

COMUNICADO
TÉCNICO

458

Colombo, PR
Outubro, 2020

Embrapa

Compostos presentes em extrato metanólico de tecido foliar de erva-mate, por meio da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Tamires Oliveira de Melo
Francisco Assis Marques
Ivar Wendling
Joachim Kopka
Alexander Erban
Fabricio Augusto Hansel

Compostos presentes em extrato metanólico de tecido foliar de erva-mate, por meio da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Tamires Oliveira de Melo, Tecnóloga em Processos Ambientais, doutora em Química, analista de Desenvolvimento na Herbarium, Colombo, PR; **Francisco Assis Marques**, Químico, doutor em Química, Professor da UFPR, Curitiba, PR; **Ivar Wendling**, Engenheiro Florestal, doutor em Ciências Florestais, pesquisador da Embrapa Florestas, Colombo, PR; **Joachim Kopka**, Bioquímico, doutor em Ciências Naturais, líder de grupo de pesquisa do Instituto Max Planck/Departamento de Fisiologia Molecular de Plantas, Potsdam, Alemanha; **Alexander Erban**, Engenheiro Biotecnológico, técnico do Instituto Max Planck/Departamento de Fisiologia Molecular de Plantas, Potsdam, Alemanha; **Fabricio Augusto Hansel**, Químico, doutor em Química, analista da Embrapa Florestas, Colombo, PR

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hill.) é uma espécie nativa da Floresta Ombrófila Mista, de grande importância socioeconômica, cultural e ambiental para a região Sul do Brasil, Paraguai e Argentina (Fowler; Sturion, 2000), de ocorrência natural no Brasil, Argentina, Paraguai e em algumas regiões do Uruguai (Oliveira; Rotta, 1985). A erva-mate é ingerida após o preparo de infusões das suas folhas verdes secas ou tostadas a quente ou a frio (Bracesco et al., 2011) e o seu consumo se deve principalmente ao sabor e aos diversos efeitos benéficos à saúde, devido à presença de compostos bioativos como as xantinas (e.g., cafeína) e compostos fenólicos (e.g., ácido clorogênico). Recentemente, a erva-mate vem ganhando destaque como produto de exportação brasileira para diversos países com potencial para o seu uso na indústria farmacêutica e alimentícia (Márquez et al., 2013; Cardozo Junior;

Morand, 2016; Matei et al., 2016). Os plantios de erva-mate provenientes de sementes apresentam grande heterogeneidade, sendo a utilização da propagação vegetativa para a produção comercial de mudas um fator importante para a formação de plantios de alta produtividade e uniformidade, com possibilidade de melhoria da qualidade dos produtos obtidos em relação aos componentes bioativos, e possibilidade de produção de mudas durante todo o ano, por meio de plantas matrizes mantidas em viveiro, em sistemas de canaletão.

Na erva-mate destacam-se os grupos das metilxantinas (cafeína, teobromina e teofilina), ácidos hidroxicinâmicos e seus derivados químicos (ácido cafeico e ácido clorogênico) e flavonoides (quercetina, campferol e rutina) (Heck; De Mejia, 2007). Entretanto, os compostos presentes em tecidos foliares são numerosos e podem ser divididos em metabólitos primários e secundários, os quais

constituem um conjunto diversificado de compostos e classes químicas que são caracterizados por distintas propriedades físico-químicas (Dunn; Ellis, 2005). Os metabólitos primários estão envolvidos nas principais vias metabólicas que ocorrem nas células e encontram-se dissolvidos no citosol (e.g., açúcares e seus derivados, ácidos carboxílicos, lipídios e aminoácidos (Dixon, 2001; Hall, 2006); e os metabólitos secundários são uma série de compostos que parecem não ter função direta no crescimento e desenvolvimento dos vegetais, mas sim às respostas a fatores externos do meio ambiente, os quais são divididos em três grupos principais, os terpenos, compostos fenólicos e nitrogenados (Taiz; Zeiger, 2013).

Na análise de compostos polares via cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) de um extrato vegetal ocorre a detecção de um grande número de compostos e, com o advento de ferramentas analíticas que possibilitem a deconvolução/extração de picos e automatização do processo, um grande número de compostos são detectados e vários são anotados (Wagner et al., 2003; Schauer et al., 2005; Strehmel et al., 2008). Os softwares que possibilitam a deconvolução/extração dos espectros de massas dos diversos compostos presentes nos cromatogramas da corrente total de íons estão disponíveis no mercado, entre as plataformas mais usuais estão o AMDIS “Automated Mass Spectra Deconvolution and Identification System”, comumente utilizado por estar disponível livremente

no site do National Institute of Standards and Technology (NIST) (<http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/downloads/>) e o TagFinder desenvolvido por pesquisadores do Instituto Max Planck de Fisiologia Vegetal Molecular (Potsdam-Golm, Alemanha) (Luedemann et al., 2008).

