESE, Karina; ROMAN, Juliana; VALDUGA, Alice Teresa. Photoprotector effect of emulsions with yerba-mate (*Ilex paraguariensis*) extract. **Scientia Pharmaceutica**, MDPI AG, v. 91, n. 2, p. 22, abr. 2023. ISSN 2218-0532. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/scipharm91020022>.

ROBBINS, Rebecca J. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, American Chemical Society (ACS), v. 51, n. 10, p. 2866–2887, abr. 2003. ISSN 1520-5118. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1021/jf026182t>.

ROSS, Julie A.; KASUM, Christine M. Dietary Flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 19–34, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.111401.144957>. Acesso em: 12 dez. 2025.

SHARMA, Anket; SHAHZAD, Babar; REHMAN, Abdul; BHARDWAJ, Renu; LANDI, Marco; ZHENG, Bingsong. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. **Molecules**, MDPI AG, v. 24, n. 13, p. 2452, jul. 2019. ISSN 1420-3049. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24132452>.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento**. [S.l.]: Artmed Editora, 2016. ISBN 9788582713655.

SIMÕES, Clarice Chaves; CARLINI, Elisaldo A.; MORAES, Jose P. P. De *et al.* **Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento**. [S.l.]: UFSC, 2007. ISBN 978-8532803955.

SKOOG, Douglas A; WEST, Donald M; HOLLER, James. **Fundamentos de química analítica. Volumen 2**. [S.l.]: Reverté, 2020.

SNYDER, Lloyd R.; KIRKLAND, Joseph J.; DOLAN, John W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010.

SONG, Yiting; CAO, Jun; CAO, Fuliang; SU, Erzhen. A systematic review on the yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **Journal of Food Composition and Analysis**, Elsevier BV, v. 142, p. 107466, jun. 2025. ISSN 0889-1575. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2025.107466>.

SOUZA, Aloisio H.P.; CORRÊA, Rúbia C.G.; BARROS, Lillian; CALHELHA, Ricardo C.; SANTOS-BUELGA, Celestino; PERALTA, Rosane M.; BRACHT, Adelar; MATSUSHITA, Makoto; FERREIRA, Isabel C.F.R. Phytochemicals and bioactive properties of *Ilex paraguariensis*: An in-vitro comparative study between the whole plant, leaves and stems. **Food Research International**, Elsevier BV, v. 78, p. 286–294, dez. 2015. ISSN 0963-9969. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.032>.

SOVIGUIDI, Deka Reine Judesse; PAN, Rui; LIU, Yi; RAO, Liping; ZHANG, Wenying; YANG, Xinsun. Chlorogenic acid metabolism: The evolution and roles in plant response to abiotic stress. **Phyton**, Tech Science Press, v. 91, n. 2, p. 239–255, 2022. ISSN 1851-5657. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.32604/phyton.2022.018284>.

STURION, José Alfredo; MEDRADO, Moacir José Sales; WENDLING, Ivar. **Cultivo da Erva-mate**. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2014. Acesso em: maio de 2025. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1155569/1/EmbrapaCultivoDaErva-Mate2014.pdf>.

TANIGUCHI, Masahiko; LAROCCA, Connor A.; BERNAT, Jake D.; LINDSEY, Jonathan S. Digital database of absorption spectra of diverse flavonoids enables structural comparisons and quantitative evaluations. **Journal of Natural Products**, American Chemical Society (ACS), v. 86, n. 4, p. 1087–1119, fev. 2023. ISSN 1520-6025. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.2c00720>.

TOMASI, Jéssica de Cássia; LIMA, Gabriel Goetten de; WENDLING, Ivar; HELM, Cristiane Vieira; HANSEL, Fabrício Augusto; GODOY, Rossana Catie Bueno de;

GRUNENVALDT, Renata Lúcia; MELO, Tamires Oliveira de; TOMAZZOLI, Maíra Maciel; DESCHAMPS, Cícero. Effects of different drying methods on the chemical, nutritional and colour of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves. **International Journal of Food Engineering**, v. 17, n. 1, p. 51–60, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/ijfe-2020-0312>.

