

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

Bruna Krieger Vargas

**Ação antioxidante *in vivo* de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*)
livre e microencapsulados**

Passo Fundo

2019

Bruna Krieger Vargas

Biomédica

**Ação antioxidante *in vivo* de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*)
livre e microencapsulados**

Dissertação de Mestrado apresentada para
obtenção do título de Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos
Orientador: Prof^ª. Dr^ª Telma Elita Bertolin
Linha de pesquisa: Qualidade e Propriedades
Funcionais de Alimentos

Passo Fundo

2019

CIP – Catalogação na Publicação

V297a Vargas, Bruna Krieger
Ação antioxidante in vivo de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) livre e microencapsulados / Bruna Krieger Vargas. – 2019.
116 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Profª. Dra. Telma Elita Bertolin.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, 2019.

1. Erva-mate. 2. Antioxidantes. 3. Radicais livres. I. Bertolin, Telma Elita, orientadora. II. Título.

CDU: 664

Catalogação: Bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues - CRB 10/1569

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

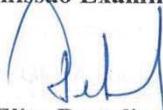
A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

Ação antioxidante *in vivo* de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) livre e microencapsulados

Elaborada por
Bruna Krieger Vargas

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Comissão Examinadora



Telma Elita Bertolin, Dra., UPF
(Orientadora/Presidente)



Rômulo Pillon Barcelos, Dr., UPF



Cíntia Guarienti, Dra., IFAAR

Passo Fundo, RS, Brasil
2019

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela oportunidade de vivenciar tantas experiências, como o mestrado que me ensinou sobre resiliência, força e amor.

Gostaria de expressar minha gratidão eterna a minha família, principalmente minha mãe Eliane e meu irmão Felipe, que sempre estiveram presentes com seu incondicional afeto. Eu amo muito vocês!

Muito obrigada a todos os colegas do Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos, em especial, a Lára, Elionio, Jana, Marina, Larissa, Alan, Fran e Naiara, que hoje são muito mais que amigos, *friends* né. A convivência com vocês alegrava meus dias (e algumas noites) e tornava todos os reveses (o famoso 7x1 diário) mais fáceis de superar. Com certeza, a melhor parte de tudo isso, ao final, foram as pessoas ao meu redor que prestaram seu apoio durante todos os desafios e momentos de dúvida.

Gratidão as minhas mentoras, Cíntia Gris, Cíntia Guarienti e Ana Cláudia Margarites. Pessoas maravilhosas e detentoras de muito conhecimento que guiaram meus passos. Sem vocês esta dissertação não seria possível.

Obrigada a todos os meus queridos ICs, Júlia, Letícia, Kátia, Cris e Samuel. Vocês foram fundamentais para a realização da nossa pesquisa. Espero que vocês tenham aprendido comigo sobre pesquisa, assim como eu aprendi com vocês sobre parceria e leveza. Desejo muito sucesso na caminhada de vocês, meus queridos amigos.

Gratidão a minha orientadora Telma Elita Bertolin por absolutamente tudo. Por me escolher como orientada, por possibilitar o desenvolvimento do nosso trabalho, e principalmente, pela confiança depositada em mim. Você foi a professora mais humana e amorosa que tive a sorte de conhecer e reconhecer, porque como nada é por acaso, sinto que nos identificamos muito. Espero conseguir continuar com essa união, na pesquisa e na amizade.

Muito obrigada por todas as colegas e amigas da nossa turma do PPGCTA 2017, vocês foram (e sempre vão ser) uma rede de suporte e alegria fundamental neste processo.

Obrigada a todos os professores do PPGCTA e da UPF que auxiliaram no andamento desta pesquisa, Prof^ª. Charise da Farmácia, Prof^ª. Ana Giacomini e Prof. Rômulo do ICB e Prof^ª. Luciane Daroit do ICEG.

Muito obrigada ao Prof. Nelson Bracesco e a Veronica Sosa por toda ajuda, paciência e acolhimento durante o período de experimentos que realizei em seu Laboratório no Uruguai.

Agradeço a todos os funcionários da UPF, principalmente a Clarisse e ao João dos laboratórios do CEPA, Adri e Daiane do Parque Científico e Tecnológico, e a Fran, Cleo e Henrique do Biotério, por toda ajuda e prontidão na realização dos experimentos. Obrigada em especial a Dani e Pati, da secretaria da pós-graduação, sempre presentes e auxiliando em todos os momentos

Muito obrigada a Ariana e o Clóvis, da empresa Inovamate, sempre dispostos a fornecer erva-mate possibilitando elaboração deste trabalho.

E, por fim, obrigada a CAPES pela oportunidade de promover este estudo.

“Se a única oração que disser em toda a sua vida for muito obrigado será o bastante”

Mestre Eckart Tolle

RESUMO

A *Ilex paraguariensis* é uma planta amplamente distribuída no sul do Brasil, com seu consumo difundido por meio do chimarrão. A erva-mate possui diversas substâncias bioativas, como saponinas, metilxantinas e compostos fenólicos, este último mais conhecido por sua ação antioxidante. A inclusão destes componentes na dieta podem contribuir na promoção da saúde dos indivíduos. No entanto, estes biocompostos são sensíveis e podem ser degradados pelo O₂, luz, pH e temperatura. Com isso, a microencapsulação está sendo empregada com o objetivo de preservar estas substâncias, garantindo que estejam íntegras até atingir seu sítio alvo no organismo. Objetivamos averiguar a modulação da atividade antioxidante *in vivo* de extratos de erva-mate microencapsulados em comparação a extratos livres. Para tal, extratos aquosos de erva-mate em diferentes concentrações (5%, 10%, 15% e 20%) foram caracterizados e testados em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. O extrato escolhido foi o de 15% com atividade antioxidante de $4,39 \pm 0,07$ mmol de Trolox/L, assim como manteve a sobrevivência celular ($135,63 \pm 11,39$ UFC/mL) das leveduras submetidas ao modelo estressor, radiação. O extrato de erva-mate 15% foi liofilizado, apresentando em sua composição majoritária ácido clorogênico. Na sequência, este extrato foi microencapsulado por gelificação iônica e as microcápsulas foram avaliadas quanto a tamanho de partícula, solubilidade, eficiência de encapsulação, análise morfológica e dos grupamentos funcionais, e submetidas a um estudo *in vivo*, em que 32 ratos foram divididos em 4 grupos: Controle, Extrato livre, Extrato Microencapsulado e Microcápsula Vazia. No período de 30 dias os animais receberam via gavagem seus respectivos tratamentos e ao final avaliamos as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, atividade antioxidante e peroxidação lipídica. A microencapsulação foi capaz de gerar partículas com diâmetro médio de 91,42 μ m, solubilidade média de 21,2% e eficiência de encapsulação de 64,73%. Apesar da microscopia de varredura eletrônica demonstrar um formato irregular das microcápsulas, a espectroscopia evidenciou que a gelificação iônica conseguiu microencapsular e proteger os compostos bioativos da erva-mate. No protocolo *in vivo* com ratos Wistar as microcápsulas contendo erva-mate demonstraram uma maior capacidade antioxidante no plasma e redução da peroxidação lipídica no tecido cerebral. Com referência ao comportamento das enzimas antioxidantes o extrato microencapsulado e o extrato livre atenuaram os níveis de superóxido dismutase, com diferença significativa somente ao grupo microcápsulas vazias. Enquanto o extrato livre, exclusivamente, conseguiu reduzir os níveis enzimáticos de catalase e glutathione peroxidase no fígado. Os resultados de nosso estudo em roedores sugerem que a ingestão da erva-mate em sua forma microencapsulada é a maneira mais eficiente de promover as defesas antioxidantes no organismo e reduzir a peroxidação lipídica. Concluímos que a erva-mate pode ser um importante elemento na dieta dos animais, visto que, o consumo regular durante 30 dias caracterizou benefícios à saúde dos mesmos. No entanto, mais estudos são necessários para o entendimento de como cada substância bioativa é absorvida.

Palavras-chave: Radicais livres. Proteção antioxidante. Extratos vegetais.

ABSTRACT

Ilex paraguariensis is a plant widely distributed in the south of Brazil, with its widespread consumption through the mate. The yerba mate has several bioactive substances, such as saponins, methylxanthines and phenolic compounds, the latter better known for its antioxidant action. The inclusion of these components in the diet can contribute to the health of individuals. However, these biocomposites are sensitive and can be degraded by O₂, light, pH and temperature. Thus, microencapsulation is being used with the aim of preserving these substances, ensuring that they are intact until reaching their target site in the body. We aimed to investigate the modulation of the antioxidant activity *in vivo* of extracts of microencapsulated yerba mate in comparison to free extracts. For this, aqueous extracts of yerba mate at different concentrations (5%, 10%, 15% and 20%) were characterized and tested in *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. The extract selected was 15% with antioxidant activity of 4.39 ± 0.07 (mmol of Trolox/L), as well as maintaining the cellular survival (135.63 ± 11.39 CFU/mL) of the yeasts submitted to the stress model, radiation. The 15% erva-mate extract was lyophilized, presenting in its composition chlorogenic acid. Subsequently, this extract was microencapsulated by ionic gelling and the microcapsules were evaluated for particle size, solubility, encapsulation efficiency, morphological analysis and functional clusters, and subjected to an *in vivo* study in which 32 rats were divided into 4 groups: Control, Free Extract, Microencapsulated Extract and Empty Microcapsule. In the 30 day period the animals received via gavage their respective treatments and in the end we evaluated the enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase, antioxidant activity and lipid peroxidation. Microencapsulation was able to generate particles with a mean diameter of 91.42 μm , mean solubility of 21.2% and encapsulation efficiency of 64.73%. Although scanning electron microscopy showed an irregular shape of the microcapsules, spectroscopy showed that ionic gelation was able to microencapsulate and protect the bioactive compounds of the yerba mate. In the *in vivo* protocol with Wistar rats the microcapsules containing yerba-mate showed a greater antioxidant capacity in the plasma and reduction of the lipid peroxidation in the cerebral tissue. Regarding the behavior of the antioxidant enzymes, the microencapsulated extract and the free extract attenuated the levels of superoxide dismutase, with significant difference only to the empty microcapsule group. While the free extract alone was able to reduce the enzymatic levels of catalase and glutathione peroxidase in the liver. The results of our study in rodents suggest that ingestion of yerba mate in its microencapsulated form is the most efficient way to promote antioxidant defenses in the body and reduce lipid peroxidation. We conclude that yerba mate may be an important element in the diet of animals, since regular consumption during 30 days characterized health benefits. However, further studies are needed to understand how each bioactive substance is absorbed.

Keywords: Free radicals. Antioxidant protection. Plant extracts.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Delineamento experimental do estudo.....	33
Figura 2 – Delineamento experimental do teste com leveduras.....	39
Figura 3 – Produção de microcápsulas de erva-mate (a) e vazias (b).....	43
Figura 4 – Delineamento experimental do teste com ratos.....	47
Figura 5 - Compostos fenólicos totais em diferentes concentrações de extratos de erva-mate...53	
Figura 6 - Capacidade antioxidante de extratos de erva-mate diferentes concentrações.....	54
Figura 7 - Micrografias de microcápsulas de erva-mate nos aumentos 400x (a) e 800x (b).....	62
Figura 8 - Micrografias de microcápsulas vazias nos aumentos 400x (a) e 800x (b).....	63
Tabela 1 – Caracterização físico-química da erva-mate.....	51
Tabela 2 – Sobrevida do ensaio com leveduras.....	55
Tabela 3 – Teores de compostos bioativos do extrato de erva-mate liofilizado.....	59
Tabela 4 – Eficiência de Encapsulação das microcápsulas.....	60
Tabela 5 – Tamanho de partícula das microcápsulas de erva-mate.....	64
Tabela 6 – Caracterização físico-química das microcápsulas de erva-mate.....	66
Tabela 7 – Quantificação de superóxido dismutase (SOD).....	69
Tabela 8 – Quantificação de catalase (CAT).....	70
Tabela 9 – Quantificação de glutathione peroxidase (GPx).....	70
Tabela 10 – Quantificação das TBARS.....	72
Tabela 11 – Quantificação da atividade antioxidante através da redução férrica.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABTS: ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiasolína-6-ácido sulfônico)

CAT: catalase

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

DCNT: doenças crônicas não-transmissíveis

ERO: espécies reativas de oxigênio

FRAP: Determinação do poder de redução do íon ferro

FTIR: Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier

GPx: glutathiona peroxidase

MEV: microscopia eletrônica de varredura

SOD: superóxido dismutase

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 ALIMENTAÇÃO E SAÚDE	23
2.2 ALIMENTOS E COMPOSTOS FUNCIONAIS	25
2.3 ERVA-MATE (<i>Ilex paraguariensis</i>)	27
2.4 MICROENCAPSULAÇÃO	30
2.4.1 Microencapsulação por gelificação iônica	33
2.5 UTILIZAÇÃO DE MODELOS <i>in vivo</i> NA PESQUISA	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 MATÉRIA PRIMA	37
3.1.1 Caracterização físico-química	37
3.1.1.1 Umidade	38
3.1.1.2 Lipídios	38
3.1.1.3 Fibras	39
3.1.1.4 Proteínas	39
3.1.1.5 Cinzas	40
3.1.1.6 Carboidratos digeríveis	40
3.2 EXTRATO AQUOSO	40
3.2.1 Caracterização do extrato aquoso	41
3.2.1.1 Compostos fenólicos totais	41
3.2.1.2 Capacidade antioxidante pelo radical ABTS	41
3.3 TESTES <i>in vivo</i> COM <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42
3.3.1 Meios de cultivo utilizados	42
3.3.2 Preparo das leveduras para os testes	42
3.3.3 Delineamento experimental	43
3.3.4 Análise de sobrevivência celular	44
3.4 MICROCÁPSULAS	44
3.4.1 Extrato liofilizado	44
3.4.2 Caracterização do extrato liofilizado	45
3.4.3 Elaboração das microcápsulas	46
3.4.4 Avaliação da eficiência de microencapsulação	47

