

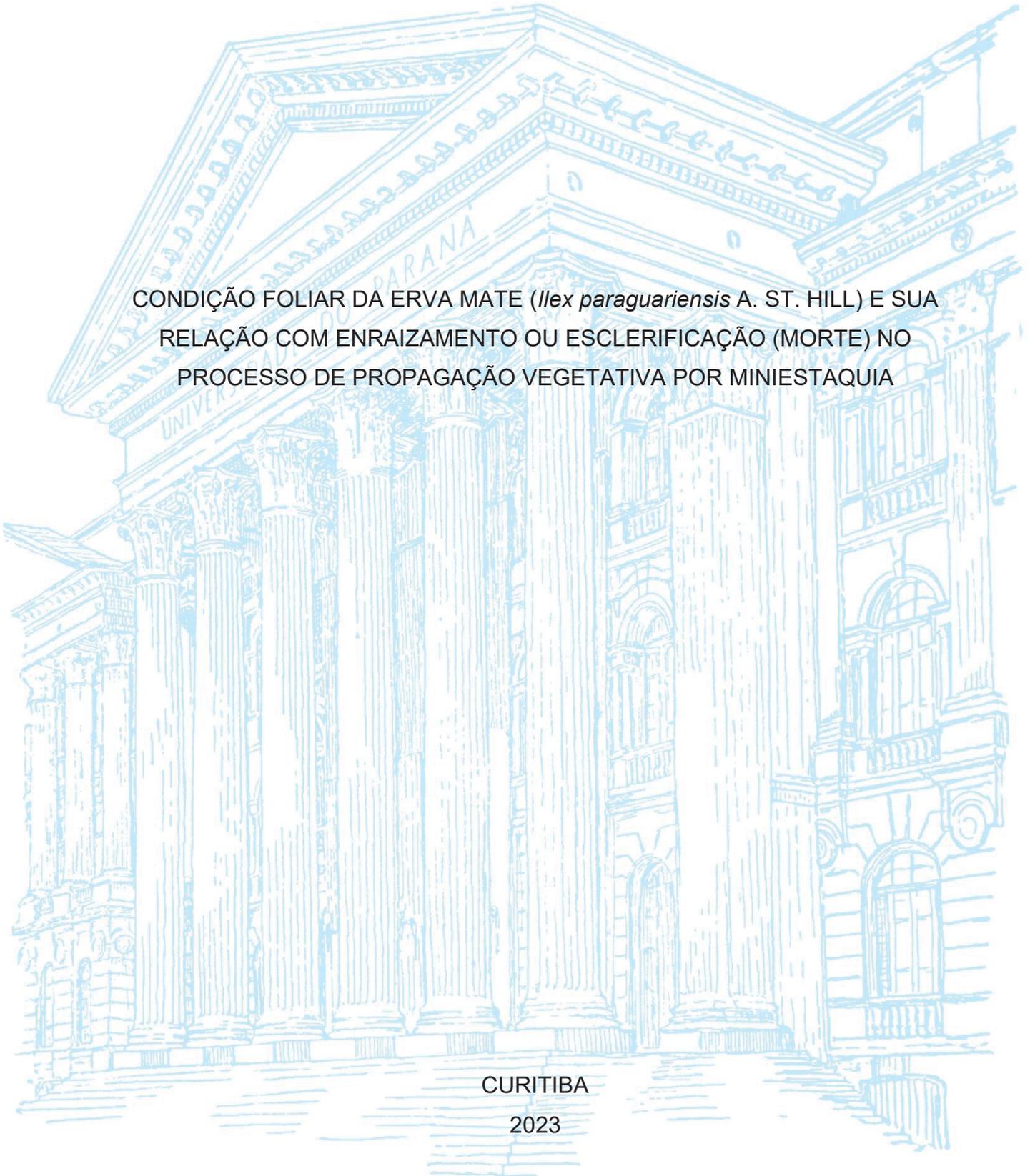
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCIELE MENEGOLLA

CONDIÇÃO FOLIAR DA ERVA MATE (*Ilex paraguariensis* A. ST. HILL) E SUA  
RELAÇÃO COM ENRAIZAMENTO OU ESCLERIFICAÇÃO (MORTE) NO  
PROCESSO DE PROPAGAÇÃO VEGETATIVA POR MINIASTAQUIA

CURITIBA

2023



FRANCIELE MENEGOLLA

CONDIÇÃO FOLIAR DA ERVA MATE (*Ilex paraguariensis* A. ST. HILL) E SUA  
RELAÇÃO COM ENRAIZAMENTO OU ESCLERIFICAÇÃO (MORTE) NO  
PROCESSO DE PROPAGAÇÃO VEGETATIVA POR MINIESTAQUIA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lazzarotto

Colaboradores: Dr. Fabrício Augusto Hansel  
Dr. Ivar Wendling

CURITIBA

2023

Menegolla, Franciele

Condição foliar da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hill) e sua relação com enraizamento ou esclerificação (morte) no processo de propagação vegetativa por ministaquia [recurso eletrônico] / Franciele Menegolla – Curitiba, 2023.

1 recurso online : PDF

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2023.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lazzarotto

Colaboradores: Dr. Fabrício Augusto Hansel

Dr. Ivar Wendling

1. *Ilex paraguariensis*. 2. Ácido clorogênico. 3. Células clonais. I. Lazzarotto, Marcelo. II. Hansel, Fabrício Augusto. III. Wendling, Ivar. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 583.982



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de FRANCIELE MENEGOLLA intitulada: **CONDIÇÃO FOLIAR DA ERVA MATE (*Ilex paraguariensis* A. ST. HILL) E SUA RELAÇÃO COM ENRAIZAMENTO OU ESCLERIFICAÇÃO (MORTE) NO PROCESSO DE PROPAGAÇÃO VEGETATIVA POR MINIESTAQUIA**, sob orientação do Prof. Dr. MARCELO LAZZAROTTO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 10 de Julho de 2023.

Assinatura Eletrônica

11/07/2023 17:24:52.0

MARCELO LAZZAROTTO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

12/07/2023 10:50:59.0

SAMANTA DALIANA GOLIN PACHECO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

10/08/2023 16:43:43.0

JULIANA DEGENHARDT GOLDBACH

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

Aos meus pais, Orildes e Natalino, que me proporcionaram a vida e os melhores exemplos de persistência e superação.

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder saúde e perseverança para vencer essa etapa e superar todos os desafios enfrentados.

À minha mãe (Orildes), meu irmão (Alan) e meu afilhado (Joaquim), por me fornecerem todo o amor e apoio emocional necessário nos momentos mais difíceis, apesar da distância.

Ao meu saudoso pai, Natalino, que infelizmente nos deixou no decorrer desta trajetória, mas que certamente guiou meus passos ao lado Dele!

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por proporcionarem meu ingresso, manutenção e conclusão do curso, mesmo frente às adversidades encontradas durante a pandemia de Covid-19.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFPR que também me propiciou o curso de excelentes disciplinas, voltadas a minha área de atuação e pesquisa.

Ao meu orientador, professor Dr. Marcelo Lazzarotto, que assumiu esse grande desafio de conduzir meu projeto.

A todos os professores da universidade que ministraram as disciplinas cursadas ao longo do mestrado, especialmente aqueles que disponibilizam seu tempo e recursos de seus laboratórios para me auxiliar no meu projeto: Dra. Francinete Ramos Campos e Dr. Roberto Pontarolo (PPGCF-UFPR); Dr. Frederico L. F. Soares, Dra. Noemi Nagata e Dr. Patrício G. P. Zamora (PPGQ-UFPR).

À Embrapa Florestas (Colombo/PR), que me propiciou a condução de um projeto voltado aos meus anseios de desenvolvimento pessoal, relacionado à área analítica, empregando técnicas distintas daquelas que costumo trabalhar rotineiramente na indústria farmacêutica. Agradeço imensamente aos colaboradores Dr. Ivar Wendling, Dra. Juliana Degenhardt Goldbach e Dra. Manoela Mendes, pelos ensinamentos e suporte na condução do projeto. Agradeço, em especial, ao Dr. Fabricio Augusto Hansel, que foi paciente e incansável em toda a minha trajetória de desenvolvimento.

Por fim, agradeço aos meus colegas de trabalho, que me suportaram diariamente (em todos os sentidos), e ao Herbarium Laboratório Botânico Ltda, por me conceder a oportunidade de conciliar a pós-graduação em períodos concorrentes com a jornada de trabalho. Agradeço imensamente aos queridos amigos e confidentes Aline Cunha, Eric Moura, Luzia Franco, Thais Bolognesi e, em especial, a Tamires Melo, que me auxiliou diretamente neste processo, a começar pela indicação da oportunidade de projeto junto à Embrapa Florestas.

“Pois o belo muda, o saber muda, a inteligência  
muda, a medida muda. Mas o desejo é  
inalterável.”

Rubem Fonseca

## RESUMO

A *Ilex paraguariensis* A.St. Hil (erva mate) é uma espécie nativa da região Sul da América do Sul, amplamente difundida pelo consumo de suas folhas na forma de infusão (chá, tererê ou chimarrão). Suas características químicas conferem aplicações importantes não só para a indústria de alimentos e bebidas, mas também para a indústria farmacêutica e cosmética, que vem desenvolvendo produtos a partir de extratos obtidos das folhas desta espécie. Para que estas indústrias possam desenvolver esses produtos de forma reprodutível e sustentável, a padronização da matéria-prima utilizada faz-se necessária. Essa padronização, por sua vez, pode ser obtida por meio da seleção de genótipos (clones) específicos de erva mate, propagados a partir de técnicas como a miniestaquia, que propiciam a maior regulação dos perfis fitoquímicos desejados. Diferentes genótipos, porém, apresentam variações metabólicas que podem influenciar direta ou indiretamente o enraizamento das miniestacas produzidas, impactando a produtividade deste processo de propagação vegetativa. Neste contexto, de forma a avaliar a potencial correlação entre os compostos encontrados nas folhas das miniestacas propagadas com a respectiva resposta de enraizamento, um estudo do perfil de metabólitos polares foi realizado para 2 clones distintos de erva mate: EC24 e EC50, com características de alta e baixa performance de rizogênese, respectivamente. Durante a produção das miniestacas (n = 60 para clone), parte das respectivas folhas foi coletada e armazenada em freezer a -80°C para posterior seleção e análise de seus metabólitos. Após um período de 120 dias em casa de vegetação, as miniestacas foram avaliadas quanto às respostas de enraizamento e morte, sendo definidas as 5 amostras biológicas selecionadas para o estudo, referentes a cada resposta e a cada clone estudado (total = 20 amostras biológicas). Os metabólitos polares das folhas das miniestacas selecionadas foram extraídos, derivatizados e analisados por CG-EM, em duplicata (total = 40 amostras químicas). A identificação dos compostos foi executada por meio do software AMDIS, utilizando biblioteca de espectros de massas e de índices de retenção, enquanto a quantificação foi realizada por meio do software XCalibur, a partir da padronização interna realizada com <sup>13</sup>C-Sorbitol. As análises estatísticas dos dados foram realizadas de forma multivariada (PCA) e univariada pelo software R. Os resultados indicam que a condição foliar é um fator importante para o enraizamento da miniestacas, e que há uma correlação positiva entre os níveis de sacarose e a diferenciação entre clones e seu enraizamento. O mioinositol, por sua vez, destacou-se como um metabólito importante para a rizogênese de ambos os genótipos estudados. Os derivados hidroxicinâmicos como o ácido clorogênico, por fim, foram evidenciados como metabólitos importantes para o enraizamento do clone de baixa performance (EC50), indicando o seu potencial de uso no aprimoramento da técnica de propagação por miniestaquia aplicada à produção de erva mate.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*. Miniestaquia. Enraizamento. Metabólitos polares. CG-EM.

## ABSTRACT

*Ilex Paraguariensis* A.ST. Hil (Yerba mate) is a native species of the southern region of South America, widespread by the consumption of its leaves as infusion (tea, tererê or chimarrão). Its chemical characteristics give important applications not only for the food and beverage industry, but also for the pharmaceutical and cosmetic industry, which has been developing products from extracts obtained from the leaves of this species. To develop these products in a reproducible and sustainable manner, the standardization of the raw material used is necessary. This standardization can be obtained through specific genotypes of yerba mate, propagated from techniques such as mini-cutting, which provide greater regulation of desired phytochemical profiles. Different genotypes, however, have metabolic variations that can directly or indirectly influence the rooting of the mini-cuttings produced, impacting the productivity of this propagation process. In this context, in order to evaluate the potential correlation between the compounds found in the leaves of mini-cuttings propagated with their rooting response, a study of the profile of polar metabolites was performed for 2 distinct genotypes of yerba mate: EC24 and EC50 (with high and low performance of rhizogenesis, respectively). During the production of mini-cuttings (n = 60 for each genotype), part of the leaves was collected and stored in a freezer (-80 ° C) for subsequent selection and analysis of their metabolites. After a period of 120 days, all mini-cuttings were evaluated for rooting and death responses and 5 biological samples referring to each response and each genotype were selected for the study (total = 20 biological samples). The polar metabolites were extracted from the leaves of selected mini-cuttings, derivatized and analyzed by CG-EM, in duplicate (total = 40 chemical samples). The identification of the compounds was performed through the AMDIs software, using mass spectra library and retention index, while quantification was performed through Xcalibur software using <sup>13</sup>C-Sorbitol as an internal standard. Statistical analyzes of the data (PCA and univariate analysis) were performed by R software. The results indicate that the leaf condition is an important factor for the rooting of mini-cuttings, and that there is a positive correlation between sucrose levels and differentiation between clones and their rooting response. Myoinositol, in turn, was highlighted as an important metabolite for the rhizogenesis of both studied genotypes. Hydroxycinnamic derivatives such as chlorogenic acid were highlighted as important metabolites for the rooting of the low-performance genotype (EC50), indicating the potential use of this compound for the improvement of the mini-cutting propagation technique applied for yerba mate production.

**Keywords:** *Ilex paraguariensis*. Mini-cuttings. Rooting. Polar metabolites. GC-MS.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FORMAÇÃO DOS PRINCIPAIS ÁCIDOS FENÓLICOS PRESENTES EM ERVA-MATE.....	27
FIGURA 2 – FORMAÇÃO DOS DERIVADOS HIDROXICINÂMICOS (ÁCIDOS CLOROGÊNICOS).....	28
FIGURA 3 – FORMAÇÃO DA CAFEÍNA.....	29
FIGURA 4 – MECANISMO GERAL DA REAÇÃO DE SILILAÇÃO .....	36
FIGURA 5 – METOXIMAÇÃO E SILILAÇÃO DE UMA MOLÉCULA DE GLUCOSE	36
FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS	41
FIGURA 7 – MINICEPAS CULTIVADAS EM MINIJARDIM CLONAL COM SISTEMA SEMI-HIDROPÔNICO (EMBRAPA FLORESTAS, COLOMBO, PARANÁ).....	45
FIGURA 8 – PRODUÇÃO DE MINIESTACAS A PARTIR DE MINICEPAS CULTIVADAS EM MINIJARDIM CLONAL .....	46
FIGURA 9 – ESQUEMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E DERIVATIZAÇÃO DOS METABÓLITOS DAS FOLHAS DE ERVA MATE .....	49
FIGURA 10 – ESQUEMA DE SELEÇÃO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA SEGUNDO DISTRIBUIÇÃO DE PROBABILIDADE DAS VARIÁVEIS (COMPOSTOS ANALISADOS).....	51
FIGURA 11 – AVALIAÇÃO DAS MINIESTACAS APÓS PERÍODO DE ENRAIZAMENTO.....	53
FIGURA 12 – SCORES E LOADINGS DAS VARIÁVEIS (COMPOSTOS) CONSIDERANDO OS FATORES F1 (CLONE) E F2 (RESPOSTA MINIASTAQUIA).....	58
FIGURA 13 – SCORES DAS VARIÁVEIS CONSIDERANDO OS FATORES F1 (CLONES) E F2 (RESPOSTA MINIASTAQUIA) SEPARADAMENTE .....	59
FIGURA 14 – HISTOGRAMAS DA CONCENTRAÇÃO DE METABÓLITOS E SUA RELAÇÃO COM OS FATORES “CLONE” E “RESPOSTA” - AMINOÁCIDOS.....	64

FIGURA 15 – HISTOGRAMAS DA CONCENTRAÇÃO DE METABÓLITOS E SUA RELAÇÃO COM OS FATORES “CLONE” E “RESPOSTA” - AÇÚCARES .....	65
FIGURA 16 – HISTOGRAMAS DA CONCENTRAÇÃO DE METABÓLITOS E SUA RELAÇÃO COM OS FATORES “CLONE” E “RESPOSTA” – DERIVADOS CAFEOILQUÍNICOS .....	66

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – PRODUÇÃO DE FOLHAS DE ERVA MATE NO BRASIL (2019-2021) .....	19
QUADRO 2 – PROPRIEDADES FUNCIONAIS E FARMACOLÓGICAS DA ERVA MATE E DE SEUS DERIVADOS.....	20
QUADRO 3 – PRINCIPAIS COMPOSTOS IDENTIFICADOS EM ERVA-MATE E SUA CORRELAÇÃO COM POTENCIAIS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS .....	26
QUADRO 4 – EXEMPLOS DE REAGENTES UTILIZADOS PARA SILILAÇÃO.....	35
QUADRO 5 – EXEMPLOS DE PRÉ-TRATAMENTOS APLICADOS EM QUIMIOMETRIA .....	38
QUADRO 6 – TESTES ESTATÍSTICOS SEGUNDO DESENHO EXPERIMENTAL E DISTRIBUIÇÃO DOS DADOS .....	42
QUADRO 7 – COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO NUTRITIVA UTILIZADA NO SISTEMA DE FERTIRRIGAÇÃO DO MINIJARDIM CLONAL .....	44
QUADRO 8 – ORGANIZAÇÃO/CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA AS ANÁLISES ESTATÍSTICAS NO <i>SOFTWARE R</i> .....	57
QUADRO 9 – PRINCIPAIS VARIÁVEIS AVALIADAS NO GRÁFICO DE <i>LOADINGS</i> (PCA COM PRÉ-PROCESSAMENTO POR PARETO) E SUA CORRELAÇÃO COM OS FATORES ESTUDADOS .....	61
QUADRO 10 – PRINCIPAIS METABÓLITOS VERIFICADOS NAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS E SUA CORRELAÇÃO COM OS FATORES ESTUDADOS.....	69

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – RESULTADOS DA PROPAGAÇÃO POR MINIESTAQUIA.....	52
TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS SELECIONADAS PARA ANÁLISE DE METABÓLITOS POLARES POR CG-EM .....	53
TABELA 3 – COMPOSTOS IDENTIFICADOS NAS AMOSTRAS ANALISADAS E SUA CONCENTRAÇÃO MÉDIA NORMALIZADA ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) DETERMINADA POR CG-EM .....	55
TABELA 4 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS UNIVARIADAS APLICADAS A AMINOÁCIDOS, AÇÚCARES E DERIVADOS CAFEOILQUÍNICOS	63

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AIB	- Ácido indolbutírico
AIA	- Ácido 3-indol-acético
AMDIS	- Automated Mass Spectra Deconvolution and Identification System
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
EMBRAPA	- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
CG-EM	- Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
CLR	- Centered Log Ratio
IR	- Índice de retenção
GLM	- Modelos Lineares Generalizados
m/z	- Razão massa:carga
MSTFA	- N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide
NP	- Não paramétrico
PC	- Principal Component
PCA	- Principal Component Analysis
PLS-DA	- Partial Least Squares Regression Discriminant Analysis
RT	- Tempo de retenção em minutos
TMS	- Trimetilsilano

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
3.1 ERVA MATE ( <i>ILEX PARAGUARIENSIS</i> A. ST. HILL) .....	19
3.1.1 Aplicações e atividades farmacológicas da erva mate .....	20
3.1.2 Principais metabólitos da erva mate .....	26
3.1.3 Cultivo e propagação da erva mate .....	29
3.1.3.1 Propagação vegetativa por miniestaquia .....	31
3.2 CG-EM PARA ANÁLISE DE METABÓLITOS EM PLANTAS .....	33
3.2.1 Técnicas de derivatização aplicadas a análises por CG-EM .....	34
3.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS MULTIVARIADAS .....	36
3.3.1 Organização e pré-tratamento dos dados .....	38
3.3.2 Análise de componentes principais (PCA) .....	39
3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS UNIVARIADAS .....	41
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
4.1 SELEÇÃO DOS CLONES DE ERVA MATE .....	44
4.2 PROPAGAÇÃO DOS CLONES SELECIONADOS POR MINIESTAQUIA .....	45
4.2.1 Preparo das miniestacas e coleta das folhas para análise de metabólitos .....	45
4.2.2 Avaliação das respostas das miniestacas e seleção de amostras .....	46
4.3 ANÁLISE DE METABÓLITOS DAS FOLHAS DE ERVA MATE .....	47
4.3.1 Preparo das amostras (pulverização das folhas das miniestacas) .....	47
4.3.2 Extração dos metabólitos polares .....	48
4.3.3 Derivatização dos metabólitos para análise por CG-EM .....	48
4.3.4 Análise por CG-EM .....	49
4.3.5 Identificação e quantificação dos metabólitos detectados .....	50
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS .....	50
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>52</b>
5.1 PERFORMANCE DOS CLONES NA PROPAGAÇÃO POR MINIESTAQUIA .....	52
5.2 METABÓLICOS ANALISADOS POR CG-EM .....	53
5.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	57

5.3.1 Análise de Componentes Principais (PCA) .....	57
5.3.2 Análises univariadas.....	62
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES FUTURAS .....</b>	<b>74</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A demanda por produtos provenientes de plantas de ecossistemas florestais, pelo setor industrial, tem se intensificado nas últimas décadas. Os produtos não madeireiros são destacados, já que oferecem uma variedade de usos e distinção de outros produtos básicos, podendo ser empregados como matéria-prima para a indústria de alimentos, farmacêutica ou cosmética (FOWLER, 2000; FIEDLER *et al.*, 2008). Devido ao seu sabor e aroma característicos, juntamente com seus benefícios medicinais, a *Ilex paraguariensis* St. Hil., popularmente conhecida por erva mate, tem sido cultivada e suas folhas utilizadas na forma de infusão no Sul da América-latina (FILIP *et al.*, 2007; HECK, MEJIA, 2007).

Os benefícios medicinais da erva mate estão relacionados principalmente à presença de flavonoides como rutina, ácidos fenólicos (*e.g.* ácidos cafeiolquínicos, ácido cafeico) e metilxantinas (*e.g.* cafeína e teobromina), metabólitos oxidados a outros constituintes no alimento ou componentes celulares e tecidos durante a ingestão (GUGLIUCCI, MENINI, 2002; HECK, MEJIA, 2007; MEJIA *et al.*, 2010).

O processo reprodutivo da *I. paraguariensis* é iniciado a partir de árvores de ocorrência florestal ou árvores cultivadas em sítios adequados, provenientes de sementes (CARVALHO, 2006). Entretanto ainda existe grande heterogeneidade da matéria-prima cultivada, sendo que esse efeito tem sido minimizado pela utilização da propagação vegetativa para a produção comercial de mudas de erva mate, que possibilita a multiplicação de indivíduos geneticamente idênticos à planta matriz. No princípio esses sistemas clonais focaram principalmente no rendimento foliar (FERNANDES *et al.*, 2000; RESENDE *et al.*, 2000), mas hoje, a qualidade foliar, ou seja, a composição química da matéria-prima, é uma preocupação para aumentar o apelo comercial da espécie.

O aperfeiçoamento da propagação clonal de espécies florestais ocorreu no início da década de 80, juntamente com o aperfeiçoamento das tecnologias genômicas, que geraram uma ampla quantidade de dados de sequência de DNA, permitindo uma visão ampla sobre o número de genes que constituem os organismos (SCHAUER *et al.*, 2005). Entretanto, o conhecimento da sequência de genes de um organismo não é suficiente para entender os mecanismos de funcionalidade de uma célula. Desde então, as pesquisas concentram-se em desvendar a função dos genes, ao invés de simplesmente sequenciar o DNA. Assim novos campos surgiram, dentre

eles destaca-se a metabolômica (FIEHN, 2002; SCHAUER *et al.*, 2005; VILLAS-BÔAS, GOMBERT, 2006).

A metabolômica foi introduzida por Fiehn e colaboradores nos anos 2000, a partir de observações de que alterações no transcriptoma ou no proteoma nem sempre correspondiam a alterações fenotípicas (FIEHN *et al.*, 2000; SCHAUER, FERNIE, 2006). Os metabólitos desempenham uma importante ação nas distintas vias do metabolismo celular, uma vez que sua quantidade no interior celular é determinada pela concentração e características das enzimas. Portanto, a quantidade de metabólitos representa uma informação integrativa da função molecular celular que define uma característica fenotípica em resposta a alterações ambientais ou genéticas (FIEHN, 2002; VILLAS BOAS, GOMBERT, 2006).

