

## EFEITO DA INTENSIDADE LUMINOSA E DA MODIFICAÇÃO GENÉTICA NO PERFIL METABÓLICO DE ERVA MATE QUÍMICA MODIFICADA: MODELOS MULTIVARIADOS ASCA ASSOCIADOS COM PLANEJAMENTO DE MISTURAS

Gustavo G. Marcheafave<sup>1</sup>; Rafaela Godoy<sup>2</sup>; Ieda S. Scarminio<sup>1</sup>; Roy E. Bruns<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, São Paulo, Brasil, 13083-970

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil, 86057-970

**Palavras-Chave:** *Ilex paraguariensis*; cafeína; sombreamento.

### Introdução

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) é uma planta nativa da América do Sul, desempenhando um papel socioeconômico crucial nos países do extremo sul da América Latina, incluindo Argentina, Chile, Brasil e Paraguai. Utilizada para a produção de bebidas tradicionais como chá mate e chimarrão, a erva-mate é consumida através da infusão de suas folhas em água quente ou fria. No Brasil, a planta é nativa de regiões de clima temperado, resistindo a baixas temperaturas nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, embora também ocorra em outras regiões (Cardozo, 2021).

Numerosos estudos científicos têm demonstrado os benefícios do consumo da erva-mate, o que a torna um componente valioso em formulações farmacológicas e alimentícias (Bracesco et al., 2011). A erva-mate é amplamente utilizada na produção de cosméticos, alimentos e outros produtos devido às suas atividades farmacológicas, como propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimutagênicas e antiobesidade. Esses benefícios são atribuídos à sua composição química diversificada, que inclui polifenóis, saponinas, óleos essenciais, alcaloides, vitaminas, magnésio e muitos outros compostos (Croge, Cuquel, Pintro, 2020; Heck e Mejía, 2010).

Esses compostos podem ser categorizados em dois grupos principais: metabólitos primários, envolvidos nas vias metabólicas essenciais como açúcares, ácidos carboxílicos e aminoácidos, e metabólitos secundários, que não têm função direta no crescimento vegetal, mas respondem a fatores ambientais (Melo et al., 2020; Aguiar, 2021). O consumo da erva-mate é amplamente justificado por seu efeito estimulante e antioxidante, atribuído aos polifenóis como o ácido clorogênico e às xantinas como cafeína e teobromina (Gullón et al., 2018).

A cafeína é conhecida por seus efeitos benéficos e estimulantes no corpo humano, incluindo a redução da fadiga, aumento do estado de alerta e diminuição do tempo de reação. O consumo moderado de cafeína está associado à redução do risco de cirrose, câncer, depressão e até mesmo doença de Parkinson. No entanto, altas concentrações de cafeína podem causar efeitos adversos como insônia, ansiedade, nervosismo, tremores e aumento da pressão arterial (van Dam et al., 2020). Diante dos benefícios e potenciais malefícios da cafeína, o controle químico ou a eliminação de metabólitos específicos, como a cafeína, é uma estratégia atraente para atender diferentes perfis de consumidores (de Almeida et al., 2023). Dessa forma, surgem novos cultivares de erva mate com composições químicas únicas e premeditadas para um público específico.

Tradicionalmente, a erva-mate é cultivada em sistemas agroflorestais, onde diversas espécies agrícolas e arbóreas são cultivadas de forma intercalada, proporcionando melhorias químicas e biológicas no solo (Barbosa et al., 2017). No entanto, a planta também pode ser cultivada em monocultura, o que permite maior rendimento, mas expõe a planta a intensa radiação solar, causando danos nas folhas e alterações metabólicas indesejadas (Croge, Cuquel, Pintro, 2020).

