

## VARIAÇÃO ANUAL DE METILXANTINAS TOTAIS EM AMOSTRAS DE *Ilex paraguariensis* A. ST. - HIL. (ERVA-MATE) EM IJUÍ E SANTA MARIA, ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

Alexandre Schubert, Francisco Fernandes Zanin, Danielle Fontana Pereira e Margareth Linde Athayde\*

Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Camobi, 97119-900 Santa Maria - RS, Brasil

Recebido em 5/10/05; aceito em 17/2/06, publicado na web em 6/7/06

ANNUAL VARIATIONS OF METHYLXANTHINES IN *Ilex paraguariensis* A. ST.-HIL (MATÉ) SAMPLES IN IJUI AND SANTA MARIA, STATE OF RIO GRANDE DO SUL. *Ilex paraguariensis* is a native plant in Southern Brazil, whose leaves are utilized in beverages such as chimarrão and tererê. This study investigated variations of total methylxanthines in leaves from two *Ilex* populations collected at one-month intervals over the course of one year. The levels varied from 1.92 to 10.37 mg/g (Ijuí) and 1.77 to 9.17 mg/g (Santa Maria). Statistical analysis indicated a significative variation in the contents of all samples analysed, confirming seasonal fluctuations. These results show that the period of harvest might decisively influence the organoleptic characteristics of raw material used in industry and therefore in commercial products.

Keywords: *Ilex paraguariensis*; methylxanthines; seasonal fluctuation.

### INTRODUÇÃO

Nos países que constituem o Mercosul, *Ilex paraguariensis* A. St.- Hil., a erva-mate, é uma espécie que apresenta importância do ponto de vista econômico e social, devido ao hábito vinculado à cultura dessa macro região, que consiste no consumo do chimarrão e do tererê. Além do Brasil, a erva-mate também é encontrada na Argentina, Paraguai e em pequenas áreas do Uruguai<sup>1</sup>.

Dentre os produtos do metabolismo secundário já relatados para a espécie, pode-se destacar a presença dos ácidos fenólicos, ácido caféico, ácido clorogênico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico, dos flavonóides rutina, canferol e quercetina<sup>2</sup>, das saponinas triterpênicas derivadas dos ácidos ursólico e oleanólico<sup>3</sup> e das metilxantinas, cafeína e teobromina<sup>4,7</sup>, sendo atribuídas a estas últimas as propriedades estimulantes da bebida. Muitos relatos têm sido publicados a respeito dos teores de metilxantinas, tanto em folhas, talos ou frutos, como no produto comercial erva-mate<sup>4-13</sup>.

Entretanto, os dados apresentados na literatura não permitem comparações, haja vista a grande diversidade nas metodologias empregadas para extração e quantificação desses metabólitos, além das variações decorrentes da época de coleta, local e condições de cultivo, idade da planta, entre outros fatores. Existem poucos estudos sobre a variabilidade de populações de *I. paraguariensis* no que se refere à concentração de metilxantinas em diferentes épocas do ano<sup>14-17</sup> e são escassos os dados relativos à variação desses conteúdos por um período mais longo de tempo<sup>18</sup>. Estas informações são muito importantes para as atividades comerciais de aproveitamento desta planta como matéria-prima, seja em seu uso tradicional, na elaboração de chimarrão, tererê e chá-mate, ou no desenvolvimento de novos produtos, que venham aumentar o valor agregado da cultura da erva-mate.

Nesse sentido, este trabalho teve por objetivo verificar a variação do conteúdo de metilxantinas totais, expressas como cafeína, em folhas de erva-mate em avaliações mensais, padronizadas, ao longo de 1

ano, escolhendo para isto amostras de duas populações geograficamente afastadas, localizadas em dois municípios do estado do Rio Grande do Sul (Ijuí e Santa Maria), no período compreendido entre março de 2001 a fevereiro de 2002.