O perfil metabólico é normalmente obtido através de técnicas cromatográficas, sendo a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) amplamente difundida, por permitir alta eficiência na separação de misturas biológicas complexas (SUMNER, MENDES, DIXON, 2003).

A análise de perfil metabólico (metabólitos polares) e sua relação com a efetividade da propagação vegetativa ainda é pouco explorada, dificultando o aprimoramento da técnica e o aumento da produtividade deste processo. Desta forma, propõe-se o estudo do perfil dos metabólitos polares por CG-EM em clones de erva mate com diferentes características de performance durante o processo de propagação vegetativa, visando a identificação de uma correlação entre a condição foliar da miniestaca de origem e as respostas observadas no processo de propagação vegetativa. A análise de metabólitos polares via CG-EM se apresenta interessante, pois analisa de maneira simultânea os principais metabólitos primários essenciais para o desenvolvimento da planta (*e.g.* açúcares, ácidos do ciclo dos ácidos carboxílico e aminoácidos) além de metabólitos secundários importantes na erva mate, como a cafeína e os ácidos clorogênicos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar os principais fatores da condição foliar que afetam a propagação vegetativa por miniestaquia em clones contrastantes de *Ilex paraguariensis* A. ST. HILL quanto ao enraizamento.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Propagar por meio de miniestaquia dois clones de erva mate, com diferentes características de enraizamento (alta e baixa performance);
- Avaliar as respostas (enraizamento *versus* morte) das miniestacas após período de enraizamento em casa de vegetação (90 a 120 dias);
- Realizar análise comparativa dos metabólitos observados nas amostras das folhas coletadas durante a produção das miniestacas, por CG-EM, correlacionando os dados com as respostas de enraizamento e morte.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 ERVA MATE (*Ilex paraguariensis* A. ST. HILL)

A *Ilex paraguariensis* A. ST. HILL, popularmente conhecida como erva mate, é uma espécie arbórea pertencente à família Aquifoliaceae, nativa da América do Sul. Esta espécie é encontrada principalmente nas regiões sul e sudeste do Brasil, bem como nos países vizinhos como a Argentina, o Paraguai e o Uruguai (CARVALHO, 2006; HECK, MEJIA, 2007; CARDOZO JUNIOR, MORAND, 2016).

Segundo dados do IBGE, no Brasil os estados do Rio Grande do Sul e Paraná se destacam como os maiores produtores de folhas de erva mate. Juntos estes estados são responsáveis por mais de 85% da produção nacional, estimada em cerca de 558 mil toneladas no ano de 2021 (QUADRO 1).

QUADRO 1 – PRODUÇÃO DE FOLHAS DE ERVA MATE NO BRASIL (2019-2021)

ESTADO	QUANTIDADE PRODUZIDA (t)			VALOR DA PRODUÇÃO (x 1000 R\$)		
	2019	2020	2021	2019	2020	2021
RIO GRANDE DO SUL	233.434	214.552	242.018	199.196,00	231.744,00	286.300,00
PARANÁ	197.352	228.382	238.110	214.175,00	283.245,00	360.579,00
<b>BRASIL</b>	<b>522.259</b>	<b>527.546</b>	<b>557.987</b>	<b>482.003,00</b>	<b>576.805,00</b>	<b>723.760,00</b>

FONTE: IBGE (2023).

De acordo com Gerber *et al.* (2023), 80% da produção de erva mate no Brasil é destinada ao mercado doméstico, para sua utilização como bebida (chimarrão, mate ou chás), já sendo notável, porém, um crescimento no desenvolvimento de novos produtos à base de suas folhas, voltados principalmente à saúde humana. Em sua revisão de literatura referente à busca de patentes publicadas para produtos de erva mate nos últimos 20 anos (2000-2020), Gerber *et al.* (2023) encontraram 62 publicações relevantes relacionadas ao uso de biomassa de *Ilex paraguariensis*, aplicados especialmente à área farmacêutica. Como conclusão desse levantamento, os autores ainda destacaram o potencial de desenvolvimento de novos produtos em áreas relacionadas, como cosméticos e nutracêuticos, ou mesmo outras aplicações diversificadas, como desenvolvimento de embalagens, biopesticidas, sanitizantes, entre outros.

### 3.1.1 Aplicações e atividades farmacológicas da erva mate

Conforme introduzido anteriormente, as folhas de erva mate têm sido tradicionalmente utilizadas como alimentos e bebidas, o que permite considerá-las, portanto, como uma fonte alimentar segura e funcional, potencialmente empregada para o desenvolvimento de novos produtos voltados à área da saúde. Estudos toxicológicos pré-clínicos *in vitro* como os publicados por Andrade *et al.* (2012) e Albas *et al.* (2014), adicionalmente, reforçam que extratos secos da erva mate são seguros para uso agudo ou crônico. Além disso, a produção da erva mate, já realizada em escala industrial para fins alimentícios, é potencialmente capaz de suprir outras indústrias como as farmacêuticas e nutracêuticas, o que garantiria o fornecimento de matérias-primas para viabilizar a comercialização adicional de produtos aplicados a essas áreas (GERBER *et al.*, 2023).

No âmbito do desenvolvimento de aplicações da erva mate e de seus extratos para fins medicinais e cosméticos, já existem inúmeras publicações que associam esta espécie ao potencial tratamento ou profilaxia de diferentes condições clínicas. Neste contexto destacam-se, principalmente, a correlação das atividades farmacológicas investigadas (*in vitro* e/ou *in vivo*) com o conteúdo de polifenóis na *I. paraguariensis*, visto a alta concentração desses compostos nas folhas de erva mate, os quais conferem um grande potencial antioxidante devido a sua capacidade de sequestrar os radicais livres formados no início dos eventos de oxidação celular, bem como de quelar elementos como metais pesados, nocivos à saúde. O quadro a seguir apresenta alguns dos principais relatos de usos da erva mate e suas correlações com potenciais ações farmacológicas.

QUADRO 2 – PROPRIEDADES FUNCIONAIS E FARMACOLÓGICAS DA ERVA MATE E DE SEUS DERIVADOS

MATERIAL UTILIZADO	PROPRIEDADE ESTUDADA	CONCLUSÕES DOS ESTUDOS	REFERÊNCIA
Extrato aquoso	Ação antidiabética em ratos.	Compostos bioativos do extrato podem ser capazes de reduzir a absorção da glicose, reduzindo a expressão da enzima intestinal cotransportadora desse açúcar em animais.	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2008.

MATERIAL UTILIZADO	PROPRIEDADE ESTUDADA	CONCLUSÕES DOS ESTUDOS	REFERÊNCIA
Extrato aquoso (infusão)	Inibição da oxidação do plasma e de lipoproteínas em humanos.	A ingestão da infusão melhorou a capacidade antioxidante e a resistência das partículas plasmáticas e do colesterol LDL à peroxidação lipídica.	SILVA <i>et al.</i> , 2008.
Extrato aquoso	Efeitos antiobesidade em camundongos.	Atenuação acentuada do ganho de peso, adiposidade, uma diminuição no peso de gordura e restauração dos níveis séricos de colesterol, triglicerídeos, colesterol LDL e glicose.	ARÇARI <i>et al.</i> , 2009.
Extrato aquoso (infusão)	Redução dos níveis séricos de lipídeos e colesterol LDL em humanos com dislipidemias.	A ingestão de infusão de erva mate melhorou os parâmetros lipídicos em indivíduos normolipidêmicos e dislipidêmicos e forneceu uma redução adicional de LDL-colesterol em indivíduos hipercolesterolêmicos no tratamento com estatina, o que pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares.	MORAIS <i>et al.</i> , 2009.
Extratos, chás e alguns compostos da erva mate	Efeitos anti-inflamatórios.	O extrato não teve um potente efeito anti-inflamatório, mas o consumo inteiro de erva mate apresentou resultado anti-inflamatório promissor, principalmente através da via PGE2/COX-2.	PUANGPRAPHANT, MEJIA, 2009.
Extrato aquoso	Inibição <i>in vitro</i> da proliferação de células de câncer de cólon.	E erva mate inibiu a proliferação de células de câncer de cólon <i>in vitro</i> possivelmente mediada por meio de atividades pró-oxidantes.	MEJIA <i>et al.</i> , 2010.
Extrato aquoso	Efeitos sobre marcadores de resistência à insulina e marcadores inflamatórios em camundongos com obesidade induzida por dieta rica em gordura.	Há potencial de efeito anti-inflamatório; a erva mate inibe o TNF- $\alpha$ hepático e muscular (molécula pró-inflamatória) e restaura a sinalização de insulina hepática em camundongos com obesidade induzida por dieta rica em gordura.	ARÇARI <i>et al.</i> , 2011.
Extrato aquoso	Antimicrobiano em alimentos e bebidas.	Ações bactericidas contra <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> .	BURRIS <i>et al.</i> , 2011.
Saponinas fracionadas de extrato metanólico	Apoptose de células de câncer de cólon <i>in vitro</i> .	As saponinas nas folhas de erva mate previnem a inflamação e o câncer de cólon <i>in vitro</i> .	PUANGPRAPHANT, BERHOW, MEJIA, 2011.
Ácidos cafeoilquínicos fracionados de extrato metanólico	Inibição da proliferação de células cancerígenas pela ativação de apoptose <i>in vitro</i> .	Os ácidos dicafeoilquínicos da erva mate poderiam ser potenciais agentes anticâncer e mitigar outras doenças também associadas à inflamação.	PUANGPRAPHANT <i>et al.</i> , 2011.

MATERIAL UTILIZADO	PROPRIEDADE ESTUDADA	CONCLUSÕES DOS ESTUDOS	REFERÊNCIA
Extrato aquoso e erva mate bruta comercial	Redução de gordura abdominal e níveis séricos de glicose em ratos machos.	O tratamento com extrato de erva mate bruta deve ser visto com cautela, porque, apesar de reduzir a gordura abdominal e epididimal em ratos (interessante para tratamento de obesidade), pode aumentar os níveis de glicose no sangue em animais não diabéticos. Seu consumo, portanto, especialmente em grandes quantidades, pode ser prejudicial para pessoas com diabetes.	SILVA <i>et al.</i> , 2011.
Extrato aquoso (infusão)	Densidade mineral óssea em mulheres pós-menopausa.	Sugerem relação positiva do consumo crônico de erva mate com um efeito protetor ósseo.	CONFORTI, GALLO, SARAVÍ, 2012.
Extratos e infusões	Redução do estresse oxidativo.	Sugerem que o consumo de erva mate possa impedir o estresse oxidativo em monócitos e macrófagos diminuindo o acúmulo de lipídios oxidados na parede arterial e a aceleração da aterosclerose.	FERNANDES <i>et al.</i> , 2012.
Extratos e frações purificadas	Ação contra replicação dos vírus da Herpes simples (tipo 1 e 2).	Foi observada ação antiviral pela redução da infectividade, inibição da entrada de vírus e propagação nas células, sugerindo ação sinérgica de metabólitos como saponinas triterpenoides monodesmosídicas, ácido cafeico, ácido clorogênico e rutina.	LÜCKEMEYER <i>et al.</i> , 2012.
Extrato bruto de folhas, frutas verdes e frações purificadas de Saponinas	Atividade de saponinas sobre a gordura abdominal e epididimal e oxidação da glicose em ratos machos.	Há uma correlação entre a redução no peso da gordura visceral e na oxidação da glicose do tecido hepático e adiposo em ratos saudáveis alimentados com uma dieta padrão com saponinas purificadas a partir de frutos verdes.	RESENDE <i>et al.</i> , 2012.
Extrato aquoso	Regulação de genes relacionados à adipogênese.	A erva mate e seus compostos bioativos regulam a expressão de genes relacionados à adipogênese <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , enfatizando seu potencial como uma terapia antiobesidade.	ARÇARI <i>et al.</i> , 2013 (a).
Extrato aquoso	Regulação de níveis de glicose e insulina em camundongos.	O extrato de erva mate reduz significativamente o peso corporal, níveis sanguíneos de glicose e resistência à insulina de camundongos.	ARÇARI <i>et al.</i> , 2013 (b).

MATERIAL UTILIZADO	PROPRIEDADE ESTUDADA	CONCLUSÕES DOS ESTUDOS	REFERÊNCIA
Extrato aquoso (infusão)	Efeitos em indivíduos pré-diabéticos.	O consumo de infusão de erva mate por indivíduos pré-diabéticos melhorou significativamente o sistema de defesa antioxidante, promovendo aumento de GSH (glutaciona reduzida) de eritrócitos e redução da peroxidação lipídica sérica.	BOAVENTURA <i>et al.</i> , 2013.
Extrato aquoso (infusão)	Efeitos anticonvulsivos e neuroprotetores em ratos.	Os dados indicam que a erva mate pode fornecer novas perspectivas para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas com compostos naturais na área farmacêutica, tanto para reduzir a frequência das convulsões quanto para minimizar os danos neuronais associados a convulsões recorrentes.	BRANCO <i>et al.</i> , 2013.
Extrato aquoso	Efeitos na função endotelial e na expressão do gene da lipoproteína hepática em ratos hiperlipidêmicos.	A administração de chá de erva mate pode regular os níveis de lipídios séricos e a função endotelial em ratos, inibindo a ocorrência de aterosclerose.	GAO <i>et al.</i> , 2013.
Extrato aquoso	Efeito sobre a inflamação induzida pela obesidade em ratos.	Sugerem que o extrato de erva mate pode ser útil para reduzir a inflamação associada à obesidade de baixo grau.	PIMENTEL <i>et al.</i> , 2013.
Extrato aquoso (chá)	Efeito no desenvolvimento de fibrose em hepatócitos (cirrose induzida <i>in vitro</i> por lesão ao álcool).	O tratamento suprimiu o aumento da morte celular de hepatócitos, indicando seu potencial de proteção contra lesão hepática induzida por álcool.	TAMURA <i>et al.</i> , 2013.
Extrato aquoso (infusão)	Efeitos nos lipídeos séricos de ratos normocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos.	Infusões aquosas de erva mate mitigaram o aumento de triglicerídeos séricos, níveis de colesterol e peroxidação lipídica nos animais alimentados com dietas ricas em colesterol.	BRAVO <i>et al.</i> , 2014.
Extrato aquoso	Efeitos sobre os distúrbios endócrinos e metabólicos em ratos obesos.	A erva mate é capaz de restaurar muitos parâmetros relacionados à obesidade e à síndrome metabólica, indicando que pode ser útil para prevenir e tratar algumas doenças endocrinometabólicas. Sugere a erva mate como ferramenta terapêutica no gerenciamento da obesidade.	LIMA <i>et al.</i> , 2014.

MATERIAL UTILIZADO	PROPRIEDADE ESTUDADA	CONCLUSÕES DOS ESTUDOS	REFERÊNCIA
Extrato aquoso (infusão) congelado	Efeito antioxidante.	O consumo agudo por indivíduos saudáveis melhorou os sistemas de defesa antioxidantes do sangue com mais eficiência do que a erva mate tradicional e não promoveu efeitos pró-oxidantes.	BOAVENTURA <i>et al.</i> , 2015.
Extrato aquoso (chá)	Efeito contra a doença de Parkinson.	Sugere uma associação inversa entre o consumo de erva mate e a doença de Parkinson, indicando um potencial protetor contra o desenvolvimento dessa doença.	GATTO <i>et al.</i> , 2015.
Cápsulas contendo extrato de erva mate padronizado em 35 mg/g de ácido clorogênico (suplemento)	Efeito antiobesidade (estudo clínico randomizado duplo cego).	Houve redução da massa corporal e redução da circunferência abdominal do grupo tratado em relação ao grupo placebo, sem efeitos adversos, sugerindo a eficácia da suplementação com erva mate no tratamento da obesidade.	KIM <i>et al.</i> , 2015.
Extrato aquoso (chá)	Efeito na microcirculação de voluntários com alta viscosidade sanguínea (estudo randomizado, duplo-cego controlado por placebo).	Resultados indicam a capacidade terapêutica do chá de erva mate no tratamento da alta viscosidade do sangue, o que pode reduzir alguns fatores de risco importantes de doenças cardiovasculares.	YU <i>et al.</i> , 2015.
Suplemento (erva mate em cápsulas)	Efeitos metabólicos de saciedade e psicomotores durante o exercício físico prolongado.	A combinação de ingestão de erva mate com prescrição de exercícios melhora a oxidação de ácidos graxos, medidas de saciedade e estado de humor em comparação apenas com o exercício.	ALKHATIB, ATCHESON, 2017.
Extrato aquoso (infusão)	Prevenção da doença de Alzheimer.	Estudo <i>in vitro</i> sugere que o extrato tem efeito protetor contra o alumínio, metal associado à progressão de doença de Alzheimer.	BORTOLI <i>et al.</i> , 2018.
Polissacarídeo purificado de erva mate	Efeito antioxidante e antimicrobiano.	Sugerem atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngica de um polissacarídeo isolado da erva mate, o qual poderia ser útil para indústrias farmacêuticas e de alimentos.	KUNGEL <i>et al.</i> , 2018.
Extrato aquoso de hastes e folhas	Atividade antibacteriana.	Houve atividade antibacteriana significativa.	NOUREDDINE <i>et al.</i> , 2018.

MATERIAL UTILIZADO	PROPRIEDADE ESTUDADA	CONCLUSÕES DOS ESTUDOS	REFERÊNCIA
Extrato aquoso	Prevenção do desequilíbrio redox hepático, triglicérides elevados e microesteatose em ratos adultos com sobrepeso desmamados precocemente.	Houve melhora das defesas antioxidantes e atenuação da disfunção hepática.	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2018.
Extrato aquoso	Efeito na diferenciação osteoblástica <i>in vitro</i> de células estromais mesenquimais derivadas da medula óssea.	Houve um efeito benéfico estimulador da diferenciação osteoblástica dependente da concentração do extrato.	BRITO <i>et al.</i> , 2019.
Diferentes formas de consumo	Efeito antiobesidade (revisão sistemática com meta-análise).	A revisão demonstrou os efeitos positivos do consumo de <i>I. paraguariensis</i> na redução do peso corporal, índice de massa corporal (IMC) e circunferência da cintura dos pacientes, mostrando, seu potencial antiobesidade.	LUÍS, DOMINGUES, AMARAL, 2019.
Extrato aquoso	Antibacteriano combinado com antibióticos.	Sugerem um efeito aditivo de extratos de erva mate combinados a antibióticos, especialmente contra <i>S. aureus</i> .	FAYAD <i>et al.</i> , 2020.
Extrato aquoso (infusão) e cafeína isolada da erva mate	Efeito da cafeína sobre o acúmulo de gordura ( <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> ).	Redução do acúmulo de gordura corporal em animais alimentados com uma dieta rica em gorduras e açúcares. Cafeína seria o composto mais ativo, atenuando a lipogênese.	ZAPATA <i>et al.</i> , 2020.
Extrato aquoso/acetônico	Atividade antibacteriana.	Atividade potente contra bactérias gram-negativas, especialmente contra cepas de <i>S. aureus</i> . Metabólito isolado e associado à atividade foi uma pirazinona incomum.	EL-SAWALHI <i>et al.</i> , 2021.
Extrato aquoso	Efeito antiproliferativo de células de câncer colorretal humano.	Extrato exibiu forte atividade antiproliferativa contra células de adenocarcinoma, sendo um potencial adjuvante terapêutico em terapias anticâncer.	SALEH <i>et al.</i> , 2021.
Extrato aquoso	Efeito sobre danos na retina (degeneração macular relacionada à idade).	A erva mate pode desempenhar um papel importante na prevenção de danos na retina associados ao estresse oxidativo.	TATE <i>et al.</i> , 2022.

### 3.1.2 Principais metabólitos da erva mate

A ingestão de erva-mate está associada, além do seu sabor característico, aos efeitos benéficos à saúde. Estes efeitos, por sua vez, são relacionados aos constituintes presentes em suas folhas, entre os quais destacam-se os compostos fenólicos (e.g. ácidos cafeico e clorogênico), que são naturalmente um sistema de defesa da planta (VOGT, 2010).

Além dos ácidos fenólicos, metilxantinas (e.g. cafeína e teobromina), saponinas, flavonoides (e.g. catequina e quercetina), aminoácidos e vitaminas também são relatados como compostos bioativos significativos nas folhas desta espécie (BOAVENTURA *et al.*, 2015). A presença destes compostos indica o grande potencial do uso de *I. paraguariensis* na indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos, o que faz o melhoramento genético e aprimoramento das técnicas de propagação necessários, não somente para o caráter de produção de massa foliar, mas também voltado para a maior produção de compostos de interesse comercial (HECK, MEJIA, 2007).

O QUADRO 3 apresenta os principais compostos identificados nas folhas da erva-mate e as atividades farmacológicas correlacionadas a eles.

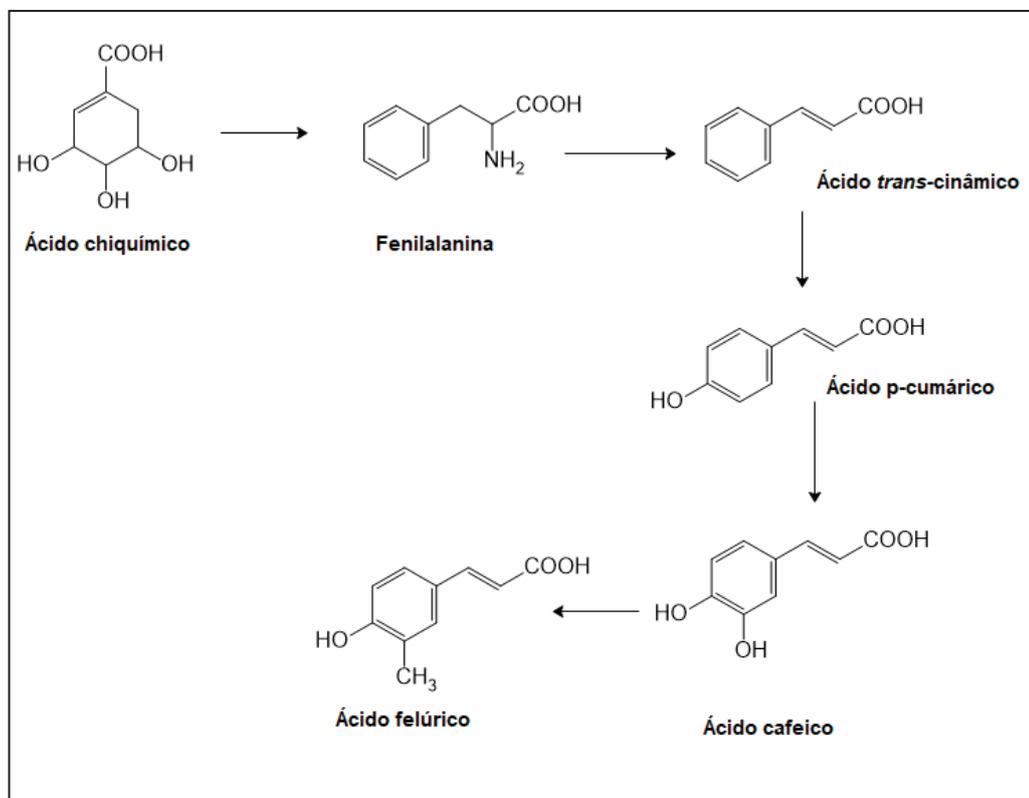
QUADRO 3 – PRINCIPAIS COMPOSTOS IDENTIFICADOS EM ERVA-MATE E SUA CORRELAÇÃO COM POTENCIAIS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

CLASSE	COMPOSTO	ATIVIDADE
Metilxantina	Cafeína	Antioxidante; estimulante; diurético; vasodilatador.
	Teobromina	Miorrelaxante; diurético; estimulante.
Flavonoide	Rutina	Antitumoral; vasodilatador; antimutagênico; antioxidante.
	Campferol	Antioxidante; antibacteriano; antitumoral.
	Quercetina	Antioxidante; antialérgico; anti-inflamatório.
Ácido fenólico	Ácido clorogênico	Neuroprotetor; analgésico; antioxidante; antibacteriano.
	Ácido cafeico	Antibacteriano; antioxidante; estimulante.
	Ácido quínico	Cicatrizante; anti-hemorragico; anti-inflamatório.
Vitamina	Ácido nicotínico (Niacina, Vitamina PP)	Hipocolesterolêmico; colinérgico.
	Ácido Pantotênico (Vitamina B5)	Antialérgico; antifadiga; antiartrítica.
	Colina	Lipotrópico; previne diabetes; colinérgica.
Saponina	Ácido ursólico	Antioxidante; anti-inflamatório; hipocolesterolêmica.

