



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Florestas
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 1676-9449

Novembro, 2001

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 8

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE METILXANTINAS E ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE SEIS "VARIEDADES" POPULARES DE ERVA-MATE.

Jessé Boquett Lagos
Maria Cristina M. Mazza
Tomoe Nakashima
Moacir J. S. Medrado
Fábio Melo Rosa Amaral

Colombo, PR
2001

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Florestas

Estrada da Ribeira km 111 - CP 319

83411-000 - Colombo, PR - Brasil

Fone: (41) 666-1313

Fax: (41) 666-1276

Home page: www.cnpf.embrapa.br

E-mail (sac): sac@cnpf.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Moacir José Sales Medrado

Secretário-Executivo: Guiomar Moreira Braguinha

Membros: Antônio Carlos de S. Medeiros, Edilson B. de Oliveira, Erich G. Schaitza, Honorino R. Rodigheri, Jarbas Y. Shimizu, José Alfredo Sturion, Patrícia P. de Mattos, Sérgio Ahrens, Susete do Rocio C. Penteado

Supervisor editorial: Moacir José Sales Medrado

Revisor de texto: Elly Claire Jansson Lopes

Normalização bibliográfica: Lidia Woronkoff

Tratamento de ilustrações: Cleide Fernandes de Oliveira

Editoração eletrônica: Cleide Fernandes de Oliveira

1ª edição

1ª impressão: 500 exemplares - Ano 2001

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Lagos, Jessé Boquett

Determinação do teor de metilxantinas e análise da variabilidade genética de seis "variedades" populares de erva-mate / Lagos Jessé Boquett [et al.]. – Colombo: Embrapa Florestas, 2001.

18 p. ; 21 cm. ; (Embrapa. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 8).

Contém bibliografia

ISSN 1676-9449

1. Ilex paraguariensis-metilxantinas. 2. Erva-mate-café. 3. Erva-mate-metilxantinas. 4. Erva-mate-DNA. 5. Marcador RAPD. 6. Erva-mate-variabilidade genética. I. Mazza, Maria Cristina M. II. Nakashima, Tomoe. III. Medrado, Moacir J. S. IV. Amaral, Fábio Melo Rosa. V. Título. VI. Série.

CDD 633.77

© Embrapa Florestas 2001

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
1. Introdução	7
2. Materiais e Métodos	8
2.1. Coleta	8
2.2. Extração de metilxantina	9
2.3. Cromatografia em camada delgada (CCD)	9
2.4. Doseamento de metilxantinas e cafeínas	9
2.5. Análise estatísticas	10
2.6. Extração do DNA genômico	10
2.7. RAPD	10
2.8. Análise do polimorfismo obtido por RAPD	11
3. Resultado e Discussão	12
3.1. Doseamento de metilxantinas, cafeína e CCD	12
3.2. RAPD	15
4. Conclusões	16
5. Referências Bibliográficas	17

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE METILXANTINAS E ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE SEIS “VARIÉDADES” POPULARES DE ERVA-MATE.

Jessé Boquett Lagos¹

Maria Cristina M. Mazza²

Tomoe Nakashima³

Moacir J. S. Medrado⁴

Fábio Melo Rosa Amaral⁵

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram determinar os conteúdos de metilxantinas e cafeína em folhas maduras de seis “variedades” populares de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae) e avaliar a distância genética entre estas diferentes “variedades” por meio de marcadores RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*). A concentração de metilxantinas foi determinada por espectrofotometria UV e a de cafeína por cromatografia gasosa. Foram estudadas seis “variedades” de erva-mate: nativa, folha grande, folha brilhosa, talo-roxo e folha cobre (consideradas variedades botânicas *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*) e a “variedade” peluda (considerada variedade botânica *Ilex paraguariensis* var. *vestita*). A “variedade” folha cobre apresentou o maior conteúdo de metilxantinas (1,65 g%) e de cafeína (1,29 g%). A “variedade” peluda mostrou o menor teor de metilxantinas (0,25 g%) e de cafeína (0,06 g%). A diferença entre a quantidade de metilxantinas e cafeína deve-se provavelmente ao conteúdo das outras metilxantinas presentes na erva-mate, como a teobromina e a teofilina. Estas diferenças não foram observadas através de marcadores RAPD. De acordo com as análises do

¹ Acadêmico de Farmácia Industrial da UFPR, Estagiário da *Embrapa Florestas*.