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Material vegetal

Foram escolhidas amostras de duas populações de *Ilex paraguariensis* no estado do Rio Grande do Sul: uma localizada no município de Ijuí (distrito de Santana) e outra no município de Santa Maria, no Jardim Botânico da Universidade Federal de Santa Maria. Para cada população foram utilizadas três árvores, devidamente identificadas.

As coletas foram realizadas mensalmente (na primeira semana de cada mês), durante 1 ano, entre março de 2001 a fevereiro de 2002, em ambas localidades. Foram coletadas por mês, em média 100 folhas íntegras, do terceiro ao oitavo nó, para cada amostra. As amostras foram codificadas como Ijuí A, B e C e Santa Maria A, B e C, seguidas de numeração identificadora do mês de coleta. As folhas foram acondicionadas separadamente em envelopes de papel e secas em estufa em temperatura inferior a 40 °C. Depois de seco, o material foi triturado em micro-moinho de facas, obtendo-se um pó grosso (diâmetro de médio das partículas de 5 – 10 mm).

#### Extração de metilxantinas

Foram preparados extratos aquosos contendo 3 g de pó de folhas em 50 mL de água para cada amostra. O processo extrativo foi baseado no descrito por Wilson e colaboradores<sup>4</sup> e Filip e colaboradores<sup>5</sup>, com adaptações introduzidas por Reginatto e colaboradores<sup>7</sup>. O material foi levado à ebulição em banho de água fervente por 30 min<sup>4,5</sup>. Após arrefecimento, os extratos foram submetidos à filtração em papel filtro, neutralizados com solução de hidróxido de amônia a 50% e extraídos com 3 porções de 10 mL de mistura de clorofórmio:isopropanol (3:1 v/v)<sup>7</sup>. A fração orgânica foi

dessecada em sulfato de sódio anidro e evaporada à secura, para determinação do rendimento de extrato de metilxantinas totais.

### Análise dos extratos de metilxantinas por cromatografia em camada delgada

Os resíduos obtidos foram ressuspensos em metanol e aplicados em cromatofolhas recobertas com gel de sílica GF254 nm, utilizando como eluente a mistura de clorofórmio:etanol (9:1 v/v) e teobromina, teofilina e cafeína (Merck) como substâncias de referência. Todas as amostras foram aplicadas na mesma quantidade, com auxílio de micropipetador Desaga (10 µL). A visualização foi efetuada mediante observação dos cromatogramas sob luz ultravioleta em comprimento de onda de 254 nm. A presença das metilxantinas foi detectada através de extinção de fluorescência e comparação de R<sub>f</sub> com as amostras autênticas.

### Curva de calibração da cafeína para a determinação do teor de metilxantinas totais

A determinação dos teores de metilxantinas totais foi realizada por método espectrofotométrico em espectrofotômetro Shimadzu UV-1021, em comprimento de onda de 273 nm, utilizando-se como substância de referência a cafeína. Para a curva de calibração da cafeína foram preparadas soluções hidroalcolólicas (EtOH:H<sub>2</sub>O 4:6 v/v) com concentrações de 2,0; 4,0; 8,0; 10,0; 16;0 e 20;0 µg/mL. Cada solução foi lida em triplicata, sendo determinadas média, desvio padrão e coeficiente de variação para cada ponto da curva. As médias foram plotadas em gráfico de concentração *versus* absorbância, calculando-se o coeficiente de regressão linear e a equação da reta correspondente pelo método dos mínimos quadrados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de cafeína e teobromina foi confirmada por cromatografia em camada delgada em todas as amostras das populações de Ijuí e de Santa Maria. A análise dos cromatogramas permitiu inferir diferenças nas concentrações de cafeína e teobromina entre as amostras ao longo do ano. Teofilina, embora citada por outros pesquisadores<sup>6,10</sup> não foi evidenciada em nenhuma das amostras, confirmando resultados encontrados por outros autores<sup>5,7,8,13,15,16</sup>.