3.4.5 Avaliação do tamanho de partícula	47
3.4.6 Caracterização físico-química	48
3.4.7 Solubilidade em água	48
3.4.8 Avaliação Morfológica	48
3.4.9 Avaliação por Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	49
3.5 TESTES <i>in vivo</i> COM RATOS WISTAR	49
3.5.2 Delineamento experimental	49
3.5.3 Coleta de material.....	50
3.5.4 Superóxido dismutase (SOD).....	51
3.5.5 Catalase (CAT)	51
3.5.6 Glutathione Peroxidase (GPx)	51
3.5.7 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	51
3.5.8 Proteína	52
3.5.9 Determinação do poder de redução do íon ferro (FRAP)	52
3.6 TRATAMENTO DOS DADOS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA ERVA-MATE.....	53
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS	54
4.3 TESTES <i>in vivo</i> COM <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57
4.4 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO LIOFILIZADO	59
4.5 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	61
4.6 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA.....	63
4.7 TAMANHO DE PARTÍCULA	65
4.8 SOLUBILIDADE DAS MICROCÁPSULAS.....	66
4.9 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROCÁPSULAS	67
4.10 FTIR	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.11 ENZIMAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>in vivo</i>	70
5 CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS	80
APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO.....	80
APÊNDICE B – CURVAS ANALÍTICAS.....	113
APÊNDICE C – CLAE	115

APÊNDICE D – ANÁLISE DE TAMANHO DE PARTÍCULA..... 116

1 INTRODUÇÃO

Alterações no padrão alimentar da população contribuíram para a instalação de um quadro mundial preocupante de doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT), com maior incidência para obesidade e outras doenças inflamatórias. A adoção de hábitos de vida saudáveis, como a prática de exercícios e inclusão de alimentos funcionais na dieta, pode contribuir para a promoção da saúde dos indivíduos (ALKHATIB et al., 2017; POPKIN; KENAN, 2016; TILMAN; CLARK, 2014).

Os compostos funcionais de maior interesse nos alimentos são os antioxidantes, comumente presentes em organismos do reino vegetal, como a *Ilex paraguariensis*. A erva-mate possui importância econômica e cultural expressiva nos países da América do Sul, sendo amplamente ingerida na forma tradicional de chimarrão com seu consumo pautado no hábito de compartilhar esta bebida típica. No extrato de erva-mate é possível obter-se inúmeras substâncias que contribuem na ação antioxidante desta planta (DA SILVEIRA et al., 2017; HECK; DE MEJIA, 2007). Apesar disso, esta matéria-prima deve ser mais explorada, ampliando-se seu uso através de inovações em seu processamento, assim como, no desenvolvimento de novos produtos alimentícios.

O consumo de biocompostos da erva-mate propicia efeitos positivos na manutenção da saúde. Estes são capazes de modular a fisiologia do organismo, promovendo ações neuroprotetoras (CITTADINI et al., 2019; COLPO et al., 2016), atua na redução da inflamação e do estresse oxidativo (PETRILLI et al., 2016), na diminuição de perfil lipídico (MESSINA et al., 2015), na glicemia e obesidade (KIM et al., 2015) entre outros (BRACESCO et al., 2019). Contudo, estas substâncias bioativas são sensíveis e podem ser degradadas frente a fatores intrínsecos, como a auto-oxidação e quanto a fatores externos. Devido a isso surgiram tecnologias, como a microencapsulação, com o intuito de preservar estes componentes até mesmo após o consumo destes pelos indivíduos.

A microencapsulação é uma técnica capaz de proteger o material encapsulado de condições adversas, como luz, umidade, pH e oxigênio, auxiliando na estabilidade dos compostos funcionais e possibilitando uma liberação controlada destes sob condições específicas (DIAS, 2017; ETCHEPARE et al., 2015). Apesar do aumento no interesse em pesquisa com o uso da erva-mate, estudos que abordem sobre o consumo de seu extrato microencapsulado, bem como a atuação destes compostos bioativos após sua ingestão ainda são escassos.

Neste contexto, estamos inseridos na linha de pesquisa 2 do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) que engloba a Qualidade e Propriedades Funcionais de Alimentos, com ênfase no projeto 3 sobre a Avaliação de Propriedades Funcionais e Nutracêuticas de Bioprodutos e Compostos. Esta pesquisa, visa colaborar com o projeto “Erva-mate como componente funcional no desenvolvimento de processos e produtos alimentares”, aprovado pelo Polo Corede da Produção, com o intuito de auxiliar na avaliação *in vivo* da ação protetora de extratos de erva-mate, promovendo esta matéria-prima e possibilitando a diversificação de seu consumo.

Desta forma, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar se extratos de erva-mate microencapsulados apresentam melhor ação protetora antioxidante do que extratos livres e como objetivos específicos: avaliar a ação protetora de extratos aquosos de erva-mate em diferentes concentrações na sobrevivência de células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* expostas ao estressor radiação gama; elaborar e caracterizar microcápsulas contendo extrato de erva-mate; aplicar as microcápsulas de erva-mate em estudo de suplementação com ratos comparando aos extratos aquosos quanto sua capacidade antioxidante e na modulação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ALIMENTAÇÃO E SAÚDE

A segurança alimentar e nutricional são fatores imprescindíveis para uma sociedade saudável, no entanto, esta não é uma realidade vivenciada por grande parte da população. A urbanização mundial ocasionou uma transição dietética em que a alimentação tradicional foi substituída por dietas com alta ingestão de produtos ultra processados, calóricos e com pouca qualidade nutricional (COSTA et al., 2018; MARTINS et al., 2013b; POPKIN, 2001).

É importante salientar que o processamento dos alimentos é fundamental na cadeia de fornecimento dos mesmos, através dele pode-se aumentar a biodisponibilidade de macronutrientes, melhorar a segurança dos alimentos através de tratamentos como refrigeração, pasteurização e cozimento, e permitir a disponibilidade de frutas e vegetais sazonais durante todo o período do ano. Entretanto, alguns alimentos podem ser ultra processados e/ou conter elevadas quantidades de gorduras, açúcares e amidos refinados, assim como excesso de sal, tornando-se opções não tão saudáveis para o consumidor (AUGUSTIN et al., 2016).

Segundo Martins e colaboradores (2013b) houve uma participação crescente de produtos ultra processados na dieta dos brasileiros em todo país e em todas as classes de renda desde a década de 80 até os anos 2009. Estas mudanças alimentares acarretaram e ainda impactam consideravelmente no desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como diabetes, obesidade, doenças inflamatórias, alguns tipos de cânceres e doenças cardiovasculares (NASCIMENTO et al., 2018). Apesar destas patologias possuírem uma etiologia multifatorial, sendo assim causadas tanto por questões genéticas quanto ambientais, o estilo de vida atual representado pela falta de atividade física aliado a uma alimentação inadequada desempenham um papel crítico associado a crescente incidência e prevalência destas doenças (FINUCANE et al., 2011; MARTINS et al., 2013b).

Modificações na dieta como um aumento da ingestão de alimentos *in natura*, minimamente processados e com a utilização de aditivos naturais, como os antioxidantes, deveriam ser implementadas para otimizar a saúde da população, sendo uma das estratégias que podem oferecer benefícios substanciais na redução da incidência de doenças crônicas (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2015). No entanto, é interessante lembrar que a promoção da saúde através de uma alimentação adequada é um desafio global para as políticas públicas e envolve a participação articulada de múltiplos setores, como educação, agricultura,

planejamento urbano, transportes e comunicação (VIEIRA et al., 2013). Ainda, deve-se considerar que as escolhas alimentares dos indivíduos são influenciadas pela sua cultura, conhecimento nutricional, preço, disponibilidade, gosto e conveniência, logo, é de suma importância analisar cada uma destas condições para auxiliar nas mudanças da alimentação (TILMAN; CLARK, 2014).

A preocupação com a alimentação tornou-se hábito constante e as tendências contemporâneas do consumo de itens alimentícios estão mudando. A população está mais atenta aos produtos ofertados e 85% dos indivíduos acreditam que a dieta pode reduzir o risco de certas patologias (CASTRO, 2013). As pessoas estão optando em manter a saúde através de escolhas mais conscientes na dieta, explorando diferentes alimentos e compostos. Este novo comportamento é evidenciado pelo crescimento expressivo do uso de suplementos dietéticos, nutracêuticos, produtos e ingredientes funcionais.

Com os consumidores mais conscientes dos possíveis benefícios para a saúde e dos riscos associados ao consumo de alimentos, todas as esferas envolvidas na produção de alimentos, em especial as indústrias alimentícias, precisaram evoluir e tentam acompanhar esta exigência dos consumidores (POPKIN; KENAM, 2016). A indústria de alimentos vem dedicando recursos ao desenvolvimento de itens mais saudáveis, hoje já é perceptível uma modificação nos produtos disponíveis no mercado e há uma grande produção de alimentos com a incorporação de ingredientes funcionais, gerando uma grande competitividade neste ramo (SMITHERS, 2016).

Outra ação do setor de alimentos está sendo intensificar esforços para acompanhar a produtividade e conseguir responder as demandas da crescente população mundial, que deverá aumentar de 7,3 bilhões para 9 bilhões em 2050 (AUGUSTIM et al., 2016; VALDRAMIDIS; KOUTSOUMANIS, 2016). O aumento exponencial na demografia da população, assim como, os consequentes gastos com a sua saúde, destacam a necessidade da implementação de um sistema baseado em uma abordagem preventiva, substituindo a atual que preocupa-se no tratamento de doenças (SMITHERS, 2016). Neste contexto, tem-se mostrado a urgência de ações envolvendo outras áreas, além da saúde, em que a indústria, a ciência e tecnologia de alimentos demonstra um grande potencial neste processo promotor da saúde (VIEIRA et al., 2013).

A ciência de alimentos é responsável por desempenhar um papel importante através do desenvolvimento de produtos e compostos alimentares capazes de promover a saúde. Apesar do estímulo para a produção destes alimentos, deve haver uma preocupação por parte das empresas quanto à sua segurança alimentar e principalmente, na comprovação dos efeitos destes

produtos. Assim, a ciência e a academia unem-se no âmbito destas questões e devem contribuir para a garantia da seguridade alimentar e efetividade dos benefícios do consumo destes novos alimentos e compostos funcionais (CASTRO, 2013).

2.2 ALIMENTOS E COMPOSTOS FUNCIONAIS

Os processos moleculares humanos são influenciados pela sua fisiologia, bem como por fatores exógenos, incluindo a alimentação. A dieta satisfaz principalmente os requisitos metabólicos e energéticos básicos para alcançar o equilíbrio do organismo. Uma vez que os nutrientes afetam diretamente as alterações fisiológicas, a alimentação tem efeitos fundamentais no organismo, logo se a dieta não for equilibrada, ela se apresenta como um fator ambiental chave na etiologia de doenças, segundo diversos estudos que demonstram a associação entre o consumo alimentar e o desenvolvimento de DCNT (POPKIN, 2001; RESCIGNO et al., 2017).

No entanto, uma dieta adequada também pode melhorar a saúde através da regulação de processos específicos, já que os nutrientes são considerados como sinais alimentares capazes de afetar tanto a programação metabólica como a homeostase celular. Neste sentido, vincula-se também a ideia de prevenção de doenças e, principalmente, da promoção da saúde através do consumo de alimentos e compostos funcionais (RICORDI; GARCIA-CONTRERAS; FARNETTI, 2015).

Cada vez mais as políticas públicas adotam a concepção de uma dieta balanceada e saudável como um dos meios de promover qualidade de vida. Assim, vêm surgindo novos sistemas agroalimentares e há um crescente quadro de informações em torno da funcionalidade de alimentos e componentes capazes de proporcionar vantagens à saúde pelo seu consumo (SMITHERS, 2016; VIANA et al., 2017).

Os alimentos funcionais podem ser descritos como matrizes alimentares ou ingredientes que além de sua função nutricional básica, inerente a sua composição química, possuem algum composto potencialmente benéfico a saúde. Os alimentos funcionais são ditos auxiliares na manutenção da saúde e na prevenção de diversas doenças, porém seu consumo deve ser regular juntamente com a adoção de hábitos de vida saudáveis (BRASIL, 2008).

A potencial ação protetora dos alimentos funcionais provém de um ou mais compostos bioativos, que por sua vez podem ser encontrados a partir de várias fontes naturais. Uma grande variedade destes biocompostos estão no reino vegetal, sendo comumente verificados em plantas, raízes e folhas, responsáveis por produzir uma gama diversificada destes compostos orgânicos, conhecidos também como fitoquímicos (JIMENEZ-GARCIA et al., 2013).

