

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Teores de metilxantinas e saponinas e morfologia foliar de
erva-mate(*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.)
sob a influência de diferentes fatores ambientais
e em diferentes variedades e populações

GERALDO CENI COELHO

Porto Alegre, 2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Teores de metilxantinas e saponinas e morfologia foliar de erva-mate
(*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) sob a influência de diferentes fatores
ambientais e em diferentes variedades e populações

Tese apresentada por Geraldo Ceni Coelho
para obtenção do GRAU DE DOUTOR em
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Valquíria Linck Bassani

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Fitoquímica e na Central Analítica do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, nos Laboratório de Botânica, Laboratório de Águas e Laboratório de Entomologia da UNIJUÍ, tendo como apoio a área experimental do IBAMA em Alto da União, Ijuí, RS.

A tese foi orientada pelo Professor Eloir Paulo Schenkel que, em virtude de seu afastamento da UFRGS, transferiu, em 2001, a orientação da mesma para a Professora Valquiria Linck Bassani.

“- É claro que eu te amo, disse-lhe a flor. Foi por minha culpa que não soubeste de nada. Isso não tem importância. Foste tão tolo quanto eu. Trata de ser feliz... Mas pode deixar em paz a redoma. Não preciso mais dela.

- Mas o vento...

- Não estou assim tão resfriada... O ar fresco da noite me fará bem. Eu sou uma flor.

- Mas os bichos...

- É preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser conhecer as borboletas. Dizem que são tão belas! Do contrário, quem virá visitar-me? Tu estarás longe... Quanto aos bichos grandes, não tenho medo deles. Eu tenho minhas garras.

E ela mostrava ingenuamente seus quatro espinhos.”

Antoine de Saint Exupéry¹

¹ trecho do livro “O Pequeno Príncipe”, 11ª ed., Rio de Janeiro: Editora Agir, 1964.

Para a Adriana, o Gustavo e a Juliana.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que de alguma forma auxiliaram e tornaram possível a realização deste trabalho, ainda que sob pena de esquecer muitas pessoas importantes:

Eloir P. Schenkel, Valquíria Linck Bassani, José Ângelo da Silveira Zuanazzi, Pedro Ros Petrovick, George González Ortega, Gilsane Lino von Poser, Grace Gosmann, Amélia T. Henriques, Pedro Fröelich, Ana M. Bergold (profs. da Faculdade de Farmácia UFRGS), Alice, Patrícia e Maribete (funcionários da Faculdade de Farmácia UFRGS), Margareth L. Athayde, Simone C. B. Gnoatto, Claiton L. Lencina, Flávio H. Reginatto, Simone Quintana, Viviane Pires, Raquel Petry, Rodrigo Freddo, Alexandre C. Taketa (colegas de jornada), Maria Cristina Pansera de Araújo, Osório Antônio Lucchese, Gustavo B. de Miranda, Beatriz Walber, Lenice Medeiros, José Maria Soares, Ubiratan S. Jacobi, Raquel Jacob, Ilaine Gehrke, Pedro P. Borges, Mára Tissot-Squalli, Daniel Ayub, Pedro Dilkin (profs. da FIDENE/ UNIJUÍ), Ivanice Wichinheski, Ana Gilda Bogo, Tiago Klafke, Sidinei Bortolon da Costa, Janete Adamski, Fernanda Borges, Fabrício Bugs (funcionários da FIDENE-UNIJUÍ), Jorge Schirmer (Irder - FIDENE), Elaine Schnorrenberger, Fábio Luiz dos Santos e Mônica Dessui (acadêmicos da FIDENE/ UNIJUÍ), Helga Winge e Aldo Mellender de Araújo (Depto de Genética, UFRGS), Jorge Ernesto de Araujo Mariath (Depto. de Botânica UFRGS), Patrick Moyna (UCS), Gilson Moreira (Depto. de Zoologia UFRGS), Rocco di Mare (UFMS), José R. Trigo (UNICAMP), Luiz Carlos Tarasconi (FEPAGRO), Renato Dedecek, Marcos Rachwal, Moacir José Sales Medrado (pesquisadores da EMBRAPA-CNPQ), Sérgio H. Mosele e Adroaldo José Waczuk (pesquisadores da URI campus Erechim-RS), Afonso Oliseski e Dilnei D. Oliseski Neverth (Ervateira Bitumirim, Ivaí-PR) Ervateira Barão (Barão do Cotegipe-RS), Cecília Fernández-Díaz (UNAM, Misiones, Argentina), Alexandre Barnewitz (IBAMA Alto da União Ijuí), Sergio D. Prat Kricun e Luiz Belingheri (INTA Cerro Azul

Misiones, Argentina), e Carlos da Silveira (revisão linguística dos capítulos 1 a 4).

À FIDENE /UNIJUÍ pelo apoio, e à FAPERGS pelo auxílio financeiro de parte deste trabalho.

Aos meus pais que sempre me apoiaram.

Sumário

Lista de Tabelas	xii
Lista de Figuras	xiv
Resumo	xvii
Abstract	xix
Apresentação	1
Objetivos	4
Objetivos gerais	4
Objetivos específicos	5
1. Introdução - Referenciais Teóricos e Bibliográficos	6
1.1. O metabolismo secundário	6
1.2. Os metabólitos secundários no gênero <i>Ilex</i>	7
1.3. Os metabólitos secundários em <i>Ilex paraguariensis</i>	8
1.4. Saponinas triterpênicas	9
1.5. Propriedades aleloquímicas das saponinas	11
1.6. Saponinas da erva-mate	13
1.7. Metilxantinas	16
1.8. Biossíntese das metilxantinas	17
1.9. Compartimentalização	19
1.10. Metilxantinas como aleloquímicos	20
1.11. Outras categorias de metabólitos de <i>Ilex</i> e sua possível função como aleloquímicos	22
1.12. Compostos fenólicos e sua função aleloquímica	24
1.13. Metabólitos secundários, variabilidade genética e evolução	25
1.14. Variação genética no teor de metabólitos e resistência a insetos	27
1.15. Defesas químicas das plantas e a interação com insetos	32
1.15.1. <i>A teoria do balanço entre carbono / nitrogênio</i>	32
1.15.2. <i>A teoria da disponibilidade de recursos e a teoria da defesa ótima</i>	33
1.16. Deterrência <i>versus</i> toxicidade	34

1.17. Defesas vegetais e controle populacional dos insetos: as relações tri- tróficas	35
1.18. Metabolismo secundário, ontogênese e fenologia	38
1.19. Insetos associados à erva-mate	39
1.20. Lepidópteros associados à erva-mate	39
2. Teores de metilxantinas em <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.Hil. variedades <i>vestita</i> Loesener e <i>paraguariensis</i>	42
2.1. Introdução	42
2.2. Material e Métodos	45
2.2.1. <i>Coleta e extração</i>	45
2.2.2. <i>Métodos cromatográficos</i>	46
2.2.3. <i>Validação</i>	46
2.3. Resultados	47
2.4. Discussão	52
3. Teores de metilxantinas em erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.) sob diferentes intensidades luminosas	55
3.1. Introdução	55
3.2. Material e Métodos	56
3.2.1. <i>Condições experimentais</i>	56
3.2.2. <i>Tratamento do material vegetal pré-extração</i>	57
3.2.3. <i>Extração e quantificação de metilxantinas</i>	57
3.3. Resultados	59
3.4. Discussão	62
4. Influência da adubação com nitrogênio e potássio sobre os teores de metilxantinas em <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.	66
4.1. Introdução	66
4.2. Material e Métodos	67
4.3. Resultados	69
4.4. Discussão	70

5. Efeito de folhas de erva-mate desenvolvidas em diferentes níveis de luz natural e da adição de cafeína no desenvolvimento de <i>Adelpha mincia</i> (Nymphalidae: Lepidoptera)	72
5.1. Introdução	72
5.2. Material e Métodos	74
5.3. Resultados	77
5.3.1. <i>Concentração de metilxantinas nas folhas</i>	79
5.3.2. <i>Influência da dieta sobre a massa das pupas, tempo de desenvolvimento e sobrevivência</i>	80
5.3.3. <i>Efeito da dieta sobre os adultos</i>	82
5.3.4. <i>Preferência dos adultos em relação ao ambiente quanto à oviposição</i>	85
5.4. Discussão	86
5.4.1. <i>Comparação entre dieta de folhas de sol e folhas de sombra</i>	86
5.4.2. <i>O efeito da adição de cafeína</i>	88
5.4.3. <i>Preferência na oviposição</i>	89
6. Perfil quantitativo de matessaponinas em plantas de erva-mate do Mato Grosso do Sul	90
6.1. Introdução	90
6.2. Material e Métodos	92
6.2.1. <i>Material vegetal e extração</i>	92
6.2.2. <i>Métodos cromatográficos e validação</i>	93
6.3. Resultados	94
6.3.1. <i>Validação</i>	94
6.3.2. <i>Análise cromatográfica</i>	95
6.3.3. <i>Análise de correlação</i>	99
6.4. Discussão	101
7. Morfologia foliar quantitativa de erva-mate: comparação entre populações	103
7.1. Introdução	103

7.2. Material e Métodos	104
7.3. Resultados	105
7.4. Discussão	109
8. Sobrevivência e morfologia de mudas de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.) em diferentes graus de sombreamento	111
8.1. Introdução	111
8.2. Material e Métodos	113
8.3. Resultados	115
8.4. Discussão	120
9. Considerações finais e conclusões	123
9.1. Variabilidade nos teores de metilxantinas e saponinas	123
9.2. Os teores de metilxantinas e saponinas e a qualidade da matéria-prima	125
9.3. A cafeína é a metilxantina preponderante no mate?	129
9.4. Composição química e sabor	130
9.5. A interação com insetos e sombreamento	132
9.6. A interação com insetos e a forma de cultivo da erva-mate	133
9.7. Adubação e composição química	135
9.8. A morfologia	136
9.9. Variabilidade e variedades	138
9.10. Questões sem resposta e perspectivas	138
9.11. Conclusões principais	140
Referências bibliográficas	142
Anexos	163
Lista de anexos	164
Artigos publicados	164
Artigos aceitos para publicação	164
Dados brutos dos trabalhos experimentais	165
Mapas meteorológicos	183

Lista de tabelas

Tabela 1.1. Substâncias do metabolismo especial e seu efeito anti-herbivoria; exemplos de substâncias que são encontradas em <i>Ilex</i> L.	23
Tabela 1.2. Gêneros e respectivos compostos que apresentam variabilidade quantitativa determinada geneticamente	26
Tabela 1.3: Estudos sobre a relação entre deterrência e toxicidade para metabólitos vegetais	35
Tabela 2.1. Conteúdo de metilxantinas (mg/g) em <i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>vestita</i> Loes. e var. <i>paraguariensis</i> , outubro de 1998, Ivaí-PR	50
Tabela 2.2. Conteúdo de metilxantinas (mg/g) em <i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>vestita</i> Loes. e var. <i>paraguariensis</i> , fevereiro de 2000, Ivaí-PR	50
Tabela 4.1. Valores médios de teobromina, cafeína, soma das duas e razão entre as duas para os tratamentos de adubação e o tratamento controle, em <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil., Barão do Cotegipe- RS	69
Tabela 5.1. Luminosidade média, Fevereiro de 2001, incidente sobre as plantas de erva-mate utilizadas na alimentação de <i>Adelpha mincia</i>	74
Tabela 5.2. Estimativa da concentração de metilxantinas nas folhas dos diferentes tratamentos utilizados na alimentação de <i>Adelpha mincia</i>	79
Tabela 5.3. Efeito dos diferentes tipos de alimentação no desenvolvimento de <i>Adelpha mincia</i>	81
Tabela 5.4. Efeito da dieta sobre os parâmetros morfológicos de adultos de <i>Adelpha mincia</i>	83
Tabela 6.1. Concentração de matessaponinas e metilxantinas em plantas de erva-mate do Mato Grosso do Sul e de Ijuí.	98
Tabela 7.1. Plantas de cada população e local, que foram incluídas no estudo comparativo de morfologia foliar	104

Tabela 7.2. Valores médios e extremos dos diferentes parâmetros e índices morfológicos.	106
Tabela 7.3. Área, RAI e a proporção da área da metade basal em relação à área total, obtida através da simulação de folhas virtuais	109
Tabela 8.1. Intensidade relativa de luz em cada tratamento.	114
Tabela 8.2. Número de mudas sobreviventes em Março de 1998 (oito meses) e em Junho de 1999 (23 meses). Estação Florestal Experimental do IBAMA, Alto da União, Ijuí-RS	116
Tabela 8.3. Resultados da análise de variância de duas vias para blocos casualizados na comparação entre tratamentos (graus de sombreamento) no que se refere à sobrevivência	117
Tabela 8.4. Valores dos parâmetros morfológicos das folhas de plantas de erva-mate submetidas a diferentes intensidade de luz natural	120
Tabela 9.1. Proporção de plantas com teores de teobromina mais elevados que os de cafeína em diferentes variedades e populações de <i>I. paraguariensis</i> .	129
Tabela 9.2. Teores das substâncias químicas da erva-mate com influência sobre o sabor, segundo diversos autores.	131

Lista de figuras

Figura 1.1. Rota biossintética resumida das saponinas triterpênicas.	10
Figura 1.2. Pedunculósídeo de <i>Ilex taubertiana</i> Loesener e <i>Ilex theezans</i> Martius ex Reissek	13
Figura 1.3. Saponinas majoritárias de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.	14
Figura 1.4. Saponinas minoritárias (mono e bidesmosídicas) de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.	15
Figura 1.5. Metilxantinas da erva-mate	17
Figura 1.6. Rotas biossintéticas prováveis para xantinas em vegetais	18
Figura 1.7: Ácidos fenólicos de <i>I. paraguariensis</i> A. St.-Hil.	22
Figura 1.8. Fluxo de energia e matéria (setas) nas interações entre plantas, herbívoros, parasitóides e predadores	37
Figura 2.1. Distribuição geográfica de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.	43
Figura 2.2. Representação esquemática de um tricoma de <i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>vestita</i>	44
Figura 2.3. Cromatogramas de CLAE para metilxantinas	48
Figura 2.4. Teobromina, cafeína e soma das duas (mg/g) em <i>Ilex paraguariensis</i> var. <i>vestita</i> Loes. and var. <i>paraguariensis</i>	49
Figura 2.5. Curva de calibração para teobromina	51
Figura 2.6. Curva de calibração para cafeína	51
Figura 3.1. Efeito do sombreamento artificial sobre a concentração de cafeína e teobromina em <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil, Ijuí-RS	60
Figura 3.2. Efeito de diferentes intensidades de luz sobre a concentração de cafeína e teobromina em <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil., São Mateus do Sul-PR	60

Figura 3.3. Intensidade de luz e incremento de metilxantinas (cafeína + teobromina)	62
Figura 4.1. Dados da razão cafeína/teobromina para os diferentes tratamentos de adubação	70
Figura 5.1. Representação esquemática do adulto de <i>Adelpha mincia</i> e os parâmetros morfológicos de avaliação	76
Figura 5.2. Ovo de <i>Adelpha mincia</i>	78
Figura 5.3. Larva de <i>A. mincia</i> em 1º ínstar	78
Figura 5.4. Larva de <i>A. mincia</i> em 2º ínstar	78
Figura 5.5. Adulto de <i>A. mincia</i> .	78
Figura 5.6. Massa fresca das pupas de <i>Adelpha mincia</i> cujas larvas foram alimentadas em folhas de erva-mate crescidas em diferentes condições lumínicas e em folhas de sol adicionadas com cafeína	80
Figura 5.7. Proporção entre indivíduos de <i>A. mincia</i> sobreviventes e mortos, do 2º ínstar até a formação da pupa	81
Figura 5.8. Relação entre massa da pupa e área total da asa	84
Figura 5.9. Relação entre massa da pupa e área da mancha laranja da asa anterior	85
Figura 5.10. Comparação entre a oviposição nas plantas crescidas sem sombreamento e sombreadas com tela sombrite (34 % luz do sol)	86
Figura 6.1. Curva de calibração de matessaponina 1	94
Figura 6.2. Curva de calibração de matessaponina 3	95
Figura 6.3. Cromatogramas em CLAE de saponinas em diferentes amostras de <i>Ilex paraguariensis</i>	96
Figura 6.4. Cromatograma em camada delgada de extratos de amostras de erva-mate	97

Figura 6.5. Correlação entre matessaponina 1 e cafeína para plantas de erva-mate do Mato Grosso do Sul	100
Figura 6.6. Correlação entre matessaponina 3 e cafeína para plantas de erva-mate do Mato Grosso do Sul	100
Figura 7.1. Relação entre RAI e ângulo basal ($\hat{A}b$) em folhas de plantas de erva-mate de diferentes populações, analisadas em conjunto	107
Figura 7.2. Folhas virtuais geradas de acordo com os valores médios de comprimento, largura, distância da largura máxima até a base e ângulo basal	108
Figura 8.1. Sobrevivência de mudas de erva-mate ao longo do período experimental nos diferentes graus de sombreamento.	115
Figura 8.2. Relação entre área por folha (cm^2) e intensidade de luz	118
Figura 8.3. Relação entre massa foliar específica (mg/cm^2) e intensidade de luz	119

Resumo

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae) é uma espécie arbórea nativa do sul do Brasil, Paraguai, Argentina (Misiones) e Uruguai. Suas folhas e ramos são utilizados para a fabricação de bebidas e chás. Neste trabalho, objetivou-se o estudo das variações quantitativas de metilxantinas e saponinas dessa espécie, em diferentes variedades, populações e condições ambientais. A morfologia foliar quantitativa também foi estudada em diferentes populações e em diferentes intensidades de luz natural. As metilxantinas e saponinas foram quantificadas através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Comparando-se populações cultivadas em Ivaí-PR, verificou-se que as plantas da variedade *vestita* Loes. apresentam teores mais baixos de metilxantinas que as plantas da variedade *paraguariensis*. Por outro lado, a concentração de cafeína das plantas da var. *vestita* é mais elevada que os valores observados por outros autores para populações de var. *paraguariensis* cultivadas em outros locais. Observa-se ainda que a concentração de metilxantinas foi mais elevada em fevereiro que em outubro, nas duas variedades. O teor de metilxantinas apresenta um aumento de concentração de acordo com a diminuição da intensidade de luz. Verificou-se que adubação potássica promove um aumento da concentração de teobromina e uma diminuição da razão cafeína/teobromina. A adubação nitrogenada (uréia) tende a aumentar os teores de metilxantinas. Foi investigado o efeito de folhas de erva-mate oriundas de plantas crescendo em diferentes intensidades de luz, sobre larvas de *Adelpha mincia* Hall 1938 (Lepidoptera), uma espécie ecologicamente associada à erva-mate (como herbívora na fase larval). Quando as larvas são alimentadas por folhas de uma planta crescendo à sombra (4 % da luz natural), as pupas apresentam massa menor, em relação às larvas alimentadas com folhas de uma planta crescendo a pleno sol. A adição de cafeína às folhas de sol também diminui a massa das pupas. Em extratos aquosos, as saponinas majoritárias de uma população de erva-mate do Mato Grosso do Sul são as matessaponinas 1 e 2. Há grande variação entre plantas no teor destas substâncias. Verifica-se valores menores de área foliar e valores maiores de massa foliar específica (mg/cm^2) nas

plantas do Mato Grosso do Sul, em relação às populações do Paraná e Santa Catarina. A população de Santa Catarina apresentou uma morfologia quantitativamente diferenciada. Utilizando-se sombreamento com tela sombrite, verificou-se que a sobrevivência das mudas diminui de acordo com o aumento na intensidade de luz. A área foliar por folha não se altera, mas a massa foliar específica aumenta de acordo com a intensidade de luz.

Abstract

The maté (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae) is a native tree species from south Brazil, Paraguay, Argentine (Misiones State), and Uruguay. Its leaves and twigs are raw material to beverages and teas. In this work, it was carried out a research on the quantitative variability of methylxanthines and saponins from different varieties, populations and from plants under different environmental conditions. The quantitative leaf morphology was also analyzed, comparing different populations and plants submitted to different light intensities. The methylxanthines and saponins were quantified by HPLC. *I. paraguariensis* var. *vestita* Loesener showed lower methylxanthines contents than var. *paraguariensis*, both varieties cultivated in Ivaí, Paraná State, Brazil. On the other hand, average caffeine content from these *vestita* plants was higher than caffeine contents reported by other authors from other populations of *paraguariensis* variety. Methylxanthine content from leaves gathered on February were higher than leaves gathered on October, from both varieties. Methylxanthine content increased as light intensity decreased. The potassium fertilization decreased the caffeine/theobromine ratio and increased the theobromine content. Nitrogen (urea) fertilization increased methylxanthine contents. The effect of maté leaves from plants under different light regimes on *Adelpha mincia* Hall 1938 (Lepidoptera: Nymphalidae) development was investigated. This Lepidoptera is associated with *I. paraguariensis* in natural conditions (as a herbivore during the larval stages). Pupae developed from caterpillars eating shaded maté leaves (4 % of the sun light) exhibited a lower mass than those eating sunny leaves. Addition of caffeine to the sunny leaves also decreased pupae mass. Matessaponins 1 and 2 were the major saponins detected in the aqueous extraction of maté from a Mato Grosso do Sul population. There is a wide variation among plants on the saponin content. Mato Grosso do Sul maté leaves presented lower area and higher specific leaf mass (mg/cm^2), compared to populations from Paraná and Santa Catarina States. The Santa Catarina population had a different quantitative leaf morphology. The seedlings survival and the specific leaf mass were

increased according to decrease in the light intensity (obtained by a nylon screen). In the same experiment, however, differences on the leaf area were not detected.

Apresentação

A erva-mate, *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., é uma espécie arbórea da família das Aquifoliáceas. Sua distribuição natural inclui o Brasil, desde Minas Gerais e Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul, incluindo também Mato Grosso do Sul. A erva-mate ocorre ainda em Misiones, na Argentina, e no Paraguai, observando-se também populações isoladas na Bahia e Uruguai (Edwin & Reitz, 1967, Giberti, 1979, Andrews, 1985, Giberti, 1995).

A erva-mate é uma cultura agrícola importante no Sul do Brasil, Paraguai e Argentina. Suas folhas e ramos são matéria-prima para bebidas e chás, especialmente nas formas tradicionais de chimarrão e tererê.

Recentemente, a erva-mate tem recebido maior atenção da pesquisa brasileira, incluindo as áreas de fitoquímica, agronomia, genética, farmacologia e tecnologia farmacêutica. Muitos metabólitos especiais já foram identificados na erva-mate, entre os quais, flavonóides (Ohem & Hölzl, 1988; Ricco *et al.*, 1995; Filip *et al.*, 2001), metilxantinas (Filip *et al.*, 1983, 1998; Reginatto *et al.*, 1999), agliconas e saponinas triperpênicas (Gosmann *et al.*, 1989 e 1995; Kraemer *et al.*, 1996; Schenkel *et al.*, 1995, 1996, 1997).

A variação quantitativa do teor de saponinas ainda não foi estudada em erva-mate, muito embora tenha sido investigada em *Ilex opaca* (Potter & Kimerer, 1989), uma espécie da América do Norte.

No que se refere às metilxantinas, as variações quantitativas relacionadas aos diferentes órgãos, e à idade destes, foram estudadas por Mazzafera (1994). Athayde (2000) comparou diferentes populações de erva-mate quanto aos teores de

metilxantinas, e Reginatto *et al.* (1999) compararam plantas da variedade *vestita* com a variedade *paraguariensis*. Athayde *et al.* (2000) verificaram a presença de cafeína e teobromina na cutícula das folhas, e uma correlação positiva entre os teores de cafeína presentes na cutícula e nos tecidos internos da folha.

A importância da variabilidade fenotípica populacional da erva-mate, no que se refere à concentração e/ou capacidade de síntese de saponinas, metilxantinas e outros metabólitos, vai desde sua influência possível sobre a qualidade organoléptica e nutricional dos produtos derivados desta planta, até as formas de interações entre a planta e outros seres vivos. Em vista disto, propõe-se a investigação da variabilidade quantitativa dos componentes químicos nesta espécie, em particular metilxantinas e saponinas, considerando fatores populacionais, ambientais e fenológicos.

Considera-se relevante também o estudo dos efeitos dos metabólitos da erva-mate sobre os seres vivos que interagem com essa espécie vegetal em seu ambiente natural, em particular os insetos herbívoros. Desta maneira, a possível interferência destes componentes químicos da erva-mate sobre a biologia dos insetos poderia ser identificada e esclarecida.

O capítulo 1, de revisão bibliográfica, apresenta os aspectos mais relevantes da literatura, no sentido de subsidiar o entendimento e a discussão das abordagens experimentais, descritas nos capítulos subsequentes.

O capítulo 2 relata uma comparação entre as variedades *vestita* e *paraguariensis*, no que se refere aos teores de cafeína e teobromina. Este capítulo originou um artigo, já publicado na Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas (vol. 37, n. 2, p. 153-158), com cópia em anexo.

O capítulo 3 traz os resultados sobre a relação entre intensidade de luz e teores de metilxantinas em erva-mate, e o capítulo 4 relata os resultados referentes à influência de diferentes fórmulas de adubação sobre os teores de metilxantinas.

No capítulo 5, são apresentados os resultados referentes à influência de plantas de erva-mate, crescidas em diferentes intensidades de luz natural, sobre o

desenvolvimento de *Adelpha mincia*, uma borboleta cujas larvas se alimentam das folhas da erva-mate.

O capítulo 6 propõe um método de quantificação de saponinas bidesmosídicas majoritárias, e apresenta os resultados referentes a uma amostra de plantas de erva-mate do Mato Grosso do Sul.

Os capítulos 7 e 8 abordam questões relacionadas à morfologia quantitativa da erva-mate. O objetivo geral desta abordagem é contribuir para a compreensão da autoecologia da erva-mate, ou seja, as formas de interação da espécie com o seu ambiente. O capítulo 7 resultou em um artigo aceito para publicação no periódico *Brazilian Archives of Biology and Technology*, e o capítulo 8 resultou em um artigo publicado nos anais do 2º Congresso Sul-Americano da Erva-Mate. Cópias destes dois artigos são apresentadas em anexo.

Os capítulos de 2 a 8, referentes aos resultados experimentais, tiveram a colaboração de outros pesquisadores, a saber:

capítulo 2, Margareth Linde Athayde (UFSM);

capítulo 3, Marcos Rachwal (EMBRAPA – CNPF);

capítulo 4, Sergio H. Mosele e Adroaldo Waczuk (URICER-Erechim-RS), Moacir José Sales Medrado (EMBRAPA – CNPF);

capítulo 5, Fabio Luiz dos Santos, Gustavo Borba de Miranda, Maria Cristina Pansera de Araújo (UNIJUÍ);

capítulo 6, Simone C. B. Gnoatto (PPG em Ciências Farmacêuticas, UFRGS);

capítulo 7, Jorge Ernesto de Araujo Mariath (Depto. de Botânica, UFRGS);

capítulo 8, Elaine Schnorrenberger (acadêmica de Biologia, UNIJUÍ).

Objetivos gerais

- Quantificar as saponinas e metilxantinas da erva-mate, em folhas de plantas cultivadas sob diferentes tratamentos, e em diferentes variedades/populações;
- verificar a importância destes metabólitos sobre as interações entre a erva-mate e insetos;
- analisar a variabilidade morfológica das folhas de erva-mate e as respostas morfológicas das folhas a diferentes condições ambientais.

Objetivos específicos

- comparar as variedades *vestita* e *paraguariensis* no que se refere aos teores de metilxantinas;
- verificar o efeito da intensidade luminosa sobre os teores de metilxantinas em erva-mate;
- verificar o efeito da adubação sobre os teores de metilxantinas;
- analisar o efeito da cafeína sobre o desenvolvimento de lepidópteros cujas larvas se alimentem de erva-mate na natureza, ou seja, insetos que estejam ecológica e evolutivamente associados à erva-mate;
- desenvolver um método de quantificação para as saponinas de erva-mate;
- analisar a correlação entre quantidades de saponinas e xantinas;
- comparar a morfologia das folhas de plantas de erva-mate oriundas de diferentes populações;
- verificar as respostas morfológicas das folhas de erva-mate em plantas cultivadas sob diferentes intensidades luminosas.

1.

Introdução - Referenciais Teóricos e Bibliográficos

1.1. O metabolismo secundário

Metabólitos secundários são compostos formados a partir das substâncias do metabolismo primário. Embora as classes de substâncias do metabolismo primário sejam as mesmas para qualquer vegetal (p. ex. açúcares, DNA, aminoácidos), as classes e características químicas particulares das substâncias do metabolismo secundário são diferentes para cada espécie (Gottlieb *et al.*, 1996), podendo caracterizá-las enquanto entidades biológicas.

O termo ‘secundário’, proposto por H. Kossel em 1891 (*apud* Rhodes, 1994), surgiu da idéia de que os compostos do metabolismo secundário teriam pouca ou nenhuma importância para o desenvolvimento das plantas. Estas substâncias já foram consideradas apenas resíduos metabólicos (Swain, 1977). Kossel afirmou que os metabólitos primários estão presentes em quaisquer plantas capazes de divisão (celular), enquanto que os metabólitos secundários estão presentes apenas ‘acidentalmente’, não sendo essenciais para a vida da planta (Rhodes, 1994).

Em vista desta origem histórica, Gottlieb *et al.* (1996) propuseram o termo ‘metabolismo especial’, enfatizando a especificidade taxonômica do perfil químico das

espécies vegetais. Entretanto, o termo secundário é amplamente utilizado e tornou-se consagrado na literatura mundial.

A delimitação do metabolismo secundário é, por outro lado, controversa. Enquanto determinadas substâncias ou combinação de substâncias são características ou mesmo exclusivas de determinadas espécies, certas substâncias incluídas usualmente no metabolismo secundário são, na verdade, de ampla ocorrência, como, por exemplo, o ácido clorogênico e o ácido caféico. Talvez esta dificuldade de delimitação ocorra porque determinadas substâncias foram inicialmente identificadas em plantas nas quais ocorre uma maior acumulação destes metabólitos. Posteriormente, verifica-se que a mesma substância ocorre em várias outras plantas, porém em teores menores. Rhodes (1994) cita o exemplo do ácido 1-aminociclopentano-1-carboxílico, identificado primeiramente na pêra (*Pyrus communis*).

Outra dificuldade que se impõe é a universalidade das rotas biossintéticas de metabólitos secundários em plantas vasculares (Rhodes, 1994). O metabolismo dos terpenos, por exemplo, que leva à síntese das saponinas, é fundamental para a formação dos fitoesteróides, componentes estruturais das membranas plasmáticas em todo o reino vegetal. Desta forma, boa parte dos produtos de uma determinada rota são freqüentes, enquanto outros são restritos a determinados táxons.

1.2. Os metabólitos secundários em *Ilex*

As pesquisas químicas sobre espécies de *Ilex* da América do Sul verificaram a existência de diversas classes de metabólitos secundários nestas espécies: ácido caféico e seus derivados, ácidos clorogênicos, compostos fenólicos, xantinas, quercetina (Woodard & Cowland, 1935; Paula & Brooks, 1953; Scarpati & Guiso, 1964; Filip *et al.*, 1983 e 1998; Clifford & Ramirez-Martinez, 1990), flavonóides (Ohem & Hölzl, 1988; Ricco *et al.*, 1991, 1995), saponinas e triterpenos (Potter &

Kimmerer 1989; Gossmann *et al.*, 1989 e 1995; Heinzmann & Schenkel, 1995; Athayde, 1993; Costantin, 1995; Taketa & Schenkel, 1994, 1995; Taketa, 1997).

A pesquisa sobre metabólitos secundários tem grande contribuição para a taxonomia, visto que, apesar da grande variabilidade verificada em *Ilex paraguariensis*, no que se refere aos aspectos morfológicos e isoenzimáticos (Winge *et al.*, 1995), e em termos de sequências de DNA (RAPD²; Gauer & Cavalli-Molina, 2000), observa-se até o momento um perfil químico característico de cada espécie. Coelho (1995) somente pôde diferenciar *Ilex integerrima* (Vell.) Reissek e *Ilex theezans* Mart. ex Reissek através de caracteres anatômicos: a primeira apresenta idioblastos de mucilagem formados a partir de divisões periclinais (descontínuas) das células epidérmicas da face adaxial, enquanto a segunda apresenta uma epiderme múltipla na face adaxial. Costantin (1995) confirmou a diferença entre *I. integerrima* e *I. theezans* através de análise química de metabólitos secundários, em especial flavonóides e saponinas triterpênicas, comparando também seus dados com os de Athayde (1993).

1.3. Os metabólitos secundários em *Ilex paraguariensis*

Na erva-mate, os compostos secundários observados são as saponinas triterpênicas derivadas dos ácidos ursólico e oleanólico (Schenkel *et al.*, 1996 e 1997), as metilxantinas teobromina e cafeína (Filip *et al.*, 1983, 1998; Reginatto *et al.*, 1999), e os flavonóides rutina, campferol, quercetina e um glicosídeo de quercetina (Ohem & Hölzl, 1988; Ricco *et al.*, 1991 e 1995; Filip *et al.*, 2001). Em que pese a dificuldade conceitual em torno do metabolismo secundário, poderíamos incluir ainda os ácidos fenólicos que, na erva-mate, se apresentam em grande concentração (Filip *et al.*, 2001).

1.4. Saponinas triterpênicas

Saponinas são glicosídeos de esteróides ou de triterpenos policíclicos. Este tipo de estrutura, que possui uma parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra parte hidrofílica (açúcares), determina a propriedade de redução da tensão superficial da água e suas ações detergente e emulsificante (Schenkel *et al.*, 1999). As saponinas triterpênicas são compostos orgânicos de núcleo fundamental pentacíclico de 30 carbonos (Schenkel *et al.*, op. cit.).

As saponinas derivadas dos núcleos fundamentais ursano e oleanano possuem uma ligação dupla entre o carbono 12 e 13. Possuem ainda, ordinariamente, diversas hidroxilas e, eventualmente, grupos carboxila e carbonila. São diversos os glicídios que podem se ligar à aglicona em diversas posições, sendo estes solitários ou sob a forma de cadeias. As saponinas monodesmosídicas possuem apenas um grupo de açúcares e as bidesmosídicas possuem dois (Hostettmann & Marston, 1995). Na maior parte dos casos, a ligação dos açúcares ao núcleo triterpênico ocorre nos carbonos 3 e 28 (Schenkel *et al.*, 1999; Figuras 1.3 e 1.4, págs. 13 e 14).

Os núcleos triterpênicos fundamentais de natureza ácida também podem ser encontrados em estado livre, tais como ácido rotúndico, ácido ursólico e ácido oleanólico. (Hostettmann & Marston, 1995).

As saponinas são biossintetizadas a partir do ácido mevalônico que, por sua vez, é formado a partir de uma condensação de duas moléculas de acetil-CoA (Brown, 1998). Os passos principais da biossíntese terpênica são ilustrados na Figura 1.1. (pág. 10).

² Random amplified polymorphic DNA

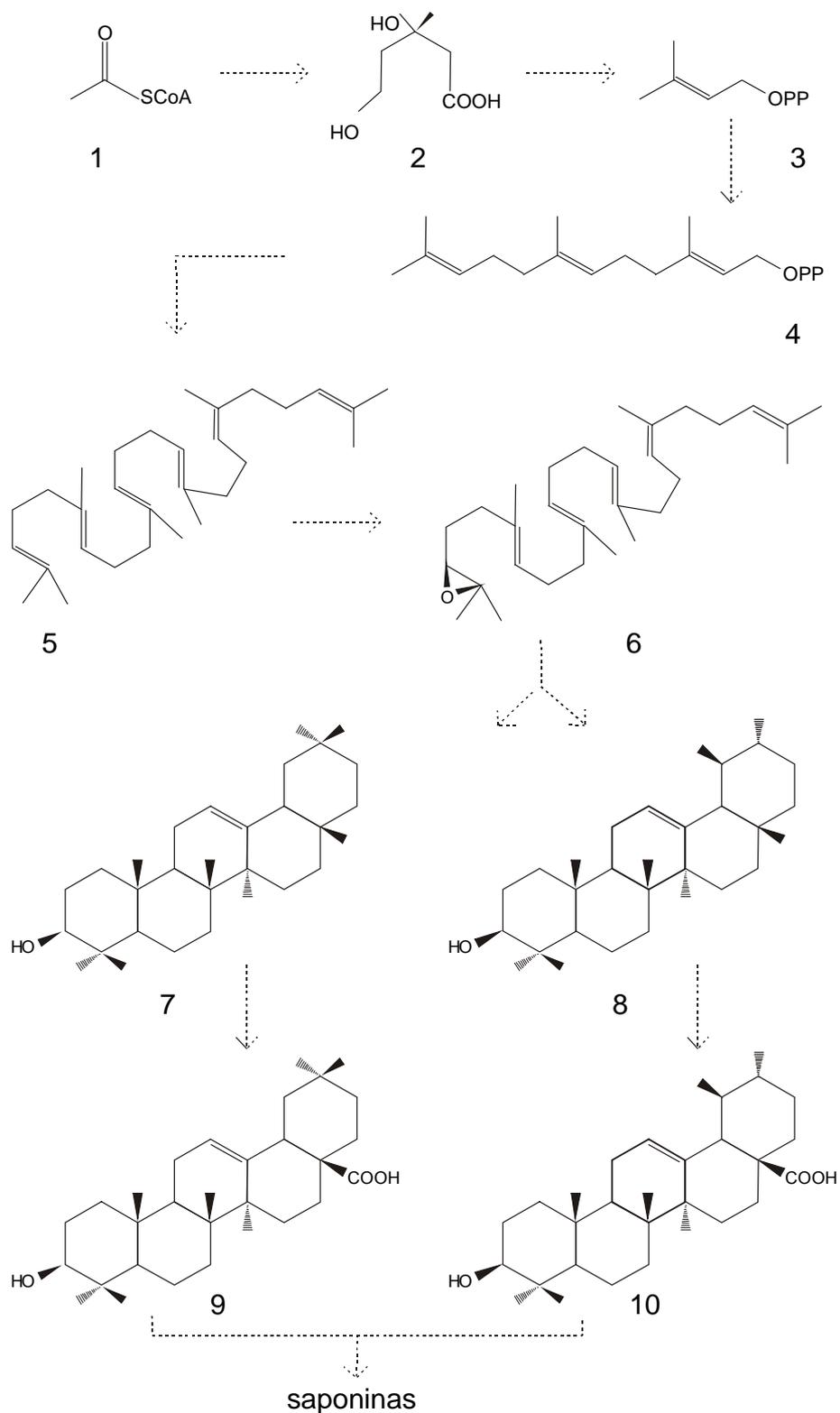


Figura 1.1. Rota biossintética resumida das saponinas triterpênicas. 1. acetil-CoA, 2. ácido mevalônico, 3. pirofosfato de 2-isopentenila, 4. pirofosfato de farnesila, 5. esqualeno, 6. 2,3-epoxiesqualeno, 7. β -amirina, 8. α -amirina, 9. ácido oleanólico, 10. ácido ursólico (adaptada de Brown, 1998).

1.5. Propriedades aleloquímicas das saponinas

Saponinas são substâncias que podem inibir a herbivoria (Rhoades & Cates, 1976; Numata *et al.*, 1987; Potter & Kimmerer, 1989).

Em *Ilex rotunda*, Nakatani *et al.* (1989) observaram um efeito anti-herbivoria fraco contra larvas de *Spodoptera litura* Fab. (Lepidoptera) para duas saponinas monodesmosídicas: um rotungenosídeo e um pedunculósídeo. A alfafa (*Medicago sativa* L.) possui diversas saponinas derivadas do ácido medicagênico conhecidas pelas suas atividades deterrentes (Small, 1996). Formigas cortadeiras (*Atta cephalotes* L.) preferem plantas com maior conteúdo de água e menor conteúdo de saponinas (Folgarait *et al.*, 1996). Diversas saponinas de *Agave cantala*, *Phaseolus vulgaris* e *Balanites roxburghii* apresentam atividade inibidora da herbivoria para o lepidóptero³ *Spilosoma obliqua* (Jain & Tripathi, 1991).

A ação fisiológica de algumas saponinas é devida à sua capacidade, como tensoativo, de destruir membranas plasmáticas, lisando as células. Em nível de tubo digestivo, porém, saponinas de leguminosas (alfafa e soja) podem inibir proteases de insetos e mamíferos, ou combinarem-se com esteróis, diminuindo sua absorção. Estes efeitos dependem da razão entre quantidade de saponinas e quantidade de nutrientes ingeridos (Slansky Jr., 1991).

Verificou-se que as saponinas de *I. paraguariensis* são capazes de interferir na permeação do colesterol através de membranas de lipídios *in vitro*, o que indica uma possível diminuição da absorção de colesterol *in vivo* (Ferreira *et al.*, 1997).

A capacidade de inibir a absorção de esteróides e terpenóides poderia, por outro lado, prejudicar o desenvolvimento de insetos que se alimentam da erva-mate.

A complexação com esteróides, reduzindo a absorção destes no tubo digestivo dos insetos, pode gerar efeitos detrimenais. Os insetos são incapazes de sintetizar

³ Ordem de insetos que inclui as borboletas e mariposas.

esteróides a partir de precursores mais simples, conseqüentemente devem absorvê-los a partir de seu alimento. Os esteróides servem como precursores dos hormônios, de forma que sua escassez pode prejudicar o desenvolvimento das larvas. Pode-se reverter, pelo menos em parte, a mortalidade e a redução no crescimento, verificados em insetos que se alimentam de dietas ricas em saponinas, através da adição de colesterol suplementar à dieta (Gershenzon & Croteau, 1991).

O ácido ursólico, aglicona componente de diversas saponinas em *Ilex*, pode estar presente na forma livre, e é referido também como substância aleloquímica (Tabela 1.1, p. 23; Morgan & Warthen Jr., 1990). Além da possibilidade de agir como aleloquímico, o ácido ursólico pode contribuir para a diminuição da perda de água através da cutícula, em função de sua baixa polaridade. O ácido ursólico é comumente encontrado na cutícula das folhas, sendo um dos compostos orgânicos mais abundantes da cutícula das folhas de macieiras (Camargo & Silva, 1990).

As saponinas podem apresentar a capacidade de inibir o desenvolvimento de vegetais, desta maneira caracterizando um fenômeno de alelopatia: a capacidade de um vegetal de inibir o desenvolvimento de outros através de substâncias químicas. Saponinas triterpênicas e agliconas triterpênicas (ácido glicirrético e ácido oleanólico) são capazes de inibir produção de clorofilas, agindo sobre os etioplastos, causar perda de eletrólitos em células de fragmentos teciduais de plantas, inibir a germinação e crescimento e, também, podem diminuir a nodulação em certas leguminosas, o alongamento da raiz primária e desenvolvimento de raiz secundária de certas plantas (Hoagland *et al.*, 1996).

A capacidade de certas saponinas ou agliconas de interferir nas atividades enzimáticas e no desenvolvimento de vegetais ou bactérias pode estar relacionada com sua capacidade de interagir com a membrana plasmática ou com as membranas internas dos compartimentos intracelulares, como ocorre no caso da inibição de peroxidação de lipídios em microsomas. Entretanto, a inibição de certas enzimas (como fosfodiesterases) pode depender da isoenzima envolvida (Hoagland *et al.*, 1996).

As saponinas de *Ilex* podem também apresentar efeito fisiológico, atuando sobre características sensoriais como o sabor. O que se sabe, até o momento, é que as diferentes saponinas de *Ilex* apresentam ampla variação no amargor. O pedunculósídeo de *Ilex taubertiana* e *Ilex theezans* (Figura 1.2) é dez vezes mais amargo que a mistura de saponinas encontradas em *I. paraguariensis* (Taketa *et al.*, 1998).

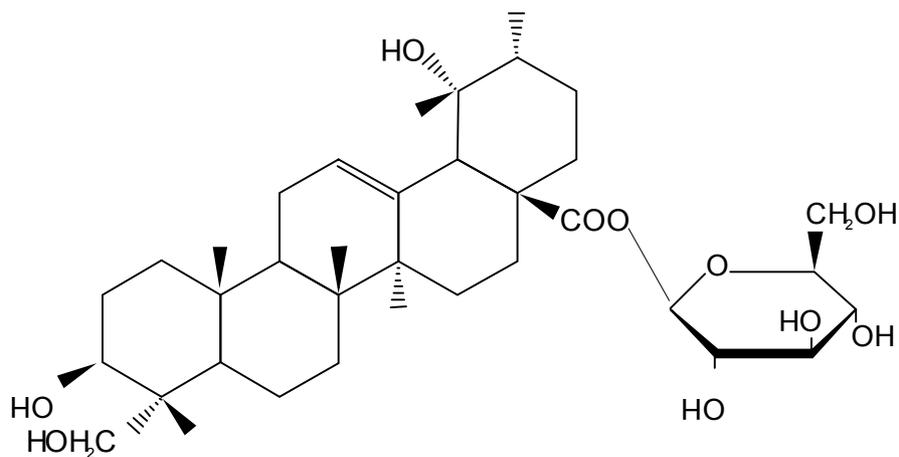
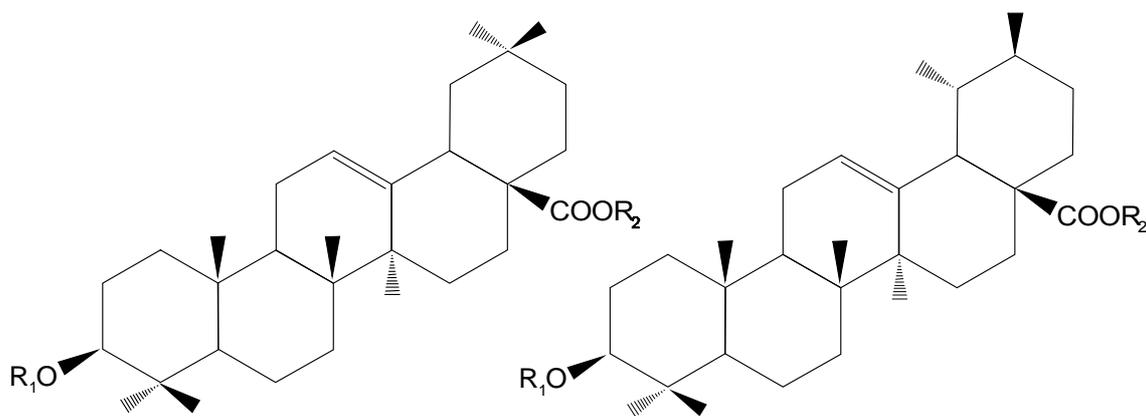


Figura 1.2: Pedunculósídeo, isolado de *Ilex taubertiana* Loesener e *Ilex theezans* Martius ex Reissek (Taketa & Schenkel, 1995; Schenkel *et al.*, 1997).