A composição química da erva-mate varia conforme fatores externos como temperatura, disponibilidade de água, nutrientes e intensidade de luz. Esses fatores afetam a fisiologia da planta e os metabólitos primários, impactando os metabólitos secundários e, conseqüentemente, alterando a qualidade final da erva-mate (Rakocevic, Janssens, Schere, 2012). Compreender como os metabólitos de plantas quimicamente modificadas são afetados por mudanças ambientais permite melhorar a qualidade do produto e compreender como as alterações genéticas se comportam no novo material vegetal (de Almeida, et al., 2023).

Para obter perfis metabólicos das folhas de erva mate, a técnica espectrofotométrica na região UV-Vis, que apresenta baixo custo e pode explorar padrões de metabólitos que absorvem luz em diferentes comprimentos de onda foi associada à extração em fase sólida com fase móvel sequencial delineada por planejamento estatístico de misturas. Associada a métodos quimiométricos, os perfis espectrais obtidos permitem identificar padrões e características de interesse. A interpretação dos dados espectrais foi realizada por metodologia ASCA (*ANOVA-Simultaneous Component Analysis*). O procedimento de extração/separação dos compostos foi realizado com diferentes misturas de solventes para obter maior variedade de perfis químicos (Tormena et al., 2019).

O objetivo deste trabalho foi investigar a diferença metabólica entre a erva-mate quimicamente modificada com baixas concentrações de cafeína e a erva-mate com alta concentração de cafeína, cultivadas sob diferentes níveis de luz (0% e 82% de sombreamento). O método quimiométrico ASCA foi utilizado para avaliar a significância estatística, ao nível de 95% de confiança, das diferenças entre os perfis metabólicos UV-vis das plantas nas diferentes condições de cultivo.

## **Material e Métodos**

### **Coleta de material**

As folhas de erva-mate utilizadas foram clones de alta (EC40) e baixa cafeína (EC22) desenvolvidos pelo programa de melhoramento genético da Embrapa Florestas de Colombo. As folhas de alta cafeína continham 2,35 g de cafeína por 100 g de amostra, enquanto as de baixa cafeína apresentavam 0,02 g de cafeína por 100 g de amostra (Wendling et al., 2018; Sturion et al., 2017). As plantas cresceram em Colombo, Paraná, Brasil (25°20'S, 49°14'O, 950 m acima do nível do mar) sob estufa com temperatura entre 13 °C e 37 °C (média de 25,3 °C) e umidade relativa do ar  $\geq 85\%$ . Foram cultivadas em canais semi-hidropônicos com leitos de areia, conforme Wendling et al. (2007), com 44 plantas por metro quadrado, espaçadas a 15 cm. As plantas foram sombreadas com telas de polietileno (0% e 82% de sombreamento). Todas as folhas foram secas em forno micro-ondas.

### **Preparo das amostras e sistema extrator**

A extração foi realizada em triplicata, com três colunas de extração em fase sólida. As colunas, feitas de polipropileno, continham um filtro de poro de 20  $\mu\text{m}$ , 500 mg de sílica gel (0,060-0,20 mm; Acros Organics) e outro filtro de poro de 20  $\mu\text{m}$ . A sílica foi pré-condicionada com 1 mL de metanol (Jardim, 2010). As folhas foram trituradas, peneiradas e 0,25 g de cada amostra foram adicionadas a cada coluna de extração. Para a extração dos metabólitos da erva-mate, foi utilizado um planejamento estatístico de misturas envolvendo quatro solventes: etanol (E), diclorometano (D), acetato de etila (A) e hexano (H). Foram preparados 15 solventes e misturas de solventes com suas proporções detalhadas na Tabela 1.