Os compostos bioativos não participam metabolicamente do crescimento destes organismos vegetais, por isso são conhecidos como metabólitos secundários. Sabe-se que estes metabólitos desempenham um papel importante na adaptação de plantas, já que vários fatores externos, como o suprimento de nutrientes, temperatura, condições de luz e até mesmo o ataque de insetos e pragas, podem influenciar nos níveis destes. Inclusive, quanto maior o estresse a que o organismo for submetido maior será a formação de compostos funcionais (FINE et al., 2006).

Os metabólitos secundários possuem estruturas químicas e vias biossintéticas complexas, sendo que suas respectivas propriedades químicas começaram a ser estudadas na década de 1850. São inúmeros compostos bioativos, porém estes podem ser compreendidos em três principais classes de acordo com sua via de sintetização: compostos fenólicos, terpenos e compostos contendo nitrogênio ou alcalóides (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1992).

Devido à grande disponibilidade de biocompostos, alguns de seus mecanismos de ação ainda não são bem elucidados. À medida que mais destes componentes vão sendo descobertos e identificados, estudos se empenham em sua caracterização e conduzem investigações para avaliar seus potenciais efeitos (MILNER, 2004; RESCIGNO et al., 2017). Ademais, deve-se estimar que a efetividade destes compostos depende de muitos outros fatores, como a individualidade bioquímica, o equilíbrio nutricional e também a biodisponibilidade de nutrientes. A integração destes fatores irá atuar de maneira distinta em cada indivíduo, influenciando na resposta em seu organismo.

A utilização de organismos vegetais para a produção de biocompostos naturais ou recombinantes cresce cada vez mais e diferentes segmentos industriais como farmacêutico, cosmético e alimentício procuram ampliar este uso para fins comerciais. Isto ocorre porque os compostos bioativos são capazes de modificar seletivamente caminhos metabólicos afetando o desenvolvimento de doenças e auxiliando no equilíbrio do organismo (JIMENEZ-GARCIA et al., 2013).

Com a grande procura da população em consumir alimentos mais saudáveis, as indústrias de alimentos têm procurado fontes naturais de obtenção de biocompostos, sendo os antioxidantes os ingredientes funcionais mais explorados pela ciência. Os compostos fenólicos são a classe de bioativos mais associada às propriedades antioxidantes, que auxiliam na manutenção da saúde humana e estão presentes em muitas plantas, como é o caso da *Ilex paraguariensis*, mais conhecida como erva-mate (FERNANDES et al., 2015).

2.3 ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*)

A *Ilex paraguariensis* é a planta nativa da América do Sul que dá origem a erva-mate, produto amplamente produzido e consumido em países como Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai. Possui importância econômica expressiva nestes países e prestígio social, já que suas folhas são utilizadas na produção de infusões como chás, chimarrão e tererê, inclusive algumas pessoas relatam que consomem estas bebidas em quantidades superiores a um litro por dia (MORAIS et al., 2009).

Para o preparo destas infusões, a planta *Ilex paraguariensis* é beneficiada por um processamento que consiste, basicamente, na secagem e moagem de suas folhas, para a obtenção da erva-mate. O consumo deste produto é pautado essencialmente no hábito de compartilhar estas bebidas típicas, exercendo um papel fundamental na socialização. Apesar de seu reconhecido uso para a produção de bebidas, a erva-mate apresenta potencial para variadas aplicações na indústria, como corante, conservante de alimentos, cosméticos, mas principalmente como ingrediente bioativo para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios (FAGUNDES et al., 2015).

No entanto, muitos dos apreciadores do chimarrão, por exemplo, desconhecem que pode haver diversas outras maneiras de consumir a erva-mate, e também as vantagens de sua ingestão. Ao caracterizar a erva-mate, Souza e colaboradores (2015) classificaram a planta *Ilex paraguariensis* como rica nutricionalmente por conter em média 7% de cinzas, 27% de proteínas, 1,5% de lipídios e 64,5% de carboidratos em sua composição. Esta planta ainda apresenta micronutrientes importantes na dieta como os minerais potássio, magnésio e manganês, e uma ampla variedade de componentes funcionais, como as saponinas, metilxantinas (cafeína e trombina) e polifenóis (ácido clorogênico, rutina e quercetina) (DELADINO et al., 2008).

Cada composto bioativo presente na erva-mate possui sua estrutura e composição química, bem como um mecanismo de ação distinto capaz de modular e promover a homeostase do organismo (ETCHEPARE et al., 2015). As saponinas são compostos eficientes em modificar o metabolismo lipídico. Resende e colaboradores (2012) verificaram que o consumo de frações de saponinas purificadas do mate, providas de frutos verdes, teve efeito na redução da gordura visceral, no nível de triglicerídeos plasmáticos e na oxidação de glicose em tecidos hepático e adiposo em ratos saudáveis alimentados com uma dieta padrão. Outros autores relatam que estas substâncias podem desempenhar ainda função antimicrobiana, impedir processos

inflamatórios e o desenvolvimento de câncer de cólon *in vitro* (MORAIS et al., 2009; PUANGPRAPHANT; BERHOW; MEJIA, 2011).

As metilxantinas são substâncias pseudoalcalóides encontradas na erva-mate conhecidas pelas suas propriedades estimulantes no sistema nervoso central, devido à presença de teofilina, teobromina e, majoritariamente, cafeína. As folhas da erva-mate podem conter de 1 a 2% de seu peso seco de cafeína, por isso podem ser recomendadas como estimulantes atuando contra a fadiga (MENDES et al., 2016). É sugerido que o consumo da erva-mate possa diminuir o peso corpóreo e adiposidade, provavelmente pela termogênese causada pela cafeína (BLUM-SILVA et al., 2015).

Os compostos fenólicos são os maiores constituintes da erva mate e possuem comprovada atividade antioxidante, podendo inibir a peroxidação lipídica, proteger o organismo contra o efeito nocivo das espécies reativas de oxigênio (ERO), assim como melhorar a função do sistema imunológico e prevenir o envelhecimento (BOAVENTURA et al., 2013; FRIZON et al., 2015; OKUDA, 2005). Os polifenóis são agentes redutores que protegem os constituintes e tecidos celulares contra o dano oxidativo, limitando o risco de várias patologias como doenças inflamatórias, cardiovasculares e neurológicas associadas ao estresse oxidativo (SCALBERT et al., 2005).

O estresse oxidativo, por sua vez, é ocasionado pelos radicais livres, que são qualquer espécie química que contém um ou mais elétrons desemparelhados, sendo altamente reativos e propícios a atacarem outras biomoléculas para conseguirem um equilíbrio molecular. A formação das ERO ocorre constantemente durante os processos metabólicos normais, são gerados fisiologicamente por compostos endógenos, mas podem ser ocasionados pela exposição a fatores exógenos também. Quando há um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e as espécies oxidativas formadas ocorre a condição de estresse (SAMPAIO; MORAES, 2010).

Basicamente, o sistema de defesa é dividido em antioxidantes não-enzimáticos e enzimáticos, estes últimos ainda podem ser primários ou secundários. Para proteção contra níveis excessivos de radicais livres, os eucariotos possuem como defesas primárias três enzimas essenciais, a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), que impedem a formação ou neutralizam os radicais livres. Já a defesa secundária refere-se a glutathione redutase (GSH-R), uma enzima que é reciclada com o intuito de neutralizar mais radicais que possam vir a se formar (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2013).

Aparentemente, a oxidação de lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos é induzida não apenas pelos radicais livres, mas também por mecanismos não-radicalares, por

isso vários compostos, além das enzimas sintetizadas endogenamente, são necessários na defesa do organismo. Para tal, os compostos bioativos obtidos da dieta também atuam como antioxidantes, porém exógenos, participando de uma segunda linha de defesa *in vivo*. Os antioxidantes presentes nos alimentos podem ajudar a limitar o dano oxidativo, atuando diretamente nas ERO ou estimulando sistemas de defesa endógenos. No primeiro caso, os mecanismos de ação destes compostos devem-se ao seu potencial de oxi-redução, onde os antioxidantes competem por sítios ativos e receptores em diferentes estruturas celulares no organismo. Os polifenóis podem aceitar um elétron para formar radicais de fenoxil relativamente estáveis, interrompendo assim as reações de oxidação em cadeia nos componentes celulares (SCALBERT et al., 2005).

A ação conjunta de componentes antioxidantes, cada um em seu respectivo local, podem atuar sinergicamente constituindo um sistema de defesa total, contribuindo para a manutenção do equilíbrio do organismo (NIKI, 2010). Outra via de atuação dos antioxidantes seria através da modulação gênica da síntese de proteínas envolvidas nas linhas de defesa contra o processo oxidativo que degenera tecidos celulares (ETCHEPARE et al., 2015). O desequilíbrio gerado pelo estresse oxidativo pode acarretar em uma inflamação do organismo, que se persistente torna-se crônica e contribui para o surgimento de outras doenças. Dados recentes mostram que a inflamação contribui para ansiedade, resistência à insulina, obesidade e doenças degenerativas. Os compostos fenólicos contidos em matrizes vegetais podem agir positivamente na inflamação revertendo o quadro crônico e promovendo a saúde (RICORDI; GARCIA-CONTRERAS; FARNETTI, 2015).

Diante destas evidências disponíveis na literatura científica, é fato que os antioxidantes provenientes da dieta melhoram a função imunológica, reduzem o estresse oxidativo e aumentam a longevidade, ações importantes levando-se em conta o aumento da expectativa de vida e a qualidade de vida destes indivíduos. Sendo assim, a sinergia entre os compostos fenólicos e as demais substâncias bioativas presentes na erva-mate permitem considerá-la um ingrediente funcional interessante para cientistas, indústria alimentar e consumidores (HECK; DE MEJIA, 2007; LIU, 2003; NEGRÃO-MURAKAMI et al., 2011).

A erva-mate sendo esta matéria prima tão rica em bioativos é altamente adequada para ser utilizada como ingrediente na incorporação de novos alimentos funcionais. Em resposta a demanda da população por alimentos mais saudáveis, a erva-mate responde aos requisitos necessários e pode perfeitamente ser incluída em produtos prontos para o consumo. Este tipo de industrialização é uma nova proposta da indústria de alimentos visando a adesão do público consumidor, assim como, a segurança alimentar (POPKIN; KENAN, 2016). No entanto, ainda

existem alguns impedimentos para a inserção de biocompostos em matrizes alimentares. Logo, novas tecnologias como a microencapsulação estão sendo empregadas no processamento e desenvolvimento de alimentos funcionais (BASSANI; GONZÁLES; PETROVICK, 2005; BOAVENTURA et al., 2013; PRUDÊNCIO et al., 2012).

2.4 MICROENCAPSULAÇÃO

As substâncias bioativas são altamente instáveis e podem ser degradadas por diversos fatores, prejudicando a sua funcionalidade no organismo (BOTELHO; CANAS; LAMEIRAS, 2016). Diante disso, micro e nanotecnologias, como a microencapsulação, vieram agregar como uma das mais promissoras técnicas na proteção de compostos como enzimas, células, medicamentos, ativos cosméticos, extratos e ingredientes alimentares. A técnica de encapsulamento é abrangente, possui utilidade em muitos segmentos, principalmente no farmacêutico, porém tem sido muito explorada nos últimos anos pelo setor alimentício. Sua aplicação vem sendo considerada uma revolução na ciência alimentar convencional e na indústria alimentar (FATHI; MOZAFARI; MOHEBBI, 2012; HE; HWANG, 2016).

A microencapsulação consiste em um processo mecânico ou físico-químico que imobiliza partículas, que podem ser sólidas, gotículas líquidas ou gases, através de seu empacotamento. O material encapsulado é denominado como núcleo e encontra-se retido em cápsulas extremamente pequenas, que podem ser classificadas por tamanho em três categorias: macro- ($>5.000 \mu\text{m}$), micro- ($0.2 - 5.000 \mu\text{m}$) e nanocápsulas ($<0.2 \mu\text{m}$) (RÉ, 1999). A proteção do núcleo provém de um agente encapsulante, responsável por revestir e conservar as propriedades da substância de interesse, assim como manter a estrutura das cápsulas mesmo sob condições adversas (DELADINO et al., 2008). Este revestimento é um meio de embalagem, separação entre meio interno e externo e armazenamento de compostos para posterior liberação em meio desejado.

O interesse em microencapsular compostos bioativos provenientes de extratos naturais vem aumentando, no entanto, são encontrados principalmente trabalhos referentes a microencapsulação de compostos purificados ou sintetizados em laboratório. Geralmente, extratos de plantas ricas em antioxidantes são utilizados em diversos alimentos visando uma melhoria na estabilidade da própria matriz alimentar, na tentativa de reduzir reações de oxidação, principalmente de lipídios, que podem ocasionar em perdas nutricionais e alterações sensoriais nos produtos (BOROSKI et al., 2012).

Dentre os estudos que estão sendo conduzidos nesta área visando fins alimentares, a maioria explora sobre o desenvolvimento da técnica para elaboração de microcápsulas de menor diâmetro e sua caracterização, eficiência de encapsulação, taxa de liberação, estabilidade dos compostos encapsulados e sua atividade antioxidante durante o armazenamento (DIAS, 2017). No entanto, pesquisas sobre a microencapsulação de ingredientes funcionais com o objetivo final de melhorar e promover a saúde dos humanos ainda são escassos.