O objetivo desse trabalho foi listar o número de compostos identificados nos extratos metanólicos de tecido foliar de dois clones de erva-mate. Para isso, foram coletado tecidos foliares durante o ciclo circadiano (i.e., período de cerca de 24 horas) e nas diferentes estações do ano, buscando abranger as possíveis diferenças biológicas na produção de metabólitos pelas plantas. A listagem dos compostos busca informar aos diferentes setores da cadeia produtiva da erva-mate sobre os compostos presentes no tecido foliar da espécie e ajudar na busca de novos compostos bioativos para uso na indústria farmacêutica ou alimentícia.

Os experimentos foram realizados na Embrapa Florestas, localizada no município de Colombo/Paraná-Brasil, utilizando dois clones comerciais (AC1 e BC1) provenientes de um programa de melhoramento genético, com as minicepas mantidas em um minijardim clonal em sistema semi-hidropônico (canaletão) com areia. As plantas foram mantidas sob irrigação por gotejamento com solução nutritiva (Wendling; Dutra, 2008), duas vezes por dia, na estação de inverno (2,5 L m⁻² / aplicação) por um período de 4 minutos e 40 segundos; e três vezes por dia na estação de verão

(1,7 L m⁻² / aplicação) por um período de 3 minutos e 6 segundos. Após o estabelecimento das mudas (16 meses) e com a manutenção de podas a cada 30 dias, a coleta do material vegetal (tecido foliar adulto) para as análises foi realizada sempre na semana que antecedia a poda de manutenção. O experimento do ciclo circadiano foi realizado no mês de maio de 2017, nos seguintes horários 12h, 16h30, 18h30, 24h30, 5h30, 7h30. As coletas em diferentes estações foram realizadas em 2017 e 2018, na sequência: maio (outono), agosto (inverno), novembro (primavera) e fevereiro (verão), sempre uma hora após o nascer do sol e uma hora antes do pôr do sol.

O tecido vegetal (folha adulta) foi coletado em cinco repetições biológicas (i.e., 5 plantas diferentes) de cada clone, em região mediana da planta e posição intermediária no galho. Em seguida, dentro de até 10 segundos após o seu corte, as folhas adultas foram imediatamente imersas em nitrogênio líquido. Todos os materiais foram macerados em cadinho com N_{2(l)} e armazenadas sob temperatura de -80 °C até requeridos para extração. O método de extração foi realizado seguindo o descrito por Dethloff et al. (2014). Brevemente: foram transferidos 20 mg (\pm 5 mg) do material vegetal anteriormente congelado e triturado, para um tubo Eppendorf de 2 mL. As amostras foram mantidas congeladas em N_{2(l)} durante a pesagem. Após, foram adicionados 300 μ L de metanol pré-arrefecido sob temperatura de -20 °C, com auxílio de micropipeta (Eppendorf). O material vegetal e o

solvente, então, foram misturados em vórtex. A este material foi adicionado 30 μ L de ¹³C₆-Sorbitol (padrão interno, 0,2 mg mL⁻¹ em metanol) e 30 μ L padrão de ácido nonadecanóico (controle da extração, 2 mg mL⁻¹ em clorofórmio). A extração ocorreu em equipamento Thermomixer (Eppendorf), sob agitação constante de 950 rpm, por 15 minutos e sob temperatura de 70 °C (após o primeiro minuto de agitação os eppendorfs eram abertos, a fim de retirar o excesso de pressão). Após a incubação, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente e após adicionado 200 μ L de clorofórmio, por meio de seringa de vidro graduada. O conteúdo foi misturado em vórtex e, em seguida, aquecido novamente no Thermomixer sob 950 rpm, durante 5 minutos e sob temperatura de 37 °C. Então, foram adicionados 400 μ L de água ultrapura, cujo conteúdo foi misturado em vórtex por cerca de 20 segundos e centrifugado (Eppendorf *centrifuge* 5417R) durante 7 minutos sob 12.000 rpm. Uma alíquota de 160 μ L da fase polar (superior) foi transferida para um tubo de Eppendorff cônico (1,5 mL), e o extrato foi seco sob vácuo no *SpeedVac* (Concentrador plus - Eppendorf) durante a noite, com posterior armazenagem sob temperatura de -80 °C até as derivatizações. A metoximação foi realizada adicionando ao extrato seco 40 μ L de uma solução preparada em piridina contendo 5 mg mL⁻¹ de 4-(dimetilamina)-piridina, 40 mg mL⁻¹ de cloridrato de metoxiamina, e misturada em vórtex por 30 segundos. A reação aconteceu em Thermomixer

sob 950 rpm, durante 90 minutos sob temperatura de 30 °C. Após o tempo de incubação, foram adicionados à solução 70 µL do agente de silição BSTFA e 10 µL de mistura de alcanos, para o cálculo do índice de retenção, sendo essa solução misturada em vórtex por 30 segundos e incubados sob temperatura de 37 °C em Thermomixer (Eppendorf) sob 950 rpm, durante 30 minutos. Logo após, os tubos Eppendorfs foram centrifugados sob 14.000 rpm por 5 minutos e uma alíquota de 80 µL transferida para vial de vidro com fundo cônico (0,5 mL), e levados para análises cromatográficas.