² Zootecnista, Mestre, Pesquisadora Resp. pelo Lab. de Genética Molecular - *Embrapa Florestas*

³ Farmacêutica Bioquímica Industrial, Doutora, Professora do Departamento de Farmácia da UFPR.

⁴ Engenheiro-agrônomo, Doutor, Pesquisador da *Embrapa Florestas*.

⁵ Acadêmico de Ciências Biológicas da UFPR, Estagiário da *Embrapa Florestas*

polimorfismo gerado pelo marcador RAPD, foram formados dois grupos distintos, os quais mostraram 58% de similaridade entre eles, utilizando o coeficiente de Jaccard. Um dos grupos incluiu as "variedades" folha cobre, peluda e nativa e o outro as "variedades" folha grande, brilhosa e talo roxo.

PALAVRAS-CHAVE: *Ilex paraguariensis*, metilxantinas, cafeína, DNA, RAPD, variabilidade genética.

METHYLXANTHINES CONTENT AND GENETIC VARIABILITY OF SIX POPULAR "VARIETIES" OF MATE.

ABSTRACT

The objectives of this study were to determinate the content of methylxanthines and caffeine in the mature leafs of popular "varieties" of maté (*Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae) and to evaluate the genetic distance between the different varieties by RAPD markers (*Random Amplified Polimorphic DNA*). The methylxanthines and caffeine contents were determined by UV spectrophotometry and gas chromatography respectively. It was studied six popular "varieties" of maté: native, big leaf, bright leaf, purple stem and copper leaf (considered botanical varieties *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*) and the "variety" hairy (considered botanical variety *Ilex paraguariensis* var. *vestita*). The copper leaf "variety" presented the highest content of methylxanthines (1,65 g%) and caffeine (1,29 g%). The hairy "variety" showed the lowest content of methylxanthines (0,25 g%) and caffeine (0,06 g%). The difference between methylxanthines and caffeine amounts presented is probably due to the content of the other methylxanthines present in maté, as theobromine and theophylline. These differences were not noticed by RAPD markers. According to the analyses of polymorphism generated by RAPD was found two distinct groups which showed 58% of similarity between each other, using Jaccard's coefficient. The native, hairy and copper leaf "varieties" form the first group and the big leaf, bright leaf and purple stem "varieties" form the second group.

KEY WORDS: maté, *Ilex paraguariensis*, methylxanthines, caffeine, DNA, RAPD, genetic variability.

1. INTRODUÇÃO

Os programas de manejo e melhoramento de recursos genéticos de *Ilex paraguariensis* carecem de informações básicas sobre o comportamento do padrão fitoquímico e a variabilidade genética, passíveis de serem correlacionados com a qualidade industrial do produto e incorporado aos trabalhos de melhoramento.

Explorada em 486 municípios do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul, a erva-mate abastece 725 indústrias, gerando 710.000 empregos e movimentando R\$ 180 milhões de recursos por ano. A atividade ervateira tem uma grande importância econômica, principalmente para os três Estados do Sul, estando presente em 180 mil propriedades rurais, na maior parte pequenas e médias. Além disso, apresenta condições de se expandir, ocupando maiores áreas, desde que sejam ampliados e abertos novos mercados, não só com a produção da erva-mate para chimarrão ou chás, mas com sua utilização para diversos outros fins (Neumann, 1999).