TOMASI, Jéssica de Cássia; MAGGIONI, Renata de A.; GABIRA, Mônica Moreno; AGUIAR, Natália Saudade de; DUARTE, Manoela Mendes; VIEIRA, Leandro Marcolino; HELM, Cristiane Vieira; WENDLING, Ivar. Influence of agronomic and processing factors on bioactive compounds of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. - Hil): A systematic review. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, Elsevier BV, v. 48, p. 100652, set. 2025. ISSN 2214-7861. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jarmap.2025.100652>.

TOMAZZOLI, Maíra M.; NETO, Remi D. Pai; MORESCO, Rodolfo; WESTPHAL, Larissa; ZEGGIO, Amelia R. S.; SPECHT, Leandro; COSTA, Christopher; ROCHA, Miguel; MARASCHIN, Marcelo. Discrimination of brazilian propolis according to the seasoning using chemometrics and machine learning based on uv-vis scanning data. **Journal of Integrative Bioinformatics**, Walter de Gruyter GmbH, v. 12, n. 4, p. 15–26, dez. 2015. ISSN 1613-4516. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1515/jib-2015-279>.

VIEIRA, Manoela A.; MARASCHIN, Marcelo; PAGLIOSA, Cristiane M.; PODESTÁ, Rossana; SIMAS, Karina N. De; ROCKENBACH, Ismael Ivan; AMBONI, Renata D. de M. C.; AMANTE, Edna R. Phenolic acids and methylxanthines composition and antioxidant properties of mate (*Ilex paraguariensis*) residue. **Journal of Food Science**, Wiley, v. 75, n. 3, abr. 2010. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01548.x>.

VIGNALE, Federico A; GARCIA, Andrea Hernandez; MODENUTTI, Carlos P; SOSA, Ezequiel J; DEFELIPE, Lucas A; OLIVEIRA, Renato; NUNES, Gisele L; ACEVEDO, Raúl M; BURGUENER, German F; ROSSI, Sebastian M; ZAPATA, Pedro D; MARTI, Dardo A; SANSBERRO, Pedro; OLIVEIRA, Guilherme; CATANIA, Emily M; SMITH, Madeline N; DUBS, Nicole M; NAIR, Satish; BARKMAN, Todd J; TURJANSKI, Adrian G. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) genome provides new insights into convergent evolution of caffeine biosynthesis. **eLife**, eLife Sciences Publications, Ltd, v. 14, jan. 2025. ISSN 2050-084X. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.104759>.

VOGT, Gilcimar Adriano; NEPPEL, Gilberto; SOUZA, Adriano Martinho de. A atividade ervateira no planalto norte catarinense: a indicação geográfica como alternativa para a (re)valorização do produto erva-mate. **Desenvolvimento Regional em debate**, Universidade do Contestado - UnC, v. 6, n. 2, p. 64–87, jul. 2016. ISSN 2237-9029. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.24302/drd.v6i2.1205>.

VOGT, Thomas. Phenylpropanoid biosynthesis. **Molecular Plant**, v. 3, n. 1, p. 2–20, 2010.

WENDLING, Ivar. **Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire): estado da arte e tendências futuras**. Colombo, PR: Embrapa

Florestas, 2004. 46 p. (Documentos, 91). ISSN 1517-536X. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/308921/1/Doc91.pdf>.