Fontes: Gnoatto, Schenkel, Bassani (2005); Heck, Mejia (2007); Boaventura *et al.* (2015); Valduga *et al.* (2019).

Como pode ser observado no QUADRO 3, os principais compostos da erva-mate pertencem à classe dos fenilpropanoides, também chamados de compostos fenólicos. Eles consistem em um dos grupos mais amplamente distribuídos de compostos secundários nas plantas, com mais de 10.000 estruturas diferentes (ANDRÉ *et al.*, 2009). Os compostos fenólicos são produzidos pela rota dos fenilpropanoides, pela via do chiquimato (VOGT, 2010). A fenilalanina é o aminoácido aromático precursor da maioria dos compostos fenólicos via rota do chiquimato e, pela ação da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) perde uma molécula de amônia, produzindo ácido cinâmico e seus derivados (TAIZ, ZEIGER, 2013).

FIGURA 1 – FORMAÇÃO DOS PRINCIPAIS ÁCIDOS FENÓLICOS PRESENTES EM ERVA-MATE

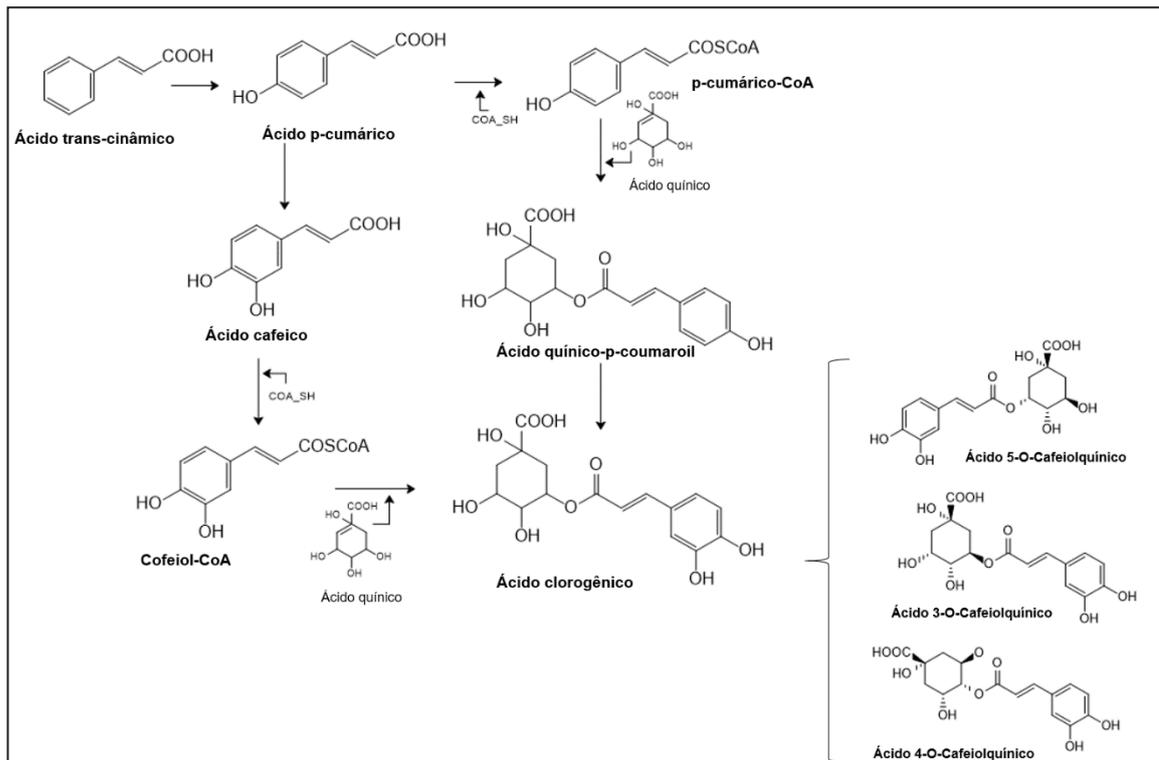


FONTE: Adaptado de Vogt (2010).

Nas plantas, os compostos fenólicos estão localizados em diferentes organelas celulares e desempenham diversas funções, tais como proteção à fotodegradação, pigmentos, moléculas sinalizadoras, resistência mecânica, ou como componentes da parede celular (VOGT, 2010). Além disso, compostos fenólicos atuam contra danos oxidativos induzidos pelo estresse, como a desnutrição, seca, temperatura, lesão e ataque de patógenos (FINI *et al.*, 2012; TAIZ, ZEIGER, 2013).

Na erva-mate os ácidos *trans*-cinâmicos (ácido cafeico, ferúlico e *p*-cumárico) podem estar nas suas formas livres ou na forma de mono ou diésteres juntamente com o ácido quínico. Tais compostos são conhecidos como ácidos clorogênicos: ácido 3-O-cafeoilquínico (ácido clorogênico), ácido 4-O-cafeoilquínico (ácido criptoclorogênico), 5-O-cafeoilquínico (ácido neoclorogênico), ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico (FILIP *et al.*, 2001), que são os principais compostos fenólicos encontrados na espécie *I. paraguariensis* (HECK, SCHMALKO, MEJIA, 2008). A presença destes ácidos fenólicos (ilustrados na FIGURA 2) é importante fator para incitar o apelo ao consumo do produto. Além dos ácidos clorogênicos, já foram identificados em tecido foliar de erva-mate os flavonoides quercetina, campferol e rutina (GNOATTO, SCHENKEL, BASSANI, 2005; HECK, MEJIA, 2007; BOAVENTURA *et al.*, 2015; VALDUGA *et al.*, 2019.).

FIGURA 2 – FORMAÇÃO DOS DERIVADOS HIDROXICINÂMICOS (ÁCIDOS CLOROGÊNICOS)

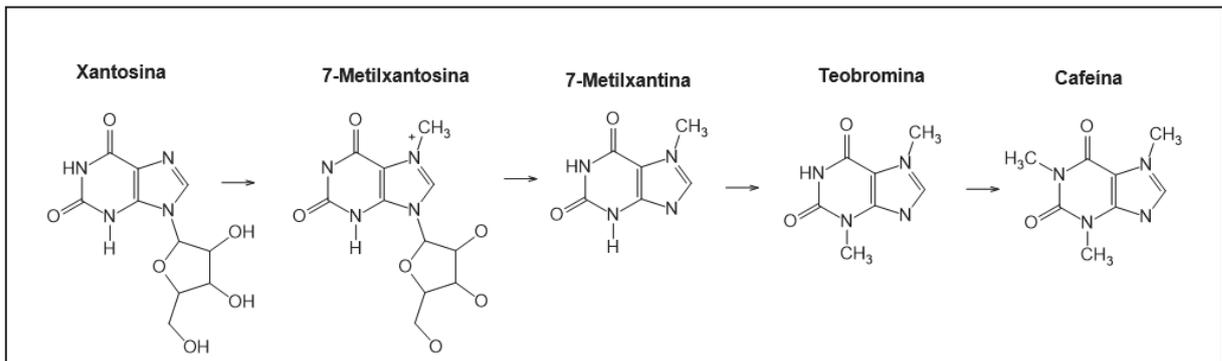


FONTE: Adaptado de Taiz e Zeiger (2013).

Como mencionado anteriormente, os alcaloides da classe metilxantina, alcaloides piridínicos (e.g. cafeína, teobromina, ilustrados na FIGURA 3) também são encontrados na erva-mate, sendo a atividade estimulante da infusão de suas folhas

atribuída especialmente à presença de teobromina e cafeína (SCHUBERT *et al.*, 2006). A cafeína é produzida como resposta evolutiva, sendo que possui três funções principais para as plantas: i) proteção química contra predadores; ii) antioxidante e iii) ajudar a polinização do vegetal (ASHIHARA *et al.*, 2008).

FIGURA 3 – FORMAÇÃO DA CAFEÍNA



FONTE: Adaptado de Ashihara *et al.* (2008).

### 3.1.3 Cultivo e propagação da erva mate

As indústrias, especialmente as farmacêuticas, vem buscando cada vez mais o desenvolvimento de produtos inovadores de origem natural, como os fitoterápicos. No Brasil, estes produtos são passíveis de registro e controle sanitário, assim como outros medicamentos convencionais sintéticos, de acordo com regulações específicas estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Logo, o desenvolvimento de tais produtos requer o uso de matérias-primas vegetais devidamente padronizadas, de acordo com definições de compêndios oficiais (farmacopeias) ou com estudos específicos, de forma a garantir a utilização da espécie e quimiotipo vegetal adequados, formulados na concentração ativa definida baseada em ensaios clínicos ou mesmo no seu uso tradicional (BRASIL, 2014).

Para a produção em escala industrial de fitoterápicos ou mesmo de outros produtos relacionados, portanto, é necessária a obtenção sustentável e reprodutível dos seus insumos vegetais ativos, a qual deve ser controlada desde a seleção do material de partida (droga vegetal). Este material deve apresentar características fitoquímicas conhecidas e bem definidas, capazes de serem propagadas para a manutenção da qualidade e eficácia desejada. No caso de produtos à base de erva mate, a obtenção de uma matéria-prima vegetal com características químicas

padronizadas pode se dar por meio da propagação de genótipos quimicamente estabelecidos da espécie (clonagem), a qual pode ser realizada por diferentes técnicas.

A propagação vegetativa ou clonagem consiste na multiplicação assexuada de partes de plantas (células, tecidos, órgãos ou propágulos), gerando indivíduos geneticamente idênticos à planta mãe. Sua utilização é justificada especialmente na produção de espécies vegetais de alta qualidade e produtividade cuja propagação seminal é limitada por fatores como a quantidade insuficiente de sementes, dificuldade do seu armazenamento, baixo poder e uniformidade germinativa ou baixa qualidade genética e fisiológica, que dificultam, por sua vez, a manutenção de programas de melhoramento ou plantios comerciais de genótipos específicos. (FERRARI, GROSSI, WENDLING, 2004; SÁ *et al.*, 2018).

Entre os principais métodos de propagação vegetativa, destacam-se:

- Estaquia: técnica mais difundida, que consiste na promoção do enraizamento de partes da planta como ramos, raízes, folhas ou fascículos por meio da regeneração dos tecidos associados ao tecido vascular ou tecido caloso formado na base da estaca;
- Micropropagação: cultivo *in vitro*, sob condições assépticas e controladas, de propágulos vegetativos denominados “explantes”, os quais são induzidos a produzir novas gemas que serão multiplicadas nas mesmas condições, na presença de reguladores de crescimento e meio nutritivo (propagação geométrica);
- Microestaquia: técnica na qual são utilizados propágulos (microestacas) rejuvenescidos em laboratório de micropropagação para posterior enraizamento e obtenção de mudas;
- Miniestaquia: técnica desenvolvida a fim de contornar as dificuldades de obtenção de clones rejuvenescidos em laboratório e que consiste nos enraizamentos sucessivos de ápices de brotações jovens, possibilitando a sua propagação e seu rejuvenescimento, melhorando seu potencial de enraizamento;
- Enxertia: técnica importante para a reversão à juvenilidade de materiais genéticos de interesse para propagação comercial, porém com custos elevados para produção em larga escala. Possui grande importância na formação de pomares de produção de sementes clonais e na enxertia seriada, quando a nova gema obtida de

um enxerto se torna o propágulo de uma próxima enxertia. (FERRARI, GROSSI, WENDLING, 2004).

### 3.1.3.1 Propagação vegetativa por miniestaquia

A miniestaquia pode ser considerada, segundo Ferriani, Zuffellato-Ribas e Wendling (2010), uma especialização da técnica de estaquia que possibilita o aproveitamento do potencial juvenil dos propágulos para a indução do enraizamento e consequente produção de mudas. Esta técnica tem se mostrado uma alternativa interessante à propagação por estaquia de espécies lenhosas como a erva mate, que eram até então limitadas por uma série de fatores como a falta de métodos eficientes de rejuvenescimento de material adulto, de técnicas de manejo do ambiente de propagação, além da dificuldade no manejo da nutrição e transplante das estacas pós-enraizamento (WENDLING, DUTRA, GROSSI, 2007).

A técnica de miniestaquia consiste na utilização de brotações de plantas matrizes (minicepas) propagadas pelo processo de estaquia convencional, miniestaquia ou por mudas produzidas por sementes, a partir das quais são realizadas podas dos ápices para estimular novas brotações que, por sua vez, são coletadas, estaqueadas e mantidas em casa de vegetação para dar origem a novas mudas (ALFENAS *et al.*, 2009; FERRIANI, ZUFFELLATO-RIBAS, WENDLING, 2010). Esta técnica apresenta vantagens em relação à estaquia convencional uma vez que possibilita a redução da área produtiva necessária para o manejo das mudas (adoção de minijardim clonal), bem como redução dos custos com coletas e transporte de brotações. Além disso, possibilita maior velocidade e percentual de enraizamento das miniestacas, apesar destas serem mais sensíveis às condições ambientais e necessitarem de maior agilidade no seu processo de estaqueamento (WENDLING, 2004).

A implementação de minijardim clonal (conjunto de minicepas), pode ocorrer por diferentes sistemas como canaletão (sistema semi-hidropônico em areia), tubetes, sacos plásticos, vasos ou bandejas dentro de estufas (FERRIANI, ZUFFELLATO-RIBAS, WENDLING, 2010; WENDLING *et al.*, 2020). Para o preparo das miniestacas é importante seguir alguns passos primordiais descritos por Wendling *et al.* (2020):

- A coleta deve ser seletiva utilizando ferramentas limpas e desinfetadas, colhendo-se brotações não muito tenras de minicepas que tenham de 7 a 10 cm de

comprimento (ou menores, caso tenham boa rigidez), mantendo de 1 a 3 pares de folhas que podem ser cortadas ao meio;

- Imediatamente após coletadas, as folhas devem ser acondicionadas em água, evitando sua desidratação até o momento do enraizamento, que deverá ser realizado rapidamente (em até 15 minutos);
- Para clones com maior dificuldade de enraizamento é possível aplicar soluções hidroalcoólicas de ácido indolbutírico (AIB), imergindo a base das miniestacas durante 10 segundos;
- As miniestacas coletadas em minijardim clonal são enraizadas em tubetes plásticos ou outros recipientes contendo substrato apropriado e mantidas em casa de vegetação sob temperatura de 20 °C a 30 °C, com umidade relativa superior a 90%, onde permanecerão por um período de 60 a 120 dias para a indução do enraizamento;
- Após esse período, as miniestacas são transferidas para casa de sombra, com 50% de luminosidade, permanecendo nessa condição por 30 a 60 dias. Na sequência são removidas para a condição de pleno sol (rustificação), com adubação e irrigação reduzidas até o momento em que atinjam tamanho adequado para seguirem o plantio em campo.

O sucesso do processo de propagação por miniestaquia é dependente de inúmeros fatores que podem ser limitantes no seu enraizamento e produtividade, tais como: ocorrência de injúrias, variabilidade genética na planta matriz, nível endógeno de inibidores, condições nutricionais e hídricas da planta doadora dos propágulos, reações de oxidação na base das estacas, maturação/juvenildade dos propágulos, época do ano de coleta, fatores ambientais como temperatura, luz, umidade, qualidade do substrato, balanço hormonal e uso de reguladores de crescimento (XAVIER, WENDLING, SILVA 2009<sup>1</sup> citado por DIAS *et al.*, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2017).

O balanço hormonal está relacionado à produção endógena de hormônios vegetais conhecidos como auxinas, compostos sintetizados pelas plantas responsáveis por funções fisiológicas relacionadas à divisão, expansão ou diferenciação celular. O AIA (ácido 3-indol acético) é a auxina de ocorrência natural

---

<sup>1</sup> XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa: Ed UFV, 2009. 272 p.

mais importante, a qual encontra-se nos tecidos vegetais em sua maior parte na forma conjugada com aminoácidos, proteínas, açúcares, entre outros (SAIRANEN et al., 2012; CIARKOWSKA et al., 2023). Existem casos em que a propagação vegetativa não apresenta bons resultados devido à baixa concentração de auxinas endógenas, razão pela qual podem ser empregados reguladores exógenos como o ácido indol butírico (AIB) mais amplamente utilizado para esta finalidade (DIAS, ONO, RODRIGUES, 2011).

Nesse contexto, portanto, o estudo contínuo para o aperfeiçoamento da técnica, aplicada a diferentes espécies ou mesmo diferentes quimiotipos de uma mesma espécie, torna-se fundamental.

### 3.2 CG-EM PARA ANÁLISE DE METABÓLITOS EM PLANTAS

A cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) é uma das técnicas analíticas amplamente utilizada em estudos de metabólitos em plantas, permitindo a análise de diferentes classes de compostos como ácidos orgânicos, álcoois, aminoácidos, ácidos graxos, esteróis, entre outros, a partir de preparos de amostra que incluem etapas de derivatização das moléculas, tornando-as voláteis e/ou mais estáveis para a análise cromatográfica. A maioria dos trabalhos que utilizam CG-EM nesse contexto empregam a fonte de ionização por impacto de elétrons (EI) a uma energia convencional de 70 eV, o que possibilita a maior padronização da fragmentação dos compostos e, conseqüentemente, obtenção de dados reprodutíveis para comparação com bibliotecas espectrais. Adicionalmente, a combinação do espectro de massas com o índice de retenção<sup>2</sup> do respectivo composto viabiliza a sua identificação molecular frente a bases de dados espectrais como a biblioteca NIST14 (*Mass Spectral Library collection of the U.S. National Institute of Standards and Technology*) e a GMD (*Golm Metabolome Database*), mantida pelo *Max-Planck Institute of Plant Physiology*, de acesso aberto e integrada a outras bases de dados (HALKET et al., 2004; PILON et al., 2020).

---

<sup>2</sup> O índice de retenção (IR) conhecido como índice de Kovats de um composto pode ser determinado com base nos tempos de retenção de alcanos lineares analisados sob as mesmas condições analíticas.

Os dados espectrais obtidos por CG-EM podem ser processados em ferramentas e *softwares* livres como o *Automated Mass Spectral Deconvolution Software* (AMDIS), disponível no site do NIST (*National Institute of Standards and Technology*, <https://chemdata.nist.gov/dokuwiki/doku.php?id=chemdata:amdis>). Esse *software* pode processar várias extensões de arquivos, abrangendo toda a gama de marcas comerciais de cromatógrafos, e possui algoritmos específicos de deconvolução espectral a partir de picos cromatográficos (STEIN, 1999). Além disso, possui funções que permitem a comparação dos espectros deconvoluídos com bibliotecas de espectros puros, construídas a partir da análise de padrões de referência de compostos alvo ou a partir de bases de dados espectrais. As bibliotecas podem ser criadas pelo usuário incluindo dados espectrais e informações de índice de retenção (IR) específicos de cada composto, o que possibilita a comparação de dados experimentais para a identificação eficiente e precisa de compostos sob investigação (HALKET *et al.*, 2004; PILON *et al.*, 2020). Tendo em vista, porém, a limitação do *software* para a quantificação confiável dos compostos identificados, o uso de outras ferramentas como o próprio *software* de operação do CG-EM é recomendável para esta finalidade (MELO, 2018).

### 3.2.1 Técnicas de derivatização aplicadas a análises por CG-EM

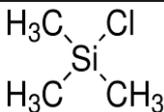
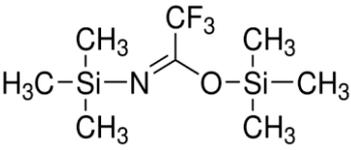
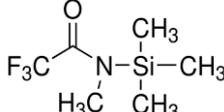
Para que um determinado composto possa ser analisado por CG ele necessita, basicamente, de duas características principais: ser volátil e termicamente estável. Muitos metabólitos, porém, não possuem essas características intrínsecas e precisam ser submetidos a reações de derivatização para adquiri-las, viabilizando sua análise por meio desta técnica cromatográfica. Nesse contexto, as reações de derivatização conferem alterações nas estruturas químicas destas moléculas, aumentando sua volatilidade pela redução de sua polaridade e tornando-as menos reativas. A redução da polaridade das moléculas, por sua vez, também influencia as separações cromatográficas devido a alterações nas interações com a fase estacionária, melhorando o formato e a resolução dos picos (ROESSNER *et al.*, 2000; FIEHN, 2002; HALKET, ZAIKIN, 2003; ENGEL, SURALIK, MARCHETTI-DESCHMANN, 2020).

No caso de análises acopladas à espectrometria de massas, a introdução de grupos funcionais nas moléculas por reações de derivatização pode direcionar a sua

fragmentação e estabilização dos íons formados, aumentando a intensidade dos sinais (sensibilidade) e auxiliando na predição das estruturas moleculares. Em alguns casos, a derivatização com reagente apropriado pode ser utilizada para determinar o número e tipos de grupos funcionais presentes em um composto pela observação da massa dos derivados formados (HALKET, ZAIKIN, 2003).

Existem diversos métodos de derivatização usualmente empregados na modificação de grupos polares para análises por CG, como a sililação, alquilação, acilação e formação de compostos cíclicos, por exemplo (HALKET, ZAIKIN, 2003; MARCHETTI-DESCHMANN, 2020). Entre esses métodos a sililação se destaca como a técnica mais simples, versátil e comumente utilizada para derivatização, a qual pode ser realizada a partir de diferentes agentes sililantes como o cloreto de trimetilsilano (**TMCS**), *N,O*-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (**BSTFA**) e a *N*-metil-*N*-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (**MSTFA**). O QUADRO 4 apresenta os principais compostos e grupos funcionais susceptíveis a sililação por estes reagentes usuais.

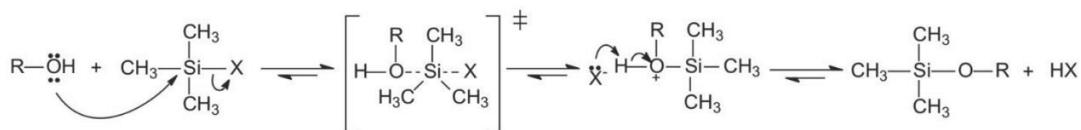
QUADRO 4 – EXEMPLOS DE REAGENTES UTILIZADOS PARA SILILAÇÃO

REAGENTE	ESTRUTURA QUÍMICA	GRUPOS FUNCIONAIS REAGENTES
TMCS (CAS 75-77-4)		Principalmente álcoois e ácidos carboxílicos (na presença de bases). Raramente utilizado de forma isolada.
BSTFA (CAS 25561-30-2)		Álcoois, fenóis, ácidos, aminoácidos, tiois, poliois e açúcares, hidroxilaminas, bases purínicas e pirimidínicas, uracilas, nucleotídeos, glucuronídeos, carboxilfenóis, fosfatos, indols. Algumas amidas, amins secundárias e grupos hidroxila impedidos na presença de TMCS.
MSTFA (CAS 24589-78-4)		Álcoois (incluindo os estericamente não impedidos), ácidos, aminoácidos, amidas, amins, enóis, açúcares, glucuronídeos, nucleosídeos, indols (+TMCS).

FONTE: Adaptado de Halket e Zaikin (2003).

Os agentes de sililação exemplificados conseguem promover a adição de grupos trimetilsilano (TMS) em moléculas contendo grupos hidroxila (-OH), carboxila (-COOH), tiol (-SH) ou mesmo grupos amina (-NH<sub>2</sub>), substituindo um ou mais átomos de hidrogênio (-H) e formando derivados O-TMS, S-TMS, N-TMS ou N-(TMS)<sub>2</sub> (ENGEL, SURALIK, MARCHETTI-DESCHMANN, 2020). A FIGURA 4 ilustra o mecanismo geral de uma reação de sililação.

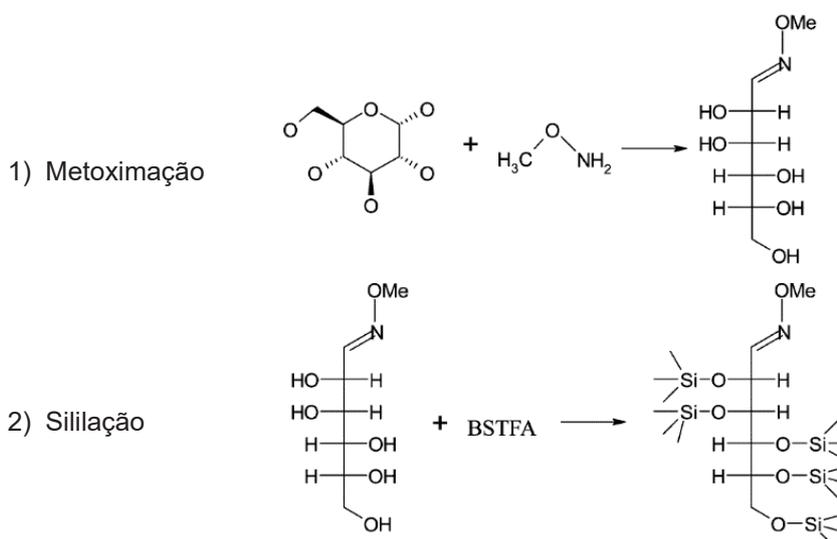
FIGURA 4 – MECANISMO GERAL DA REAÇÃO DE SILILAÇÃO



FONTE: Melo (2018).