A produção de cafeína pura, para uso na indústria farmacêutica, em laboratórios de pesquisa e na fabricação de bebidas pode abrir um mercado extremamente rentável. A identificação de árvores com alta concentração de cafeína, por exemplo, pode permitir a implantação de ervais para atender a um mercado diferenciado à base de cafeína, como a indústria de cosméticos. Da mesma forma, plantas com baixo teor de cafeína poderiam ser usadas para mate descafeinado. Porém, existem poucas informações sobre a variação do conteúdo de metilxantinas para usos futuros e alternativos da erva-mate quando se consideram as "variedades".

Uma grande variabilidade tem sido associada ao germoplasma de erva-mate, principalmente devido à sua ampla distribuição natural, ocupando 5% do território nacional e 3% da América do Sul (considerando também a ocorrência em território argentino e paraguaio). Tem sido observada, visualmente, grande variabilidade fenotípica em populações de erva-mate, principalmente quanto às características cor do talo da folha (roxo, branco ou amarelo), tamanho da folha (grandes ou pequenas), pilosidade das folhas (com pelos, sem pelos) e susceptibilidade à queda-de-folhas. Técnicos e produtores envolvidos com a silvicultura da espécie têm se referido a esta variabilidade com o termo

"variedades" de erva-mate (Resende *et al.*, 1995). Estas "variedades" ocorrem simultaneamente no mesmo erval e são utilizadas sem distinção pela indústria ervateira. Estudos recentes, utilizando marcadores RAPD, em populações do Mato Grosso, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, tem mostrado alta variabilidade genética na espécie (Gauer, 1999). Entretanto, pouco se conhece sobre a variabilidade obtida por marcadores moleculares quando se consideram as "variedades". Esse estudo teve como principais objetivos determinar a concentração de metilxantinas, por espectrofotometria UV, e de cafeína, por cromatografia gasosa, das folhas maduras de seis "variedades" populares de erva-mate e também avaliar a distância genética entre estas "variedades" por meio de marcadores RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Coleta

Na Indústria Ervateira Bitumirim - Fazenda Vila Nova, em Ivai - PR, coletou-se o terço médio de ramos do ano, de duas árvores de cada "variedade": nativa, folha grande, folha brilhosa, talo-roxo, folha cobre e peluda. As "variedades" nativa, folha grande, folha brilhosa, talo-roxo e folha cobre referem-se a variedades botânicas *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* e a "variedade" peluda refere-se à variedade botânica *Ilex paraguariensis* var. *vestita*. Foram feitas excisas das "variedades" coletadas, as quais se encontram disponíveis no herbário da *Embrapa Florestas*. Os ramos foram levados ao laboratório onde separaram-se as folhas para as análises fitoquímica e molecular. Para a análise fitoquímica, as folhas foram secadas a 60 °C por 10 h, moídas em moinho com tamiz de malha 1 mm e conservadas em frasco de vidro até o início da extração das metilxantinas. Para a análise de RAPD, as folhas foram limpas com hipoclorito de sódio a 10%, enxaguadas com água destilada, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até o momento da extração do DNA. Nesta análise, utilizou-se apenas uma árvore de cada "variedade", selecionando as árvores que estavam mais próximas entre si no campo.

2.2. Extração de metilxantinas

A extração foi realizada segundo a metodologia descrita por Valduga (1995), com pequenas modificações. Pesou-se 2 g de material foliar de cada amostra e aqueceu-se em banho-maria a 50 °C durante 15 minutos, com 4 ml de ácido sulfúrico p.a. Adicionou-se 30 ml de água destilada e levou-se ao agitador mecânico por mais 15 minutos. Em seguida, o material foi filtrado a quente. O papel de filtro foi lavado com duas porções de 10 ml de solução aquosa de ácido sulfúrico a 2,5%. Após resfriamento, o filtrado foi neutralizado com solução de hidróxido de amônio 25% até pH 10 e extraído com 20 ml de clorofórmio por 5 minutos, 4 vezes consecutivas. Em seguida, a solução clorofórmica foi dessecada com sulfato de sódio anidro. Recolheu-se o filtrado em balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com clorofórmio.