1.6. Saponinas da erva-mate

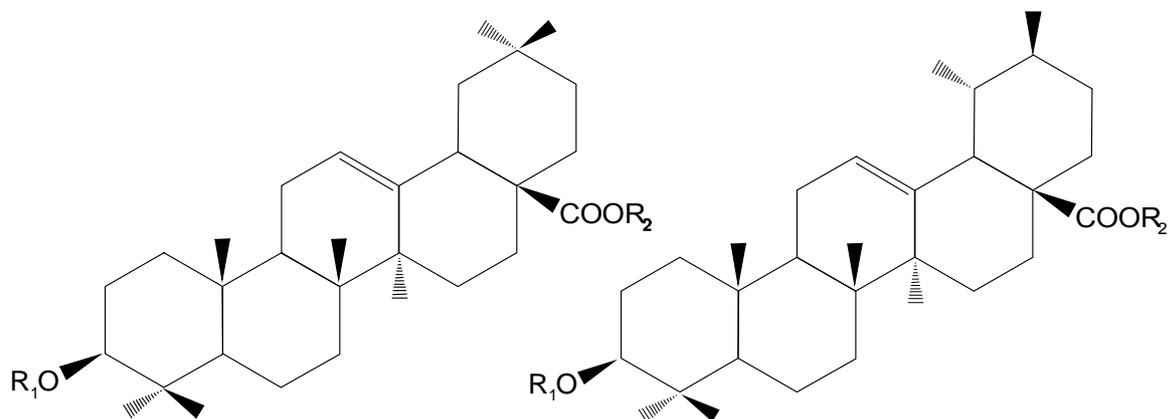
As saponinas majoritárias de *I. paraguariensis* têm estrutura bidesmosídica (Figura 1.3). Cada uma delas é uma mistura de isômeros com agliconas constituídas de ácido ursólico ou de ácido oleanólico (Schenkel *et al.*, 1996; Martinet *et al.*, 2001).



	R₁	R₂
Matessaponina 1	β-D-glicopiranosil-(1→3)-α-L-arabinopiranosil	β-D-glicopiranosil
Matessaponina 2	β-D-glicopiranosil-(1→3)-[α-L-ramnopiranosil-(1→2)]-arabinopiranosil	β-D-glicopiranosil
Matessaponina 3	β-D-glicopiranosil-(1→3)-arabinopiranosil	β-D-glicopiranosil-(1→6)-β-D-glicopiranosil
Matessaponina 4	β-D-glicopiranosil-(1→3)-[α-L-ramnopiranosil-(1→2)]-arabinopiranosil	β-D-glicopiranosil-(1→6)-β-D-glicopiranosil
Matessaponina 5	β-D-glicopiranosil-(1→3)-[α-L-ramnopiranosil-(1→2)]-arabinopiranosil	β-D-glicopiranosil-(1→4)-β-D-glicopiranosil-(1→6)-β-D-glicopiranosil

Figura 1.3. Saponinas majoritárias de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., adaptada a partir de Schenkel *et al.*, 1996 e 1997. Os núcleos triterpênicos representados acima são o ácido oleanólico (à esquerda) e o ácido ursólico (à direita).

Além destas, a erva-mate possui saponinas minoritárias, a maioria das quais monodesmosídicas (Figura 1.4).



	R₁	R₂
J1a	α -L-ramnopiranosil-(1→2)] α -L-arabinopiranosil	H
J1b	α -L-ramnopiranosil-(1→2)] α -L-arabinopiranosil	H
J2a	β -L-glicopiranosil-(1→3)] α -L-arabinopiranosil	H
J2b	β -L-glicopiranosil-(1→3)] α -L-arabinopiranosil	H
J3a	α -L-ramnopiranosil-(1→2)] α -L-arabinopiranosil	β -D-glicopiranosil
J3b	α -L-ramnopiranosil-(1→2)] α -L-arabinopiranosil	β -D-glicopiranosil

Figura 1.4. Saponinas minoritárias (mono e bidesmosídicas) de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.; Os núcleos triterpênicos representados acima são o ácido oleanólico (à esquerda) e o ácido ursólico (à direita); adaptada de Schenkel *et al.* (1996).

1.7. Metilxantinas

As metilxantinas são derivadas da purina e do ciclo de Krebs. Segundo alguns autores, as metilxantinas podem ser consideradas alcalóides, pois apresentam uma estrutura heterocíclica com a presença de nitrogênio e, ainda, a capacidade de ação sobre o sistema nervoso animal (Pelletier, 1983). Outros preferem excluí-las deste grupo em função de não serem derivadas diretamente de aminoácidos (Atta-ur-rahman & Choudhary, 1990).

Encontram-se nos vegetais sob formas solúveis combinadas com o ácido clorogênico, taninos, oses e seus ésteres fosfóricos. Em *Coffea*, verificou-se que o ácido clorogênico é importante na estabilização físico-química da cafeína e da teobromina (Waldhauser & Baumann, 1996), evitando que estas se dispersem nas células por difusão (Martin *et al.*, 1987).

As metilxantinas são produzidas por plantas de mais de 30 famílias. As mais conhecidas são Aquifoliaceae (*Ilex paraguariensis*, *I. guaiusa*, *I. vomitoria*), Theaceae (*Camellia sinensis*), Rubiaceae (*Coffea arabica*, *C. canephora*), Sterculiaceae (*Theobroma cacao*, *Cola nitida*) e Sapindaceae (*Paulinia cupana*), entre outras (Atta-ur-rahman & Choudhary, 1990).

São três as metilxantinas observadas nas espécies de *Ilex* do Sul da América do Sul: teobromina, teofilina e cafeína (Figura 1.5).

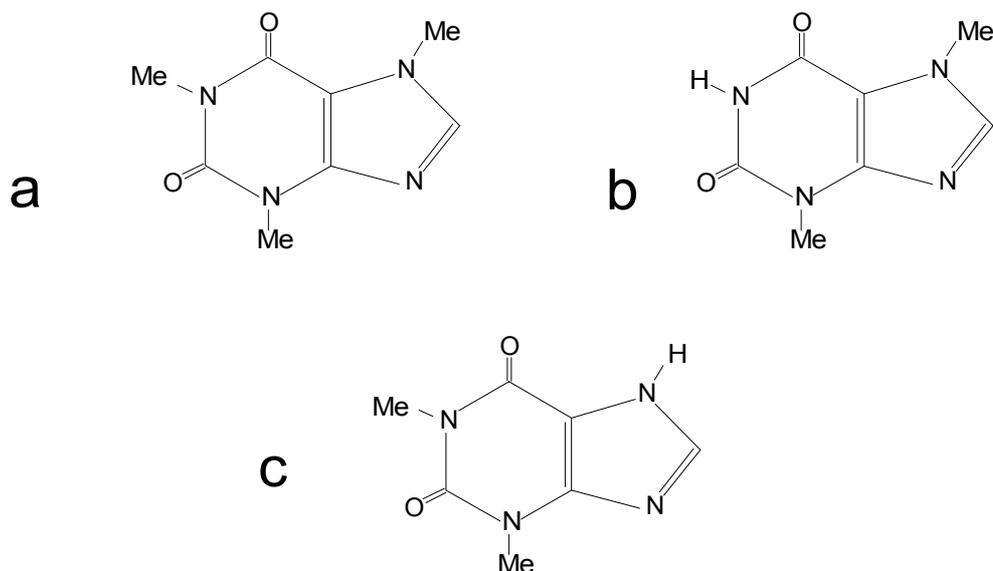


Figura 1.5: Metilxantinas da erva-mate; a= cafeína, b= teobromina e c=teofilina; Me=CH₃.

A ocorrência de teofilina em *Ilex paraguariensis* é controversa. Embora tenha sido encontrada em pequenas quantidades por certos autores (Mazzafera, 1994), não é confirmada por outros (Baltassat *et al.*, 1984; Clifford & Ramirez Martinez, 1990; Ashihara, 1993; Filip *et al.*, 1998; Reginatto *et al.*, 1999; Athayde *et al.*, 2000).

1.8. Biossíntese das metilxantinas

A biossíntese das metilxantinas, resumida na Figura 1.6, tem como ponto principal de partida a adenina (Fujimori & Ashihara, 1990; Mazzafera *et al.*, 1991; Suzuki *et al.* 1992, Ashihara, 1993). A origem biossintética da adenina, por sua vez, envolve os aminoácidos glicina, ácido aspártico e glutamina (Wink, 1997; Henriques *et al.*, 1999).

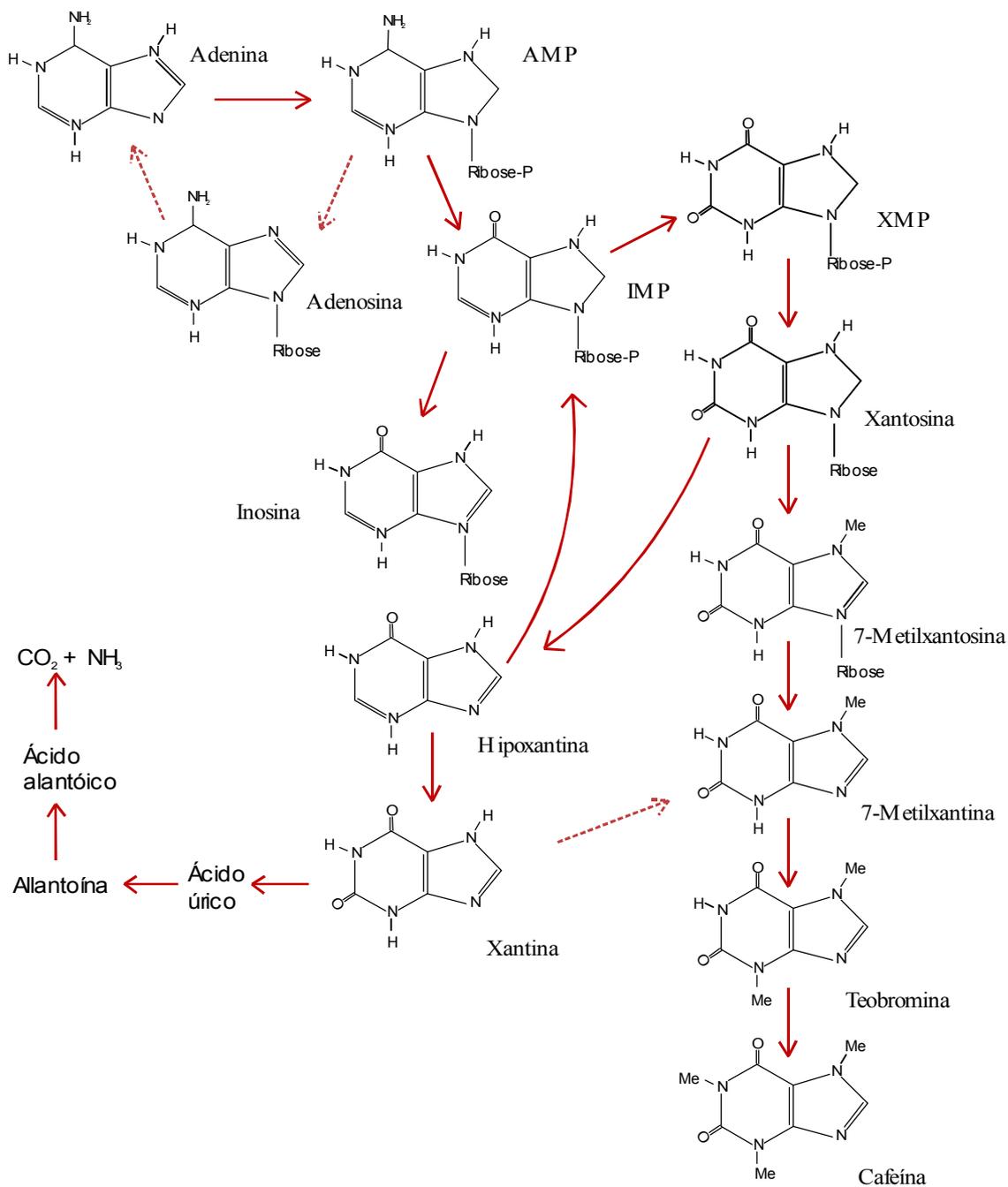


Figura 1.6. Rotas biossintéticas prováveis para xantinas em *Camellia sinensis*, *Coffea arabica* e *I. paraguariensis*, adaptadas de Suzuki *et al.*, 1992 e Ashihara, 1993; Me = CH₃.

A adenina é transformada em adenosina monofosfato através da ligação de uma ribose no N -9, e pela ação da adenina fosforibosil transferase. O doador de ribose

fosfato é o 5-fosforibosil-1-pirofosfato. Através de duas etapas de oxidação, surge a xantosina monofosfato (XMP). Ocorre então a desfosforilação seguida de metilação através da N-7 metiltransferase (7-NMT), formando então a 7 metilxantosina. A fonte do grupo metila é a S-adenosil metionina. A metilação antes da fosforilação é outra hipótese proposta por Schultess *et al.* (1995).

A retirada da ribose (por uma 7-metil -N⁹-nucleosídeo hidrolase) gera a 7-metilxantina, precursora da teobromina. Até há poucos anos existiam dúvidas sobre a identidade das metiltransferases, havendo quem acreditasse na existência de apenas uma enzima com múltiplas funções. Processos de purificação enzimática levaram ao isolamento da 7-NMT (40 KDa) e outras duas unidades (43 e 49 KDa) que podem ser as outras enzimas responsáveis pelos processos de metilação posteriores: a formação de 3,7-dimetilxantina (teobromina) e 1,3,7-trimetilxantina (cafeína).

Já outros experimentos levaram ao isolamento, em endosperma de café, de uma 1-NMT específica, de 54 ou 60 kDa. É possível que estas enzimas ocorram na forma de dímeros. O acúmulo de teobromina e cafeína não resulta em inibição das metiltransferases, o que, segundo Mazzafera *et al.* (1994), leva a crer que o processo de regulação envolva a síntese das enzimas, relacionada ao processo de transcrição.

1.9.Compartimentalização

A compartimentalização dos precursores e da biossíntese das metilxantinas não foi totalmente elucidada. Observou-se que a adenina fosforibosil transferase se encontra nos cloroplastos. As enzimas para a formação de xantosina monofosfato foram encontradas em plastídios de nódulos de soja. A 3-N- Metiltransferase foi encontrada em cloroplastos de *Camellia sinensis* (Kato *et al.*, 1994). A localização das outras enzimas responsáveis pelas metilações que geram a cafeína não é conhecida.

O acúmulo de cafeína e teobromina ocorre nos vacúolos, em todas as espécies estudadas até o momento. Estas metilxantinas formam complexos com fenilpropanóides. No caso da erva-mate, verifica-se a predominância de ácidos cafeoilquínicos (ACQ) e dicafeoilquínicos nesta associação com cafeína. No caso de *Camellia sinensis*, predomina a epi-galocatequina, que apresenta alta afinidade pela cafeína. Em *Coffea arabica*, o ácido clorogênico parece ter papel principal na formação do complexo com metilxantinas no vacúolo (Martin *et al.*, 1987; Baumann & Röhrig, 1989). O clorogenato de potássio apresenta interações com a cafeína através das ligações de hidrogênio. Adicionalmente as interações do potássio com os átomos de oxigênio do ácido clorogênico, da cafeína e da água simultaneamente, representam também um papel importante. As ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, aliadas ao pH predominante no vacúolo, dificultam a difusão das metilxantinas para o meio externo (Waldhauser & Baumann, 1996).

Verificou-se que a síntese de cafeína e de ACQ apresentam uma forte interação metabólica, havendo uma correlação entre quantidades de um e outro. Em meios de cultura, o fornecimento de cafeína estimula a atividade da fenilalanina amônia liase (PAL), enzima chave no processo de formação dos fenilpropanóides. Em contrapartida, a inibição da PAL, através da adição do ácido 2-aminoindano fosfônico (2-AIP), leva à diminuição da biossíntese de cafeína (Waldhauser & Baumann, 1996).

1.10. Metilxantinas como aleloquímicos

Em *Camellia sinensis*, a cafeína pode inibir um fungo degradador do lenho, associado de forma mutualista a um coleóptero que ataca os ramos desta planta. Plantas atacadas pelas larvas deste besouro apresentam um aumento na síntese de cafeína, tornando-se, assim, menos susceptíveis a novos ataques (Kumar *et al.*, 1995).

Verificou-se que, em sementes de *Paullinia cupana*, a cafeína está localizada no tegumento seminal, e não é liberada no trato digestivo dos pássaros que ingerem a semente e seu arilo, de forma a não ocorrer intoxicação nestes animais e a permitir que estes realizem a função de dispersão das sementes. A cafeína, portanto, deve agir como aleloquímico para proteger a semente após a dispersão (Baumann *et al.*, 1994).

Observa-se também que a cafeína inibe o desenvolvimento de plantas, podendo ter efeito alelopático (Chou & Waller, 1980; Wink *et al.*, 1998).

Efeitos deletérios da cafeína sobre insetos foram relatados por diversos autores (Janzen *et al.*, 1977; Nathanson, 1984; Itoyama & Bicudo, 1992; Morris *et al.*, 1994).

Lagartas de *Manduca sexta* (Lepidoptera) são capazes de detectar a cafeína aplicada na superfície de discos de folhas de tabaco através de seus órgãos sensores, evitando-os (Glendinning, 1996).

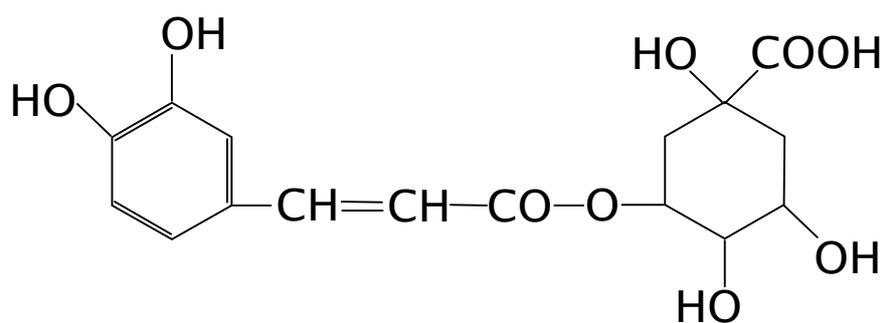
Efeitos negativos da ingestão de cafeína em lepidópteros já foram registrados (Morgan & Warthen Jr., 1990; Morris *et al.*, 1994). Porém, não foi reportado nenhum efeito negativo das metilxantinas sobre lepidópteros que, na natureza, estejam associados a plantas que possuem estas substâncias. Guerreiro-Filho & Mazzafera (2000) não puderam detectar correlações entre teor de cafeína em plantas de *Coffea* spp. e danos por herbivoria por parte de *Perileucoptera coffeella* (Lepidoptera), concluindo que o inseto está adaptado à cafeína, evitando, de alguma forma, seus efeitos nocivos.

1.11. Outras categorias de metabólitos de *Ilex* e sua possível função como aleloquímicos

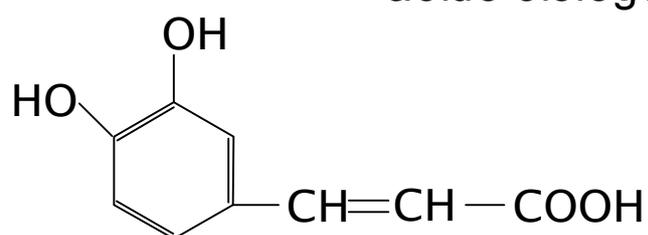
Além das saponinas e metilxantinas, os metabólitos secundários de *Ilex* podem ser agrupados em pelo menos mais duas categorias:

1. flavonóides;

2. ácidos fenólicos: ácido caféico, ácido clorogênico (Figura 1.7), ácido dicafeoilquínico e derivados destes.



ácido clorogênico



ácido caféico

Figura 1.7: Exemplos de ácidos fenólicos presentes em *I. paraguariensis* A. St. Hil.

Substâncias pertencentes à classe dos flavonóides e ácidos fenólicos são citadas como anti-herbívoros em diversos trabalhos, revisados por Morgan & Warthen Jr (1990) e Warthen Jr (1990) (Tabela 1.1).

Tabela 1.1. Substâncias do metabolismo secundário vegetal e seu efeito anti-herbivoria; exemplos de substâncias que também são encontradas em *Ilex* L., testadas a partir de outras plantas segundo Morgan & Warthen Jr. (1990), Warthen Jr. (1990) e Argandoña & Faini (1993), com os artrópodos respectivos utilizados como teste.

Substância	planta de origem	artrópodo estudado	Concentração deterrente
ácido ursólico	-	<i>Locusta migratoria migratorioides</i>	0,1 %
ácido oleanólico	-	<i>Heliotis zea</i>	0,23 %
cafeína	várias	<i>Danaus plexippus</i> <i>Manduca sexta</i>	- -
canferol	<i>Robinia pseudoacacia</i>	<i>Scolytus multistriatus</i>	2×10^{-3} M
quercetina	<i>Quercus macrocarpa</i>	<i>Bombyx mori</i> <i>Scolytus multistriatus</i>	5×10^{-4} M 2×10^{-3} M
rutina	várias	<i>Anthonomus grandis grandis</i> <i>Bombyx mori</i> <i>Locusta migratoria migratorioides</i>	0,03 mg/ml 5×10^{-4} M 3 %
ácido caféico	<i>Sorghum bicolor</i>	<i>Locusta migratoria</i>	0,07 %
ácido clorogênico	<i>Salix chaenomeloides</i> <i>S. integra</i> <i>S. koriyanagi</i>	<i>Lochmaeae caprae</i> <i>cribata</i> <i>Agelasa caerulea</i> <i>Atrachya menetriesi</i> <i>Fleutriaxia armata</i> <i>Galelucella vittaticollis</i> <i>Gallerucida bifasciata</i> <i>Gastrolina depressa</i> <i>Gastrophysa atrocynea</i> <i>Oulema oryzae</i> <i>Pyrrhalta humeralis</i>	-

1.12. Compostos fenólicos e sua função aleloquímica

Dentre os compostos fenólicos, os taninos são substâncias que podem atuar como inibidores da digestão protéica, defendendo as plantas contra insetos (Feeny, 1970, 1976; Rhoades & Cates, 1976; Coley *et al.*, 1985). Em outros casos, foi demonstrado que os taninos podem ter função de regulação da diferenciação celular, através de interação com enzimas, que ocasiona a inibição destas (Ransey & Berlin, 1976).

Paula & Brooks (1953) afirmam que em *Ilex* foram encontrados compostos fenólicos derivados dos ácidos clorogênico e isoclorogênico, demonstrando que os polímeros fenólicos de *Ilex* são pseudotaninos semelhantes aos encontrados no café (Scarpati & Guiso, 1964). Anteriormente, Mendive *et al.* (1943) demonstraram que *I. paraguariensis* não possui taninos verdadeiros, mas tão-somente moléculas em cuja composição participa o ácido caféico. Estes autores se basearam na ausência de propriedades aglutinantes de proteínas nos extratos do mate.

Mais recentemente, Clifford & Ramirez-Martinez (1990) e Filip *et al.* (2001) observaram altas concentrações de ácidos dicafeoilquínicos (> 60 mg/g) e ácido clorogênico (> 40 mg/g).

Apesar de não possuir propriedades aglutinantes típicas dos taninos, o ácido clorogênico é citado como inibidor de herbivoria de várias espécies de insetos (Tabela 1.1). A aeração e a adição de polifenol oxidases nas dietas destinadas aos insetos, aumentam a oxidação do ácido clorogênico e a ligação de ortoquinonas a proteínas e aminoácidos, diminuindo a qualidade nutricional (Johnson & Felton, 2001).

Por outro lado, estudos recentes utilizando linhagens de fumo (*Nicotiana tabacum*), com expressão elevada de fenilalanina amônia liase, e com teores de ácido clorogênico e flavonóides aumentados, constataram a não geração de efeitos negativos sobre o desenvolvimento de insetos lepidópteros herbívoros. Os efeitos oxidativos verificados em dietas artificiais quando da adição de ácidos fenólicos não são

verificados quando os insetos se alimentam de folhas com teores mais elevados de fenólicos (de baixo peso molecular). Ao contrário, verificou-se um aumento na capacidade anti-oxidante na hemolinfa de larvas de *Heliothis zea* (Lepidoptera) alimentadas com essas linhagens de fumo (Johnson & Felton, 2001).

1.13. Metabólitos secundários, variabilidade genética e evolução

No que se refere à produção de metabólitos secundários, foram observadas variações fenotípicas em diversas plantas cultivadas e silvestres. Os estudos nesse sentido têm sido concentrados nas primeiras, pois a resistência a predadores conferida pela produção de metabólitos pela planta é de grande vantagem econômica e ecológica.

A tabela 1.2 apresenta uma lista de compostos para os quais se observou variação quantitativa geneticamente determinada através de estudos de herdabilidade.

Nurmi *et al.* (1996) verificaram que há variação quantitativa e qualitativa na produção de compostos do metabolismo especial em uma população de *Betula pubescens*, subespécie *tortuosa*, existente na Finlândia. A quantidade de flavonóides, compostos fenólicos totais de baixo peso molecular e os diversos compostos fenólicos individualmente apresentaram sua concentração diminuída ao longo da estação de crescimento (julho a agosto). Houveram variações significativas entre as 20 árvores incluídas na amostra desses autores, no que se refere à concentração de todos os compostos estudados, com exceção de ácido gálico. O coeficiente de variação entre plantas para os teores de ácido clorogênico, componente mais abundante, foi de 60%, em uma amplitude de 4,6 a 31,1 mg/g de peso seco. Certos flavonóides só ocorreram em menos de um terço das árvores, o que demonstra variação qualitativa.

Tabela 1.2. Gêneros e respectivos compostos que apresentam variabilidade quantitativa determinada geneticamente (adaptada de Berenbaum & Zangerl, 1992)

GÊNERO	COMPOSTOS
<i>Pinus</i>	alfa-pineno beta-pineno 3-careno mirceno
<i>Prunus</i>	fenólicos
<i>Phalaris</i>	gramina hordenina
<i>Lens</i>	taninos
<i>Vicia</i>	vicina convicina
<i>Phaseolus</i>	taninos
<i>Pastinaca</i>	furanocumarinas
<i>Senecio</i>	alcalóides pirrolizidínicos

No que se refere a saponinas, observou-se variabilidade quantitativa e qualitativa em alfafa (*Medicago sativa*), como resultado de procedimentos de seleção (Hoagland *et al.*, 1996).

Além da variação encontrada em termos de capacidade de produção metabólica, variações nas características estruturais podem influenciar a concentração de compostos do metabolismo especial nos tecidos vegetais. Por exemplo, o tamanho e a quantidade das estruturas de armazenamento variam geneticamente, como se observou em ductos de óleo de *Pastinaca* e em tricomas glandulares de *Lycopersicum*⁴ (Berenbaum & Zangerl, 1992).

⁴ gênero de plantas que inclui o tomateiro.

1.14. Variação genética no teor de metabólitos e resistência a insetos

Em muitos casos, especialmente em plantas cultivadas, a resistência a insetos também está relacionada a fatores genéticos, o que foi observado em experimentos com trevos (*Trifolium* spp.), sorgo (*Sorghum* sp.), alface (*Lactuca sativa*), algodão (*Gossypium* sp.), alfafa (*Medicago sativa*), maçã (*Malus sylvestris*), arroz (*Oriza sativa*), centeio (*Secale cereale*), trigo (*Triticum aestivum*), beterraba (*Beta vulgaris*), milho (*Zea mays*), tomate (*Lycopersicum esculentum*), batata-inglesa (*Solanum tuberosum*), entre outras (Lara, 1991; Berenbaum & Zangerl, 1992).

A resistência de plantas a insetos e outros herbívoros está relacionada a diversos fatores. Entre os fatores determinados geneticamente, temos diversos caracteres morfológicos, fenológicos e mutualísticos, além de variações qualitativas e quantitativas em compostos do metabolismo especial. Em alguns casos, se demonstrou relação entre resistência a insetos e variações quantitativas e qualitativas em compostos químicos das plantas. Por exemplo, a quantidade de ácidos hidroxicinâmicos no milho é determinada geneticamente, e está correlacionada positivamente com a resistência à *Ostrinia mutabilis*. Em *Cucumis sativa*, a resistência ao ácaro *Tetranychus urticae* está relacionada à concentração de cucurbitacinas, que, por sua vez, é influenciada por fatores genéticos (Berenbaum & Zangerl, 1992).

Em que pesem as evidências da importância da variação quantitativa e qualitativa de compostos secundários, geneticamente determinadas, no sentido de influenciar a capacidade de resistência das plantas em relação aos predadores, a evolução destes caracteres nas plantas ainda suscita questionamentos. Por exemplo, a evolução promove coexistência ou desestabiliza a interação e leva à extinção? As espécies antagonistas evoluem indefinidamente em uma luta evolutiva ou chegam a um equilíbrio evolutivo? Pode a evolução ser suficientemente rápida para preservar uma espécie da extinção por competição ou predação? (Futuyma, 1996, p. 507).

Em 1964, Ehrlich & Raven propuseram um princípio que buscava fundamentar a coevolução entre plantas e herbívoros: “a evolução das substâncias do metabolismo

secundário das plantas e as respectivas respostas passo-a-passo, por parte dos insetos fitófagos, tem sido claramente o fator dominante na evolução das borboletas e outros grupos fitófagos” (Berenbaum & Zangerl, 1992). Esta afirmação foi ampla e prontamente aceita, sendo generalizada para a análise das relações predador-presa em geral, muito embora faltassem demonstrações. A coevolução definida por Erlich & Raven postula, portanto, que a cada mutação ou mudança nas frequências gênicas ocorridas nas plantas, capaz de determinar mudanças qualitativas e quantitativas em termos de compostos secundários, seguem-se mudanças nas populações de insetos, tornando-os mais aptos a superar as defesas vegetais.

Nem sempre é fácil demonstrar a vantagem adaptativa de características químicas das plantas na defesa contra insetos. Isto por que quase sempre há insetos capazes de, em alguma medida, contra-adaptar-se a estas defesas.

A falta de evidências claras tem levado diversos autores a criticar a aplicação da teoria da coevolução nas interações relacionadas à herbivoria (Berenbaum & Zangerl, 1992). Gottlieb *et al.* (1996) argumentam que os compostos apresentados pelas plantas não estão relacionados à biota associada: outros fatores podem explicar a presença de determinadas rotas biossintéticas nas linhagens vegetais. Algumas conclusões gerais sobre a evolução do metabolismo especial, segundo Gottlieb *et al.* (1996):

1. A ocorrência de metabólitos secundários está restrita fortemente pela filogenia das espécies e *taxa* de ordem mais elevada; o surgimento (mutações) de categorias (rotas biossintéticas) de metabólitos secundários em determinados *taxa* é um evento raro, fortemente relacionado com o surgimento e irradiação evolutiva de *taxa* de níveis maiores: classes, ordens, famílias;

2. Os fatores seletivos mais importantes na evolução dos compostos secundários são físico-químicos, tais como a concentração de oxigênio atmosférico ao longo dos períodos geológicos;

3. Existem limites metabólicos que geram competição entre rotas biossintéticas; a bifurcação mais importante é a que divide a via do ácido acético da via do ácido chiquímico.

Como exemplo de competição entre rotas biossintéticas, Gottlieb *et al.* (1996) citam o chamado 'freio lignínico'. Plantas que sintetizam lignina em larga escala, como, por exemplo, as árvores, têm uma diversidade menor de metabólitos não fenólicos, ou seja, não relacionados à rota biossintética da lignina. Por outro lado, plantas herbáceas, ao dispensar a síntese de lignina em larga escala, são capazes de sintetizar uma variedade maior de compostos, especialmente os relacionados a outras rotas biossintéticas, tais como a terpênica e a dos poliacetilenos. Sob o ponto de vista evolutivo, nas angiospermas o hábito arbóreo é em geral considerado primitivo, e o hábito herbáceo derivado.

Em escalas de tempo mais amplas, verifica-se que há falta de correspondência entre a filogenia dos insetos e das plantas, o que pode ser ilustrado pelo caso das umbelíferas: espécies que apresentam furanocumarinas angulares são atacadas por um determinado grupo de insetos especializados, e as que apresentam furanocumarinas lineares por outro. Estes grupos de insetos diferentes não estão filogeneticamente associados, reforçando a hipótese que afirma ser o surgimento de insetos especializados em determinados compostos um evento posterior ao surgimento das categorias de substâncias químicas citadas (Futuyma, 1996).

Observa-se que, em plantas cultivadas e silvestres, há uma correlação negativa entre capacidade de crescimento e produção primária *versus* resistência a insetos. Dentro de uma determinada espécie, as plantas que apresentam maior produção de metabólitos secundários, ou metabólitos mais tóxicos, em contrapartida, são as que crescem menos (Berenbaum & Zangerl, 1992). Em *Diplacus aurantiacus* (Scrophulariaceae), um subarbusto do chaparral da Califórnia, verificou-se uma correlação negativa entre taxa de crescimento e conteúdo de compostos fenólicos (Han & Lincoln, 1994).

Nem sempre esta correlação pode ser observada para todos os caracteres relacionados à deterrência⁵. Em *Psychotria horizontalis*, uma planta umbrófila silvestre do Panamá, verificou-se correlação negativa entre taxas de crescimento e teor total de taninos. No que se refere à dureza da folha, entretanto, não foi verificada tal correlação. Tanto teor total de taninos como dureza da folha mostraram correlação negativa com as taxas de herbivoria (Sagers & Coley, 1995).

As menores taxas de crescimento em plantas com maior quantidade de defesas químicas ou morfológicas (mecânicas) podem ser explicadas pelos custos diretos de produção e manutenção da concentração de princípios ativos, ou custos indiretos devido à autotoxicidade dos mesmos (Berenbaum & Zangerl, 1979; Chung *et al.*, 2000). Saponinas, por exemplo, poderiam destruir as membranas plasmáticas da própria planta. Este tipo de fenômeno requer, geralmente, compartimentalização adequada ou atenuação química da reatividade das moléculas.

Por outro lado, haveria uma limitação para o aumento na concentração de defesas químicas, considerando que estas implicam em custos ou desvantagens (por autotoxicidade). Desta forma, a vantagem adaptativa das defesas químicas dependeria do contexto ecológico, como por exemplo a densidade populacional ou a intensidade da herbivoria dos insetos.

⁵ processo de evitação da herbivoria através de mecanismos de defesa da planta.

O conceito de relação custo *versus* benefício entre defesas e crescimento/reprodução poderia favorecer um maior investimento metabólico em defesas, em contextos onde a pressão seletiva representada pela herbivoria é alta e, ao mesmo tempo, as condições ambientais não favorecem taxas elevadas de fotossíntese e crescimento. Este seria o caso de muitas plantas que crescem no sub-bosque e apresentam densidades populacionais altas, considerando que as altas densidades favorecem os herbívoros. Por outro lado, esta relação custo *versus* benefício não é totalmente aceita nem está amplamente demonstrada (Baldwin & Ohnmeiss, 1994; Bergelson & Purrington, 1996).

Conforme já referido, ocorre variabilidade genética em *Lycopersicum* spp. (Solanaceae) na quantidade de tricomas glandulares produzidos pelas plantas (Berenbaum & Zangerl, 1992). A relação entre maior capacidade de produção primária, tricomas glandulares e fecundidade, entretanto, não está esclarecida e, portanto, não se pode estabelecer *a priori* quais genótipos serão favorecidos e qual o tipo de seleção presente, pois o que importa são as frequências gênicas resultantes de fato. Por exemplo, uma planta que cresce em uma velocidade maior, mesmo sendo mais atacada por insetos (menor resistência), ainda assim poderá se reproduzir em taxas maiores, e a resistência aos insetos não aumentará na população. Será favorecida, então, a determinação genética que confere maior velocidade de crescimento e produção primária. Segundo Coley (1987), existem espécies de plantas que crescem tão rápido que a taxa de consumo dos insetos não é suficiente para exterminá-las e impedi-las de reproduzir-se em taxas efetivas; isto é comum em espécies florestais pioneiras.

Embora o custo de produção de metabólitos secundários possa limitar a capacidade de crescimento, em alguns casos verifica-se que a taxa de crescimento, determinada pela interação entre a capacidade genética e os fatores ambientais, terá, por sua vez, uma influência positiva sobre a produção dos metabólitos. Ou seja, em condições ótimas, onde a planta tiver maior taxa de crescimento, maior quantidade de metabólitos poderá ser produzida (Gianoli & Niemeyer, 1997), desde que haja capacidade genética para isso, em um processo de retroalimentação positiva.

1.15. Defesas químicas das plantas e a interação com insetos

Existem diversas proposições teóricas que buscam prever a resposta das plantas em relação aos fatores limitantes e seletivos do ambiente, em particular no que se refere às variações quantitativas e qualitativas nas suas defesas químicas contra herbívoros (Hartley & Jones, 1997).

1.15.1.A teoria do balanço entre carbono / nitrogênio

A teoria do balanço entre carbono / nitrogênio foi proposta por Bryant *et al.* (1983):

A resposta evolucionária das plantas à herbivoria é delimitada pela disponibilidade de recursos do ambiente. Plantas arbóreas (lenhosas) adaptadas a ambientes com baixa disponibilidade de recursos possuem, intrinsecamente, crescimento lento, o que limita sua capacidade de crescer acima da taxa de consumo dos herbívoros⁶ (...) Plantas adaptadas a ambientes com baixos recursos respondem à herbivoria desenvolvendo fortes defesas constitutivas com relativamente baixa plasticidade. Pelo fato de serem os nutrientes frequentemente mais limitantes do que luz, nas florestas boreais, as árvores boreais de crescimento lento utilizam defesas baseadas em carbono em lugar de defesas baseadas em nitrogênio. Sugerimos que a resposta de todas as plantas em relação à baixa disponibilidade de recursos é qualitativamente similar.

Exemplos de defesas baseadas em carbono seriam terpenóides (incluindo saponinas), taninos e fenólicos não-nitrogenados. Exemplos de defesas baseadas em nitrogênio seriam metilxantinas, alcalóides e compostos cianogênicos.

Por outro lado, de acordo com a teoria, uma planta de sombra como a erva-mate deveria investir mais em defesas nitrogenadas para sobreviver em ambientes sombreados, como o interior da floresta, onde a luz é um recurso limitado. Isto porque, nas condições de sub-bosque, o nitrogênio é mais abundante que em áreas mais

⁶ Mamíferos pastadores, ou *browsing mammals*, no original

iluminadas (abertas ou de clareiras), especialmente em áreas tropicais, onde o processo de degradação da matéria orgânica, principal reservatório de nitrogênio, é mais rápido.

A teoria se propõe a explicar diferenças entre espécies, e não se sabe até que ponto é possível aplicá-la intra-especificamente (Hartley & Jones, 1997). Entretanto, considerando a grande variabilidade observada entre populações vegetais, e particularmente no caso de erva-mate (Winge *et al.*, 1995; Resende *et al.*, 1997; Athayde, 2000; Gauer & Cavalli-Molina, 2000), é possível que, pelo menos em parte, essa teoria seja aplicável para analisar as variações intra-específicas.

A proposta de Bryant *et al.* (1883) parece ser excessivamente genérica, pressupondo que todas as plantas são capazes de responder da forma descrita. Muitas plantas não apresentam defesas químicas que contêm nitrogênio. Além disso, modificações qualitativas dependem de processos evolutivos mais longos, e as mutações não são ‘direcionadas’ pelo ambiente.

1.15.2. A teoria da disponibilidade de recursos e a teoria da defesa ótima

A teoria da disponibilidade de recursos pressupõe que “a disponibilidade de recursos ⁷ (...) é a maior determinante dos tipos e teores das defesas químicas vegetais. Quando os recursos são limitados, plantas com crescimento inerentemente lento são favorecidas em relação àquelas de crescimento rápido; por outro lado, taxas de crescimento lento favorecem grandes investimentos em defesas contra os herbívoros. Longevidade das folhas, também determinada pela disponibilidade de recursos, afeta a vantagem relativa de defesas (químicas) com diferentes taxas de reposição (*turnover*). Limitação relativa de diferentes recursos, da mesma forma, limita os tipos de defesas” (Coley *et al.*, 1985).

⁷ Entenda-se recursos como água, luz, nutrientes

Já a teoria da defesa ótima é uma extensão da teoria acima aplicada a situações intra-específicas, ou seja, prevê a resposta de uma espécie em diferentes condições ecológicas (plasticidade fenotípica). Esta teoria propõe que a síntese de compostos químicos de defesa têm prioridade sobre o crescimento e a reprodução. Em condições de limitação de recursos, estes seriam prioritariamente utilizados em defesas. Se as defesas químicas apresentam custo metabólico, tais defesas podem ser mais econômicas (para a planta) se utilizadas apenas quando necessário (Ohnmeiss & Baldwin, 1994).

1.16. Deterrência *versus* toxicidade

Embora a lista de produtos deterrentes siga crescendo (Morgan & Warthen Jr., 1990), confirma-se, em diversos casos, a inexistência de correlação entre deterrência e toxicidade, para os mesmos organismos herbívoros (Bernays & Graham, 1988, Bernays 1990; Aerts & Mordue, 1997). Certos componentes químicos das plantas, embora sejam capazes (pelo menos em condições de laboratório) de afastar os insetos nas concentrações encontradas naturalmente, freqüentemente não apresentam efeitos deletérios (Bernays & Cornelius, 1992), em alguns casos gerando até performance superior dos insetos (Bernays, 1990). A tabela 1.3 mostra compostos cuja atividade biológica foi avaliada, alguns apresentando capacidade de deterrência sem efeito tóxico aparente. Estes mesmos compostos ocorrem em *I. paraguariensis* e outras espécies de *Ilex*.(ver itens anteriores: 1.2 até 1.11)

A explicação evolutiva para o surgimento da deterrência pode ter razões diferentes que efeitos tóxicos pós-ingestão (Bernays & Graham, 1988; Bernays, 1990). Certos insetos podem evitar determinados compostos, utilizando-os como ‘sinalizadores’, para evitar plantas que não fazem parte da dieta da espécie, e para as quais, em tese, estariam menos adaptados.

Tabela 1.3: Estudos sobre a relação entre deterrência e toxicidade para metabólitos vegetais.

Substância	Concentração	Efeito	Inseto	Referência
ácido caféico	0,5 %	deterrente não tóxico	<i>Locusta migratoria</i> (Orthoptera)	(Bernays, 1990)
ácido clorogênico	0,1 %	deterrente não tóxico	<i>Hypera brunneipennis</i>	(Bernays & Cornelius, 1992)
ácido ursólico	0,1 %	não deterrente não tóxico	(Coleoptera)	(Bernays & Cornelius, 1992)

Em *Azadirachta indica* (Meliaceae), Aerts & Mordue (1997) observaram uma toxicidade crescente ao longo da rota biossintética, na qual o composto azadirachtina, de maior grau de oxidação e o único glicosídeo da série estudada, apresenta-se como produto final e também o mais tóxico. Em algumas espécies de Brassicaceae, os glicosídeos também apresentam maior toxicidade que as agliconas (Usher & Feeny, 1983), embora estas possam apresentar atividade deterrente.

Desta forma alguns precursores de uma determinada substância tóxica podem apresentar efeito repelente, embora não sejam tóxicos, pelo menos nas concentrações encontradas nos tecidos vegetais.

1.17. Defesas vegetais e o controle populacional dos insetos: as relações tri-tróficas

Se há poucas evidências a favor da efetividade das defesas vegetais contra os animais (especialmente os insetos) herbívoros, por que as plantas não são devoradas de forma acentuada nos ecossistemas naturais?