**Tabela 1** – Solventes e suas proporções em ordem crescente de força de fase móvel

Notação do solvente	Solventes				$\epsilon^\circ$
	Etanol	Diclorometano	Acetato de Etila	Hexano	
<b>H</b>	0	0	0	1	0,01
<b>DH</b>	0	1/2	0	1/2	0,21
<b>HA</b>	0	0	1/2	1/2	0,29
<b>DAH</b>	0	1/3	1/3	1/3	0,33
<b>D</b>	0	1	0	0	0,42
<b>EDH</b>	1/3	1/3	0	1/3	0,43
<b>EH</b>	1/2	0	0	1/2	0,44
<b>EDAH</b>	1/4	1/4	1/4	1/4	0,47
<b>EHA</b>	1/3	0	1/3	1/3	0,49
<b>DA</b>	0	1/2	1/2	0	0,50
<b>A</b>	0	0	1	0	0,58
<b>EDA</b>	1/3	1/3	1/3	0	0,62
<b>ED</b>	1/2	1/2	0	0	0,65
<b>EA</b>	1/2	0	1/2	0	0,73
<b>E</b>	1	0	0	0	0,88

### Extração

As colunas contendo as amostras foram eluídas com 6 mL de cada solvente, seguindo a ordem determinada pelo parâmetro de força de fase móvel ( $\epsilon^\circ$ ) para cromatografia líquido-sólido. A sequência de eluições foi organizada de acordo com o aumento da força cromatográfica (Barwick, 1997). Os detalhes das proporções de solvente e seus valores de força de fase móvel estão apresentados na Tabela 1 em ordem crescente. Os primeiros 3 mL de cada solvente foram descartados para evitar contaminação residual. A eluição dos solventes foi realizada sem interrupção, sem permitir a secagem das colunas. Cada clone, sob um determinado nível de iluminação, resultou em 45 frascos de amostra. Os extratos obtidos foram armazenados em refrigeração no freezer até a análise espectral UV-Vis.

### Espectrofotometria UV-vis

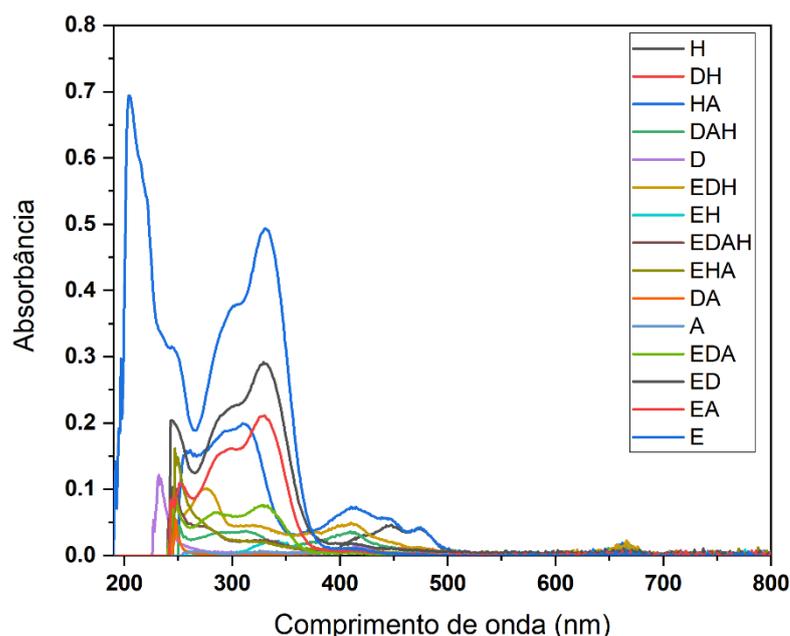
As análises das amostras foram conduzidas na região de absorção molecular UV-visível utilizando o Espectrofotômetro UV-Vis Evolution 60S (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Foi utilizada uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm, e o software associado ao UV-vis foi o VISION Lite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). As amostras foram diluídas na proporção de 200  $\mu\text{L}$  de amostra para 2

mL do respectivo solvente de cada extrato. Os espectros foram obtidos no intervalo de 190 a 800 nm, com resolução de 1 nm, à temperatura de 22 °C.