As análises cromatográficas foram realizadas no Instituto Max Planck (Potsdam, Alemanha) utilizando um injetor automático (PAL-Autosamples, Gerstel) em um cromatógrafo gasoso (Agilent 6890N) com injetor split e splitless com controle de pressão eletrônico de até 150 psi, acoplado a um espectrômetro de massas de tempo de voo Pegasus III (LECO Instrumento GmbH, Mönchengladbach, Alemanha). As amostras foram injetadas no modo splitless (1 µL) e no modo split com divisão de fluxo 1:30 (1 µL), dependendo da concentração dos analitos nas amostras. Os analitos foram separados por meio de coluna cromatográfica modelo DB-5 (30 m x 0,25 mm, espessura de filme 0,25 µm, Agilent) integrada a uma pré-coluna de mesmo recheio (10 m x 0,25 mm x 0,25 µm) com injetor na temperatura de 230 °C e linha de transferência na temperatura de 250 °C, o gás de arraste usado foi o hélio com fluxo constante de 0,6 mL min⁻¹. A programação de

temperatura do forno foi: 70 °C, isoterma de 1 minuto, aquecimento até temperatura de 350 °C na taxa de 9 °C min⁻¹, com isoterma final de 5 minutos. O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo com ionização por impacto de elétrons de 70 eV, com temperatura da fonte de íons de 200 °C, com resolução de massa nominal com taxa de varredura ajustada para 20 s⁻¹, com intervalo de massas definido para m/z = 70–600.

Os cromatogramas gerados pelo software ChromaTOF (Versão 4.22; LECO, St. Joseph, EUA) foram exportados em formato NetCDF, para extração das alturas de picos dos fragmentos e identificação dos compostos usando o software TagFinder sob supervisão manual (Luedemann et al., 2008). Os analitos foram identificados mediante comparação dos espectros de massas e índice de tempo de retenção coletados com a biblioteca de referência do banco de dados metabômicos, *GDM database* (Kopka et al., 2005; Hummel et al., 2007). As diretrizes para identificação de metabólitos supervisionados manualmente foram à presença de, pelo menos, três fragmentos de massa específicos por composto e um desvio do índice de retenção inferior a 1,5% (Strehmel et al., 2008).

O processo de detecção dos compostos usando o software TagFinder (Luedemann et al., 2008) proporcionou a extração de mais de 200 compostos nos extratos metanólicos do tecido foliar de erva-mate, os quais foram coletados em diferentes horas do dia e ao longo

do ano. Entretanto, somente 96 desses compostos foram anotados (Tabela 1) e, com base nas estruturas químicas dos compostos, esses foram separados em 13 diferentes classes químicas. Com relação à classificação é importante mencionar que alguns compostos possuem uma molécula bifuncional (i.e., quando dois grupos funcionais diferentes estão presentes em uma mesma molécula orgânica), como etanolamina que possui os grupos funcionais amina e hidroxila. Nos casos bifuncionais optou-se por aquela em que os grupos funcionais representassem uma única classe (e.g., açúcares) ou ainda na literatura específica já tivessem sido classificados em uma classe específica (e.g. ácido quínico, classe ciclitol).

Os açúcares (carboidratos) monossacarídeos presentes nos tecidos foliares são aldoses (6 compostos) e cetoses (2 compostos) contendo 5 (pentose) e 6 (hexose) átomos de carbono. A diferença entre aldose e cetose é a presença do grupo funcional aldeído ou cetona, respectivamente (Tabela 1, Garret; Grisham, 2005). Além dos monossacarídeos foi identificado 3 dissacarídeos e 1 trissacarídeo (Tabela 1).

Açúcares álcoois (alditóis) são classificados assim pela presença de somente grupos álcoois nas moléculas (Garrett; Grisham, 2005). Os álcoois cíclicos (ciclitóis) também foram classificados nessa mesma classe, uma vez que o mio-inositol pode ser classificado tanto como açúcar álcool cíclico ou ciclitol. Considerando que os compostos ácidos quínico e chiquímico são moléculas

bifuncionais contendo grupos hidroxilas e carboxila, esses foram classificados aqui como ciclitóis (Anderson; Wolter, 1966). Nessas duas classes foram identificados 5 compostos (Tabela 1).

Os açúcares ácidos são derivados das aldoses produzindo os ácidos aldônicos (uma carboxila) ou aldáricos (duas carboxilas) ou podendo derivar dos açúcares álcoois (e.g., glicerol produzindo ácido glicérico) (Garrett; Grisham, 2005). Foram identificados 8 açúcares ácidos sendo que somente dois desses pertencem ao grupo dos ácidos aldáricos, os ácidos galactônico e sacárico (Tabela 1).

Duas outras classes de açúcares foram encontradas. Os desoxiaçúcares, monossacarídeos no qual um ou mais grupos hidroxil são substituídos por átomo (s) de hidrogênio (Garrett; Grisham, 2005), representado pela presença da fucose, e os anidros açúcares representados pelo levoglucosano (Radermacher et al., 2019, Tabela 1).