Muitos ecologistas têm argumentado que as populações de herbívoros são primariamente controladas pelos seus inimigos naturais, mais do que pelas plantas ou através da competição com outros herbívoros. A Figura 1.8 esquematiza o fluxo de energia e matéria através destas interações. Como estão envolvidos três níveis da cadeia alimentar, estas interações podem ser definidas como tri-tróficas (Araújo, 1997), ou seja, envolvendo três níveis tróficos. O primeiro nível, representado pelas plantas, é formado pelos *produtores*. O segundo nível, dos herbívoros, é formado pelos *consumidores primários*. Os animais que se alimentam dos herbívoros (predadores e parasitóides⁸) são denominados *consumidores secundários*.

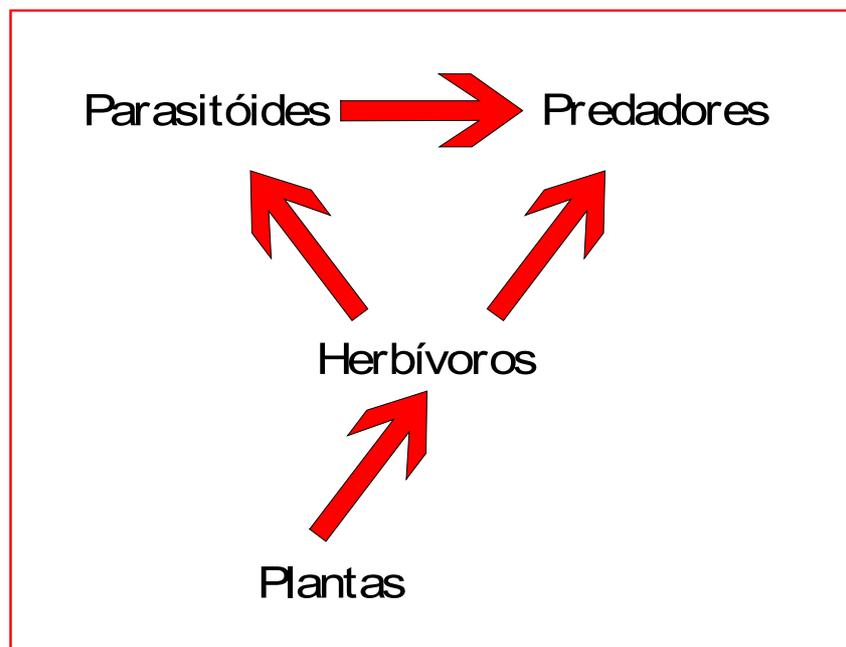


Figura 1.8. Fluxo de energia e matéria (setas) nas interações entre plantas, herbívoros, parasitóides e predadores (interações tri-tróficas).

Uma regulação efetiva das populações de herbívoros pelos inimigos naturais pode ser possível, entretanto, somente quando as plantas apresentam baixa qualidade nutricional, o suficiente para que as taxas de natalidade dos herbívoros seja baixa (Hartley & Jones, 1997).

⁸ Insetos que parasitam outros insetos durante a fase larval.

Existem evidências do papel indireto das plantas no controle sobre os herbívoros via predadores. Verificou-se que a mortalidade gerada em *Mamestra brassicae* (Lepidoptera) por *Bacillus thuringiensis* subespécie *kurstaki*, uma bactéria entomopatogênica, é aumentada pela adição de cafeína. A presença da cafeína a 0,1 % (m/v) aumentou de três a cinco vezes os efeitos deletérios do patógeno nas larvas, quando aplicada a dietas artificiais, e até 9,2 vezes em avaliação a campo, quando aplicada através de aspersão em plantios de *Brassica napus* variedade *oleifera* (Morris *et al.*, 1994).

Evidências mais diretas foram fornecidas por Letorneau & Dyer (1998). Reduzindo seletivamente as populações de predadores em um ecossistema florestal, estes autores verificaram efeitos significativos sobre a herbivoria das plantas.

1.18. Metabolismo especial, ontogênese e fenologia

As substâncias componentes do metabolismo especial podem variar quantitativamente conforme aspectos ontogenéticos e fenológicos. Nurmi *et al.* (1996) observaram um declínio nas quantidades de flavonóides e fenólicos de baixo peso molecular (p. ex., ácido clorogênico), e na quantidade de cada um dos compostos fenólicos individualmente, ao longo da estação de crescimento (julho a agosto) em *Betula pubescens* subespécie *tortuosa*, na Finlândia. Já Goralka *et al.* (1996) observaram um aumento de terpenos voláteis nas folhas de *Umbellularia californica* (Lauraceae) ao longo do seu envelhecimento.

Potter & Kimmerer (1989) verificaram que a concentração de saponinas em folhas de *Ilex opaca* diminui conforme a idade da folha avança, observando-se, portanto, maiores concentrações (por peso) nas folhas em suas fases iniciais. Estes autores, entretanto, utilizaram como referência cronológica a época do ano e não a idade de cada folha. Em espécies subtropicais e tropicais, entretanto, seria mais

conveniente realizar um estudo mais detalhado por folha, ou por conjunto de folhas da mesma idade.

Observa-se, em solanáceas, que a concentração de chalcona-sintase e flavonóides aumenta nas estruturas florais, em especial nas anteras, ao longo do desenvolvimento e maturação da flor. Nas anteras, a acumulação dessas substâncias inicia com a meiose e prossegue até a maturação do grão-de-pólen. Grãos-de-pólen de milho e de solanáceas deficientes em flavonóides são incapazes de formar o tubo polínico (Rhoades, 1994). O mecanismo de interferência destes flavonóides na formação do tubo polínico não é conhecido, e em outras plantas a sua presença não é necessária para a formação dessa estrutura, conforme indicam estudos em *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae).

1.19. Insetos associados à erva-mate

São conhecidas 147 espécies da entomofauna associadas ao cultivo da erva-mate, das quais 99 são consideradas fitófagas⁹ (prejudiciais), 39 predadoras e 9 parasitóides. Como principais fitófagos, em termos de prejuízo econômico, destacam-se *Gyropsylla spegazziniana* L. (Homoptera: Psyllidae), *Perigonia lusca* F. (Lepidoptera: Sphingidae) e *Hedypathes bettulinus* K. (Coleoptera: Cerambycidae, Laminae) (De Coll & Saini, 1992; Flores, 1996a, 1996b; Fernández-Díaz, 1996, 1997), respectivamente conhecidos como ampola, marandová da erva-mate e broca da erva-mate. Os dois primeiros se alimentam das folhas, enquanto que a broca ataca a madeira. *G. spegazziniana* oviposita em brotos e folhas novas. Posteriormente, as larvas induzem a formação de galhas, ou seja, um desenvolvimento anormal das folhas que permite o abrigo destas larvas em relação aos fatores ambientais. As folhas enroladas lembram uma ‘ampola’, por isso a denominação popular. *H. bettulinus* é um

⁹ Animais que se alimentam de plantas.

escaravelho que oviposita no tronco da erva-mate. Suas larvas perfuram o tronco, gerando apodrecimento e, finalmente, a queda dos ramos e troncos.

1.20. Lepidópteros associados à erva-mate

Existem mais de 40 espécies de lepidópteros associados à erva-mate na Argentina, mas somente algumas parecem ser importantes pelas perdas causadas, sendo que a principal é a *Perigonia lusca* F. (Sphingidae).

No Brasil, verifica-se que *Hylesia sorana* e *H. fulviventris* (Hemileucidae) e outras espécies deste gênero, bem como *Thelosia camina* (Euptherotidae), podem apresentar importância econômica, dependendo da região. Por outro lado, foi registrada, para a Argentina, a espécie *Hylesia nigricans* (Fernández-Díaz, 1997).

Perigonia lusca F. (Sphingidae)

Na Argentina é considerada uma das três espécies principais de insetos no que se refere ao prejuízo causado nos cultivos de erva-mate. São conhecidas pela velocidade de consumo de folhas e estratégia gregária (Fernández-Díaz, 1997).

Embora no sul da América do Sul esta espécie tenha sido observada associada à *I. paraguariensis*, Bernays & Janzen (1988) observaram *Perigonia lusca* alimentando-se de *Calycophyllum candidissimum* (Rubiaceae) no Parque Nacional de Santa Rosa, Costa Rica.

Hylesia spp. (Saturniidae)

Trata-se de um gênero de ampla distribuição pelas Américas e outras partes do mundo. Algumas espécies são conhecidas por sua capacidade urticante quando do contato com seres humanos com as larvas ou mesmo com os adultos.

As diferentes espécies de *Hylesia* estudadas se alimentam de uma flora diversificada, indicando polifagia. Além de erva-mate, *Hylesia nanus* Walker_1855 já foi observada se alimentando de *Johanesia princeps* (Euphorbiaceae), *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae), *Terminalia* sp. (Combretaceae), *Psidium guajava* (Myrtaceae), *Acacia mearnsii* (Leguminosae), *Calycophyllum* sp. (Rubiaceae), entre outras (Santos *et al.*, 1988). *Hylesia lineata* também é capaz de consumir plantas de diferentes famílias: *Casearia corymbosa* (Flacourtiaceae), *Thouinia paucidentata* (Sapindaceae), *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae), com pouca ou nenhuma diferença em termos de crescimento e reprodução (Pescador, 1993). O desenvolvimento e a reprodução de *H. nanus* foi estudada em laboratório (Santos *et al.*, 1988).

Em Ijuí, foi encontrada *Hylesia scortina* Draudt 1929 associada à erva-mate (observação do autor), conforme identificação fornecida pelo professor Olaf H.H.Mielke, da Universidade Federal do Paraná.

Adelpha mincia Hall 1938 (Nymphalidae)

Adelpha é um gênero neotropical com cerca de 30 a 50 espécies. Os adultos alimentam-se de néctar, excremento, ou frutos. Lagartas de *Adelpha hyas* foram observadas se alimentando de *Ilex paraguariensis* (Brown Jr., 1992), fato também observado em Ijuí por Fábio Luis dos Santos (comunicação pessoal) e pelo autor.

Na serra do Japi, Estado de São Paulo, *Adelpha mincia* ocorre em uma grande variedade de habitats (Brown Jr., 1992). Segundo nossas observações, em Ijuí a espécie foi observada, na fase larval, se alimentando exclusivamente de *Ilex paraguariensis*.

2.

Teores de metilxantinas em *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. variedades *vestita* Loesener e *paraguariensis*

2.1. Introdução

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) é uma espécie que pertence à família das Aquifoliáceas. Existem oito espécies de *Ilex* no Rio Grande do Sul (Coelho & Mariath, 1996) e nove no estado de Santa Catarina (Edwin & Reitz, 1967).

A erva-mate ocorre em estado nativo nas regiões subtropicais e temperadas da América do Sul, entre as latitude 18°S e 30°S, em altitudes que variam de 80 a 1.700 m. No Brasil, a área onde se encontra a erva-mate é estimada em aproximadamente 450.000 km², abrangendo principalmente os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná e, em menor extensão, Mato Grosso do Sul e São Paulo. A erva-mate ocorre também em pequenas áreas nos estados brasileiros de Minas Gerais, Rio de Janeiro e Bahia (Figura 2.1). Fora do Brasil, a planta é encontrada na Argentina, no Paraguai, e em pequenas áreas no Uruguai (Giberti, 1995).

São reconhecidas 3 variedades botânicas de erva-mate. A variedade *sincorensis* Loes. é registrada apenas para a Bahia, em locais acima dos 1.800 m de altitude (Andrews, 1985). A variedade *vestita* Loes. é registrada para os estados do Paraná e São Paulo (Figura 2.1). A variedade *paraguariensis* ocupa a maior parte da distribuição geográfica da espécie (Figura 2.1).

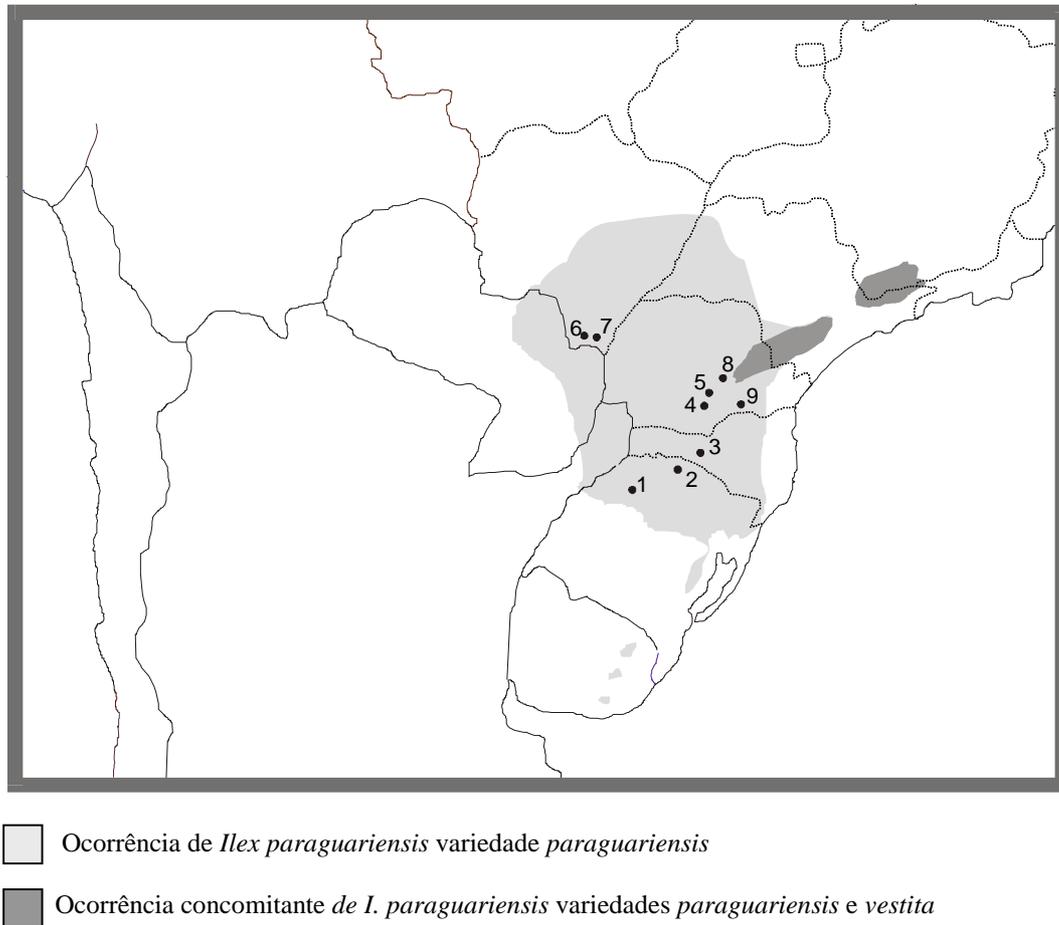


Figura 2.1. distribuição geográfica de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (adaptada de Giberti, 1995). O números indicam locais de coleta do material estudado neste trabalho; 1. Ijuí-RS, 2. Barão do Cotegipe-RS 3. Catanduvas-SC, 4. Pinhão-PR, 5. Guarapuava-PR, 6. Tacuru-MS, 7. Iguatemi-MS, 8. Ivaí-PR, 9. São Mateus do Sul-PR.

A principal característica distintiva da variedade *vestita* são os tricomas simples que revestem folhas em ambas as faces, ramos e inflorescências, o que gera um aspecto aveludado à superfície destes órgãos. Uma representação esquemática de um tricoma em corte transversal é ilustrada na Figura 2.2.

Tricomas são apêndices epidérmicos, altamente variáveis, incluindo os pêlos das raízes, papilas, escamas, estruturas glandulares e não-glandulares. Podem ser unicelulares ou pluricelulares (Esau, 1977). Os tricomas de *Ilex paraguariensis* variedade *vestita* são unicelulares e não-glandulares.

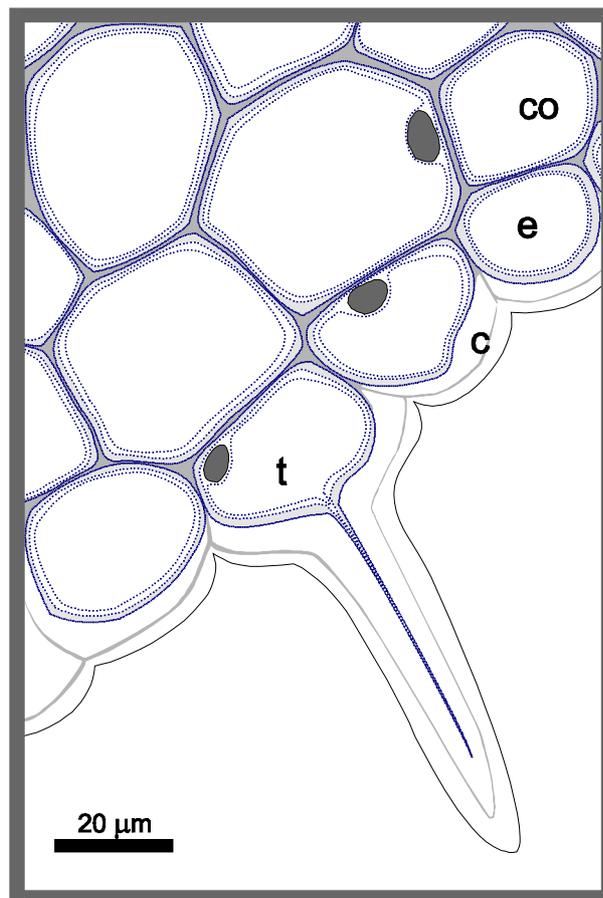


Figura 2.2. Representação esquemática de um tricoma de *Ilex paraguariensis* variedade *vestita* na face abaxial da epiderme, junto à nervura principal, corte transversal; co = colênquima, e= célula epidérmica, c= cutícula, t = tricoma.

Do ponto de vista químico e morfológico, com exceção do trabalho de Reginatto *et al.* (1999), não há outros estudos detalhados sobre as plantas da variedade *vestita*, ou sobre comparações desta com a variedade *paraguariensis*. Por outro lado, o crescimento do interesse econômico na variedade fez suscitar curiosidade sobre suas propriedades. Há relatos, por exemplo, não confirmados, sobre uma possível

resistência superior desta variedade em relação a determinados insetos (Renato Dedecek, Embrapa, comunicação pessoal).

Para ampliar o conhecimento sobre esta variedade, especificamente quanto ao teor de metilxantinas, procedeu-se a um estudo comparativo entre plantas das variedades típica e *vestita*, cultivadas no mesmo local (Ivaí-PR). A distribuição geográfica destas variedades se sobrepõe (Figura 2.1), e Ivaí-PR é um local de ocorrência das duas.

2.2. Material e métodos

2.2.1. Coleta e extração

Foram coletadas plantas cultivadas em Ivaí-PR, não submetidas à exploração comercial há pelo menos dois anos, na fazenda Vila Nova Bitumirm (20° 00' S 50° 50' W). As plantas da variedade *vestita* foram cultivadas a partir de sementes oriundas de Ponta Grossa-PR, 100 km em direção noroeste do local de cultivo. As plantas da variedade *paraguariensis* foram cultivadas a partir de sementes oriundas de Ivaí-PR. As folhas foram coletadas em dois diferentes momentos, outubro de 1998 (4 plantas da variedade *paraguariensis* e 7 plantas da variedade *vestita*) e em fevereiro de 2000 (12 plantas de cada variedade). Foram coletadas somente folhas plenamente expandidas, sem danos causados por herbivoria, pertencentes do 5° ao 8° nós, em ramos a uma altura de 1-2 m do solo.

As folhas foram secas a 50° C por 48 horas em uma estufa com ventilação forçada, trituradas, e os fragmentos selecionados através de uma peneira com aberturas de 1,5 mm de diâmetro, acoplada ao moinho. As folhas de cada planta foram reunidas para a trituração, e o produto foi homogeneizado.

Um grama do material triturado e selecionado foi submetido a uma decocção durante 15 min em 100 ml de uma solução de ácido sulfúrico a 20% (Reginatto *et al.*, 1999). O decocto foi filtrado e neutralizado com uma solução de 50% de hidróxido de

amônio e submetido à partição em um funil de separação com 4 repetições de 50 ml de uma mistura de clorofórmio: isopropanol 3:1 (v/v). A fase orgânica foi concentrada e o resíduo foi retomado no eluente usado em CLAE e analisado quantitativamente, em concentrações dentro da faixa correspondente à curva de calibração.

2.2.2. Métodos cromatográficos

CCD: extratos concentrados foram analisados em cromatofolhas de gel de sílica GF₂₅₄ usando clorofórmio:metanol (9:1, v/v), acetato de etila:metanol:água (100:13,5:1, v/v) ou acetona:tolueno (75:25, v/v, saturação com hidróxido de amônia). A presença de metilxantinas foi detectada através de extinção de fluorescência, usando amostras autênticas de cafeína, teobromina e teofilina para comparação (Sigma®).

CLAE: as amostras foram analisadas em cromatógrafo líquido Waters 600 E com uma válvula de injeção Rheodyne e um reservatório de 20 µl, acoplado a um detector UV-Vis Waters 486, e um integrador Waters 747. A fase estacionária foi uma coluna Nova-Pak[®] RP C-8 (150 x 3.9 mm, 5 µm). A fase móvel foi uma mistura de AcN:MeOH:H₂O (25:55:920, v/v), a um fluxo de 1,1 ml/min, isocrático, a temperatura ambiente (20 – 25° C). A detecção foi realizada a 280 nm e 0,05 AUFS. Soluções analíticas foram injetadas em triplicata, aceitando-se um coeficiente de variação de até 5%. As áreas dos picos foram comparadas com uma curva de calibração, a qual foi calculada a partir de cinco concentrações de amostras autênticas de cafeína e teobromina (Sigma®) com concentrações entre 8 a 70 µg/ml e 7,42 a 65 µg/ml, respectivamente.

2.2.3. Validação (Swartz & Krull, 1997)

A precisão intermediária foi avaliada durante três diferentes dias, com as cinco diferentes concentrações da curva de calibração, injetadas em triplicata. O coeficiente de variação em cada triplicata foi menor que 5%. A linearidade foi avaliada por

regressão linear a partir da curva de calibração. A taxa de recuperação foi estimada a partir de três adições de teores diferentes de amostras autênticas a uma amostra de extrato vegetal. Todos os procedimentos foram feitos em triplicata e os resultados apresentados representam a média da triplicata por amostra. O coeficiente de variação em cada triplicata foi inferior a 5%.

2.3. Resultados

A presença de cafeína e teobromina foi confirmada através de CCD, em todas as amostras das duas variedades. A presença de teofilina não foi confirmada por CCD, em nenhuma delas, em que pese a ocorrência de uma substância desconhecida com o mesmo tempo de retenção ter sido observada em CLAE (Figura 2.3). O pico da teobromina foi confirmado através de injeção de amostra autêntica adicionada a duas diferentes amostras.

Tendo em conta as médias, as plantas da variedade *vestita* apresentaram menores teores de cafeína que as da variedade *paraguariensis* em ambos momentos de coleta (outubro de 1998 e fevereiro de 2000). Entretanto, não foram constatadas diferenças no que se refere ao conteúdo de teobromina (Figura 2.4).

As duas variedades apresentaram teores superiores de cafeína e teobromina em folhas coletadas em fevereiro de 2000, em relação às folhas coletadas em outubro de 1998 (Figura 2.4; tabelas 2.1 e 2.2).

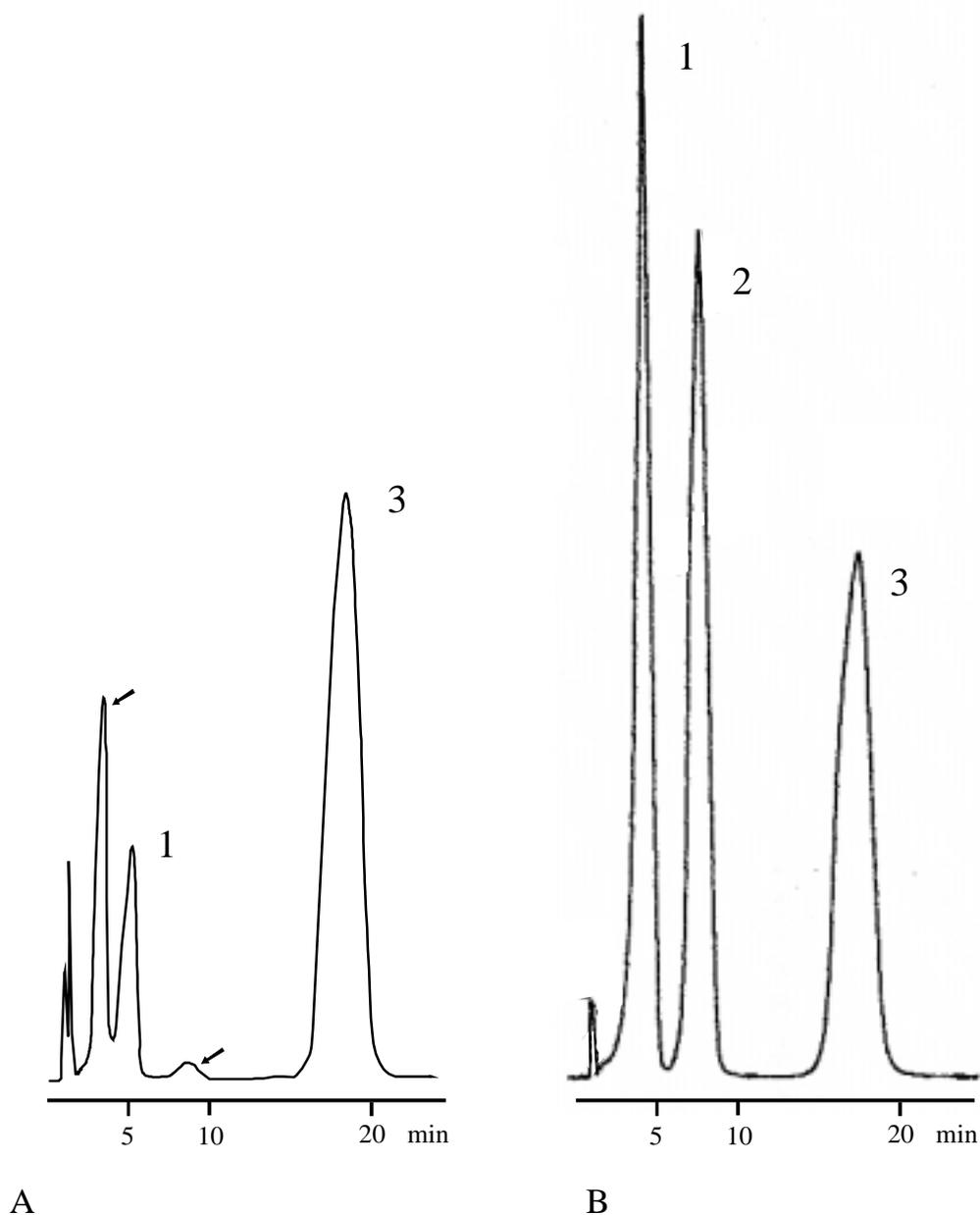


Figura 2.3. Cromatogramas de CLAE para metilxantinas de uma amostra de *Ilex paraguariensis* variedade *vestita* (A) e das amostras autênticas (B); 1 = teobromina, 2 = teofilina, 3 = cafeína; as setas indicam substâncias desconhecidas presentes em algumas amostras. Condições cromatográficas: coluna Nova-Pak[®] RP C-8 (150 x 3.9 mm, 5 μ m), fase móvel AcN:MeOH:água (25:55:920, v/v), a um fluxo de 1,1 ml/min, isocrático, à temperatura ambiente (20 – 25° C), detecção realizada a 280 nm e 0,05 AUFS.

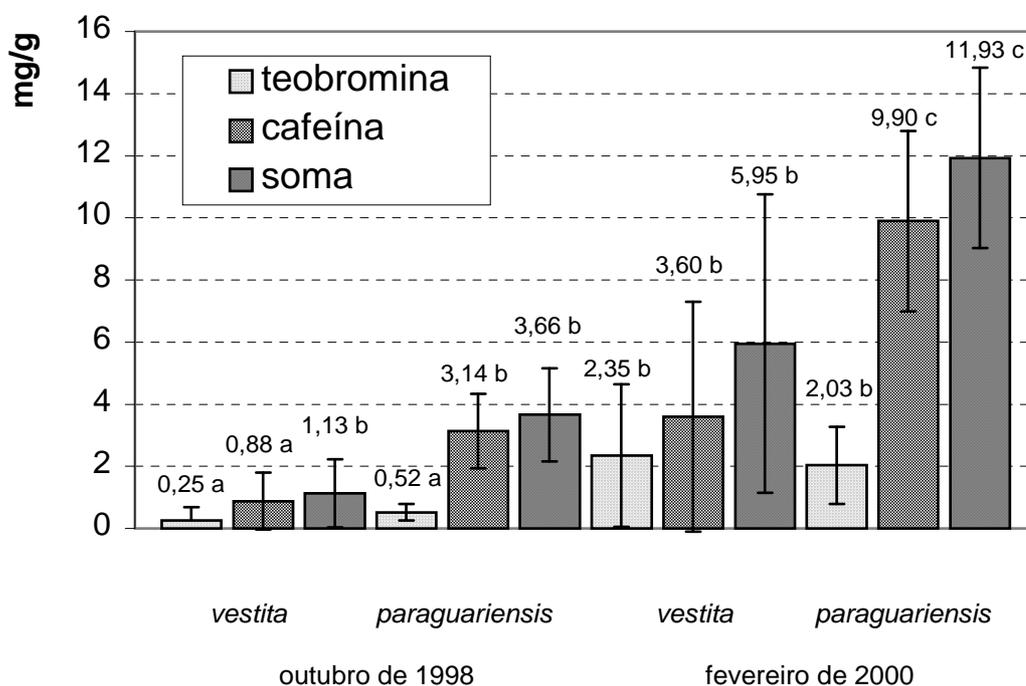


Figura 2.4. Teobromina, cafeína e a soma das duas (mg/g), nas plantas coletadas em outubro de 1998 e fevereiro de 2000, *Ilex paraguariensis* variedade *vestita* Loes. e variedade *paraguariensis*. Os valores médios são mostrados, letras diferentes indicam diferença estatística com base no teste t ($\alpha= 0,05$), comparações feitas somente entre variedades em cada época.

De um total de doze, cinco plantas da variedade *vestita*, coletadas em fevereiro de 2000, apresentaram uma concentração de teobromina superior à de cafeína. Entre as plantas coletadas em 1998, somente uma planta da variedade *vestita* apresentou valores superiores de teobromina. Por outro lado, nenhuma das plantas da variedade *paraguariensis* mostrou uma concentração superior de teobromina em relação à cafeína (tabelas 2.1 e 2.2).

A diferença entre os momentos de coleta foi mais pronunciada na variedade *paraguariensis*. Quanto à soma cafeína + teobromina, o valor de fevereiro de 2000 foi 3,3 vezes superior ao valor apresentado em outubro de 1998, nesta variedade. A mesma razão foi de 5,3 para a variedade *vestita*.

Tabela 2.1. Conteúdo de metilxantinas (mg/g) de plantas de *Ilex paraguariensis*, variedades *vestita* e *paraguariensis*, coletas de outubro de 1998, Ivaí-PR; os valores apresentados são a média das triplicatas.

variedade <i>vestita</i>			variedade <i>paraguariensis</i>				
	teobromina	cafeína	soma		teobromina	cafeína	soma
1	1,23	1,07	2,30	1	0,62	2,98	3,60
2	0,24	0,39	0,63	2	0,29	2,28	2,57
3	0,03	0,21	0,24	3	0,32	2,36	2,68
4	0,11	1,99	2,10	4	0,85	4,94	5,79
5	0,04	0,09	0,13				
6	0,08	0,14	0,22				
7	0,04	2,28	2,32				

Tabela 2.2. Conteúdo de metilxantinas (mg/g) de plantas de *Ilex paraguariensis*, variedades *vestita* e *paraguariensis*, coletas de fevereiro de 2000, Ivaí-PR; os valores apresentados são a média das triplicatas.

variedade <i>vestita</i>			variedade <i>paraguariensis</i>				
	teobromina	cafeína	soma		teobromina	cafeína	soma
1	4,31	0,35	4,66	1	2,65	8,57	11,22
2	8,01	4,00	12,01	2	1,45	10,69	12,14
3	0,85	4,08	4,93	3	1,79	12,81	14,60
4	2,55	4,53	7,08	4	0,42	7,41	7,83
5	0,22	0,11	0,33	5	2,98	9,00	11,98
6	0,41	0,94	1,35	6	1,52	7,03	8,55
7	0,77	0,03	0,80	7	4,67	14,18	18,85
8	4,01	3,40	7,41	8	1,55	7,39	8,94
9	0,65	9,22	9,87	9	3,50	14,83	18,33
10	1,05	2,20	3,25	10	1,38	11,93	13,31
11	3,68	12,24	15,92	11	2,09	8,71	10,80
12	1,69	2,15	3,84	12	0,41	6,22	6,63
CV%	98,14	103,87	79,84		61,01	29,55	32,46

A curva de calibração de teobromina apresentou $r^2=0.99970$ ($y= 102.395x +12.676$). A curva de calibração de cafeína apresentou $r^2=0.99996$ ($y=99.375x-26.029$). O coeficiente de variação, no mesmo dia, foi de 2,81% para a teobromina e 2,69 % para a cafeína. Na avaliação da precisão intermediária, verificou-se um coeficiente de variação de 4,88 % para a teobromina e 4,93 % para a cafeína. A taxa de recuperação foi de $94,61 \pm 1,51$ para a teobromina e $100,96 \pm 0,57\%$ para a cafeína. O tempo de retenção da teobromina foi cerca de 5 min e o da cafeína foi em torno de 18 min.

As curvas de calibração são apresentadas nas Figuras 2.5 e 2.6.

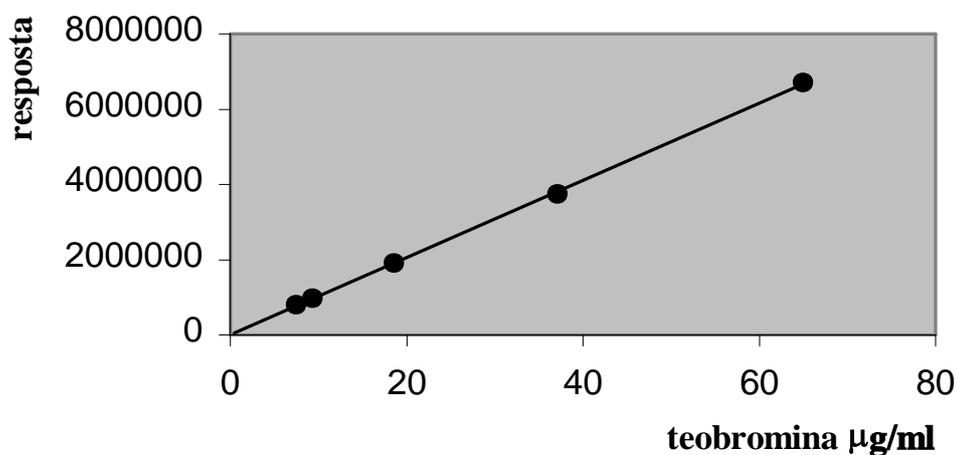


Figura 2.5. Curva de calibração para teobromina, $r^2=0.99970$, $y= 12.676 + 102.395x$.

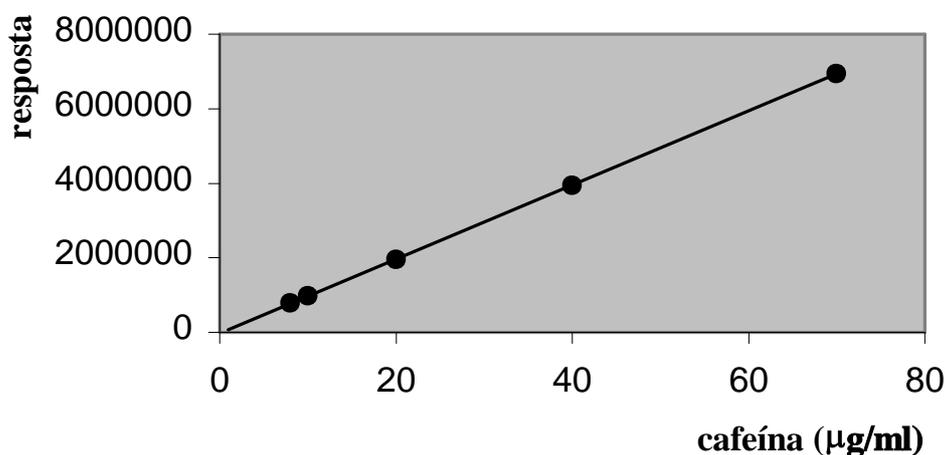


Figura 2.6. Curva de calibração para cafeína, $r^2=0,99996$, $y=-26.029 + 99.375x$.

2.4. Discussão

A presença de teofilina na erva-mate, embora reportada por outros autores (Vázquez & Moyna, 1986; Mazzafera, 1994), não foi confirmada nas amostras aqui analisadas. Chama a atenção a presença de uma substância com tempo de retenção semelhante à teofilina, no método de CLAE utilizado. A presença desta substância, no entanto, não foi confirmada através das análises qualitativas em CCD.

A concentração de cafeína e teobromina foi mais alta em fevereiro de 2000 em relação a outubro de 1998. A menor concentração de metilxantinas na erva-mate, quando coletada no início da primavera, já foi reportada em outros estudos (Athayde, 2000; Athayde *et al.*, 2000), e pode ser explicada pela idade das folhas, assumindo que folhas mais novas apresentam teores mais elevados (Mazzafera, 1994). Resultados experimentais indicam que a biossíntese de cafeína ocorre somente em folhas jovens (Ashihara, 1993).

A brotação principal em *I. paraguariensis* ocorre no fim de setembro e outubro. Em plantas cultivadas a pleno sol, pode ocorrer uma nova brotação entre fevereiro e março. Desta forma, as folhas plenamente expandidas coletadas em outubro apresentavam pelo menos 6 meses e algumas poderiam ter 1 ano (Coelho & Mariath, 1996). Quase todas as folhas com mais de 1 ano, entretanto, caem entre novembro e dezembro. Tendo isso em conta, estima-se que as folhas coletadas em fevereiro apresentavam de 3 a 4 meses de idade.

Os dados obtidos mostram que a época de coleta influencia decisivamente o teor de metilxantinas da erva-mate, o que pode ter implicação direta na qualidade da matéria-prima utilizada na indústria.

As plantas da variedade *vestita* apresentaram menores concentrações de cafeína que as plantas da variedade *paraguariensis*, o que já tinha sido relatado por Reginatto *et al.* (1999). Entretanto, não se pode concluir que a variedade *vestita* é caracterizada por baixos teores de cafeína em relação à variedade *paraguariensis*, em face da amplitude geográfica restrita dos dados disponíveis. É preciso considerar a influência

de diferentes anos, solos, e outros fatores ambientais. Verifica-se que outras populações da variedade *paraguariensis* apresentam médias inferiores de cafeína que a média aqui registrada para a variedade *vestita*, no mesmo momento do ano. Por exemplo, Athayde (2000) reportou uma média de 2,96 mg/g de cafeína para uma população de *I. paraguariensis* variedade *paraguariensis* coletada em fevereiro de 1997. Esta concentração é 3,3 vezes menor que a concentração média de cafeína nas plantas de *vestita*, relatada no presente trabalho, no mesmo período do ano.

Deve ser ressaltado ainda que outras populações da variedade *paraguariensis* apresentaram valores médios ainda menores (Athayde, 2000). Por outro lado, outras populações da variedade *vestita* devem ser investigadas, a fim de verificar a amplitude de variações desta variedade, especialmente tendo em conta a ampla variação interpopulacional já verificada para a variedade *paraguariensis*.

Os dados obtidos mostram que a cafeína não é sempre a metilxantina predominante em *I. paraguariensis*. Na variedade *vestita*, uma parcela das plantas apresenta teores mais elevados de teobromina do que de cafeína. Anteriormente, Reginatto *et al.* (1999) detectaram um teor mais elevado de teobromina em relação à cafeína em uma amostra de *I. paraguariensis* variedade *vestita*, e Athayde (2000) registrou um teor maior de teobromina em relação à cafeína para diversas plantas da variedade *paraguariensis* nativas de Ilópolis-RS.

A erva-mate pode ser considerada uma espécie com uma ampla variação fenotípica no conteúdo de metilxantinas, um tópico que deve ser destacado em futuras pesquisas, no sentido de modificar ou melhorar a qualidade da matéria-prima.

O método de CLAE utilizado pode ser considerado preciso e exato para cafeína e teobromina. Em que pese os tempos de retenção mais longos, comparando-se com outros métodos (e. g. Baltassat *et al.*, 1984), a quantificação da teobromina tornou-se mais precisa. A interferência de substâncias desconhecidas na quantificação de teobromina, e que tendem a apresentar tempos de retenção semelhantes a esta (conforme ilustrado na Figura 2.3), questão já relatada por outros autores (Marx & Maia, 1990), foi minimizada. A ocorrência de plantas com teores superiores de

teobromina em relação à cafeína justifica o método proposto, permitindo maior precisão na determinação quantitativa desta substância. Métodos anteriores (Baltassat *et al.*, 1984), utilizados para plantas com os interferentes citados, podem ocasionar uma superestimativa da teobromina, à medida que há sobreposição do pico da teobromina com essas substâncias.

3.

Teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) sob diferentes intensidades luminosas

3.1. Introdução

Entre as substâncias do metabolismo especial da erva-mate estão a cafeína e a teobromina. Estas metilxantinas são substâncias nitrogenadas com efeito tóxico sobre insetos e fungos, podendo, desta forma, atuar como defesas químicas (Nathanson, 1984; Itoyama & Bicudo, 1992; Morris *et al.*, 1994; Kumar *et al.*, 1995).

Do ponto de vista sucessional, a erva-mate é considerada uma espécie tolerante à sombra ou reprodutora à sombra (Floss, 1994; Coelho & Mariath, 1996; Coelho *et al.*, 2000). Por outro lado, é freqüentemente cultivada em condições de máxima exposição ao sol. Mazzafera (1994) verificou que, em uma mesma planta de *I. paraguariensis*, as folhas mais sombreadas apresentam teores mais elevados de metilxantinas. Plantas individuais, em sua totalidade, teriam resposta semelhante em relação à intensidade luminosa?

Como parte de nossas investigações sobre a química e ecologia da erva-mate (Reginatto *et al.*, 1999; Athayde *et al.*, 2000), esta etapa do trabalho teve como objetivo verificar a variação do conteúdo de cafeína e teobromina em função da variação na intensidade luminosa. Dois experimentos foram utilizados para verificar esta relação. Primeiramente, a relação entre luminosidade e metilxantinas foi estudada em um experimento onde as plantas de erva-mate foram cultivadas sob tela sombrite.

A fim de comparar o efeito do sombreamento artificial com o sombreamento natural, plantas crescidas sob a cobertura florestal natural também foram analisadas.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Condições experimentais

Experimento 1: as plantas foram cultivadas na Estação Experimental do IBAMA, Alto da União, Ijuí-RS a partir de junho de 1997. O solo da área, latossolo vermelho distrófico, foi descompactado mecanicamente e recebeu um tratamento através de adubação orgânica (1 kg de adubo por metro quadrado). Após o plantio, as mudas foram irrigadas nos primeiros dois meses até que pudessem apresentar aclimatação adequada. A coleta do material vegetal para análise química foi realizada em fevereiro de 2000 (plantas com 31 meses). Folhas sem danos evidentes por herbivoria foram colhidas entre o 3º e o 8º nós. Foram analisados dois tratamentos: plena luz natural e sombreamento com tela sombrite preta. O sombrite foi colocado sobre as plantas, e em todas as laterais até o solo, com exceção do lado sul. A atenuação da luz pelo sombrite foi avaliada através de um luxímetro LD-209 Instrutherm. Foram feitas quatro medidas de intensidade de luz dentro e fora da cobertura de tela sombrite, em três dias diferentes, sempre às 9 horas da manhã. Obteve-se um sombreamento médio de 66 % ($\pm 1,26$). As características físico-químicas do solo estão nos Anexos.

Experimento 2: as plantas foram cultivadas em espaçamento 3 x 2 m, em latossolo vermelho-amarelo álico, horizonte A moderado e textura muito argilosa, relevo suave ondulado, sob remanescentes de floresta nativa na fazenda Ignamate, São Mateus do Sul-PR (ver mapa página 43), em três sítios com diferentes níveis de sombreamento fornecido pelas árvores nativas. A intensidade de luz em cada tratamento foi medida através de um luxímetro em diferentes épocas do ano, em todas as plantas, a 1 metro de altura, junto ao tronco (Rachwal *et al.*, 1997). A média de iluminação de cada planta foi calculada a partir de medições em quatro épocas diferentes do ano, e a média

de cada tratamento corresponde à média das plantas em cada sítio. A extração das metilxantinas foi feita a partir do conjunto de todas as folhas de cada planta, as quais foram coletadas em agosto de 1999 (quando as plantas apresentavam a idade de 5 anos e 4 meses). Este mesmo material foi utilizado, paralelamente, para avaliação da produtividade, do conteúdo mineral e de compostos fenólicos totais (resultados relatados por Rachwal *et al.*, 1997). A mistura de todas as folhas foi triturada e homogeneizada, e uma sub-amostra foi destinada à quantificação de metilxantinas. Na análise do teor de metilxantinas, foram incluídas 6 plantas em cada tratamento. A média de luminosidade, portanto, em cada sítio/tratamento, corresponde à média dessas 6 plantas. Desta forma, o tratamento de maior luminosidade apresentou 93% da luz natural, o tratamento de luminosidade baixa apresentou 5% e o tratamento de luminosidade intermediária apresentou 41% da luz natural. As características físico-químicas do solo estão nos Anexos.