A microencapsulação inicialmente foi considerada uma técnica muito dispendiosa, porém com o aumento da demanda e do desenvolvimento de diferentes metodologias, as microcápsulas tornaram-se viáveis para a indústria alimentícia. Para que haja a formação destas cápsulas, diversos métodos podem ser utilizados como *spray drying* e *spray chilling*, extrusão, revestimento em leito fluidizado, lipossomas, coacervação, microemulsão entre outros (GIBBS et al., 1999).

A técnica escolhida dependerá da substância de núcleo, do material a ser utilizado como encapsulante, do produto em que as cápsulas serão aplicadas posteriormente, bem como do processamento a que serão submetidas. Na área de alimentos o processo de microencapsulação vem sendo empregado como uma ferramenta para solucionar principalmente problemas de perda de atividade de constituintes como vitaminas, minerais e materiais vegetais ricos em metabólitos secundários, como os antioxidantes (NUNES et al., 2015; OEHLKE et al., 2014).

A conservação das propriedades benéficas de compostos antioxidantes é um desafio, já que estes são altamente instáveis e podem ser facilmente degradados frente a algumas condições como luz, oxigênio, pH, temperatura, entre outros. Estes componentes funcionais são suscetíveis a reações de auto-oxidação e sensíveis quimicamente, podendo ser prejudicados durante o processamento industrial. Alguns métodos de obtenção e formulação de produtos alimentícios utilizam-se de altas temperaturas, se o emprego do calor for realizado por longos períodos pode-se ocasionar perdas nutricionais e de biocompostos. Nunes et al. (2015) verificaram que a microencapsulação utilizando maltodextrina preservou melhor os compostos fenólicos do extrato de erva-mate durante o processo de *spray drying*, aumentando sua estabilidade durante o armazenamento.

Outro fator que pode diminuir a funcionalidade destas substâncias é a variação de pH já no organismo e a exposição ao conteúdo gástrico. Embora a biodisponibilidade das substâncias funcionais da erva-mate seja ainda pouco estudada, supõem-se que após a metabolização no organismo estas possam ter a sua atividade antioxidante diminuída. Os compostos fenólicos, em especial, apresentam pouca disponibilidade devido a sua estrutura química com massa molecular elevada, resultando em uma baixa estabilidade e solubilidade (DIAS, 2017). Com

isso, a microencapsulação é um advento para promover o aumento da dispersão dos bioativos e auxiliar na manutenção da estabilidade destas substâncias (BOAVENTURA et al., 2013; HE et al., 2010; NUNES et al., 2015; PRUDÊNCIO et al., 2012).

Mais uma vantagem quanto a esta tecnologia é a capacidade de mascarar possíveis odores e sabores desagradáveis na elaboração de novos produtos. O encapsulante é eficiente em reduzir as interações entre o núcleo e fatores externos, diminuindo tanto reações que possam vir a causar perdas de aroma e cor, como também, reduzem prejuízos no valor nutricional dos alimentos. Sendo assim, através da microencapsulação torna-se possível a inserção de ingredientes bioativos em matrizes alimentares, sem alterar negativamente suas características físicas, mas permitindo o enriquecimento de vários alimentos e bebidas, apresentando um potencial significativo devido suas propriedades funcionais (BORGOGNA et al., 2010).

Por último, o processo de microencapsulação é conhecido por proporcionar uma liberação controlada das substâncias de núcleo, sua aplicação para esta finalidade começou com os probióticos, que ocasionaram bons resultados demonstrando que as microcápsulas protegeram o produto durante a passagem pelo trato gastrointestinal e foram capazes de liberar os compostos em sítio de ação adequado (SIMEONI et al., 2014). Posteriormente, o emprego desta técnica foi ampliado e mais estudos como de Deladino e colaboradores (2008) concluíram que a encapsulação permitiu adaptar a liberação de antioxidantes naturais da erva-mate, dependente da presença de uma camada de revestimento de quitosana (DELADINO et al., 2008).

Quando um material bioativo é aprisionado em um transportador para controlar sua taxa de liberação podemos definir isto como sistema de entrega e os mecanismos referentes a este sistema dependem do material encapsulante. A liberação do núcleo das microcápsulas irá depender da composição do agente encapsulante, que pode ser formado por diversos materiais, preferencialmente de origem alimentícia (MCCLEMENTS et al., 2009). Normalmente, são utilizados como encapsulantes polímeros naturais, como alginato, carragena, pectina, zeína e goma-laca. Estes materiais são previstos para serem estáveis em condições estomacais, tornando-se solúveis somente no pH do intestino delgado, por isso os polímeros alimentares entéricos são utilizados nestes sistemas de liberação controlada (SOBEL; VERSIC; GAONKAR, 2014).

2.4.1 Microencapsulação por gelificação iônica

A gelificação iônica é um processo físico de microencapsulação capaz de proteger bioativos sensíveis a fatores externos. Trata-se de um método simples, fácil, rápido e de baixo custo que ocorre em meio aquoso e requer condições brandas. Este tipo de microencapsulação é reconhecido por sua capacidade de modular as propriedades de liberação do material microencapsulado, levando em conta algumas questões como tamanho de partículas, forma e composição do encapsulado (BUREY et al., 2008).

Na gelificação iônica são utilizados biopolímeros para formar uma solução com a substância de interesse a se encapsular. Os biopolímeros são amplamente empregados na agricultura, indústria química, farmacêutica e alimentícia, como eles provém de fontes naturais e muitas vezes são biocompatíveis podem ser utilizados nestes diversos ramos com segurança. Um uso para os biopolímeros que vem crescendo está na função destes formarem partículas de gel, sendo muito úteis na microencapsulação de materiais sensíveis como cosméticos contendo vitaminas, probióticos e bioativos em geral (BUREY et al., 2008; VINCI et al., 2015).

O alginato é um exemplo de biopolímero extraído a partir de algas marrons, este nome compreende um grupo de sais derivados do ácido alginico. São várias as características que o classificam como um dos materiais de parede mais vantajosos para a microencapsulação: é um produto não tóxico, ou seja, não existe quantidade estipulada para ingestão, possui um baixo custo, biocompatibilidade e tem propensão a formação de gel na presença de cátions bivalentes (BUREY et al., 2008).

A técnica de gelificação iônica baseia-se na aspersão de uma mistura contendo um polímero (alginato) e o agente bioativo em solução reticulante, sendo a de cloreto de cálcio a mais utilizada, com o auxílio de um bocal de alta pressão. A gelificação ocorre quando os polímeros entram em contato com os íons, que através da interação das diferentes cargas ocasionam na formação das micropartículas (BERALDO, 2016). Existem duas técnicas principais em que a gelificação ionotrópica pode ser realizada: configuração de difusão (gelificação externa) e gelificação interna.

O método de difusão ou gelificação externa envolve a introdução de uma solução hidrocolóide (alginato) com carga negativa em uma solução iônica carregada positivamente. Portanto, quando duas soluções com cargas opostas são misturadas, pode-se dizer que estes complexos de polieletrólitos formados são resultado de interações eletrostáticas entre os dois íons. Após a formação, as partículas ficam sob agitação por um determinado período de tempo, pois as ligações cruzadas desenvolvem-se lentamente da superfície para o interior da

partícula gelificada. A gelificação é praticamente instantânea, com a desvantagem de que muitas vezes pode causar a gelificação não homogênea de partículas de gel devido ao mecanismo de difusão. A gelificação da superfície geralmente ocorre antes da gelificação do núcleo e pode inibir a gelificação deste, levando a partículas com superfícies externas firmes e núcleos macios (COMUNIAN; FAVARO-TRINDADE, 2016).

Já o método de gelificação interna é baseado na mistura de uma forma inativa do íon de reticulação com solução de alginato. De acordo com a literatura, íons carbonato de cálcio (CaCO_3) ou Ca^{2+} insolúveis complexados com agentes quelantes, como EDTA, podem ser usados. Os íons Ca^{2+} são liberados quando ocorre a diminuição do pH, através da adição de ácidos orgânicos. Este método permite uma formação lenta e controlada de géis e resulta em uma distribuição homogênea de gel de alginato (VINCI et al., 2015; OZKAN et al., 2019).

2.5 UTILIZAÇÃO DE MODELOS *in vivo* NA PESQUISA

Estudos recentes comprovam que a ingestão regular de infusões de erva-mate contendo altas quantidades de polifenóis aumenta a capacidade antioxidante *in vitro* através da neutralização dos radicais livres DPPH e ABTS (BOADO; FRETES; BRUMOVSKY, 2015). No entanto, pesquisas que avaliam a biodisponibilidade e os efeitos das substâncias funcionais da erva-mate na modulação de enzimas e na homeostase do organismo não são tão amplos (MCCLEMENTS et al., 2009). Embora existam estes ensaios químicos relativamente simples para medir a capacidade antioxidante, estes não são representativos das condições celulares do homem, sendo necessário a obtenção de informações a partir de sistemas biológicos (FUKUMOTO; MAZZA, 2000). Muitas vezes, potentes antioxidantes *in vitro* não possuem qualquer atividade em modelos *in vivo*, havendo a necessidade de complementação de informações entre os ativos estudados (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2013).

Neste sentido, os modelos experimentais vieram agregar cientificamente, eles podem ser caracterizados como a materialização de uma parte da realidade, por meio da representação simples de uma ocorrência aguda (recente) ou crônica (antiga). A utilização destes métodos em pesquisa é fundamental pois facilitam o melhor entendimento da fisiologia, dos mecanismos de ação de substâncias no organismo, da etiopatogenia de doenças, entre outros. O modelo escolhido deve ser o mais semelhante e representativo possível ao que se objetiva investigar, devem ter uma precisão adequada, apresentar validação prévia na literatura científica, assim como a constatação das limitações em relação à realidade que irá representar (FERREIRA; HOCHMAN; BARBOSA, 2005).

Para os modelos *in vivo* podem ser usados animais de laboratório e microrganismos eucariotos, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A *Saccharomyces cerevisiae* é um modelo experimental rápido, de baixo custo e fácil padronização, podendo ser útil para otimizar a concentração dos extratos da erva-mate em função de sua capacidade antioxidante. Trata-se de um ótimo sistema eucariótico unicelular para medir bioatividade de substâncias, seu metabolismo assemelha-se a de eucariontes superiores com a vantagem de não apresentarem tanta variabilidade genética (SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR et al., 2003).

A exposição transitória de células a certos desafios ambientais induz rápidas mudanças celulares e moleculares conhecidas como resposta ao estresse (KESZENMAN; CANDREVA; NUNES, 2000). A integridade do genoma é continuamente ameaçada tanto por fatores endógenos, como as ERO produzidas pela respiração celular e as mutações aleatórias do DNA, quanto por fatores exógenos, como luz ultravioleta e radiações ionizantes.

Certos tipos de agentes físicos e químicos podem alterar a proliferação celular, principalmente por causa de seus efeitos no DNA, nas membranas e nos componentes de cascatas de transdução de sinais, resultando em atrasos e letalidades no ciclo celular como necrose, apoptose ou mutagênese. Alguns exemplos desses agentes são as radiações ionizante e ultravioleta, gerando ERO no metabolismo celular e meio ambiente (BRACESCO et al., 2007). Neste sentido, o modelo eucariótico de levedura é muito utilizado para estudos, pois desde o dano oxidativo a proteínas e ácidos nucleicos a enzimas do sistema de defesa contra estresse oxidativo são muito similares com os mamíferos (MÜLLER; GROSSNIKLAUS, 2010; ZAKRAJŠEK; RASPOR; JAMNIK, 2011).

Entretanto, para avaliar a efetividade *in vivo* de biocompostos microencapsulados e seu efeito no organismo o modelo de leveduras é limitado. Isto porque, de acordo com a solubilidade das microcápsulas formadas, o modelo experimental precisará dispor de um sistema digestivo para liberar o material de núcleo. A *Saccharomyces cerevisiae* é desprovida de sistema digestivo, não sendo capaz de romper microcápsulas insolúveis, por isso, outros modelos devem ser utilizados. Para esta análise, um modelo experimental muito utilizado são os ratos Wistar. Todavia, este método costuma ser mais dispendioso, requer cuidados quanto a responsabilidade ética da realização do estudo, além de tentar utilizar-se o menor número possível de animais para um resultado significativo (FERREIRA; HOCHMAN; BARBOSA, 2005).

Visando verificar a eficácia da técnica de microencapsulação dos compostos funcionais da erva-mate, deve-se analisar sua estabilidade ao longo do trato gastrointestinal e sua biodisponibilidade, através da quantificação destes compostos que atingem o plasma sanguíneo

(BOADO; FRETES; BRUMOVSKY, 2015; OEHLKE et al., 2014). Após o processo de metabolização das microcápsulas, as substâncias bioativas entram no sistema circulatório onde podem ser armazenadas, utilizadas ou excretadas. Por isso, é necessário verificar se o extrato microencapsulado manteve, reduziu ou se aumentou suas características bioativas após metabolizado quando comparado ao extrato livre (MCCLEMENTS et al., 2009).

Diversos estudos sobre a biodisponibilidade de substâncias, assim como o efeito da sua dosagem e duração foram realizados em modelos experimentais de animais após ingestão imediata de antioxidantes. Boado, Fretes e Brumovsky (2015) avaliaram a biodisponibilidade *in vivo* dos polifenóis da erva-mate por meio de um protocolo de ingestão aguda de extratos. Após as análises foi mostrado que os compostos fenólicos possuem um efeito de “economizar” as defesas antioxidantes naturais do corpo, ou seja, enzimas endógenas eram poupadas frente a utilização das defesas exógenas providas da erva-mate. Outros autores já haviam relatado a importância do consumo de antioxidante através da dieta para poupar as defesas endógenas (NIKI, 2010).