2.3. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para o acompanhamento da extração das metilxantinas utilizaram-se cromatoplasas Merck com adsorvente Silica gel 60 F₂₅₄ (art. 1.05554). As alíquotas de 10 ml do extrato clorofórmico e do padrão de cafeína Merck dissolvido em clorofórmio (500 mg/ml) foram levadas ao banho-maria a 50 °C até a secura, ressuspensas em diclorometano: metanol (6:4) e aplicados na cromatoplasa com o auxílio de tubos capilares. A fase móvel utilizada foi toluol: acetato de etila: dietilamina (7:2:1) e o visualizador iodo-iodeto de potássio, de acordo com Wagner (1996).

2.4. Doseamento de metilxantinas e cafeína

O doseamento da cafeína isoladamente presente nas folhas das variedades analisadas foi feito em cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama, modelo CG 370, acoplado a integrador processador modelo CG 200, segundo metodologia descrita por Mayer (1996), com coluna de vidro de 6 pés de comprimento, 1/8" de diâmetro, fase estacionária 2,5 % DC 200 + 2,5% QF-1 e suporte Chv : W-AW DMCS. Já o doseamento das metilxantinas foi realizado em espectrofotômetro UV Perkin Elmer Lambda 20. O extrato clorofórmico foi diluído dez vezes e foi medida a absorvência a 276,5 nm em cubetas de quartzo de 1 cm, usando clorofórmio como branco.

2.5. Análise estatística

Foi realizado ANOVA do delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos (variedades) e duas repetições (amostras). Foram realizados os testes F e DMS para comparação das médias dos teores de metilxantinas e cafeína. Os dados experimentais foram transformados em raiz quadrada do dado mais dez unidades para os dois parâmetros (metilxantinas e cafeína) para obtenção dos coeficientes de variação. O programa estatístico usado foi o MSTATC.

2.6. Extração do DNA genômico

O método de extração utilizado foi baseado em Ferreira & Gratapaglia (1996). O material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido. Transferiu-se 0,15 g do pó das folhas obtido e usou-se o detergente CTAB (*cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide*) no tampão de extração. Para retirar as proteínas solúveis e carboidratos, em sua maioria, foi utilizada a mistura clorofórmio - álcool isoamílico em três lavagens. A precipitação do DNA foi realizada pela adição de isopropanol absoluto gelado. O DNA obtido foi lavado em etanol 70%, ressuspensionado em Tris-EDTA (TE) pH 8,0 e quantificado por espectrofotometria UV a 260 e 280 nm. A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

2.7. RAPD

As condições de amplificação de RAPD utilizadas foram as mesmas utilizadas por Vasconcelos (1995). O termociclador foi programado para executar 40 ciclos a 94 °C por 15 s, 35 °C por 30 s e 72 °C por 60 s. Ao final desses ciclos, incluiu-se uma extensão final a 72 °C por 7 minutos. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e fotografado em luz UV com filme polaróide 667. Realizou-se uma seleção prévia dos primers com maior número de bandas e mais polimórficos, utilizando o total de 113 *primers* da Operon Technologies Inc. Destes, foram selecionados os dez melhores para a análise da variabilidade genética. Os *primers* utilizados encontram-se listados na Tabela 1.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores – *primers* (Operon Thechnologies Inc.)