## Resultados e Discussão

A variação do solvente extrator de acordo com a Tabela 1 produziu uma série de perfis químicos distintos, tanto em variedade de picos de absorção molecular quanto em unidades de absorbância. As maiores absorbâncias foram encontradas para os extratores com maior força cromatográfica, destacando-se o etanol (Figura 1). Os perfis espectrais exibiram bandas de absorção associadas a ácidos clorogênicos ou ácido caféico a 300 e 329 nm (Marcheafave et al., 2024). Além disso, apresentaram bandas de absorção em 666 nm, o que é altamente indicativo da presença de clorofila *a* com sobreposição de feofitina. Mostraram ainda bandas de absorção na região de 270-280 nm característica da catequina, cafeína e/ou ácidos fenólicos, e na região de 400-500 nm, que é um perfil distinto associado aos carotenóides (Marcheafave et al., 2024).

**Figura 1** – Perfil espectral representativo na região UV-vis após extração em fase sólida para folhas de erva mate



As modificações no ambiente externo da planta podem alterar os metabólitos produzidos pela erva mate e, conseqüentemente, a qualidade do produto (Rakocevic, Janssens, Schere, 2012). Para avaliar se o melhoramento genético e o sombreamento foram fatores estatisticamente significativos na modificação química da planta, aplicou-se a análise ASCA aos conjuntos espectrais.

A extração dos metabólitos foi realizada utilizando vários solventes conforme o planejamento de mistura, permitindo obter perfis metabólicos mais abrangentes e uma maior variedade de marcadores biológicos (Tormena et al., 2019). Os extratos foram analisados no UV-Vis em um intervalo espectral de 190-800 nm, e as absorbâncias obtidas foram utilizadas para a construção da matriz de análise. Para a construção do modelo ASCA, elaborou-se uma matriz geral contendo 180 extratos de erva mate, com 15 impressões digitais para cada gênero

e condição de luz, realizadas em triplicata, versus a intensidade espectral (611 intensidades de espectro). No entanto, as modelagens ASCA foram realizadas individualmente para cada perfil espectral originado pelo respectivo solvente extrator (12 × 611).

O planejamento fatorial para o experimento foi de 2<sup>2</sup>, explorando dois fatores: melhoramento genético (F1) e efeito de sombreamento (F2). Cada fator teve dois níveis: cafeinado e baixa cafeína, 0% e 82% de incidência de luz. A modelagem ASCA gerou a significância dos efeitos e a interação correspondente, com p-valor ao nível de 95% de confiança, utilizando o teste de permutação com 10.000 randomizações. O modelo ASCA também determinou a variância da contribuição de cada fator para a diferenciação dos perfis espectrais. A Tabela 2 apresenta a variância dos efeitos principais para cada fator, assim como a variância do efeito de interação entre os fatores para todas as misturas de solventes e seus respectivos p-valores.

**Tabela 2** – Variância dos efeitos principais, efeito de interação e p-valor obtidos por ASCA para os diferentes solventes e suas misturas

Solvente	Melhoramento Genético		Sombreamento		Interação entre os fatores	
	Efeito (%)	<i>p</i> -valor	Efeito (%)	<i>p</i> -valor	Efeito (%)	<i>p</i> -valor
E	19,82	0,0965	23,06	0,0807	<b>24,99</b>	<b>0,0381</b>
A	11,55	0,0976	<b>20,41</b>	<b>0,0001</b>	<b>14,09</b>	<b>0,0133</b>
D	6,24	0,2697	<b>51,92</b>	<b>0,0128</b>	<b>14,10</b>	<b>0,0434</b>
H	7,36	0,2423	<b>37,51</b>	<b>0,0048</b>	<b>13,91</b>	<b>0,0158</b>
EA	<b>27,30</b>	<b>0,0001</b>	<b>62,58</b>	<b>0,0014</b>	<b>6,32</b>	<b>0,0025</b>
ED	<b>29,63</b>	<b>0,0001</b>	<b>58,50</b>	<b>0,0001</b>	<b>9,87</b>	<b>0,0005</b>
EH	10,63	0,1033	<b>29,42</b>	<b>0,0001</b>	<b>14,87</b>	<b>0,0243</b>
AD	<b>24,28</b>	<b>0,0087</b>	<b>24,07</b>	<b>0,0174</b>	10,32	0,0929
AH	<b>29,09</b>	<b>0,0170</b>	<b>16,86</b>	<b>0,0412</b>	<b>24,13</b>	<b>0,0004</b>
DH	<b>10,65</b>	<b>0,0145</b>	<b>64,69</b>	<b>0,0001</b>	<b>9,64</b>	<b>0,0118</b>
EDH	9,33	0,1232	<b>39,75</b>	<b>0,0023</b>	9,64	0,0982
EAH	14,53	0,0607	<b>31,01</b>	<b>0,0109</b>	8,53	0,2287
EAD	2,80	0,4298	<b>61,01</b>	<b>0,0001</b>	<b>20,06</b>	<b>0,0066</b>
ADH	<b>12,73</b>	<b>0,0326</b>	<b>23,84</b>	<b>0,0001</b>	<b>11,73</b>	<b>0,0008</b>
EADH	<b>17,49</b>	<b>0,0108</b>	13,74	0,0644	<b>16,99</b>	<b>0,0056</b>