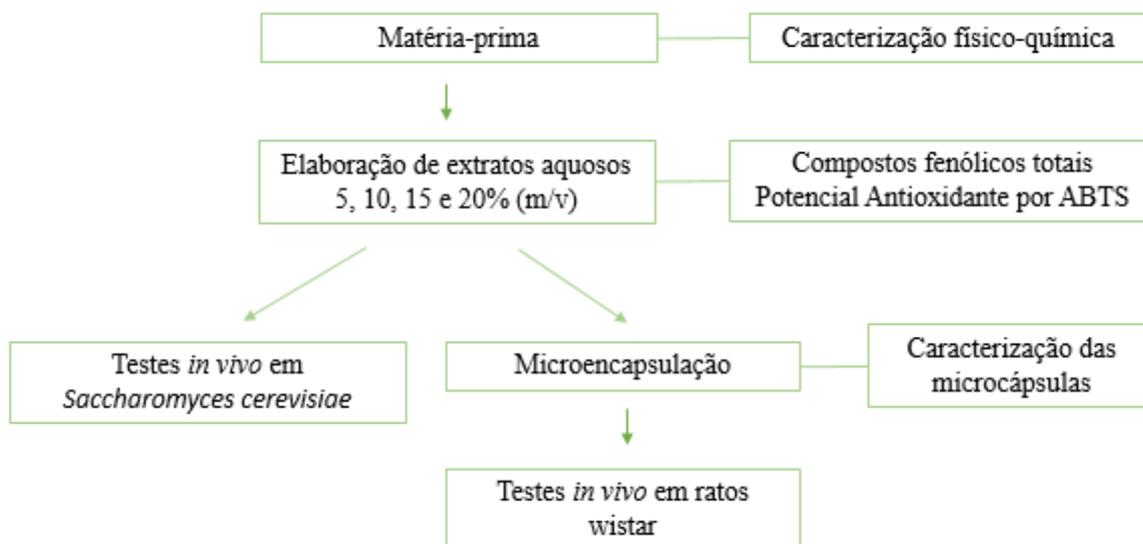
Pesquisas sobre a ação destes biocompostos podem ser realizadas por um protocolo de suplementação com o extrato de erva-mate por um maior período de tempo. A capacidade protetora *in vivo* desta planta pode ser avaliada mais precisamente através do nível de oxidação em fluidos, tais como plasma e eritrócitos, e tecidos biológicos, como fígado e cérebro. Estes biomarcadores juntamente com análises de perfil lipídico e inflamatório são capazes de indicar o mecanismo de ação e a efetividade dos biocompostos da erva-mate no organismo. Fernandes e colaboradores (2015) utilizaram ratos Wistar para testar a capacidade hipolipemiante e antioxidante da erva-mate e através de análises bioquímicas conseguiram verificar que esta foi eficaz na redução de 36% e 42% dos níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos, respectivamente.

A pesquisa sobre os efeitos de erva-mate cresceu exponencialmente nos últimos anos, junto com muitos relatórios que mostram efeitos benéficos de seus extratos *in vitro* e *in vivo* (BRACESCO, 2011; BRACESCO, 2019). Devido à elevada atividade biológica atribuída às infusões de erva-mate na última década, a maioria dos estudos são direcionados para a medição de seu conteúdo em diferentes formas de consumo e no estudo de suas propriedades bioativas (BOADO; FRETES; BRUMOVSKY, 2015). Poucas são as investigações quanto a utilização da microencapsulação nestes extratos, assim como sobre a aplicação final das microcápsulas em matrizes alimentares e os efeitos no organismo após seu consumo. Por isso são necessários estudos que incluam a validação da funcionalidade e da ação protetora *in vivo* da erva-mate microencapsulada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia está apresentada no fluxograma conforme mostra a Figura 1.

Figura 1 - Delineamento experimental do estudo.



Fonte: próprio autor (2019).

3.1 MATÉRIA PRIMA

Toda a matéria-prima utilizada para a elaboração dos extratos de erva-mate foi proveniente do município de Ilópolis, gentilmente cedida pela empresa INOVAMATE. As folhas *in natura* após o recebimento foram submetidas a secagem em estufa por 16 horas em temperatura de 50 ± 2 °C. Logo em seguida, as folhas foram trituradas em moinho de facas e classificadas em peneiras com mesh <42 (<355 μm), embaladas à vácuo e mantidas sob congelamento à -18 ± 2 °C até a sua utilização.

3.1.1 Caracterização físico-química

Para a caracterização da matéria-prima foram realizadas análises de umidade, lipídios, fibras, proteínas, cinzas e carboidratos digeríveis por diferença. As quantificações foram feitas seguindo protocolo do Instituto Adolfo Lutz (2008) com adaptações. Os resultados obtidos são médias de triplicatas apresentadas em porcentagem com as respectivas estimativas do desvio padrão.

3.1.1.1 Umidade

Amostras de folhas de erva-mate trituradas foram pesadas em quantidade de 4 gramas em cadinhos de metal previamente tarados. Estes foram colocadas em estufa a 105 °C permanecendo por um período aproximado de 4 horas. As amostras foram resfriadas em dessecador e logo após pesadas. Este processo repetiu-se até que a amostra apresentou peso constante. Para calcular a porcentagem de umidade foi utilizada a Equação 1.

$$\text{Umidade, \%} \left(\frac{m}{m} \right) = \frac{100 * N}{P} \quad (1)$$

sendo,

N = n° de gramas de umidade (perda de massa em g)

P = n° de gramas da amostra

3.1.1.2 Lipídios

Amostras de folhas de erva-mate trituradas foram preparadas em cartuchos de Soxhlet em quantidade de 4 gramas. Logo após o cartucho foi transferido para o aparelho extrator tipo Soxhlet, com balão de fundo chato acoplado, utilizando hexano como solvente orgânico. O cartucho permaneceu no equipamento até extração completa, cerca de 5 horas. Após este período, foi retirado o cartucho e o balão com o resíduo extraído foi colocado em estufa a 105 °C por cerca de uma hora. O balão foi resfriado em dessecador até a temperatura ambiente e pesado até atingir peso constante. Para calcular a porcentagem de lipídios foi utilizada a Equação 2.

$$\text{Lipídios, \%} \left(\frac{m}{m} \right) = \frac{N * 100}{P} \quad (2)$$

sendo,

N= Massa de lipídios

P = Massa de amostra

3.1.1.3 Fibras

A partir da amostra desengordurada que restou da análise de lipídios, transferiu-se para um béquer a amostra adicionado de 200 mL de ácido sulfúrico 0,255 M. A mistura foi levada para equipamento com aquecimento em refluxo, mantendo-se em ebulição por 30 minutos. Após a ebulição, foi realizada a filtração lavando com água fervente e o retido foi novamente transferido para um béquer com auxílio de 200 mL de hidróxido de sódio 0,313 M. O béquer voltou ao equipamento por mais 30 minutos em ebulição e foi filtrado em cadinho de fundo sinterizado. O cadinho foi colocado em estufa à 100 °C até peso constante e após em mufla à 600 °C até peso constante. A perda de peso entre a estufa e a mufla será a quantidade de fibras da amostra.

3.1.1.4 Proteínas

Amostras de 0,5 g de folhas de erva-mate trituradas foram pesadas em papel livre de nitrogênio e transferiu-se para o balão de Kjeldahl. Adicionou-se um catalizador e 20 mL de ácido sulfúrico, levando a mistura ao digestor até a solução se tornar azul-esverdeada ou incolor, livre de material não digerido e deixou-se esfriar até temperatura ambiente. Transferiu-se 25 mL de ácido bórico em um erlenmeyer de 250 mL junto a algumas gotas de solução indicadora mista mergulhando o erlenmeyer na saída do condensador do equipamento. Ao balão de Kjeldahl adicionou-se 250 mL de água destilada, 80 mL de hidróxido de sódio 40% e transferiu-se o balão para o conjunto destilador. A destilação ocorreu até se obter 125 mL de destilado no erlenmeyer e a solução foi titulada com ácido clorídrico 0,1 M até mudança de coloração. Para calcular a porcentagem de proteínas totais na amostra foi utilizada a Equação 3.

$$Proteínas\ totais,\ \% \left(\frac{m}{m} \right) = \frac{(Va - Vb) * fc * F * 0,14}{P} \quad (3)$$

sendo,

Va= volume de HCL 0,1M gasto na titulação da amostra

Vb= volume de HCL 0,1M gasto na titulação do branco

fc= fator de correção da solução de HCL (0,1M)

F= 6,25 (valor médio)

P= Massa da amostra

3.1.1.5 Cinzas

Amostras de folhas de erva-mate trituradas foram pesadas em quantidade de 4 gramas em cadinho de porcelana previamente tarado e incinerou-se em bico de Bunsen até a carbonização. Os cadinhos foram transferidos para mufla a 550°C até destruição total da matéria orgânica, posteriormente esfriaram até temperatura ambiente em dessecador e foram pesados. Para calcular a porcentagem de cinzas na amostra foi utilizada a Equação 4.

$$\text{Cinzas \%} \left(\frac{m}{m} \right) = \frac{A * 100}{P} \quad (4)$$

sendo,

A= massa de cinzas

P= massa de amostra

3.1.1.6 Carboidratos digeríveis

A quantificação da porcentagem de carboidratos digeríveis é realizada através de cálculo de diferença, ou seja, soma-se os valores dos outros componentes químicos da amostra (umidade, lipídios, fibras, proteínas e cinzas) e o valor que falta para perfazer a totalidade de 100% são considerados então os carboidratos. Para calcular a porcentagem de carboidratos digeríveis na amostra foi utilizada a Equação 5.

$$\text{Carboidratos} = 100 - (\text{Umidade} + \text{Lipídios} + \text{Fibras} + \text{Proteínas} + \text{Cinzas}) \quad (5)$$

3.2 EXTRATO AQUOSO

A partir das folhas de erva-mate trituradas e congeladas foram produzidos extratos aquosos em diferentes concentrações. Foram utilizadas quantidades de 5, 10, 15 e 20 g de erva-mate adicionadas de 100 mL de água destilada a 90 ± 2 °C (MENINI et al., 2007), após 5 minutos a infusão foi filtrada e coletada através de funil com papel filtro e, em seguida, filtrada novamente em filtro de celulose de 0,2 µm. Estes extratos foram utilizados posteriormente para o ensaio em leveduras.

3.2.1 Caracterização do extrato aquoso

Após a elaboração dos extratos aquosos foram realizadas análises de quantificação de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante pelo método de captura de radical ABTS.

3.2.1.1 Compostos fenólicos totais

A análise foi realizada segundo metodologia de Sousa e Correia (2012), com adaptações. Em tubos de ensaio foram adicionados 1 mL de amostra, 1 mL de etanol 95%, 5 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 50 % (v/v). Os tubos foram agitados em vórtex por 30 segundos e após foi adicionado 1 mL da solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 5% e agitados por mais 3 segundos. Os tubos foram deixados em repouso na ausência de luz por 60 minutos. A amostra em branco foi preparada nas mesmas condições que a amostra, sendo o volume da amostra substituído por 1 mL de água. Os ensaios realizaram-se em triplicata e os resultados estão apresentados em mg equivalentes de ácido gálico/mL (mg EAG/mL) de amostra de acordo com uma curva analítica prévia, apresentada no Apêndice B.

3.2.1.2 Capacidade antioxidante pelo método do radical ABTS

A análise da atividade antioxidante pelo método do radical ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) baseia-se na captura deste pelos antioxidantes presentes na amostra, avaliando-se sua capacidade de transferir elétrons/hidrogênio para estabilizar o cátion radicalar ABTS, sendo convertido em uma forma não colorida de ABTS. Para isso, segundo RE et al. (1999), foi preparada uma solução com quantidades iguais de radical ABTS e persulfato de potássio, previamente misturadas de 12 a 16 horas antes da utilização para a análise e mantidas ao abrigo da luz. Seguindo o protocolo, foi adicionado 1 mL desta solução mista com 10 μL de amostra do extrato de erva-mate, homogeneizando-se em vórtex e após 6 minutos de reação no escuro foi feita a leitura em 734 nm com um Espectrofotômetro UV-Vis. Para a leitura dos resultados foi realizada uma curva analítica prévia de Trolox ($\mu\text{mol/L}$), apresentada no Apêndice B. Os ensaios foram feitos em triplicata e os resultados estão expressos μmol de Trolox /L de amostra.

3.3 TESTES *in vivo* COM *Saccharomyces cerevisiae*

Utilizou-se um modelo experimental *in vivo* para avaliar a ação protetora de extratos de erva-mate, em diferentes concentrações, frente a radiação gama na sobrevivência celular. Para isso, foram utilizadas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* haplóides SC7K lys2-3 (auxotróficas para lisina) gentilmente cedidas pelo Prof. Nelson Bracesco seguindo seu protocolo de estudo. Para a manutenção das cepas as leveduras estão sendo mantidas em placas de Petri contendo meio nutritivo YPDA no refrigerador a 4 °C.