<i>Primers</i>	<i>Sequência 5'→3'</i>
OPA-01	CAGGCCCTTC
OPA-02	TGCCGAGCTG
OPA-03	AGTCAGCCAC
OPB-08	GTCCACACGC
OPB-11	GTAGACCCGT
OPB-15	GGAGGGTGTT
OPB-17	AGGGAACGAG
OPE-07	AGATGCAGCC
OPE-15	ACGCACAACC
OPF-03	CCTGATCACC

2.8. Análise do polimorfismo obtido por RAPD

A análise da variabilidade genética foi realizada pelo agrupamento das "variedades", segundo os princípios adotados em taxonomia numérica. Utilizou-se o coeficiente de similaridade de Jaccard, que permite calcular similaridades com base em variáveis binárias (0 para ausência e 1 para presença de bandas). As bandas foram consideradas variáveis enquanto as "variedades" como unidades. As unidades foram agrupadas através do método UPGMA - "*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*" (Sneath & Sokal, 1973), que é um modelo de agrupamento hierárquico que permite a construção de dendrogramas. Matrizes e dendrogramas foram elaborados segundo programa NTSYS – "*Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs*" (Rohlf, 1988).

3. Resultados e Discussão

3.1. Doseamento de metilxantinas, cafeína e CCD

A realização da CCD mostrou o padrão de cafeína por uma mancha marrom com Rf de 0,43. Foi demonstrada a presença de cafeína nas extrações de metilxantinas das amostras, pois revelaram-se manchas similares ao padrão de cafeína Merck. Também foi observada sob luz UV (ondas curtas) a presença de teobromina nas extrações de metilxantinas pela extinção da fluorescência, porém a teobromina não foi revelada com o visualizador utilizado.

O resultado dos doseamentos de metilxantinas e cafeína das duas amostras de cada "variedade" podem ser observadas nas tabelas 3 e 4.

Tabela 2: Análise da variância

Fontes da variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Metilxantinas	5	0,011
Cafeína	5	0,012

* F-teste significativo a nível de 5% de probabilidade de erro tipo I

Para a comparação entre médias utilizou-se o teste DMS a nível de 5% de probabilidade de erro tipo I (Tabelas 2 e 3), justificado em função do teste F ter dado significativo (Tabela 2). Os coeficientes de variação foram de 1,35% e 1,31% respectivamente, para metilxantinas e cafeína.

Tabela 3: Doseamento de metilxantinas em folhas de seis "variedades" de erva-mate por espectrofotometria UV em 276,5 nm

Variedade	Amostra	g% de Metilxantinas	Média *	DPM
Folha cobre	2	1,63	1,65 ^A	0,021
	5	1,66		
Folha grande	1	1,77	1,38 ^{AB}	0,552
	7	0,99		
Brilhosa	3	1,14	1,26 ^{AB}	0,163
	6	1,37		
Talo roxo	4	0,75	0,88 ^{BC}	0,184
	12	1,01		
Nativa	9	1,13	0,84 ^{BC}	0,410
	11	0,55		
Peluda	8	0,29	0,25 ^C	0,057
	10	0,21		

DPM: Desvio padrão da média

* Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste DMS, a 5% de probabilidade de erro tipo I.

Tabela 4: Doseamento de cafeína em folhas de seis "variedades" de erva-mate determinada por cromatografia gasosa.

Variedade	Amostra	g% de Cafeína	Média *	DPM
Folha cobre	2	1,17	1,29 ^A	0,170
	5	1,41		
Folha grande	3	0,92	1,13 ^A	0,290
	6	1,33		
Brilhosa	1	1,31	1,00 ^{AB}	0,445
	7	0,68		
Talo roxo	4	0,55	0,39 ^{BC}	0,226
	12	0,23		
Nativa	9	0,54	0,30 ^{BC}	0,339
	11	0,06		
Peluda	8	0,06	0,06 ^C	0,007
	10	0,05		

DPM: Desvio padrão da média

* Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste DMS, a 5% de probabilidade de erro tipo I.

As "variedades" que apresentaram maior e menor conteúdo de metilxantinas e cafeína são respectivamente a folha cobre e a peluda, diferindo entre si a 5% de probabilidade de erro tipo I. Analisando as tabelas 3 e 4, pode ser notado o mesmo padrão na concentração dos alcalóides púricos, demonstrando ser a cafeína o principal deles presente nas amostras, com exceção da "variedade" nativa (amostra 11). A diferença nos valores do doseamento de metilxantinas e cafeína pode ser devida à presença das outras metilxantinas presentes na erva-mate, como a teobromina e a teofilina.