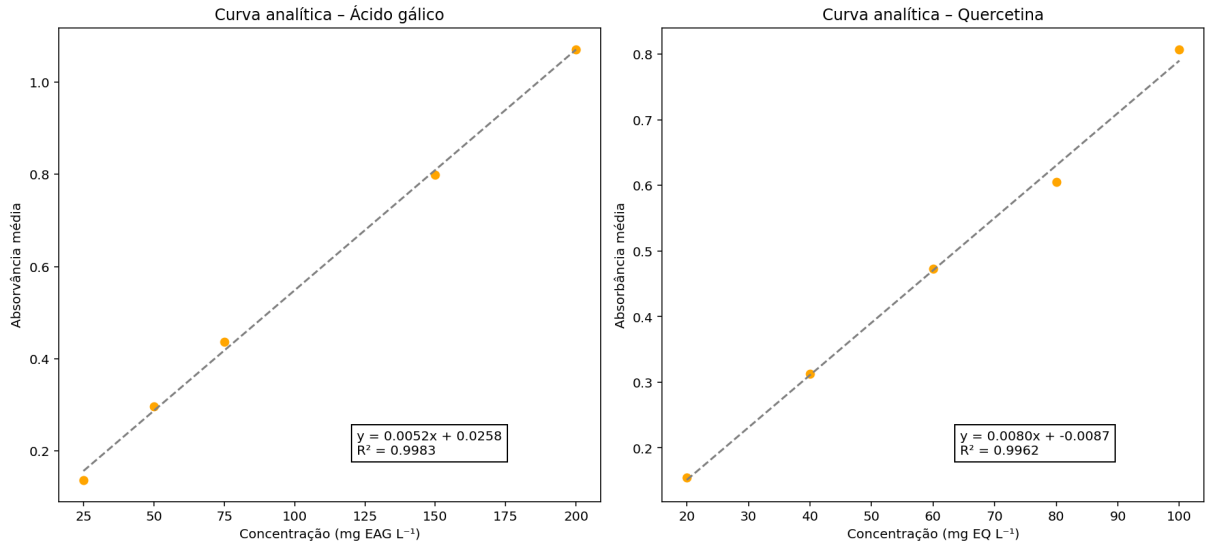
WENDLING, Ivar; SANTIN, Delmar. **Propagação e nutrição de erva-mate**. Brasília, DF: Embrapa, 2015. 195 p. ISBN 978-85-7035-365-8. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1013131/1/EmbrapaFlorestas-2015-PropagacaoNutricaoErvaMate.pdf>.

YIN, Yuling; KATAHIRA, Riko; ASHIHARA, Hiroshi. Metabolism of purine alkaloids and xanthine in leaves of maté (*Ilex paraguariensis*). **Natural Product Communications**, SAGE Publications, v. 10, n. 5, maio 2015. ISSN 1555-9475. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1177/1934578X1501000503>.

## **APÊNDICE**

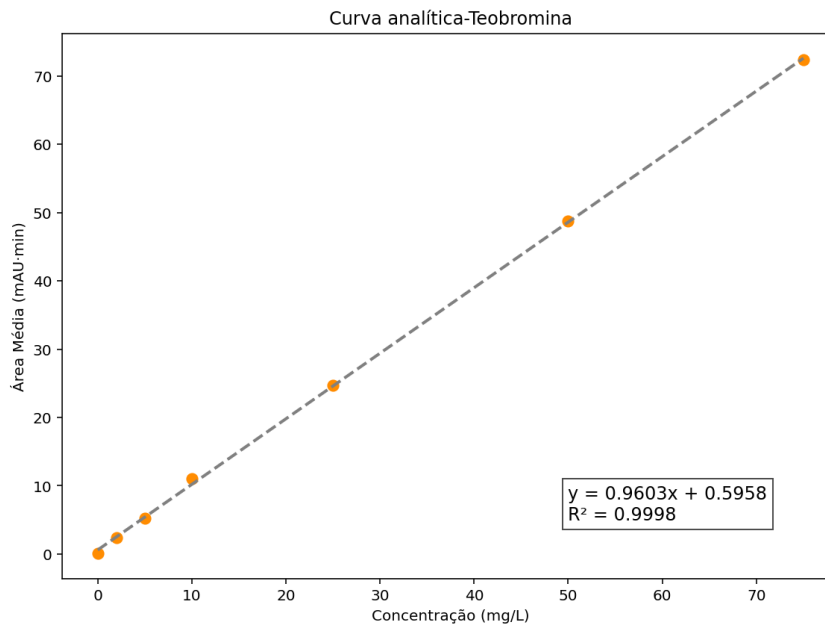
## APÊNDICE – RESULTADOS DETALHADOS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONOIDES, METILXANTINAS E ÁCIDOS CLOROGÊNICOS

Figura 21 – Curvas de calibração para quantificação de antioxidantes: fenólicos totais e flavonoides.