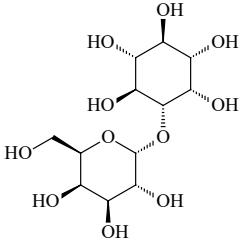
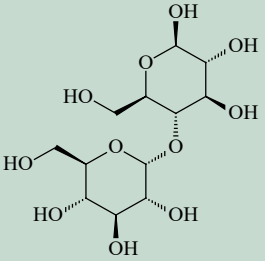
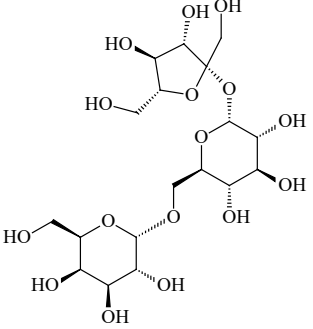
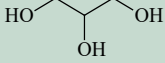
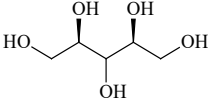
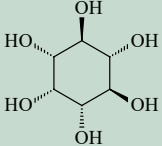
Aminoácidos são moléculas, no mínimo, bifuncionais contendo os grupos carboxila e amina, cuja característica crucial desses é a formação de peptídeos e proteínas a partir da presença dos dois grupos funcionais que sofrem uma reação cabeça – cauda (Garrett; Grisham, 2005). Nos extratos metanólicos foram encontrados 12 aminoácidos (Tabela 1), entretanto o ácido piroglutâmico raramente é encontrado em proteínas e os compostos GABA (ácido gama-aminobutírico), sarcosina e ornitina não são encontrados em proteínas (Garrett; Grisham, 2005).

Tabela 1. Relação dos compostos presentes em extrato metanólico de tecido foliar de erva-mate coletado em diferentes horas do dia e ao longo do ano.

Compostos ¹	GMD ²	Estruturas moleculares
Açúcares		
Arabinose (C5)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/3914b0f2-cac7-49bc-a905-91b6e342f219.aspx	
Ribose (C5)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/2fea82f2-b180-4b7e-be29-af06a31c90c7.aspx	
Xilose (C5)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/f71c5d3e-3d79-4658-842b-f3d61bdfd29d.aspx	
Ribulose (C5)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/13f8679e-39b3-4eb8-a869-c30aef6bbfa2.aspx	
Glicose (C6)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/0a2b3536-2245-4c0e-bdbc-495766ecec67.aspx	
Manose (C6)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/search.aspx#&query=Mannose+(1MEO-X)+(5TMS)+MP	
Galactose (C6)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/eea648a8-cd2c-433c-acc8-e5ae59188062.aspx	
Frutose (C6)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/7e813079-d1aa-4977-8de4-3440b2643efb.aspx	
Sacarose (C12)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/19eba91e-4d0e-493e-8297-3466769c0c1b.aspx	

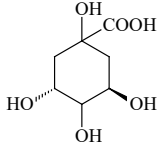
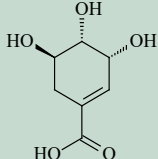
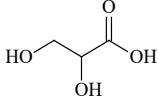
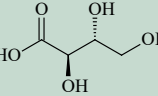
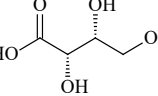
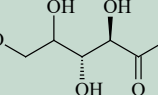
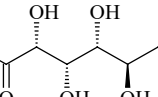
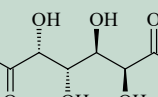
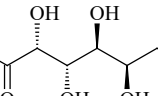
Continua...

Tabela 1. Continuação...

Compostos ¹	GMD ²	Estruturas moleculares
Galactinol (C12)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/996989cd-4161-4d87-948f-3e152ac4d4b0.aspx	
Maltose (C12)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/0bb65b2b-76be-4ed5-a03c-bb659df547a8.aspx	
Rafinose (C18)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/176f3289-5e77-4e1b-8695-fa71478f18f9.aspx	
Açúcares álcoois e ciclitolóis		
Glicerol	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/63f6a968-adf6-4473-a616-56660f46a73c.aspx	
Ribitol	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/507d17f8-ddec-4560-919b-b7d729ece611.aspx	
<i>mio</i> -Inositol	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/6176bb6d-9d93-4714-b906-c7a54e0d3325.aspx	

Continua...

Tabela 1. Continuação...

Compostos ¹	GMD ²	Estruturas moleculares
Ácido quínico	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/9506c21a-0f1c-4ef9-9cda-2e5c46c1a5dc.aspx	
Ácido chiquímico	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/1e0dfe20-fcd1-43df-8de2-901e95a51523.aspx	
Açúcares ácidos		
Ácido glicérico (C3)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/c926563f-1dd6-4eaf-b7ff-17cf3ab60d21.aspx	
Ácido eritrônico (C4)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/d38a9ed2-81ad-43c6-aeb2-9abc15999412.aspx	
Ácido treônico (C4)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/37ec4174-f358-4860-9d99-98104be33a70.aspx	
Ácido ribônico (C5)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/7c14ec5e-9fb4-4512-a2b8-10bdb5eff326.aspx	
Ácido glucônico (C6)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/05aee292-e223-48b5-b0b6-da88d117139d.aspx	
Ácido galactárico (C6)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/593e644b-68a3-4e67-bab1-bdd99219e072.aspx	
Ácido galactônico (C6)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/fd9fb30f-5f8d-486c-815c-90749331bb20.aspx	

Continua...

Tabela 1. Continuação...