A presença de teofilina em *Ilex paraguayensis* é matéria controversa, que remonta a artigos de várias décadas passadas e que persiste ainda atualmente. Alikaridis<sup>19</sup>, em sua revisão sobre constituintes no Gênero *Ilex*, relatou, para *Ilex paraguayensis*, a presença de teofilina, citada nos artigos de Mich e Haberler, 1954, Fleischer, 1956, Siesto, 1959 e Maravalhas, 1965, sendo que neste último é relatada a presença nos frutos; os trabalhos de Vásquez e Moyna<sup>6</sup> e Mazzafera<sup>10</sup> também indicaram a presença desta metilxantina e, recentemente, a extração de pequenas quantidades de teofilina (47 mg/kg), juntamente com teobromina (348 mg/kg) e cafeína (4.308 mg/kg) foi relatada por Saldaña e colaboradores<sup>20</sup>, após mais de 7 h de extração das folhas de *Ilex paraguayensis* por CO<sub>2</sub> supercrítico, sendo a quantificação realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta. No entanto, outros autores<sup>5,7,8,13,15,16</sup>, usando as mais diversas metodologias preconizadas para a extração de metilxantinas, não detectaram a teofilina em *Ilex paraguayensis*, mesmo utilizando técnicas de extração drásticas, como extração por Soxhlet (4 h) e separação por cromatografia líquida de alta eficiência e detecção no ultravioleta<sup>8</sup>. Para preparação de um extrato enriquecido com metilxantinas, a literatura apresenta uma variedade de métodos, desde o método clássico para extração de alcalóides, até a utili-

zação de métodos de sublimação e extração com fluido supercrítico. Solventes clorados em soluções aquosas alcalinas ou ácidas e a extração aquosa à quente são os mais freqüentemente utilizados, variando o tipo de ácido mineral e sua concentração e o solvente orgânico (tetracloreto de carbono, diclorometano, clorofórmio, clorofórmio:isopropanol) para extração das metilxantinas da fase aquosa. Dessa forma, além das questões metodológicas para extração dessa metilxantina, como sua solubilidade diferenciada em relação à cafeína e teobromina (teofilina:1 em 120 mL de água, 1 em 200 mL de clorofórmio; cafeína: 1 em 60 mL de água, 1 em 7 mL de clorofórmio; teobromina: 1 em 2.000 mL de água, 1 em 6.000 mL de clorofórmio), sua presença em baixas quantidades em *Ilex paraguayensis* poderia dificultar a quantificação e/ou detecção, mesmo com o uso de aparelhagem analítica sensível, como a CLAE/UV. Coincidentemente, a presença de uma substância relacionada às metilxantinas, cujo tempo de retenção foi idêntico ao da teofilina, mas cuja identidade não pode ser associada à teofilina após repetidas análises em diferentes sistemas eluentes por cromatografia em camada delgada e comparação com amostras autênticas é relatada por Coelho e colaboradores<sup>16</sup> ao determinarem o conteúdo de metilxantinas por cromatografia líquida de alta eficiência em amostras de folhas de *Ilex paraguayensis*.

Com relação às diferentes solubilidades das metilxantinas, cabe ressaltar a baixa solubilidade da teobromina em clorofórmio, um dos solventes orgânicos mais utilizados na extração de metilxantinas. O uso da mistura de clorofórmio:isopropanol (3:2 v/v) relatado por Wilson *et al.*<sup>4</sup> e modificado por Reginatto e colaboradores<sup>7</sup> (3:1, v/v) mostrou-se mais adequado para extração dessa metilxantina, aportando teores de teobromina cerca de 9 vezes superiores aos teores encontrados com o uso de clorofórmio isoladamente, em estudo comparativo realizado por Athayde<sup>14</sup>.