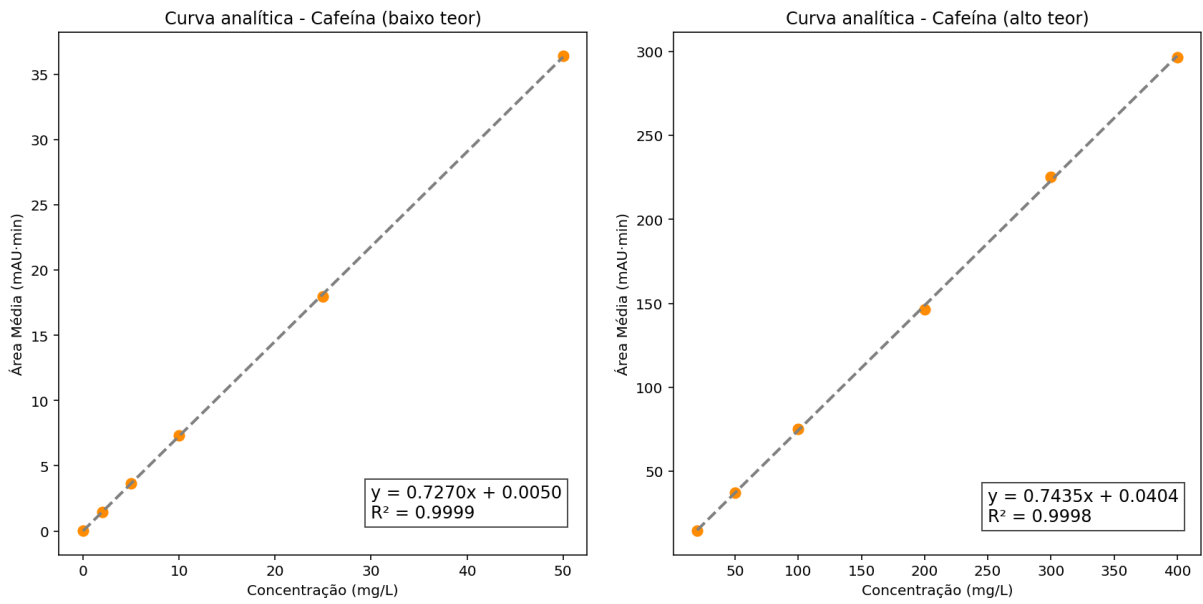
Fonte: Autoria própria (2026).

Figura 22 – Curva analítica para quantificação de teobromina



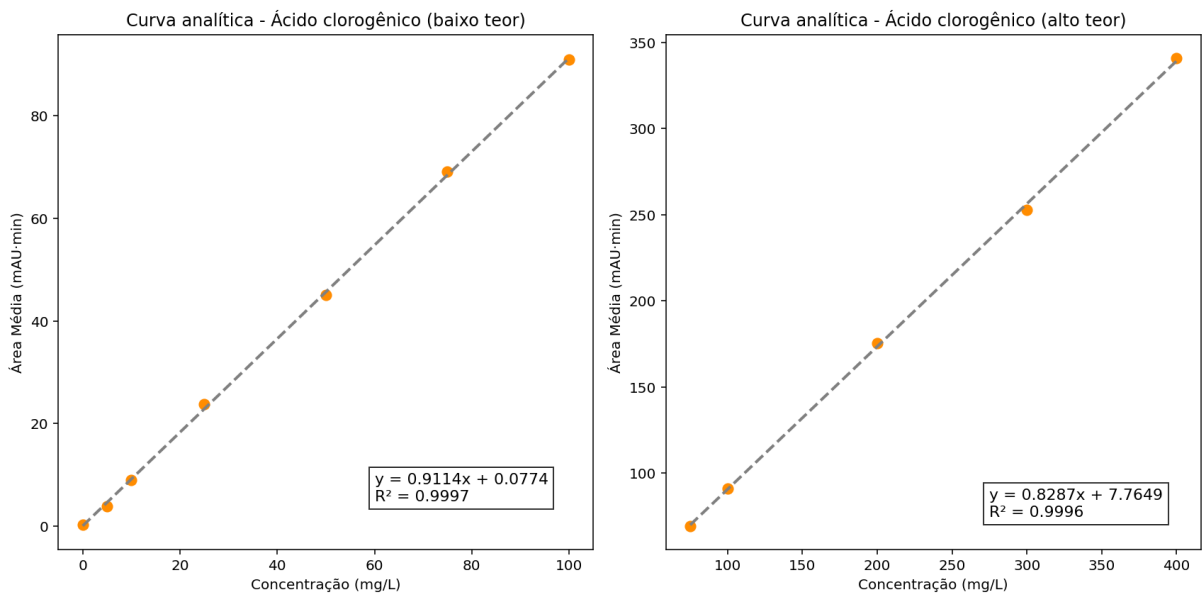
Fonte: Autoria própria (2026).