Compostos ¹	GMD ²	Estruturas moleculares
Ácido sacárico (C6)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/c98be9bb-ceb5-4886-aa9d-1f8f274a2cef.aspx	
Desoxiaçúcares		
Fucose	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/8bf35b59-a27b-44fe-ab3a-162b14d910d0.aspx	
Anidro açúcares		
β-Glicose-1,6-anidro (levoglucosano)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/854cdbea-d411-4b0d-9491-e4023fb91683.aspx	
Aminoácidos		
Ácido aspártico (Asp)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/93d5a750-cac7-403b-89b5-b3eb0a3a8f83.aspx	
Ácido glutâmico (Glu)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/0929c255-892a-4196-b906-54a5d809fa72.aspx	
Alanina (Ala)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/33ca143b-009a-4c92-82cd-355067c664cb.aspx	
Arginina (Arg)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/a647d4f1-da6c-4884-8b91-f08ad402155e.aspx	
Asparagina (Asn)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/f994be66-4ef5-4f30-91aa-156bcc4aa0ff.aspx	
Fenilalanina (Phe)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/06b09fc5-90c7-4930-83ef-36c3e3b6e06d.aspx	

Continua...

Tabela 1. Continuação...

Compostos ¹	GMD ²	Estruturas moleculares
Glicina (Gly)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/4ca0f2ad-18d5-4044-8350-504ffe609b2c.aspx	
Glutamina (Gln)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/2e1fa86a-23d3-4d7d-a386-38c0d7f9c6aa.aspx	
Serina (Ser)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/8f6890fc-0f3f-4f60-980e-4e3f16e36934.aspx	
Treonina (Thr)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/e449a211-33fc-45f4-b4f4-03cde1d4f4bf.aspx	
Valina (Val)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/c3f371a7-0c27-4fe9-90d7-53f8e8bf963f.aspx	
Ácido piroglutâmico	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/4f0fa9b6-514f-4ff4-98cc-0009bc08eb80.aspx	
Ácido 4-aminobutanóico (GABA)	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/ReferenceSubstances/61d398c6-51aa-4dba-9785-177e0b91eaaf.aspx	
Sarcosina	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/ReferenceSubstances/926720d8-3871-4cc0-b85e-98d16a5c1576.aspx	
Ornitina	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/86ec8ae9-56be-4891-89ca-04c1d4820ab7.aspx	
Compostos nitrogenados		
Cafeína	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/ReferenceSubstances/6f382797-2ab1-442b-9e03-caaf91717432.aspx	

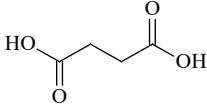
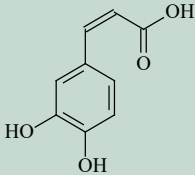
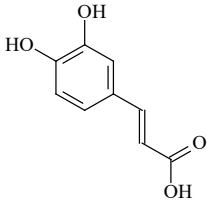
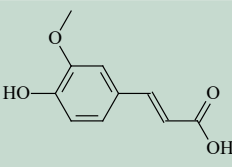
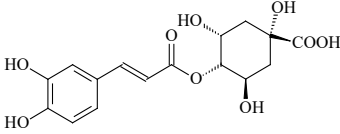
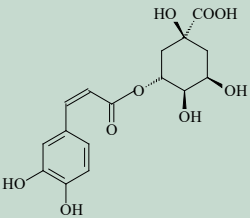
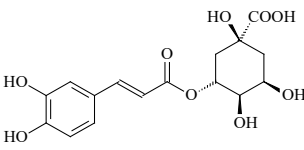
Continua...

Tabela 1. Continuação...

Compostos ¹	GMD ²	Estruturas moleculares
Alantoína	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/28925d1b-da97-4cc3-8c7c-92e621794bba.aspx	
Etanolamina	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/3771176a-f95b-494a-8172-e57260ac372c.aspx	
Tiramina	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/b3e2cf69-7211-4a8f-997c-6a5e78edac2.aspx	
Ácidos orgânicos		
Ácido α -cetoglutárico	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/1cf4b4b-db79-44cc-a47e-7806308fdda9.aspx	
Ácido cítrico	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/5cb91881-3359-4fbb-a8e4-dd2f007f01ba.aspx	
Ácido fumárico	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/a6f751bb-bf57-4852-9368-825eff3c501b.aspx	
Ácido málico	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/607dbf7c-9714-402b-b03a-2cc96dc5ce02.aspx	
Ácido oxálico	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/0bf5e196-b197-4367-8cd1-178370479a2f.aspx	
Ácido láctico	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/99470209-71ef-4ffb-95b8-e09125766973.aspx	

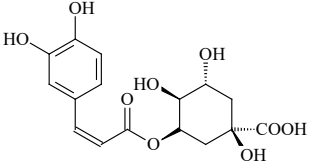
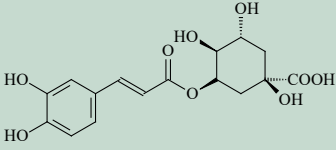
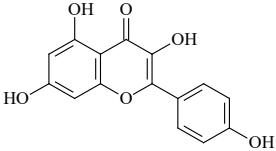
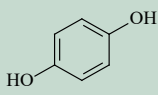
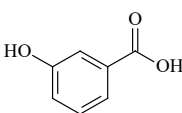
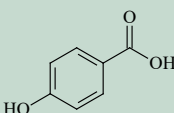
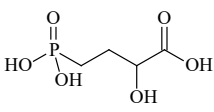
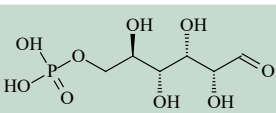
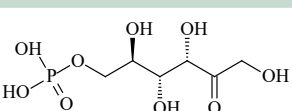
Continua...