3.3.1 Meios de cultivo utilizados

Meios de cultura nutritivos foram usados para estudar sobrevivência em *Saccharomyces cerevisiae*, descritos na literatura (ROSE; WINSTON; HIETER, 1990). A composição de cada meio encontra-se detalhado a seguir:

Meio nutriente líquido YPD: 1% de extrato de levedura (Difco, US Biological, Cleveland, EUA), 2% de bactopectona (Difco, US Biological, Cleveland, EUA) e 2% de glicose (Sigma, St. Louis, EUA).

Meio nutriente sólido YPDA: YPD e 2% ágar (Difco, US Biological, Cleveland, USA).

3.3.2 Preparo das leveduras para os testes

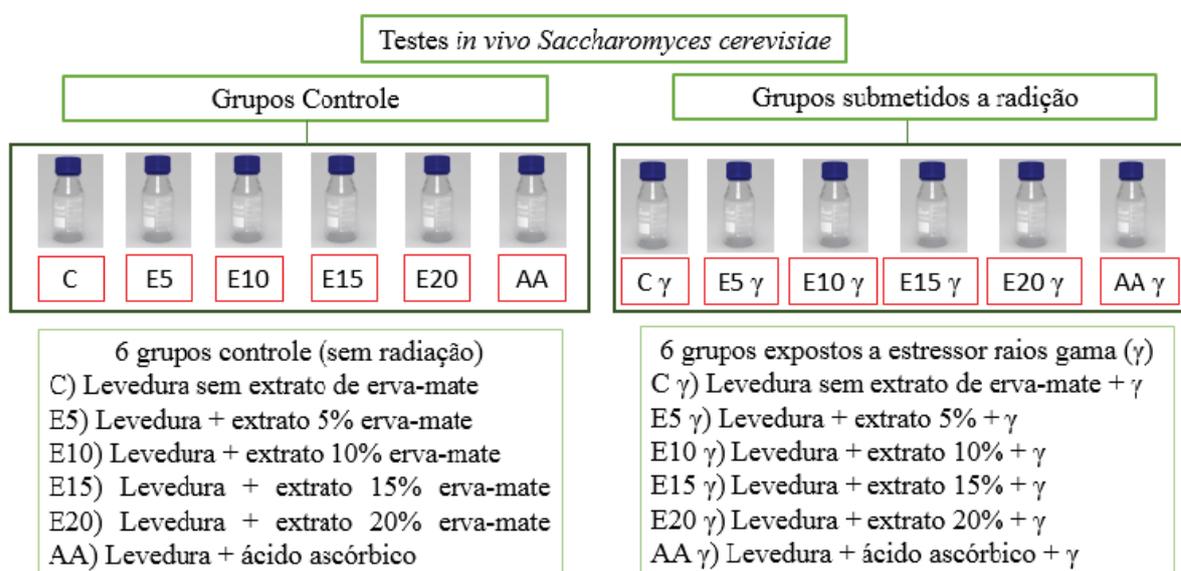
Para o início dos experimentos foi feito o crescimento das populações celulares utilizando-se uma amostra da cepa. Retirou-se então uma colônia isolada do meio de cultura YPDA sob condições estéreis e fez-se uma primeira transferência para um frasco contendo mesmo meio YPD líquido, incubando-a durante 3 dias, sob agitação contínua a 30 ° C, em um agitador orbital. Esta primeira transferência objetivou reativar a levedura que estava em meio refrigerado, por isso deixou-se incubando em meio nutritivo por período mais longo de tempo, atingindo desta maneira uma fase estacionária precoce ($N = 1-3 \times 10^8$ células/mL), o crescimento máximo populacional antes do declínio celular. A partir desta primeira transferência foi realizada uma segunda transferência, que consistiu em diluir uma fração da cultura celular a partir da primeira transferência em YPD, incubando-se durante 18 horas a 30

°C com agitação contínua de modo que se obteve uma fase exponencial de crescimento celular ($N = 1-3 \times 10^7$ células/mL), necessária para a realização dos ensaios posteriores.

3.3.3 Delineamento experimental

Foram utilizadas culturas de fase de crescimento exponencial ($N = 1-3 \times 10^7$ células/mL) as quais foram divididas em frascos e submetidas a diferentes tratamentos, como demonstra o delineamento experimental na Figura 2.

Figura 2 - Delineamento experimental do teste com leveduras.



Fonte: próprio autor (2019).

Para a realização dos testes, de acordo com a Figura 2, foram formados 12 grupos todos contendo células de leveduras. Iniciando-se com os seis grupos controles, que não foram expostos a nenhum estressor, compreendendo um grupo somente com células de leveduras, quatro grupos de extratos aquosos de erva-mate, respectivamente 5%, 10%, 15% e 20%, mais levedura e um grupo contendo levedura e solução de ácido ascórbico 5mM (FUJII et al., 2010) atuando como um antioxidante de referência. Seguindo o protocolo, outros seis grupos foram igualmente formados como descrito anteriormente com a adição da exposição a um estressor, neste caso utilizou-se a radiação gama. As amostras foram irradiadas em frascos de vidro com ou sem extrato de erva-mate ou ácido ascórbico. Todos os tratamentos foram adicionados aos frascos contendo células de leveduras uma hora antes da irradiação e a dose absorvida por cada frasco foi de 200Gy (Dosimetria: dosímetro de polimetilmetacrilato - Harwell Amber 3042 S),

previamente estabelecida por uma curva dose efeito com diferentes doses absorvidas (Da) de raios gama na faixa de 0 a 200 Gy. Após o tratamento os frascos foram mantidos em gelo antes do processamento das amostras, sendo posteriormente feita a análise de sobrevivência celular.

3.3.4 Análise de sobrevivência celular

Para determinar a sobrevivência celular, as células de leveduras de cada grupo após tratamentos, demonstrados na Figura 2, foram adequadamente diluídas. Logo, as amostras foram semeadas em placas de Petri contendo meio YPD (0,2 mL/placa, 3 placas por dose) e incubadas a 30 °C em estufa por 3 dias. Após crescimento o número de colônias foi contado e a sobrevivência celular foi calculada para cada tratamento, de acordo com a Equação 6. A probabilidade de sobrevivência foi estimada através dos valores médios da contagem das colônias de três placas de Petri (UFC/mL).

3.4 MICROCÁPSULAS

Foram produzidas microcápsulas a partir de extrato de erva-mate liofilizado para posterior aplicação em estudo com ratos Wistar, visando compreender mais sobre a liberação e absorção dos compostos bioativos da erva-mate no organismo, bem como na modulação da atividade antioxidante *in vivo*.

3.4.1 Extrato liofilizado

A partir das folhas de erva-mate trituradas e congeladas foram produzidos extratos aquosos a 15%, com 15 g de liofilizado de erva-mate para 100 mL de água. Esta concentração foi determinada preliminarmente, por comparação de valores de compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante por ABTS e ensaios *in vivo* com leveduras *Saccharomyces cerevisiae*.

Para a elaboração do extrato utilizaram-se 15 g de erva-mate adicionadas de 100 mL de água, permanecendo esta solução em banho aquecido a 100 °C durante 5 minutos, de acordo com método de Negrão-Murakami et al. (2011) com adaptações. Após, o extrato foi filtrado em bomba à vácuo para separação dos resíduos. A partir do extrato pronto, este foi colocado em bandejas com aproximadamente 250 mL cada, foram acondicionadas a – 80 °C em ultrafreezer por 24 h e posteriormente permaneceram em equipamento liofilizador (LS 3000 Terroni) a – 40°C, com pressão de 700 mmHg, por 96 h em média até estarem com o extrato completamente

seco. O processo de liofilização teve como intuito fazer a concentração dos compostos de interesse da erva-mate para a elaboração posterior das microcápsulas.

3.4.2 Caracterização do extrato liofilizado

Após obtenção do extrato de erva-mate liofilizado este foi caracterizado quanto sua composição através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido Flexar Perkin Elmer, contendo bomba binária com gerenciamento de solventes e desgaseificador, com injetor automático Auto sampler Flexar LC (volume de injeção foi de 20 μ L), e com detector de comprimento de onda variável Flexar PDA, ajustado em 280 nm. Os comprimentos de onda 330 e 225 nm também foram monitorados.

Para fase estacionária, foi utilizada uma coluna ACE C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m). Para a fase móvel, foi utilizado acetonitrila (grau HPLC) (solvente B) e água ultrapura (obtida em sistema Direct-Q da Millipore®) pH 3,1 ajustado com ácido fosfórico (solvente A), em modo de eluição gradiente. Durante 7 minutos foi utilizado as proporções (89:11, A:B), após este período (85:15, A:B) por 6 minutos, em seguida (91:9, A:B) por 6 minutos e para finalizar (89:11, A:B) por 2 minutos. O fluxo de fase móvel foi de 0,8 mL/min. As injeções foram feitas de modo gradiente.

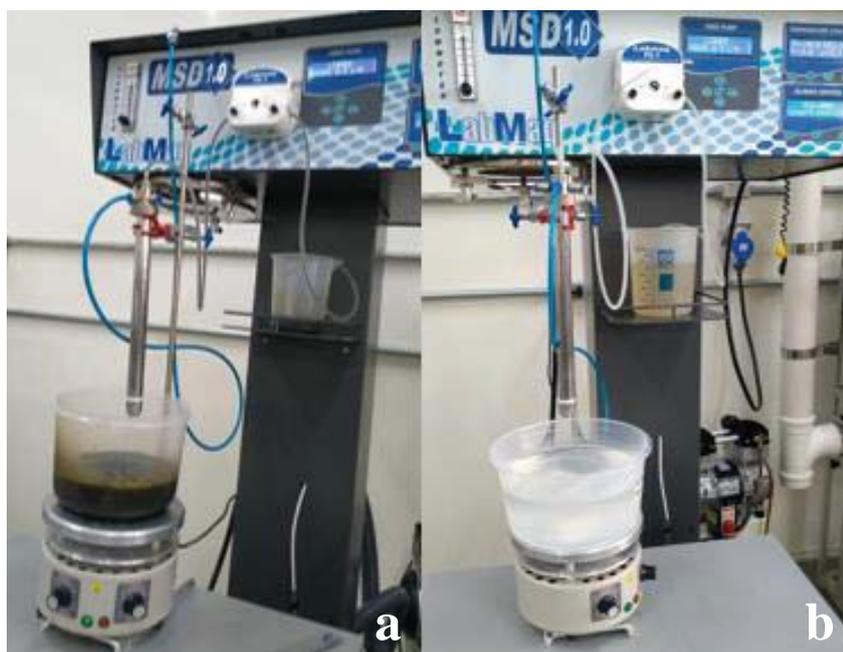
O método foi adaptado de Favaretto (2014). Foram pesquisadas as substâncias químicas de referência (SQR) ácido ferúlico (99%, Sigma Aldrich, lote STBC5005V), cafeína (Sigma Aldrich, lote C0750), ácido clorogênico (>95% Sigma Aldrich, lote SLBS0103V) e teobromina (>99% Sigma Aldrich, lote BCBS1162V). Para o preparo das fases móveis utilizou-se água ultrapurificada obtida pelo Sistema Directi-Q – Millipore®/Millipore Corporation (EUA), acetonitrila e metanol grau HPLC e ácido fosfórico e acético grau PA. As soluções das SQRs contendo 1000 μ g/ mL foram preparadas dissolvendo 0,01 g de cada SQR em balão volumétrico de 10 mL com metanol grau HPLC. De cada uma das SQRs foram construídas curvas de calibração prévias no mesmo dia da avaliação, no intervalo de 50 a 150 μ g/mL.

As amostras para análise por CLAE foram preparadas utilizando 50 mg de extrato de erva-mate liofilizado em 5 mL de água ultra pura. A solução foi filtrada com papel filtro e em membranas de porosidade 0,45 μ m (Millipore) antes de serem injetadas no sistema. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados estão apresentados em microgramas de composto de interesse por ml (mcg/ml) de extrato e também em porcentagem.

3.4.3 Elaboração das microcápsulas

As microcápsulas foram desenvolvidas através da técnica de geleificação iônica externa seguindo os princípios descritos por Yan et al. (2014) com modificações. O método consistiu em elaborar uma solução contendo alginato de sódio (1,5%) e extrato de erva-mate liofilizado (7,5%). A proporção entre alginato (material de parede) e extrato de erva-mate (substância de interesse a encapsular-se) foi de 1:5. Esta mistura ficou sob agitação até estar completamente homogênea e foi atomizada utilizando compressor de ar e bomba peristáltica acoplados a um extensor e um bico atomizador número 3 (LabMq) em solução de cloreto de cálcio 1,1%, como demonstra a Figura 3. A proporção da solução de alginato com extrato de erva-mate para a solução reticulante de cloreto de cálcio foi de 1:2. Foram utilizados parâmetros de vazão de alimentação de 0,3 L/h, fluxo de ar de 10 L.min⁻¹, pressão de 3 bar e altura de 8 ± 0,5 cm entre o líquido reticulante e o bico aspersor.

Figura 3 - Produção de microcápsulas de erva-mate (a) e vazias (b).



Fonte: elaborado pelo próprio autor (2019).