**Figura 23 – Curvas analíticas para quantificação de cafeína**



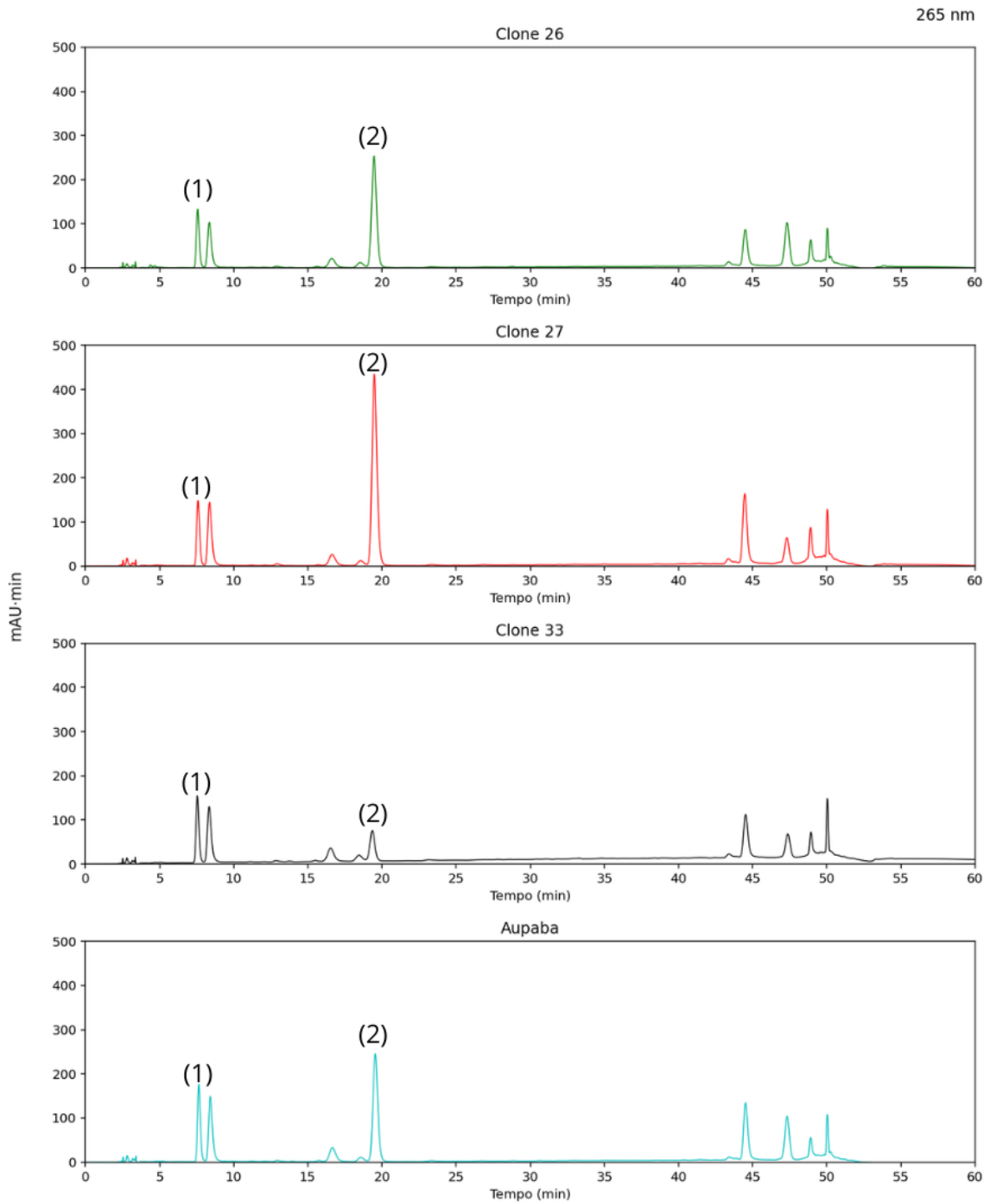
Fonte: Autoria própria (2026).