Tabela 1. Continuação...

Compostos ¹	GMD ²	Estruturas moleculares
Ácido succínico	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/1f4c55c2-6f41-4b79-b994-aacdf9d87c19.aspx	
Compostos fenólicos		
(cis) Ácido cafeico	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/e41b163a-5274-4b66-a8f6-7332a0b048a3.aspx	
(trans) Ácido cafeico	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/5f2eb568-4f1c-4241-810d-95c2a13093f7.aspx	
(trans) Ácido ferúlico	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/0ae47e69-3fa6-471b-bfdf-af84e4d3201f.aspx	
(trans) Ácido-4-cafeiolquinico	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/0292159d-8ee5-4b0b-9756-17ef4f55263a.aspx	
(cis) Ácido-3-cafeiolquinico	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/5bb480fd-2d3a-4b4b-ad0f-7f689f761079.aspx	
(trans) Ácido-3-cafeiolquinico	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/a7805fdf-1028-4275-a8f1-3620610199f6.aspx	

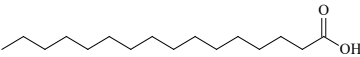
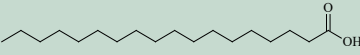
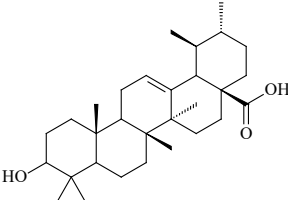
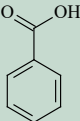
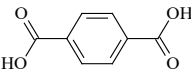
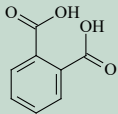
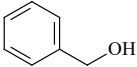


Continua...

Tabela 1. Continuação...

Compostos ¹	GMD ²	Estruturas moleculares
(cis) Ácido-5-cafeiolquinico	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/cc50f7e3-1cc3-4de4-a8d0-efa9254afda5.aspx	
(trans) Ácido-5-cafeiolquinico	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/aa690cf2-1ec3-4e0a-99cf-dd24992eee9a.aspx	
Campferol	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/8d39ebd9-83c2-4fc9-b280-e4907644d03d.aspx	
Hidroquinona	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/8b23fe21-6359-4da2-b666-164e66f4c21d.aspx	
Ácido 3-hidroxi-benzóico	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/9926508b-c453-4081-b146-ccce942c106e.aspx	
Ácido 4-hidroxi-benzóico	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/268378c6-0982-40e1-96ac-1a26f13758a3.aspx	
Orgânicos fosfatados		
Ácido glicérico-3-fosfato	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/b68adc4a-a164-498b-8d60-3b2ad81e217c.aspx	
Glicose-6-Fosfato	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/1c7cf56b-eba8-4080-a6ef-5138c443b2bf.aspx	
Frutose-6-Fosfato	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/8a5ba2a2-c127-4ae7-81cc-1daf5f7e2e1f.aspx	

Continua...

Tabela 1. Continuação...

Compostos ¹	GMD ²	Estruturas moleculares
Lipídios		
Ácido hexadecanóico	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/e8976ad5-04d7-4c42-8897-efcb2ca0a171.aspx	
Ácido octadecanóico	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/4d17daa9-d912-48d4-b0b6-11d968190b46.aspx	
Ácido ursólico	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/358e123f-d610-412e-876c-d585e77264ed.aspx	
Compostos aromáticos		
Ácido benzóico	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/17b178c8-9728-450b-a13a-7ccc5fc301c9.aspx	
Ácido 1,4-dicarboxílico-benzóico ³	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/d7258d1b-c6d6-4c79-9560-04574b4f8f40.aspx	
Ácido 3,4-dicarboxílico-benzóico ³	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/bf2e3aed-aa53-48b5-9d29-c248e018c96c.aspx	
Ácido Benzílico	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/2d367f6b-d827-4ab7-8bda-5c6c7315af7f.aspx	
Inorgânicos		
Ácido bórico	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/e2b4bb4a-ef6a-4fca-ad6d-655de1cff81e.aspx	
Ácido fosfórico	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Analytes/87daec85-6f71-4239-8d48-5590da42ce45.aspx	

¹ Os nomes compostos estão apresentados (i.e., nomes e estruturas) sem as derivatizações usadas para análises por CG-EM, entretanto as referências listadas estão associadas aos compostos derivatizados; ² GMD - Golm metabolome database; ³ Compostos referenciados não estão derivatizados.