3.2.2. Tratamento do material vegetal pré-extração

As folhas do experimento 1 foram desidratadas em estufa com ventilação forçada, a uma temperatura de 50°C, por 48 horas. Antes da extração, foram trituradas através de um moinho coloidal com uma peneira acoplada, cujo tamis apresentava aberturas de 1,5 mm de diâmetro.

3.2.3. Extração e quantificação de metilxantinas

A extração foi feita por decocção aquosa, durante 20 minutos, com uma amostra de 1,0 g de material homogeneizado em 100 ml de água destilada. O extrato foi submetido à partição com clorofórmio:isopropanol 3:1 (v/v) em quatro repetições de 30 ml. A fase orgânica foi submetida à evaporação em pressão reduzida e o resíduo obtido foi diluído em metanol : água 1:1 (v/v) para análise em CLAE.

A extração ácida utilizada no capítulo anterior foi abandonada, visto que Gnoatto *et al.* (2000) demonstraram não ocorrer diferenças entre os dois procedimentos.

As condições cromatográficas em CLAE e em CCD foram as mesmas utilizadas no capítulo 2.

Análise estatística: os tratamentos foram analisados estatisticamente de acordo com um teste *t*, no experimento 1, e uma ANOVA de um fator no experimento 2 (Zar, 1999).

O incremento de metilxantinas em relação ao grau de sombreamento foi calculado da seguinte forma:

$$I (\%) = C_{\text{metilx}} \cdot 100 / C_{\text{máx}}$$

onde

C_{metilx} = concentração de metilxantinas em um determinado tratamento

$C_{\text{máx}}$ = concentração de metilxantinas no tratamento de máxima luminosidade

$I (\%)$ = incremento percentual de concentração de metilxantinas de um tratamento em relação ao tratamento de máxima luminosidade

Considerando que a intensidade luminosa máxima em São Mateus do Sul foi de 93 %, esta condição foi definida como 100 % de luz, e os outros dados foram padronizados de acordo. Desta forma, o tratamento de intensidade de luz intermediária assumiu um valor de 44,4% e o tratamento de menor intensidade de luz assumiu um valor de 5,06 %.

A significância estatística da regressão entre incremento de metilxantinas ($I (\%)$) e intensidade do sombreamento foi verificada através de ANOVA, segundo Zar (1999).

Os dados brutos obtidos são apresentados em anexo.

3.3. Resultados

No experimento 1, onde foi avaliado o efeito do sombreamento artificial, somente a teobromina apresentou um aumento significativo de concentração no tratamento de menor intensidade de luz, em relação ao tratamento de maior intensidade. O aumento no teor de cafeína e na soma dos teores de cafeína e teobromina não foi estatisticamente significativo (Figura 3.1).

No experimento 2, onde o efeito do sombreamento natural foi avaliado, verificaram-se diferenças significativas entre tratamentos, para os teores de cafeína e de cafeína + teobromina, (ANOVA de um fator, $P < 0,001$). A concentração de cafeína aumentou significativamente nas plantas submetidas ao tratamento de menor intensidade de luz (5% de luz), em relação aos outros tratamentos. Nota-se também que, ao contrário do verificado nos outros tratamentos, a concentração de cafeína foi muito superior à de teobromina. Não houve diferença significativa entre os tratamentos de intensidade alta e intermediária de luz (Figura 3.2).

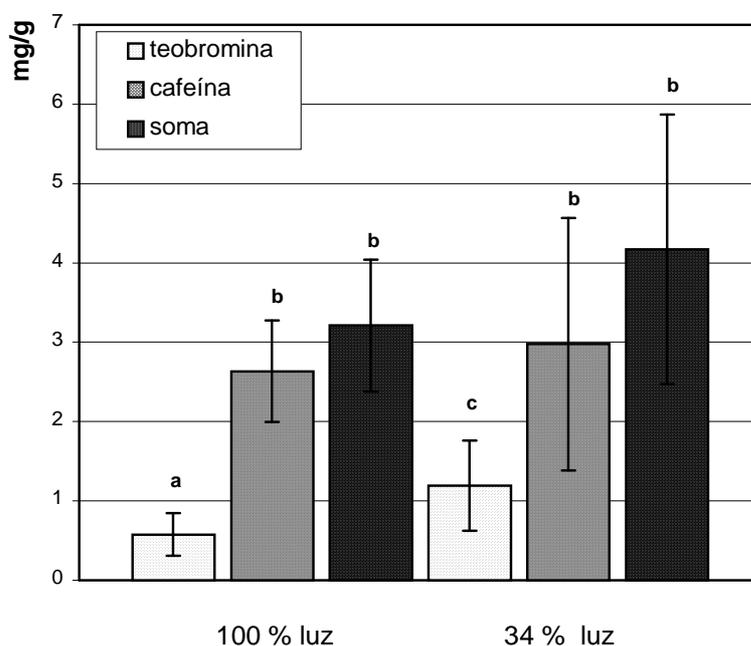


Figura 3.1. Efeito do sombreamento artificial sobre a concentração de cafeína e teobromina em *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil, var. *paraguariensis* Ijuí-RS; n= 10; letras diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos no teste t ($\alpha = 0,05$).

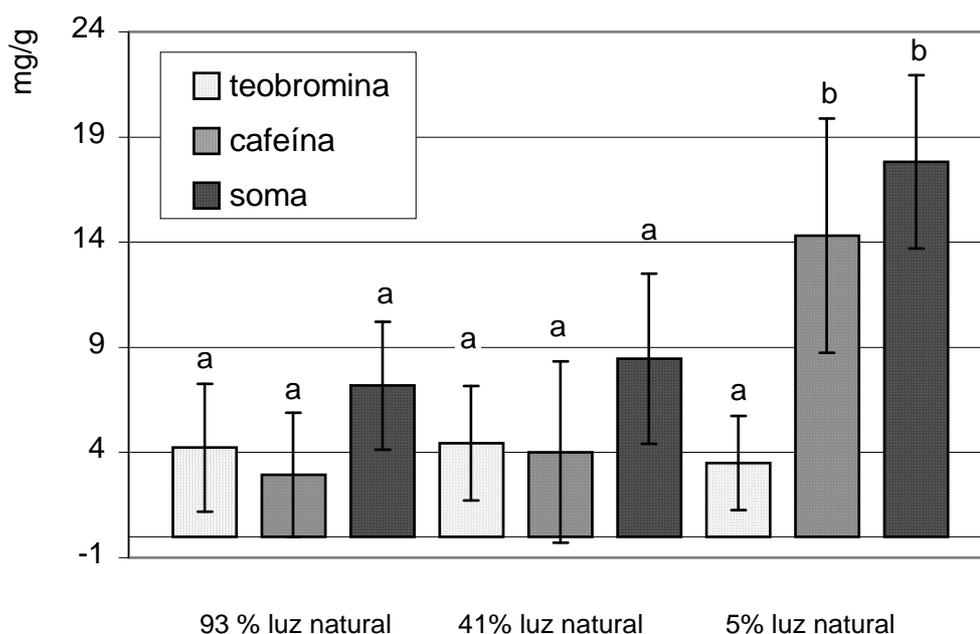


Figura 3.2. Efeito de diferentes intensidades de luz natural (valores médios e desvio padrão) sobre a concentração de cafeína e teobromina em *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., var. *paraguariensis*, São Mateus do Sul-PR; n = 6. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos segundo o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Os resultados dos dois experimentos são parcialmente diferentes. Entretanto, verifica-se uma tendência semelhante, ou seja, o aumento do teor de metilxantinas com a diminuição da intensidade luminosa. Um aumento mais acentuado de cafeína não foi observado no experimento 1, possivelmente em função da falta de um tratamento com menor intensidade de luz, equivalente ao tratamento com 5% de luz do experimento 2.

É possível propor uma síntese dos dois experimentos, transformando os valores médios da soma de cafeína e teobromina, em cada tratamento, em valores percentuais de incremento em relação aos valores obtidos nos tratamentos de máxima intensidade de luz (em cada experimento: 100 e 93 % da luz natural). Desta forma, os resultados dos dois experimentos foram analisados conjuntamente, permitindo verificar que a relação entre sombreamento e o incremento no teor destas substâncias não é linear, sendo melhor descrita por uma função potência $y = 403,99 x^{-0,314}$, onde y é o incremento percentual de metilxantinas e x é a intensidade luminosa expressa em porcentagem da luminosidade máxima (Figura 3.3). Para esta regressão, obteve-se um $r^2 = 0,9885$. Resultado semelhante não pôde ser obtido para cada uma das metilxantinas em separado, pois a proporção entre cafeína e teobromina é diferente nos dois experimentos (Figuras 3.1 e 3.2).

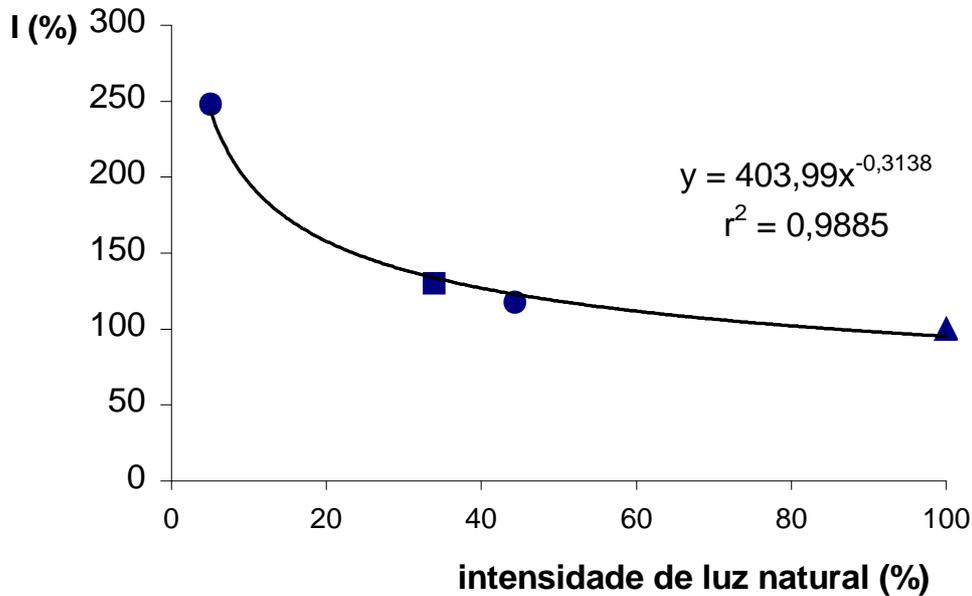


Figura 3.3. Intensidade de luz natural e I (%) = incremento de metilxantinas (caféina + teobromina), em relação ao tratamento de máxima intensidade de luz, em cada experimento. A linha representa uma curva ajustada de acordo com a equação acima; $r^2 = 0,9885$, $P < 0,01$; o triângulo indica os tratamentos de máxima intensidade de luz nos dois experimentos; círculos e quadrado representam os tratamentos de sombreamento dos experimentos 1 e 2, respectivamente.

3.4. Discussão

A teoria do balanço entre carbono/nutrientes (Bryant *et al.*, 1983) propõe que condições ambientais capazes de limitar a fotossíntese diminuem a produção de substâncias não-nitrogenadas, enquanto que a produção de substâncias nitrogenadas é favorecida. Uma das situações onde se verifica estas condições ambientais é o interior das florestas, onde o sombreamento das árvores dos estratos superiores diminui a luz disponível para as plantas nos estratos intermediários e inferiores.

Entretanto, o aumento de substâncias nitrogenadas de defesa em condições onde a disponibilidade de luz é limitada não foi observado em diversas espécies vegetais.

Ao contrário o teor destas substâncias (principalmente alcalóides) pode aumentar em condições de maior luminosidade (Bérnath & Tétényi, 1979; Jansen & Stamp, 1997; Ralphs *et al.*, 1998; Hägele & Rowell-Rahier, 1999). É possível que a teoria só possa ser aplicada a plantas adaptadas a ambientes sombreados (umbrófilas), que tendem a aumentar seu conteúdo de defesas químicas nitrogenadas quando submetidas a baixas intensidades luminosas (Hoft *et al.*, 1998). A resposta obtida em *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., ou seja, o aumento da concentração de metilxantinas em condições de luminosidade reduzida, está de acordo com esta proposição. Esta resposta fenotípica pode ter sido evolutivamente fixada, como uma adaptação às condições ecológicas do interior da floresta, sendo assim característica de uma planta adaptada à sombra. A erva-mate é uma espécie de alta longevidade foliar (Coelho & Mariath, 1996). Considerando as metilxantinas como substâncias de defesa contra insetos desfoliadores, o investimento maior nestas substâncias permitiria, em folhas mais sombreadas, uma longevidade maior. Assim, a assimilação fotossintética, durante um prazo mais largo, seria capaz de compensar o investimento biológico na formação deste órgão.

Um aumento acentuado (ecologicamente significativo) de cafeína e teobromina parece ocorrer apenas a partir de um determinado nível de sombreamento. É possível que, em condições de sombreamento moderado, a capacidade de crescimento desta espécie não seja reduzida, de forma que não haveria necessidade de investimentos maiores em defesa. Com efeito, no mesmo experimento 2 aqui analisado (São Mateus do Sul-PR), Rachwal *et al.* (1997) não puderam detectar diferenças significativas na produção de matéria seca de *I. paraguariensis* entre tratamentos de alta (74%) e moderada (46%) luminosidade natural, verificando que a produtividade caía de forma significativa somente no tratamento de menor intensidade luminosa (20% de luz natural; as porcentagens de luz não coincidem com as apresentadas na Figura 3.2, pois as plantas aqui analisadas não coincidem com as incluídas no estudo citado acima).

O aumento na concentração de substâncias nitrogenadas do metabolismo secundário poderia não estar relacionado à interação com herbívoros ou patógenos, e poderia ser explicado alternativamente como uma simples ‘realocação’ dos nutrientes,

em uma situação em que a fotossíntese esteja sendo limitada. Desta forma, o processo de crescimento estaria impossibilitado de utilizar todos os nutrientes disponíveis (especialmente o nitrogênio), que seriam destinados a outros processos metabólicos (Höft *et al.*, 1996).

A erva-mate é a única espécie de *Ilex* com quantidades apreciáveis de metilxantinas, enquanto que em outras espécies de *Ilex* a cafeína e teobromina estão ausentes ou presentes apenas em traços (Filip *et al.*, 1998; Reginatto *et al.*, 1999). Por outro lado, outras plantas adaptadas ao sub-bosque apresentam cafeína e teobromina em teores elevados, tais como *Theobroma cacao* (Sterculiaceae) e *Coffea* spp. (Rubiaceae). Isto pode indicar que cafeína e teobromina sejam substâncias de defesa favoráveis em ambientes sombreados, ou seja, onde a luz seja um fator ecológico limitante. O aumento dos teores de cafeína através do sombreamento também foi observada em *Camellia sinensis* (Tang & Tang, 1987; Fong & Shyu, 1988; Ohta & Harada, 1996).

A relação entre intensidade de luz (ou porcentagem de sombreamento) e a soma de cafeína e teobromina se ajusta adequadamente a uma função potência ($r^2 = 0,9885$). O número de pontos da curva (tratamentos) é pequeno e, assim, a descrição da relação entre o incremento no teor de metilxantinas e o sombreamento requer novos experimentos que confirmem a correlação aqui descrita. Por outro lado, o estudo desta correlação pode permitir um manejo mais preciso dos cultivos, buscando melhor qualidade da matéria-prima. É possível também que estes estudos contribuam para o manejo dos insetos.

Considerando as metilxantinas substâncias de defesa, os teores de cafeína e teobromina podem interferir na relação entre a planta e os herbívoros, particularmente os insetos. Conseqüentemente, a manipulação da intensidade luminosa nos cultivos pode ser um fator condicionante dos níveis de dano causados por parte destes últimos. À medida que a maior intensidade luminosa diminui a concentração de metilxantinas, pode tornar as folhas mais frágeis em relação aos herbívoros (capítulo 5).

A quantidade de substâncias ativas interfere também na qualidade dos produtos comerciais gerados a partir da erva-mate. O sabor, por exemplo, é uma função da composição química, e pode ser modificado pelo teor das diferentes substâncias químicas desta planta (Taketa *et al.*, 1998; Taketa, 2001). As condições de cultivo, portanto, à medida que alteram a concentração das diferentes substâncias presentes na planta, podem influenciar de forma decisiva as características da matéria-prima de erva-mate de seus produtos industrializados.

4.

Influência da adubação com nitrogênio e potássio sobre os teores de metilxantinas em *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

4.1. Introdução

O efeito da adubação sobre a composição química tem sido verificado em diversas plantas e em relação a diferentes categorias de compostos do metabolismo secundário (Owuor *et al.*, 1988; Salas *et al.*, 1990; Kainulainen *et al.*, 1996; Demeyer & Dejaegere, 1997; Li & Mazza, 1999). Também a deficiência nutricional pode modificar a concentração de alcalóides (Vrieling & van Wijk, 1994) ou de compostos não-nitrogenados (Estiarte *et al.*, 1994).

Isoladamente, a adubação potássica pode diminuir a concentração de alcalóides (Khan & Harborne, 1991; Demeyer & Dejaegere, 1997). A deficiência de potássio, por outro lado, aumenta a concentração de alcalóides (Khan & Harborne, 1991) e, particularmente, de cafeína, em *Coffea arabica* (Mazzafera, 1999). Em alguns casos, entretanto, a adubação com potássio promoveu um aumento no teor de alcalóides (Jana *et al.*, 1996). Em *Camellia sinensis*, a adubação potássica promoveu o aumento de cafeína (Wang *et al.*, 1993; Wu & Ruan, 1995, Ruan *et al.*, 1999).

A influência do potássio parece estar relacionada à atividade de certas enzimas (Khan & Harborne, 1991). O potássio também pode diminuir a síntese de alcalóides à

medida que estimula a síntese de proteínas (Flaig & Mohr, 1992; Laukanen *et al.*, 1997; Walker *et al.*, 1998) e diminui a disponibilidade de aminoácidos livres (Demeyer & Dejaegere, 1997).

A adubação nitrogenada, em geral, promove um aumento no teor de alcalóides (Jana & Varghese, 1996; Lata & Sadowska, 1996). A fonte de nitrogênio, porém, é importante na determinação de teores de alcalóides: em *Catharanthus roseus*, verificou-se que a adubação com nitrogênio sob a forma de nitrato aumenta o teor de alcalóides, enquanto a adubação com cloreto de amônia combinado com nitrato de potássio diminui a produção destas substâncias (Miranda *et al.*, 1996).

Com o objetivo de verificar a influência de adubos potássicos e nitrogenados, analisou-se plantas de erva-mate submetidas a diferentes tratamentos de adubação, no município de Barão de Cotegipe-RS.

4.2. Material e Métodos

O experimento foi instalado no município de Barão de Cotegipe (*cf.* figura 2.1, página 43), Rio Grande do Sul, na propriedade da Indústria de Erva-mate Barão do Cotegipe, sob a responsabilidade técnica da EMBRAPA-CNPQ (Colombo-PR) e URICER (Universidade Regional Integrada de Erechim-RS). As plantas analisadas pertencem à variedade *paraguariensis*.

O espaçamento entre plantas foi de 2 x 2 metros. A altura das plantas, no momento da coleta, variou entre 2 e 4 metros.

A adubação foi feita em três diferentes tratamentos:

- tratamento 1: 120 g de KCl + 100 g de uréia por planta;
- tratamento 2: 45 g de KCl + 300 g de uréia por planta;
- tratamento controle: sem adubação.

A aplicação do adubo foi parcelada em duas vezes. A primeira aplicação no intervalo entre a última semana de setembro até a primeira semana de outubro de 2000. Posteriormente, uma aplicação foi realizada no intervalo entre a última semana de janeiro e a primeira semana de fevereiro de 2001.

Foram analisadas 10 plantas em cada tratamento. A coleta das folhas foi realizada em maio de 2001. Foram coletados ramos do lado externo das plantas, em cada bloco, junto aos caminhos, lado sudeste, de forma a minimizar o efeito de sombreamento que pudesse ser gerado no interior de cada bloco.

A secagem foi realizada a 40 °C, em uma estufa com ventilação forçada, durante 48 horas. As folhas com o menor grau de danos por herbivoria foram selecionadas e trituradas em um moinho, com um tamis acoplado de orifícios de 1,5 mm de diâmetro.

A extração e a quantificação das metilxantinas foi realizada conforme o método descrito no capítulo 3.

Os tratamentos foram comparados através de uma ANOVA de um fator (Zar, 1999), no que se refere aos teores de teobromina, cafeína, e soma das duas substâncias. As comparações múltiplas entre tratamentos utilizaram o teste de Tukey.

Um teste de Kruskal-Wallis foi aplicado para a razão cafeína/teobromina, em função do alto coeficiente de variação. Além disso, sendo uma proporção, os dados de razão cafeína/teobromina tendem a fugir de uma distribuição normal. As comparações múltiplas entre tratamentos utilizaram o teste de Nemenyi (Zar, 1999).

4.3. Resultados

Os valores médios dos teores de cafeína e teobromina são apresentados na tabela 4.1, juntamente com os valores médios correspondentes à soma das duas substâncias.

Tabela 4.1. Valores médios de teobromina e cafeína, e a soma das duas nos tratamentos de adubação e tratamento controle, em *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Barão do Cotegipe- RS (n=10); em cada parâmetro, letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA de uma via, $\alpha = 0,05$, teste de Tukey para comparações pareadas).

	teobromina	cafeína	soma
1. KCl 120 g / uréia 100 g	3,81 (\pm 3,11) a	17,28 (\pm 5,46) a	21,08 (\pm 3,05) ab
2. KCl 45 g / uréia 300 g	1,38 (\pm 0,84) ab	25,52 (\pm 7,30) b	26,90 (\pm 7,36) b
3. controle	0,94 (\pm 0,91) b	18,92 (\pm 6,13) ab	19,86 (\pm 6,58) a

A razão cafeína/teobromina é diferente entre os tratamentos, segundo o teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Pode-se observar a forma de distribuição dos dados na figura 4.1. Verifica-se que a adubação potássica tende a diminuir essa proporção.

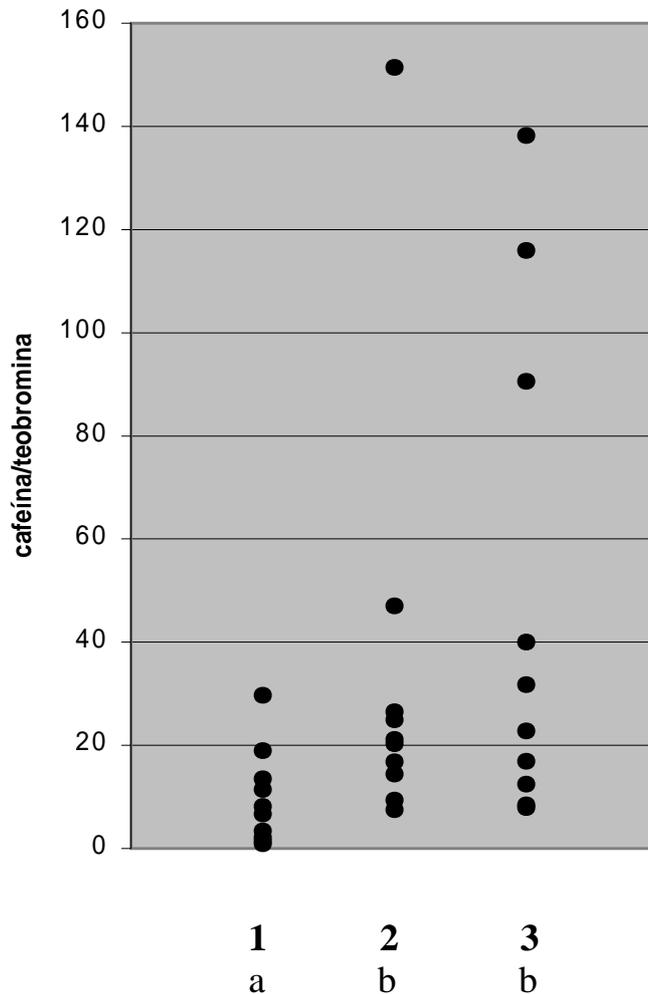


Figura 4.1. Dados da razão cafeína/teobromina para os diferentes tratamentos de adubação; 1. KCl 120 g, uréia 100 g, 2. KCl 45 g, uréia 300 g, 3. controle. Cada ponto no gráfico corresponde a uma planta. A diferença entre os tratamentos é significativa, segundo o teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$), $n=10$; letras diferentes significam diferenças entre tratamentos segundo o teste de Nemenyi.

4.4. Discussão

A adubação potássica promoveu um aumento dos teores de teobromina e uma diminuição da razão cafeína/teobromina, em relação aos outros dois tratamentos. Não foi detectada diferença nos teores de cafeína entre o tratamento com essa adubação e o

controle. Esses resultados sugerem que o potássio promove o aumento nos teores de teobromina em erva-mate.

A interferência do potássio sobre a cafeína pode ter sido minimizada pela adição conjunta de uréia, em teores baixos (primeiro tratamento). Desta forma, não se pode excluir a possibilidade de uma diminuição no teor da cafeína, se a adubação com potássio for utilizada isoladamente.

Na comparação entre progênies meio-irmãs cultivadas em dois lugares diferentes (Ijuí e Ilópolis-RS), verificou-se que as plantas cultivadas em Ilópolis apresentavam uma razão cafeína/teobromina inferior, embora diferenças nos teores de teobromina e cafeína, isoladamente, não tenham sido detectadas. Uma das diferenças entre Ijuí e Ilópolis é a presença de teores mais elevados de potássio no solo desta última localidade, pelo menos nas áreas de cultivo das plantas estudadas (Verza, 2001).

A adubação nitrogenada (tratamento 2) promoveu um aumento nos teores de cafeína em relação ao tratamento com menos uréia e mais potássio (tratamento 1), embora não tenha sido detectada diferença entre o tratamento 2 e o controle. Por outro lado, quanto à soma de cafeína e teobromina, verifica-se que o tratamento 2 diferenciase do controle. Desta forma, podemos afirmar que adubação nitrogenada promove o aumento das metilxantinas. O aumento dos teores de cafeína, neste tratamento, é de 35 % em relação ao controle, e o aumento sobre a teobromina corresponde a 47 % sobre o controle (considerados os valores médios).

5.

Desenvolvimento de *Adelpha mincia* Hall (Lepidoptera: Nymphalidae) alimentadas com folhas de erva-mate crescidas em diferentes intensidades de luz e sob efeito da adição de cafeína

5.1. Introdução

Por suas características biológicas e ecológicas, a erva-mate é considerada uma planta tolerante à sombra (Floss, 1994; Coelho & Mariath, 1996; Coelho *et al.*, 2000). As espécies tolerantes à sombra apresentam uma série de adaptações às condições de sub-bosque, incluindo as suas defesas contra os desfolhadores (Coley, 1983, 1987).

Entre os insetos folívoros da erva-mate, destacam-se os da ordem Lepidoptera. São mais de 40 espécies destes insetos cujas larvas se alimentam das folhas desta planta (Fernandez-Díaz, 1997). Embora já exista um bom número de levantamentos da entomofauna associada à erva-mate, não existem estudos sobre os fatores que interferem na interação da erva-mate com os lepidópteros.

Plantas de erva-mate apresentam teores mais elevados de cafeína e teobromina quando sombreadas (Coelho *et al.*, 2000; capítulo 3). De forma similar, Mazzafera (1994), comparando folhas de uma mesma planta, verificou que as folhas menos expostas ao sol possuem concentrações maiores destas metilxantinas. A cafeína é uma

substância tóxica aos insetos, e pode funcionar como defesa química (Janzen *et al.*, 1977; Nathanson, 1984; Itoyama & Bicudo, 1992; Morris *et al.*, 1994). Não obstante, existem poucos estudos (e. g. Kumar *et al.*, 1995), que demonstram a efetividade da cafeína como deterrente em condições naturais, ou seja, envolvendo plantas que produzem cafeína e os herbívoros associados a estas.

Desta maneira, interessa verificar qual o efeito das condições lumínicas às quais a planta está submetida, sobre o desenvolvimento das larvas de insetos lepidópteros. Considerando que o sombreamento aumenta a concentração de metilxantinas, este trabalho avaliou também o efeito da adição de cafeína às folhas sobre o desenvolvimento dos insetos.

Adelpha mincia Hall 1938 (Lepidoptera:Nymphalidae), uma espécie cujas larvas se alimentam de folhas de erva-mate, foi escolhida como objeto destes ensaios, considerando sua abundância na região durante um longo período do ano. No local onde foi desenvolvido o estudo, esta espécie só se alimenta de *Ilex paraguariensis*, o que indica que se trata de uma espécie monófaga.

Diversos parâmetros morfológicos quantitativos dos insetos têm sido avaliados do ponto de vista da seleção natural e da adaptação a certas condições do ambiente (Moore, 1989; Carareto & Mourão, 1991; Myastake, 1993). Nos lepidópteros, área da asa (Wasserthal, 1975) comprimento da asa e dimensões das estruturas torácicas de vôo (Van Dongen *et al.*, 1999) são caracteres que, entre outros, apresentam um significado importante na relação de cada espécie com o seu ambiente. O alimento utilizado pelas larvas pode alterar estes caracteres (Miranda, 1997). Desta forma, foi realizada uma comparação entre os tratamentos com o objetivo de verificar se a alimentação pode interferir na expressão de características morfológicas dos insetos adultos de *A. mincia*.

5.2. Material e Métodos

Para alimentar as lagartas, foram escolhidas plantas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil. var. *paraguariensis*) crescendo em condições naturais (crescimento espontâneo), na estação Florestal e Experimental do IBAMA, Alto da União, Ijuí-RS. As duas plantas estavam à uma distancia aproximada de 50 m, pelo que se pode pressupor que pertençam à mesma população. Foram utilizadas folhas de uma planta crescida a pleno sol, e uma planta do interior da floresta, sob cerca de 4 % de luminosidade, conforme tabela 5.1.

Tabela 5.1. luminosidade média, no mês de Fevereiro de 2001, incidente sobre as plantas de erva-mate utilizadas na alimentação das larvas de *Adelpha mincia*.

	intensidade lumínica (média)
Planta a pleno sol	84.233 lux
Planta sombreada do interior da floresta	3.384 lux

A avaliação da intensidade luminosa foi obtida através de um luxímetro LD-209 INSTRUTHERM. Foram feitas 3 medidas de intensidade de luz, entre 9 horas e 9 horas e 30 min (Abril, 2001). As medidas foram tomadas no interior da copa, a cerca de 1,5 m do chão e a 0,5 m do tronco, e também a pleno sol.

Algumas larvas foram criadas previamente em laboratório até a fase adulta. Estes adultos foram posteriormente identificados por Olaf H. H. Mielke (UFPR) e por Rocco di Mare (UFSM).

As folhas das plantas selecionadas para a alimentação das larvas foram coletadas, lavadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5% e conservadas em geladeira até o uso.

Foram utilizados três tratamentos para a alimentação das larvas: folhas da planta de sombra, folhas da planta de sol, folhas da planta de sol às quais foi adicionada cafeína. A adição de cafeína às folhas de sol foi realizada através do uso de um pincel umedecido, espalhando a cafeína em pó, previamente pesada, sobre a superfície superior das folhas. A cafeína foi aplicada em dois tratamentos, na proporção de 8 mg e 25 mg de cafeína para cada g de folha (massa fresca).

Estimou-se a relação entre massa fresca e massa seca através de uma amostra de folhas. Obteve-se um valor de $61 \% \pm 4,4$ de água. Considerando que a massa seca corresponde, portanto, à cerca de 39 % da massa fresca, estima-se que as adições de cafeína correspondam a 20,5 mg e 64,0 mg de cafeína por g de massa seca foliar.

Os ovos de *A. mincia* foram coletados na Estação do IBAMA, levados ao laboratório e desinfetados com formalina a 5% (aq.) durante 1 hora, e posteriormente lavados com água corrente por cerca de 1 hora (adaptado de Boettner *et al.*, 2000). Este procedimento foi adotado após a grande mortalidade verificada nas larvas recém-nascidas. Possivelmente, esta grande mortalidade vinha sendo causada por microorganismos patogênicos trazidos junto com os ovos.

Posteriormente, os fragmentos de folha contendo os ovos foram depositados sobre um papel e conservados em recipientes plásticos translúcidos de 250 ml, fechados, até a eclosão, sob uma temperatura de 25°C.

Na eclosão, as larvas foram transferidas para as folhas, mantidas em recipientes individuais do mesmo tipo descrito acima, com fragmentos de papel molhado para manter a umidade. As folhas foram oferecidas *ad libitum* e foram substituídas num intervalo máximo de 3 dias.

Os parâmetros avaliados foram massa fresca da pupa, sobrevivência na fase larval, tempo necessário para o desenvolvimento da larva até a formação da pupa, e para a emergência do adulto a partir da formação da pupa. A massa fresca foi quantificada através de uma balança Setra ELS 200s com precisão na ordem de décimos de miligrama.

A sobrevivência foi avaliada somente nas larvas de 2º ínstar¹⁰ até a formação da pupa. No adulto, foram avaliados o comprimento máximo da asa anterior, a área total das asas (posterior + anterior, um lado), a área da mancha laranja da asa anterior, a área escura (cinza a preta), e a área total das manchas brancas (fig. 1).

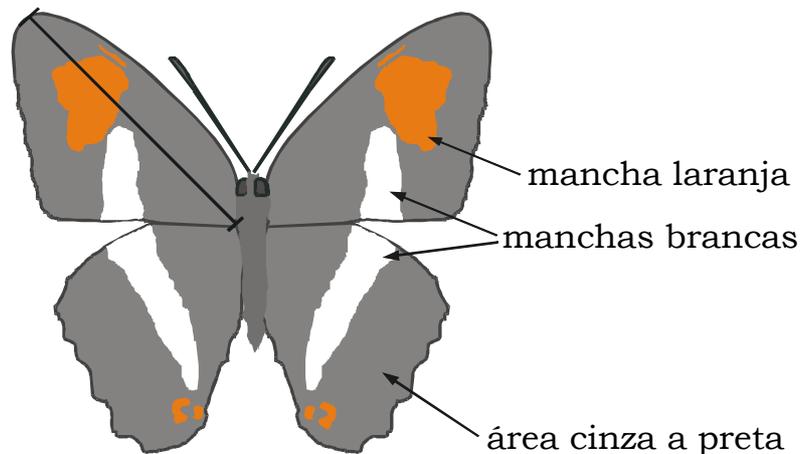


Figura 5.1. Representação esquemática do adulto de *Adelpa mincia* (face dorsal) e os parâmetros morfológicos de avaliação: comprimento máximo da asa dianteira (linha à esquerda), área total das asas (cm², um lado), área das manchas laranja da asa anterior, área das manchas brancas, e área escura (cinza a preta).

A análise morfológica dos adultos foi realizada a partir de imagens fotográficas digitalizadas a partir dos negativos, usando um scanner Canon 2720. As imagens digitais, em formato jpg, foram analisadas através do programa Somnium 1.0 para análise de imagens, desenvolvido pelo laboratório de Anatomia Vegetal da UFRGS.

Para avaliar a preferência dos adultos em relação ao ambiente das plantas, quantificou-se os ovos de *Adelpa mincia* encontrados em uma população submetida a dois tratamentos de sombra: 0 e 66 % de sombreamento. Os tratamentos foram instalados lado a lado, e o sombreamento foi obtido através do uso de tela sombrite. O

¹⁰ Estádio de desenvolvimento larval.

grau de sombreamento gerado pelo sombrite foi avaliado através de luxímetro (capítulo 3). Em função da alta mortalidade das plantas de erva-mate verificada no tratamento sem sombreamento (Coelho *et al.*, 2000; capítulo 8), o número de plantas neste tratamento (n=15) na época da avaliação da oviposição (janeiro a junho de 2001) foi menor do que o tratamento com sombreamento (n= 48). A idade das plantas no momento desta avaliação foi de 42-48 meses.

A quantificação de metilxantinas foi realizada de acordo com a metodologia descrita no capítulo 3.

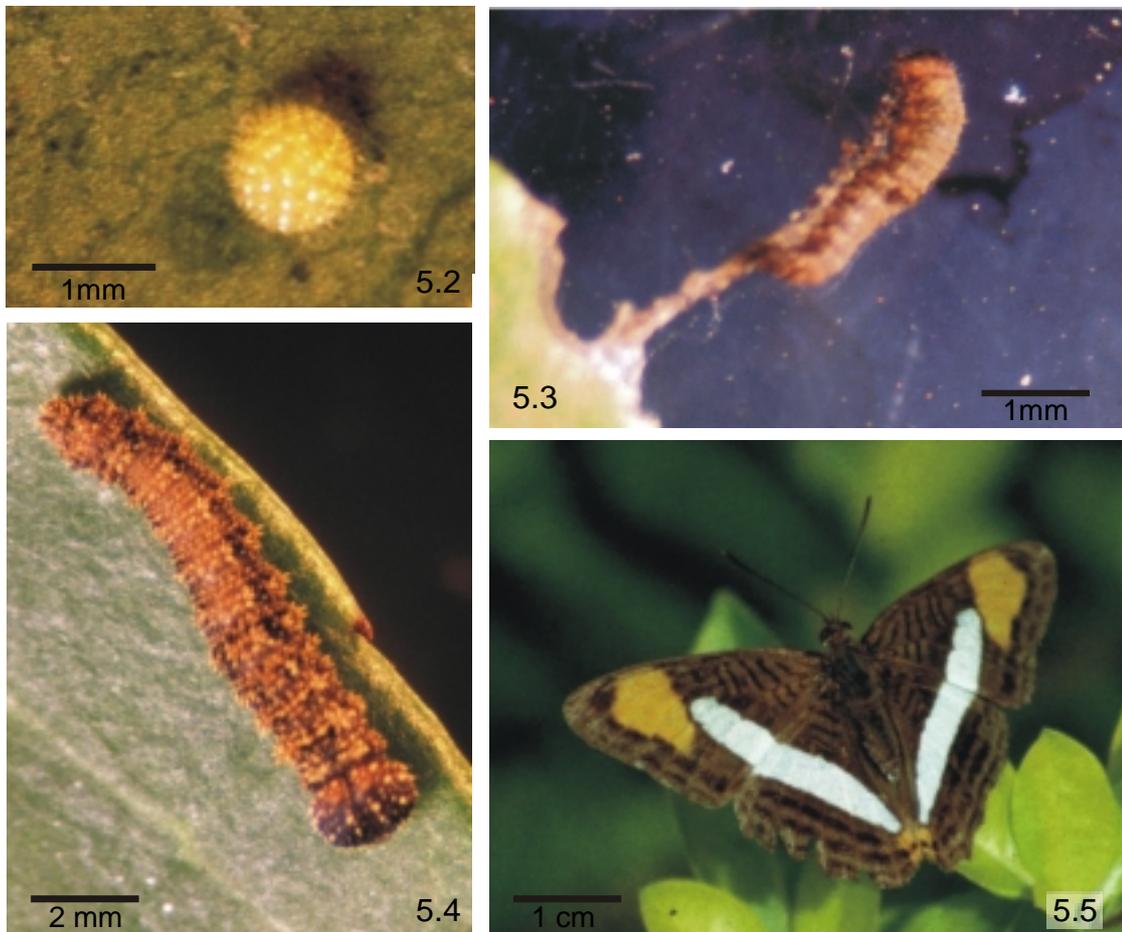
Todos os procedimentos de análise estatística foram realizados de acordo com Zar (1999).

Os dados brutos são apresentados em Anexos, com exceção dos dados morfológicos dos adultos, apresentados na tabela 5.4.

5.3. Resultados

As Figuras 5.2 a 5.5 mostram algumas fases do desenvolvimento de *A. mincia*. A fase larval apresenta 5 ínstaes. O ovo (Figura 5.2) é colocado na face dorsal ou ventral da folha. Quando colocado na face dorsal (inferior), geralmente é encontrado próximo à nervura mediana ou à meia distância entre esta e o bordo, na metade apical da folha. Quando encontrado na face ventral, quase sempre o ovo é localizado junto ao ápice ou às bordas.

As larvas dos primeiros 2 ínstaes se mantém uma parte do tempo em hastes construídas a partir do ápice ou das bordas da folha (Figura 5.3). Este abrigo é construído no ápice ou nas bordas da folha, geralmente como um prolongamento das nervuras e em locais onde parte do bordo já foi consumido.



Figuras 5.2. a 5.5. fases de desenvolvimento de *Adelpha mincia* (Lepidoptera, Nymphalidae)

5.2. Ovo (escala = 1mm);

5.3. Larva de 1º ínstar em um abrigo construído na borda da folha (escala = 1mm);

5.4. Larva de 2º ínstar (escala = 2 mm);

5.5. Adulto (escala = 1 cm).

5.3.1. Concentração de metilxantinas nas folhas

Inicialmente foi testado o efeito da adição de 25 mg/g nas folhas sobre as larvas de *A. mincia*, porém neste caso não houve sobreviventes (n=12). Desta forma, este tratamento foi substituído por uma adição de 8 mg/g de cafeína (em relação à massa fresca das folhas).

A tabela 5.2 apresenta a concentração estimada de cafeína e teobromina nas folhas utilizadas para alimentação das larvas. A concentração de cafeína em folhas de sombra e de sol foi avaliada através de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). A partir desta avaliação, estimou-se a concentração obtida através da adição de cafeína (8 mg/g de massa fresca de folha).

Tabela 5.2. Estimativa da concentração de metilxantinas nas folhas dos diferentes tratamentos utilizados na alimentação de *Adelpha mincia*. Dados de folhas de sol e sombra obtidos a partir de análise em CLAE.

A. estimativa da concentração de metilxantinas em mg/g de massa foliar fresca

	folhas de sombra	folhas de sol	folhas de sol + cafeína
cafeína (mg/g)	10,73	6,75	15,2
teobromina (mg/g)	0,55	0,98	0,98

B. estimativa da concentração de metilxantinas em mg/g de massa foliar seca.

	folhas de sombra	folhas de sol	folhas de sol + cafeína
cafeína (mg/g)	27,5	17,3	39,0
teobromina (mg/g)	1,4	2,5	2,5

5.3.2. Influência da dieta sobre a massa das pupas, tempo de desenvolvimento e sobrevivência

As pupas de larvas alimentadas com folhas de sol apresentaram massa fresca superior aos outros tratamentos (Figura 5.6). As de larvas alimentadas com folhas de sombra e as alimentadas com folhas de sol adicionadas com cafeína (8 mg/g) apresentaram valor inferior ao tratamento anterior, e não diferiram entre si.

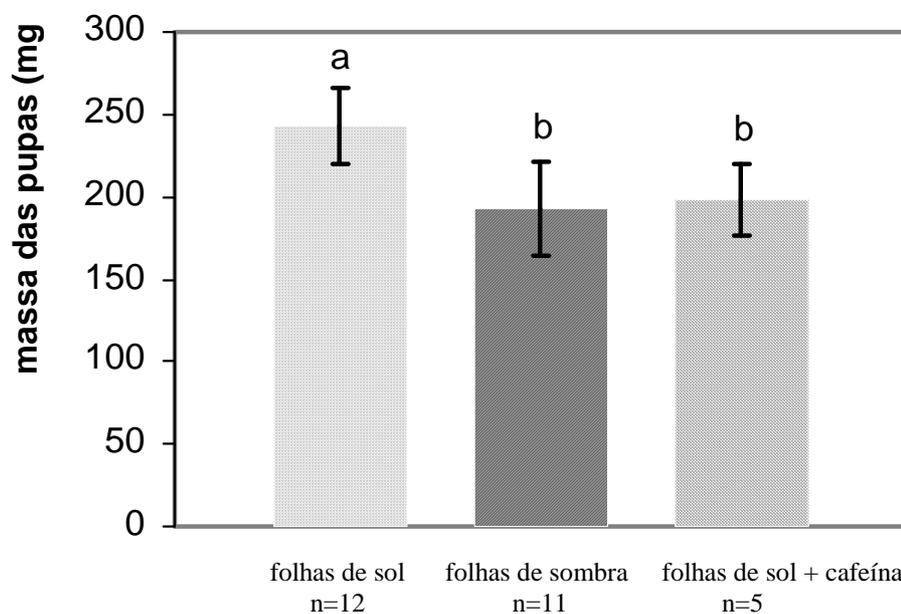


Figura 5.6. Massa fresca das pupas de *Adelpha mincia* cujas larvas foram alimentadas em folhas de erva-mate crescidas em diferentes condições lumínicas e em folhas de sol adicionadas com cafeína; $P < 0,01$, ANOVA de um fator. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre tratamentos.

Os tratamentos não diferiram no tempo de desenvolvimento das larvas, da eclosão até a formação da pupa, e no tempo de emergência dos adultos, contado a partir da formação da pupa (tabela 5.3). Entretanto, somando-se o tempo de desenvolvimento das larvas e o tempo de emergência do adulto, verifica-se que o tratamento com folhas de sombra apresenta um valor superior.