**Figura 24 – Curvas analíticas para ácido clorogênico e os seus derivados.**



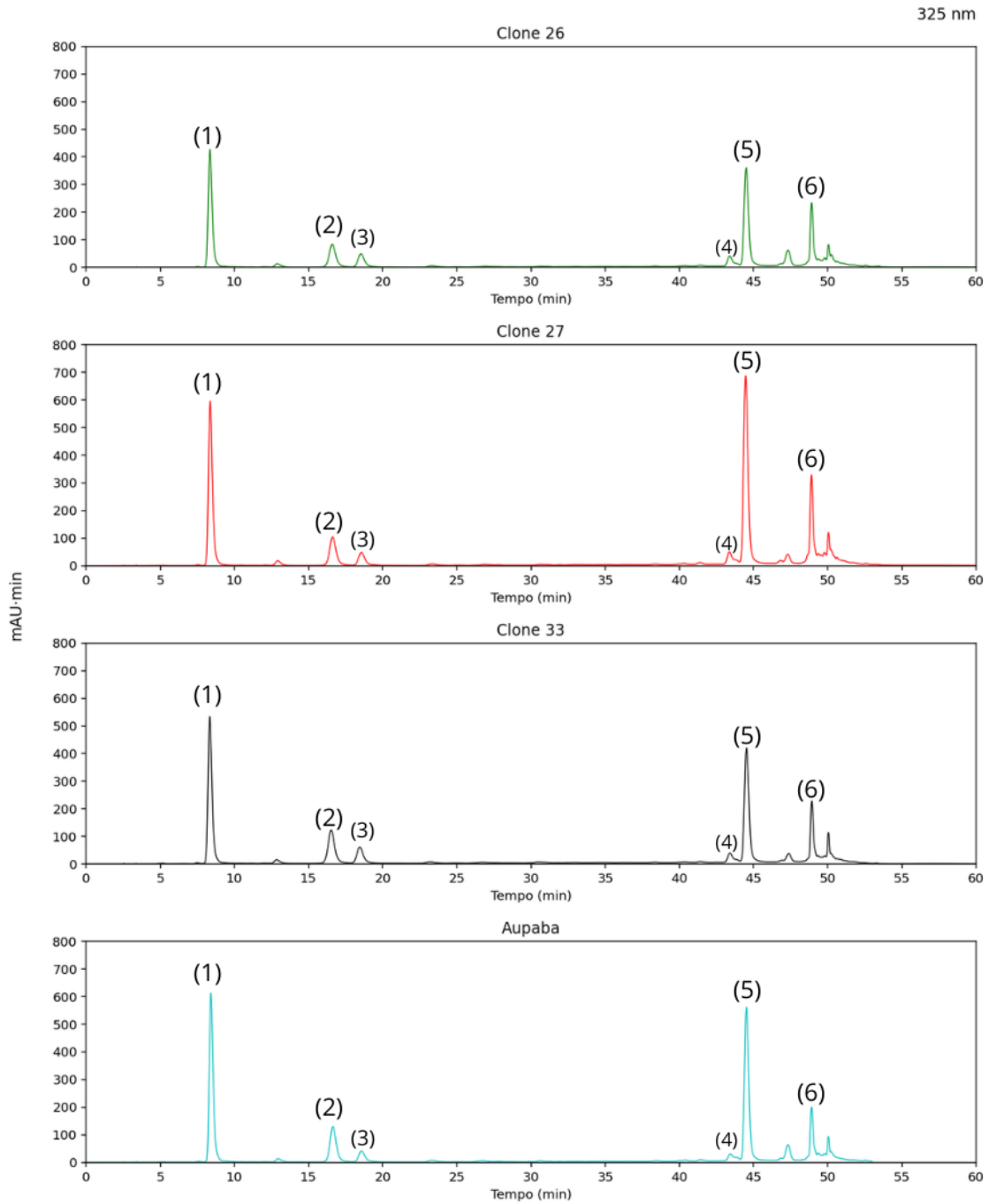
Fonte: Autoria própria (2026).