A metodologia empregada para quantificação de metilxantinas nesse estudo, espectrofotometria no ultravioleta, não permite distinção entre cafeína e teobromina, visto que ambas absorvem em comprimentos de onda muito próximos (273 e 272 nm, respectivamente). Desta forma, cafeína e teobromina foram quantificadas concomitantemente, apresentando-se os resultados em metilxantinas totais, expressos em cafeína, ( $y = 0,0448x - 0,055$ ; R<sup>2</sup> = 0,9999), já que esta foi a metilxantina predominante nas amostras de *Ilex paraguayensis* analisadas previamente por cromatografia em camada delgada.

A Figura 1 apresenta os teores de metilxantinas totais em mg/g, encontrados nas amostras da população de Ijuí ao longo de 12 meses e a Figura 2, os teores de metilxantinas totais em mg/g, nas amostras de Santa Maria, no mesmo período. Os resultados repre-

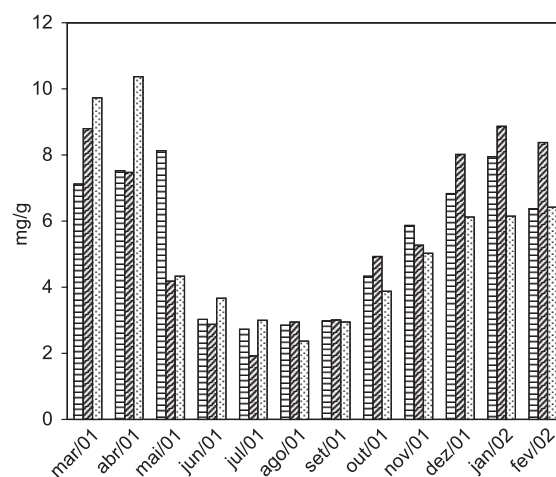


Figura 1. Teores de metilxantinas totais nas amostras de Ijuí, em mg/g, em 12 meses (□ Ijuí A, ▨ Ijuí B e ▤ Ijuí C)

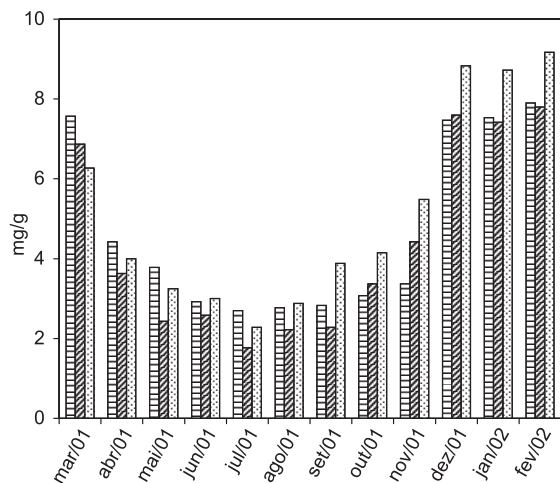


Figura 2. Teores de metilxantinas totais nas amostras de Santa Maria, em mg/g, em 12 meses (▨ Santa Maria A, ▩ Santa Maria B e ▤ Santa Maria C)

sentam a média de três determinações, com coeficiente de variação percentual (CV%) inferior a 3%.

Nas amostras da população de Ijuí, os teores variaram de 1,92 (IjuíB-julho) a 10,37 mg/g (IjuíC-abril), enquanto que nas amostras de Santa Maria estes teores variaram de 1,77 (SMB-julho) a 9,17 mg/g (SMC-fevereiro).

Nesse estudo observou-se um decréscimo no teor de metilxantinas nas duas populações durante o período final do outono e todo o inverno. O aumento nas concentrações foi detectado no início da primavera, tendo seu ápice no verão para as amostras de Santa Maria, enquanto que as amostras de Ijuí apresentaram os maiores teores também no verão, mantendo-se elevados ainda no outono. A análise dos resultados permite evidenciar variações no conteúdo de metilxantinas totais nas diferentes épocas do ano, notadamente diferenças acentuadas no verão, onde todas as amostras apresentaram conteúdos elevados, e no inverno, onde invariavelmente os conteúdos decresceram, atingindo os menores valores observados em todo o experimento.