Tabela 5.3. Efeito dos diferentes tipos de alimentação no desenvolvimento de *Adelpha mincia*; $\alpha = 0,05$, ANOVA de um fator. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre tratamentos.

	folhas de sol	folhas de sombra	folhas de sol + cafeína
tempo de desenvolvimento das larvas (dias)	19,00 ± 1,73 a (n=11)	20,70 ± 3,59 a (n=10)	20,50 ± 0,58 a (n=4)
tempo de emergência dos adultos (dias)	7,13 ± 0,64 b (n=8)	9,20 ± 3,77 b (n=5)	6,50 ± 0,58 b (n=4)
tempo total de desenvolvimento	25,63 ± 1,51 a (n=8)	30,40 ± 2,07 b (n=5)	26,67 ± 1,15 a (n=3)

Os tratamentos com folhas de sol e folhas de sombra não apresentaram diferenças significativas no que se refere à sobrevivência das larvas no período pré-pupa (Figura 5.7; Teste de χ^2 , $P = 0,067$).

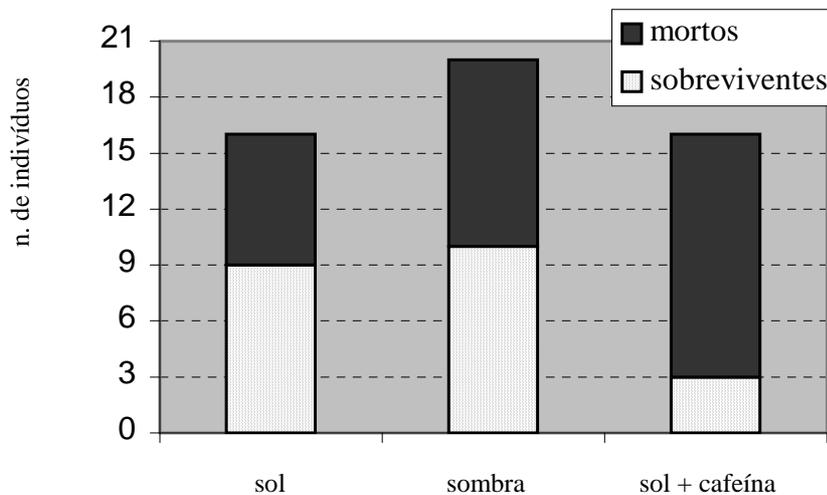


Figura 5.7. Proporção entre indivíduos de *A. mincia* sobreviventes e mortos, do 2º ínstar até a formação da pupa, em cada tratamento. Teste de χ^2 , $P = 0,067$.

5.3.3. Efeito da dieta sobre os adultos

Uma sub-amostra de adultos foi analisada morfolologicamente para verificar a interferência do tipo de alimentação. A tabela 5.4 resume os dados obtidos.

Verifica-se que os adultos de *A. mincia* que se alimentaram de folhas de sombra apresentam uma área total de asa semelhante às lagartas alimentadas com folha de sol, apesar de apresentarem uma massa de pupa média inferior. Conseqüentemente, a relação entre área da asa e massa da pupa é superior também no tratamento de folha de sombra (tabela 5.4). O aumento da razão área da asa/massa incide mais fortemente na área escura e na área branca, visto que os tratamentos são significativamente diferentes quanto às razões área escura/massa da pupa e área branca/massa da pupa, e não diferem quanto à razão área laranja/massa da pupa.

Tabela 5.4. Efeito da dieta sobre os parâmetros morfológicos de adultos de *Adelpha mincia*; massa da pupa (mg), comprimento máximo da asa anterior (C asa, cm), área total de asa de um lado (cm²), área total escura (cm²), área da mancha laranja da asa anterior (cm²), área total das manchas brancas (cm²), relação entre área total e massa (cm²/g), área escura e massa, área laranja e massa e área branca e massa; os coeficientes (r) abaixo se referem a correlação entre cada parâmetro e massa da pupa em cada tratamento (* indica r significativo para $\alpha = 0,05$, teste *t*). A probabilidade associada ao teste *t* para a comparação entre tratamentos, em cada parâmetro, é mostrada na linha inferior (em negrito valores menores que 0,05).

tratamento folhas de sombra

	massa pupa	C asa	A total	A escura	A laranja	A branca	A tot/ massa	A esc. /massa	A lar./ massa	A branca/ massa
	145	2,397	4,093	3,158	0,349	0,556	28,23	21,78	2,41	3,83
	171	2,430	4,0381	3,085	0,296	0,642	23,61	18,04	1,73	3,76
	185	2,494	4,4912	3,508	0,285	0,668	24,28	18,96	1,54	3,61
	186	2,502	4,6901	3,521	0,423	0,708	25,22	18,93	2,27	3,80
	190	2,522	4,4834	3,447	0,378	0,627	23,60	18,14	1,99	3,30
	204	2,613	4,4318	3,378	0,396	0,628	21,72	16,56	1,94	3,08
	237	2,788	5,8601	4,468	0,557	0,794	24,73	18,85	2,35	3,35
	248	2,787	5,9752	4,049	0,470	0,728	24,09	16,33	1,90	2,94
	265	3,004	6,4565	4,979	0,522	0,891	24,36	18,79	1,97	3,36
média	203,44	2,615	4,95	3,733	0,408	0,694	24,43	18,49	2,01	3,45
r		0,973*	0,952*	0,912*	0,822*	0,885*	-0,381	-0,517	-0,066	-0,707

tratamento folhas de sol

	201	2,598	4,6785	3,729	0,378	0,571	23,28	18,55	2,34	2,84
	205	2,681	4,3279	3,341	0,449	0,740	21,11	16,30	2,19	3,61
	217	2,527	4,4776	3,322	0,432	0,688	20,63	15,31	1,99	3,17
	238	2,594	4,848	3,598	0,449	0,763	20,37	15,12	1,89	3,21
	250	2,820	5,4657	4,254	0,449	0,725	21,86	17,02	1,80	2,90
	254	2,692	4,984	3,340	0,349	0,603	19,62	13,15	1,37	2,37
	269	2,687	4,6381	3,615	0,315	0,685	17,24	13,44	1,17	2,55
	287	2,730	5,9565	4,533	0,552	0,836	20,75	15,79	1,92	2,91
	293	2,912	6,5079	4,955	0,563	0,936	22,21	16,91	1,92	3,20
média	246,00	2,693	5,10	3,854	0,437	0,727	20,79	15,73	1,84	2,97
r		0,706*	0,818*	0,680*	0,417	0,652*	-0,299	-0,307	-0,541	-0,343
teste t	0,025	0,337	0,701	0,529	0,500	0,510	0,0004	0,0028	0,2999	0,0108

A relação entre área total e massa da pupa é diferente para lagartas que se alimentaram de folhas de plantas de sol e sombra. Embora os coeficientes angulares sejam equivalentes, as duas retas diferem estatisticamente na interceptação no eixo y, confirmando que há diferença entre tratamentos (Figura 5.8). No caso da proporção da mancha laranja em relação à mancha total (Figura 5.9), não foi verificada diferença entre as equações de reta dos dois tratamentos.

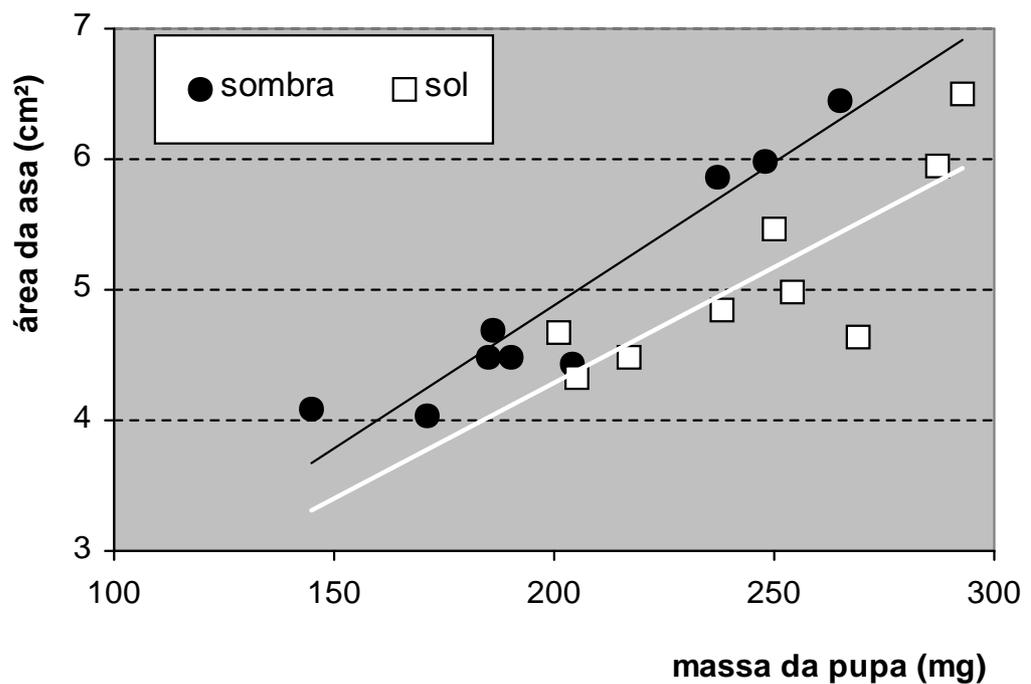


Figura 5.8. Relação entre massa da pupa e área total da asa (um lado); $0,0219x + 0,482$ ($r^2=0,9064$) para folhas de sombra e $y = 0,0178x + 0,727$ ($r^2=0,7267$) para folhas de sol; coeficientes angulares equivalentes ($P > 0,05$) e coeficientes de elevação diferentes estatisticamente ($P < 0,01$), conforme teste t .

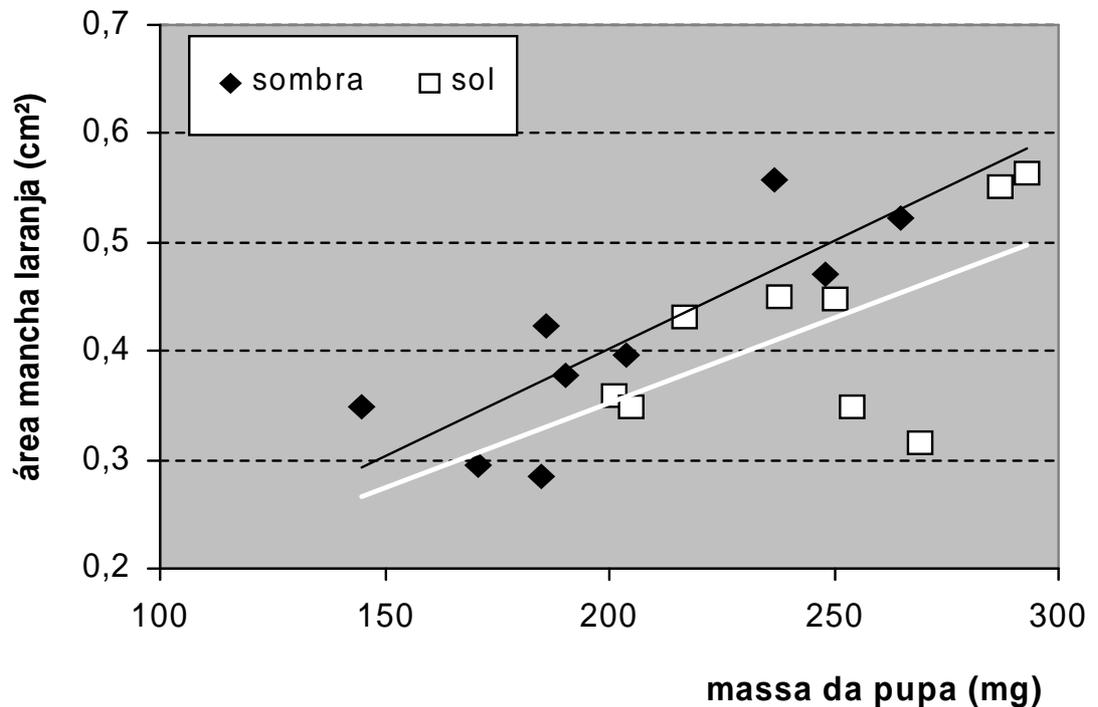


Figura 5.9. Relação entre massa da pupa e área da mancha laranja da asa anterior (um lado); $y=0,00199x + 0,0032$ ($r^2=0,6762$) para folhas de sombra e $y = 0,00157x + 0,0369$ ($r^2=0,3508$) para folhas de sol; coeficientes angulares e de elevação equivalentes ($P > 0,05$), conforme teste t .

5.3.4. Preferência dos adultos em relação ao ambiente quanto à oviposição

Adicionalmente aos experimentos relativos ao desenvolvimento das larvas e pupas, realizou-se experimentos de campo sobre a oviposição. O número de ovos de *A. mincia* encontrados nas plantas mais iluminadas foi superior (Figura 5.10), em que pese o número menor de plantas neste tratamento.

Neste experimento e na estação experimental em geral, observou-se que a abundância de aranhas de teia, predadoras de borboletas, é maior nos ambientes mais sombreados. Foram oferecidos 3 adultos de *Adelpha mincia* para aranhas *Nephila* sp. (uma das espécies mais abundantes de aranha de teia) e nenhuma foi recusada. Adicionalmente, foram observados na área experimental outros três adultos de *A. mincia* predados em teias de *Nephila* sp.

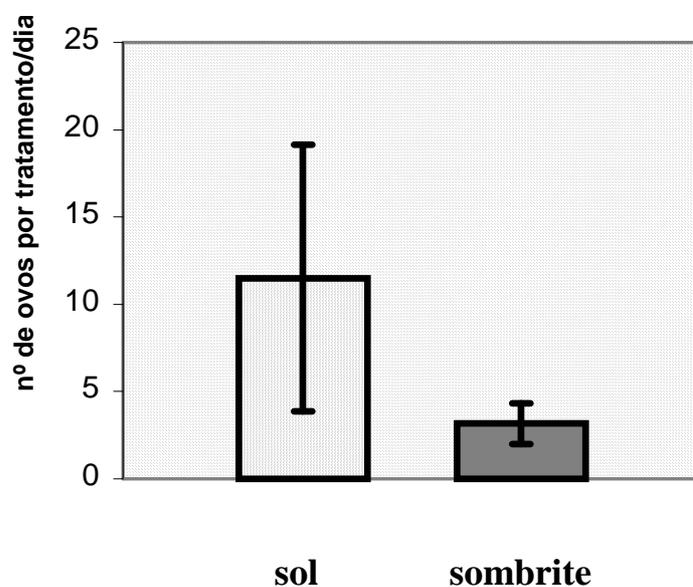


Figura 5.10. Comparação entre a oviposição nas plantas crescidas sem sombreamento e sombreadas com tela sombrite (34 % luz do sol); $n = 6$ dias de observação, $P > 0,05$ (teste t). Número de plantas no tratamento a pleno sol (sem sombrite) igual a 15, número de plantas no tratamento com sombrite igual a 48. As barras verticais indicam o desvio-padrão.

5.4. Discussão

5.4.1. Comparação entre dieta de folhas de sol e folhas de sombra

Em relação ao tratamento com folhas de sol, o tratamento com folhas de sombra resultou em menor massa de pupas e maior tempo de desenvolvimento total, da eclosão da larva até a emergência do adulto. Considerando que a adição de cafeína às folhas de sol geraram efeito semelhante no que se refere à massa das pupas, este resultado poderia estar relacionado, em parte, ao maior teor de cafeína da planta crescida à sombra. Outros fatores químicos, entretanto, podem contribuir para este

efeito, o que requer maiores investigações. A título de exemplo, verifica-se que o teor de fenólicos em erva-mate se modifica com intensidade luminosa, diminuindo em ambientes sombreados (Rachwal *et al.*, 2000).

Uma menor massa de pupas pode gerar adultos com menor fertilidade em Lepidoptera (Tammaru, 1998), determinando desvantagem seletiva para os indivíduos que se alimentam de plantas sombreadas.

Embora a massa das pupas tenha sido menor no tratamento de folhas de sombra, não foi detectada diferença na área da asa dos adultos entre os tratamentos. Isto parece indicar uma capacidade ontogenética compensatória por parte de *Adelpha mincia*. Esta compensação pode ser importante, considerando o valor seletivo do tamanho das asas em Lepidoptera. O comprimento da asa dos lepidópteros está positivamente correlacionada com a fecundidade e a longevidade dos adultos (Van Dongen *et al.*, 1999). Também está positivamente correlacionada com capacidade de vôo (Dudley, 1990), e a capacidade de vôo pode ser importante na adaptação a determinadas condições ecológicas da paisagem (Hill *et al.*, 1999). A área da asa pode ser importante também na termoregulação (Wasserthal, 1975; Kingsolver, 1987). Portanto, um aumento proporcional na área da asa em *A. mincia*, especialmente da área escura, pode facilitar o aquecimento e acelerar o início das atividades pela manhã.

Por outro lado, caracteres quantitativos ligados às asas e à reprodução estão, com frequência, correlacionados negativamente (Zera & Denno, 1997). Um investimento proporcionalmente maior em área de asa, nas lagartas de *A. mincia* alimentadas com folhas de sombra, pode ter ocorrido em detrimento de outras estruturas.

Os resultados obtidos em relação aos adultos sugerem que avaliações restritas às fases larval e de pupa pode ser insuficiente para analisar o efeito dos tratamentos alimentares sobre as espécies de Lepidoptera.

O menor valor nutricional das folhas de sombra é coerente com as características ecológicas da erva-mate. Sendo esta planta adaptada a ambientes

florestais sombreados, espera-se que sua adaptação a estes ambientes inclua estratégias eficientes de defesa contra herbívoros. Por outro lado, estas defesas podem ser negativamente influenciadas quanto esta planta cresce em condições diferentes, como por exemplo em ambientes mais iluminados. Desta forma, os resultados obtidos contrastam com os resultados de estudos semelhantes realizados com plantas heliófilas (Hartley *et al.*, 1995; Guillet *et al.*, 1997; Jansen & Stamp, 1997; Crone & Jones, 1999) onde se observou um aumento da palatabilidade nas plantas mais sombreadas.

5.4.2. O efeito da adição de cafeína

Foi constatado um teor mais elevado de cafeína nas folhas de sombra. Quando estas folhas foram utilizadas na alimentação das larvas, observou-se uma diminuição na massa das pupas. Fenômeno semelhante ocorreu com a adição de cafeína nas folhas de sol. A adição de cafeína (8 mg/g de massa fresca) às folhas de sol diminuiu a massa das pupas. Este resultado sugere que a cafeína apresenta efeitos deletérios em *Adelpha mincia*.

Os resultados obtidos indicam que a cafeína, na condição de aleloquímico, pode ser importante na interação da planta com insetos herbívoros, mesmo com aqueles insetos especialistas em plantas que contém cafeína. Destaca-se que a população de *A. mincia* estudada só foi observada em *Ilex paraguariensis*, o que indica tratar-se de um inseto especialista, do ponto de vista nutricional.

A dieta com 25 mg/g de adição de cafeína apresentou uma mortalidade de 100 %. Esta adição corresponde a um teor de cafeína de 90 mg/g (massa seca), e está bem acima das médias verificadas para as diferentes populações de erva-mate já estudadas (Filip *et al.*, 1998; Reginatto *et al.*, 1999; Athayde, 2000; capítulos 1, 2 e 3 deste trabalho).

A produção e o armazenamento de substâncias do metabolismo secundário apresenta custos (Berenbaum & Zangerl, 1979; Vrieling & van Wijk, 1994), em parte devido a efeitos de auto-toxicidade (Chung *et al.*, 2000). Em função disso, é possível que teores muito elevados de cafeína não sejam favorecidos seletivamente, o que está de acordo com um modelo de seleção estabilizadora (Futuyma, 1993, pág. 163).

5.4.3. Preferência na oviposição

Os resultados de oviposição indicam que a população estudada de *A. mincia* apresenta uma preferência por plantas menos sombreadas, crescendo em ambientes abertos. Podemos considerar duas hipóteses (não-excludentes) para explicar isto:

1. Os adultos de *Adelpha mincia* são capazes de selecionar plantas com maior qualidade nutricional e/ou com menores teores de metilxantinas, considerando os resultados relativos ao desenvolvimento das larvas e à morfologia dos adultos;
2. Os adultos de *A. mincia* evitam ambientes sombreados, preferindo ambientes abertos, onde a predação pode ser menor. Em que pese o aposematismo¹¹ de *A. mincia*, aranhas do gênero *Nephila* não rejeitam esta espécie.

Em relação à primeira hipótese, Athayde *et al.* (2000) demonstraram que *I. paraguariensis* possui cafeína e teobromina na cutícula, e que a quantidade de cafeína cuticular está positivamente correlacionada com os teores foliares totais desta substância. Este fato pode facilitar a seleção de plantas pelos adultos de *A. mincia*, pressupondo que estes sejam capazes de avaliar a qualidade química das plantas, como já foi demonstrado para outros insetos (Swain, 1977; Schoonhoven, 1990; Glendinning, 1996).

¹¹ Coloração viva e chamativa de determinados insetos, em geral uma adaptação no sentido de sinalizar sua toxicidade e afugentar os predadores.

6.

Perfil quantitativo de saponinas em plantas de erva-mate do Mato Grosso do Sul

6.1. Introdução

As saponinas da erva-mate são glicosídeos de ácido ursólico e de ácido oleanólico, e os açúcares presentes são arabinose, glicose e ramnose. Foram registradas saponinas bidesmosídicas e monodesmosídicas para a erva-mate. (Gossmann *et al.*, 1989; Gossmann *et al.*, 1995; Kraemer *et al.*, 1996; Schenkel *et al.*, 1996).

As saponinas do mate podem resultar em efeitos fisiológicos benéficos aos consumidores. Entre estes efeitos está a capacidade de aumentar a oxidação dos lipídios, o que pode levar à redução do peso corporal (Martinet *et al.*, 1999).

Sob o ponto de vista ecológico, saponinas podem ser importantes para as plantas no sentido de evitar ou diminuir a herbivoria por parte dos insetos (Numata *et al.*, 1987; Potter & Kimmerer, 1989; Gershenzon & Croteau, 1991; Slansky Jr., 1991; Nozzolillo *et al.*, 1997), ou ainda produzir efeitos alelopáticos (Hoagland *et al.*, 1996).

Folhas jovens de *Ilex opaca* Ait. apresentam alta concentração de saponinas (média de 125 mg/g), o que pode representar uma defesa contra certos herbívoros (Barbosa *et al.*, 1990). Duas saponinas de *Ilex rotunda* Thunb., o pedunculósídeo e o rotungenosídeo, apresentam propriedades deterrentes em relação a *Spodoptera litura*

Fab. (Orthoptera), em concentrações de 2 mg/g (Nakatani *et al.*, 1989). O pedunculósídeo é uma saponina também registrada para *Ilex taubertiana* Loes. (Taketa & Schenkel, 1995), planta que ocorre no sul do Brasil. Esta saponina apresenta elevado amargor (Taketa *et al.*, 1998).

Em que pese a possível importância ecológica, fisiológica e farmacológica das saponinas da erva-mate e outras espécies de *Ilex* da América do Sul, não há resultados quantitativos detalhados sobre estas substâncias, com exceção do trabalho de Athayde (2000), que comparou populações de *I. paraguariensis* utilizando um método semi-quantitativo através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

Saponinas têm sido quantificadas por CCD e por CLAE. Diferentes tipos de colunas e eluentes são utilizados, em sistemas isocráticos ou em gradiente (Vidal-Olivier *et al.*, 1989; Kensil *et al.*, 1991; Asaka *et al.*, 1994; Ndamba *et al.*, 1994; Hostettmann & Marston, 1995; Saeki *et al.*, 1999; Reginatto, 2000; San Martin & Briones, 2000).

Os objetivos do presente capítulo foram desenvolver um método para a quantificação de saponinas e descrever o perfil quantitativo de saponinas bidesmosídicas de uma população de erva-mate do Mato Grosso do Sul. Athayde (2000) demonstrou que esta população apresentava teores mais elevados de saponinas, em relação às outras populações de erva-mate do Brasil. Em função da maior concentração de saponinas, esta população foi escolhida para o desenvolvimento de uma metodologia quantitativa.

Adicionalmente, foram incluídas duas plantas de Ijuí-RS, utilizadas em testes de herbivoria (capítulo 5), como um parâmetro de comparação.

6.2. Material e Métodos

6.2.1. Material vegetal e extração

As folhas foram coletadas nos municípios de Tacuru (23° 44' S, 54° 49' W) e Iguatemi (23° 40' S, 54° 28' W), Mato Grosso do Sul (mapa da figura 2.1, página 43), em fevereiro de 1997, de plantas numeradas *in situ* para estudos multidisciplinares. As plantas 10, 11 e 12 são de Tacuru e as plantas 1, 2, 26, 27, 31, 35, 40 e 47 foram coletadas em Iguatemi. Material botânico testemunho foi depositado no herbário ICN. Todas as plantas analisadas pertencem à variedade paraguariensis (*Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*).

As populações de erva-mate analisadas estavam sob exploração econômica, de tal forma que a floresta nativa original foi suprimida, e as plantas de erva-mate permaneceram. Desta forma, as plantas amostradas não sofriam nenhum tipo de sombreamento. As plantas de Ijuí incluídas neste estudo estavam em duas condições lumínicas. Uma, denominada Ijuí Sol, crescia sem sombreamento. A outra, denominada Ijuí Sombra, crescia sob sombreamento natural de outras árvores, de tal forma que a luminosidade medida com um luxímetro correspondeu a 4% da luminosidade plena (mais detalhes no capítulo 5). Estas mesmas plantas foram utilizadas para alimentar os insetos nos testes do capítulo 5.

As folhas colhidas no Mato Grosso do Sul foram mantidas em temperatura ambiente por sete dias, e posteriormente desidratadas em estufa com ventilação forçada a 40 °C por 48 horas. As folhas das plantas coletadas em Ijuí-RS, em fevereiro de 2001, foram desidratadas em estufa com ventilação forçada a 40 °C por 48 horas.

Foram analisadas somente folhas plenamente expandidas. Após a trituração, o material fragmentado foi selecionado através de um tamis com aberturas de malha de 1,25 mm, desprezando-se os fragmentos maiores.

A extração foi feita por decocção durante 20 min, com 2,0 g de material vegetal para 100 ml de água destilada. O decocto foi filtrado, liofilizado e posteriormente retomado em 10 ml de fase móvel para a análise em CLAE.

6.2.2. Métodos cromatográficos e validação

Condições de análise em CCD: utilizou-se um sistema eluente com clorofórmio:metanol:água 100:40:5 (v/v), em cromatofolhas de alumínio com fase estacionária de gel de sílica, e revelação foi feita com anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento. A leitura foi realizada em luz UV (365 nm). A identificação das saponinas foi feita através do uso de amostras de referência de matessaponinas 1 e 3, previamente analisadas através de métodos espectroscópicos (Gosmann *et al.*, 1989; Gosmann *et al.*, 1995, Kraemer *et al.*, 1996). A identificação das matessaponinas restantes foi realizada de acordo com os resultados obtidos por Schenkel *et al.* (1996).

Condições cromatográficas em CLAE: as amostras foram injetadas em cromatógrafo líquido Shimadzu LC-10, com uma válvula de injeção de 20 µl. A detecção foi realizada através de índice de refração (Shimadzu RI-10). A fase estacionária foi Licrospher[®] RP C-8 (125 x 3,9 mm D. I., 5 µm). A fase móvel utilizada foi constituída por um sistema isocrático composto pela mistura de AcN:MeOH:H₂O (31:3:67, v/v) a um fluxo de 1,1 ml/min e à temperatura de 30°C, obtida através de um forno Shimadzu.

Validação (Swartz & Krull, 1997): a curva de calibração foi obtida através de cinco diferentes concentrações de matessaponina 1 (102,5 a 854 µg/ml) e matessaponina 3 (103 a 515 µg/ml), diluídas na fase móvel utilizada em CLAE. A precisão intermediária foi avaliada através de uma amostragem em três diferentes dias com as cinco diferentes concentrações da curva de calibração, para cada uma das saponinas. Todos os procedimentos foram feitos em triplicata. O coeficiente de variação em cada triplicata foi menor que 5%.

A identificação dos picos e a validação foi realizada com saponinas de referência, correspondentes às matessaponinas 1, 2, 3 e 4, previamente isoladas e analisadas através de métodos espectroscópicos (Gosmann *et al.*, 1989; Gosmann *et al.*, 1995, Kraemer *et al.*, 1996). Estas amostras foram cromatografadas em CLAE isoladamente ou adicionadas a determinadas amostras.

A quantificação das matessaponinas 1 e 3 nas amostras foi realizada pela medida da área dos picos correspondentes, e por comparação com as respectivas curvas de calibração. Os teores da saponina 2 foram expressos em teores de matessaponina 3.

A análise de correlação entre os teores das diferentes substâncias analisadas foi realizada de acordo com Spiegel (1993). Para a verificação do melhor ajustamento entre as variáveis, foram comparadas as equações de reta exponencial ($y = ab^x$), potência ($y=ax^b$), logarítmica [$y=a+b(\ln x)$], e linear ($y = a + bx$).

6.3. Resultados

6.3.1. Validação

As curvas de calibração apresentaram $r^2=0,9962$ ($y=28.260 + 1.025,2x$) para a matessaponina 1 e $r^2= 0,9995$ ($y=13.267+774,19x$) para a matessaponina 3 (figuras 6.1 e 6.2).

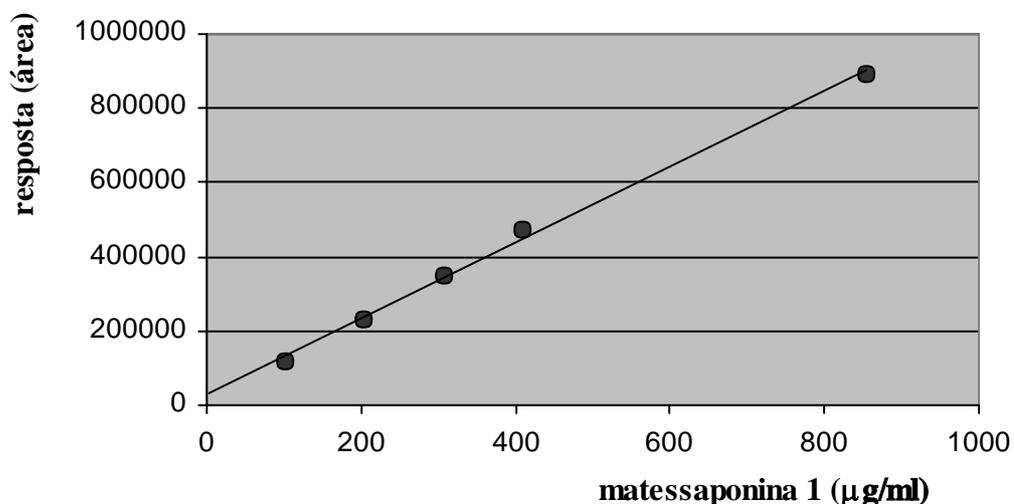


Figura 6.1. Curva de calibração de matessaponina 1; $r^2= 0,9962$, $y=28.260+1.025,2x$.

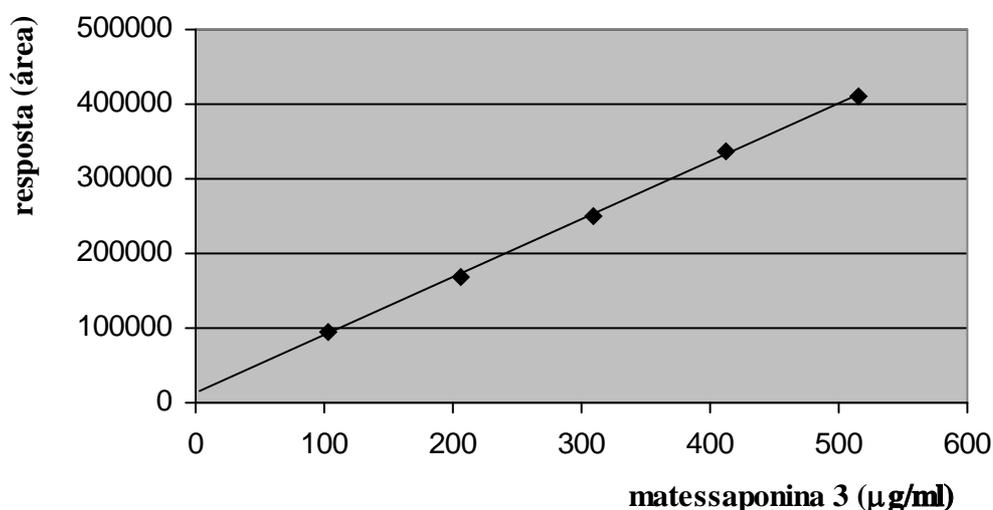


Figura 6.2. Curva de calibração de matessaponina 3; $r^2 = 0,9995$, $y = 13.267 + 774,19x$.

O coeficiente de variação durante um dia foi de 4,70 e 6,61 % para matessaponina 1 e matessaponina 3, respectivamente. A estimativa da precisão intermediária apresentou coeficientes de variação de 6,77 e 7,79 % para matessaponina 1 e matessaponina 3, respectivamente.

A matessaponina 1 apresentou um tempo de retenção entre 15 e 16,5 min e matessaponina 3 entre 4,5 e 5,5 min.

6.3.2. Análise cromatográfica

A figura 6.3 mostra cromatogramas referentes às amostras do Mato Grosso do Sul (10 e 47), e uma amostra de Ijuí-RS. Verifica-se a predominância de matessaponinas 1, 2 e 3.

A figura 6.4 mostra um cromatograma em camada delgada dos extratos das amostras do Mato Grosso do Sul e de Ijuí. Este cromatograma confirma a predominância de matessaponinas 1 e 2. Verifica-se também a presença de matessaponina 3 e de matessaponinas da série J, acima da matessaponina 1.

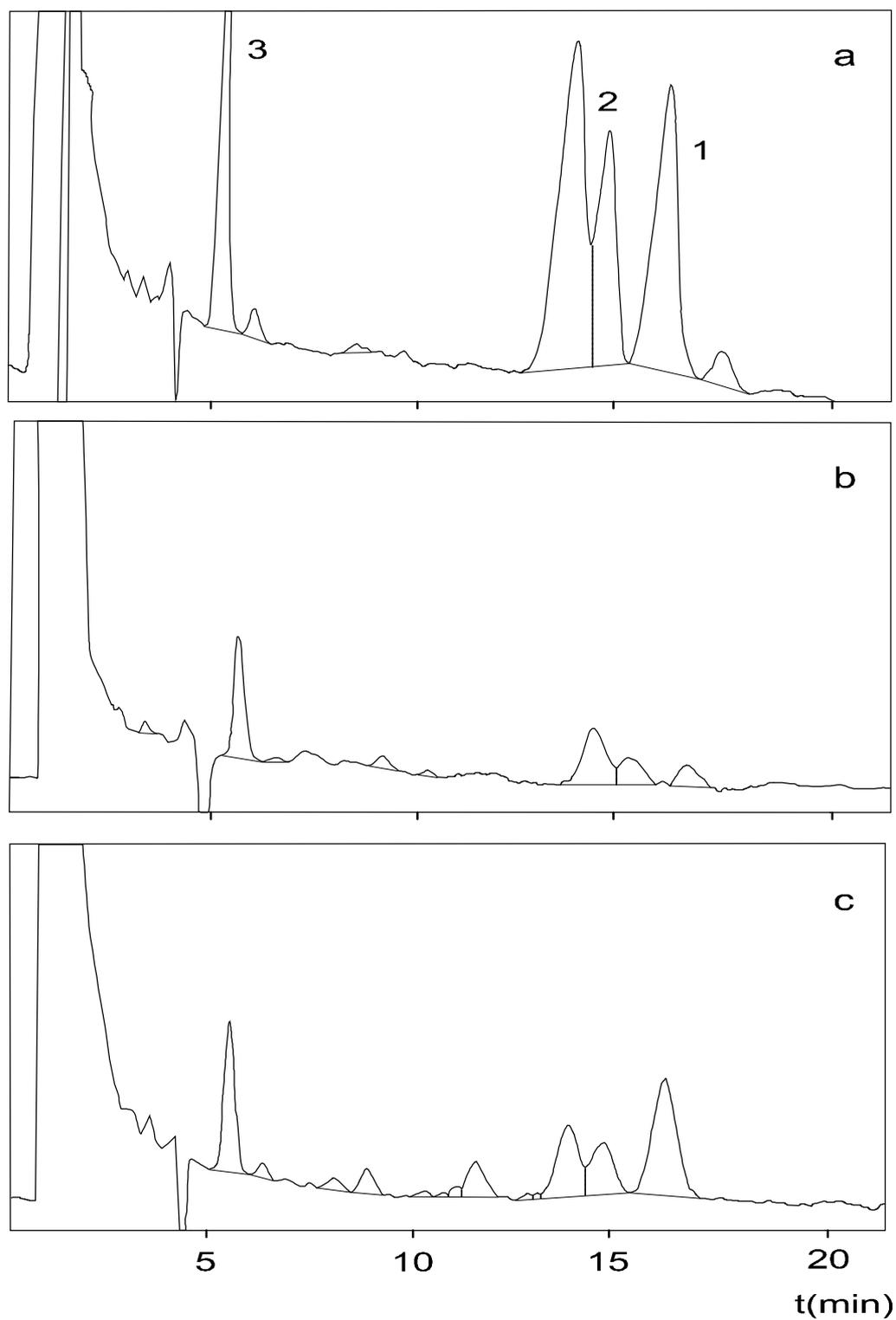


Figura 6.3. Cromatogramas de saponinas em diferentes amostras de *Ilex paraguariensis*, coluna C-8 Licrospher Merck®, eluente AcN:MeOH:H₂O, 31:3:67, v/v, fluxo de 1,1 ml/min; a= amostra nº 47 (Iguatemi-MS), b=amostra nº 10 (Tacuru-MS), c= amostra de Ijuí-RS, planta de sol. os números 1 a 3 indicam as respectivas matessaponinas.

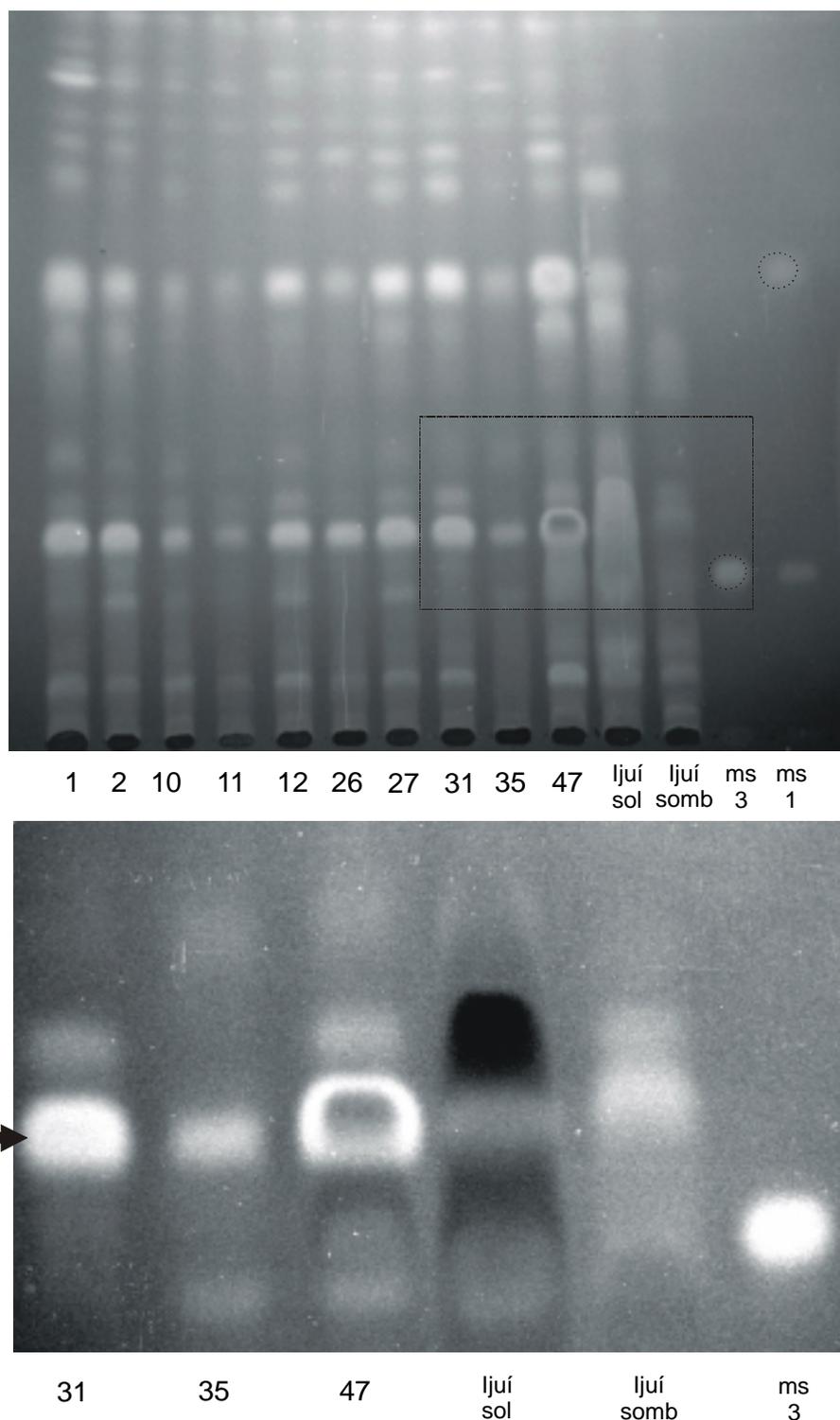


Figura 6.4. Cromatograma em camada delgada de extratos de amostras de erva-mate, sob luz ultravioleta (365 nm), eluente clorofórmio:metanol:água 100:40:5 (v/v), fase estacionária gel de sílica. Aspecto geral acima e detalhe abaixo. Os números indicam amostras do Mato Grosso do Sul; estão incluídas também as duas amostras de Ijuí-RS e amostras autênticas de matessaponinas 1 e 3 (ms 1 e ms 3, respectivamente). O detalhe abaixo corresponde à área pontilhada acima. A seta indica a posição da matessaponina 2.

A tabela 6.1. mostra a concentração das matessaponinas 1, 2 e 3 nas plantas analisadas. Dados de metilxantinas para as plantas do Mato Grosso do Sul, obtidos por Athayde (2000), foram incluídos para as análises de correlação.

Tabela 6.1. Concentração de matessaponinas 1, 2 e 3 e metilxantinas em plantas de erva-mate do Mato Grosso do Sul e de Ijuí (mg/g). Os dados de saponinas são a média da triplicata.

amostras	matessaponinas			soma	cafeína*	teobromina*
	1	2	3	(1+2+3)		
1	1,17	2,92	0,68	4,77	2,7	0,5
2	1,27	2,89	0,72	4,88	2,8	0,13
10	0,39	1,94	1,32	3,65	3,5	0,83
11	N. Q.	N. Q.	N. Q.		2,8	0,34
12	N. Q.	0,56	0,33		-	-
26	0,95	3,28	0,46	4,69	2,8	0,56
27	2,33	5,10	0,67	8,1	3,2	0,14
31	1,06	4,66	0,77	6,49	-	-
35	2,85	6,21	0,97	10,03	2,8	0,14
40	0,74	1,19	N. Q.		3,6	0,21
47	6,01	12,76	3,45	22,22	2,4	0,9
Ijuí sol	2,53	2,79	1,64	6,96		
Ijuí sombra	N. Q.	N. Q.	1,19			

* os dados de cafeína e teobromina das amostras do Mato Grosso do Sul foram obtidos de Athayde (2000)
N. Q. = concentração abaixo do limite de quantificação (0,2 mg/g)

O teor de matessaponinas é bastante variável de planta para planta. Entre as amostras do Mato Grosso do Sul nas quais a matessaponina 1 foi quantificável (tabela 6.1), o teor desta saponina variou entre 0,39 e 6,01 mg/g (média de 1,86 mg/g).

Paralelamente, o teor de matessaponina 3 variou entre 0,33 e 3,45 (média de 1,04 mg/g) e a matessaponina 2 apresentou concentrações de 0,56 a 12,76 mg/g (média de 4,15 mg/g). Para esta última saponina, os teores são expressos em equivalentes de matessaponina 3.

Duas amostras provenientes do Mato Grosso do Sul apresentaram teores de matessaponina 1 menores que 0,2 mg/g, sendo portanto não quantificáveis. O mesmo ocorreu para matessaponina 3.

Com exceção da planta de Ijuí crescida à sombra, todas as outras amostras apresentaram teores de matessaponina 2 mais elevados que os teores de matessaponina 1 e matessaponina 3 (tabela 6.1).

6.3.3. *Análise de correlação*

Na análise de correlação entre as variáveis, foram incluídas as amostras do Mato Grosso do Sul para as quais há dados de concentração de metilxantinas e, concomitantemente, os teores de saponinas são quantificáveis (cf. tabela 6.1). A amostra 40 foi incluída, assumindo-se o valor obtido de 0,04 mg/g para a matessaponina 3. Este resultado representa a média de uma triplicata que apresentou um CV% = 19,22. Desta maneira, na tabela 6.1 considerou-se que a concentração da matessaponina 3 na amostra 40 estava abaixo do limite de quantificação.