No caso da análise de açúcares, uma etapa de derivatização chamada de metoximação é usualmente empregada antes da etapa de sililação, utilizando reagentes como o cloridrato de metoxiamina (CAS 593-56-6), de forma a inibir a formação de anéis de açúcares redutores por meio da proteção dos grupos carbonila. Esta reação evita processos de epimerização e formação de artefatos, promovendo a abertura do anel que resulta em dois estereoisômeros (*E* e *Z*) separados por CG-EM (RUIZ-MATUTE *et al.*, 2011; LUNZHAO *et al.*, 2014; ENGEL, SURALIK, MARCHETTI-DESCHMANN, 2020). A FIGURA 5 esquematiza a reação de metoximação com cloridrato de metoxiamina seguida da sililação com BSTFA para uma molécula de glicose.

FIGURA 5 – METOXIMAÇÃO E SILILAÇÃO DE UMA MOLÉCULA DE GLUCOSE

FONTE: Adaptado de Lunzhao *et al.* (2014).

### 3.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS MULTIVARIADAS

O avanço tecnológico nas análises químicas instrumentais, que introduziu espectrômetros e cromatógrafos nas rotinas laboratoriais, ocasionou um enorme

crescimento na quantidade e variedade de dados experimentais produzidos, os quais demandaram ferramentas matemáticas para viabilizar a sua interpretação adequada, de forma multivariada. A busca por ferramentas estatísticas para o tratamento/conversão de grandes conjuntos extraindo o máximo de informações úteis culminou no desenvolvimento da quimiometria (FERREIRA, 2015).

Segundo IUPAC, a quimiometria pode ser definida como a “*aplicação de estatística à análise de dados químicos (de química orgânica, analítica ou de química medicinal) e o planejamento de experimentos químicos e simulações*”. Sua aplicação vem sendo difundida em diversas áreas, tais como: química medicinal e computacional, com estudos de QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationships*) para planejamento de novos fármacos; controle de qualidade *on-line* em indústrias químicas, farmacêuticas e de alimentos; área médica, em tratamentos de imagens e metabolômica, na identificação de marcadores de doenças (FERREIRA, 2015).

Pilon e colaboradores (2020) resumem bem os diferentes métodos usualmente empregados na análise multivariada de dados, especialmente aplicados à metabolômica. Estes métodos são capazes de representar as amostras como pontos dentro de um espaço de variáveis em menor dimensionalidade (componentes ou variáveis latentes), os quais podem ser divididos em:

- Análises não-supervisionadas (exploratórias): visam o entendimento global dos dados, viabilizando a detecção de tendências, reconhecimento de padrões ou agrupamentos. Entre elas destacam-se a Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA);
- Análises supervisionadas: visam a obtenção de uma correlação entre as variáveis químicas e um conjunto de dados (modelo) usado como base para a predição. Diferentes ferramentas podem ser usadas na construção de modelos de regressão (calibração multivariada), como o *Partial Least Squares* (PLS) e *Partial Least Squares Discriminat Analysis* (PLS-DA), entre outros.

Independentemente do método selecionado para as análises multivariadas, a organização prévia dos dados se faz necessária, bem como a avaliação da aplicabilidade de pré-tratamentos sobre amostras e/ou variáveis, reduzindo fatores influentes oriundos da etapa de aquisição dos dados (VAN DEN BERG *et al.*, 2006; FERREIRA, 2015).

### 3.3.1 Organização e pré-tratamento dos dados

Antes de iniciar a análise quimiométrica é necessário organizar os dados por meio da construção de uma matriz  $X$  ( $n \times m$ ), em que cada amostra é associada a um respectivo vetor linha ( $n$ ) e cada coluna ( $m$ ) da matriz corresponde a uma variável medida. Na interseção de cada linha e coluna são inseridos os resultados analíticos da amostra para aquela variável.

Após a organização dos dados é possível realizar o seu pré-tratamento, de forma a reduzir as variações indesejáveis que não foram removidas durante a aquisição dos dados e que não serão eliminadas naturalmente durante a análise estatística, mas que podem influenciar os resultados. O pré-tratamento dos dados pode ser conceitualmente dividido em transformação (aplicada às amostras) e pré-processamento (aplicado às variáveis medidas). Os diferentes pré-tratamentos podem ser utilizados individualmente ou combinados entre si para se atingir o objetivo desejado, sendo necessário conhecer como o pré-tratamento funciona e qual o resultado da sua aplicação (FERREIRA, 2015). O quadro a seguir resume alguns dos principais pré-tratamentos aplicados em quimiometria.

QUADRO 5 – EXEMPLOS DE PRÉ-TRATAMENTOS APLICADOS EM QUIMIOMETRIA

TRANSFORMAÇÃO (AMOSTRAS - LINHAS DA MATRIZ X)	PRÉ-PROCESSAMENTO (VARIÁVEIS - COLUNAS DA MATRIZ X)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Alisamento</u>: grande aplicação nas áreas de espectroscopia e cromatografia para redução da componente aleatória e aumento do sinal ruído;</li> <li>• <u>Correção da linha de base</u>: comum no tratamento de dados de análises por infravermelho com refletância difusa, empregando primeira derivada e/ou segunda derivada (para corrigir deslocamento e inclinação dos dados);</li> <li>• <u>Logaritmo</u>: visa linearizar e reduzir a assimetria das distribuições dos dados;</li> <li>• <u>Normalização</u>: um fator de normalização é empregado, a exemplo da normalização de sinais em espectrometria de massa (geralmente o pico com maior razão <math>m/z</math> é normalizado, sendo os demais expressos como uma fração ou porcentagem desse fragmento).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Centragem dos dados na média</u>: consiste na subtração de cada valor individual do valor médio da coluna, mantendo a estrutura original dos dados;</li> <li>• <u>Escalamento pela variância</u>: os dados individuais da coluna são divididos por um fator de escala (desvio padrão da coluna), tornando os dados adimensionais;</li> <li>• <u>Autoescalamento</u>: dados são centrados na média e escalados pelo desvio padrão (subtraídos do valor médio e divididos pelo desvio padrão da coluna), tornando-se adimensionais;</li> <li>• <u>Escalamento por Pareto</u>: extensão do autoescalamento que utiliza a raiz quadrada do desvio padrão como fator de escala (dados não se tornam adimensionais);</li> <li>• <u>Escalamento pela Amplitude</u>: dados escalados pela amplitude dos dados da coluna.</li> </ul>

FONTE: Adaptado de Van den Berg *et al.* (2006) e Ferreira (2015).

A centragem na média costuma ser o pré-processamento mais frequente quando se trabalha com dados espectrais, pois não impacta a variância interna dos dados e possibilita a redução dos deslocamentos da linha de base (a direção da maior variância ao redor da origem é a do espectro médio). O escalamento pela variância, por sua vez, atribui igual peso a todos os comprimentos de onda, não levando em consideração se o sinal se trata de um pico ou um ruído (razão pela qual esse pré-processamento não é aconselhável). O autoescalamento costuma ser empregado quando há diferentes unidades para as variáveis avaliadas ou quando há grande variação dos dados, minimizando a influência de uma variável dominante nas análises posteriores. Porém, este pré-processamento não é recomendado para dados ruidosos de LC-MS e RMN, por exemplo. Nesses casos, comuns em estudos de metabolômica e proteômica, o escalamento de Pareto torna-se o pré-processamento mais apropriado, reduzindo a importância de valores altos (menos impactados pelo ruído), mas não tão drasticamente quanto o autoescalamento, mantendo a estrutura dos dados parcialmente inalterada (VAN DEN BERG *et al.*, 2006; FERREIRA, 2015).

### 3.3.2 Análise de componentes principais (PCA)

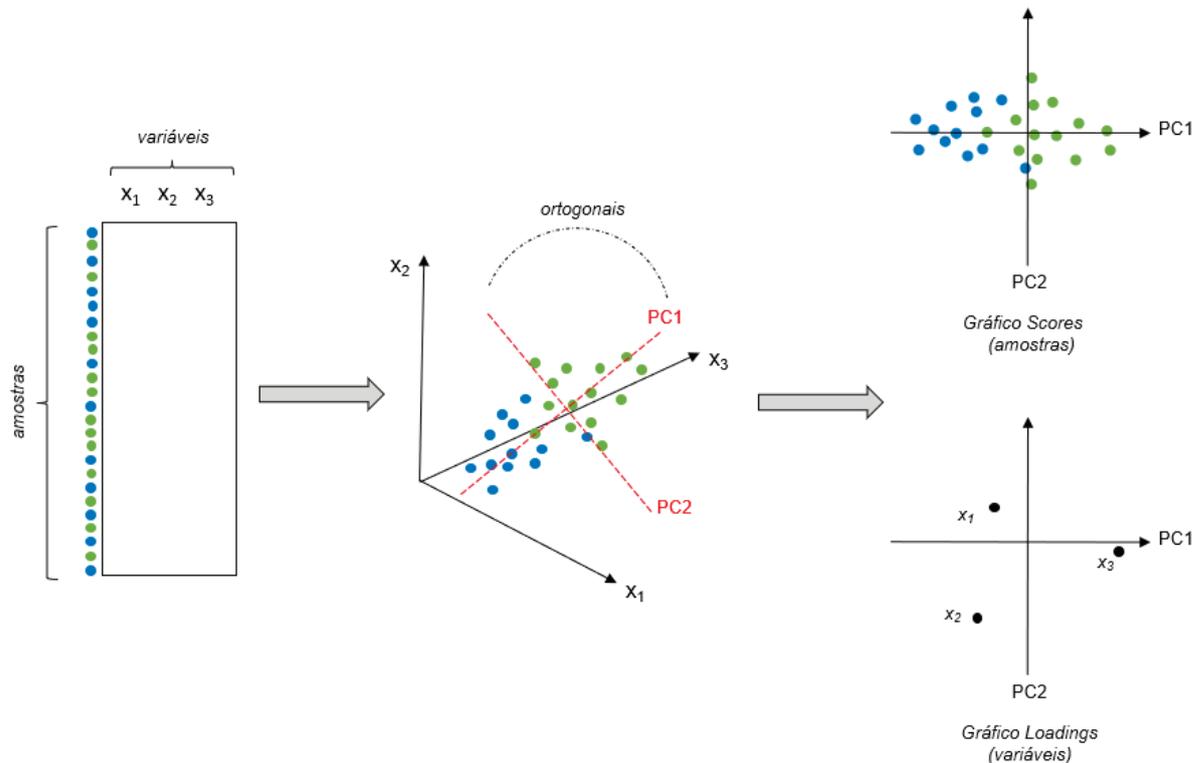
A análise de componentes principais (*Principal Component Analysis* – PCA) consiste em um método base para o tratamento de dados multivariados, amplamente empregado para a compressão de grandes conjuntos de variáveis em dimensões menores que contêm as informações mais relevantes sobre elas. Esse método é capaz de projetar os dados multivariados em um espaço dimensional reduzido, sem que as relações entre as amostras sejam afetadas, o que facilita a visualização e interpretação das diferenças existentes entre as variáveis, das relações que podem existir entre as amostras, além da detecção daquelas que apresentam comportamento atípico (NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2006; ROGGO *et al.*, 2007; BOCCARD, VEUTHEY, RUDAZ, 2010; BALLABIO, CONSONNI, 2013; FERREIRA, 2015). Este método é usualmente empregado, ainda, como uma análise exploratória prévia à construção de modelos de classificação como o *Partial Least Squares Regression Discriminant Analysis* (PLS-DA), quando a construção destes modelos de predição é desejada, auxiliando na definição dos pré-tratamentos mais adequados e detecção de *outliers* que podem impactar a regressão (BALLABIO, CONSONNI, 2013).

A redução da dimensão das variáveis ocorre quando existe colinearidade entre elas na matriz de dados, o que possibilita seu agrupamento por combinações lineares conforme suas semelhanças. Logo, havendo correlações significativas no conjunto de dados original, é possível encontrar um número menor de novas variáveis (eixos) capazes de resumir toda a informação da matriz de dados. Cada novo eixo é denominado Componente Principal (PC) e é obtido pela transformação das coordenadas das variáveis originais de uma matriz de dados (amostras x variáveis) em um novo eixo de variáveis ortogonais (não correlacionadas), que explica a maior quantidade de informação dos dados obtidos (FERREIRA, 2015; SOARES, 2018).

Conforme mencionado anteriormente, as PCs são obtidas a partir de combinações lineares das variáveis originais. A primeira componente principal, PC1, é definida pela direção que descreve a combinação linear da máxima variância dos dados originais (isto é, a de máxima informação). Já a PC2 e suas subsequentes representam a direção da maior variância sempre de forma ortogonal à PC anterior, ou seja, descrevem a variância restante. Como esses eixos são calculados em ordem decrescente de importância, muitas vezes a informação relevante fica concentrada nas duas ou três primeiras PCs, sendo que as últimas PCs contêm, principalmente, variações aleatórias como erros experimentais, que podem ser ignoradas (NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2006; FERREIRA, 2015).

A FIGURA 6 exemplifica a combinação linear de um conjunto de dados contendo três variáveis originais ( $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$ ), explicando sua distribuição em um novo espaço de duas dimensões formado pelas novas variáveis PC1 e PC2 e indicando o impacto destas variáveis sobre o modelo.

FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS



FONTE: Adaptado de Boccard, Veuthey, Rudaz (2010).

As novas coordenadas das amostras no novo sistema de eixos das componentes principais são denominadas de *scores* e fornecem um resumo ou visão geral da relação entre elas, possibilitando a visualização de grupos, tendências ou mesmo *outliers*. O gráfico de *loadings*, por sua vez, representa o quanto cada variável original contribui para a formação da PC, ou seja, seu peso (*loading*) individual no modelo. Portanto, os *scores* expressam as relações entre as amostras (sua proximidade indica um perfil multivariado semelhante), enquanto os *loadings* indicam as relações entre as variáveis, sendo as direções no gráfico de *scores* correspondentes a do gráfico de *loadings*, permitindo identificar quais variáveis separam diferentes grupos de amostras (TRYGG, HOLMES, LUNDSTEDT, 2007; FERREIRA, 2015).

### 3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS UNIVARIADAS

As análises multivariadas, discutidas de forma sucinta no item anterior, são ótimas ferramentas para avaliação estatística de grandes conjuntos de dados

(amostras e variáveis), pois são capazes de reduzir significativamente a sua dimensão, fornecendo uma visão geral aproximada de sua distribuição. Elas têm a vantagem de considerar os padrões gerais em todo o conjunto de dados, mas podem introduzir desafios adicionais e fontes de variabilidade devido ao pré-tratamento de dados, muitas vezes necessários para analisar todas as variáveis de uma só vez (SUGIMOTO *et al.*, 2012). Nesse contexto, as análises estatísticas univariadas, que permitem a avaliação das variáveis estudadas de forma individualizada, também podem fornecer informações úteis, complementando ou mesmo corroborando os resultados observados em ensaios multivariados. No caso de estudos que envolvem um grande número de variáveis sob investigação, a exemplo de estudos de metabólica, sua aplicação rotineira ainda pode apresentar certa resistência devido à necessidade de avaliação individual de cada variável estudada, o que não limita, tampouco invalida a sua relevância para esse tipo de estudo.

Um teste univariado, usualmente, compara o valor estatístico (ex: média ou mediana) entre dois grupos de estudo de amostras empregando diferentes testes estatísticos para esta finalidade. Com base na heterocedasticidade, normalidade e independência dos conjuntos de dados, a comparação pode ser paramétrica ou não paramétrica. Entre algumas ferramentas estatísticas univariadas típicas destacam-se teste t (pareado ou não pareado), análise de variância (ANOVA), teste de soma de classificação de Wilcoxon, teste de Kruskal-Wallis entre outros, a depender do desenho experimental e distribuição de dados (LAMICHHANE *et al.*, 2018). O QUADRO 6 exemplifica alguns testes estatísticos empregados de acordo com a distribuição dos dados (normal *versus* não normal) e conforme desenho experimental.

QUADRO 6 – TESTES ESTATÍSTICOS SEGUNDO DESENHO EXPERIMENTAL E DISTRIBUIÇÃO DOS DADOS

DESENHO EXPERIMENTAL	DISTRIBUIÇÃO NORMAL (PARAMÉTRICO)	DISTRIBUIÇÃO NÃO-NORMAL (NÃO PARAMÉTRICO)
	COMPARAÇÃO DE MÉDIAS	COMPARAÇÃO DE MEDIANAS
Comparação de dois grupos não pareados	Teste t não pareado	Mann-Whitney
Comparação de dois grupos pareados	Teste t pareado	Wilcoxon signed-rank
Comparação de mais de dois grupos não correspondentes	ANOVA unidirecional com comparação múltipla	Kruskal-Wallis
Comparação de mais de dois grupos correspondentes	ANOVA de medidas repetidas	Friedman

Fonte: Adaptado de Vinaixa *et al.* (2012).

Conforme resumido por Vinaixa *et al.* (2012) no quadro anterior, o desenho experimental dependerá de condições experimentais consideradas no planejamento e execução do estudo. A distribuição populacional dos dados, por sua vez, irá determinar o tipo de teste estatístico a ser empregado: paramétrico (baseado na suposição de que os dados são amostrados de uma distribuição gaussiana ou normal) e não paramétrico (não supõe a distribuição da população).

A decisão entre testes paramétricos e não paramétricos deve ser baseada em três pressupostos que devem ser verificados: normalidade, homogeneidade das variâncias (homoscedasticidade/heterocedasticidade) e independência. A normalidade é assumida em testes estatísticos paramétricos, como teste t ou ANOVA e pode ser avaliada estatisticamente ou graficamente por testes de hipótese como Shapiro-Wilk (indicado para amostras pequenas, com  $N < 50$ ) e Kolmogorov-Smirnov, por exemplo. A homoscedasticidade (homogeneidade de variâncias) pode ser avaliada por métodos gráficos (ex: boxplot) ou métodos estatísticos como testes de Levene e Bartlett, sendo o primeiro o menos sensível a desvios da normalidade. Por fim, a independência avalia se dois eventos são independentes quando a ocorrência de um não impacta/interfere na probabilidade da ocorrência do outro (VINAIXA *et al.*, 2012).

Testes t e ANOVA são usados quando a variável de resposta tem uma distribuição normal (LM). Quando os dados não apresentam normalidade, tratamentos estatísticos não paramétricos (NP) devem ser utilizados. Nesse sentido, um modelo linear generalizado (GLM) tem sido utilizado como uma alternativa não paramétrica para ANOVA, a exemplo do realizado em um estudo conduzido por Austel *et al.* (2017), que avaliou a correlação entre o uso de fumigantes e alterações no perfil de compostos voláteis de sementes de girassol. O GLM corresponde a uma grande classe de modelos estatísticos usados para relacionar respostas a combinações lineares de variáveis preditoras independentes, englobando distribuições com menores exigências dos modelos normais aplicados a ANOVA. Isso fornece maior flexibilidade em relação aos modelos lineares clássicos e permite tratar os dados com distribuição não normal com maior robustez (MELO, 2018).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 SELEÇÃO DOS CLONES DE ERVA MATE

Para o presente estudo foram selecionados 2 (dois) clones de erva mate, mantidos como minicepas em um minijardim clonal localizado na cidade de Colombo, Paraná, Brasil (25° 20'S e 49° 14'W, 950 m acima do nível do mar). As minicepas foram cultivadas em sistema semi-hidropônico em canaletão com areia lavada (WENDLING, DUTRA, GROSSI, 2007), fertilizadas diariamente com solução nutritiva via sistema de fertirrigação por gotejamento (WENDLING, SANTIN, 2015), sendo mantidas em casa de vegetação com temperatura e umidade controladas (temperaturas entre 13°C e 37°C, com uma média de 25,3°C e umidade relativa do ar  $\geq 85\%$ ). A composição da solução nutritiva utilizada é especificada no QUADRO 7.

QUADRO 7 – COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO NUTRITIVA UTILIZADA NO SISTEMA DE FERTIRRIGAÇÃO DO MINIJARDIM CLONAL

CONSTITUINTE		CONCENTRAÇÃO (mg.L <sup>-1</sup> )
Fósforo		25
Potássio		200
Cálcio		45
Magnésio		45
Enxofre		76,9
Boro		1,5
Cobre		0,1
Ferro		5
Manganês		1
Zinco		0,7
Molibdênio		0,07
Nitrogênio total	NO <sub>3</sub>	156
	NH <sub>4</sub>	50

FONTE: Duarte *et al.* (2020).

Os clones EC24 e EC50 foram selecionadas para o estudo devido as suas diferentes características de enraizamento (alta e baixa performance, respectivamente, conforme observado previamente por Vieira *et al.*, 2021), além de estarem em condição foliar e de brotação favorável no momento da coleta de miniestacas. Estes clones, entre outros, são oriundos de um programa de

melhoramento genético da Embrapa Florestas estabelecido na cidade de Ivaí, Paraná, Brasil.

FIGURA 7 – MINICEPAS CULTIVADAS EM MINIJARDIM CLONAL COM SISTEMA SEMI-HIDROPÔNICO (EMBRAPA FLORESTAS, COLOMBO, PARANÁ)



FONTE: O autor (2022).

## 4.2 PROPAGAÇÃO DOS CLONES SELECIONADOS POR MINIESTAQUIA

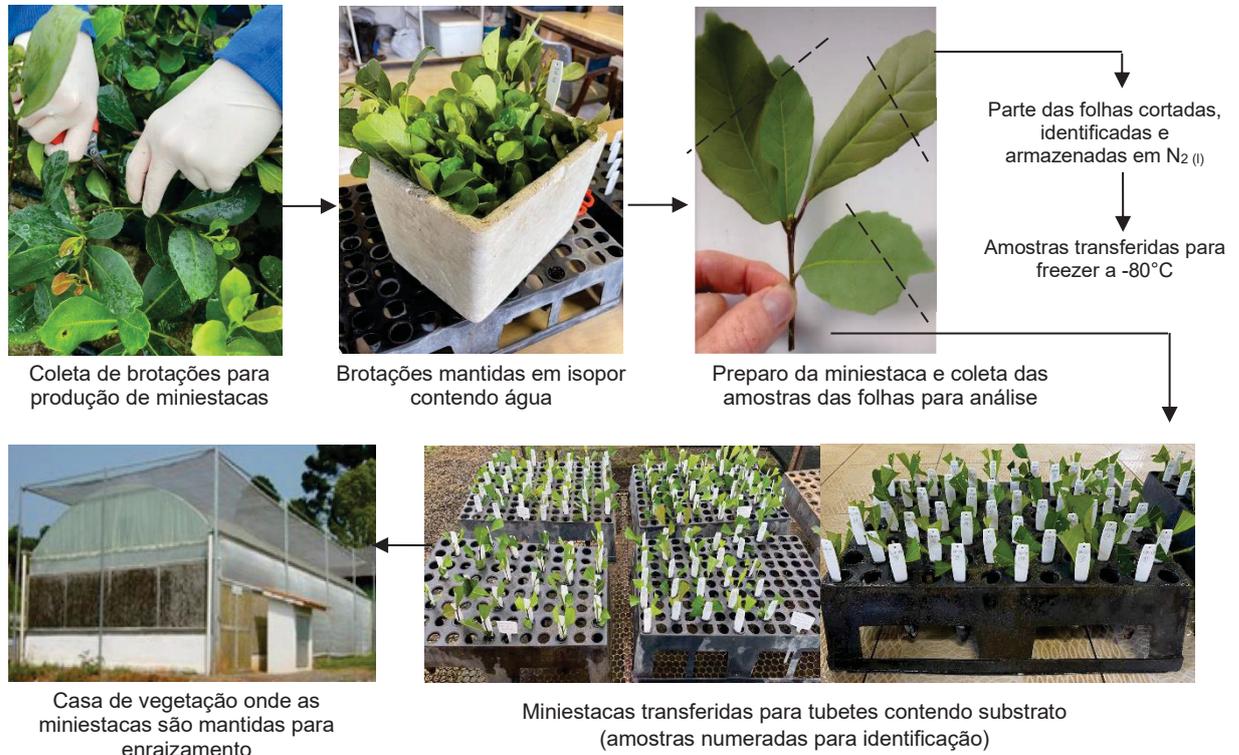
### 4.2.1 Preparo das miniestacas e coleta das folhas para análise de metabólitos

As brotações das minicepas dos clones selecionados (EC24 e EC50) foram colhidas em janeiro de 2022, utilizando tesoura de poda, e armazenadas em caixas de isopor contendo água para evitar o estresse hídrico e manter a turgescência do material vegetal. As miniestacas foram confeccionadas logo em seguida, a partir das brotações coletadas, realizando corte em bisel na porção basal do caule, mantendo um comprimento médio foi de 8 cm ( $\pm 0,5$  cm) e 3 folhas com área foliar reduzida em 50%.