A análise da variância (fator duplo, sem repetição,  $\alpha = 0,05$ ) realizada com os teores de metilxantinas totais para as três amostras de Ijuí (Ijuí A, B e C) e para as três amostras de Santa Maria (SM A, B e C), nos doze meses de coleta (março de 2001 a fevereiro de 2002), indicou diferença significativa entre os teores mensais obtidos (entre meses,  $F = 20,5993^*$ ,  $F_{crítico} = 1,9674$ ). O tratamento estatístico demonstrou a variação sazonal nos conteúdos de metilxantinas observada ao longo do ano, nas amostras das duas populações. Entretanto, a comparação da variação dos teores ao longo do ano entre as seis amostras não apresentou diferença significativa (ANOVA, fator duplo sem repetição,  $\alpha = 0,05$ ;  $F = 1,9684$ ,  $F_{crítico} = 2,3828$ ). Com exceção do teor médio de metilxantinas relativamente elevado verificado no mês de abril/01 nas amostras de Ijuí, de modo geral a variação ao longo do ano foi semelhante para as duas populações, indicando que o fator local de coleta não teve influência significativa nos teores encontrados.

A Figura 3 apresenta os teores médios de metilxantinas totais (média dos teores de três exemplares de cada amostra), expressos em mg/g, nas amostras de Ijuí e de Santa Maria, respectivamente, nos diferentes meses do ano.

A quantificação de cafeína e teobromina por cromatografia líquida de alta eficiência realizada por Athayde<sup>14</sup> em amostras de folhas de *Ilex paraguariensis* oriundas de quatro estados brasileiros (Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), em duas épocas de coleta (verão e primavera), evidenciou maior concentração dessas metilxantinas no verão, com decréscimo na prima-

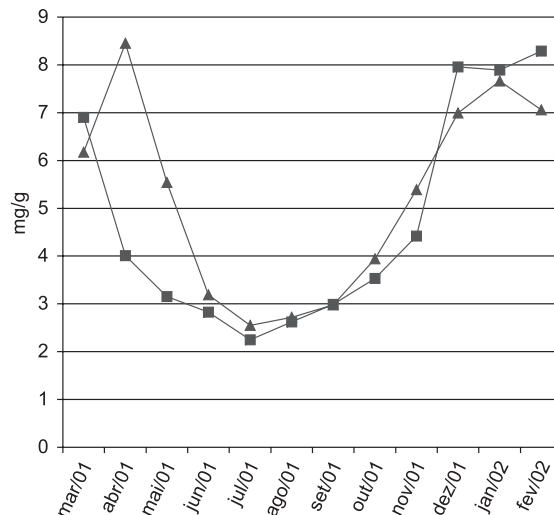


Figura 3. Teores médios de metilxantinas totais, expressos em mg/g, nas amostras das populações de Ijuí e de Santa Maria (▲ Teores médios - Ijuí, ■ Teores médios - Santa Maria)

vera. Resultados semelhantes foram obtidos por Coelho e colaboradores<sup>16</sup>, ao analisarem, por cromatografia líquida de alta eficiência e mesmo processo extrativo, amostras de *Ilex paraguariensis* coletadas em duas épocas diferentes no estado do Paraná.

Os resultados obtidos por Athayde<sup>14</sup> e por Coelho e colaboradores<sup>16</sup>, assim como os obtidos no presente estudo, podem ser explicados, em parte, pela idade das folhas, já que resultados experimentais indicam que a biossíntese de cafeína em *Ilex* ocorre somente em folhas jovens<sup>9</sup>, sendo as etapas biossintéticas similares às descritas para *Coffea* e *Camellia*<sup>21-23</sup>. Variações sazonais nos conteúdos de metilxantinas têm sido relatadas para *Coffea*<sup>24</sup> e *Camellia*<sup>25</sup>. Uma flutuação marcante no conteúdo de purinas foi observada em folhas de chá (*Camellia sinensis* L.) ao longo de 1 ano, com os teores mais elevados de cafeína na primavera e os menores no inverno<sup>26</sup>.