Na classe dos compostos nitrogenados estão presentes várias classes químicas, sendo a presença do átomo de nitrogênio o ponto em comum (Tabela 1). Destaca-se a presença da cafeína (classe das xantinas), um importante composto nos tecidos foliares da erva-mate, onde pode ser encontrado em alta concentração, em geral 1% a 2% de tecido seco (Heck; De Mejia, 2007).

A maioria dos ácidos orgânicos presentes nos tecidos da erva-mate encontram-se em suas formas aniônicas, no ciclo do ácido cítrico (Ciclo de Krebs), sendo esses os ácidos α -cetoglutarico, cítrico, fumarico e málico (Tabela 1). É importante salientar a presença do ácido succínico, um regulador da rota da SAM (S-adenosil-metionina (Ashihara et al., 2008)), principal rota para obtenção de cafeína e seus derivados.

Compostos fenólicos ou polifenóis são uma das classes químicas identificadas frequentemente em plantas, e são reconhecidos como antioxidantes naturais (Tanase, 2019). Os derivados do cafeol são os constituintes majoritários nos tecidos foliar de erva-mate (Heck; De Mejia, 2007), aqui representados nos extratos metanólicos, nos isômeros *cis* e *trans* dos ácidos cafeico, 3-cafeiolquínico, 4-cafeiolquínico e 5-cafeiolquínico (Tabela 1). É interessante mencionar que a análise dos ácidos dicafeiolquínicos não é possível com a técnica de cromatografia gasosa usada, devido às suas elevadas massas moleculares. Como compostos fenólicos são aqueles que contêm anéis aromáticos hidroxilados, a hidroquinona e os ácidos

3-hidroxi-benzóico e 4-hidroxi-benzóico estão presentes nessa classe, embora não exista evidência que atuem como antioxidantes naturais.

Outras quatro classes de compostos foram criadas com a presença de poucos compostos nelas: (i) compostos fosfatados, (ii) lipídios, (iii) compostos aromáticos e (iv) composto inorgânicos (Tabela 1). A fosforilação de açúcares está diretamente ligada à glicólise e são importantes na rota biossintética de amido e glicose (Taiz; Zeiger, 2013). Os lipídios são moléculas que possuem baixa solubilidade em água e contêm alto teor de hidrocarbonetos, aqui destaca-se o ácido ursólico, um componente das saponinas triterpênicas presente em tecido foliar de erva-mate (Gosmann et al., 1995). Os compostos aromáticos detectados apresentam um único anel benzênico e, além do ácido benzoico que pode estar associado à síntese do ácido salicílico (Lee et al., 1995), os demais compostos não apresentam uma função específica em tecidos foliares. Por fim, os compostos inorgânicos presentes (i.e., fósforo e boro) são nutrientes identificados nos tecidos.

Em resumo, a análise de compostos polares via CG-EM do tecido foliar adulto de erva-mate possibilitou a detecção de um grande número de compostos, sendo que 96 compostos foram anotados. Entretanto, é importante salientar que, com uma técnica analítica isolada, não é possível detectar todos os compostos presentes em uma determinada amostra e que essa possui suas limitações. De qualquer forma, a relação

dos compostos listados nesse trabalho acrescenta ao número de compostos presentes no tecido foliar de erva-mate, o que é de importância fundamental para a compreensão da fisiologia da espécie e para a busca por novos compostos bioativos.

Referências

- ANDERSON, L.; WOLTER, K. E. Cyclitols in plants: biochemistry and physiology. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 17, n. 1, p. 209–222, 1966. DOI: <<https://doi.org/10.1146/annurev.pp.17.060166.001233>>.
- ASHIHARA, H.; SANO, H.; CROZIER, A. Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. **Phytochemistry**, v. 69, n. 4, p. 841–856, 2008. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.10.029>>.
- BRACESCO, N.; SANCHEZ, .G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 378–384, 2011. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.06.032>>.
- CARDOZO JUNIOR, E. L.; MORaAND, C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health: a review. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 440–454, 2016. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.12.010>>.
- DETHLOFF, F.; ERBAN, I. O.; APLPERS, J.; FEHRLE, I.; BEINE-GOLOVCHUK, O.; SCHMIDT, S.; SCHWACHTJE, J.; KOPKA, J. Profiling methods to identify cold-regulated primary metabolites using gas chromatography coupled to mass spectrometry. In: HINCHA, D.
- K.; ZUTHER, E. (Ed.). **Plant cold acclimation**. [S.l.]: Springer, 2014. p. 171–197. (Methods in molecular biology, 1166).
- DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v. 411, n. 6839, p. 843–847, 2001. DOI: <<https://doi.org/10.1038/35081178>>.
- DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 285–294, 2005. DOI: . <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.11.021>>.
- FOWLER, J. A. P.; STURION, J. A. **Aspectos da formação do fruto e da semente na germinação da erva-mate**. Colombo: Embrapa Florestas, 2000. 5 p. (Embrapa Florestas. Comunicado técnico). Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/289938>>.
- GARRETT, R. H.; GRISHAM, C. M. **Biochemistry**. Belmont: Thomson Brooks/Cole, 2005.
- GOSMANN, G.; GUILLAUME, D.; TAKETA, A. C. T.; SCHENKEL, E. P. Triterpenoid saponins from *Ilex paraguariensis*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 3, p. 438–441, 1995. DOI: <<https://doi.org/10.1021/np50117a015>>.
- HALL, R. D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. **New Phytologist**, v. 169, n. 3, p. 453–468, 2006. DOI: <<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01632.x>>.
- HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. R138–R151, 2007. DOI: <<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x>>.
- HUMMEL, J.; SELBIG, J.; WALTHER, D.; KOPKA, J. The golm metabolome database: a database for GC-MS based metabolite profiling. In: **Metabolomics**. [s.l.]: Springer, 2007. p. 75–95. DOI: <https://doi.org/10.1007/4735_2007_0229>.
- KOPKA, J.; SCHAUER, N.; KRUEGER, S.; BIRKEMEYER, C.; USADEL, B.; BERGMÜLLER, E.; DÖRMANN, P.; WECKWERTH, W.; GIBON, Y.; STITT, M.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R.; STEINHAUSE, D. GMD@ CSB. DB: the Golm metabolome database. **Bioinformatics**, v. 21, n. 8, p. 1635–1638, 2005. DOI: <<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti236>>.