As miniestacas preparadas foram imersas por cerca de 10 segundos em uma solução hidroalcolica 0,3% (p/V) de ácido indolbutírico (AIB) e imediatamente plantadas em tubetes de polipropileno contendo o substrato comercial Agrofior F6®, composto por cascas de pinus compostado e fibra de coco 100% orgânico. Ao todo foram preparadas 60 miniestacas para cada genótipo selecionado, totalizando 120 miniestacas, as quais foram mantidas em casa de vegetação climatizada (80% de

umidade relativa e temperatura de 20 a 30 °C) por aproximadamente 120 dias para seu enraizamento.

FIGURA 8 – PRODUÇÃO DE MINIESTACAS A PARTIR DE MINICEPAS CULTIVADAS EM MINIJARDIM CLONAL



FONTE: Adaptado de Wendling *et al.* (2020).

Os 50% restantes das folhas de cada miniestaca preparada foram envoltos em papel alumínio, devidamente identificados conforme sua minicepa e miniestaca de origem, sendo imediatamente armazenados sob nitrogênio líquido, de forma a cessar o metabolismo das folhas e mitigar alterações na composição de seus constituintes químicos. Em seguida as folhas foram transferidas para freezer a -80 °C e mantidas sob estas condições até o momento do preparo para as análises cromatográficas (CG-EM).

#### 4.2.2 Avaliação das respostas das miniestacas e seleção de amostras

Após um período de enraizamento de cerca de 120 dias, em maio de 2022, as 120 miniestacas produzidas (60 de cada clone propagado) foram avaliadas quanto às respostas enraizamento ou esclerificação (morte). Além disso, as principais

características das amostras enraizadas foram catalogadas em planilha para viabilizar sua classificação quanto à similaridade de resposta de enraizamento, considerando os seguintes aspectos:

- a) Número de raízes axiais formadas e comprimento da raiz principal;
- b) Formação de calos;
- c) Presença de brotos;
- d) Manutenção das folhas da miniestaca original.

Após esta classificação, 5 (cinco) amostras biológicas de cada clone propagado e de cada resposta biológica foram selecionadas para a investigação dos metabólitos de suas folhas de origem. Para as amostras enraizadas foram consideradas aquelas com a maior formação de raízes e manutenção das folhas da miniestaca original, sem a formação de calos.<sup>3</sup>

Para as amostras mortas foram selecionadas aquelas que apresentaram a miniestacas totalmente necrosada.

#### 4.3 ANÁLISE DE METABÓLITOS DAS FOLHAS DE ERVA MATE

Para o preparo e análise das amostras foi utilizado um procedimento otimizado pela Embrapa Florestas (Colombo/PR) para extração e derivatização de compostos polares em folhas de erva mate, o qual é baseado em protocolos de análises de metabolômica descritos por autores como Fiehn *et al.* (2000).

##### 4.3.1 Preparo das amostras (pulverização das folhas das miniestacas)

As folhas originais das miniestacas selecionadas após o processo de enraizamento, mantidas por 120 dias sob refrigeração a -80 °C (desde o procedimento de propagação miniestaquia), foram individualmente pulverizadas com auxílio de gral e pistilo, empregando nitrogênio líquido N<sub>2(l)</sub>. As amostras pulverizadas foram transferidas para tubos Eppendorf de 2 mL, identificadas e mantidas sob constante

---

<sup>3</sup> A ausência de calos foi considerada como um critério de seleção das amostras biológicas uma vez que os diferentes genótipos apresentaram características distintas em relação a rizogênese indireta: algumas amostras do genótipo EC24 apresentaram a formação significativa de calos enquanto o genótipo EC50 não apresentou calogênese pronunciada.

refrigeração (em  $N_2(l)$  ou refrigerador a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ ) até o momento da extração de seus metabólitos.

#### 4.3.2 Extração dos metabólitos polares

Cerca de 30 mg das folhas de cada amostra biológica, em duplicata química, foram transferidas para tubos Eppendorf de 1,5 mL. A cada tubo foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  de metanol (100%), pré-arrefecido a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Após homogeneização em vórtex, 30  $\mu\text{L}$  de uma solução de  $^{13}\text{C}$ -sorbitol a 0,2 mg/mL foram adicionados a cada Eppendorf, com auxílio de microsseringa de vidro, para a padronização interna.

A extração das amostras ocorreu em um equipamento Thermomixer Comfort (Eppendorf), empregando agitação a 950 rpm por 15 minutos, a  $70\text{ }^\circ\text{C}$ . Após o arrefecimento, 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio foram adicionados a cada tubo, que foi agitado em vórtex e novamente transferido para Thermomixer, para novo ciclo de incubação (desta vez sob agitação a 950 rpm, por 5 minutos, a uma temperatura de  $37\text{ }^\circ\text{C}$ ).

Após esta etapa, 400  $\mu\text{L}$  de água ultrapura (tipo 1) foram adicionados aos Eppendorfs, agitados em vórtex e centrifugados a 12000 rpm por 7 minutos para a separação das fases. Após a centrifugação, a fase polar (superior) de cada amostra foi transferida para 2 novos tubos Eppendorf<sup>4</sup>, transferidos, por sua vez, para um equipamento concentrador Speed Vac, onde foram secas sob vácuo a temperatura ambiente por 10 horas.

Todos os extratos obtidos após secagem foram mantidos sob refrigeração a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  até o momento da derivatização para análise cromatográfica

#### 4.3.3 Derivatização dos metabólitos para análise por CG-EM

Para a análise cromatográfica dos metabólitos obtidos da fração polar da extração das folhas de erva mate, foi empregado o procedimento de derivatização por metoximação seguido de sililação.

Para a metoximação, 50  $\mu\text{L}$  de cloridrato de metoxiamina em piridina (20 mg/mL) foram adicionados aos tubos Eppendorf contendo o resíduo seco da fração

---

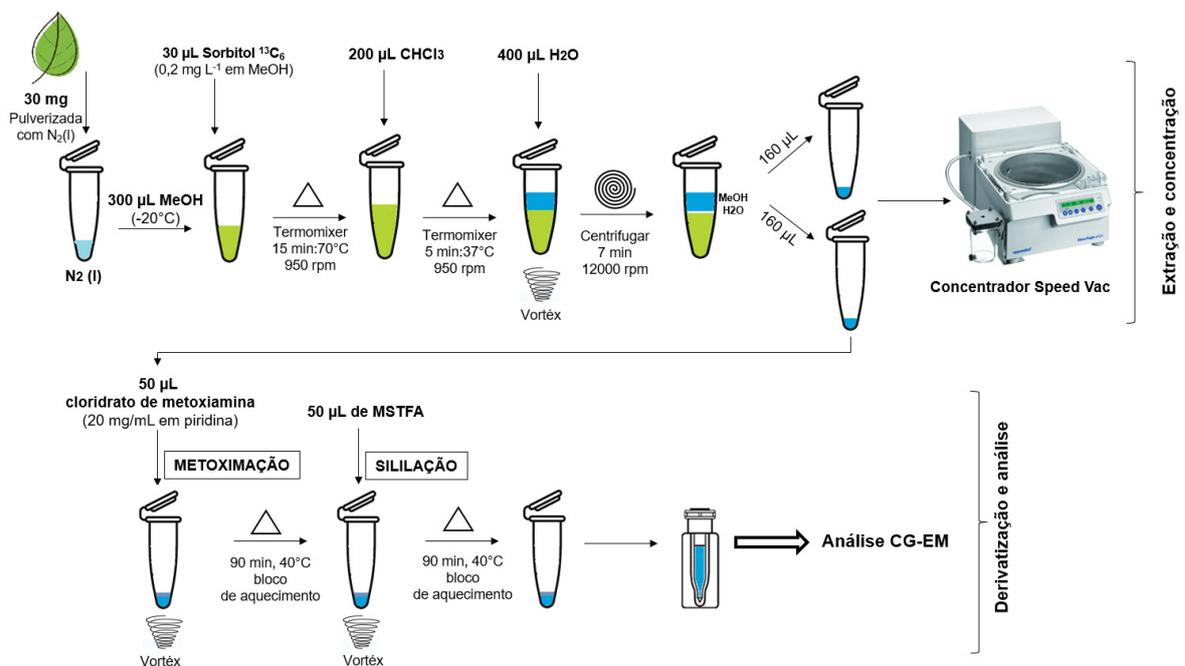
<sup>4</sup> A fração polar da extração de cada amostra foi coletada e dividida em 2 Eppendorfs distintos, de forma a garantir uma contraprova do processo de extração para uma eventual reanálise, se necessária.

polar de extração, homogêneos em vórtex e incubados 40 °C por 90 minutos em bloco de aquecimento.

Para a reação de sililação, por sua vez, 50 µL de N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) foram adicionados aos Eppendorfs após a reação de metoximação, homogêneos em vórtex e novamente incubados em bloco de aquecimento a 40 °C por 90 minutos.

O esquema a seguir (FIGURA 9) ilustra os processos de extração, concentração e derivatização (metoximação e sililação) dos metabólitos extraídos.

FIGURA 9 – ESQUEMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E DERIVATIZAÇÃO DOS METABÓLITOS DAS FOLHAS DE ERVA MATE



FONTE: Adaptado de Melo (2018).

Após as reações de derivatização, as amostras foram imediatamente analisadas em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas.

#### 4.3.4 Análise por CG-EM

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo gasoso Focus GC (Thermo), utilizando injeção automática (TripPlus AS, Thermo) acoplado a um espectrômetro de massas Ion trap (Polaris Q, Thermo). A injeção das amostras ocorreu com divisão de fluxo 1:25 (1 min) e a análise foi realizada com fluxo constante

e compensação a vácuo, com a temperatura do injetor a 230 °C, linha de transferência a 250 °C e gás de arraste hélio a 1,0 mL.min<sup>-1</sup>. Para a separação dos compostos foi utilizada uma coluna cromatográfica modelo DB-5 (30 m x 0,25 mm Thermo Scientific) e a seguinte programação de temperatura do forno da coluna: 70 °C com isoterma de 1 minuto, aquecimento até 320 °C na taxa de 8 °C.min<sup>-1</sup>, com isoterma final de 8 minutos.

O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo com ionização por impacto de elétrons a 70 eV e temperatura da fonte de íons a 200 °C.

#### 4.3.5 Identificação e quantificação dos metabólitos detectados

Os cromatogramas foram obtidos utilizando o *software* de operação do cromatógrafo (Xcalibur) e transferidos para o *software* AMDIS (*Automated Mass Spectral Deconvolution*, NIST) para a identificação dos principais sinais detectados, a partir de sua deconvolução. Para a identificação foi realizada a comparação de espectros de massas e do índice de retenção (IR) com a biblioteca *GMD-Database* (HUMMEL *et al.*, 2010; DETHOLOFF *et al.*, 2014). O IR foi calculado pelo *software* AMDIS com base na análise de hidrocarbonetos saturados lineares realizada sob as mesmas condições analíticas (C<sub>10</sub>H<sub>22</sub> a C<sub>30</sub>H<sub>62</sub>). Alguns compostos, mesmo não sendo identificados previamente frente à biblioteca, foram anotados e seguiram para a etapa de quantificação, visando a investigação de sua identidade caso indicados como significativos nas análises estatísticas.

Para a quantificação, os cromatogramas foram processados utilizando o *software* Xcalibur. A altura dos três principais fragmentos característicos de cada metabólito foi considerada na quantificação, sendo normalizada pela altura do padrão interno adicionado (<sup>13</sup>C-Sorbitol) e pela massa pesada da respectiva amostra, utilizando planilha construída em Excel®. Os resultados de concentração de cada metabólito foram expressos em µg.g<sup>-1</sup>.

#### 4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS

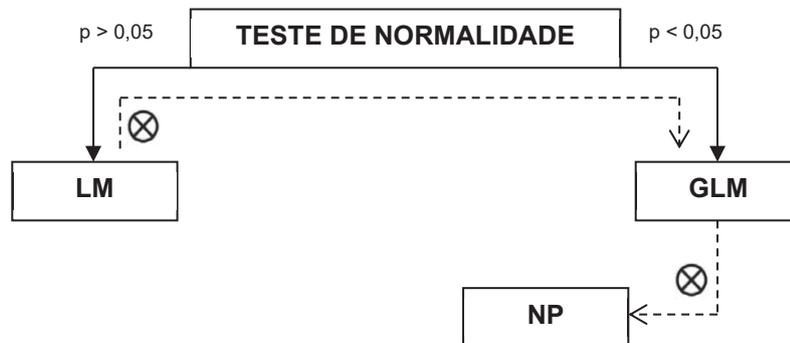
A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para reduzir a dimensão dos dados e para isso foi empregado o *software* R (Studio Server, pacotes: factoextra e FactoMineR). Os dados foram avaliados sem qualquer pré-tratamento e

utilizando os métodos CLR (*Centered Log Ratio*) e Pareto (Studio Server, pacotes: IMIFA e compositions).

Para avaliação univariada dos dados obtidos, a normalidade e a homogeneidade da variância (homoscedasticidade) foram testadas, sendo as variáveis analisadas por meio de ANOVA com teste F ( $p > 0,05$ ) quando apresentaram distribuição de probabilidade normal. As variáveis com outras distribuições de probabilidade foram analisadas utilizando GLM (Modelos Lineares Generalizados), com distribuição gama e teste CHISQ ( $p < 0,05$ ). Aquelas que não se adequaram aos modelos anteriores, por fim, foram tratadas como não paramétricas (NP) e analisadas com o teste Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ). As comparações entre tratamentos e suas interações significativas foram avaliadas por contrastes de Tukey, com um nível de significância de 5%. Todos os testes foram executados pelo *software* R, por meio dos pacotes multcomp, stats, lattice e agricolae (R CORE TEAM, 2018).

A FIGURA 10 ilustra o racional de seleção das análises estatísticas univariadas aplicadas às variáveis em estudo segundo a distribuição de probabilidade observada.

FIGURA 10 – ESQUEMA DE SELEÇÃO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA SEGUNDO DISTRIBUIÇÃO DE PROBABILIDADE DAS VARIÁVEIS (COMPOSTOS ANALISADOS)



FONTE: Adaptado de Melo *et al.* (2021).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 PERFORMANCE DOS CLONES NA PROPAGAÇÃO POR MINIESTAQUIA

Após o período de enraizamento em casa de vegetação (aproximadamente 120 dias), as miniestacas de erva mate produzidas foram avaliadas quanto as respostas de enraizamento e esclerificação (morte). A TABELA 1 resume estes resultados, observados para ambos os clones de erva mate avaliados no estudo.

TABELA 1 – RESULTADOS DA PROPAGAÇÃO POR MINIESTAQUIA

CLONE	RESPOSTA	Nº AMOSTRAS / TOTAL	% AMOSTRAS
EC24	Enraizamento	33 / 60	55,0
	Esclerificação (Morte)	16 / 60	26,7
	Ausência de raízes*	11 / 60	18,3
EC50	Enraizamento	12 / 60	20,0
	Esclerificação (Morte)	40 / 60	66,7
	Ausência de raízes*	8 / 60	13,3

\*Miniestacas que permaneceram vivas (sem indícios de esclerificação), mas que não apresentavam raízes.

Conforme observado na TABELA 1, o genótipo EC24 apresentou, assim como esperado, a melhor performance no enraizamento das miniestacas (55% das amostras enraizaram). O genótipo EC50 apresentou apenas 20% das miniestacas enraizadas.

Após a classificação das respostas, realizada conforme introduzido no item 4.2.2, foram selecionadas para a etapa de análise de metabólitos 5 (cinco) amostras biológicas de cada genótipo de erva mate, referentes às respostas sob investigação (morte e enraizamento), as quais são identificadas na TABELA 2. Cada amostra biológica, por sua vez, foi submetida às análises por CG-EM sendo o preparo realizado em duplicata (duplicata química).

TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS SELECIONADAS PARA ANÁLISE DE METABÓLITOS POLARES POR CG-EM

CLONE	RESPOSTA	AMOSTRA BIOLÓGICA*	Nº RAÍZES AXIAIS	COMPRIMENTO RAÍZES (cm)
EC24	Esclerificação (Morte)	5	-	-
		38	-	-
		47	-	-
		51	-	-
		58	-	-
	Enraizamento (raiz)	21	4	1,6 - 4,2
		32	> 10	4,5 - 5
		55	8	4 - 4,8
		57	6	4 - 5
		60	> 10	4 - 5,5
EC50	Esclerificação (Morte)	4	-	-
		23	-	-
		32	-	-
		47	-	-
		58	-	-
	Enraizamento (raiz)	7	6	2 - 5
		9	3	2,3 - 4,5
		13	6	2,2 - 5,8
		25	4	3,4 - 5,5
		37	5	2,5 - 5

\*Número da miniestaca identificada e selecionada entre as 60 miniestacas propagadas para cada minicepa.

FIGURA 11 – AVALIAÇÃO DAS MINIESTACAS APÓS PERÍODO DE ENRAIZAMENTO



Exemplos de miniestacas após período de enraizamento

Exemplo de raízes e calos

FONTE: O autor (2022).

## 5.2 METABÓLICOS ANALISADOS POR CG-EM

O processamento dos dados das análises por CG-EM utilizando o *software* AMDIS possibilitou a anotação de 86 compostos. Entre os compostos anotados, 48 foram efetivamente identificados por meio da comparação de seus espectros de massa e IRs com a biblioteca. Os compostos foram nomeados de C1 a C86 durante

a quantificação, realizada por meio da altura dos 3 principais fragmentos de massa, utilizando o *software* de operação do CG-EM (XCalibur).

A TABELA 3 lista os compostos efetivamente identificados frente à biblioteca, incluindo os respectivos códigos de identificação (IDs), índices de retenção (IRs), principais fragmentos de massa ( $m/z$ ) e resultados médios de concentração expressos em  $\mu\text{g.g}^{-1}$  (normalizados frente ao padrão interno e massa de cada amostra pesada). Nela é possível visualizar, principalmente, metabólitos primários como os açúcares e seus derivados, que se destacam pela maior concentração frente aos demais compostos identificados nas folhas de ambos os clones de erva mate, entre eles a sacarose (C73), a glucose (C47) e o mioinositol (C59). Já entre os metabólitos secundários identificados destacam-se os derivados cafeoilquínicos, especialmente o ácido quínico (C43) e os ácidos 5-cafeoilquínico (5-CQA - ácido neoclorogênico) e 3-cafeoilquínico (3-CQA - ácido clorogênico), codificados como C85 e C83, respectivamente, na etapa de quantificação realizada no *software* XCalibur.

Os resultados médios de concentração e o desvio padrão apresentados na TABELA 3 já desconsideram os dados relativos a amostras apontadas como anômalas (*outliers*) nas análises estatísticas. Mesmo após a exclusão de *outliers*, porém, é possível verificar que os valores de desvio padrão são bastante significativos quando comparados ao respectivo valor médio de concentração, o que é compreensível tendo em vista os diferentes fatores que podem contribuir para a maior variabilidade e dispersão dos dados (ex: amostragem, cuidados no manuseio das amostras após a coleta, variações metabólicas intrínsecas da matriz, método analítico, entre outros). Esta variabilidade dos dados obtidos, portanto, reforça a necessidade da aplicação de ferramentas estatísticas, associadas ou não a pré-tratamentos dos dados brutos, para viabilizar a sua interpretação e conclusão em relação ao principal objetivo do estudo: determinar se há uma correlação entre a concentração foliar dos metabólitos (anterior à confecção da miniestacas) com as respostas de morte e enraizamento no processo de propagação por miniestaquia.

TABELA 3 – COMPOSTOS IDENTIFICADOS NAS AMOSTRAS ANALISADAS E SUA CONCENTRAÇÃO MÉDIA NORMALIZADA ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) DETERMINADA POR CG-EM

ID	COMPOSTO IDENTIFICADO	IR	FRAGMENTOS m/z	CONCENTRAÇÃO MÉDIA (DEVIÓ PADRÃO)				
				MORTE **	CLONE EC24	RAIZ	RAIZ	
<b>Aminoácidos</b>								
C3	Alanina	1098,1	149 116	73	23,54 (11,62)	9,45 (9,31) *	13,83 (10,12)	6,65 (2,61)
C7	Valina	1210,8	132 116	73	2,07 (3,38)	1,41 (2,60)	0,35 (0,44)	0,12 (0,05)
C13	Serina	1354,9	218 204	73	10,30 (13,23)	2,24 (2,92)	0,89 (0,69)	0,53 (0,30)
C14	Treonina	1379,8	292 218	73	1,43 (1,60)	1,19 (1,35)	0,22 (0,18)	0,09 (0,03)
C18	Ác. aspártico	1514,9	232 149	73	55,80 (26,30)	12,53 (5,93) *	4,48 (2,74)	5,39 (2,77)
C19	Ác. piroglutâmico	1515,4	230 156	73	27,95 (11,53)	14,72 (10,13)	2,62 (1,38)	3,70 (1,97)
C20	Ác. 4-amino butanoico	1526,1	304 174	149	4,11 (2,62)	1,45 (0,62) *	0,32 (0,21)	0,51 (0,22)
C26	Ác. glutâmico	1616,7	246 230	149	85,83 (41,17)	20,22 (14,66)	7,41 (4,53)	8,98 (4,78)
C49	Tiramina	1907,4	338 174	73	61,29 (50,08)	54,67 (35,45)	78,63 (47,02)	51,40 (14,82)
<b>Açúcares</b>								
C12	Ác. Glicérico	1324,2	292 189	149	12,71 (7,23)	5,71 (7,06)	4,88 (4,75)	3,70 (1,45)
C28	Ribose (isômero 1)	1649,3	217 149	73	1,34 (1,99)	0,81 (1,16)	0,73 (0,39)	0,87 (0,66)
C29	Arabinose	1655,9	217 149	73	8,99 (14,95)	2,62 (3,75)	4,04 (2,57)	4,62 (2,91)
C30	Ribose (isômero 2)	1670,4	217 149	73	1,28 (0,82)	0,71 (0,59)	0,53 (0,35)	0,56 (0,29)
C31	Arabitol	1711,5	217 149	73	1,43 (1,25)	1,09 (1,05)	1,12 (0,80)	0,75 (0,87)
C34	Ác. ribônico	1753,6	292 149	73	2,42 (0,77)	2,59 (2,09)	0,87 (0,44)	1,03 (0,55)
C35	Glucopirranose	1760,4	217 149	73	11,07 (11,17)	62,54 (108,42)	5,54 (7,93)	1,96 (0,96)
C45	Frutose	1862,8	217 149	73	191,60 (116,01)	164,30 (99,48)	86,17 (64,88)	57,53 (27,01)
C46	Galactose	1881,4	319 149	73	10,69 (12,63)	11,95 (10,51)	6,27 (3,66)	5,11 (1,21)
C47	Glucose	1905,2	319 149	73	852,95 (908,95)	1291,37 (884,56)	1256,33 (1035,24)	1254,84 (810,05)
C55	Ác. Sacárico	2000,1	333 149	73	0,43 (0,36)	0,34 (0,28)	0,52 (0,28)	0,77 (0,47)
C57	Ác. Galactarico	2032,1	333 149	73	0,84 (0,72)	0,53 (0,28)	1,15 (0,61)	1,45 (0,58)
C59	Mioinositol	2081,5	318 305	265	993,89 (331,26)	2210,85 (778,31)	904,28 (319,28)	2002,82 (1080,32)
C69	Glucose-6-fosfato	2307,5	387 315	299	0,54 (0,23)	0,42 (0,26)	0,26 (0,10)	1,35 (0,52)
C73	Sacarose	2627,3	437 361	347	3467,42 (1342,54) *	5987,07 (2129,92)	1820,81 (609,58)	3660,77 (1169,99)
C74	Maltose	2748,7	361 217	204	13,18 (11,74)	54,40 (109,89)	4,61 (9,83)	0,13 (0,10)
C79	Galactinol	2974,6	433 204	191	52,09 (29,76)	23,65 (11,06)	27,29 (16,79)	42,73 (18,47)
C86	6 – Kestose	3384,3	452 437	361	100,03 (34,90)	124,57 (46,44)	76,46 (28,07)	196,32 (64,00)