Os modelos ASCA identificaram diferenças estatísticas nos perfis espectrais das folhas de erva mate para diferentes solventes ( $p$ -valor  $\leq 0,05$ ). A Tabela 2 mostra que o perfil UV-vis obtido com etanol demonstrou diferença estatística apenas para o efeito de interação entre os fatores de melhoramento genético e intensidade luminosa ( $p_{F1 \times F2} = 0,0381$ ). Ou seja, este

solvente foi capaz de extrair somente a diferença química metabólica existente na interação entre os fatores principais. A variância explicada no modelo ASCA para o extrator etanol também foi maior para a interação F1xF2 (24,99%), sendo a principal responsável pela diferenciação química espectral das folhas de erva mate extraídas com este solvente.

As misturas de solventes EDH ( $pF2 = 0,0023$ ) e EAH ( $pF2 = 0,0109$ ) foram capazes de determinar estatisticamente a diferença espectral para os compostos presentes nas folhas de erva mate apenas para o fator de sombreamento (Tabela 2). Para esses casos, a maior porcentagem de efeito ocorreu para o fator de incidência de luz, sendo 39,75% para EDH e 31,01% para EAH.

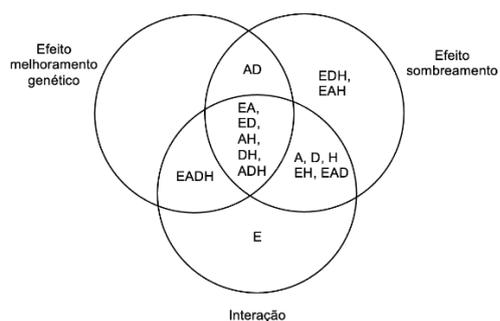
Alguns solventes mostraram tanto a interação entre os fatores quanto o nível de sombreamento, incluindo A ( $pF2 = 0,0001$ ;  $pF1xF2 = 0,0133$ ), D ( $pF2 = 0,0128$ ;  $pF1xF2 = 0,0434$ ), H ( $pF2 = 0,0048$ ;  $pF1xF2 = 0,0158$ ), EH ( $pF2 = 0,0001$ ;  $pF1xF2 = 0,0243$ ) e EAD ( $pF2 = 0,0001$ ;  $pF1xF2 = 0,0066$ ). Em todos esses casos, o nível de sombreamento foi o principal responsável pela diferenciação estatística, com destaque para a variância do EAD com 61% para o fator de sombreamento, um dos maiores valores de efeito apresentados na tabela.

Nenhuma mistura de solvente demonstrou apenas a diferença química das folhas para o fator de melhoramento genético. No entanto, a mistura AD determinou a diferença química gerada pelo melhoramento genético, assim como o efeito de sombreamento ( $pF1 = 0,0087$ ;  $pF2 = 0,0174$ ). A mistura quaternária demonstrou a diferença estatística pelo efeito do melhoramento genético, assim como a interação entre os fatores ( $pF1 = 0,0108$ ;  $pF1xF2 = 0,0056$ ). Ambas as misturas AD e EADH tiveram a maior porcentagem de efeito para o fator melhoramento genético, com 24,28% e 17,49%, respectivamente.