Os baixos teores de cafeína encontrados na "variedade" peluda (*Ilex paraguariensis* var. *vestita*) mostram-se coerentes em relação aos dados apresentados por Reginatto et al. (1999). Após a realização de estudos com maior amostragem de indivíduos e de procedências que confirmem os resultados

obtidos, pode ser aberta a possibilidade de a indústria ervateira implementar ervais com a variedade *vestita*, como uma alternativa ecológica e barata de obtenção de mate, com baixíssimo conteúdo de cafeína, a qual pode ser utilizada como matéria-prima de produtos em que se deseje essa característica. Da mesma forma quando for desejada a característica de alto conteúdo de cafeína, sugere-se que sejam realizados outros estudos com mais indivíduos e procedências para que se possa confirmar a utilização da "variedade" folha cobre para esse fim. Essa matéria-prima com alto conteúdo de cafeína pode ser utilizada em usos alternativos da erva-mate, como para a extração da cafeína na sua forma pura ou ser utilizado o extrato obtido desse material nas indústrias farmacêutica e cosmeceutica.

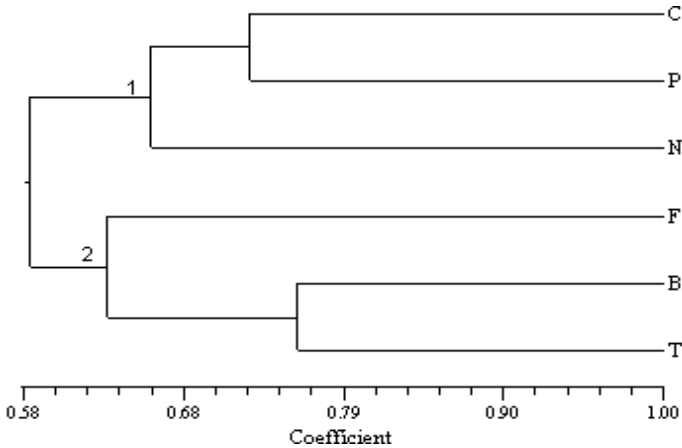
A erva-mate é rica em metabólitos secundários de interesse industrial e medicinal como as saponinas e a cafeína. Essas características podem ser incorporadas aos trabalhos de melhoramento associados à produção de massa foliar, tendo em vista os usos alternativos dessa espécie.

3.2. RAPD

O número de bandas formado pelos *primers* variou de 5 a 16, gerando 107 fragmentos utilizados na análise do polimorfismo. O dendrograma obtido pelo índice de Jaccard, mostrando o grau de similaridade genética entre as "variedades" estudadas, pode ser visualizado na Figura 1.

Na Figura 1 observou-se a formação de dois grupos distintos. A separação entre esses dois principais grupamentos apresenta similaridade de 58%. O grupamento 1 foi formado pelas "variedades" folha cobre, peluda e nativa e o grupamento 2 foi formado pelas "variedades" folha grande, brilhosa e talo roxo. No grupamento 1, houve a separação a 66 % entre a nativa e as "variedades" folha cobre e peluda, as quais apresentaram 70% de similaridade. Interpretando o grupamento 2, nota-se que a "variedade" folha grande apresentou-se mais distante, geneticamente, que os representantes das "variedades" brilhosa e talo roxo, sendo esses indivíduos 77 % semelhantes. Os grupos não mostraram correspondência em relação ao conteúdo de cafeína, pois as "variedades" que apresentaram os valores extremos de cafeína, foram reunidas dentro do mesmo grupamento (Figura 1).