Verificou-se uma correlação inversa entre teores de cafeína e matessaponina 1 (figura 6.5), entre os teores de cafeína e matessaponina 2 (figura 6.6). Entre as diferentes equações comparadas, verificou-se que o melhor ajustamento é dado pela função potência ($y = ax^b$).

A semelhança da correlação entre matessaponina 1 e cafeína, e a correlação entre a matessaponina 2 e cafeína, é explicada pela alta correlação ($r^2 = 0,981$) entre os teores de matessaponina 1 e matessaponina 2, definida pela equação linear $y = 2,0015x$

+ 0,6059, onde y representa os teores de matessaponina 2 e x os teores de matessaponina 1.

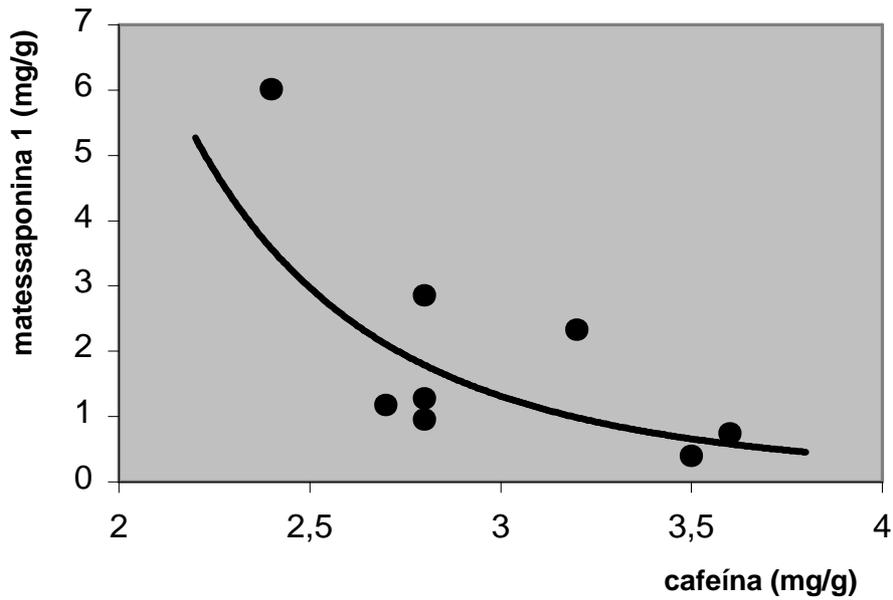


Figura 6.5. Correlação entre matessaponina 1 e cafeína para as amostras de plantas de erva-mate do Mato Grosso do Sul, $n=8$, $y=180,14x^{-4,479}$, $r^2 = 0,526$, $P < 0,05$.

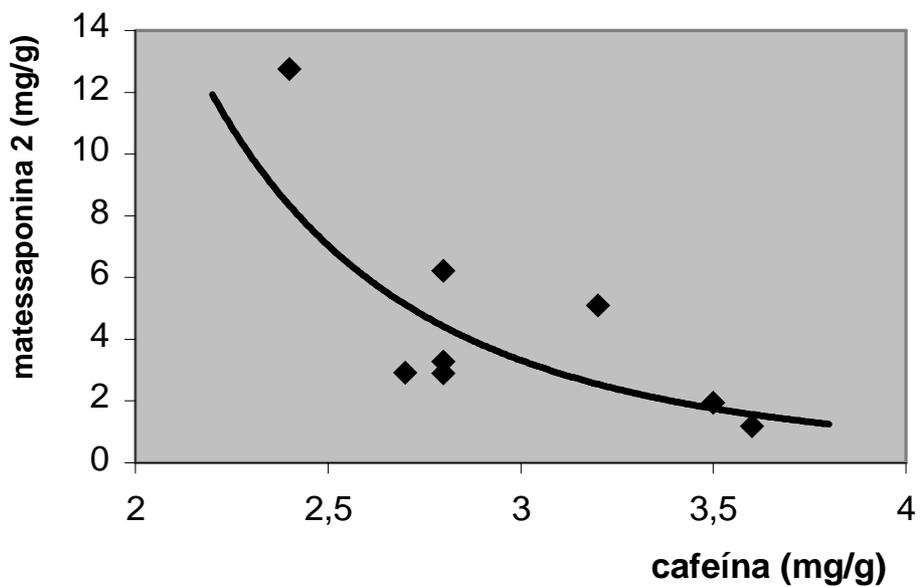


Figura 6.6. Correlação entre matessaponina 2 e cafeína para as amostras de plantas de erva-mate do Mato Grosso do Sul, $n=8$, $y=307,17x^{-4,12}$, $r^2 = 0,611$, $P < 0,05$.

Além das correlações acima, foram testadas as correlações entre cafeína e matessaponina 3, entre cafeína e matessaponina 1+3, e a correlação entre cafeína mais teobromina e matessaponinas 1+3. Houve também uma tendência de correlação negativa, e os coeficientes de determinação foram de 0,31, 0,41, e 0,07, respectivamente. Entretanto, nenhuma delas é significativa para $\alpha=0,05$.

6.4. Discussão

O método se mostrou eficaz para a quantificação das matessaponinas 1 e 3. Quanto à matessaponina 2, observa-se a formação de dois picos, possivelmente relacionados aos dois isômeros, visto que a amostra utilizada em estudos espectroscópicos (Gosmann *et al.*, 1995) também apresenta os mesmos picos. As saponinas da erva-mate são uma mistura de isômeros cujas agliconas são ácido ursólico e oleanólico (Schenkel *et al.*, 1996; Martinet *et al.*, 2001). Uma separação completa dos isômeros não foi obtida até o momento através de CLAE, dada sua dificuldade (Martinet *et al.*, 2001).

Os dados sugerem que as matessaponinas 1 e 2 são as saponinas majoritárias no decocto aquoso de *Ilex paraguariensis* provenientes do Mato Grosso do Sul. Resultados semelhante ocorreu em uma das duas plantas de Ijuí, Rio Grande do Sul. De acordo com a cromatografia em camada delgada, as saponinas da série J, na sua maioria monodesmosídicas, também estão presentes, fato que já havia sido observado por Athayde (2000). Este resultado contraria as conclusões de Martinet *et al.* (2001), que não detectaram as saponinas J1 e J2 no decocto aquoso. Isto indica que estas saponinas também são ingeridas, em alguma medida, pelos consumidores dos produtos da erva-mate.

A grande variabilidade intra-populacional sugere que há amplas possibilidades de seleção genética para a produção de matessaponinas. Considerando a importância nutricional e fisiológica das saponinas, reveladas por estudos recentes (Ferreira *et al.*,

1997; Martinet *et al.*, 1999), esta perspectiva torna-se interessante no sentido de possibilitar a produção de matéria-prima diferenciada.

O teor de máximo de matessaponinas 1, 2 e 3 chega a cerca de 22 mg/g. Este valor é bastante inferior a relatos anteriores, que indicam que a concentração de saponinas totais é da ordem de 100 mg/g (Schenkel *et al.*, 1996). Esta diferença pode ocorrer em função de metodologias diferentes de extração ou de quantificação, visto que os autores citados realizaram uma avaliação gravimétrica. Por outro lado, mesmo considerando que outros métodos de extração sejam mais eficientes que o utilizado neste trabalho (p. ex extração hidroetanólica), a extração aquosa por decocção é interessante na medida em que se assemelha mais às formas de consumo dos produtos da erva-mate, em especial chás e chimarrão.

As correlações negativas entre cafeína e matessaponina 1, e entre cafeína e matessaponina 2, revelam a necessidade de maiores estudos neste sentido. Em que pese a ausência de significância estatística nas outras correlações estudadas, verifica-se a mesma tendência geral de correlações negativas entre metilxantinas e saponinas.

7.

Diversidade populacional da morfologia foliar em erva-mate

7.1. Introdução

A erva-mate é uma planta umbrófila (Coelho, 1995; Carpanezzi, 1995; Coelho & Mariath, 1996) das florestas do sul do Brasil, Argentina e Uruguai (Giberti, 1995). Suas folhas e ramos são utilizados para a fabricação de chás e bebidas, se constituindo em uma atividade econômica importante.

As folhas são uma interface importante entre o vegetal e os fatores ambientais. Alguns caracteres morfológicos, por exemplo área e espessura, são fortemente modificados pelas condições ecológicas. Modificações nas características das folhas podem se constituir em respostas adaptativas a estes fatores ambientais, por exemplo intensidade da luz e disponibilidade de água (Groom & Lamont, 1997).

Como parte de um programa de pesquisa sobre a auto ecologia e a variabilidade populacional da erva-mate (Winge *et al.*, 1995; Coelho & Mariath, 1996), objetivou-se verificar a influência da origem geográfica na morfologia das folhas desta espécie. Foram incluídas neste estudo plantas de três diferentes populações nativas do Brasil. Estas populações estavam sob exploração econômica, de tal forma que a floresta

nativa original foi suprimida, e as plantas de erva-mate permaneceram. O manejo das plantas pode ser considerado muito semelhante, permitindo um estudo comparativo.

7.2. Material e Métodos

Foram comparadas plantas de três populações de erva-mate (tabela 7.1) do Mato Grosso do Sul (MS), Paraná (PR) e Santa Catarina (SC). Todas as plantas das diferentes populações são originárias da floresta nativa, a qual foi retirada na sua quase totalidade, restando apenas a erva-mate no estrato arbóreo. Posteriormente, estas plantas foram submetidas ao extrativismo, porém as plantas incluídas no estudo não tinham sido podadas há pelo menos 2 anos. As plantas foram numeradas para estudos multidisciplinares, e foram identificadas pelo autor. Amostras testemunha foram depositadas no herbário ICN (UFRGS, Porto Alegre-RS). Foram coletadas folhas do 5º ao 8º nó, sem danos evidentes por herbívoros e patógenos, a uma altura de cerca de 2 m do solo, em todos os quadrantes. Foram analisadas 7 folhas de cada planta e 9 plantas de cada população.

Tabela 7.1. Plantas de cada população e local, que foram incluídas neste estudo. A numeração serve como referência para outros estudos realizados de forma multidisciplinar (Projeto Erva-mate UFRGS/FEPAGRO/UNIJUÍ/Pref. Municipal de Ilópolis)

Estado	Plantas	Localidade	Coordenadas
MS	05, 09, 15, 27, 42, 49, 253, 267, 268	Iguatemi	23° 40' S, 54° 28' W
		Tacuru	23° 44' S, 54° 49' W
PR	51, 64, 91, 280, 285, 289, 290, 296, 299	Pinhão	25° 20' S, 51° 11' W
			25° 26' S, 51° 31' W
SC	105, 108, 129, 130, 143, 302, 303, 307, 308	Catanduvás	27° 03' S, 51° 40' W

Imagens digitais foram obtidas através de um Scanner, e a análise das imagens foi realizada através do aplicativo Somnium 1.0 (Laboratório de Anatomia Vegetal, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brasil). Os dados morfológicos obtidos foram área (A), perímetro (P),

comprimento (c), largura máxima (l), distância entre a base e a largura máxima (dl) e o ângulo basal (bâ).

Posteriormente, calculou-se os seguintes índices:

Distância relativa da largura máxima $O = dl/c$

Razão comprimento /largura $LWR = c / l$

Perímetro relativo $RP = P / (c + l)$

Índice de área retangular $RAI = A / (c \times l)$

Adicionalmente, a biomassa da lâmina foi obtida através de uma balança semi-analítica, permitindo o cálculo da massa foliar específica ($LMA = m/A$).

Populações e plantas foram comparadas através de uma Análise de Variância Hierárquica, para cada parâmetro e índice.

A significância da correlação entre bâ e RAI foi testada através de uma Análise de Variância (Zar, 1999).

7.3. Resultados

Os valores médios observados em cada população, para os diferentes parâmetros e índices, são mostrados na tabela 7.2. A população do Mato Grosso do Sul apresentou os menores valores de comprimento, largura e área. Por outro lado, esta população apresentou os valores mais altos de massa foliar específica (LMA).

Tabela 7.2. valores médios (acima) e extremos (entre parêntesis, abaixo) dos diferentes parâmetros e índices morfológicos das três diferentes populações de erva-mate, Mato Grosso do Sul (MS), Paraná (PR), e Santa Catarina (SC); diferenças significativas são indicadas por um asterisco ($\alpha = 0,05$, ANOVA hierárquica), médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes segundo um teste de Tukey.

parâmetro/ índice	populações			significância	
	MS	PR	SC	entre populações	entre plantas
c (cm)	6,37 a (4,91 - 7,59)	7,92 b (6,54 - 10,29)	7,83 b (6,41 - 10,89)	*	*
l (cm)	2,99 a (2,54 - 3,32)	3,55 b (2,99 - 4,07)	3,66 b (2,89 - 4,86)	*	*
A (cm ²)	13,17 a (8,56 - 17,09)	19,47 b (15,07 - 26,00)	19,41 b (12,39 - 35,15)	*	*
LMA (mg/cm ²)	16,49 a (13,86 - 20,49)	13,96 b (11,38 - 16,10)	14,29 a (10,88 - 18,81)	*	*
dl / c	0,611 a (0,554 - 0,644)	0,625 a (0,564 - 0,662)	0,632 a (0,591 - 0,660)	n. s.	n. s.
c / l	2,08 a (1,62 - 2,63)	2,27 a (2,07 - 2,28)	2,15 a (2,05 - 2,25)	n. s.	n. s.
RP	2,09 a (2,05 - 2,12)	2,12 a (2,07 - 2,28)	2,15 a (2,05 - 2,25)	n. s.	n. s.
RAI	0,685 a (0,663 - 0,698)	0,687 a (0,663 - 0,717)	0,654 b (0,635 - 0,676)	*	n. s.
ângulo basal	60,93 a (49,20 - 71,69)	59,84 a (47,80 - 80,64)	54,20 a (43,44 - 63,83)	n. s.	*

Os valores observados e sua amplitude estão de acordo com os valores reportados por Mutinelli (1990), que apresentou uma revisão sobre trabalhos anteriores na morfologia quantitativa de *I. paraguariensis*. A única discordância ocorreu no valor mínimo da razão c/l da população de Mato Grosso do Sul, que está abaixo dos valores mínimos reportados pelo referido autor.

Entre os índices, somente foram observadas diferenças entre populações no que se refere ao Índice de Área Retangular (RAI). Não foram detectadas diferenças entre

plantas dentro de cada população, o que reforça a importância do índice na diferenciação entre populações.

Para investigar as causas do menor valor médio de RAI da população de Santa Catarina, o ângulo basal das folhas também foi medido (tabela 7.2), considerando a hipótese de que a redução no ângulo basal (sem mudanças no comprimento e na largura) poderia gerar uma redução no RAI. De fato, a população de Santa Catarina apresentou um valor médio menor de ângulo basal, muito embora não foi detectada diferença significativa entre as populações (tabela 7.2). A alta variação entre plantas contribuiu neste sentido. Por outro lado, verificou-se a existência de uma correlação positiva entre RAI e ângulo basal (figura 7.1). Considerando o baixo valor de r^2 (0,365), é possível que outros fatores tenham também contribuído para reduzir o RAI.

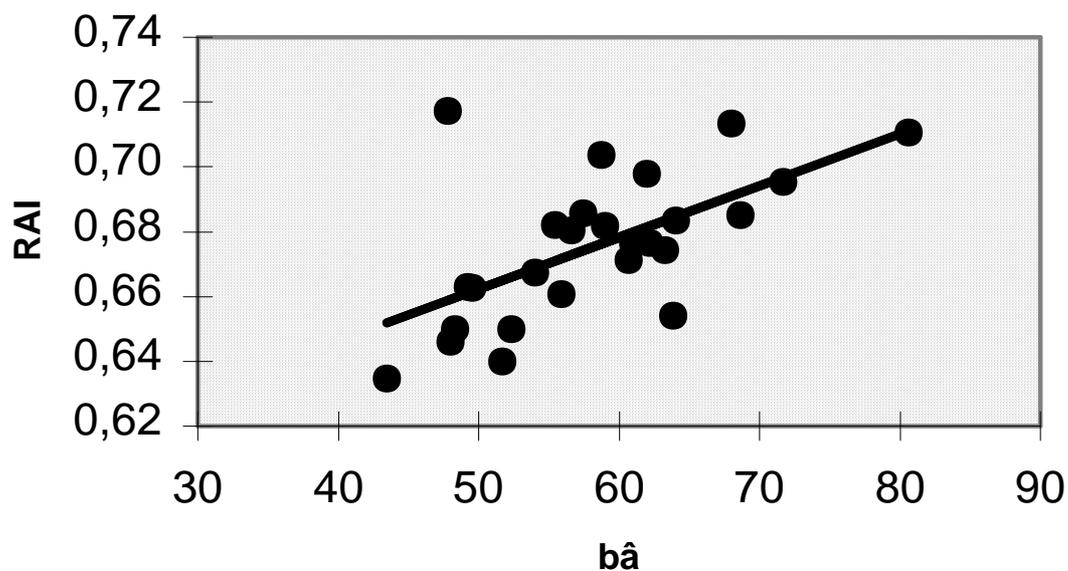


Figura 7.1. Relação entre RAI e ângulo basal (bâ) em folhas de plantas de erva-mate de diferentes populações, analisadas em conjunto; $r^2= 0,365$, $y= 0,5829 + 0,00159x$, $P < 0,01$ (ANOVA).

Imagens digitais virtuais de folhas foram geradas (figura 7.2) através do uso dos valores médios de comprimento, largura, ângulo basal e distância da largura máxima em relação à base, de cada população.

O RAI obtido através desta simulação é apresentado na tabela 7.3.

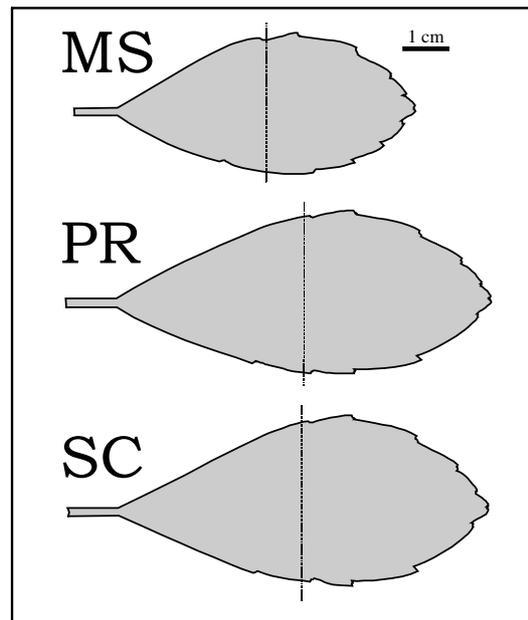


Figura 7.2. Folhas virtuais geradas de acordo com os valores médios de comprimento, largura, distância da largura máxima até a base e ângulo basal, para cada população. A linha pontilhada divide a lâmina na metade do comprimento.

A população de Santa Catarina apresentou um RAI virtual 2,71 % inferior em relação ao RAI virtual da população do Paraná. A diferença original foi de 4,83 %. Este resultado virtual parece indicar também a existência de outros fatores que interferem no RAI, além do ângulo basal. Adicionalmente, observa-se uma menor proporção da área da metade basal da lâmina (ou um aumento da área da metade apical) na folha virtual correspondente à população de Santa Catarina (tabela 7.3). Destaca-se que as populações de Mato Grosso do Sul e Paraná apresentaram valores virtuais de proporção da área na metade basal idênticos. Este resultado virtual enfatiza a semelhança entre as duas populações no que se refere à morfologia, em que pese as diferenças quantitativas de comprimento, largura e área (tabela 7.2).

Tabela 7.3. Área, RAI e a proporção da área da metade basal em relação à área total (%hba), obtida através da simulação de folhas virtuais com os valores médios de c, l, dl e âb, para cada população.

	valores originais		valores calculados		
	c	l	A	RAI	%hba
MS	6,37	2,99	11,71	0,616	43,19
PR	7,92	3,55	17,06	0,607	43,19
SC	7,83	3,66	16,92	0,591	40,79

7.4. Discussão

Para plantas da mesma espécie, geralmente valores mais altos de massa foliar específica estão relacionados a intensidades maiores de luz (Osunkoya & Ash, 1991; Mulkey *et al.*, 1993; Kitajima, 1994; Muraoka *et al.*, 1997). Esta resposta está relacionada ao aumento da espessura dos tecidos da folha (Hanson, 1917), especialmente o parênquima paliçádico (Fretz & Dunham, 1972). A massa foliar específica aumenta linearmente com um aumento da luminosidade relativa e portanto pode ser considerado um indicador biológico, específico para cada espécie, das condições de luminosidade a longo prazo (Niinemets, 1997). Disponibilidade de água pode contribuir para a redução da massa foliar específica no caso de muitas espécies (Groom & Lamont, 1997), porém em outros não foram observadas diferenças (Mulkey *et al.*, 1993).

A área foliar apresenta uma correlação negativa com a intensidade da luz, quando se compara plantas da mesma população ou folhas da mesma planta (Crawley, 1997; Kozlowsky & Pallardy, 1997). Considerando que o manejo das diferentes populações pode ser considerado muito semelhante, a área menor das folhas de plantas oriundas do Mato Grosso do Sul indicam uma condição climática diferenciada.

Os índices utilizados são relacionados à morfologia. Por exemplo, dl/c é uma medida de quanto uma folha é obovada (divergindo da forma elíptica). Na comparação

de plantas e populações, foi observada uma diferença somente no índice RAI. Isto sugere que *Ilex paraguariensis* podem apresentar mudanças em suas dimensões (largura, comprimento, área) com modificações menos acentuadas na forma. Os parâmetros de forma tendem a apresentar menor plasticidade genética (Smith & Hake, 1994). Por outro lado, essa menor plasticidade enfatiza a importância da diferença encontrada na população de Santa Catarina do índice RAI. O menor valor de RAI é parcialmente causado por um menor valor do ângulo basal. Decréscimo do ângulo basal pode aumentar a proporção da área laminar na metade apical, ampliando a exposição à luz. Esta modificação morfológica poderia ser uma resposta adaptativa a um ambiente mais sombreado. Em oposição, um aumento do ângulo basal poderia ser uma resposta a ambientes com uma intensidade luminosa maior, ou uma limitação da fotossíntese de caráter edáfico. Este aumento geraria um efeito mais acentuado de auto-sombreamento, visto que maior proporção de área laminar estaria na metade basal da folha.

Deve-se ressaltar a importância das diferenças populacionais aqui relatadas para a *I. paraguariensis*, considerando a alta diversidade intrapopulacional desta espécie (Winge *et al.*, 1995). Novos experimentos estão sendo conduzidos para verificar a plasticidade das plantas da mesma população, ou seja, em que medida essas plantas são capazes de modificar sua morfologia quando submetidas à variações ambientais (Coelho *et al.*, 2000; capítulo 8).

8.

Sobrevivência e morfologia de mudas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) em diferentes graus de sombreamento

8.1. Introdução

A erva-mate é uma cultura economicamente importante no sul do Brasil (Tormen, 1995), nordeste da Argentina (Artaza, 1995) e Paraguai. Em que pese o baixo nível tecnológico empregado, a cultura pode resultar em renda significativa nas pequenas propriedades do sul do Brasil (Mosele *et al.*, 2000).

Apesar da importância econômica que a cultura tem adquirido no sul do Brasil, a pesquisa sobre sua biologia, ecologia e cultivo estão sendo incrementadas apenas recentemente. Já foi prática usual, no Brasil, a derrubada de matas e ervais (populações naturais de erva-mate com manejo semi-extrativista, eventualmente com adensamento) para plantio de lavouras, especialmente de soja e trigo, não só no Rio Grande do Sul, mas também no Mato Grosso do Sul (Tormen, 1995). Este processo foi mais intenso entre as décadas de 50 e 70, com grande incentivos das entidades governamentais e outras instituições de extensão e fomento. Hoje, com a escassez do produto, a erva-mate vem se mantendo há vários anos como um produto economicamente mais rentável que a lavoura que a substituiu parcialmente. Entretanto, as dificuldades de

plantio, onde se observa altas taxas de mortalidade nos primeiros dois anos e até depois, desestimulam os agricultores.

A erva-mate é considerada uma umbrófito (Floss, 1994; Carpanezzi, 1995; Coelho, 1995; Coelho & Mariath, 1996). Na natureza, alcança grandes densidades no sub-bosque, o que é típico de espécies arbóreas umbrófitas ou “reprodutoras à sombra” (*sensu* Kageyama & Viana, 1989). As altas densidades naturais favoreceram as formas de manejo mais antigas, ou seja, retirada total ou parcial do resto da mata, permanecendo a erva-mate. Por outro lado, espécies evoluídas como umbrófitas, quando expostas à grandes intensidades de luz, ficam sujeitas a estresses fisiológicos que as torna mais suscetíveis às doenças e mais frágeis ao ataque de insetos e outros animais herbívoros (Carpanezzi, 1995). Desta forma, a alta mortalidade observada nos primeiros anos em mudas é explicada pela posição desta espécie na sucessão florestal.

Este trabalho buscou simular diferentes intensidade de luz natural, através de tela sombrite, a fim de observar as respostas da erva-mate nas fases iniciais de crescimento.

8.2. Material e Métodos

Os experimentos foram instalados a campo na Estação Florestal e Experimental do IBAMA, na localidade de Alto da União, Ijuí-RS.

As mudas foram produzidas a partir de sementes oriundas de três populações diferentes: Miraguaí Reserva e Miraguaí Zamborski do Município de Miraguaí-RS, e Ijuí Alto da União, do município de Ijuí-RS. Cada matriz fornecedora de sementes originou uma progênie meio-irmã, considerando-se que *I. paraguariensis* é uma planta dióica. Foram utilizadas 3 progênies meio-irmãs de Miraguaí Reserva (M1, M2 e M3), uma de Ijuí (I) e uma de Miraguaí Zamborski (Z), totalizando 5 progênies. Foram plantadas 15 mudas de cada progênie em cada tratamento, com exceção do tratamento de 18% de sombreamento, onde a progênie Z não foi incluída. O total de mudas utilizadas, portanto, foi de 285. Para o plantio (Julho de 1997), foi feito sorteio das progênies e plantas, as quais foram distribuídas ao acaso em cada tratamento.

Os tratamentos de sombra foram realizados através do uso de tela preta de 50, 30 e 18% (dados fornecidos pelo fabricante), marca Sombrite®.

A intensidade luminosa relativa de cada tratamento foi calculada a partir de medidas com um luxímetro. Os dados de luminosidade real são mostrados na tabela 8.1, correspondentes a uma amostragem em triplicata para cada tratamento, no dia 27 de setembro de 2001.

O solo da área, latossolo vermelho distrófico, foi descompactado mecanicamente e recebeu um tratamento através de adubação orgânica (1 kg de adubo por metro quadrado). Após o plantio, as mudas foram irrigadas nos primeiros dois meses até que pudessem apresentar aclimatação adequada.

Tabela 8.1. Intensidade luminosa relativa nos diferentes tratamentos; médias de 3 repetições para cada tratamento.

tratamento	intensidade de luz (lux)	sombreamento (%)
luz natural (100%)	98.120	0
sombrite 18 %	74.233	24,3
sombrite 30 %	43.300	55,9
sombrite 50 %	26.700	72,8

Foram feitas três avaliações, em setembro de 1997, março de 1998 e junho de 1999. Aplicou-se uma análise de variância de duas vias para blocos casualizados, na comparação entre tratamentos. Para esta análise os dados correspondentes à progênie Z, o resultado da progênie Z no tratamento de 18% de sombreamento (ausente), foi estimado através do método de Li (Zar, 1999, pág. 254). A comparação entre médias foi realizada através do Teste de Tukey.

As folhas para a análise morfológica foram coletadas entre setembro e novembro de 1999, portanto folhas maduras formadas antes do inverno. Foram selecionadas 3 folhas por planta e 5 plantas por tratamento. Em cada tratamento, a progênie M2 contribuiu com duas plantas e as progênies I, M1 e M3 contribuíram com 1 planta. A escolha foi aleatória dentro de cada progênie. As folhas foram originadas sempre do 5º ao 8º nó, sem danos por herbivoria.

Os parâmetros avaliados são descritos no capítulo 7. Para a comparação estatística entre os tratamentos, quanto aos dados de morfologia, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis (Zar, 1999). Os dados brutos são apresentados nos Anexos.

8.3. Resultados

Verificou-se que a sobrevivência das mudas é significativamente alterada em função do grau de sombreamento (figura 8.1, tabela 8.2). A maior sobrevivência após 8 e 23 meses ocorre nos maiores graus de sombreamento utilizados, 30 e 50%. Os resultados da análise de variância são apresentados na Tabela 8.2. As comparações entre tratamentos par a par através do teste de Tukey indicaram que o tratamento 50% apresentou maior sobrevivência que os tratamentos de 18 e 0 % (Tabela 8.2), após 8 e 23 meses.

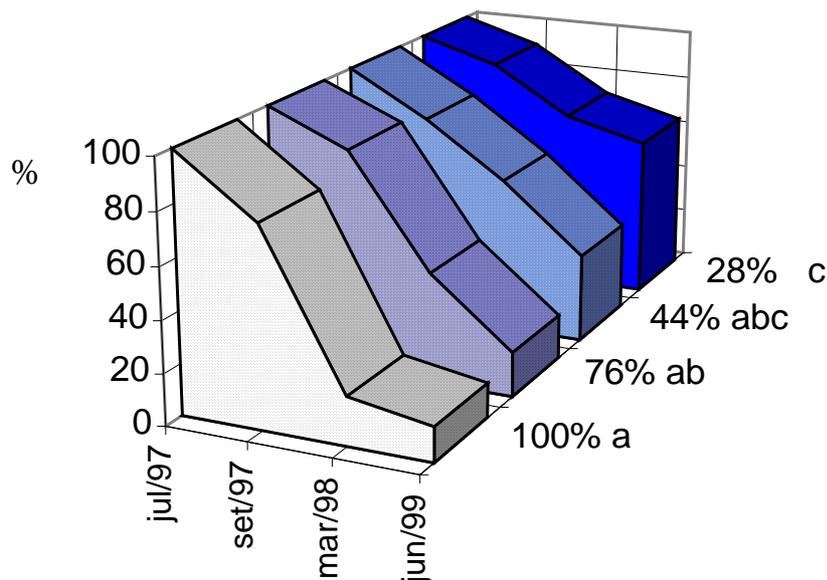


Figura 8.1. Porcentagem de sobrevivência de mudas de erva-mate ao longo do período experimental nos diferentes graus de sombreamento. O eixo Y representa o número de mudas em cada progênie (número inicial=15), o Z indica o grau percentual de luz natural, e o X as datas do início do experimento (plantio) e das avaliações. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos após 23 meses (ANOVA, $\alpha=0,05$).

Observa-se que, tanto a médio (8 meses) como a longo prazo (23 meses), não há diferença significativa entre 100 e 76 % de luz natural (tabela 8.2).

Tabela 8.2. número de mudas sobreviventes em a. Março de 1998, oito meses após o início do experimento e b. Junho de 1999, 23 meses após o início do experimento. Estação Florestal Experimental do IBAMA, Alto da União, Ijuí-RS. letras diferentes indicam médias diferentes no teste de Tukey para $\alpha=5\%$ (somente entre tratamentos dentro de cada período). Os tratamentos são expressos em termos de porcentagem da luz natural.

a.

Tratamentos	100%	76%	44%	28%	
PROGÊNIES					total
M1	4	9	12	13	38
M2	5	8	8	8	29
M3	3	6	8	16	29
Z	1	---	11	7	17
Ijuí	1	3	7	9	19
média	2,8 a	6,5 ab	9,2 bc	10,6 c	

b.

tratamentos	100%	76%	44%	28%	
PROGÊNIES					total
M1	2	2	6	11	21
M2	4	6	6	6	22
M3	2	0	2	15	19
Z	1	---	8	6	15
Ijuí	1	3	4	10	18
média	2 a	2,8 ab	5,2 abc	9,6 c	

Tabela 8.3. Resultados da análise de variância de duas vias para blocos casualizados na comparação entre tratamentos (graus de sombreamento) no que se refere à sobrevivência a. após 8 meses b. após 23 meses.

a.

Fonte de variação	Soma quad.	GL ¹²	média quad.	F	F _{0,05(1), 2,11}
total	296,132	18			
blocos (progênes)	46,710	3			
tratamentos	186,7261	2	93,3630		
remanescente	62,6958	11	5,6996	11,9131	3,98

b.

Fonte de variação	Soma quad.	GL ¹³	média quad.	F	F _{0,05(1), 2,11}
total	282,55	18			
blocos (progênes)	4,3	3			
tratamentos	179,35	2	89,675		
remanescente	98,9	11	8,9909	7,2538	3,98

Houve maior facilidade de discriminação entre os tratamentos após o período de 8 meses em relação ao período de 23 meses (Tabelas 8.2 e 8.3). Pode-se explicar este resultado pela grande mortalidade observada entre 8 e 23 meses para os tratamentos 18 e 30%.

¹² graus de liberdade reduzidos em função da estimativa do dado ausente, progênie Z tratamento 18% (tabela 2).

¹³ os graus de liberdade reduzidos em função da estimativa do dado ausente, progênie Z tratamento 18% (tabela 2).

Em média, o tratamento de 28 % de luz natural apresentou 64 % de sobrevivência após 23 meses. Esta sobrevivência é 4,8 vezes maior que a do tratamento sem sombreamento, que apresentou 13,33 % de sobrevivência (23 meses). Por outro lado, a razão entre os valores extremos de sobrevivência das diferentes progênies (Tabela 8.2b, excluindo progênie Z) é de 1,22. Este resultado indica que a possível diferença (genética) entre progênies apresenta uma influência menor sobre a sobrevivência do que as condições ambientais (intensidade de luz). Em outras palavras, em populações naturais de *I. paraguariensis*, a variabilidade genética natural não permite uma sobrevivência uniforme em diferentes intensidades luz.

Os tratamentos não se diferenciaram quanto à área foliar por folha (figura 8.2). Quanto à massa foliar específica, verificou-se uma tendência significativa de aumento conforme o aumento da luminosidade.

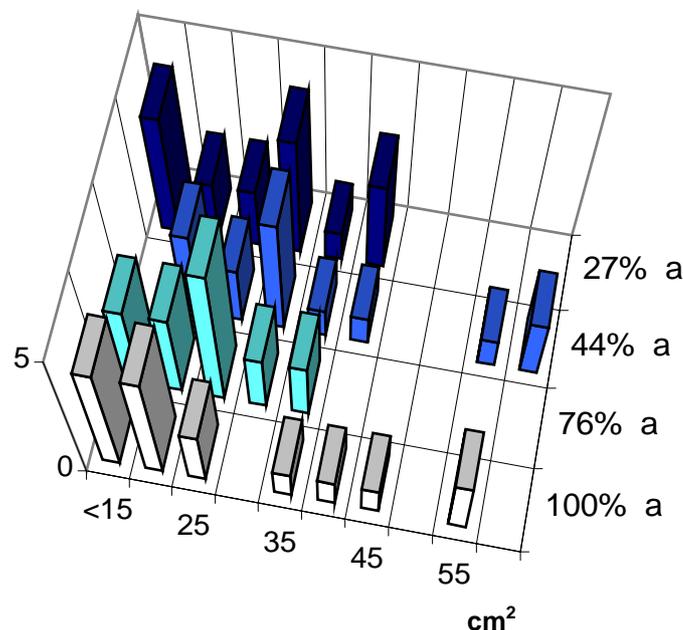


Figura 8.2. Relação entre área por folha (cm^2) e intensidade de luz (à direita), sombreamento com tela sombrite; à esquerda (eixo y) número de folhas em cada intervalo de classe, $n = 15$ folhas por tratamento, $P > 0,05$, teste de Kruskal-Wallis.

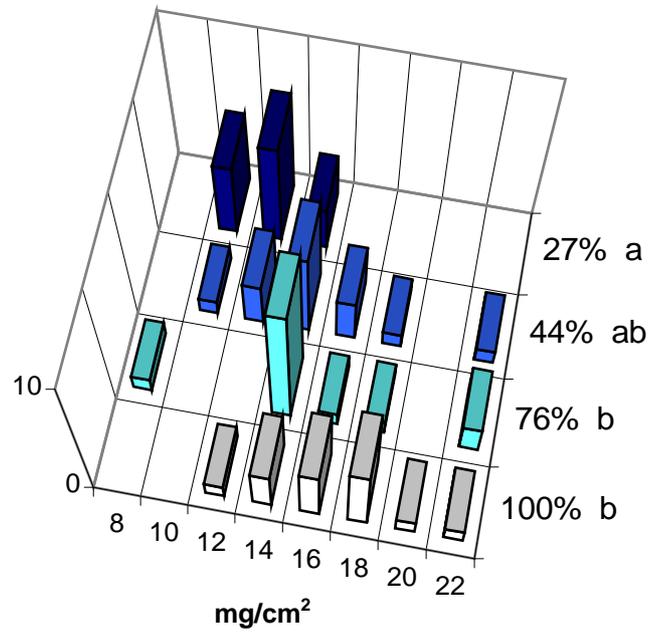


Figura 8.3. Relação entre massa foliar específica (mg/cm^2) e intensidade de luz (à direita), sombreamento com tela sombrite; à esquerda (eixo y) número de folhas em cada intervalo de classe, $n=15$ folhas por tratamento. $P < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis.

Os tratamentos também foram comparados através de diferentes parâmetros morfológicos. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para estes parâmetros (tabela 8.4).

Tabela 8.4. Valores médios dos parâmetros morfológicos das folhas de plantas de erva-mate submetidas a diferentes intensidade de luz natural; $\hat{A}b$, ângulo basal da lâmina foliar, PeR, perímetro relativo, RAI = índice de área retangular, c/l = razão comprimento/largura, dl/c = razão entre a distância da largura maior em relação à base/comprimento. Não houveram diferenças significativas entre os tratamentos, para todos os parâmetros, segundo uma ANOVA de um fator ($P>0,05$).

tratamentos	$\hat{A}b$	PeR	RAI	c/l	dl/c
27%	66,44	2,13	0,685	2,05	0,618
44%	56,03	2,10	0,687	2,23	0,623
72%	64,73	2,12	0,715	2,07	0,604
100%	61,08	2,11	0,695	2,21	0,627

8.4. Discussão

Verifica-se geralmente que, em plantas da mesma espécie, maiores valores de massa específica foliar estão relacionados à exposição à luz de maior intensidade (Osunkoya & Ash, 1991; Mulkey *et al.*, 1993; Kitajima, 1994; Muraoka *et al.*, 1997). Esta resposta está geralmente relacionada ao aumento da espessura dos tecidos (Hanson, 1917; Kozlowsky & Pallardy, 1997), especialmente o parênquima paliçádico (Fretz & Dunham, 1972). Plantas ou folhas da mesma população ou da mesma árvore, quando mais expostas à luz, tendem também a apresentar menor área (Crawley, 1997; Kozlowsky & Pallardy, 1997). Adicionalmente, a menor disponibilidade de água pode gerar ou contribuir para uma resposta similar (Groom & Lamont, 1997), embora em certos experimentos a irrigação não tenha produzido diferenças em massa específica foliar (Mulkey *et al.*, 1993). Os resultados obtidos indicam que a erva-mate é uma espécie capaz de aumentar a massa específica foliar em condições de maior

luminosidade, porém não é capaz de diminuir a área foliar. Como as condições de luminosidade mais intensa podem ser estressantes, especialmente para as plantas umbrófitas (Lovelock *et al.*, 1994), a incapacidade de redução da superfície pode ser um dos fatores que contribuiu para a relação inversa entre sobrevivência e intensidade de luz natural neste experimento. Esta redução de superfície pode ser importante não só para diminuir a fotoinibição e o aquecimento excessivo gerado pela exposição à luz, mas também para reduzir a perda de água.

A plasticidade da estrutura foliar em resposta a diferentes intensidades de luz varia consideravelmente entre plantas arbóreas do mesmo gênero. Esta plasticidade é maior em plantas heliófilas/tolerantes ao estresse hídrico que em plantas umbrófilas/pouco tolerantes ao estresse hídrico (Kozlowski & Pallardy, 1997). Camacho & Bellefleur (1996), ao comparar as respostas de climatização de plântulas pertencentes a seis diferentes espécies da floresta tropical da Costa Rica, verificaram que as espécies que melhor se aclimataram à sombra foram também as que apresentaram a menor diferença de área foliar entre plantas crescidas à sombra e crescidas sem sombreamento. Estas mesmas espécies, por outro lado, apresentaram diferenças de massa específica foliar equivalentes às outras espécies (mais heliófilas).

Correlações negativas entre intensidade de luz e sobrevivência são usualmente relacionadas à plantas umbrófilas (tolerantes à sombra). Em ambientes com baixa intensidade de luz a sobrevivência está fortemente relacionada com a capacidade de manter taxas positivas de crescimento, mesmo que em valores baixos (Walters & Reich, 1996).

Aplicando-se esta observação aos cultivos, percebe-se que é possível facilitar a sobrevivência das mudas de erva-mate a campo através do sombreamento. Este sombreamento tem sido obtido tradicionalmente através de placas de madeira colocadas verticalmente no lado norte. Uma alternativa que pode aumentar o rendimento econômico é consorciar a erva-mate com plantas arbóreas pioneiras, da mesma maneira em que tem sido proposto o reflorestamento heterogêneo com espécies

nativas de diferentes estágios sucessionais (Kageyama *et al.*, 1989; Durigan & Nogueira, 1990; Kageyama *et al.*, 1992).

Comparando-se a diferença entre os tratamentos com a diferença entre as progênies no que se refere à sobrevivência, mudanças na forma de manejo da erva-mate nos primeiros anos de plantio podem apresentar resultados mais efetivos que a seleção de diferentes materiais genéticos para a tolerância às condições sem sombra, pelo menos nas condições edafo-climáticas deste experimento.

Embora ocorra diferenças entre populações de *I. paraguariensis* quanto à forma da folha (capítulo 7), não foi detectada interferência significativa dos tratamentos sobre os diferentes parâmetros morfológicos utilizados. Isto confirma a idéia da baixa plasticidade fenotípica esperada para a forma da folha (Smith & Hake, 1994).

9.

Considerações finais e conclusões

9.1. Variabilidade nos teores de metilxantinas e saponinas

A erva-mate é uma espécie de alta variabilidade genotípica e fenotípica, o que foi demonstrado através de diferentes abordagens de pesquisa (Winge *et al.*, 1995; Floss, 1994; Gauer & Cavalli-Molina, 2000; Cavalli-Molina *et al.*, 2000; Resende *et al.*, 2000).

Quanto ao teores de metilxantinas, Athayde (2000) e Athayde *et al.* (2000) reportaram grande variabilidade não só entre populações de *I. paraguariensis* var. *paraguariensis*, como também entre plantas dentro da mesma população. A diferença nos teores de cafeína entre plantas da mesma população chegou em alguns casos a mais de 100 vezes. Resultado semelhante foi observado entre plantas da variedade *vestita*: a planta com maior concentração de cafeína apresentou 12,24 mg/g em fevereiro, enquanto que a planta com menor concentração de cafeína apresentou 0,11 mg/g, na mesma época (capítulo 2).

Os resultados obtidos confirmam portanto a grande variação de teores de metilxantinas. Não sabemos qual a intensidade da determinação genética sobre esta variação. Entretanto, observa-se interação significativa entre condições ambientais locais e genótipos no que se refere aos teores de metilxantinas (Verza, 2001). Esta

interação entre genótipos e ambiente também é observada na análise da produção de massa verde (Resende *et al.*, 2000). Em termos práticos, os trabalhos de seleção genética devem ser conduzidos especificamente para cada local ou região, ou seja, não se pode ‘generalizar’ resultados obtidos por seleção genética em um determinado local, esperando que os mesmos resultados sejam obtidos em qualquer lugar.

Mesmo considerando a existência de interação significativa entre genótipos e ambiente, a grande variabilidade observada pode ser interessante ao fornecer as condições para que se realizem trabalhos de seleção genética, visando a obtenção de teores definidos de compostos químicos ou, por outro lado, no sentido de diminuir a amplitude de variação entre plantas, de forma a obter uma matéria-prima com as características desejadas.

A variação entre épocas do ano, que já tinha sido apontada por Athayde (2000) e Athayde *et al.* (2000) também foi verificada no estudo das variedades *vestita* e *paraguariensis*. No caso da variedade *vestita*, observa-se um aumento de 5,27 vezes no teor de cafeína entre outubro e fevereiro, e um aumento de 3,26 para a variedade *paraguariensis* quanto ao mesmo teor e para as mesmas épocas do ano (capítulo 2).

No produto industrializado, a variação nos teores de metilxantinas apresenta aspecto semelhante. A concentração de cafeína¹⁴ em fevereiro chega a valores 1,8 vezes a concentração observada em outubro, e 2,8 vezes a concentração observada em setembro, o mês de menor concentração (Da Croce, 2000).

Desta forma, o industrial poderá levar em conta a variação, de caráter biológico, nos teores de metilxantinas, no sentido de buscar um produto com teores definidos destas substâncias.