ID	COMPOSTO IDENTIFICADO	IR	FRAGMENTOS m/z	CONCENTRAÇÃO MÉDIA (DESVIO PADRÃO)			
				MORTE **	CLONE EC24	RAIZ	MORTE
<b>Derivados hidroxicinâmicos (cafeoilquínicos)</b>							
C43	Ác. Quínico	1850,2	345 255 149	1677,10 (786,40)	1713,35 (615,20)	942,81 (366,44)	1053,13 (658,37)
C64	Ác. cafeico (trans)	2131,7	396 381 219	8,73 (6,73)	25,51 (26,19)	49,00 (55,73)	69,50 (31,00)
C80	Ác. 3-Cafeoilquínico (cis)	2993,4	345 307 255	3,06 (3,30)	8,11 (5,10)	3,30 (2,00)	20,35 (8,33)
C81	Ác. 4-Cafeoilquínico (cis)	3058,1	345 307 255	3,75 (1,82)	2,96 (1,49)	3,52 (1,54)	13,88 (7,81)
C82	Ác. 5-Cafeoilquínico (cis)	3082,3	345 307 255	1,83 (1,02)	2,25 (1,05)	0,80 (0,50)	3,49 (1,69)
C83	Ác. 3-Cafeoilquínico (trans)	3103,1	345 307 255	234,18 (170,38)	180,65 (105,11)	140,88 (144,34)	598,06 (338,88)
C85	Ác. 5-Cafeoilquínico (trans)	3184,6	345 307 255	721,22 (821,26)	973,87 (585,57)	801,07 (688,08)	2978,39 (1245,13)
<b>Outros metabólitos</b>							
C1	2-hidroxi piridina	1032,6	166 152 -	2,58 (1,74)	1,05 (1,35) *	3,14 (3,45)	0,51 (0,46)
C2	Ác. Láctico	1052,5	191 149 73	6,62 (3,08)	2,80 (3,54) *	9,87 (10,12)	2,98 (2,61)
C10	Ác. Fosfórico	1265,7	314 299 73	223,49 (133,23)	59,86 (61,08)	116,63 (83,37)	33,41 (20,87)
C11	Ác. Succínico	1309,7	247 149 73	7,24 (4,07)	7,81 (8,22)	7,01 (5,24)	4,35 (1,94)
C16	Ácido málico	1482,3	263 149 73	48,99 (20,14)	29,62 (27,51)	17,21 (8,76)	14,95 (6,44)
C22	Ác. Treônico	1553,8	292 149 73	31,45 (19,05)	15,32 (8,02)	4,94 (3,50)	6,99 (3,98)
C24	Ác. 5-Hidroxipecolico (isômero 1)	1595,7	244 154 73	93,84 (60,04)	49,37 (63,68)	53,68 (36,57)	32,94 (14,03)
C25	Ác. 5-Hidroxipecolico (isômero 2)	1605,7	244 154 73	5,97 (4,62)	2,11 (2,03) *	7,54 (4,61)	6,70 (3,27)
C38	Ácido chiquímico	1801,9	204 149 73	2,54 (1,59)	1,18 (0,59)	1,46 (0,75)	2,93 (3,19)
C40	Ácido cítrico	1811,0	345 273 149	203,77 (145,09)	70,11 (55,17)	60,07 (66,51)	40,70 (27,20)
C41	Dímero ác. desidroascórbico	1838,8	316 173 157	0,51 (0,14)	0,44 (0,25)	0,47 (0,33)	1,00 (0,53)
C42	Cafeína	1843,8	194 165 109	36,62 (17,55)	50,41 (18,23)	41,99 (20,34)	50,42 (19,91)
C60	Ácido úrico	2090,1	456 441 382	0,19 (0,24)	0,05 (0,04)	0,12 (0,20)	0,08 (0,09)
C84	Quercetina	3164,5	647 559 307	14,06 (10,07)	16,28 (8,65)	13,08 (6,74)	80,56 (39,62)

\*Variáveis que tiveram uma replicata química excluída do conjunto de dados, por serem apontadas como outliers (n = 9); \*\* Dados referentes à média e desvio padrão de 4 amostras biológicas analisadas em duplicata química (n = 8) – duplicata química da amostra n° 51 do clone EC24 foi excluída do conjunto de dados por ser apontada como outlier.

### 5.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises estatísticas, realizadas por meio do *software* R (conforme descrito no item 4.4), os dados de concentração de cada composto anotado (C1 a C86, expressos em  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) foram organizados em uma planilha de Excel®, e classificados em fatores (F1 e F2) e níveis (L1 e L2), conforme detalhado no QUADRO 8. O fator F1 foi relacionado aos clones estudados (níveis L1 e L2 para EC24 e EC50, respectivamente) e o fator F2 foi relacionado à resposta observada no processo de miniestaquia (níveis L1 e L2 para Morte e Enraizamento, respectivamente).

QUADRO 8 – ORGANIZAÇÃO/CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA AS ANÁLISES ESTATÍSTICAS NO SOFTWARE R

CLONE	RESPOSTA	F1	F2
EC24	Morte	L1	L1
EC24	Raiz / Enraizamento	L1	L2
EC50	Morte	L2	L1
EC50	Raiz / Enraizamento	L2	L2

#### 5.3.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

Para as análises estatísticas multivariadas foi utilizado o método de Análise de Componentes Principais (PCA), aplicado aos dados brutos de concentração dos compostos normalizados pelo padrão interno e massa fresca da amostra (variáveis) e empregando os métodos Pareto e logaritmo centrado na média (*Centered log ratio*, CLR) no pré-tratamento dos dados. Nesta avaliação, bem como nas análises estatísticas univariadas discutidas adiante, foi possível identificar algumas amostras e variáveis anômalas (*outliers*), as quais foram excluídas do conjunto de dados inicial para a condução de todas as análises estatísticas (conforme já indicado na TABELA 3).

A FIGURA 12 ilustra os gráficos de *scores* e *loadings* obtidos na análise de componentes principais, utilizando os dados sem e com os respectivos pré-tratamentos selecionados, contemplando os fatores F1 (clones) e F2 (respostas da miniestaquia). A FIGURA 13, por sua vez, apresenta os gráficos de *scores* avaliados separadamente para cada um dos fatores.

FIGURA 12 – SCORES E LOADINGS DAS VARIÁVEIS (COMPOSTOS) CONSIDERANDO OS FATORES F1 (CLONE) E F2 (RESPOSTA MINIASTAQUIA)

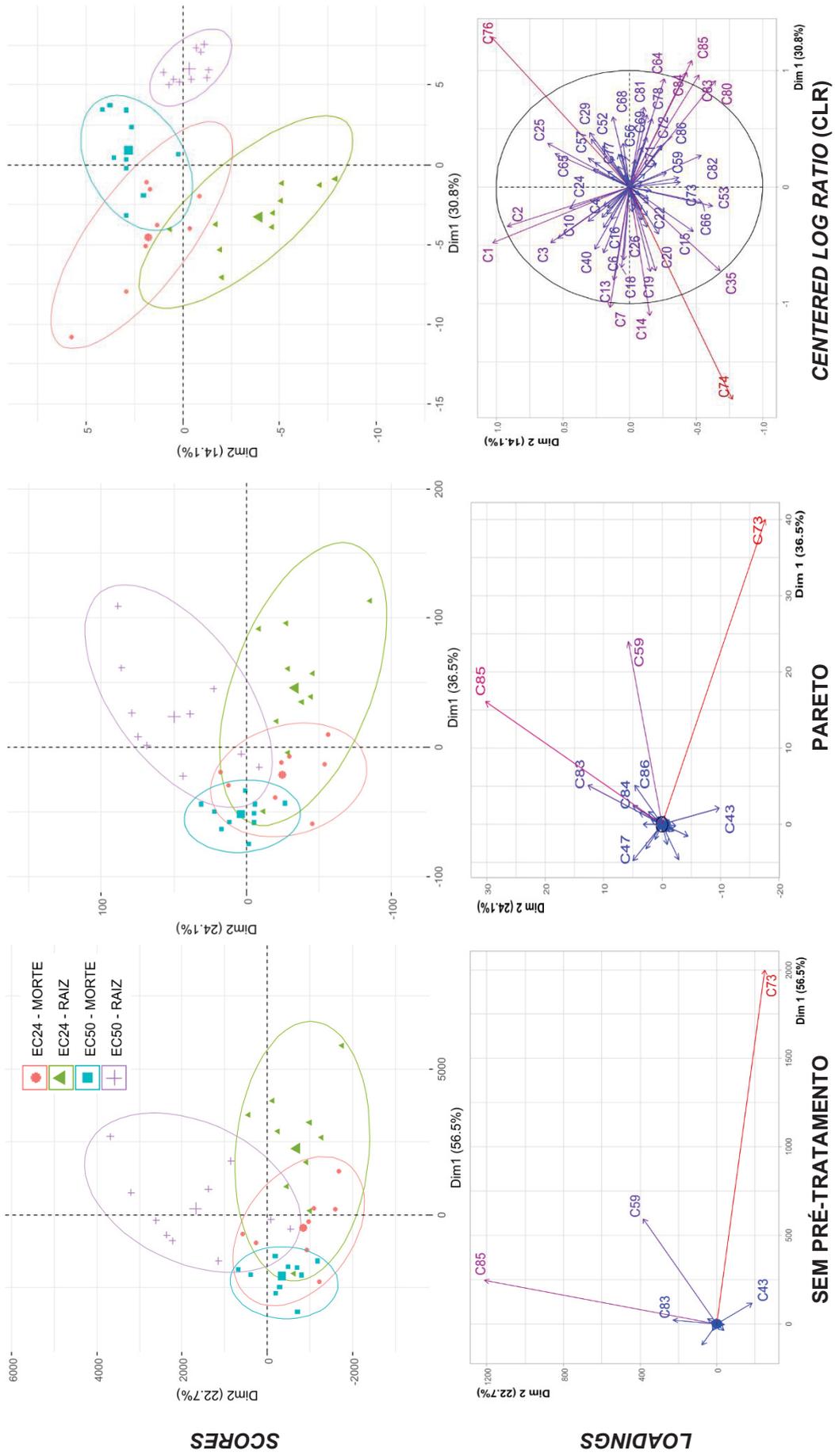
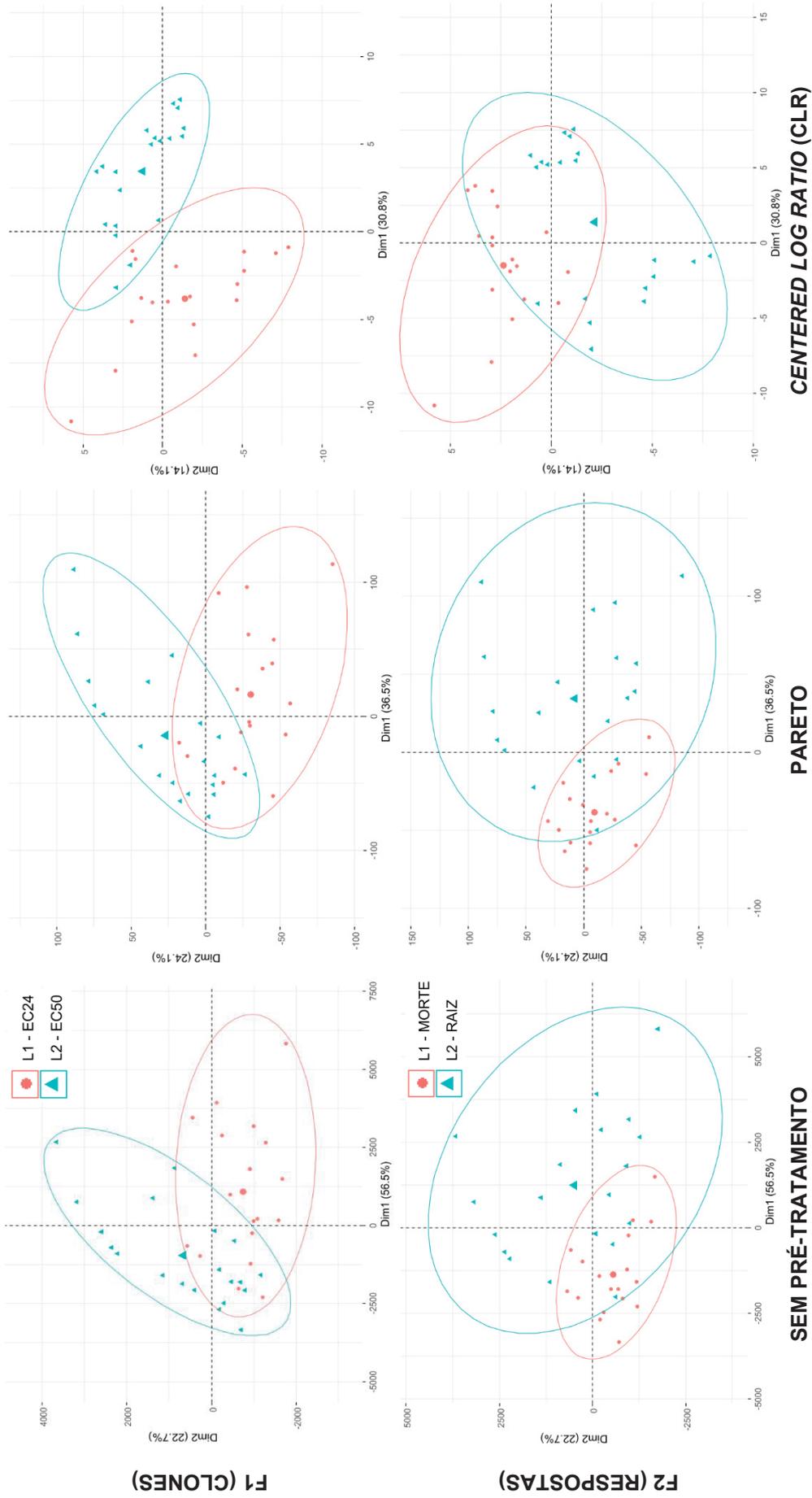


FIGURA 13 – SCORES DAS VARIÁVEIS CONSIDERANDO OS FATORES F1 (CLONES) E F2 (RESPOSTA MINIESTAQUIA) SEPARADAMENTE



Conforme observado na FIGURA 12, a análise de componentes principais aplicada às variáveis sem um pré-tratamento dos dados foi capaz de explicar 79,2% de sua variância, considerando duas componentes principais (56,5% explicados pela PC1 e 22,7% pela PC2). Um comportamento muito similar pode ser observado para os dados pré-processados pelo método de Pareto, com 57,9% da variância global explicada pelas mesmas componentes principais. A similaridade entre os resultados observados para ambas as análises pode ser justificada pelas características deste método de pré-processamento, o qual é capaz de reduzir a importância dos valores mais altos de concentração das variáveis estudadas (que são menos impactados, por exemplo, pelo ruído da técnica analítica), sem impactar a estrutura e a dispersão característica dos dados originais. Dessa forma, o Pareto possibilita uma maior redução da dimensão dos dados, sem impactos sobre sua estrutura original, o que fica evidente nos respectivos gráficos de *scores* e *loadings*: a dispersão dos dados em ambas as dimensões (PC1 e PC2) permanece praticamente inalterada na análise com Pareto (em relação aos dados sem pré-tratamento), porém houve uma redução considerável de suas escalas, que possibilita a visualização ampliada dos dados, principalmente no gráfico de *loadings*, o que passou a destacar novas variáveis significativas para o modelo.

Nos gráficos de *scores* (sem pré-tratamento e com Pareto) observa-se que há algumas tendências de agrupamento dos dados: a primeira componente principal tende a separar o fator F2 (resposta), visto que os dados referentes às amostras que enraizaram encontram-se dispersos mais à direita desse eixo, enquanto os dados referentes às amostras que não enraizaram (mortas) deslocam-se mais à esquerda da PC1. O eixo correspondente à PC2, por sua vez, tende a separar os diferentes clones estudados (fator F1): a grande maioria dos dados referentes ao clone EC24 encontra-se no eixo inferior desta componente principal, enquanto os dados referentes ao clone EC50 apresentam maior tendência de dispersão no eixo superior da PC2. Uma vez que as direções das variáveis observadas no gráfico de *loadings* representam o seu impacto (carga) sobre a construção das componentes principais, é possível correlacionar os compostos observados nesse gráfico com a dispersão das amostras visualizadas no gráfico de *scores*. Neste contexto, portanto, é possível inferir que o composto C73 (sacarose) apresenta forte relação com a resposta de enraizamento, especialmente em relação ao clone EC24 (que efetivamente apresenta concentrações maiores desse açúcar nas folhas analisadas, conforme valores médios

visualizados na TABELA 3). Esta correlação entre a concentração mais elevada de sacarose nas folhas e o enraizamento pode, inclusive, explicar a melhor performance do clone EC24 no enraizamento após a propagação por miniestquia. Outro metabólito que se destaca no mesmo gráfico de *loadings* e que pode ser efetivamente correlacionado ao enraizamento da miniestacas é o mioinositol (C59), que apresenta concentrações significativamente maiores nas folhas oriundas das miniestacas que enraizaram, as quais são muito similares para ambos os clones (conforme também observado na TABELA 3). Adicionalmente, é possível verificar que alguns metabólitos secundários se destacaram no gráfico de *loadings*, dessa vez diferenciando os clones sob estudo: os derivados cafeoilquínicos C85 (ácido 5-trans-cafeoilquínico) e C83 (ácido 3-trans-cafeoilquínico) são observados de forma mais significativa no clone EC50, enquanto o ácido quínico (C43), precursor dos derivados cafeoilquínicos, destaca-se mais no clone EC24. O QUADRO 9 resume os principais metabólitos verificados no gráfico de *loadings*, considerando os dados pré-processados pelo método Pareto.

QUADRO 9 – PRINCIPAIS VARIÁVEIS AVALIADAS NO GRÁFICO DE *LOADINGS* (PCA COM PRÉ-PROCESSAMENTO POR PARETO) E SUA CORRELAÇÃO COM OS FATORES ESTUDADOS

VARIÁVEL (COMPOSTO)	CLONE (F1)	RESPOSTA (F2)
C59 (mioinositol)	EC24 e EC50	Enraizamento
C73 (sacarose)	EC24	Enraizamento
C85 (ácido 5-trans-cafeoilquínico)	EC50	-
C83 (ácido 3-trans-cafeoilquínico)	EC50	-
C43 (Ácido quínico)	EC24	-

Nas FIGURAS 12 e 13 também são apresentados os gráficos de *scores* e *loadings* observados após o pré-tratamento dos dados empregando o método CLR. Este pré-tratamento é comumente aplicado a dados composicionais, que transmitem informações relativas como medições de probabilidade, proporções, porcentagens, partes por milhão (ppm), entre outros, sendo, por esta razão, selecionado adicionalmente para avaliação dos dados obtidos no presente estudo. O método CLR aplica o logaritmo (log) sobre a razão das variáveis observadas e a sua média geométrica (R CORE TEAM, 2018). Nos gráficos de *scores* obtidos após esse pré-tratamento também é possível verificar certos agrupamentos das amostras, cuja variância global de 44,9% é explicada por duas componentes principais: neste caso, a PC1 representou melhor a diferenciação entre os clones, EC24 disperso mais à

esquerda e EC50 disperso mais à direita, com menor sobreposição de dados em relação aos resultados discutidos anteriormente (FIGURA 13). A PC2, por sua vez, explicou de forma parcial a dispersão das amostras em relação às respostas estudadas. Nota-se, portanto, que esse pré-tratamento foi mais eficiente em explicar as diferenças entre os clones avaliados, mas não tão eficiente na diferenciação das amostras considerando as respostas de enraizamento e morte, visto a maior sobreposição de dados destes diferentes grupos. O gráfico de *loadings* referente a esse pré-tratamento foi capaz de evidenciar apenas 2 compostos potencialmente relacionados a diferenciação dos clones: C74 (maltose), observado em maior concentração nas amostras do clone EC24 e o composto C76 (não identificado), mais pronunciado nas amostras do clone EC50 e nas amostras do EC24 que enraizaram (conforme TABELA 3). Logo, entende-se que este pré-tratamento não foi tão eficiente em apontar os compostos relacionados à resposta de enraizamento/morte, principal objetivo do estudo, quando comparado ao pré-processamento empregando o método de Pareto.

### 5.3.2 Análises univariadas

Conforme mencionado anteriormente, análises multivariadas como a PCA possibilitam a redução da dimensão de um grande número de variáveis, facilitando sua visualização. Eventualmente, porém, a aplicação de pré-tratamentos, comum nesse tipo de análise, pode introduzir novos desafios à sua interpretação, contornável pela condução complementar de análises estatísticas univariadas.

Sendo assim, os compostos indicados como relevantes para a distinção de respostas e/ou clones na PCA foram avaliados também por meio de análises estatísticas univariadas (conforme descrito no item 4.4). Nesta avaliação foram incluídos os metabólitos que compartilham a mesma rota metabólica daqueles que se destacaram na PCA (açúcares e derivados cafeoilquínicos) e, adicionalmente, os aminoácidos anotados na análise por CG-EM. Embora estes últimos não tenham se destacado na análise multivariada (possivelmente pela sua menor concentração em relação aos açúcares e ácidos clorogênicos), sua avaliação também foi realizada tendo em vista a importância destes compostos no metabolismo e desenvolvimento vegetal.

Na TABELA 4 e nos histogramas a seguir (FIGURAS 14 a 16) são apresentados os resultados observados nas análises univariadas, aplicadas aos compostos selecionados.

TABELA 4 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS UNIVARIADAS APLICADAS A AMINOÁCIDOS, AÇÚCARES E DERIVADOS CAFEOLQUÍNICOS

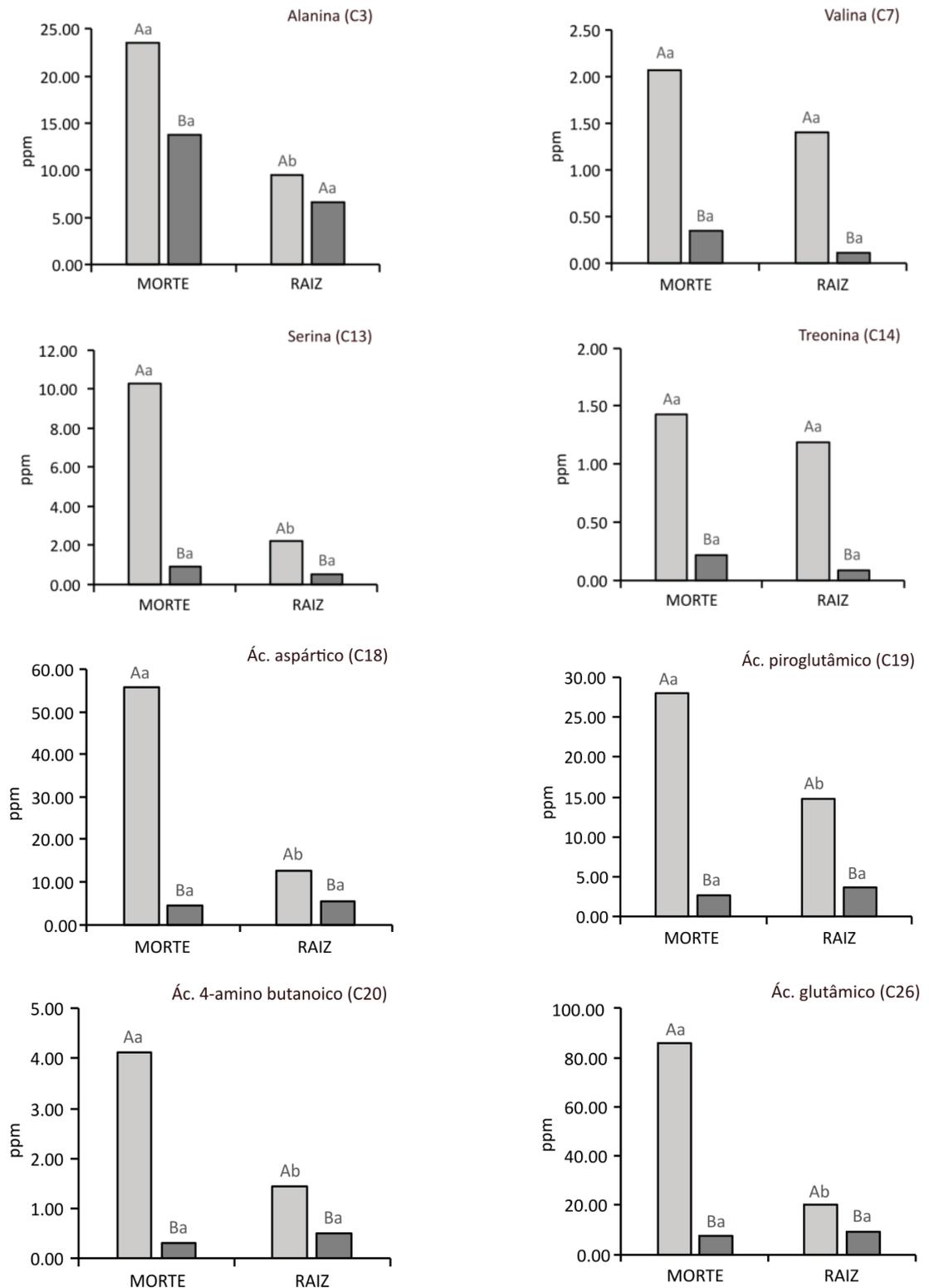
ID	COMPOSTO IDENTIFICADO	VARIÁVEL	F1 (CLONE)	F2 (RESPOSTA)	F1 x F2
<b>Aminoácidos</b>					
C3	Alanina	NP	ns	**	-
C7	Valina	NP	***	ns	-
C13	Serina	NP	***	ns	-
C14	Treonina	NP	***	ns	-
C18	Ác. aspártico	GLM	***	**	***
C19	Ác. piroglutâmico	GLM	***	ns	*
C20	Ác. 4-amino butanoico	GLM	***	*	***
C26	Ác. glutâmico	GLM	***	**	***
C49	Tiramina	GLM	ns	ns	ns
<b>Açúcares</b>					
C12	Ác. glicérico	NP	ns	ns	-
C28	Ribose (1)	NP	ns	ns	-
C29	Arabinose	GLM	ns	ns	ns
C30	Ribose (2)	GLM	*	ns	ns
C31	Arabitol	NP	ns	ns	-
C34	Ác. ribônico	GLM	***	ns	ns
C35	Glucopirranose	NP	***	ns	-
C45	Frutose	GLM	***	ns	ns
C46	Galactose	NP	ns	ns	-
C47	Glucose	GLM	ns	ns	ns
C55	Ác. sacárico	GLM	*	ns	ns
C57	Ác. galactarico	GLM	***	ns	ns
C59	Mioinositol	GLM	ns	***	***
C69	Glucose-6-fosfato	GLM	***	***	***
C73	Sacarose	GLM	***	***	***
C74	Maltose	NP	***	ns	-
C79	Galactinol	GLM	ns	ns	***
C86	6 - kestose	GLM	ns	***	***
<b>Derivados hidroxicinâmicos (cafeoilquínicos)</b>					
C43	Ác. quínico	LM	**	ns	ns
C64	Ác. cafeico (trans)	NP	***	*	-
C80	Ác. 3-Cafeoilquínico (cis)	GLM	**	***	***
C81	Ác. 4-Cafeoilquínico (cis)	GLM	***	**	***
C82	Ác. 5-Cafeoilquínico (cis)	GLM	ns	***	***
C83	Ác. 3-Cafeoilquínico (trans)	GLM	*	*	***
C85	Ác. 5-Cafeoilquínico (trans)	NP	*	***	-

NP = não paramétrico; GLM = modelo linear generalizado; LM = variável com distribuição normal; ns = não significativo.