Por fim, cinco misturas de solventes comprovaram a diferença estatisticamente significativa dos metabólitos produzidos por plantas com diferentes níveis de cafeína, expostas a diferentes intensidades de luz, assim como a interação entre os dois fatores: EA ( $pF1 = 0,0001$ ;  $pF2 = 0,0014$ ;  $pF1xF2 = 0,0025$ ), ED ( $pF1 = 0,0001$ ;  $pF2 = 0,0001$ ;  $pF1xF2 = 0,0005$ ), AH ( $pF1 = 0,0170$ ;  $pF2 = 0,0412$ ;  $pF1xF2 = 0,0004$ ), DH ( $pF1 = 0,0145$ ;  $pF2 = 0,0001$ ;  $pF1xF2 = 0,0118$ ) e ADH ( $pF1 = 0,0326$ ;  $pF2 = 0,0001$ ;  $pF1xF2 = 0,0008$ ). Em todas as cinco misturas, exceto AH, o fator de incidência luminosa foi o principal responsável pela maior porcentagem de efeito.

Para sistematizar os resultados apresentados na Tabela 2, a Figura 2 mostra o diagrama de Venn para o agrupamento dos solventes de acordo com os fatores que cada solvente determina na modelagem ASCA.

**Figura 2** – Diagrama de Venn para o agrupamento de solventes extratores que determinam a significância de efeitos principais e interação na modelagem ASCA para folhas de erva mate



É importante notar que o sombreamento tem o maior valor de efeito sobre a variabilidade espectral do UV-vis. Isso indica que o nível de incidência luminosa ao qual a planta é exposta durante seu desenvolvimento foi o fator de maior impacto na diferenciação química dos metabólitos produzidos. Além disso, a maior porcentagem de efeito também foi desse fator, correspondendo a 64,69% para a mistura DH. Para o fator de melhoramento genético, é esperado que os solventes que apresentam melhor diferenciação sejam aqueles capazes de extrair a cafeína das folhas.

Os resultados ASCA mostram que a variabilidade do solvente interfere na significância dos fatores, considerando que cada solvente ou mistura extrai um conjunto específico de metabólitos de acordo com suas propriedades/interações químicas. A extração sequencial por solventes foi fundamental para maximizar a retirada de metabólitos e alcançar a maior diversidade química da planta. Essa diferença não seria tão bem explorada se fosse utilizado um único sistema extrator.

## Conclusões

A análise metabolômica desenvolvida mostrou que tanto o sombreamento quanto o melhoramento genético influenciam significativamente os perfis metabólicos das folhas de erva mate. A utilização de diferentes solventes extratores permitiu identificar variações específicas nos compostos químicos das plantas, destacando o impacto da incidência luminosa na diferenciação química dos metabólitos. Os resultados obtidos com o modelo ASCA confirmaram a importância de considerar múltiplos fatores ambientais e genéticos na análise da qualidade química da erva mate. Além disso, a extração sequencial por solventes foi crucial para capturar a maior diversidade de metabólitos, demonstrando que o sombreamento tem o maior efeito sobre a variabilidade espectral UV-vis.

## Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2020/11463-5, pelo financiamento concedido.

## Referências

- Aguiar, N. S. Níveis de sombreamento na produção de massa foliar e compostos bioativos em clones de erva-mate cultivados em sistema semi- hidropônico. Dissertação de mestrado. Ciências agrárias, UFPR, Curitiba, 2021.
- Barbosa, J. S.; Silva, K. R.; Carducci, C. E.; Santos, K. L.; Kohn, L. S.; Fucks, J, S. Physical-hydric Attributes of a humic inceptisol in agroforestry on the Santa Catarina plateau. **Floresta e Ambiente**, v. 24, 2017.
- Barwick, V. J. Strategies for solvent selection — a literature review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.16(6), 293–309, 1997.