Quanto às saponinas os dados são escassos, visto que o método de quantificação desenvolvido (capítulo 6) é o primeiro para as saponinas da erva-mate. Anteriormente, Athayde 2000, em uma análise semi-quantitativa, verificou ampla variação entre

¹⁴ Neste trabalho (Da Croce, 2000), a metodologia empregada foi a AOAC 979.11 (1997), que se baseia em leituras espectrofotométricas. Desta forma os resultados podem se referir à soma (imprecisa) de cafeína e teobromina, e não são totalmente comparáveis aos aqui apresentados.

plantas, mas especialmente grande diferença entre populações. Entre elas, a do Mato Grosso do Sul apresentou maior quantidade de saponinas.

Ao analisar esta mesma população do Mato Grosso do Sul (Tacuru e Iguatemi) quanto ao teor das saponinas bidesmosídicas (capítulo 6), verificou-se que há ampla variação entre plantas. Para os teores de matessaponina 1, a diferença entre a planta com a maior concentração e a planta com menor concentração (excluindo as plantas com teor inferior ao limite de quantificação) chega a 15,4 vezes. Verifica-se também que a variação nos teores das diferentes saponinas é maior que a variação nos teores de cafeína e de teobromina, para as mesmas plantas.

9.2. Os teores de metilxantinas e saponinas e a qualidade da matéria-prima

A questão dos teores dos diferentes componentes químicos da erva-mate, especialmente o teor de cafeína, é matéria bastante polêmica, considerando o ponto de vista do controle de qualidade. A portaria 234 do Ministério da Saúde exige um teor mínimo de 5 mg/g (0,5 %) de cafeína no produto. Verifica-se, entretanto, que a concentração de cafeína no produto industrializado é muitas vezes inferior a esta concentração exigida, dependendo da época do ano. (Da Croce, 2000). O mesmo se verifica nas plantas a campo (médias populacionais, capítulos 2 e 3).

Os resultados apresentados aqui e por outros autores (especialmente Athayde 2000 e Verza 2001) indicam que se pode esperar ampla variação no teor de metilxantinas nos produtos industrializados em função de:

- variação entre plantas e entre populações
- variação entre épocas do ano
- influência do tipo de adubação
- interação entre genótipos e ambiente

Este último fator é importante, especialmente no caso de ervais implantados com sementes oriundas de outros locais, determinando que o resultado, em termos de teores de metilxantinas, é até certo ponto imprevisível. Em outras palavras, os teores observados nas plantas matrizes (das sementes) não necessariamente se expressarão em suas progênes, quando cultivadas em um ambiente diferente.

É possível que as mesmas fontes de variação sejam também determinantes para os teores de saponinas, considerando-se os primeiros resultados quantitativos (capítulo 6), onde se pode observar ampla variação entre plantas.

A legislação específica sobre os limites aceitos para os teores de cafeína pode ser questionada considerando os seguintes aspectos:

- Um teor inferior a 5 mg/g não indica que o produto não é erva-mate, ou seja, que necessariamente esteja adulterado, ou que seja prejudicial à saúde;
- A legislação contradiz as práticas mais tradicionais, nas quais a época preferencial para a colheita era outono e inverno (de março até agosto; Linhares 1969, p. 61; Souza e Fossati, 2000), onde os teores de metilxantinas são menores, com base nos dados disponíveis (Da Croce, 2000);
- Não se sabe qual é o teor de metilxantinas mais adequado para a saúde do consumidor.

Determinar o teor de metilxantinas mais adequado para a saúde do consumidor é tarefa bastante complexa. Isto porque há diferentes tipos de consumidores, e não só no que se refere à suas condições fisiológicas e constitutivas, mas também quanto à quantidade e frequência do consumo de erva-mate. Esta área de pesquisa, por outro lado, é de maior interesse, pois o consumidor também precisa estar informado sobre o

produto que consome e os possíveis efeitos de cada perfil de consumo (De Stefani, 1998).

Em geral, o teor de princípios ativos em produtos à base de plantas é bastante variável, de acordo com a época e local de coleta, diferentes raças químicas, formas de cultivo, condições climáticas, idade do material vegetal, entre outros fatores. Devido à esta grande variabilidade, os teores mínimos exigidos tendem a ser baixos. Por exemplo, no caso da camomila, os teores de óleo volátil variam entre 0,3 e 1,5 %, e o teor mínimo preconizado na maioria das farmacopéias é de 0,4 % (Farias, 1999, p. 215).

Quanto à cafeína e à teobromina, considerando possíveis efeitos tóxicos de um consumo muito elevado (Rates, 2000), é possível que muitos consumidores considerem adequado teores baixos destas substâncias, até mesmo mais baixos do que o limite definido pela legislação.

O consumo em excesso de cafeína pode causar intoxicações agudas, cujos sintomas são dores de cabeça, nervosismo, cansaço, excitação, taquicardia, diurese, face vermelha e contrações musculares. O consumo crônico de altas doses diárias pode produzir ansiedade, cansaço e distúrbios do sono (Rates, 2000).

Os teores baixíssimos de cafeína e teobromina verificados em *Ilex dumosa* (Filip *et al.*, 1998), ou mesmo a inexistência destas substâncias em certas procedências desta espécie (Reginatto *et al.*, 1999) servem de estímulo, atualmente, para o desenvolvimento de novos produtos semelhantes ao mate a partir dessa outra aquifoliácea, considerando ainda que esta planta já era utilizada pelos guaranis e pelos jesuítas nas missões (Prat Kricun *et al.*, 2000). Embora existam saponinas de *Ilex dumosa* capazes de gerar hemólise *in vitro* (Schenkel *et al.*, 1997), e tenha sido verificado uma diminuição do número de glóbulos vermelhos em ratos Wistar submetidos à ingestão crônica de extratos desta planta (Bonfiglio *et al.*, 1997), outros estudos recentes com ratos não verificaram qualquer efeito negativo, tanto agudo como crônico, em dosagens semelhantes (Malgor *et al.*, 2000).

Embora a cafeína seja considerada tradicionalmente o principal componente ativo do mate, mais recentemente outras substâncias do mate tendem a ser considerados tão ou mais importantes para a saúde do consumidor. Entre os componentes químicos que podem trazer efeitos fisiológicos e nutricionais importantes, podemos citar as vitaminas, especialmente a vitamina C e as do complexo B (Schmalko *et al.*, 2000), as saponinas (Ferreira *et al.*, 1997; Martinet *et al.*, 2001) os flavonóides e os ácidos fenólicos (Gugliucci & Stahl, 1995; Gugliucci, 1996; Schinella *et al.*, 2000; Filip *et al.*, 2000). Diante deste quadro, o padrão de qualidade para a erva-mate deve ser considerado em bases mais amplas, considerando também o teor de outras substâncias.

Por outro lado, deve ser entendido que as diferentes populações de erva-mate apresentam perfis químicos diferentes. Este fato não prejudica a qualidade do produto, antes gera uma diversidade de produtos que podem ser interessantes para diferentes consumidores. Os apreciadores de tereré, por exemplo, podem se interessar em teores mais altos de determinadas substâncias, como saponinas e metilxantinas, visto que, na preparação e consumo desta bebida, se realiza uma extração com água fria, ao contrário dos chás e do chimarrão. Espera-se que a extração com água fria seja menos eficiente para a maioria dos compostos químicos aqui considerados.

Muito mais do que restringir o comércio, gerando regras de validade científica ou nutricional duvidosa, a legislação deve permitir ao consumidor ser informado das características do produto. Isto pode ser alcançado através da informação sobre a qualidade química na embalagem do produto.

Além disso, o estabelecimento de rotinas de análise dos produtos da erva-mate são fundamentais para viabilizar a ampliação do mercado externo desta matéria-prima. A manutenção e monitoramento de padrões de qualidade certamente exigirá dos industriais do setor mais organização e menos improvisação, misturando matérias-primas de quaisquer procedências ou época do ano, apenas em função do preço.

9.3. A cafeína é a metilxantina preponderante no mate?

A maioria dos resultados sobre metilxantinas em erva-mate mostram que a cafeína é a metilxantina preponderante, tanto a nível populacional, como para a maioria das plantas (capítulos 2, 3 e 4; Filip *et al.*, 1998; Reginatto *et al.*, 1999; Athayde, 2000; Athayde *et al.*, 2000). Entretanto, existem diversas populações onde há um significativo número de plantas com teores de teobromina mais elevados que o de cafeína (tabela 9.1).

Destaca-se entre estas populações as de Ilópolis e de São Mateus do Sul, com metade das plantas apresentando teores de teobromina superiores aos de cafeína. Em São Mateus do Sul, esta proporção cresce para 67 % se consideramos apenas as plantas submetidas aos tratamentos de luminosidade alta e média (cf. tabela nos anexos). Além disso, nestes tratamentos, o teor médio de teobromina também é superior ao teor médio de cafeína (figura 3.2, capítulo 3), fato que não ocorre na amostra populacional de Ilópolis analisada por Athayde (2000).

Tabela 9.1. Proporção de plantas com teores de teobromina mais elevados que os de cafeína em diferentes variedades e populações de *I. paraguariensis*.

variedade (população estudada)	% plantas com teores de teobromina > cafeína	época do ano	fonte
var. <i>vestita</i>	41,7 %	fevereiro	capítulo 2
var. <i>paraguariensis</i> (Ivaí-PR)	0 %		
var. <i>paraguariensis</i> (Ijuí-RS)	5%	fevereiro	capítulo 3
var. <i>paraguariensis</i> (São Mateus do Sul-PR)	50%	agosto	capítulo 3
var. <i>paraguariensis</i> (Barão do Cotegipe-RS)	3,3 %	maio	capítulo 4
var. <i>paraguariensis</i> (Iguatemi e Tacuru-MS)	0%	fevereiro	Athayde, 2000
(Pinhão e Guarapuava-PR)	0%		
(Catanduvas-SC)	10%		
(Ilópolis-RS)	50%		

Chama a atenção que, já em 1959, Ruben Descartes de Garcia Paula, em um trabalho não publicado citado por Linhares (1969, p. 400-402) afirmava ter encontrado os teores mais elevados de cafeína nas plantas do Mato Grosso e, ao contrário, os teores mais elevados de teobromina nos estados sulinos, sobretudo no Paraná. A variabilidade populacional quanto à composição química já era, portanto, conhecida por aquele pesquisador.

Novamente observa-se que diferentes populações e locais podem gerar produtos diferenciados, ampliando as opções do mate enquanto alimento.

9.4. Composição química e sabor

Além da polêmica em torno dos teores de cafeína no mate, outro tema que gera controvérsias é a questão do sabor. A tabela 9.2 apresenta algumas das substâncias que mais contribuem para o amargor no mate.

Infelizmente, os dados sobre ácido clorogênico não são comparáveis aos outros dados, visto que se referem à soluções aquosas (bebidas) e não ao teste do papel filtro utilizado por Taketa *et al.* (1998) e Taketa (2000). Combinando-se as informações sobre os teores e os resultados do teste do papel filtro, verifica-se que a cafeína apresenta maior contribuição ao amargor que as saponinas. Por outro lado, os ácidos fenólicos devem também apresentar contribuição expressiva para o amargor, ou talvez para a adstringência, qualidades organolépticas de difícil distinção (Nagel *et al.*, 1987).

O aumento da polaridade das saponinas, correlacionado com o aumento no número de açúcares da molécula, eleva o amargor (Taketa, 2001). Entretanto, verifica-se que a concentração de saponinas é relativamente baixa em relação às outras substâncias (tabela 9.2). Além disso, a cafeína é 5 vezes mais amarga que a matessaponina 4.

Considerando-se também a elevação da polaridade, espera-se que a matessaponina 3 apresente um amargor intermediário entre a matessaponina 2 e a 4. Desta forma, mesmo esta saponina, teria menor contribuição para o amargor que a cafeína.

Tabela 9.2. Teores das substâncias químicas da erva-mate com influência sobre o sabor, segundo diversos autores; o limiar de detecção do amargor das diferentes substâncias é baseado em Nagel *et al.* (1987), Taketa *et al.* (1998), Taketa (2001).

substâncias	teores médios encontrados (mg/g)	limiar de detecção do amargor	fonte sobre teores médios
ácido clorogênico	11 – 47	20 mg/l *	Clifford & Ramirez-Martinez, 1990; Filip <i>et al.</i> , 2001
ácidos dicafeoilquínicos	6 – 68	?	
cafeína	3 - 15	20 µg **	capítulos 2 e 3; Athayde, 2000; Reginatto <i>et al.</i> , 1999
teobromina	0,4 - 6,6	?	capítulos 2 e 3; Clifford & Ramirez-Martinez, 1990
saponinas			capítulo 6
matessaponina 1	1,8	> 400 µg **	
matessaponina 2	4,2	200 µg **	
matessaponina 3	1	?	
matessaponina 4		100 µg **	

* em bebidas

** aplicadas sobre um fragmento de papel filtro

? amargor não testado

De acordo com Rachwal *et al.* (2000), a quantidade de fenólicos na erva-mate diminui com o aumento do sombreamento. Uma diminuição de 38 % na luz gerou um decréscimo de 10 % em fenólicos. Considerando os dados do capítulo 3, um

sombreamento moderado aumenta marginalmente a concentração de metilxantinas. Um sombreamento de 38 % elevaria a concentração de metilxantinas em 11%. Por outro lado, uma diminuição equivalente nos fenólicos poderia ser mais significativa sobre o sabor, em função dos teores mais elevados destes últimos (tabela 9.2).

Em que pese a possível importância dos ácidos fenólicos como antioxidantes (Gugliucci & Stahl, 1995; Gugliucci, 1996; Schinella *et al.*, 2000; Filip *et al.*, 2000), um teor muito elevado pode promover um aumento significativo na adstringência ou no amargor, o que poderia explicar a rejeição usual do público em relação à erva-mate cultivada a pleno sol, no Brasil (segundo relatos dos industriais; Gonar Oling, comunicação pessoal). O preço da matéria-prima verde de origem sombreada hoje é 50 a 100 % maior que o de matéria-prima de origem cultivada sem sombreamento, em praças como Ijuí e Palmeira das Missões- RS.

O método de cultivo a pleno sol tornou-se cada vez mais comum no Brasil, seguindo-se desta forma o exemplo da Argentina. Tudo indica que esta mudança, do extrativismo para o cultivo a céu aberto, alterou o perfil químico do produto.

É interessante citar Temístocles Linhares que, com convicção notável, oriunda talvez de uma base de argumentação vivencial, afirma que “todos sabem que são os ervais cobertos, principalmente quando neles entremeiam pinheiros, que dão melhor mate. É o que ocorre no Paraná e em Santa Catarina.” (Linhares, 1969, p. 102).

9.5. A interação com insetos e o sombreamento

Observa-se que a cafeína afeta o desenvolvimento de *Adelpha mincia* (Lepidoptera). Guerreiro-Filho e Mazzafera (2000) obtiveram resultados semelhantes, observando que a cafeína afeta a herbivoria gerada por *Perileucoptera coffeella* (Lepidoptera, Lyonetiidae) em plantas de café (*Coffea arabica*). Entretanto, estes autores consideram que a interferência da cafeína não se constitui em uma defesa efetiva, visto os insetos são capazes de causar danos, mesmo nas plantas com os teores

mais elevados de cafeína. A partir dos resultados obtidos, concluem que existem outros fatores importantes na determinação da resistência.

Os dados obtidos com *Adelpha* e erva-mate apontam na mesma direção. O fator sombreamento pode interferir na herbivoria não somente via modificação no conteúdo químico, mas também modificando outros elementos do ambiente, como por exemplo a presença de predadores. Na composição química, não só os teores de metilxantinas são alterados, mas possivelmente há alterações no conteúdo de saponinas, flavonóides, ácidos fenólicos. Podem ocorrer também alterações nos níveis de fatores nutricionais, como potássio, cálcio, vitaminas, aminoácidos.

Assim como *Perileuoptera coffeella* é adaptada às defesas do café, *Adelpha mincia* também apresenta adaptações às defesas da erva-mate. Estas adaptações, entretanto não são absolutas, visto que a adição de cafeína gera interferências significativas.

9.6. A interação com insetos e as formas de cultivo da erva-mate

Considerando os resultados obtidos no estudo com os insetos (capítulo 5), pode-se supor que as formas de cultivo interferem na interação da erva-mate com os herbívoros. Estes seriam favorecidos pelos ambientes mais abertos, seja pelas modificações químicas geradas nas plantas, seja pelas modificações ambientais em outros componentes do ecossistema (solo, predadores, outras árvores).

Ainda é cedo para generalizar os resultados para os Lepidópteros, quanto mais para os outros insetos. Mas poderíamos analisar a questão por outro viés, ou seja, por uma visão ecossistêmica. A erva-mate cresce em regiões florestais, onde ocupa os estratos inferiores e intermediários da floresta, ocorrendo muitas vezes em grandes densidades populacionais (Carpanezzi, 1995). A floresta é um ambiente complexo, que representa, nas suas regiões de ocorrência natural, o estágio de maior quantidade de

energia e matéria (incluindo nutrientes) sob a forma viva, dadas as condições climáticas e edáficas (Golley *et al.*, 1978; Vivan, 1998). A simplificação do ecossistema, gerando a monocultura de erva-mate, traz a necessidade de combate às populações de insetos e de plantas competidoras herbáceas, que antes não existiam ou exerciam influência bem menor sobre esta espécie (Alves *et al.*, 2000; Fossati & Souza, 2000). Considerando a experiência argentina, temos como resultado um uso amplo e abusivo de agrotóxicos, com todos os problemas que isto acarreta. A partir do abandono do uso de agrotóxicos, e ao se permitir paralelamente o aumento espontâneo da diversidade vegetal, os controles naturais das ‘pragas’ da erva-mate tendem a se restabelecer (Fernández-Díaz *et al.*, 2000). Acrescentaríamos que um aumento de diversidade vegetal, especialmente quando combina plantas funcionalmente diferentes (árvores de grande porte, arbustos, pioneiras, umbrófitas, leguminosas e não-leguminosas), aumenta a produção vegetal a estabilidade e a resiliência¹⁵ dos ecossistemas (Díaz & Cabido, 2001).

O sombreamento com outras espécies arbóreas, promovendo a restauração do estrato florestal superior, aumenta a ciclagem de nutrientes (Vivan, 1998) gerando também outras fontes de renda, e poderá contribuir no manejo de insetos herbívoros, além da interferência sobre a qualidade da matéria-prima. Sistemas complexos agroflorestais envolvendo a erva-mate não são novidade (Eibl *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 2000).

Recentemente, o ‘modelo’ argentino, que implica na simplificação do agroecossistema e no uso intensivo de pesticidas e outros insumos, foi introduzido no centro-sul do Paraná. As experiências iniciais mostraram sua inviabilidade econômica e social, considerando o aumento nos custos de produção. O referido modelo gera também impactos ambientais diretos e rompe a relação cultural entre os agricultores, a produção primária e a preservação da floresta com araucárias (Petersen *et al.*, 2000). Considera-se que a tendência à monocultura e a extinção de sistemas tradicionais de produção estão entre as principais ameaças à biodiversidade, no que tange a atividade agropecuária (Rodrigues, 2001).

¹⁵ Resiliência é a capacidade do ecossistema de retornar às condições originais após uma perturbação.

9.7. Adubação e composição química

Verificou-se que a adubação com potássio aumenta a produção de teobromina, enquanto que a adubação com nitrogênio aumenta a produção de cafeína (capítulo 4).

O nível máximo de nitrogênio usado foi de 300 g de uréia por planta/ano, o que corresponde a cerca de 130 g de N por planta/ano. Uma adubação de 75 a 125 g de N por planta/ano gera na planta uma resposta máxima de produtividade de folhas, segundo Pandolfo *et al.* (2000).

O aumento de cafeína gerado pela adubação nitrogenada é de 35%, considerando a média de concentração de cafeína no tratamento com teores mais elevados de uréia, em relação à testemunha (capítulo 4). Desta forma, se os produtores seguirem a adubação recomendada para atingir o máximo de produtividade em folhas, estarão provavelmente aumentando os teores de cafeína.

A combinação de uma adubação moderada com uréia (correspondente a cerca de 45 g de N por planta/ano) e uma adubação com altos teores de potássio (120 g de cloreto de potássio por planta/ano) não produziu elevações do teor de cafeína em relação à testemunha. Por outro lado, o teor de teobromina quadruplicou, passando de 0,94 mg/g para 3,81 mg/g valores médios). Como nesta população o teor de teobromina é bastante baixo em relação ao de cafeína, este tratamento não diferiu da testemunha em relação à soma das duas metilxantinas (ver tabela 4.1).

Desta forma, uma adubação moderada com fontes de nitrogênio combinada com uma adubação potássica, parece ter um efeito menor sobre a qualidade do produto, considerando apenas as metilxantinas como parâmetro. Deve-se entretanto considerar que podem haver outros fatores locais importantes (p. ex. macro e microclima, pH do solo, teor de alumínio), e o efeito da adubação deve ainda ser testado mais amplamente em diferentes regiões.

Outro aspecto a ser considerado é o tipo de adubação. Sabe-se que a uréia pode acarretar à planta efeitos tóxicos (Chaboussou, 1987). Talvez outras formas de

adubação possam apresentar efeitos diferentes sobre a composição química da erva-mate. Miranda *et al.* (1996) verificaram que diferentes formas de adubação nitrogenada resultam em teores diferenciados de princípios ativos em *Catharanthus roseus*.

Os resultados aqui apresentados recomendam moderação com relação à adubação nitrogenada, sob pena de produzir-se alterações na qualidade dos produtos derivados da erva-mate.

9.8. A morfologia

Os estudos morfológicos reforçam a existência de diferenças entre populações. Isto mostra que avaliações fenotípicas podem contribuir significativamente para o entendimento da variabilidade da erva-mate, contextualizada em termos ecológico-evolutivos.

A diferença morfológica entre a população de erva-mate de Santa Catarina e as outras populações analisadas (Mato Grosso do Sul e Paraná), é um resultado interessante, considerando-se que a forma da folha tenha forte determinação genética (Smith & Hake, 1994).

Por outro lado, J. E. A. Mariath e J. F. Bonini Stolz (comunicação pessoal) verificaram que as plantas oriundas das sementes das populações aqui estudadas (Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul) não mantiveram as diferenças entre populações quanto ao Índice de Área Retangular, quando cultivadas no mesmo local (Banco de Germoplasma de Erva-mate de Ilópolis-RS). Este resultado indica que mesmo a forma das folhas pode ser influenciada pelas condições ambientais. Os resultados comunicados por esses pesquisadores contrariam os resultados obtidos no capítulo 8, onde não se verificou diferenças quanto ao Índice de Área Retangular entre plantas submetidas a diferentes intensidades de luz. Talvez existam outros fatores ambientais que sejam capazes de interferir na forma da folha, ou talvez estas

diferenças (de caráter genético) só se manifestem em plantas mais velhas (fator ontogenético).

Diferenças entre populações no que se refere à morfologia (capítulo 7) e no que se refere à composição química (Athayde, 2000; Athayde *et al.*, 2001) contrastaria com os estudos envolvendo isoenzimas e sequenciamento de DNA, onde se verificou que a diferença genética entre plantas é maior que a diferença entre populações (Cavalli-Molina & Gauer, 2000; Gregiannini & Winge, 2000). Poderíamos argumentar, por outro lado, que as diferenças são induzidas pelos fatores ambientais, e há muitas evidências neste sentido, seja para dados de produção de folha (Resende *et al.*, 2000) morfologia (Mariath & Bonini Stolz, comunicação pessoal) ou teores de metilxantinas (Verza, 2001). Por outro lado, há interações significativas entre genótipos e ambiente, ocasionando herdabilidade alta em determinados ambientes. Por exemplo, observou-se que a herdabilidade para os teores de cafeína é alta ($h=0,75$) quando as plantas são cultivadas em Ilópolis, e esta mesma herdabilidade é nula quando as mesmas progênes/procedências são cultivadas em Ijuí (Geraldo C. Coelho & Simone Verza, comunicação pessoal).

Divergências entre dados isoenzimáticos e morfológicos foram verificadas por diversos autores. Podolski (2001), comparando diferentes populações de uma Onagraceae anual, observou que a variabilidade isoenzimática intra-populacional não apresenta correlação com variabilidade morfológica, tanto em caracteres quantitativos quanto em caracteres qualitativos (discretos). Knapp & Rice (1998) também verificaram divergências entre os dados isoenzimáticos e morfológicos, observando que a morfologia está mais relacionada com as diferentes condições climáticas, enquanto que as isoenzimas não. A similaridade entre populações, usando dados morfológicos, diverge da similaridade gerada usando dados isoenzimáticos.

Em vista dos escassos resultados já obtidos pelas diferentes abordagens, observa-se que há ampla necessidade de estudos mais aprofundados sobre a herdabilidade dos caracteres químicos e morfológicos, e a interações entre genótipos e ambiente.

As diferenças morfológicas observadas na população do Mato Grosso do Sul sugerem que esta espécie está submetida a condições ecológicas diferenciadas. É possível que estas diferenças ambientais estejam relacionadas com intensidades maiores de luz e/ou menor disponibilidade de água. As localidades de Iguatemi e Tacuru-MS estão submetidas a uma intensidade solar anual média e à temperaturas médias anuais superiores em relação à todas as outras localidades incluídas neste estudo. (INMET – Instituto Nacional de Meteorologia, 2002; LABSOLAR/UFSC, 2002; mapas climatológicos em anexo), ou ainda menor fertilidade do solo. Destaca-se, nesta população, a área foliar menor a massa foliar específica (mg/cm^2) maior. A herdabilidade de tais caracteres, contudo, ainda permanece desconhecida.

9.9. Variabilidade e variedades

A relação taxonômica entre as variedades *vestita* e *paraguariensis* ainda merece maiores investigações. Seria *vestita* um ecótipo de cerrado, ou apresentaria uma identidade ecológico-evolutiva suficientemente diferenciada? A população cultivada em Ivaí apresenta teores menores de cafeína (Reginatto *et al.*, 1999; Athayde, 2000). Por outro lado, as saponinas predominantes são as mesmas nas duas variedades (Athayde, 2000). Chama a atenção o fato de que a distribuição geográfica da var. *vestita* se sobrepõe a da var. *paraguariensis*. A questão da distribuição geográfica, entretanto, também merece uma investigação mais detalhada.

9.10. Questões sem resposta e perspectivas

Questões fundamentais ainda não foram totalmente respondidas. Como modificações ambientais podem gerar mudanças na interação entre a erva-mate e os herbívoros? Como se dá a interação entre os diferentes fatores (p. ex. nutrição mineral e luz)? Como os agricultores podem aproveitar este conhecimento no sentido de

melhorar a qualidade da matéria-prima, aumentar a produtividade, ou quem sabe ainda diminuir o impacto das perdas geradas por insetos?

Os dados químicos e morfológicos reforçam a necessidade de preservar a variabilidade genético-populacional da erva-mate, especialmente através do esforço que tem sido feito no sentido de montagem de bancos de germoplasma de *Ilex* spp. (Giberti, 1997; Winge, 1997).

A preservação *in situ* também deve ser considerada importante, pois mantém as condições evolutivas que originaram as características de cada população. A redução das populações naturais, geradas por destruição do hábitat e por extrativismo poderá levar a uma grande perda de variabilidade, e pode ser útil no futuro, do ponto de vista econômico (Oldfield, 1989).

9.11. Conclusões principais

- As populações das variedades de erva-mate (*vestita* e *paraguariensis*), cultivadas em Ivaí-PR, diferem entre si no que se refere ao conteúdo de cafeína. A variedade *paraguariensis* apresenta teores mais elevados desta substância. Quanto ao conteúdo de teobromina, foi detectada diferença apenas nas amostras coletadas em outubro. Seguindo a mesma tendência da cafeína, a variedade *paraguariensis* apresenta teores mais elevados de teobromina.
- Os teores de metilxantinas em fevereiro são mais elevados que os encontrados em outubro, em ambas as variedades acima.
- A intensidade luminosa interfere nos teores de metilxantinas. Observou-se um aumento na concentração destas substâncias de acordo com a diminuição da intensidade luminosa.
- A adubação com potássio (KCl) e nitrogênio (uréia) interfere no teor de metilxantinas. Os dados sugerem que o potássio tende a aumentar os teores de teobromina e reduzir a razão cafeína/teobromina. A adubação nitrogenada tende a produzir um aumento na soma dos teores de cafeína + teobromina.
- O ambiente no qual a erva-mate cresce pode interferir no desenvolvimento dos insetos herbívoros. Os dados indicam que folhas de sombra produzem efeitos negativos sobre o desenvolvimento de *Adelpha mincia* (Lepidoptera, Nymphalidae) quando comparadas às folhas de plantas sem sombreamento.
- A adição de cafeína às folhas de erva-mate, oferecidas como alimento para as larvas de *A. mincia*, diminuem a sobrevivência e a massa das pupas deste lepidóptero.

- Observa-se ampla variação intra-populacional nos teores de matessaponina 1, 2 e 3. Os dados obtidos a partir do decocto aquoso sugerem que as matessaponinas 1, 2 são as saponinas predominantes em plantas de erva-mate do Mato Grosso do Sul.
- Observa-se uma correlação negativa, estatisticamente significativa, entre os teores de matessaponina 1 e cafeína, e entre os teores de matessaponina 2 e cafeína, nas plantas de erva-mate do Mato Grosso do Sul.
- As populações de erva-mate diferem entre si quanto à morfologia das folhas. As diferenças encontradas se referem à área foliar por folha, massa foliar específica (mg/cm^2) e índice de área retangular.
- A sobrevivência de mudas de erva-mate tende a aumentar conforme a diminuição da intensidade luminosa, na faixa de intensidade luminosa correspondente ao intervalo de 100 a 28 % da luz natural.
- Plantas de erva-mate submetidas a diferentes intensidades luminosas, obtidas através do uso de tela sombrite, apresentam diferenças significativas entre tratamentos no que se refere à massa foliar específica. Observa-se um aumento da massa foliar específica de acordo com o aumento da luminosidade. Entretanto, não foram detectadas diferenças entre tratamentos no que se refere à área foliar por folha e nos diferentes parâmetros quantitativos referentes à forma da folha.

Referências bibliográficas

- AERTS, R. J. & MORDUE (LUNTZ), J. (1997) Feeding deterrence and toxicity of neem triterpenoids. *Journal of Chemical Ecology*, vol. 23, n. 9, p. 2117-2132.
- ALIKARIDIS, F. (1987) Natural constituents of *Ilex* species. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 20, p. 121-44.
- ALVES, L. F. A.; SANTANA, D. L. Q.; NEVES, P. M. O. J.; OLIVEIRA, R. C. (2000) 2º Congresso Sul-americano da erva-mate e III Reunião Técnica do Cone Sul sobre a Cultura da erva-mate (anais), Porto Alegre: UFRGS/FEPAGRO/ACI Encantado/Prefeitura de Encantado-RS, p. 39-42.
- ANDREWS, S. (1985) A checklist of Aquifoliaceae of Bahia. *Rodriguésia*, vol. 37, n. 63, p. 34-44.
- ARAÚJO, M. C. G. P. (1997) Aspectos ecológicos e evolutivos da interação entre animais e plantas. In: ARAÚJO, M. C. G. P., COELHO, G. C. & MEDEIROS, L. *Interações ecológicas e biodiversidade*, Ijuí-RS: Editora UNIJUÍ, p. 11-48.
- ARGANDOÑA, V. H. & FAINI, F. A. (1993) Oleanolic acid content in *Baccharis linearis* and its effects on *Heliothis zea* larvae. *Phytochemistry*, vol. 33, n. 6, p. 1377-1379.
- ARTAZA, A. N. (1995) La economía yerbatera argentina. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. A.; TARASCONI, L. C. (eds.) *erva-mate - Biología e Cultura no Cone Sul*. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 23-26.
- ASAKA, I.; II, I.; HIROTANI, M.; ASADA, Y.; FURUYA, T. (1994) Ginsenoside contents of plantlets regenerated from *Panax ginseng* embryoids. *Phytochemistry*, vol. 36, n. 1, p. 61-63.
- ASHIHARA, H. (1993) Purine metabolism and the biosynthesis of caffeine in maté leaves. *Phytochemistry*, vol. 33, n. 6, p. 1427-1430.

- ATHAYDE, M. L. (1993) Saponinas e triterpenos em algumas espécies do gênero *Ilex*.
Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Farmácia- UFRGS, Porto Alegre.
- ATHAYDE, M. L. (2000) Metilxantinas e saponinas em quatro populações de *Ilex paraguariensis* A. St-Hil.; triterpenos e saponinas em outras espécies do gênero *Ilex*. Tese de Doutorado, PG em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre-RS.
- ATHAYDE, M. L. COELHO, G. C. & SCHENKEL, E. P. (2000) Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. *Phytochemistry*, vol. 55, n. 7, p. 853-857.
- ATTA-UR-RAHMAN & CHOUDHARY, M. I. (1990) Purine alkaloids. *The alkaloids*, vol. 38, p. 225-323, Academic Press, Inc.
- BALDWIN, I. T. & OHNMEISS, T. E. (1994) Allocation of ^{15}N from nitrate to nicotine: production and turnover of a damage-induced mobile defense. *Ecology*, vol. 75, n. 6, p. 1703-1713.
- BALTASSAT, F.; DARBOUR, N.; FERRY, S. (1984) Étude du contenu purique de drogues a caféine: I. - le maté: *I. paraguariensis* Lamb. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, vol. 18, n. 4, p. 195-203.
- BARBOSA, P.; GROSS, P.; PROVAN, G. J.; STERMITZ, F. R. (1990) Allelochemicals in foliage of unfavored tree hosts of the gypsy moth, *Lymantria dispar* L. 2. Seasonal variation of saponins in *Ilex opaca* and identification of saponin aglycones. *Journal of Chemical Ecology*, vol. 16, n. 5, p. 1731-1738.
- BAUMANN, T. W. & RÖHRIG, L. (1989) Formation and intracellular accumulation of caffeine and chlorogenic acid in suspension cultures of *Coffea arabica*. *Phytochemistry*, vol. 28, n. 10, p. 2667-2669.
- BAUMANN, T. W., SCHULTESS, B. H.; HÄNNI, K. (1994) Guaraná (*Paullinia cupana*) rewards seed dispersers without intoxicating them by caffeine. *Phytochemistry*, vol. 39, n. 5, p. 1063-1070.
- BERENBAUM, M. R. (1986) Postingestive effects of phytochemicals on insects: on Paracelsus and plant products. In: MILLER, J. R. & MILLER, T. A. (org.) *Insect-plant interactions*. New York: Springer-Verlag, p. 121-153.
- BERENBAUM, M. R. & ZANGERL, A. R. (1992) Genetic of secondary metabolism and herbivore resistance in plants. IN: ROSENTHAL, G. A. & BERENBAUM, M. R. *Herbivores - their interactions with secondary plant metabolites*. Vol. II - *Ecological and Evolutionary processes*. 2^a ed., San Diego: Academic Press, p. 415-439 .
- BERGELSON, J. & PURRINGTON, C. B. (1996) Surveying patterns in the cost of resistance in plants. *The American Naturalist*, vol. 148, n. 3, p. 536-558.

- BÉRNATH, J. & TÉTÉNYI, P. (1979) The effect of environmental factors on growth development and alkaloid production of poppy (*Papaver somniferum* L.) I. Responses to day-length and light intensity. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, vol. 174, n. 5-6, p. 468-478.
- BERNAYS, E. A. & GRAHAM, M. (1988) On the evolution of host specificity in phytophagous arthropods. *Ecology*, vol. 69, n. 4, p. 886-892
- BERNAYS, E. A. & JANZEN, D. H. (1988) Saturniid and sphingid caterpillars: two ways to eat leaves. *Ecology*, vol. 69, n. 4, p. 1153-1160.
- BERNAYS, E. A. (1990) Plant secondary compounds deterrent but not toxic to the grass specialist acridid *Locusta migratoria*: implications for the evolution of graminivory. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, vol. 54, n. 1, p. 53-56.
- BERNAYS, E. A. & CORNELIUS, M. (1992) Relationships between deterrence and toxicity of plant secondary compounds for the alfalfa weevil *Hypera brunneipennis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, vol. 64, n. 3, p. 289-292.
- BOETTNER, G. H.; ELKINTON, J. S.; BOETTNER, C. J. (2000) Effects of a biological control introduction on three nontarget native species of saturniid moths. *Conservation Biology*, vol. 14, n. 6, p. 1798-1806.
- BONFLIGLIO, N.; VALDUGA, E.; PAZ, R.; STANKIEWICZ, A.; CECHETTE, D. DIETERICH (1997) AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS efeitos tóxicos do extrato de *Ilex dumosa* Reiss. Parte 2 – determinações hematológicas. I Congresso Sul-americano da Erva-mate e II Reunião Técnica da Erva-mate (anais), Colombo-PR, EMBRAPA-CNPq, p. 413.
- BROWN JR., K. (1992) Borboletas da Serra do Japi: diversidade, habitats, recursos alimentares e variação temporal. In: L. P. C. Morellato (org.) *História Natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil*. Campinas: Edit. da UNICAMP, FAPESP, p. 142-187.
- BROWN, G. D. (1998) The biosynthesis of steroids and triterpenoids. *Natural Products Reports*, p. 653-696.
- BRYANT, J. P.; CHAPIN, F. S.; KLEIN, D. R. (1983) Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos*, vol. 40, p. 357-368.
- CAMACHO, M. & BELLEFLEUR, P. (1996) Aclimatación morfológica a la luz en seis especies arbóreas de los bosques montanos de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, vol. 44, n. 1, p. 71-79.
- CAMARGO, P. N. & SILVA, O. (1990) *Manual de adubação foliar*. São Paulo: Herba.

- CARARETO, C. M. A. & MOURÃO, C. A. (1991) Darwinian fitness in *Drosophila*. I. Fitness components of *Drosophila prosaltans*. *Revista Brasileira de Genética*, vol. 14, n. 3, p. 661-672.
- CARPANEZZI, A. A. (1995) Cultura do mate no Brasil: conflitos e lacunas. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. A.; TARASCONI, L. C.(orgs.) *Erva - Mate: biologia e cultura no Cone Sul*. Ed. da Universidade/UFRGS, Porto Alegre, Brasil, pp. 43-46.
- CHABOUSSOU, F. (1987) *Plantas doentes pelo uso de agrotóxicos: a teoria da trofobiose*. Porto Alegre: LP & M.
- CHOU, C. & WALLER, G. R. (1980) Possible allelopathic constituents of *Coffea arabica*. *Journal of Chemical Ecology*, vol. 6, p. 643-654.
- CHUNG, I.-M.; SEIGLER, D.; MILLER, D. A.; KYUNG, S.-H. (2000) Autotoxic compounds from fresh alfalfa leaf extracts: identification and biological activity. *Journal of Chemical Ecology*, vol. 26, n. 1, p. 315-327.
- CLIFFORD, M. N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J. R. (1990) Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of Maté (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. *Food Chemistry*, vol. 35, n. 1, p. 13-21.
- COELHO, G. C. (1995) Anatomia Foliar e Morfologia de Inflorescências das espécies rio - grandenses de *Ilex* L. (Aquifoliaceae). Dissertação de Mestrado. Curso de Pós - Graduação em Botânica UFRGS, Porto Alegre.
- COELHO, G. C. & MARIATH, J. E. A. (1996) Inflorescences morphology of *Ilex* L. (Aquifoliaceae) species from Rio Grande do Sul, Brazil. *Feddes Repertorium*, vol. 107 n. 1-2. p. 19-30.
- COELHO, G. C.; RACHWAL, M.; SCHNORRENBERGER, E; SCHENKEL, E. P. (2000) Efeito do sombreamento sobre a sobrevivência, morfologia e química da erva-mate. Anais do 2º Congresso Sul-americano e 3ª reunião técnica da Erva Mate, Encantado-RS, Porto Alegre: UFRGS/FEPAGRO/ACI Encantado/Prefeitura de Encantado-RS, p. 396-399.
- COLEY, P. D. (1983) Herbivory and defensive characteristics of tree species in a lowland tropical forest. *Ecological Monographs*, vol. 53, n. 2, p. 209-33.
- COLEY, P. D. (1987) Interspecific variation in plant anti-herbivore properties: the role of habitat quality and rate of disturbance. *New Phytologist*, vol. 106 (supl.), p. 251-263.
- COLEY, P. D.; BRYANT, J. P.; CHAPIN III, F. S. (1985) Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science*, vol. 230 n. 4728 p. 895-9.
- COLLE, S. & PEREIRA, E. B. (1998) Atlas de irradiação solar do Brasil. Brasília: INMET/LABSOLAR. disponível em <www.labsolar.ufsc.br> consultado em 13.08.2002.

- COSTANTIN, M. B. (1995) Análise de saponinas em *Ilex integerrima* Reissek e comparação com *Ilex theezans* Martius. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Farmácia- UFRGS, Porto Alegre.
- CRAWLEY, M. J. (1997) Life history and environment. In: CRAWLEY, M. J. (ed.) *Plant Ecology*. 2^a ed., Cambridge, UK, Blackwell Science Ltd.
- CRONE, E. E.; JONES, C. G. (1999) The dynamics of carbon-nutrient balance: effects of cottonwood acclimation to short and long-term shade on beetle feeding preferences. *Journal of Chemical Ecology*, vol. 25, n. 3, p. 635-656.
- DA CROCE, D. M. (2000) Características físico-químicas da erva-mate no estado de Santa Catarina. Anais do II Congresso Sul-americano da erva-mate e III Reunião Técnica do Cone Sul sobre a Cultura da erva-mate, Porto Alegre: UFRGS/FEPAGRO/ACI Encantado/Prefeitura de Encantado-RS, p. 77-79.
- DE COLL, O. R. & SAINI E. D. (1992) Plagas de la yerba mate e sus enemigos naturales. 1^o Curso de Capacitacion en Produccion de Yerba Mate, Resúmenes Técnicos, Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Cerro Azul, Misiones, p. 73-76.
- DE STEFANI, E.; FIERRO, L.; MENDILAHARSU, M.; RONCO, A.; LARRINAGA, M.T.; BALBI, J. C.; ALONSO, S.; DENEIO-PELLEGRINI, H. 1998. Meat intake, 'mate' drinking and renal cell cancer in Uruguay: A case-control study. *British Journal of Cancer*, vol. 78, n. 9, pp. 1239-1243.
- DEMEYER, K. ; DEJAEGERE, R. (1997) The influence of Ca²⁺/K⁺ balance and light energy on alkaloid content and partitioning in *Datura stramonium*. *Australian Journal of Botany*, vol. 45, n. 1, p. 81-101.
- DÍAZ, S.; CABIDO, M. (2001) Vive la différence: plant functional diversity matters to ecosystem processes. *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 16, n. 11, p. 646-655.
- DUDLEY, R. (1990) Biomechanics of flight in neotropical butterflies: morphometrics and kinematics. *Journal of Experimental Biology*, vol. 150, n. 1, p. 37-53.
- DURIGAN, G. & NOGUEIRA, J. C. B. (1990) Recomposição de matas ciliares. *Série Registros do Instituto Florestal de São Paulo*, n. 4, p. 1-14.
- EDWIN, G.; REITZ, R. (1967) Aquifoliáceas. *Flora Ilustrada Catarinense I (AQUI)*, Itajaí, Herbário Barbosa Rodrigues. 47 p.
- EIBL, B.; FERNANDEZ, R. A.; KOZARIK, J. C.; LUPI, A.; MONTAGNINI, F.; NOZZI, D. (2000) Agroforestry systems with *Ilex paraguariensis* (American holly or yerba mate) and native timber trees on small farms in Misiones, Argentina. *Agroforestry Systems*, vol. 48, n. 1, p. 1-8.

- ESAU, K. (1977). *Anatomy of seed plants*. 2^a ed., New York: John Wiley & Sons.
- ESTIARTE, M; FILELLA, I.; SERRA, J.; PEÑUELAS, J. (1994) Effect of nutrient and water stress on leaf phenolic content of peppers and susceptibility to generalist herbivore *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Oecologia*, vol. 99, n. 3-4, p. 387-391.
- FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia - da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, p. 197-220.
- FEENY, P. P. (1970) Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by wintermoth and caterpillars. *Ecology*, Vol. 51, p. 656-681.
- FEENY, P. P. (1976) Plant apparency and chemical defense. **In:** WALLACE, J. & MANSELL, R. L. *Biochemical interactions between plants and insects*. Recent Advances in Phytochemistry, vol. 10. New York: Plenum Press. p. 1-40.
- FERNÁNDEZ-DÍAZ, C. Y. (1996) Plagas de la Yerba mate. 3^o Curso de Capacitación en Producción, 2-6 de Setembro de 1996, INTA - Estación Experimental Agropecuaria Cerro Azul, Misiones, Argentina, Resumos.
- FERNÁNDEZ-DÍAZ, C. Y. (1997) Perspectivas del manejo integrado de plagas em yerba mate. *Embrapa-CNPF / Documentos*, n. 33, Anais do I Congresso Sul-americano da erva-mate e II Reunião Técnica do Cone Sul sobre a Cultura da erva-mate, 24 a 27 de Novembro de 1997, Curitiba-PR, p. 371-390.
- FERNÁNDEZ-DÍAZ, C. Y.; TRICIO, A. E.; MORAWICKI, P. M. (2000) Insectos asociados ao cultivo de yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) 2^o Congresso Sul-americano da erva-mate e III Reunião Técnica do Cone Sul sobre a Cultura da erva-mate (anais), Porto Alegre: UFRGS/FEPAGRO/ACI Encantado/Prefeitura de Encantado-RS, p. 46-49.
- FERREIRA, F.; VÁZQUEZ; GÜNTNER, C.; MOYNA, P. (1997) Inhibition of the passive diffusion of cholic acid by the *I. paraguariensis* St. Hil. saponins. *Phytotherapy Research*, vol. 11, p. 79-81.
- FILIP, R.; IGLESIAS, D. I. A.; RONDINA, R. B. V.; COUSSIO, J. D. (1983) Análisis de las hojas y tallos de *Ilex argentina* Lillo I. Xantinas. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, vol. 2, n. 2, p. 87-90.
- FILIP, R.; LÓPEZ, P.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. (1998) Mate substitutes or adulterants: study of xanthine content. *Phytotherapy Research*, vol.12, n. 1, p. 129-131.
- FILIP, R.; LOLITO, S. B., P.; FERRARO, G.; FRAGA, C. G. (2000) Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutrition Research*, vol. 20, n. 10, p. 1437-1446.