Níveis de significância: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

FIGURA 14 – HISTOGRAMAS DA CONCENTRAÇÃO DE METABÓLITOS E SUA RELAÇÃO COM OS FATORES “CLONE” E “RESPOSTA” - AMINOÁCIDOS

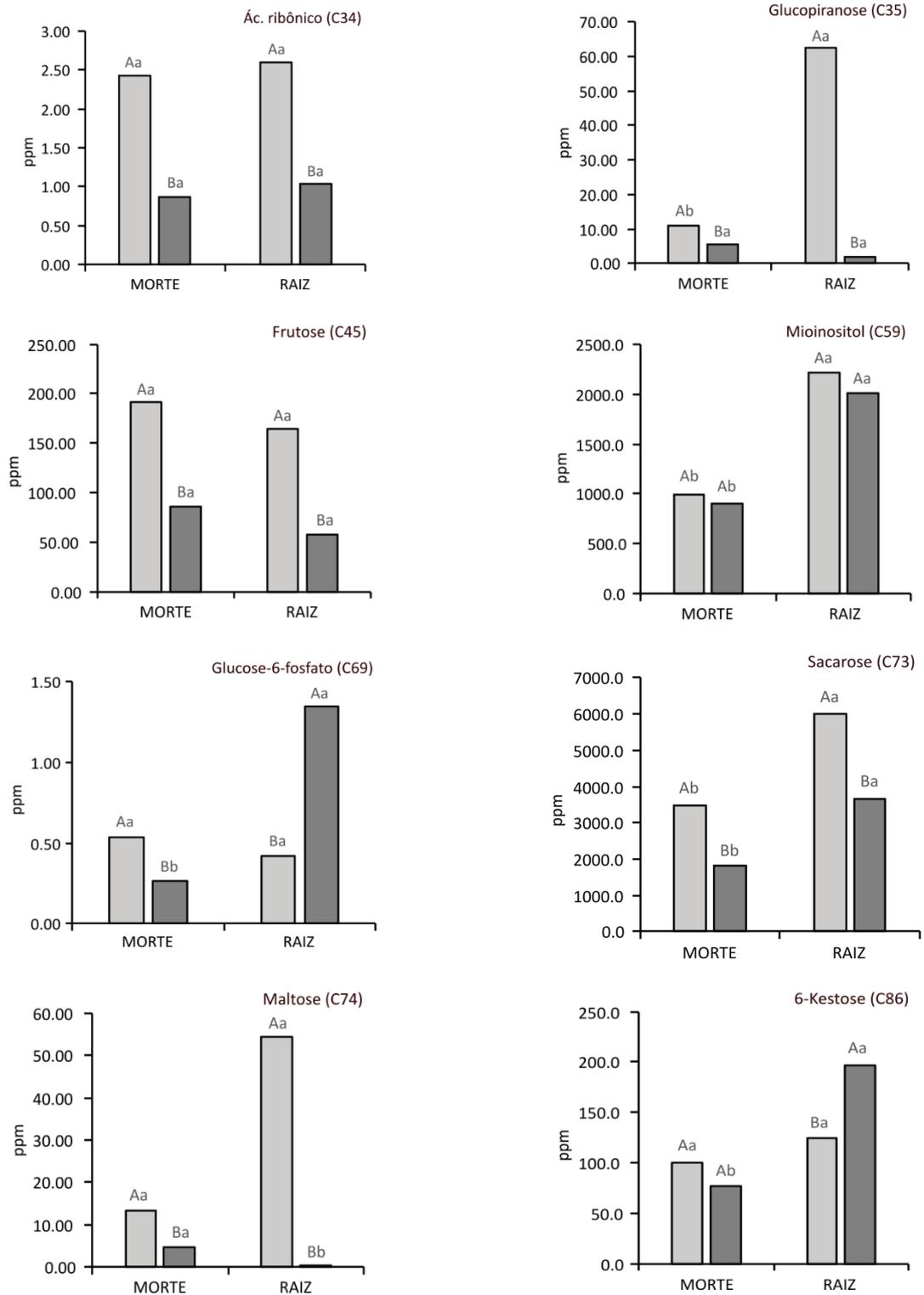
■ EC24 ■ EC50



NOTA: As letras observadas sobre os histogramas referem-se às diferenças estatísticas observadas. Caracteres maiúsculos representam diferenças entre os clones, enquanto caracteres minúsculos representam diferenças entre as respostas.

FIGURA 15 – HISTOGRAMAS DA CONCENTRAÇÃO DE METABÓLITOS E SUA RELAÇÃO COM OS FATORES “CLONE” E “RESPOSTA” - AÇÚCARES

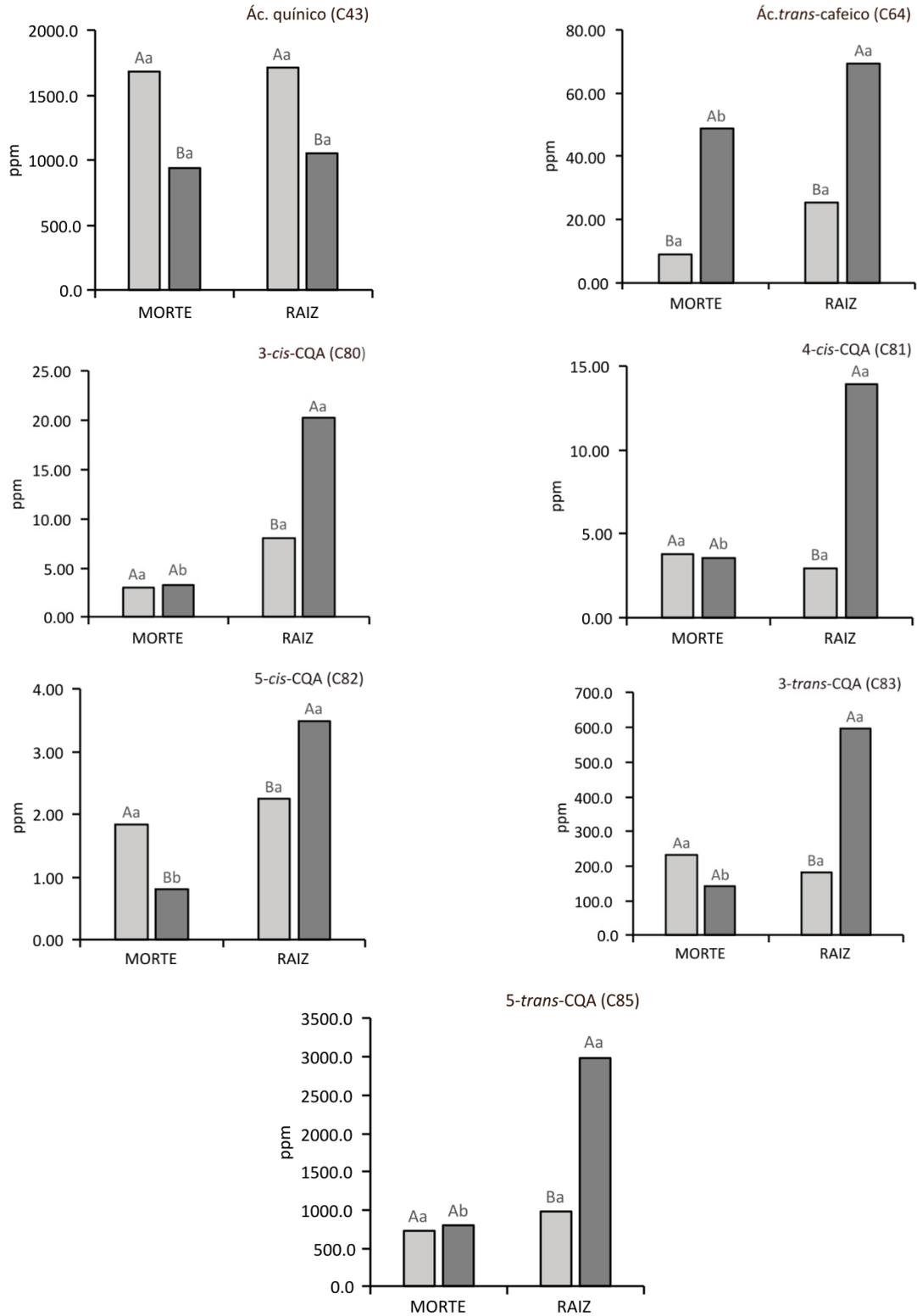
■ EC24 ■ EC50



NOTA: As letras observadas sobre os histogramas referem-se às diferenças estatísticas observadas. Caracteres maiúsculos representam diferenças entre os clones, enquanto caracteres minúsculos representam diferenças entre as respostas.

FIGURA 16 – HISTOGRAMAS DA CONCENTRAÇÃO DE METABÓLITOS E SUA RELAÇÃO COM OS FATORES “CLONE” E “RESPOSTA” – DERIVADOS CAFEILQUÍNICOS

■ EC24 ■ EC50



NOTA: As letras observadas sobre os histogramas referem-se às diferenças estatísticas observadas. Caracteres maiúsculos representam diferenças entre os clones, enquanto caracteres minúsculos representam diferenças entre as respostas.

Conforme observado na TABELA 4, a tiramina (C49) é o único aminoácido que não representou significância para a diferenciação estatística dos clones avaliados ou das respostas de enraizamento/morte. De maneira geral, os demais aminoácidos se destacaram principalmente na diferenciação dos clones, sendo observados em maior concentração no EC24, que apresenta melhor performance de enraizamento. Estes dados, portanto, podem evidenciar a maior eficiência deste clone na fixação e transporte de nitrogênio inorgânico ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) e consequente formação compostos orgânicos nitrogenados como os aminoácidos. Curiosamente, porém, alguns dos aminoácidos avaliados apresentaram concentração estatisticamente mais relevante na resposta de morte do clone EC24 (alanina, serina, ácido aspártico, ácido piroglutâmico, ácido 4-amino butanoico e ácido glutâmico, conforme observado na FIGURA 14). Entende-se que, nesse caso, o acúmulo de aminoácidos nas folhas das miniestacas que não enraizaram poderia indicar um eventual desequilíbrio metabólico destas amostras biológicas, o que pode ter afetado rotas metabólicas importantes como a de formação dos fitohormônios, por exemplo, essencial para o enraizamento das miniestacas.

Para os açúcares identificados (FIGURA 15), as análises univariadas apontaram quatro deles como estatisticamente relevantes para a resposta do processo de miniestaquia: mioinositol (C59) e sacarose (C73), também destacados na PCA, além da glucose-6-fosfato (C69) e da 6-kestose (C86). O mioinositol destacou-se como o açúcar relacionado ao enraizamento das miniestacas (para ambos os clones), enquanto a sacarose foi observada em maior concentração no clone EC24, principalmente nas folhas das miniestacas que enraizaram. Esses resultados, portanto, corroboram aqueles observados na análise multivariada empregando PCA, conforme discutido anteriormente e destacado no QUADRO 9. A glucose-6-fosfato e a 6-kestose, por sua vez, correspondem a açúcares encontrados em maior concentração especialmente nas folhas das miniestacas do clone EC50 que enraizaram, conforme visualizado nos respectivos histogramas presentes na FIGURA 15. A 6-kestose, inclusive, também pode ser observada no gráfico de *loadings* da PCA empregando Pareto (composto C86 visualizado na FIGURA 12), que também correlaciona esse metabólito ao enraizamento do clone EC50. Na FIGURA 15 também é possível verificar que o ácido ribônico, (C34), a glucopiranosose (C35), a frutose (C45) e a maltose (C74) encontram-se em concentrações significativamente maiores no

clone EC24, razão pela qual foram relacionados à diferenciação dos clones nas análises univariadas detalhadas na TABELA 4.

Por fim, ao avaliar os histogramas referentes aos metabólitos secundários característicos das folhas de erva mate (derivados cafeoilquínicos), também selecionados para as análises univariadas, observa-se que alguns deles destacam-se não só pela sua representatividade nos diferentes clones (conforme verificado nas análises multivariadas), mas também por sua relevância em relação à resposta do processo de miniestaquia no respectivo clone. De maneira geral, o ácido quínico (C43) e o ácido trans-cafeico (C64), que originam os diferentes isômeros do ácido clorogênico (CGA), são observados em maior concentração nos clones EC24 e EC50, respectivamente (vide FIGURA 16). O ácido 5-cis-cafeoilquínico (C82) apresentou maior relação com a resposta de enraizamento, enquanto os demais derivados cafeoilquínicos foram observados de forma mais significativa nas amostras das folhas do clone EC50 que também enraizaram, especialmente o ácido 5-trans-cafeoilquínico (C85), que se destacou na PCA pela distinção do clone EC50.

É possível verificar, portanto, que as análises estatísticas univariadas corroboraram as correlações entre metabólitos e variáveis independentes (clone e resposta ao enraizamento) verificadas nas análises multivariadas (PCA). Além do mais, as análises univariadas permitem a visualização adicional de outros compostos que também podem ser associados aos diferentes fatores e que, possivelmente, não se destacaram na PCA devido à menor concentração em relação àqueles observados claramente no gráfico de *loadings*. Sendo assim, considerando os resultados observados em ambas as análises estatísticas (multivariada e univariada), é possível destacar os metabólitos apresentados no QUADRO 10 e suas respectivas relações com os fatores “clone” e “resposta”.

QUADRO 10 – PRINCIPAIS METABÓLITOS VERIFICADOS NAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS E SUA CORRELAÇÃO COM OS FATORES ESTUDADOS

GRUPO	ID	COMPOSTO	CLONE (F1)	RESPOSTA (F2)
Aminoácidos	C3	Alanina	-	Morte
	C7	Valina	EC24	-
	C14	Treonina		
	C13	Serina	EC24	Morte
	C18	Ácido aspártico		
	C19	Ácido piroglutâmico		
	C20	Ácido 4-amino butanoico		
	C26	Ácido glutâmico		
Açúcares	C59	Mioinositol	EC24 e EC50	Enraizamento
	C73	Sacarose	EC24	
	C86	6-kestose	EC50	
	C34	Ácido ribônico	EC24	-
	C35	Glucopirranose		
	C45	Frutose		
	C74	Maltose		
Derivados cafeoilquínicos	C43	Ácido quínico	EC24	-
	C64	Ácido trans-cafeico	EC50	Enraizamento
	C80	Ácido 3-cis-cafeoilquínico		
	C81	Ácido 4-cis-cafeoilquínico		
	C85	Ácido 5-trans-cafeoilquínico		
	C83	Ácido 3-trans-cafeoilquínico		
	C82	Ácido 5-cis-cafeoilquínico	-	

## 6 DISCUSSÃO

A propagação vegetativa por miniestaquia realizada com os clones EC24 e EC50 de erva mate corroborou as características de alta e baixa performance de enraizamento, respectivamente, observadas por Vieira *et al.* (2021) em estudos anteriores. A análise dos compostos presentes nas folhas das miniestacas preparadas, por sua vez, permitiu correlacionar, principalmente, a sacarose e o mioinositol com a efetividade do processo de enraizamento.

Assim como observado por Vieira (2022), a concentração da sacarose nas folhas do clone EC24 foi significativamente maior que a concentração observada no clone EC50. Esta característica, somada à maior concentração de outros açúcares redutores no genótipo EC24, pode ser diretamente relacionada a melhor performance deste clone no enraizamento de suas miniestacas, haja vista a importância destes metabólitos primários como fonte de carbono (energia), necessária para o processo de divisão celular e consequente formação de raízes adventícias (CORRÊA *et al.*, 2005; AHKAMI *et al.*, 2009). Nesse contexto é possível destacar a maior concentração da maltose no genótipo EC24, a qual poderia ser relacionada à metabolização do amido com formação de maltose e glucose, indicando uma possível reserva energética mais pronunciada nesse clone (LU, SHARKEY, 2006); a maior concentração de frutose, por sua vez, poderia ser associada à hidrólise da sacarose (frutose + glucose). Em ambos os casos (metabolização do amido ou da sacarose), níveis maiores de concentração de glucose poderiam ser esperados para as mesmas amostras, o que não foi claramente evidenciado na avaliação individual dos dados ou mesmo nas análises estatísticas. Entende-se, nestes casos, que possivelmente a glucose liberada seja prontamente utilizada pela planta em outros processos metabólicos, razão pela qual não foi observada uma correlação direta entre sua concentração e a resposta de enraizamento ou diferenciação química entre os clones.

No âmbito dos açúcares livres como a glucose cabe destacar, ainda, o papel importante que eles representam na regulação das auxinas como o ácido 3-indol acético (AIA), principal “fitohormônio” derivado do aminoácido triptofano que atua como fator de crescimento, regulando a expansão, divisão e diferenciação celular. Estudos executados por Sairanen e colaboradores (2012), por exemplo, evidenciaram que a biossíntese de AIA é positivamente regulada pelos níveis endógenos e exógenos de glucose, que também aumentam os níveis dos principais precursores do

AIA (antranilato e triptofano) e seu principal catabólito (2-oxindol-3-ácido acético). Nesse contexto, portanto, a maior concentração de sacarose e frutose nas folhas do clone EC24 corroboram a hipótese de maior disponibilidade da glucose endógena nesse clone, prontamente utilizada como fonte de energia nos processos de divisão celular e na modulação do AIA, culminando na sua melhor performance de enraizamento.

Diferentemente do estudo realizado por Vieira (2022), o mioinositol foi identificado nas amostras das folhas como o único metabólito relacionado exclusivamente ao enraizamento das miniestacas. As concentrações desse composto foram significativamente maiores nas folhas das miniestacas que enraizaram, não havendo diferenças significativas de concentração para os diferentes clones estudados, seja na resposta de enraizamento ou na resposta de morte da miniestaca. O mioinositol é o estereoisômero mais abundante de inositol, e participa de funções celulares cruciais como a transdução de sinal, transporte por membranas, tolerância ao estresse e armazenamento de fósforo, sendo um precursor dos fosfatidilinosítois e dos polissacarídeos da parede celular. Além disso, o principal produto de sua quebra é o ácido d-glucurônico, utilizado na síntese de peptídios e compostos não celulósicos da parede celular, bem como na formação do ácido ascórbico, importante antioxidante capaz de regular a produção de radicais livres produzidos na respiração celular (VALLURU, ENDE, 2011).

Assim como outros açúcares, o mioinositol possui um importante papel na regulação do AIA, que apresenta atividade na divisão, alongamento e diferenciação celular quando na sua forma livre (ácido 3-indol acético). A maior parte desta auxina, porém, encontra-se usualmente conjugada com outros metabólitos, como aminoácidos, peptídeos, proteínas, álcoois ou mesmo açúcares, incluindo o mioinositol. O éster indol-3-acetil-mio-inositol funciona como uma forma de armazenamento e transporte de AIA nos tecidos vegetais, sendo seu metabolismo mediado por uma enzima específica bifuncional responsável pela biossíntese e hidrólise desse conjugado (CIARKOWSKA *et al.*, 2023). Portanto, é possível verificar a importância do mioinositol para o crescimento celular e consequente formação das raízes nas miniestacas de erva mate.

Os resultados observados nesse estudo também permitiram identificar alguns compostos fenólicos característicos da erva mate, os derivados cafeoilquínicos, observados de forma mais pronunciada no clone com baixa performance de

enraizamento (EC50). A avaliação generalizada e superficial dos dados obtidos poderia, inicialmente, induzir uma interpretação de que tais compostos teriam um efeito negativo na rizogênese das miniestacas, o que não é verificado, de fato, quando se avalia as respostas da miniestaquia de forma individualizada. Os dados evidenciam uma correlação positiva entre as concentrações dos ácidos hidroxicinâmicos e o enraizamento do clone EC50, indicando um papel direto ou indireto desses metabólitos nesse processo. Diferentes estudos citados por Denaxa *et al.* (2022) indicam, por exemplo, o ácido clorogênico (ácido 3-O-cafeoilquínico) como um cofator importante na formação de raízes adventícias, destacando-se pelo seu papel como um precursor de lignina, suberina e outros compostos protetores, ou mesmo pela sua interação positiva com a regulação de auxinas endógenas, também inibindo enzimas promotoras de oxidação do AIA.

Importante resultado observado neste estudo em relação à performance de enraizamento, é a indicação de que a correlação com a composição de metabólitos das folhas deve ser conduzida por indivíduo (miniestaca preparada), visto ser fundamental o conhecimento da resposta efetiva na sua condição exata de propagação. No caso, a análise de metabólitos na porção restante das respectivas folhas permite correlacionar diretamente os resultados à cada miniestaca efetivamente propagada e não apenas a uma amostragem realizada a partir de clones, uma vez que o efeito clone e condição foliar da miniestaca influenciam no enraizamento.

## 7 CONCLUSÃO

A análise de metabólitos polares via GC-MS se mostrou uma ferramenta promissora em estudos de enraizamento, provendo com base nos metabólitos identificados a separação entre clones e resposta frente ao enraizamento ou esclerificação da miniestaca. Assim como o clone, a condição foliar é um aspecto importante para a o enraizamento.

A maior concentração de sacarose e, principalmente, de mioinositol no tecido foliar é uma condição essencial para a formação de raiz na miniestaca. Os ácidos clorogênicos, por sua vez, são importantes na separação do efeito clone, mas sua maior concentração no tecido foliar não é um indicativo da não formação de raiz, pelo contrário, esses compostos possuem um papel positivo na formação de raízes do clone de baixa performance.

Por fim, conclui-se que a individualização da miniestaca e o conhecimento de sua resposta (enraizamento ou esclerificação) é importante para estudos que avaliam o seu enraizamento. Essa forma de avaliação se mostrou essencial para a interpretação dos resultados.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES FUTURAS

De maneira geral, o presente estudo evidenciou a importância da avaliação direta dos metabólitos presentes nas folhas das respectivas miniestacas produzidas, permitindo estabelecer uma correlação mais precisa entre a condição foliar e as respostas de enraizamento ou morte no processo de propagação vegetativa por miniestaquia.