Bracesco, N.; Sanchez, A. G.; Contreras, V.; Menini, T.; Gugliucci, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136(3), 378–384, 2011.

Cardozo, A. G. L.; Rosa, R. L. da; Novak, R. S.; Folquitto, D. G.; Schebelski, D. J.; Brusamarello, L. C. C.; Ribeiro, D. T. B. Yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. hill.): a comprehensive review on chemical composition, health benefits and recent advances. **Research, Society and Development**, v. 10(11), 2021.

Croge, C. P.; Cuquel, F. L.; Pintro, P. T. M. Yerba mate: Cultivation systems, processing, and chemical composition. A review. **Scientia Agricola**, v. 78(5), 1–11, 2020.

de Almeida, A. G.; Pauli, E. D.; Tormena, C. D.; Wendling, I.; Rakocevic, M.; Bruns, R. E.; Scarminio, I. S.; Marcheafave, G. G. Portable NIR Spectroscopy-Chemometric Identification of Chemically Differentiated Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Clones. **Food Analytical Methods**, v. 16, 469–477, 2023.

Gullón, B.; Eibes, G.; Moreira, M. T.; Herrera, R.; Labidi, J.; Gullón, P. Yerba mate waste: A sustainable resource of antioxidant compounds, **Industrial Crops and Products**, v. 113, 398-405, 2018.

Heck, C. L.; Mejía, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72(9), 138-151, 2010.

Jardim, I. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. *Scientia Chromatographica*, Campinas-SP, 2010. ISSN:1984-4433

Marcheafave, G. G.; Pauli, E. D.; Rakocevic, M.; Wendling, I.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E.; Tauler, R. Uv–Vis molecular spectral resolution of multi-level mixture design-fingerprints of yerba mate leaves by chemometric methods. **Microchemical Journal**, v. 199, p. 110021, 2024.

Melo, T. O. de; Lago, J. H.; Barreto, F. de A. O.; Matos, K. A. de S.; Antonioli, Z. I.; Ferrão, M. F. da S. Compostos presentes em extrato metanólico de tecido foliar de erva-mate, por meio da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas - Comunicado Técnico 458. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIIRAS, 47, 2020, Poços de Caldas, MG. Brasília, DF: Embrapa Café, 2020. p. 1743-1751.

Rakocevic, M.; Janssens, M.; Schere, R. Light responses and gender issues in the domestication process of yerba-mate, a subtropical evergreen. *Evergreens: Types, Ecology and Conservation*. Nova Science, 2012, p. 63-95.

Sturion, J. A.; Stuepp, C. A.; Wendling, I. Genetic parameters estimates and visual selection for leaves production in *Ilex paraguariensis*. **Plant Breeding**, Bragantia, Campinas, v. 76(4), 492-500, 2017.

Tormena, C. D.; Marcheafave, G. G.; Rakocevic, M.; Bruns, R. E.; Scarminio, I. S. Sequential mixture design optimization for divergent metabolite analysis: Enriched carbon dioxide effects on *Coffea arabica* L. leaves and buds. **Talanta**, v. 191, p. 382-389, 2019.

Van Dam, R. M.; Hu, F. B.; Willett, W. C. Coffee, Caffeine, and Health. **New England Journal of Medicine**. v. 383(4), 369-378, 2020.

Wendling, I.; Dutra, L. F.; Grossi, F. Produção e sobrevivência de miniestacas e minicepas de erva-mate cultivadas em sistema semi-hidropônico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42(2), p.289-292, 2007.

Wendling, I.; Sturion, J. A.; Stuepp, C. A.; Reis, C. A. F.; Ramalho, M. A. P.; Resende, M. D. V. Early selection and classification of yerba mate progenies. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53(3), 279-286, 2018.