- FILIP, R.; LÓPEZ, P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. (2001) Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia*, vol. 72, p. 774-778.
- FLAIG, H.; MOHR, H. (1992) Assimilation of nitrate and ammonium by the Scots pine (*Pinus sylvestris*) seedling under conditions of high nitrogen supply. *Physiologia Plantarum*, vol. 84, n. 4, p. 568-576. (CAB abstracts)
- FLORES, S. E. R. (1996a) Incidencia del daño causado por el psílido de la yerba mate, *Gyropsylla spegazziniana*. 3º Curso de Capacitación en Producción de Yerba Mate, Resúmenes, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Cerro Azul, Misiones, p. 117-120.
- FLORES, S. E. R. (1996b) Sistemas de alarma para el control del psílido. 3º Curso de Capacitación en Producción de Yerba Mate, Resúmenes, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Cerro Azul, Misiones, p. 121-124.
- FLOSS, P. A. (1994) Variações genéticas entre populações naturais de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate) avaliadas em Chapecó, SC e Três Barras, SC. Dissertação de Mestrado, ESALQ/USP, Piracicaba, Brasil.
- FOLGARAIT, P. J.; DYER, L. A.; MARQUIS, R. J.; BRAKER, H. E. (1996) Leaf-cutting ant preferences for five tropical plantation tree species growing under different light conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, vol. 80, n. 3, p. 521-530.
- FONG, C. H. & SHYU, Y. S. (1988) Effects of shading percentage and duration on yield, young shoot characteristics and paochung tea quality. *Taiwan Tea Research Bulletin*, n. 7, p. 63-78. (CAB abstracts)
- FOSSATI, L. C. & SOUZA, A. M. (2000) Efeitos de operações de controle da matocompetição em erva-mate plantada. 2º Congresso Sul-americano da erva-mate e III Reunião Técnica do Cone Sul sobre a Cultura da erva-mate (anais), Porto Alegre: UFRGS/FEPAGRO/ACI Encantado/Prefeitura de Encantado-RS, p. 237-240.
- FRETZ, T. A. & DUNHAM, C. W. (1972) Influence of 3 levels of light-intensity on leaf structure, area and color difference in american holly, *Ilex opaca* AIT. cv Miss Helen. *Phyton - International Journal of Experimental Botany*, vol. 30, n. 1-2, p. 135-139.
- FUJIMORI, N. & ASHIRARA, H. (1990) Adenine metabolism and the synthesis of purine alkaloids in flowers of *Camellia*. *Phytochemistry*, vol. 29, n. 11, p. 3513-3516.
- FUTUYMA, D. J. (1996) *Biologia Evolutiva*. 2ª ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/ CNPq.
- GAUER, L. & CAVALLI-MOLINA, S.; (2000) Genetic variation in natural populations of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) using RAPD markers. *Heredity*, vol. 84, n. 6, p. 647-656.

- GERSHENZON, J. & CROTEAU R. (1991) Terpenoids. In: ROSENTHAL, G. A. & BERENBAUM, M. R. (eds.). *Herbivores - their interactions with secondary plant metabolites*. San Diego: Academic Press, p. 165-220.
- GIANOLI, E. & NIEMEYER, H. M. 1997. Environment effects on the accumulation of hydroxamic acids in wheat seedlings: the importance of plant growth rate. *Journal of Chemical Ecology*, vol. 23, n. 2, p. 543-551.
- GIBERTI, G. C. (1979) Las espécies argentinas del género *Ilex* L. (Aquifoliaceae). *Darwiniana*, vol. 22, n. 1-3, p. 217-40.
- GIBERTI, G. C. (1995) Aspectos oscuros de la cronología de *I. paraguariensis* St. Hil. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. A.; TARASCONI, L. C. (orgs.) *Erva-mate - Biología e Cultura no Cone Sul*. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul , p. 289-302.
- GIBERTI, G. C. (1997) Conservación genética de *Ilex* sp em Argentina. *Embrapa-CNPQ / Documentos*, n. 33, Anais do I Congresso Sul-americano da erva-mate e II Reunião Técnica do Cone Sul sobre a Cultura da erva-mate, 24 a 27 de Novembro de 1997, Curitiba-PR, p. 227-242.
- GLENDINNING, J. I. (1996) Is chemosensory essential for the rapid rejection of toxic foods? *The Journal of Experimental Biology*, vol. 199, n. 7, p. 1523-1534.
- GNOATTO, S. C. B.; BASSANI, V. L.; SCHENKEL, E. P. (2000) Análise da influência de diferentes métodos de extração sobre a quantificação de metilxantinas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. 2º Congresso Sul-americano da erva-mate e 3ª Reunião Técnica do Cone Sul sobre a Cultura da erva-mate (anais), Porto Alegre: UFRGS/FEPAGRO/ACI Encantado/Prefeitura de Encantado-RS, p. 400-402.
- GOLLEY, F. B.; MCGINNIS, J. T.; CLEMENTS, R. G.; CHILD, G. I.; DUEVER, M. J. (1978). Ciclagem de Minerais em um Ecossistema de Floresta Tropical Úmida. São Paulo: EDUSP.
- GORALKA, R. J. L. SCHUMAKER, M. A.; LANGENHEIM, J. H. (1996) Variation in chemical and physical properties during leaf development in california bay tree (*Umbellularia californica*): predictions regarding palatability for Deer. *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 24, n. 2, p 93-103.
- GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P.; SELIGMANN, O. (1989) A new saponin from mate, *Ilex paraguariensis*. *Journal of Natural Products*, vol. 52, n. 6, p. 1367-1370.
- GOSMANN, G.; GUILLAUME, D.; TAKETA, A. T. C. & SCHENKEL, E. P. (1995) Triterpenoids saponins from *I. paraguariensis*. *Journal of Natural Products*, vol. 58, n. 3, p. 438-441.
- GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C.; BORIN, M. R. de M. B. (1996) *Biodiversidade: um*

ênfoque químico-biológico. Rio de Janeiro: Editora da UFRJ.

- GREGIANINI, T. S. & WINGE, H. (2000) Variabilidade de proteínas de reserva em populações naturais de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae). 2º Congresso Sul-americano da erva-mate e III Reunião Técnica do Cone Sul sobre a Cultura da erva-mate (anais), Porto Alegre: UFRGS/FEPAGRO/ACI Encantado/Prefeitura de Encantado-RS, p.373-377.
- GROOM, P. K. & LAMONT, B. B. (1997) Xerophytic implications of increased sclerophylly: interactions with water and light in *Hakea psilorrhyncha* seedlings. *New Phytologist*, vol. 136, n. 2, p. 231-237.
- GUERREIRO-FILHO, O. & MAZZAFERA, P. (2000) Caffeine does not protect coffee against the leaf miner *Perileucoptera coffeella*. *Journal of Chemical Ecology*, vol. 26, n. 6, p. 1447-1464.
- GUGLIUCCI, A. & STAHL, A. J. C. (1995) Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. *Biochemistry and Molecular Biology International*, vol. 35, n. 1p. 47-56.
- GUGLIUCCI, A. (1996) Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL In Vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 224, p. 338-344.
- GUILLET, G.; LORENZETTI, F.; BELANGER, A.; ARNASON, J. T.; BERNAYS, E. A. (1997) Production of glands in leaves of *Porophyllum* sp. (Asteraceae): ecological and genetic determinants, and implications for insect herbivores. *Journal of Ecology*, vol. 85, n. 5, p. 647-655.
- HÄGELE, B. F. & ROWELL-RAHIER, M. (1999) Genetic and environmental-based variability in secondary metabolite leaf content of *Adenostyles alliariae* and *A. alpina* (Asteraceae). A test of the resource availability hypothesis. *Oikos*, vol. 85, n. 2, p. 234-246.
- HAN, K. & LINCOLN, D. E. (1994) The evolution of carbon allocation to plant secondary metabolites: a genetic analysis of cost in *Diplacus aurantiacus*. *Evolution*, vol. 48, n. 5, 1550-1663.
- HANSON, H. C. (1917) Leaf structure as related to environment. *American Journal of Botany*, vol. 4, p. 533-560.
- HARTLEY, S. E.; NELSON, K.; GORMAN, M. (1995) The effect of fertiliser and shading on plant chemical composition and palatability to orkney voles, *Microtus arvalis orcadensis*. *Oikos*, vol. 72, n. 1, p. 79-87.
- HARTLEY, S. E. & JONES, C. G. (1997) Plant chemistry and herbivory, or why the world is green. IN: CRAWLEY, M. J. (ed.) *Plant Ecology*. 2ª ed., Blackwell Science, Londres, p. 284-324.

- HEINZMANN, B. M. & SCHENKEL, E. P. (1995) Saponins from *Ilex dumosa*. *Journal of Natural Products*, vol. 58 n. 9 p. 1419-1422.
- HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. (1999) Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia - da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, p. 641- 656.
- HILL, J. K.; THOMAS, C. D.; LEWIS, O. T. (1999) Flight morphology in fragmented populations of a rare British butterfly, *Hesperia comma*. *Biological Conservation*, vol. 87, p. 227-283
- HOAGLAND, R. E., ZABLOTOWICZ, R. M.; REDDY, K. N. (1996) Studies of the phytotoxicity of saponins on weed and crop plants. IN: WALLER, G. R. & YAMASAKI, K. (eds.) *Saponins used in food and agriculture*. series Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 405, Plenum Press, New York, p. 57-73.
- HÖFT, M.; VERPOORTE, R.; BECK, E. (1996) Growth and alkaloids contents in leaves of *Tabernaemontana pachysiphon* Stapf (Apocynaceae) as influenced by light intensity, water and nutrient supply. *Oecologia*, vol. 107, n. 2, p. 160-169.
- HÖFT, M.; VERPOORTE, R.; BECK, E. (1998) Growth and alkaloid patterns of roots of *Tabernaemontana pachysiphon* and *Rauvolfia mombasiana* as influenced by environmental factors. *Botanica Acta*, vol. 111, n. 3, 222-230.
- HOSTETTMANN, K. & MARSTON, A. (1995) *Saponins*. Cambridge University Press, Cambridge, Grã-Bretanha.
- INMET – Instituto Nacional de Meteorologia (2002) Climatologia. Disponível no endereço <http://www.inmet.gov.br>.
- ITOYAMA, M. M. & BICUDO, E. M. C. (1992) Effects of caffeine on fecundity, egg laying capacity, development time and longevity in *Drosophila prosaltans*. *Revista Brasileira de Genética*, vol. 15, n. 2, p. 303-321.
- JAIN, D. C. & TRIPATHI, A. K. 1991. Insect feeding-deterrent activity of some saponin glycosides. *Phytotherapy Research*, vol. 5, n. 3, pp.139-141.
- JANA, B. K.; VARGHESE, B. (1996). Effect of mineral nutrition on growth and alkaloid content of *Catharanthus roseus*. *Indian Agriculturist*, 1996, vol. 40, n. 2, p. 93-99. (CAB abstracts)
- JANSEN, M. P. T. & STAMP, N. E. (1997) Effects of light availability on host plant chemistry and the consequences for behavior and growth of an insect herbivore. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, vol. 82, p. 319-333.

- JANZEN, D. H. ; JUSTER, H. B.; BELL, E. A. (1977) Toxicity of secondary compounds to the seed-eating larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. *Phytochemistry*, vol. 16, n. 2, p. 223-227.
- JOHNSON, K. S. & FELTON, G. W. (2001) Plant phenolics as dietary oxidants for herbivorous insects: a test with genetically modified tobacco. *Journal of Chemical Ecology*, vol. 27, n. 12, p. 2579-2597.
- KAGEYAMA, P. Y.; CASTRO, C. F. A.; CARPANEZZI, A. A. (1989) Implantação de matas ciliares: estratégias para auxiliar a sucessão secundária. Fundação Cargill, Anais do Simpósio sobre Mata Ciliar, Campinas-SP, p. 130-143.
- KAGEYAMA, P. Y. e VIANA, V. M. (1989) Tecnologia de sementes e grupos ecológicos de espécies arbóreas tropicais. Série documentos da Secretaria do Meio Ambiente do estado de São Paulo (Instituto Florestal); Anais do II Simpósio brasileiro sobre tecnologia de sementes florestais, Atibaia (SP), 16 a 19 de Outubro de 1989, p. 197-215.
- KAGEYAMA, P. Y.; REIS, A.; CARPANEZZI, A. A. (1992) Potencialidades e restrições da regeneração artificial na recuperação de áreas degradadas. Anais do Simpósio Nacional de Recuperação de Áreas Degradadas, UFPR/FUPEF, Curitiba, 25 a 29 de outubro de 1992, p. 1-7.
- KAINULAINEN, P.; HOLOPAINEN, J.; PALOMÄKI, V.; HOLOPAINEN, T. (1996) Effects of nitrogen fertilization on secondary chemistry and ectomycorrhizal state of scots pine seedlings and on growth of grey pine aphid. *Journal of Chemical Ecology*, vol. 22, n.4, p. 617-636. (CAB abstracts)
- KATO, A.; CROZIER, A.; ASHIRARA, H. (1994) Subcellular localization of the N-3 methyl-transferase involved in caffeine biosynthesis in tea. *Phytochemistry*, vol. 48, n. 5, p. 777-779.
- KENSIL, C. R.; PATEL, U. LENNICK, M.; MARCIANI, D. (1991) Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. *The Journal of Immunology*, vol. 146, n. 2, p. 431-437.
- KHAN, M. B. & HARBORNE, J. B. (1991) Potassium deficiency increases tropane alkaloid synthesis in *Atropa acuminata* via arginine and ornithine decarboxylase levels. *Phytochemistry*, vol. 30, n. 11, p. 3559-3563.
- KINGSOLVER, J. G. (1987) Evolution and coadaptation of thermoregulatory behavior and wing pigmentation pattern in pierid butterflies. *Evolution*, vol. 4, p. 472-490.
- KITAJIMA, K. (1994) Relative importance of photosynthetic traits and allocation patterns as correlates of seedling shade tolerance of 13 tropical trees. *Oecologia*, vol. 98, n. 3-4, p. 419-428.

- KOZLOWSKY, T. T. & PALLARDY, S. G. (1997) *Physiology of woody plants*. 2ª ed., Academic Press, San Diego, E.U.A.
- KNAPP, E. E.; RICE, K. J. (1998) Comparison of Isozymes and quantitative traits for evaluating patterns of genetic variation in purple needlegrass (*Nassella pulchra*). *Conservation Biology*, vol. 12, n. 5, p. 1031-1041.
- KRAEMER, K. H. TAKETA, A. T. C.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; GUILLAUME, D. (1996) Matessaponin 5, a highly polar saponin from *I. paraguariensis*. *Phytochemistry*, vol. 42, n. 4, p. 1119 - 1122.
- KUMAR, N. S.; HEWAVITHARANAGE, P.; ADIKARAM, N. K. B. (1995) Attack on tea by *Xyleborus fornicatus*: inhibition of the symbiote, *Monacrosporium ambrosium*, by caffeine. *Phytochemistry*, vol. 40, n. 4, p. 1113-1116.
- LABSOLAR/UFSC (2002) Atlas de irradiação solar do Brasil. Laboratório de Energia Solar/ Núcleo de Controle Térmico de Satélites/ Departamento de Engenharia Mecânica, UFSC. disponível em <www.labsolar.ufsc.br> consultado em 13.08.2002.
- LARA, F. M. (1991) *Princípio de resistência de plantas a insetos*. 2ª ed. São Paulo: Ícone Editora.
- LATA, B.; SADOWSKA, A. (1996) Effect of N, P, K and Zn foliar fertilization on the yield of *Catharanthus roseus* L. (G) Don. *Folia Horticulturae*, vol. 8, n. 2, p. 51-58. (CAB abstracts)
- LAUKKANEN, H.; JULKUNEN, T. R.; HOHTOLA, A. (1997) Effect of different nitrogen nutrients on the viability, protein synthesis and tannin production of Scots pine callus. *Physiologia Plantarum*, vol. 100, n. 4 p. 982-988. (CAB abstracts)
- LETORNEAU, D. K.; DYER, L. A. (1998) Experimental test in lowland tropical forest shows top-down effects through four trophic levels. *Ecology*, vol. 79, n. 5, p. 1678-1687.
- LI, T. S. C. & MAZZA, G. (1999) Correlations between leaf and soil mineral concentrations and ginsenoside contents in american ginseng. *Hortscience*, vol. 34, n. 1, p. 85-87.
- LINHARES, T. (1969) *Histórica econômica do mate*. Rio de Janeiro: José Olympio Editora.
- LOVELOCK, C. E.; JEBB, M.; OSMOND, C. B. (1994) Photoinhibition and recovery in tropical plant species: response to disturbance. *Oecologia*, vol. 97, p. 297-307.
- MAFRA, A. L.; MIKLÓS, A. A. W.; VOCURCA, H. L.; HARKALY, A. H.; MENDOZA, E. (1998) Adição de nutrientes ao solo em sistema agroflorestal do tipo “cultivo em aléias” e em cerrado na região de Botucatu, SP. *Scientia Forestalis*, vol. 54, p. 41-54.

- MALGOR, L. A.; VALSECIA, M.; VERGES, E.; HARTMAN, I.; MARKOWSKY, E.; LÓPEZ-CAMPANHER, A. G.; MENDOZA, L. (2000) Estudio de las acciones farmacológicas de una espécie de yerba mate: *Ilex dumosa* Reiss. 2º Congresso Sul-americano da erva-mate e III Reunião Técnica do Cone Sul sobre a Cultura da erva-mate (anais), Porto Alegre: UFRGS/FEPAGRO/ACI Encantado/Prefeitura de Encantado-RS, p. 406-409.
- MARTIN, R.; LILLEY, T. H.; FALSHAW, C. P.; HASLAM, E.; BEGLEY, M. J.; MAGNOLATO, D. (1987) The caffeine-potassium chlorogenate molecular complex. *Phytochemistry*, vol. 26, n. 1, p. 273-279.
- MARTINET, A.; NDJOKO, K.; TERREAUX, C.; MARSTON, A. HOSTETTMANN, K.; SCHUTZ, Y. (2001) NMR and LC-MS characterization of two minor saponins from *Ilex paraguariensis*. *Phytochemical Analysis*, vol. 12, n. 1, p. 48-52.
- MARX, F., MAIA J. G. (1990) Analysis (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) III. Identification and determination of guarana beverages by hplc analysis of caffeine and theophylline. *Química Nova*, vol.13, n. 4, p. 285-286.
- MAZZAFERA, P.; CROZIER, A.; MAGALHÃES, A. C. (1991) Caffeine metabolism in *Coffea arabica* and other species of coffee. *Phytochemistry*, vol. 37, n. 6, p. 1577-1584.
- MAZZAFERA, P. (1994) Caffeine, theobromine and theophylline distribution in *Ilex paraguayensis*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, vol. 6, p. 149-151.
- MAZZAFERA, P.; WINSGLE, G.; OLSSON, O.; SANDBERG, G. (1994) S-adenosyl-1-methionine: theobromine 1-N-Methyltransferase, an enzyme catalysing the synthesis of coffeine in coffee. *Phytochemistry*, vol. 37, n. 6, p. 1577-1584.
- MAZZAFERA, P. (1999) Mineral nutrition and caffeine content in coffe leaves. *Bragantia*, vol. 58, n. 2, p. 387-391.
- MENDIVE, J. R., FONDOVILLA, M. E. & DEULOFEU, V. (1943) El llamado tanino de la Yerba Mate (*I. paraguariensis*) - un producto cristalino que da por hidrolisis acido cafeico. *Anales de la Asociación Química Argentina*, vol. 31, n. 161, p. 99-108.
- MIRANDA, G. B. (1997) Associação entre componentes do valor adaptativo de *Heliconius ethilla narcaea* (Lepidoptera; Nymphalidae) e passifloráceas utilizadas na alimentação das larvas. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal, UFRGS, Porto Alegre.
- MIRANDA, H. M. L.; GOMEZ, I.; LOYOLA, V. V. M. (1996) Effect of inorganic nitrogen source on ammonium assimilation enzymes of *Catharanthus roseus* plants. *Phyton*, vol. 58: n. 1-2, p. 125-133. (CAB abstracts)

- MIYATAKE, T. (1993) Male-male aggressive behavior is changed by body size difference in the leaf-footed plant bug, *Leptoglossus australis*, Fabricius (Heteroptera: Coreidae). *Journal of Ethology*, v. 11, n. 1, p. 63-65.
- MOORE, A. J. (1990) The evolution of sexual dimorphism by sexual selection: the separate effects of intrasexual selection and intersexual selection. *Evolution*, vol. 44, n. 2, p. 315-331.
- MORRIS, O. N.; TROTTIER, M.; MCLAUGHLIN, N. B.; CONVERSE, V. (1994) Interaction of caffeine and related compounds with *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* in bertha armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, vol. 87, n. 3, p. 610-617.
- MORGAN, E. D. & WARTHEN JR., J. D. (1990) Insect feeding deterrents - Part B: insect feeding deterrents (1980-1987) IN: MORGAN, E. D. & MANDAVA, N. B. *Handbook of Natural Pesticides* Vol VI. Insect attractants e repellents, CRC Press, Boca Raton, E.U.A. p. 83-134.
- MOSELE, S. H.; DOSSA, D.; MONTOYA, L. (2000) Sistemas agroflorestais com erva-mate no município de Áurea. *Perspectiva* (Erechim), vol. 24, n. 88, p. 109-124.
- MULKEY, S. S.; WRIGHT, S. J.; SMITH, A. P. (1993) Comparative physiology and demography of three neotropical forest shrubs: alternative shade-adaptative character syndromes. *Oecologia*, vol. 96, n. 4, p. 526-536.
- MURAOKA, H.; TANG, Y.; KOIZUMI, H.; WASHITANI, I. (1997) Combined effects of light and water availability on photosynthesis and growth of *Arisaema heterophyllum* in the forest understory and an open site. *Oecologia*, vol. 112, n. 1, p. 26-34.
- MUTINELLI, A. (1990) Biometria foliar de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil. var. *paraguariensis*). *Nota Técnica* (INTA - Cerro Azul-Misiones) 43, p. 1-16.
- NAGEL, C. W.; HERRICK, I. W.; GRABER, W. R. (1987) Is the chlorogenic acid bitter? *Journal of Food Science*, vol. 52, n. 1, p. 213.
- NAKATANI, M.; HATANAKA, S.; KOMURA, H.; KUBOTA, T.; HASE, T. (1989) The structure of rotungenoside, a new bitter triterpene glucoside from *Ilex rotunda*. *Bulletin of Chemical Society of Japan*, vol. 62, p. 469-473.
- NATHANSON, J. A. (1984) Caffeine and related methylxanthines: possible naturally occurring pesticides. *Science*, vol. 226, n. 4671, p. 184-187.
- NDAMBA, J.; LEMMICH, E.; MOLGAARD, P. (1994) Investigation of the diurnal, ontogenetic and seasonal variation in the molluscicidal saponin content of *Phytolacca dodecandra* aqueous berry extracts. *Phytochemistry*, vol 35, n. 1, p. 95-99.

- NIINEMETS, U. (1997) Role of foliar nitrogen in light harvesting and shade tolerance of four temperate deciduous woody species. *Functional Ecology*, vol. 11, n. 4, p. 518-531.
- NOZZOLILLO, C.; ARNASON, J. T.; CAMPOS, F.; DONSKOV, N.; JURZYSTA, M. (1997) Alfalfa leaf saponins and insect resistance. *Journal of Chemical Ecology*, vol. 23, n. 4, p. 995-1023.
- NUMATA, A.; KITAJIMA, A.; KATSUNO, T. (1987) An antifeedant for the yellow butterfly larvae in *Chamellia japonica*: a revised structure of camellidin II. *Chemistry Pharmaceutical Bulletin*, vol. 35, n. 9, p. 3948-3951.
- NURMI, K.; OSSIPOV, V.; HAUKIOJA, E.; PIHLAJA, K. (1996) Variation of total phenolic content and individual low-molecular-weight phenolics in foliage of mountain birch trees (*Betula pubescens* ssp. *tortuosa*). *Journal of Chemical Ecology*, vol. 22, n. 11, p. 2023-2040.
- OHEM, N., HÖLZL, J. (1988) Some new investigations on *Ilex paraguariensis*: flavonoids and triterpenes. *Planta Medica*, vol. 54, n. 6, p.576.
- OHNMEISS, T. E. & BALDWIN, I. T. (1994) The allometry of nitrogen allocation to growth and an inducible defense under nitrogen-limited growth. *Ecology*, vol. 75, n. 4, p. 995-1002.
- OHTA, K. & HARADA, K. (1996) Studies on environmental conditions of tea plants cultivated by hydroponics. Effects of irradiation and night temperature on free amino acids contents and plant growth. *Environment Control in Biology*, vol. 34, n. 3, p. 179-190.
- OLDFIELD, M. L. (1989). *The value of conserving genetic resources*. Sunderland: Sinauer Associates.
- OSUNKOYA, O. O. & ASH, J. E. (1991) Acclimation to a change in light regime in seedlings of 6 australian rain-forest tree species. *Australian Journal of Botany*, vol. 39, n. 6, p. 591-605.
- OWUOR, P. O.; OTHIENO, C. O.; HOWARD, G. E. ; ROBINSON, J. M.; COOKE, R. D. (1988) Studies on the use of shade in tea plantations in Kenya: effects on chemical composition and quality of made tea. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 46, n. 1, p. 63-70.
- PANDOLFO, C. M.; FLOSS, P. A.; DA CROCE, D. M. (2000) Resposta da erva-mate a níveis de nitrogênio, fósforo, potássio e esterco de aves, em um latossolo roxo distrófico. . Anais do 2º Congresso Sul-americano e 3ª reunião técnica da Erva Mate, Encantado-RS, Porto Alegre: UFRGS/FEPAGRO/ACI Encantado/Prefeitura de Encantado-RS, p. 20-23.
- PAULA, R. D. de G. & BROOKS, G. (1953) Bioquímica do Mate - O tanóide do Mate - isolamento e identificação, *Revista de Química Industrial*, (Abril, 1953), p. 72-74.

- PELLETIER, S. W. (1983) The nature and definition of an alkaloid. In: Pelletier, S. W. (ed.) *Alkaloids: chemical and biological perspectives*. New York: Wiley.
- PESCADOR, A. R. (1993) The effects of a multispecies sequential diet on the growth and survival of a tropical polyphagous caterpillar. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, vol. 67, n. 1, p. 15-24.
- PETERSEN, P.; TARDIN, J. M.; MAROCHI, F. (2000) From maté extractivism to the regenerative management of Araucária forests. *ILEIA Newsletter*, vol. 16, n. 3, pp. 17-18.
- PODOLSKI, R. H. (2001) Genetic variation for morphological and allozyme traits in relation to population size in *Clarkia dudleyana*, an endemic annual. *Conservation Biology*, vol. 15, n. 2 p. 412-423.
- POTTER, D. A. & KIMMERER, T. W. (1989) Inhibition of herbivory on young holly leaves: evidence for the defensive role of saponins. *Oecologia*, vol. 78, n. 3, p. 322-329.
- PRAT KRICUN, S. D. & BELINGHERI, L. D. (1995) Aplicación de nitrógeno en plantaciones de yerba mate con diferentes densidades. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. A.; TARASCONI, L. C. (orgs.) *Erva-mate - Biología e Cultura no Cone Sul*. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul , p. 73-80.
- PRAT KRICUN, S. D.; LEHMANN, E. A.; SCIPIONI, G. P.; ARGÜELLO, B. V. (2000) Actividad de peroxidases em *Ilex dumosa*. Anais do II Congresso Sul-americano da erva-mate e III Reunião Técnica do Cone Sul sobre a Cultura da erva-mate, Porto Alegre: UFRGS/FEPAGRO/ACI Encantado/Prefeitura de Encantado-RS, p. 348-351.
- RACHWAL, M. F. G.; CURCIO, G. R.; DEDECEK, R. A.; NIETSCHKE, K.; FILHO, F. E. S.; VOGEL, R. C. (1997) Influência da luminosidade sobre a produtividade da erva-mate em latossolo vermelho-amarelo em São Mateus do Sul-PR. I Congresso Sul-americano da Erva-mate e II Reunião Técnica da Erva-mate (anais), Colombo-PR, EMBRAPA-CNPQ, p. 445.
- RACHWAL, M. F. G.; CURCIO, G. R.; DEDECEK, R. A.; NIETSCHKE, K.; RADOMSKI, M. I. (2000) Influência da luminosidade sobre os teores de macronutrientes e tanino em folhas de erva-mate. 2º Congresso Sul-americano da erva-mate e 3ª Reunião Técnica do Cone Sul sobre a Cultura da erva-mate (anais), Porto Alegre: UFRGS/FEPAGRO/ACI Encantado/Prefeitura de Encantado-RS, p. 417-420.
- RALPHS, M.H.; MANNERS, G. D.; GARDNER, D. R. (1998) Influence of light and photosynthesis on alkaloid concentration in larkspur. *Journal Chemical Ecology*, vol. 24, n. 1, p. 167- 182.
- RANSEY, J. C. & BERLIN, J. D. (1976) Ultrastructure of early stages of cotton fiber differentiation. *Botanical Gazette*, vol. 137, n.1, p. 11-19.

- RATES, S. M. K. (1999) Metilxantinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia - da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, p. 723-738.
- REGINATTO, F. H.; ATHAYDE, M. L.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. (1999) Methylxanthines accumulation in *Ilex* species – Caffeine and theobromine in erva-mate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* species. *Journal of The Brazilian Chemical Society*, vol. 10, n. 6, p. 443-446.
- REGINATTO, F. H. (2000) Saponinas em *Passiflora alata* Dryander. Tese de Doutorado, PG em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre-RS
- RESENDE, M.D. V.; STURION, J. A.; CARVALHO, A. P.; SIMEÃO, R. M.; FERNANDES, J. S. C. (1997) Avaliação genética de populações, progênies, indivíduos e clones de erva-mate no Paraná. 2º Congresso Sul-americano da erva-mate e 3ª Reunião Técnica do Cone Sul sobre a Cultura da erva-mate (anais), Porto Alegre: UFRGS/FEPAGRO/ACI Encantado/Prefeitura de Encantado-RS, p. 57-59.
- RICCO, R. A.; WAGNER, M. L. & GURNI, A. A. (1991) Estudio comparativo de flavonoides em seis especies austrosudamericanas del género *Ilex*. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, vol. 10, n. 1, p. 29-35.
- RICCO, R. A., WAGNER, M. L., GURNI, A. A. (1995) Estudio comparativo de flavonoides en especies austrosudamericanas del género *Ilex*. In: WINGE, H., FERREIRA, A. G., MARIATH, J. E. A., TARASCONI, L. C., eds. *Erva-mate - Biología e Cultura no Cone Sul*. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 243-249.
- RHODES, M. J. C. (1994) Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. *Plant Molecular Biology*, vol. 24, p. 1-20.
- RHOADES, D. F. & CATES, R. G. (1976) Toward a general theory of plant antiherbivore chemistry. In: J. W. WALLACE & R. L. MANSELL (ed.) *Biochemical interaction between plants and insects*. Plenum, New York.
- RODRIGUES, G. S. (2001) Impacto das atividades agrícolas sobre a biodiversidade: causas e conseqüências. In: GARAY, I. & DIAS, B. (orgs.) *Conservação da Biodiversidade em Ecosistemas tropicais*. Petrópolis: Vozes, p. 128-139.
- RUAN, J. Y.; WU, X.; HARDTER, R. (1999). Effects of potassium and magnesium nutrition on the quality components of different types of tea. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 79 n. 1, p. 47-52.
- SAEKI, T.; KOIKE, K.; NIKAIDO, T. (1999) A comparative study on commercial, botanical gardens and wild samples of the roots of *Platycodon grandiflorum* by HPLC analysis. *Planta Medica*, vol. 65, n. 5, p. 428-431.

- SALAS, M. L.; CORCUERA, L. J.; ARGANDONA, V. H. (1990) Effect of potassium nitrate on gramine content and resistance of barley against the aphid *Schizaphis graminum*. *Phytochemistry*, vol. 29, n. 12, p. 3789-3791.
- SAN MARTIN, R. & BRIONES, R. (2000) Quality control of commercial quillaja (*Quillaja saponaria* Molina) extracts by reverse phase HPLC. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 80, p. 2063-2068.
- SANTOS, G. P.; ANJOS, N.; ZANÚNCIO, J. C. (1988) Biologia de *Hylesia nanus* (Walker, 1855) (Lepidoptera: Attacidae), desfolhadora de cutieira (*Joannesia princeps*: Euphorbiaceae). *Revista Ceres*, vol. 35, n. 201, p. 479-485.
- SCARPATI, M. L. & GUIISO, M. (1964) Structure of the three dicaffeoyl-quinic acids of Coffee (Isochlorogenic acid). *Tetrahedron Letters*, vol. 6 n. 39 p. 2841-2853.
- SCHENKEL, E. P.; ATHATDE, M. L.; GIBERTI, G. C.; GUILLAUME, D. (1995) A new saponin from *Ilex argentina*. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, vol. 14, n. 1, p. 5-9.
- SCHENKEL, E. P., MONTANHA, J. A., GOSMANN, G. (1996) Triterpene saponins from maté, *I. paraguariensis*. In: WALLER, G. R., YAMASAKI, K., (eds.) *Saponins used in food and agriculture*. New York: Plenum Press, Series Advances in Experimental Medicine and Biology, v. 405, p. 47-56.
- SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MONTANHA, J. A., HEIZMANN, B. M., ATHAYDE, M. L., TAKETA, A. T. C., PIRES, V. S., GUILLAUME, D. (1997) Saponins from maté (*I. paraguariensis*) and other south american *Ilex* species: ten years research on *Ilex* saponins. *Ciência e Cultura*, vol 49, n. 5/6, p. 359-363.
- SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. (1999) Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (orgs.) *Farmacognosia - da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, p. 597-622.
- SCHINELLA, G. R.; TROIANI, G.; DÁVILA, V.; DE BUSCHIAZZO, P. M.; TORNIER, H. A. (2000) Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 269, p. 357-360.
- SCHMALKO, M. E.; RAMALHO, L. A. SMORCZEWSKI, M. VALDEZ, E. C.; PAREDES, A. M. (2000). Contenido de nutrientes em la yerba mate. Anais do II Congresso Sul-americano da erva-mate e III Reunião Técnica do Cone Sul sobre a Cultura da erva-mate, Porto Alegre: UFRGS/FEPAGRO/ACI Encantado/Prefeitura de Encantado-RS, p. 74-76.
- SCHOONHOVEN, L. M. (1990) Insects in a chemical world. In: E. D. MORGAN & N. B. MANDAVA (eds.) *Handbook of natural Pesticides*. Boca Raton (E. U. A.): CRC Press, Vol. VI – Insects Attractants and Repellents, p. 1-23.

- SCHULTESS, B. H.; MORATH, P.; BAUMANN, T. W. (1996) Caffeine biosynthesis starts with the metabolically channelled formation of 7-methyl-XMP - a new hypothesis. *Phytochemistry*, vol. 41, n. 1, p 169-175.
- SLANSKY Jr., F. (1991) Allelochemical-nutrient interactions in herbivore nutritional ecology. In: ROSENTHAL, G. A. & BERENBAUM, M. R. (eds.) *Herbivores - their interactions with secondary plant metabolites*. Vol. II - *Ecological and Evolutionary processes*. 2^a ed. San Diego: Academic Press.
- SMALL, E. (1996) Adaptations to herbivory in alfalfa (*Medicago sativa*). *Canadian Journal of Botany*, vol. 74, n. 6, p. 807-822.
- SMITH, L. G. & HAKE, S. (1994) Molecular approaches to leaf development: Knotted and beyond. *Canadian Journal of Botany*, vol. 72 n. 5, p. 617-625.
- SOUZA, A. M. & FOSSATI, L. C. (2000) A evolução da legislação da erva-mate e seus constrangimentos. 2^o Congresso Sul-americano da erva-mate e III Reunião Técnica do Cone Sul sobre a Cultura da erva-mate (anais), Porto Alegre: UFRGS/FEPAGRO/ ACI Encantado/ Prefeitura de Encantado-RS, p. 192-195.
- SPIEGEL, M. R. (1993) *Estatística*. 3^a ed., São Paulo: Makron Books.
- SUZUKI, T.; ASHIRARA, H. & WALLER, G. R. (1992) Purine and purine alkaloids metabolism in *Camellia* and *Coffea* plants. *Phytochemistry*, vol. 31, n. 8, p. 2575-2584.
- SWARTZ, M. E., KRULL, I. S. (1997) *Analytical method development and validation*. New York: Marcel Dekker.
- SWAIN, T. (1977) Secondary compounds as protective agents. *Annual Review of Plant Physiology*, vol. 28, p. 479-501.
- TAKETA, A. T. C. (1997) Saponinas de *Ilex brevicuspis* Reissek. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas- UFRGS, Porto Alegre.
- TAKETA, A. T. C. (2001) Phytochemical investigation on the triterpenes and triterpenoid glycosides from the fruits and leaves of South American *Ilex* species. Tese de Doutorado, Universidade de Bonn, Alemanha.
- TAKETA, A. T. C. & SCHENKEL, E. P. (1994) Saponins from *Ilex pseudobuxus*. *Acta Farmacêutica Bonaerense*, vol. 13, n. 3, p. 159-164.
- TAKETA, A. T. C. & SCHENKEL, E. P. (1995) Saponinas de *Ilex taubertiana*. *Revista Brasileira de Farmácia*, vol. 76, n. 1, p. 9-11.

- TAKETA, C. S. C.; TAKETA, A. T. C.; SCHENKEL, E. P.; SPIKER, V. (1998) Untersuchungen zum n bitteren prinzip der matépflanze (*I. paraguariensis*) und einiger als Verfälschung eigesetzter anderer Ilexspezies. *Lebensmittelchemie*, vol. 52, p. 20.
- TAMMARU, T. (1998) Determination of adult size in a folivorous moth: constraints at instar levels? *Ecological Entomology*, vol. 23, n. 1, p. 80-89.
- TANG, R. N. & TANG, X. L. (1987) Studies of ecological benefits of interplanting slash pine in a tea plantation. *Journal of Nanjing Forestry University*, n. 2, p. 35-44. (CAB abstracts)
- TORMEN, M. J. (1995) Economia ervateira argentina. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. A.; TARASCONI, L. C. (orgs.) *erva-mate - Biologia e Cultura no Cone Sul*. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul , p. 27-40.
- USHER, B. F. & FEENY, P. (1983) Atypical secondary compounds in the family Cruciferae: tests for toxicity to *Pieris rapae*, and adapted crucifer-feeding insect. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, vol. 34, n. 3, p. 257-265.
- VAN DONGEN, S.; SPRENGERS, E.; LÖFSTEDT, C.; MATTHYSEN, E. (1999) Fitness components of male and female winter moths (*Operophtera brumata* L.) (Lepidoptera, Geometridae) relative to measures of body size and asymmetry. *Behavioral Ecology*, vol. 10, n. 6, p. 659-665.
- VÁZQUEZ, A., MOYNA, P. (1986) Studies on mate drinking. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 18, p. 267-272.
- VERZA, S. G. (2001) Quantificação de metilxantinas em progênes meio-irmãs de *Ilex paraguariensis* A. St. Hilaire cultivadas em duas regiões do estado do Rio Grande do Sul. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Farmácia, UNIJUÍ – Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí-RS.
- VIVAN, J. (1998) *Agricultura e florestas – princípios de uma interação vital*. Guaíba: AS-PTA/Livraria e Editora Agropecuária.
- VRIELING, K.; VAN WIJK, C. A. M. (1994) Cost assesment of the production of pyrrolizidine alkaloids in ragwort (*Senecio jacobaea* L.). *Oecologia*, vol. 97, p. 541-546.
- WALDHAUSER, S. S. M. & BAUMMANN, T. W. (1996) Compartmentation of caffeine and related purine alkaloids depends exclusively on the physical chemistry of their vacuolar complex formation with chlorogenic acids. *Phytochemistry*, vol. 42, n. 4, p. 985-996.
- WALKER, D. J.; BLACK, C. R.; MILLER, A. J. (1998) The role of cytosolic potassium and pH in the growth of barley roots. *Plant Physiology*, vol. 118, n. 3, p. 957-964. (CAB abstracts)
- WALTERS, M. B. & REICH, P. B. (1996) Are shade tolerance, survival, and growth linked? Low light and nitrogen effects on hardwood seedlings. *Ecology*, vol. 77, n. 3, p. 841-853.

- WANG, K.; GONG, Z.; LU, Y.; WANG, K. R.; GONG, Z. Q.; LU, Y.W. (1993) Effect of combining application of fertilizers to red field on tea yield and quality. *Journal of Tea*, vol. 19, n. 4, p. 12-17. (CAB abstracts)
- WARTHEN Jr., J. D. (1990) Insect feeding deterrents - Introduction to part A and B, Part A: insect feeding deterrents (1976-1980) In: MORGAN, E. D. & MANDAVA, N. B. (eds.) *Handbook of Natural Pesticides*, Boca Raton, E.U.A: CRC Press, Vol VI. Insect Attractants e Repellents, p. 23-82.
- WASSERTHAL, L. (1975) The role of butterfly wings in regulation of body temperature. *Journal of Insect Physiology*, vol. 21, p. 1921-1930.
- WOODARD, W. A. & COWLAND, A. N. (1935) The question of tannin in Maté. *The analyst*, vol. 60, p. 135-46.
- WINGE, H.; WOLHEIM, C. ; CAVALLI-MOLINA, S.; ASSMANN, E. M.; BASSANI, K. L. L.; AMARAL, M. B.; COELHO, G. C.; FREITAS-SACCHET, A. M. O.; BUTZKE, A.; VALDUGA, A. T.; MARIATH, J. E. A. (1995) Variabilidade genética em populações nativas de Erva-mate e a implantação de bancos de germoplasma. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. A.; TARASCONI, L. C. (orgs.) *Erva-mate - Biologia e Cultura no Cone Sul*. Porto Alegre, Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 323-346.
- WINGE, H. (1997) Conservação genética da erva-mate no Brasil. *Embrapa-CNPQ / Documentos*, n. 33, Anais do I Congresso Sul-americano da erva-mate e II Reunião Técnica do Cone Sul sobre a Cultura da erva-mate, 24 a 27 de Novembro de 1997, Curitiba-PR, p. 173-226.
- WINK, M. (1997) Special nitrogen metabolism. In: DEY, P. M. & HARBORNE, J. B. (1997) *Plant biochemistry*. London: Academic Press, p. 439-486.
- WINK, M.; SCHMELLER, T.; LATZ-BRÜNING, B. (1998) Modes of action of allelochemical alkaloids: interaction with neuroreceptors, DNA, and other molecular targets. *Journal of Chemical Ecology*, vol. 24, n. 11, p. 1881-1937.
- WU, X.; RUAN, J. Y. (1995) Physiological effects of potassium and magnesium on tea plants. *China Tea*, vol. 17, n. 4, p. 18-19. (CAB abstracts)
- ZAR, J. H. (1999) *Biostatistical Analysis*. 4^a ed., New Jersey: Prentice Hall.
- ZERA, A. J.; DENNO, R. F. (1997) Physiology and ecology of dispersal polymorphism in insects. *Annual Review of Entomology*, vol. 42, p 207-231.

Anexos

ARTIGOS PUBLICADOS:

COELHO, G. C.; ATHAYDE, M. L.; SCHENKEL, E. P. (2001) Methylxanthines of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. var. *vestita* Loes. and var. *paraguariensis*.

Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 37, n. 2, p. 153-158

COELHO, G. C.; RACHWAL, M.; SCHNORRENBERGER, E; SCHENKEL, E. P. (2000) Efeito do sombreamento sobre a sobrevivência, morfologia e química da erva-mate. Anais do 2º Congresso Sul-americano e 3ª reunião técnica da Erva Mate, Encantado-RS, Porto Alegre: UFRGS/FEPAGRO/ACI Encantado/Prefeitura de Encantado-RS, pp. 396-399.

COELHO, G.; MARIATH, J. E. A.; SCHENKEL, E. P. (2002) Populational diversity on leaf morphology of maté (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae)

Brazilian Archives in Biology and Technology , vol. 45, n. 1, p. 47-51.