Figura 1. Dendrograma obtido pelo índice de Jaccard, mostrando o grau de similaridade genética entre as "variedades" estudadas, onde: C = folha cobre; P = peluda; N = nativa; F = folha grande; B = brilhosa; T = talo roxo.



Os resultados obtidos necessitam ser confirmados em estudos mais aprofundados, utilizando marcadores moleculares que forneçam maiores informações, abrangendo mais completamente o genoma da erva-mate. Também mostrou-se necessária uma amostragem mais adequada em termos de número de indivíduos por variedade. Estes dados poderão ser importantes em programas de melhoramento e, conseqüentemente, poderão fornecer maiores esclarecimentos sobre a produção de cafeína na erva-mate.

4. CONCLUSÕES

As "variedades" que apresentaram maior e menor conteúdo de metilxantinas e cafeína são respectivamente a folha cobre (*Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis*) e a peluda (*Ilex paraguariensis* var. *vestita*).

A análise de RAPD mostrou uma proximidade genética (58%) presente entre as "variedades" estudadas, porém esta proximidade não apresentou correlação com os teores de alcalóides púricos, presentes nas folhas de erva-mate, nas condições deste ensaio. Serão necessários estudos futuros, utilizando maior

número de amostras e ampliando o número de *primers*, para esclarecer melhor a relação genética entre estas "variedades".

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem uma possível diferenciação nos teores de alcalóides púricos entre as "variedades avaliadas. Esta informação, se confirmada em estudos futuros, utilizando uma maior amostragem de indivíduos e procedências no doseamento de alcalóides púricos, evidencia o potencial de utilização da variedade peluda (*Ilex paraguariensis* var. *vestita*), quando se desejar matéria prima com baixos teores de cafeína, e da variedade cobre, para usos alternativos da erva-mate que exigem altos teores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética*. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1996. 220 p. (EMBRAPA-CENARGEM. Documento 20).

GAUER, I. *Variabilidade genética em populações naturais de erva-mate usando marcadores RAPD*. 1999. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MAYER, G. U.; MÜLLER JÚNIOR, S. A.; FERRÃO, M. F.; SCHNEIDER, R. C. S.; ADAIME, M. B. *A química da erva-mate*. In: HOPPE, M.; KARNOPP, E.; MEDRADO, M. J. S. Erva-mate: diagnóstico e perspectivas de desenvolvimento. Venâncio Aires: Prefeitura Municipal, 1996. p. 23- 34.

NEUMANN, R. I. *Anuário brasileiro da erva-mate*. Santa Cruz do Sul: Gazeta Grupo de Comunicações, 1999. Não paginado.

REGINATTO, F. H.; ATHAYDE, M. L.; GOSMANN, G. SCHENKEL, E. P. *Methylxanthines accumulation in Ilex species – caffeine and theobromine in erva-mate (Ilex paraguariensis) and other Ilex species*. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 10, n. 6, p. 443-446, 1999.

RESENDE, M. D. V. de; STURION, J. A.; MENDES, S. ***Genética e melhora-mento da erva-mate (Ilex paraguariensis St. Hil.)***. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 1995. 33 p. (EMBRAPA-CNPQ. Documentos, 25)

ROHLF, J. ***NTSYS-PC: numerical taxonomy and multivariate analysis system***. New York: Exeter, 1988. Não paginado.

SNEATH, P. H. A.; SOCKAL, R. R. ***Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification***. San Francisco : W.H. Freeman and Co., 1973. 573 p.

VALDUGA, E. ***Caracterização química e anatômica da folha de Ilex paraguariensis St. Hil. e de algumas espécies utilizadas na adulteração do mate***. 1995. 97 f. Tese (Mestrado em Tecnologia Química) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

VASCONCELOS, M. J. V. ***Avaliação da variabilidade genética de cultivares de feijão (Phaseolus vulgaris L.) pelo uso de marcadores moleculares RAPD***. 1995. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Setor de Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. ***Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas***. Berlin: Springer-Verlag, 1983. 320 p.