LEE, H.-I.; LEÓN, J.; RASKIN, I. Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 10, p. 4076–4079, 1995. DOI: <<https://doi.org/10.1073/pnas.92.10.4076>>.

LUEDEMANN, A.; STRASSBURG, K.; ERBAN, A.; KOPKA, J. TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography: mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. **Bioinformatics**, v. 24, n. 5, p. 732–737, 2008 DOI: <<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn023>>.

MÁRQUEZ, V.; MARTÍNEZ, N.; GUERRA, M.; FARIÑA, L.; BOIDO, E.; DELLACASSA, E. Characterization of aroma-impact compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) using GC-olfactometry and GC-MS. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 808–815, 2013. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.016>>.

MATEI, M. F.; JAISWAL, R.; PATRAS, M. A.; KUHNERT, N. LC-MSn study of the chemical transformations of hydroxycinnamates during yerba maté (*Ilex paraguariensis*) tea brewing. **Food Research International**, v. 90, p. 307–312, 2016. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.017>>.

OLIVEIRA, Y. M. M. de; ROTTA, E. Área de distribuição natural de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, 10., 1983, Curitiba. **Silvicultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis*): anais...** Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, 1985. p. 17-36. (EMBRAPA-CNPQ. Documentos, 15).

RADERMACHER, A. L.; DU TOIT, S. F.; FARRANT, J. M. Desiccation-driven senescence in the resurrection plant *Xerophyta schlechteri* (Baker) NL Menezes: comparison of anatomical, ultrastructural and metabolic responses between senescent and non-senescent tissues. **Frontiers**

in Plant Science, v. 10, p. 1396, 2019. DOI: <<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01396>>.

SCHAUER, N.; STEINHAUSER, D.; STRELKOV, S.; SCHOMBURG, D.; ALLISON, G.; MORITZ, T.; LUNDGREN, K.; ROESSNER-TUNALI, U.; FORBES, M. G.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R.; KOPKA, J. GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. **FEBS Letters**, v. 579, n. 6, p. 1332–1337, 2005. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.01.029>>.

STREHMEL, N.; HUMMEL, J.; ERBAN, A.; STRASSBURG, K.; KOPKA, J. Retention index thresholds for compound matching in GC-MS metabolite profiling. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 871, n. 2, p. 182–190, 2008. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.04.042>>.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

TANASE, C.; BUJOR, O.-C.; POPA, V. I. Phenolic natural compounds and their influence on physiological processes in plants. In: **Polyphenols in plants**. [S.l.] Elsevier, 2019. p. 45–58.

WAGNER, C.; SEFKOW, M.; KOPKA, J. Construction and application of a mass spectral and retention time index database generated from plant GC/EI-TOF-MS metabolite profiles. **Phytochemistry**, v. 62, n. 6, p. 887–900, 2003. DOI: <[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00703-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00703-3)>.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F. **Solução nutritiva para condução de minicepas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) em sistema semi-hidropônico**. Colombo: Embrapa Florestas, 2008. (Embrapa Florestas. Circular técnica, 157). Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/306529>>.

Exemplares desta edição
podem ser adquiridos na:

Embrapa Florestas

Estrada da Ribeira, km 111, Guaraituba,
Caixa Postal 319
83411-000, Colombo, PR, Brasil
Fone: (41) 3675-5600
www.embrapa.br/florestas
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

Versão digital (2020)



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Florestas

Presidente

Patrícia Póvoa de Mattos

Vice-Presidente

José Elidney Pinto Júnior

Secretária-Executiva

Elisabete Marques Oaida

Membros

Annete Bonnet

Cristiane Aparecida Fioravante Reis

Guilherme Schnell e Schühli

Krisle da Silva

Marcelo Francia Arco-Verde

Marcia Toffani Simão Soares

Marilice Cordeiro Garrastazu

Valderês Aparecida de Sousa

Supervisão editorial/Revisão de texto

José Elidney Pinto Júnior

Normalização bibliográfica

Francisca Rasche

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

Neide Makiko Furukawa

Ilustração capa:

Tamires Oliveira de Melo

CCPE