Os resultados indicam que estudos complementares podem ser conduzidos para verificar, por exemplo, se a suplementação dos meios nutricionais com açúcares, ou mesmo com ácidos hidroxicinâmicos como o ácido clorogênico, a exemplo de estudos citados Sairanen *et al.* (2012) e por Denaxa *et al.* (2022), respectivamente, poderiam promover melhor performance de enraizamento para clones como o EC50, que não apresentam boa produtividade nesse processo. Tais estudos poderiam verificar, adicionalmente, a correlação entre a suplementação empregada e os níveis de AIA nas miniestacas formadas, haja visto relatos apresentados em estudos já conduzidos para outras espécies vegetais (FAIVRE-RAMPANT *et al.*, 2002; DENAXA *et al.*, 2021). O acompanhamento destes metabólitos, por sua vez, poderia ser realizado por meio de técnicas analíticas mais específicas e exatas para a sua determinação.

O aprimoramento da técnica de miniestaquia, portanto, especialmente aplicado a clones de baixa performance de enraizamento, segue sendo um importante objeto de estudo, visando o aumento da produtividade de genótipos que podem ter características químicas e nutricionais interessantes para as indústrias, incluindo as farmacêuticas.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. R. de *et al.* Environmental control of adventitious rooting in *Eucalyptus* and *Populus* cuttings. **Trees** v. 31, p. 1377–1390, 2017. DOI. 10.1007/s00468-017-1550-6.
- ANDRÉ, C. M. *et al.* Gene expression changes related to the production of phenolic compounds in potato tubers grown under drought stress. **Phytochemistry**, v. 70, n. 9, p. 1107–16, 2009. DOI. 10.1016/j.phytochem.2009.07.008.
- AHKAMI, A. H. *et al.* Molecular physiology of adventitious root formation in *Petunia hybrida* cuttings: involvement of wound response and primary metabolism. **New Phytologist**, v. 181, n. 3, p. 613-625, 2009. DOI. 10.1111/j.1469-8137.2008.02704.x.
- ARÇARI, D. P. *et al.* Antiobesity effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet–induced obese mice. **Obesity (Silver Spring)**, v. 17, p. 2127-2133, 2009. DOI. 10.1038/oby.2009.158.
- ARÇARI, D. P. *et al.* Anti-inflammatory effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 335, p. 110-115, 2011. DOI. 10.1016/j.mce.2011.01.003.
- ARÇARI, D. P. *et al.* The *in vitro* and *in vivo* effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on adipogenesis. **Food Chemistry**, v. 141, p. 809-815, 2013a. DOI. 10.1016/j.foodchem.2013.04.062.
- ARÇARI, D. P. *et al.* Modulatory effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on the PI3K-AKT signaling pathway. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 57, p. 1882-1885, 2013b. DOI. 10.1002/mnfr.201200834.
- 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. 10.1016/j.phytochem.2007.10.029.
- ALBAS, C. S. *et al.* Avaliação da genotoxicidade da *Ilex paraguariensis* (erva mate) pelo teste do micronúcleo. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, v. 16, 2014. DOI. 10.1590/1983-084X/12\_058.
- ALFENAS, A. C. *et al.* **Clonagem e doenças do Eucalipto**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009.
- ANDRADE, F. de *et al.* Safety assessment of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) dried extract: results of acute and 90 days subchronic toxicity studies in rats and rabbits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 328–334, 2012. DOI. 10.1016/j.fct.2011.08.028.
- AUSTEL, N. *et al.* Influence of fumigants on sunflower seeds: characteristics of fumigant desorption and changes in volatile profiles. **Journal of Hazardous Materials**, v. 337, p. 138–147, 2017. DOI. 10.1016/j.jhazmat.2017.04.070.

BALLABIO, D; CONSONNI, V. Classification tools in chemistry. Part 1: linear models. PLS-DA. **Analytical Methods**, 2013. DOI. 10.1039/C3AY40582F.

BOAVENTURA, B. C. B. *et al.* Antioxidant potential of mate tea (*Ilex paraguariensis*) in type 2 diabetic mellitus and pre-diabetic individuals. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1057–1064, 2013. DOI. 10.1016/j.jff.2013.03.001.

BOAVENTURA, B. C. B. *et al.* Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) infusion obtained by freeze concentration technology on antioxidant status of healthy individuals. **LWT-Food Science and Technology**, v. 62, n. 2, p. 948-954, 2015. DOI. 10.1016/j.lwt.2015.02.028.

BOCCARD, J.; VEUTHEY, J.; RUDAZ, S. Knowledge discovery in metabolomics: an overview of MS data handling. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 3, p. 290-304, 2010. DOI. 10.1002/jssc.200900609.

BORTOLI, P. M. *et al.* *Ilex paraguariensis*: Potential antioxidant on aluminium toxicity, in na experimental model of Alzheimer's disease. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 181, p. 104-110, 2018. DOI. 10.1016/j.jinorgbio.2017.11.001.

BRANCO, C. dos S. *et al.* Anticonvulsant, neuroprotective and behavioral effects of organic and conventional yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) on pentylenetetrazol-induced seizures in Wistar rats. **Brain Research Bulletin**, v. 92, p. 60–68, 2013. DOI. 10.1016/j.brainresbull.2012.11.008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da diretoria colegiada RDC nº 26, de 13 de maio 2014**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Brasília: Diário Oficial da União, 2014.

BRAVO, L. *et al.* Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in high-cholesterol fed rats. **Fitoterapia**, v. 92, p. 219-229, 2014. DOI. 10.1016/j.fitote.2013.11.007.

BRITO, V. G. B. *et al.* Soluble yerba mate (*Ilex Paraguariensis*) extract enhances *in vitro* osteoblastic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 244, 2019. DOI: 10.1016/j.jep.2019.112131.

BURRIS, K. B. *et al.* Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) aqueous extracts against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Science**, v. 76, 2011. DOI. 10.1111/j.1750-3841.2011.02255.x.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Vol. 2. Brasília: Embrapa Informações Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2006. 627p.

CARDOZO JUNIOR, E. L.; MORAND, 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. 10.1016/j.jff.2015.12.010.

CHANDRA S.; GONZALEZ, E. de M. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3583–3590, 2004. DOI. 10.1021/jf0352632.

CIARKOWSKA, A. *et al.* Auxin homeostasis in maize (*Zea mays*) is regulated via 1-O-indole-3-acetyl-myoinositol synthesis at early stages of seedling development and under abiotic stress. **Planta**, 2023. DOI. 10.1007/s00425-022-04058-z.

CONFORTI, A. S.; GALLO, M. E.; SARAVÍ, F. D. Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) consumption is associated with higher bone mineral density in postmenopausal women. **Bone**, v. 50, p. 9-13, 2012. DOI. 10.1016/j.bone.2011.08.029.

CORRÊA, L. da R. *et al.* Carbohydrates as regulatory factors on the rooting of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant Growth Regulation**, v. 45, p. 63-73, 2005. DOI. 10.1007/s10725-004-6125-z.

DENAXA, N. *et al.* Chlorogenic Acid: a possible cofactor in the rooting of 'Kalamata' olive cultivar. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 40, p. 2017-2027, 2021. DOI. 10.1007/s00344-020-10249-3.

DENAXA, N. *et al.* Role phenolic compounds in adventitious root formation. *In*: HUNSEN, A. **Environmental, Physiological and Chemical Controls of Adventitious Rooting in Cuttings**, 1 ed., p. 262-264, 2022.

DIAS, J. P. T.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. IBA e carboidratos no enraizamento de brotações procedentes de estacas radiciais de *Rubus spp.* **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 666–671, 2011. DOI. 10.1590/S0100-29452011000500093.

DIAS, P. C. *et al.* Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Brazilian Journal of Forestry Research**, 2012. DOI. 10.4336/2012.pfb.32.72.453.

DUARTE, M. M. *et al.* Adubação nitrogenada na miniestaquia de erva mate. **Advances in Forestry Science**, v. 7, n. 2, p. 981-988, 2020. DOI. 10.34062/afs.v7i2.9716.

EL-SAWALHI, S. *et al.* The antibacterial activity of Libanstin from *Ilex paraguariensis* (Yerba Mate). **Fitoterapia**, v. 153, 2021. DOI. 10.1016/j.fitote.2021.104962.

ENGEL, B; SURALIK, P.; MARCHETTI-DESCHMANN, M. Critical considerations for trimethylsilyl derivatives of 24 primary metabolites measured by gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Separation Science Plus**, v. 3, n. 9, p. 407-418, 2020. DOI. 10.1002/sscp.202000025.

FAIVRE-RAMPANT, O. *et al.* Cuttings of the non-rooting rac tobacco mutant overaccumulate phenolic compounds. **Functional Plant Biology**, v. 29, p. 63-71, 2002. DOI. 10.1071/PP01016.

FAYAD, E. *et al.* Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) a potential food antibacterial agent and combination assays with different classes of antibiotics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 125, 2020. DOI. 10.1016/j.lwt.2020.109267.

FERNANDES, J. S. C. *et al.* Estimativas de parâmetros relacionados ao melhoramento genético da erva mate: possibilidade de seleção precoce. **Scientia Agraria**, Curitiba, 2000. DOI. 10.5380/rsa.v1i1.967.

FERNANDES, E. S. *et al.* Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) enhances the gene modulation and activity of paraoxonase-2: *In vitro* and *in vivo* studies. **Nutrition**, v. 28, p. 1157-1164, 2012. DOI. 10.1016/j.nut.2012.04.011.

FERRARI, M. P.; GROSSI, F.; WENDLING, I. **Documentos 94 – Propagação vegetativa de espécies florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2004.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria - conceitos, métodos e aplicações**. 1. ed. Campinas: Editora Unicamp, 2015.

FERRIANI, A.P.; ZUFFELLATO-RIBAS, K.C.; WENDLING, I. Miniestaquia aplicada a espécies florestais. **Revista Agro@ambiente on-line**, v. 4, n. 2, p.102-109, 2010.

FIEDLER, N. C.; SOARES, T. S.; SILVA, G. F. Produtos Florestais Não Madeireiros: Importância e Manejo Sustentável da Floresta. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v.10, n. 2, 2008.

FIEHN, O. *et al.* Identification of uncommon plant metabolites based on calculation of elemental compositions using gas chromatography and quadrupole mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 15, p. 3573-3580, 2000. DOI. 10.1021/ac991142i.

FIEHN, O. *et al.* Metabolite profiling for plant functional genomics. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, p.1157-1161, 2000. DOI. 10.1038/81137.

FIEHN, O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v 48, p. 155-171, 2002. DOI. 10.1023/A:1013713905833.

FILIP, R. *et al.* Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, n. 7, 2001. DOI. 10.1016/s0367-326x(01)00331-8.

FILIP, R. *et al.* Effect of *Ilex* extracts and isolated compounds on peroxidase secretion of rat submandibular glands. **Food and chemical toxicology**, v. 45, n. 4, p. 649-655, 2007. DOI. 10.1016/j.fct.2006.10.014.

FINI, A. *et al.* Drought stress has contrasting effects on antioxidant enzymes activity and phenylpropanoid biosynthesis in *Fraxinus ornus* leaves: an excess light stress affair? **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n. 10, p. 929–939, 2012. DOI. 10.1016/j.jplph.2012.02.014.

FOWLER J. A. P.; STURION, J. A. Aspectos da formação do fruto e da semente na germinação da erva mate. **Comunicado técnico Embrapa Florestas**. Nº 45, p. 1-5, 2000.

GAO, H. *et al.* Effects of Yerba Mate tea (*Ilex paraguariensis*) on vascular endothelial function and liver lipoprotein receptor gene expression in hyperlipidemic rats. **Fitoterapia**, v. 84, p. 264-272, 2013. DOI. 10.1016/j.fitote.2012.12.024.

GATTO, E. M. *et al.* Inverse association between yerba mate consumption and idiopathic Parkinson's disease. A case–control study. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 356, p. 163-167, 2015. DOI. 10.1016/j.jns.2015.06.043.

GERBER, T. *et al.* Yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) for new therapeutic and nutraceutical interventions: A review of patents issued in the last 20 years (2000–2020). **Phytotherapy Research**, v. 37, p. 527-548, 2023. DOI. 10.1002/ptr.7632.

GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. The botanical extracts of *Achyrocline satureoides* and *Ilex paraguariensis* prevent methylglyoxal-induced inhibition of plasminogen and antithrombin III. **Life Sciences**, v. 72, n. 3, p. 279–292, 2002. DOI. 10.1016/s0024-3205(02)02242-7.

HALKET, J. M.; ZAIKIN, V. G. Derivatization in mass spectrometry – 1. Silylation. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 9, p. 1-21, 2003. DOI. 10.1255/ejms.527.

HALKET, J. M. *et al.* Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 410, 2004. DOI. 10.1093/jxb/eri069.

HECK, C. I.; MEJIA, E. G. de. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 138-151, 2007. DOI. 10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x.

HECK, C. I.; SCHMALKO, M.; MEJIA, E. G. de. Effect of growing and drying conditions on the phenolic composition of mate teas (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 18, p. 8394-8403, 2008. DOI. 10.1021/jf801748s.

HUMMEL, J. *et al.* Decision tree supported substructure prediction of metabolites from GC-MS profiles. **Metabolomics**, v. 6, n. 2, p. 322-333, 2010. DOI. 10.1007/s11306-010-0198-7.

IBGE. **Produção Agrícola – Lavoura Permanente**. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pr/pesquisa/15/11941?localidade1=43&localidade2=33>. Acesso em 03 maio 2023.

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2 ed. **The "Gold Book"**, 1997. Disponível em: <https://goldbook.iupac.org/terms/view/CT06948>. Acesso em: 12 mar. 2023.

KIM, S. *et al.* Anti-obesity effects of Yerba Mate (*Ilex Paraguariensis*): a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, 2015. DOI. 10.1186/s12906-015-0859-1.

KUNGEL, P. T. A. N. *et al.* Antioxidant and antimicrobial activities of a purified polysaccharide from yerba mate (*Ilex paraguariensis*). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 1161-1167, 2018. DOI. Disponível em: 10.1016/j.ijbiomac.2018.04.020.

LAMICHHANE, S. *et al.* Chapter Fourteen - An overview of metabolomics data analysis: current tools and future perspectives. **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 82, p. 387-413, 2018. DOI. 10.1016/bs.coac.2018.07.001.

LIMA, N. da S. *Ilex paraguariensis* (yerba mate) improves endocrine and metabolic disorders in obese rats primed by early weaning. **European Journal of Nutrition**, v. 53, p. 73-82, 2014. DOI. Disponível em: 10.1007/s00394-013-0500-3.

LU, Y; SHARKEY, T. D. The importance of maltose in transitory starch breakdown. **Plant, Cell and Environment**, v. 29, p. 353-366, 2006. DOI. 10.1111/j.1365-3040.2005.01480.x.

LÜCKEMEYER, D. D. *et al.* Effects of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (Yerba Mate) on Herpes simplex virus types 1 and 2 replication. **Phytotherapy Research**, v. 26, p. 535-540, 2012. DOI. 10.1002/ptr.3590.

LUÍS, A. F. S.; DOMINGUES, F. DA C.; AMARAL, L. M. J. P. The anti-obesity potential of *Ilex paraguariensis*: results from a meta-analysis. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 55, 2019. DOI. Disponível em: 10.1590/s2175-97902019000217615.

LUNZHAO, Y. *et al.* MeOx-TMS derivatization for GC-MS metabolic profiling of urine and application in the discrimination between normal C57BL/6J and type 2 diabetic KK-Ay mice. **Analytical Methods**, n. 12, 2014. Disponível em: 10.1039/C3AY41522H.

MEJIA, E. G. de *et al.* Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and *in vitro* inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 1, p. 23–34, 2010. DOI. 10.1016/j.jff.2009.12.003.

MELO, T. O. de. **Metabólitos como ferramenta de seleção de erva mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hill) para fins industriais**. 2018. 204 f. Tese (Doutorado em Química) – Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/70204>. Acesso em: 06 jan. 2022.

MELO, T. O. de *et al.* Univariate statistical analysis of gas chromatography – mass spectrometry fingerprints analyses. **Chemical Data Collections**, v. 33, 2021. DOI. 10.1016/j.cdc.2021.100719.

MORAIS, E. C. de *et al.* Consumption of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional

LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 8316-8324, 2009. DOI. 10.1021/jf901660g.

NETO, B. de B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1401-1406, 2006. DOI. 10.1590/S0100-40422006000600042.

NOUREDDINE, T. *et al.* Antibacterial activity of *Ilex paraguariensis* (Yerba Mate) against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 12, p. 712-719, 2018. DOI. 10.3855/jidc.10380.

OLIVEIRA, D. M. *et al.* Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) aqueous extract decreases intestinal SGLT1 gene expression but does not affect other biochemical parameters in alloxan-diabetic Wistar rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 10527-10532, 2008. DOI. 10.1021/jf8021404.

OLIVEIRA, E. de *et al.* Treatment with *Ilex paraguariensis* (yerba mate) aqueous solution prevents hepatic redox imbalance, elevated triglycerides, and microsteatosis in overweight adult rats that were precociously weaned. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, 2018. DOI. 10.1590/1414-431X20187342.

PILON, A. C. Metabolômica de plantas: métodos e desafios. **Química Nova**, v. 43, n. 3, p. 329-354, 2020. DOI. 10.21577/0100-4042.20170499.

PMENDEL, G. D. *et al.* Yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) attenuates both central and peripheral inflammatory effects of diet-induced obesity in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, p. 809–818, 2013. DOI. 10.1016/j.jnutbio.2012.04.016.

PUANGPRAPHANT, S.; MEJIA, E. G. de. Saponins in Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) and quercetin synergistically inhibit iNOS and COX-2 in lipopolysaccharide-induced macrophages through NFκB pathways. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 8873-8883, 2009. DOI. 10.1021/jf902255h.

PUANGPRAPHANT, S.; BERHOW, M. A.; MEJIA, E. G. de. Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) saponins induce caspase-3-dependent apoptosis in human colon cancer cells *in vitro*. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1171-1178, 2011. DOI. 10.1016/j.foodchem.2010.10.023.

RESENDE, D. V. M. *et al.* Programa de melhoramento da erva mate coordenado pela Embrapa: resultados da avaliação genética de populações, progênies, indivíduos e clones. **Circular Técnica 43**. Colombo: Embrapa Florestas, 60 p., 2000.

SUGIMOTO, M. *et al.* Bioinformatics tools for mass spectroscopy-based metabolomic data processing and analysis. **Current Bioinformatics**, v. 7, p. 96-108, 2012. DOI. 10.2174/157489312799304431.

R Core Team. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 10 abr. 2023.

RESENDE, P. E. de *et al.* The activity of mate saponins (*Ilex paraguariensis*) in intra-abdominal and epididymal fat, and glucose oxidation in male Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, p. 735-740, 2012. DOI. 10.1016/j.jep.2012.10.023.

ROESSNER, U. *et al.* Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. **The Plant Journal**, v. 23, p. 131-142, 2000. DOI. 10.1046/j.1365-313x.2000.00774.x.

ROGGO, Y. *et al.* A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical Technologies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 683–700, 2007. DOI. 10.1016/j.jpba.2007.03.023.

RUIZ-MATUTE, A. I. *et al.* Derivatization of carbohydrates for GC and GC–MS analyses. **Journal of Chromatography B**, p. 1226-1240, 2011. DOI. 10.1016/j.jchromb.2010.11.013.

SÁ, F. P. de. ***Ilex paraguariensis* A.St.-Hil: Miniestaquia, caracterização anatômica e bioquímica e, estimativa do enraizamento por espectroscopia NIR**. 2018. 143 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/69732>. Acesso em: 06 jan. 2022.

SÁ, F. P. de *et al.* Miniestaquia de erva-mate em quatro épocas do ano. **Ciência Florestal**, v. 28, n. 4, p. 1431-1442, 2018. DOI. 10.5902/1980509835051.

SALEH, A. J. *et al.* Anti-proliferative activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) aqueous extracts on human colorectal cancer cell lines. **Functional Foods in Health and Disease**, v. 11, n. 10, 2021. DOI. 10.31989/ffhd.v11i10.828.

SAIRANEN, I. *et al.* Soluble carbohydrates regulate auxin biosynthesis via PIF proteins in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 24, p. 4907–4916, 2012. DOI. 10.1105/tpc.112.104794.

SCHAUER, N. *et al.* GC–MS Libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. **Ferbs Letters**, v. 579, p.1332-1337, 2005. DOI. 10.1016/j.febslet.2005.01.029.

SCHAUER, N.; FERNIE, R. A. Plant metabolomics: towards biological function and mechanism. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 10, p. 508-516, 2006. DOI. 10.1016/j.tplants.2006.08.007.

SCHUBERT, A. *et al.* 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. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1233–1236, 2006. DOI. 10.1590/S0100-40422006000600016.

SILVA, E. L. da *et al.* Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. **Food Research International**, v. 41, p. 973-979, 2008. DOI. 10.1016/j.foodres.2008.08.004.

SILVA, R. D. *et al.* The effect of aqueous extract of gross and commercial yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on intra-abdominal and epididymal fat and glucose levels in male Wistar rats. **Fitoterapia**, v. 82, p. 818-826, 2011. DOI. 10.1016/j.fitote.2011.04.011.

SOARES, F. L. F. **Espectroscopia RAMAN amplificada por superfície associada à cromatografia em camada delgada para análise de amostras alimentícias**. 2018. 183 f. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração de Química Analítica) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/10272>. Acesso em: 18 mar. 2023.

STEIN, S. E. An integrated method for spectrum extraction and compound identification from gas chromatography/mass spectrometry data. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 10, p. 770-781, 1999. DOI. 10.1016/S1044-0305(99)00047-1.

SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: large scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, p. 817-836, 2003. DOI. 10.1016/s0031-9422(02)00708-2.

TAMURA, A. *et al.* Yerba-mate (*Ilex paraguariensis*) extract prevents ethanol-induced liver injury in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1714–1723, 2013. DOI. 10.1016/j.jff.2013.07.017.

TATE, P. S. *et al.* *Ilex paraguariensis* extracts prevent oxidative damage in a mouse model of age-related macular degeneration. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 66, 2022. DOI. 10.1002/mnfr.202100807.

TRYGG, J.; HOLMES, E.; LUNDSTEDT, T. Chemometrics in Metabonomics. **Journal of Proteome Research** v. 6, p. 469-479, 2007. DOI. 10.1021/pr060594q.

VALDUGA, A. T. *et al.* Chemistry, pharmacology and new trends in traditional functional and medicinal beverages. **Food Research International**, v. 120, p. 478-503, 2019. DOI. 10.1016/j.foodres.2018.10.091.

VAN DEN BERG, R. A. *et al.* Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. **BMC Genomics**, 2006. DOI. 10.1186/1471-2164-7-142.

VIEIRA, L. M. *et al.* Vegetative propagation, chemical composition and antioxidant activity of yerba mate genotypes. **Plant Genetic Resources**, v. 19, n. 2, p. 112-121, 2021. DOI. 10.1017/S1479262121000150.

VIEIRA, L. M. ***Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.: miniestaquia, caracterização química e produtiva de diferentes genótipos em sistema semi-hidropônico**. 2022. 141 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-

Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2022. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/77462>. Acesso em: 06 jan. 2022

VILLAS-BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. Análise do metaboloma: uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Ano IX. n. 36, p. 58-69, 2006.

VINAIXA, M. *et al.* A Guideline to univariate statistical analysis for LC/MS-Based untargeted metabolomics-derived data. **Metabolites**, v. 2, p. 775-795, 2012. DOI. 10.3390/metabo2040775.

VOGT, T. Phenylpropanoid biosynthesis. **Molecular Plant**, v. 3, n. 1, p. 2-20, 2010. DOI. 10.1093/mp/ssp106.

WENDLING, I. **Documentos 91 – Propagação vegetativa de Erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire): Estado da Arte e Tendências Futuras**. Colombo: Embrapa Florestas, 2004.

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, p. 289–292, 2007. DOI. 10.1590/S0100-204X2007000200019.

WENDLING, I.; SANTIN, D. **Propagação e nutrição de erva mate**. 1 Ed. Brasília: EMBRAPA, 2015. 195 p.

WENDLING, I. *et al.* **Manual de produção de mudas clonais de erva mate**. Colombo: Embrapa Florestas, 2020. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/item/221>. Acesso em: 14 dez. 2021.

YU, S. *et al.* Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves microcirculation of volunteers with high blood viscosity: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Experimental Gerontology**, v. 62, p. 14-22, 2015. DOI. 10.1016/j.exger.2014.12.016.

ZAPATA, F. J. *et al.* Caffeine, but not other phytochemicals, in mate tea (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) attenuates high-fat-high-sucrose-diet-driven lipogenesis and body fat accumulation. **Journal of Functional Foods**, v. 64, 2020. DOI. 10.1016/j.jff.2019.103646.