Coelho e Mariath<sup>27</sup> constataram que a principal brotação em *Ilex paraguariensis* ocorre em fins de setembro e outubro, sendo que em plantas em pleno sol, pode ocorrer uma brotação entre fevereiro e março. Assumindo que folhas mais novas apresentam elevada atividade de biossíntese e, conseqüentemente, teores de cafeína mais elevados<sup>9,10</sup>, os altos teores de metilxantinas obtidos no verão podem ser atribuídos às folhas jovens, em desenvolvimento, e os resultados do final de outono e inverno podem indicar folhas mais velhas, maduras, sem atividade de biossíntese.

Resultados diferentes foram obtidos por Da Croce<sup>18</sup>, em estudo realizado com misturas de folhas de *Ilex paraguariensis*, sem observação de idade da folha ou posição na planta, como é usual na coleta da erva-mate para fins comerciais, coletadas em quatro regiões produtoras de Santa Catarina, abrangendo os períodos de setembro a dezembro de 1998, janeiro a março e junho e julho de 1999. Os resultados indicaram diferenças significativas entre os teores de cafeína de acordo com a época de coleta das folhas. Entretanto, o autor encontrou teores de cafeína mais baixos nos meses de setembro a dezembro de 1998 e teores mais elevados nos meses de janeiro, fevereiro, março, junho e julho de 1999. Os diferentes tipos de solos e locais de coleta das amostras não apresentaram diferenças significativas no teor de cafeína.

Os dados levam a crer que, além da influência da brotação das folhas, outros fatores podem desempenhar papel relevante nos teores de metilxantinas, como intensidade de luz<sup>17</sup> e temperatura, idade da planta, condições de estresse, ataque de predadores, tipo de

poda e intervalo entre podas, entre outros, além de diferenças entre as metodologias de coleta, extração e quantificação utilizadas.

Dentre as metilxantinas, a cafeína é considerada a mais ativa como estimulante do Sistema Nervoso Central (SNC), podendo causar insônia, excitação, agitação, distúrbios gastrintestinais, aumento da pressão arterial, entre outros sintomas transitórios<sup>28</sup>. Atualmente, existe preocupação por parte dos consumidores, principalmente os mais idosos, quanto ao consumo de cafeína, visando evitar os efeitos estimulantes dessa metilxantina no SNC, bem como a elevação transitória da pressão arterial. Bebidas descafeinadas ou plantas selecionadas com baixo conteúdo de cafeína podem ser obtidas e destinadas a segmentos específicos do mercado, como já é verificado para o café<sup>22</sup>.

A erva-mate pode ser considerada uma espécie com 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.

Adicionalmente, a quantidade de substâncias ativas nas folhas interfere também na qualidade dos produtos comerciais gerados a partir da erva-mate. O sabor é uma função da composição química e pode ser modificado pelo teor de diferentes substâncias químicas na planta<sup>29</sup>. As condições de cultivo e a época da coleta, na medida em que podem alterar a composição e a concentração de substâncias presentes na planta, podem influenciar as características da matéria-prima e de seus produtos industrializados.

Os dados obtidos mostram que a época de coleta influencia decisivamente o teor de metilxantinas na erva-mate, traduzindo-se em teores mais altos ou mais baixos, o que pode ter implicação direta na qualidade da matéria-prima utilizada na indústria, além de ampliar as possibilidades de obtenção de produtos comerciais com teores de acordo com as exigências dos consumidores.

## AGRADECIMENTOS

Ao produtor C. Schubert pela coleta em sua propriedade e ao Prof. Dr. G. C. Coelho (UNIJUÍ), pela identificação do material coletado em Ijuí. Ao Prof. R. A. Záchia, Diretor do Jardim Botânico da UFSM, pela coleta e identificação do material coletado em Santa Maria. À FAPERGS, pela bolsa de IC de F. F. Zanin e auxílio financeiro ao projeto.