Após a formação das cápsulas, estas continuaram sob agitação por 30 minutos na solução de cloreto de cálcio para total reticulação. Posteriormente, as cápsulas foram filtradas em bomba a vácuo, logo após foram congeladas e liofilizadas. Também foram produzidas microcápsulas vazias, sem a presença de extrato de erva-mate, seguindo o mesmo procedimento para atuarem como cápsulas controle no ensaio *in vivo* posterior.

3.4.4 Avaliação da eficiência de microencapsulação

Após a formação das microcápsulas foi realizada avaliação da sua eficiência de encapsulação. Para tal, o residual da solução reticulante foi filtrado e submetido a quantificação de compostos fenólicos totais. Através da relação entre a quantidade de compostos fenólicos do extrato liofilizado de erva-mate inicial e do seu residual não encapsulado foi avaliada a eficácia da encapsulação, conforme a Equação 8. A análise foi realizada em triplicata a cada produção de microcápsulas e os resultados estão apresentados em porcentagem.

(8)

$$EE\% = (AA_0 - AA_R * 100) / AA_0$$

sendo,

AA₀: Atividade antioxidante do extrato inicial;

AA_r: Atividade antioxidante do resíduo.

3.4.5 Avaliação do tamanho de partícula

A distribuição de tamanho de partícula foi analisada utilizando a técnica de difração de raios laser, com faixa de medida de 0,10 a 2000 µm. Utilizando o equipamento *Bettersizer S2* foram adicionadas as microcápsulas liofilizadas no equipamento utilizando água como meio de dispersão. Os resultados da distribuição de tamanhos disponibilizados pelo *software* do equipamento incluem parâmetros estatísticos da curva de distribuição de tamanhos, tais como: - D[4,3] diâmetro médio volumétrico, assumindo partículas esféricas com o mesmo volume que as partículas reais; - D[3,2] diâmetro médio de área superficial, considerando partículas esféricas com a mesma área superficial que as partículas reais; - D10 diâmetro abaixo do qual se encontra 10% do volume total das partículas; - D50 diâmetro abaixo do qual se encontra 50% do volume total das partículas; - D90 diâmetro abaixo do qual se encontra 90% do volume total das partículas; - Span ou largura da distribuição, dada pela Equação 9. A avaliação do tamanho de partícula foi realizada em triplicata e os resultados estão apresentados em micrômetros (µm) em todos parâmetro citados de D10, D50 e D90.

(9)

$$Span = \frac{D90 - D10}{D50}$$

3.4.6 Caracterização físico-química

A microcápsulas de erva-mate foram caracterizadas através da determinação do teor de umidade, lipídio, proteína e cinzas propostas pelo IAL (2008) e o cálculo de carboidratos foi realizado por diferença. A umidade foi determinada em estufa a 105 °C, o teor de cinzas em mufla a 550 °C e o conteúdo de lipídios foi determinado utilizando extrator de Soxhlet, hexano como solvente e 6 horas de refluxo, sendo os resultados calculados por diferença gravimétrica. A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Kjeldhal. Os resultados estão apresentados em porcentagem com as respectivas estimativas do desvio padrão e as análises realizaram-se em triplicata.

3.4.7 Solubilidade em água

A solubilidade das microcápsulas foi determinada segundo a metodologia descrita por Cano-Chauca et al. (2005), com adaptações. Para as análises foi utilizado 1 g de microcápsulas liofilizadas adicionada à 100 mL de água destilada, obtendo-se uma suspensão. Esta foi agitada em agitador magnético por 5 min em velocidade máxima e temperatura ambiente. Posteriormente filtrou-se a suspensão em tela de nylon utilizando bomba de vácuo e em seguida foram colocados 25 mL do filtrado em placa de Petri seca e vazia, com massa conhecida a qual levou-se à estufa a 105 °C, por 5 h. A solubilidade das microcápsulas em água foi analisada em duplicata. O cálculo foi realizado pela diferença de massa e os resultados foram expressos em percentual.

3.4.8 Avaliação Morfológica

As microcápsulas foram observadas através de microscopia óptica para verificar sua morfologia. As características superficiais (externas) foram avaliadas através do uso de microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando microscópio modelo VEGA3 Tescan, do Parque Tecnológico da UPF. Foram realizadas micrografias das amostras, após serem colocadas sobre os suportes (stubs), com fita 52 de carbono dupla face e recobertas com uma fina camada de ouro em metalizador Quorum Q150R ES, para melhorar a condutividade elétrica. As observações foram realizadas com aceleração de 20 kV. Uma amostra das microcápsulas vazias também foi submetida à observação. As imagens apresentadas são resultados de aumentos (*zoom*) de 400 e 800 vezes.

3.4.9 Avaliação por Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O extrato de erva-mate liofilizado, suas microcápsulas e as microcápsulas vazias foram analisados por espectroscopia na região do infravermelho para identificar os grupamentos funcionais presentes. As condições operacionais foram região de varredura 4000 a 650 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e o registro dos espectros se deu através de Transmitância (%T). Os espectros foram obtidos por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), utilizando equipamento Cary 630 FTIR, Agilent Technologies, do Parque Tecnológico da UPF.

3.5 TESTES *in vivo* COM RATOS WISTAR

Com o objetivo de investigar os efeitos do extrato de erva-mate microencapsulado comparado ao extrato livre quanto a atividade antioxidante foi executado um estudo *in vivo* no modelo de roedores. Para a realização desta etapa foram utilizados 32 ratos machos adultos da linhagem wistar provenientes do Biotério da UPF. Ao início da pesquisa os ratos tinham 12 semanas de vida, com aproximadamente 180 g de peso corporal e foram alocados em gaiolas com cama de maravalha, respeitando uma lotação máxima de quatro ratos por gaiola. Os ratos foram mantidos em um ambiente com temperatura controlada de aproximadamente $22 \pm 1^\circ\text{C}$, com exaustão do ar, em um ciclo claro-escuro de ± 12 horas, com acesso a água e ração *ad libitum*.

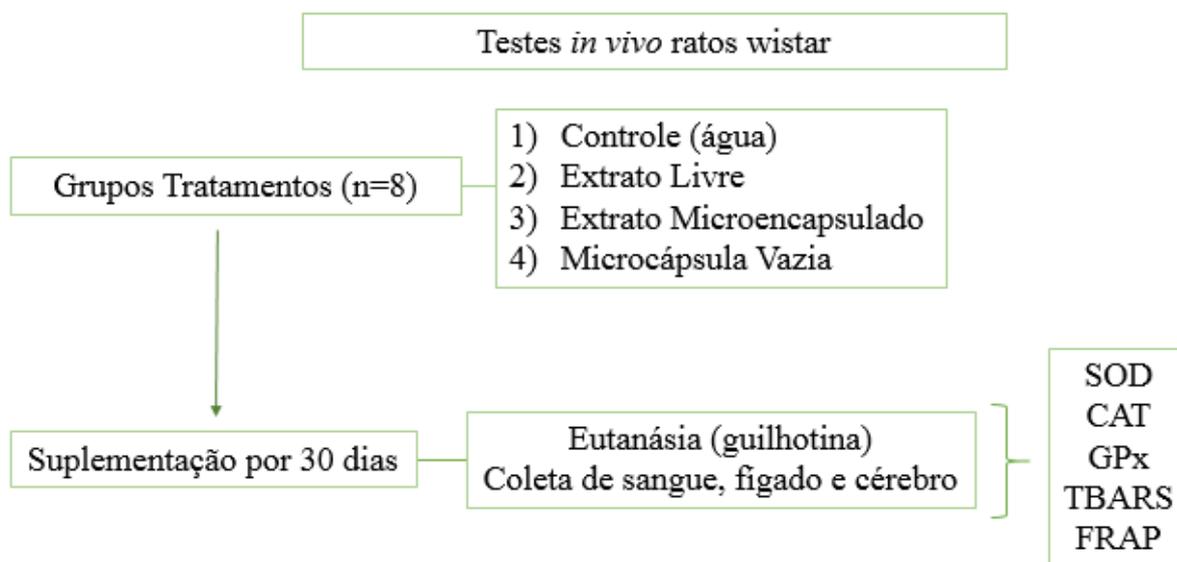
3.5.1 Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado e registrado sob nº 043/2017 pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Passo Fundo (UPF).

3.5.2 Delineamento experimental

32 ratos foram divididos randomicamente em quatro grupos de tratamentos (n=8), como demonstra a Figura 4, sendo estes: Controle (C) que consiste somente em água, Extrato Livre (EL), Extrato Microencapsulado (EM) e Microcápsula Vazia (MV).

Figura 4 - Delineamento experimental do teste com ratos.



Fonte: próprio autor (2019).

Cada grupo recebeu seus respectivos tratamentos durante o período de 30 dias, uma vez ao dia, no turno da manhã. A administração das suplementações foi feita via gavagem (oral) e além dos tratamentos os animais tiveram acesso a água e ração *ad libitum*. A dose dos tratamentos foi estimada no consumo médio diário de compostos fenólicos, segundo Taguchi et al. (2015) com adaptações. Com isso, foi estabelecida uma dose-efeito de 28,57 mg de compostos fenólicos/kg, como a dose foi de acordo com peso de cada animal semanalmente os ratos eram pesados para o ajuste da dose-efeito. Ao final do período de intervenção os ratos foram realocados no Biotério Setorial da UPF onde ocorreu o sacrifício.

3.5.3 Coleta de material

Após o período de 30 dias de tratamento os ratos foram devidamente anestesiados com Isoflurano® e logo eutanaziados por guilhotina manual. Imediatamente após foi coletado seu sangue (em média 5 mL) através de funil, por inversão do corpo dos animais. As amostras de sangue foram coletadas em frascos na presença de anticoagulante EDTA e foram centrifugadas a 1500 x g por 15 minutos para separação e retirada do plasma. O fígado e o cérebro também foram retirados imediatamente, homogeneizados com tampão fosfato de potássio 20mM pH 7,5 e solução de cloreto de sódio 150mM, respectivamente, e centrifugados a 1500 x g por 15 minutos. O sobrenadante das amostras de sangue, fígado e cérebro após serem homogeneizadas, foi retirado e aliqotado em volumes de 500 µL em microtubos eppendorfs previamente

identificados e prontamente congelados para posterior realização das análises de superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, proteínas, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e determinação do poder de redução do íon ferro.

3.5.4 Superóxido dismutase (SOD)

Para medir a atividade da enzima SOD no fígado foi realizada uma análise cinética iniciada após a adição de adrenalina, segundo metodologia de Misra e Fridovich (1972). A leitura espectrofotométrica foi medida em triplicata a 480 nm e os dados foram corrigidos pelo teor de proteína da amostra. Os valores da enzima estão expressos em $\mu\text{g SOD/mg proteína}$.

3.5.5 Catalase (CAT)

A atividade da enzima CAT foi determinada nos tecidos fígado, cérebro e plasma através do decaimento de absorbância do peróxido de hidrogênio, segundo metodologia de Aebi (1984). A leitura espectrofotométrica foi medida em triplicata a 240 nm e os dados foram corrigidos pelo teor de proteína da amostra. A atividade enzimática está expressa em $\text{nmol de H}_2\text{O}_2$ reduzidos/minuto/mg proteína.

3.5.6 Glutathione Peroxidase (GPx)

A atividade da enzima GPx foi determinada nos tecidos fígado e cérebro pelo consumo de NADPH a partir da adição do peróxido de hidrogênio 0,4 mM, segundo metodologia de Flohé e Günzler (1984). A leitura espectrofotométrica foi medida em triplicata a 340 nm e a atividade da GPx foi determinada usando a extinção molar coeficiente $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os dados foram corrigidos pelo teor de proteína da amostra e estão expressos em $\text{nmol de H}_2\text{O}_2$ reduzidos/minuto/mg proteína.

3.5.7 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica foi estimada nos tecidos fígado e cérebro pela medição de TBARS de acordo com o método de Buege e Aust (1978). A leitura espectrofotométrica foi medida em triplicata a 532 nm e a absorbância foi comparada com curva analítica previamente

desenvolvida usando malonaldeído (MDA) como padrão, como demonstrado no Apêndice B, e corrigidos pelo conteúdo de proteína. Os valores estão expressos em nmol MDA/mg proteína.

3.5.8 Proteína

O teor de proteína foi determinado em todas as amostras para correção nos cálculos de atividade enzimática. O protocolo utilizado foi segundo método descrito por Bradford (1976) utilizando o corante Comassie brilhante azul. O conteúdo de proteína foi medido em triplicata a 595 nm e a absorvância foi comparada com curva analítica previamente desenvolvida, demonstrada no Apêndice B, usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

3.5.9 Determinação do poder de redução do íon ferro (FRAP)

A avaliação do potencial antioxidante através da redução férrica foi realizado no cérebro e plasma segundo metodologia descrita por Benzie e Strain (1996) com adaptações de Arnous et al. (2002). A quantificação da capacidade antioxidante foi medida em triplicata a 620 nm e a absorvância foi comparada com curva analítica previamente desenvolvida, demonstrada no Apêndice B, usando ácido gálico como padrão. Os dados estão expressos em $\mu\text{g EAG/mL}$ de amostra.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram primeiramente submetidos a teste de Shapiro-Wilk para verificar se havia distribuição normal. Dados considerados paramétricos foram avaliados utilizando Análise de Variância com pós teste de Tukey. No caso de dados não paramétricos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Student-Newman-Keuls. O programa estatístico utilizado foi o SPSS 23 e o nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA ERVA-MATE

Embora a composição da erva-mate já seja conhecida na literatura científica, esta possui fatores naturais intrínsecos que podem modificar sua caracterização, como tipo de planta e condições ambientais de cultivo. O processamento aplicado a mesma é capaz de alterar os valores de seus componentes e a qualidade sensorial do produto final (EFING et al., 2009; ESMELINDRO et al., 2002). A caracterização físico-química da erva-mate está demonstrada na Tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização físico-química da folha de erva-mate.