**Figura 25 – Cromatogramas dos clones C26, C27, C33 e Aupaba no verão. Sinal em 265 nm. Os compostos indicados são: (1) teobromina, (2) cafeína.**



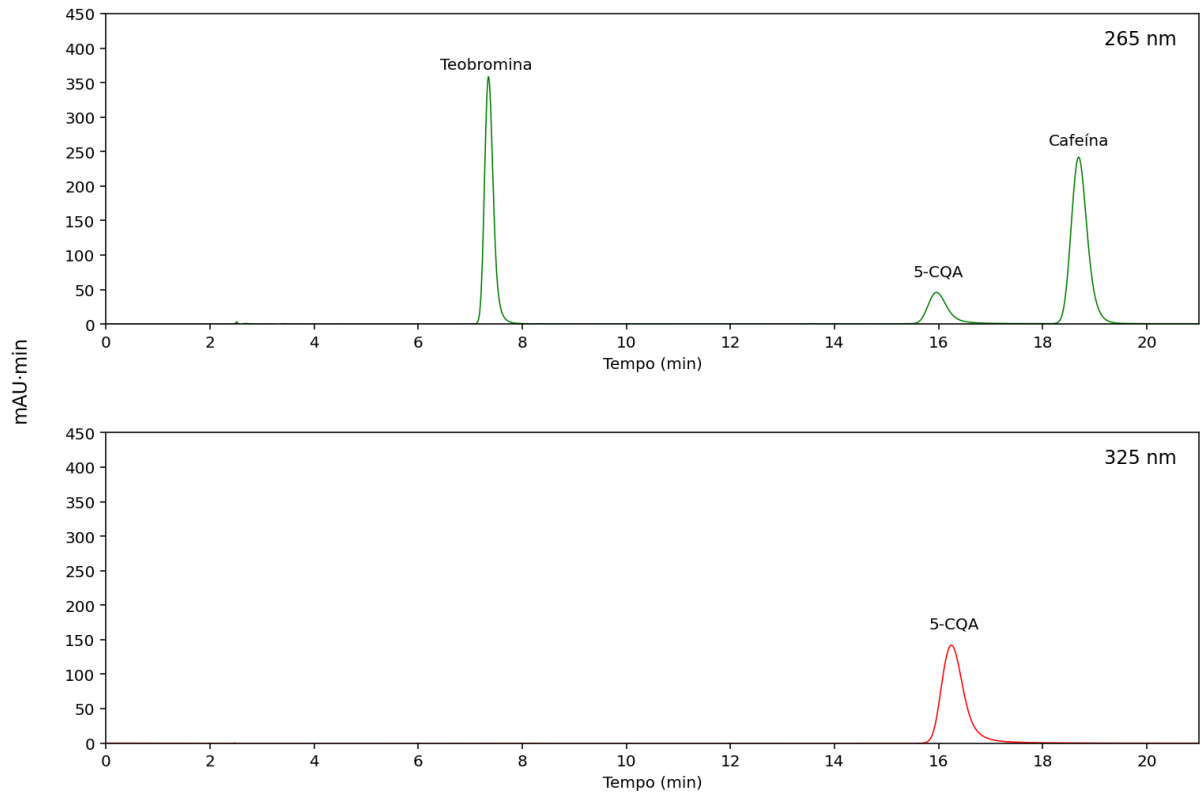
**Fonte: Autoria própria (2026).**

**Figura 26 – Cromatogramas dos clones C26, C27, C33 e Aupaba no verão. Sinal em 325 nm. Os compostos indicados são: (1) ácido 3-*O*-cafeoilquínico (3-CQA), (2) ácido 5-*O*-cafeoilquínico (5-CQA), (3) ácido 4-*O*-cafeoilquínico (4-CQA), (4) ácido 3,4-di-*O*-cafeoilquínico (3,4- diCQA), (5) ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico (3,5-diCQA) e (6) 4,5-di-*O*-cafeoilquínico (4,5-diCQA).**



**Fonte: Autoria própria (2026).**

**Figura 27 – Cromatogramas dos padrões utilizados para quantificar os compostos presentes nos extratos de erva-mate. Sinal em 265 e 325 nm.**



**Fonte: Autoria própria (2026).**