## REFERÊNCIAS

- Giberti, G. C. Em *Erva mate – Biologia e Cultura no Cone Sul*; Winge, H., Ferreira, A. G.; Mariath, J. E. A.; Tarasconi, L. C., orgs.; Ed. da Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Porto Alegre, 1995, p. 289.
- Filip, R.; López, P.; Giberti, G.; Coussio, J.; Ferraro, G.; *Fitoterapia* **2001**, *72*, 774.
- Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Montanha, J. A.; Heinzmann, B. M.; Athayde, M. L.; Taketa, A. T. C.; Pires, V. S.; Guillaume, D.; *Ciência e Cultura* **1997**, *49*, 359.
- Wilson, E. G.; Rondina, R. V. D.; Coussio, J. D.; *Rev. Farm.* **1981**, *124*, 41.
- Filip, R.; Iglesias, D. I. A.; Rondina, R. V. D.; Coussio, J. D.; *Acta Farm. Bonaerense* **1983**, *2*, 87.
- Vázquez, A.; Moyna, P.; *J. Ethnopharmacol.* **1986**, *18*, 267.
- Reginato, F. H.; Athayde, M. L.; Gosmann, G.; Schenkel, E. P.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1999**, *10*, 443.
- Baltassat, F.; Darbour, N.; Ferry, S.; *Plantes médicinales et phytoterapie* **1984**, *18*, 195.
- Ashihara, H.; *Phytochemistry* **1993**, *33*, 1427.
- Mazzafera, P.; *Rev. Braz. Fisiol. Veg.* **1994**, *6*, 149.
- Andrade, J. B.; Pinheiro, H. L. C.; Lopes, W. A.; Martins, S.; Amorim, A. M.; Brandão, A. M.; *Quim. Nova* **1995**, *18*, 379.
- Esmelindro, M. C.; Toniazzo, G.; Waczuk, A.; Dariva, C.; Oliveira, D.; *Ciênc. Technol. Aliment.* **2002**, *22*, 193.
- Filip, R.; Lopes, P.; Coussio, J. D.; Ferraro, G.; *Phytotherapy Research* **1998**, *12*, 129.
- Athayde, M.L.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2000.
- Athayde, M. L.; Coelho, G. C.; Schenkel, E. P.; *Phytochemistry* **2000**, *55*, 853.
- Coelho, G. C.; Athayde, M. L.; Schenkel, E. P.; *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2001**, *37*, 153.
- Coelho, G.C.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2002.
- Da Croce, D. M.; *Ciência Florestal* **2002**, *12*, 107.
- Alikaridis, F.; *J. Ethnopharmacol.* **1987**, *20*, 121.
- Saldaña, M. D. A.; Mohamed, R. S.; Baer, M. G.; Mazzafera, P.; *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3804.
- Mazzafera, P.; Crozier, A.; Magalhães, A. C.; *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3913.
- Ashihara, H.; Crozier, A.; *Trends Plant Sci.* **2001**, *6*, 407.
- Zheng, X.; Ashihara, H.; *Plant Sci.* **2004**, *166*, 807.
- Looser, E.; Baumann, T. W.; Wanner, H.; *Phytochemistry* **1974**, *3*, 2515.
- Suzuki, T.; Ashihara, H.; Waller, G. R.; *Phytochemistry* **1992**, *31*, 2575.
- Fujimori, N.; Suzuki, T.; Ashihara, H.; *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2245.
- Coelho, G. C.; Mariath, J. E. A.; *Feddes Repertorium* **1996**, *107*, 19.
- Sawynok, J.; *Drugs* **1995**, *49*, 37.
- Taketa, C. S. C.; Taketa, A. T. C.; Schenkel, E. P.; Spitzer, V.; *Lebensmittelchemie* **1998**, *52*, 20.