Análises	(%)
Umidade	3,41±0,23
Lipídios	5,67±0,17
Fibras	31,64±2,45
Proteínas	13,87±0,27
Cinzas	5,69±0,08
Carboidratos digeríveis	39,72±2,45

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Fonte: próprio autor (2019).

Em relação a umidade, a Anvisa estabelece que os valores para erva-mate comercial devem estar entre 3,65% a 5,89% (BRASIL, 2002). Em nossa amostra, conforme a Tabela 1, o teor de umidade verificado foi de 3,41%. Industrialmente a erva-mate após a colheita passa por um tratamento que consiste basicamente em sapeco, secagem e cancheamento. A primeira etapa de sapeco é o contato rápido das folhas direto com o fogo, por meio de um equipamento de cilindro metálico, objetivando a retirada da umidade e inativação de enzimas oxidantes (ESMELINDRO et al., 2002). Apesar da matéria-prima deste estudo ser submetida a processo de secagem diferente do industrial, os teores de umidade foram semelhantes. A análise de umidade é um fator de controle importante, pois um baixo teor de água garante a estabilidade microbiológica do produto ao longo do tempo (HENRIQUE, 2018).

De acordo com a Tabela 1, verificamos que os carboidratos digeríveis são o elemento de maior quantidade na erva-mate, perfazem quase 40% da sua composição e são responsáveis

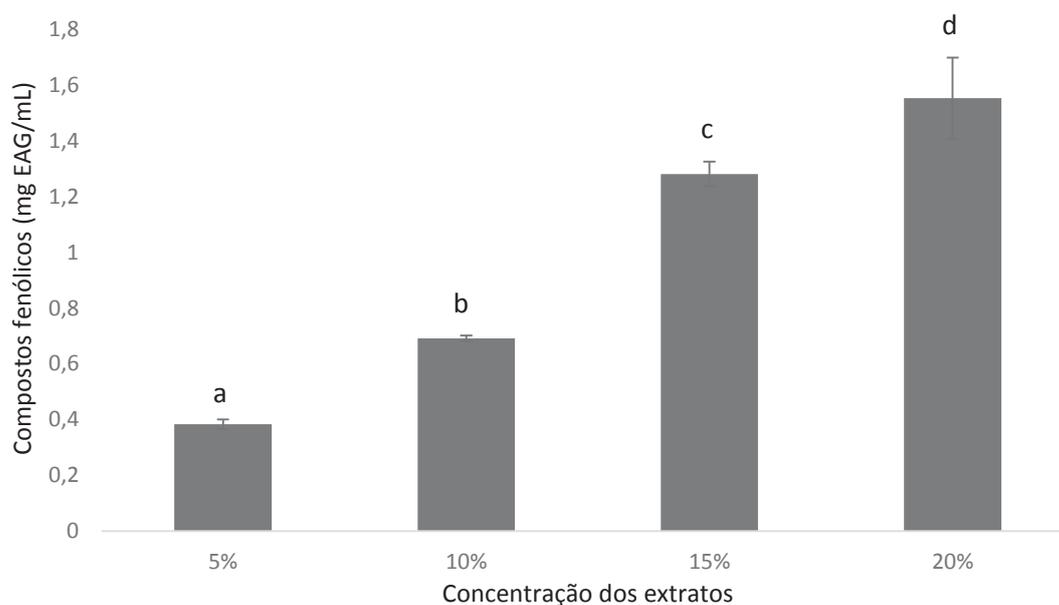
principalmente pelo aporte energético do organismo. Este valor de carboidratos é comum em ervas tradicionais, não adicionadas de açúcar (SANTOS et al., 2014). As fibras são o segundo componente detectado em maior número na amostra. Representam 31,64% da composição, sendo um valor significativo deste item, principalmente ponderando a adição desta matéria-prima em produtos alimentícios, o que irá agregar no seu valor de fibras. Em seguida, as proteínas completam em 13,87% a composição centesimal da amostra. Estas macromoléculas são fundamentais na síntese proteica e estão presentes também em um nível considerável na erva-mate (BRAGHINI et al., 2014).

A erva-mate não é uma matéria-prima com grandes quantidades de lipídios, por isso apresentaram um valor modesto de 5,67% na amostra. Bem como, para a análise de cinzas sua quantificação foi em torno de 5,7%. Contudo, nem sempre o teor de cinzas representa toda a substância inorgânica presente na amostra, pois alguns sais podem sofrer redução ou volatilização nesse aquecimento (EFING et al., 2009; HENRIQUE, 2018).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS

Os extratos aquosos de erva-mate em diferentes concentrações (5%, 10%, 15% e 20%) foram caracterizados pela quantificação dos seus compostos fenólicos totais e os resultados estão apresentados na Figura 5.

Figura 5 - Compostos fenólicos totais em diferentes concentrações de extratos de erva-mate.



Resultados expressos como média \pm desvio padrão. Letras diferentes significam que há diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Fonte: próprio autor (2019).

Salienta-se que todos extratos foram desenvolvidos a partir de uma mesma amostragem de folhas de erva-mate, submetidos ao mesmo processo de secagem e armazenamento. De acordo com a Figura 5, podemos observar que houve diferença significativa entre todas as concentrações dos extratos aquosos. O extrato de erva-mate a 5% apresentou a menor média ($0,38 \pm 0,01$ mg EAG/mL de extrato) enquanto que a concentração de 20% apresentou a maior média ($1,55 \pm 0,14$ mg EAG/mL de extrato). Com estes resultados podemos inferir que a porção de matéria-prima foi diretamente proporcional a quantificação dos compostos fenólicos nos extratos de erva-mate.

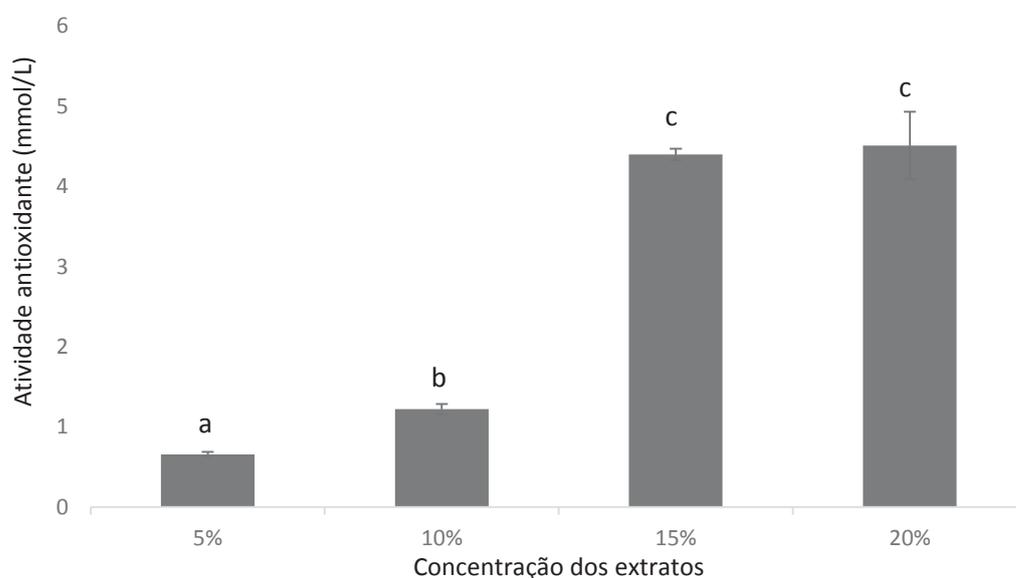
Os compostos fenólicos são um extenso grupo de substâncias que contêm um anel de benzeno ligado com um ou mais grupos hidroxila, característica que confere a estes compostos propriedades antioxidantes, tanto para alimentos quanto para o organismo. Encontram-se em grande quantidade na erva-mate, somente os polifenóis representam de 7 a 10% do peso seco de suas folhas (BRAVO; GOYA; LECUMBERI, 2007; GÓMEZ-JUARISTI et al., 2018; HECK; DE MEJIA, 2007).

A quantificação dos compostos fenólicos geralmente demonstra forte correlação com sua capacidade antioxidante total. Muitos autores já discorreram sobre esta relação positiva entre fenólicos e atividade antioxidante em frutos e plantas (BARBI, 2016; SANTOS et al., 2018a; SILVA et al., 2007). No entanto, outras pesquisas demonstram que não há necessariamente uma correlação, devido algumas variáveis como a metodologia de quantificação, os antioxidantes testados e das características hidrofóbicas e/ou hidrofílicas do sistema (LIMA et al., 2012; WU et al., 2004). O método de escolha para a quantificação possui grande importância, embora o método de Folin-Ciocalteu seja o mais utilizado, seu reagente pode interagir com outros compostos não fenólicos, promovendo resultados superestimados dos fenólicos totais (GEORGÉ et al., 2005).

Apesar dos compostos fenólicos serem reconhecidos pelo poder antioxidante, seu potencial não depende somente da sua quantidade, mas sim do tipo destes compostos, seu grau de glicosilação e coeficiente de partição (HASSIMOTTO; GENOVESE; LAJOLO; 2005). Portanto, além da presença destes componentes seu arranjo molecular vai determinar sua atividade. Inclusive, existem modelos equacionais que conseguem estabelecer a relação quantitativa da estrutura e atividade de antioxidantes fenólicos. Com base nestas equações pode-se explicar os fatores de contribuição físico-químicos para a atividade antioxidante (LIEN et al., 1999).

Por isto, neste trabalho além de quantificarmos os compostos fenólicos nos extratos de erva-mate realizou-se a análise da atividade antioxidante dos mesmos, através da redução do radical ABTS, e os resultados podem ser observados na Figura 6.

Figura 6 - Capacidade antioxidante de extratos de erva-mate diferentes concentrações.



Resultados expressos como média \pm desvio padrão. Letras diferentes significam que há diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Fonte: próprio autor (2019).

A análise de ABTS, segundo a Figura 6, demonstrou que os extratos com melhor capacidade antioxidante foram o de 15% e 20% com médias de $4,39 \pm 0,07$ e $4,51 \pm 0,14$ (mmol de Trolox/L de extrato), respectivamente, sem diferença significativa entre eles. Apesar do extrato de 20% possuir maior quantidade de compostos fenólicos, mostrado na Figura 5, a capacidade antioxidante deste foi igual ao extrato de 15%.

No entanto, diferentemente de nossos achados, Bravo, Goya e Lecumberi (2007) demonstraram que as preparações de chá mate com maior teor de fenólicos resultou em um aumento da capacidade antioxidante, por meio de ensaios de FRAP e ABTS. Através destas análises, Baeza et al. (2017) e Gullón et al. (2018) igualmente relacionaram a capacidade antioxidante de diversos chás ao seu conteúdo fenólico. Entretanto, para a análise de DPPH, Gullón et al. (2018) não evidenciaram esta relação no chá de erva-mate.

Não há consenso na literatura quanto a esta correlação, é importante ressaltar que a atividade antioxidante dos fenólicos pode ser modificada pela sua estrutura química principalmente pela questão da disponibilidade destes compostos. A biodisponibilidade difere muito de um polifenol para outro, portanto, os polifenóis mais abundantes na dieta não são

necessariamente aqueles que levam às maiores concentrações de metabólitos ativos nos tecidos alvo (MANACH et al., 2005). Peres et al. (2013) determinaram a atividade antioxidante individual dos principais componentes fenólicos da erva-mate através do radical ABTS mostrando que a capacidade antioxidante não foi proporcional às concentrações dos mesmos. A maior concentração de fenólicos identificados foram os ácidos cafeoilquínicos, no entanto, estes não representaram o principal contribuinte para a capacidade antioxidante da erva-mate no estudo.

A simples caracterização dos extratos não nos permite entender de que forma ocorre a contribuição do consumo de erva-mate para a atividade antioxidante e seus efeitos biológicos *in vivo*. Para isso, testaram-se em uma segunda etapa os extratos de erva-mate nas mesmas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20% em um modelo de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. O intuito da utilização deste modelo *in vivo* foi verificar qual extrato de erva-mate adicionado ao meio de cultura das leveduras era mais eficaz na sua defesa antioxidante diante o estressor raios gama, através da análise de sobrevivência.

4.3 TESTES *in vivo* com *Saccharomyces cerevisiae*

Os resultados do ensaio de sobrevivência consta na Tabela 2. Podemos observar para o teste de sobrevivência que os maiores índices de crescimento celular estão concentrados nos grupos controles: Controle, Extrato 5%, Extrato 10%, Extrato 15%, Extrato 20% e Ácido ascórbico. Os valores de sobrevivência destes controles apresentaram diferença significativa perante os grupos γ (gama), γ + extrato 5% e γ + extrato 10%.

Em seguida, podemos constatar que o grupo γ + ácido ascórbico não apresentou diferença significativa ao ácido ascórbico, demonstrando que houve um crescimento similar ao seu controle. Já os grupos γ + extrato 15% e γ + extrato 20% conseguiram apresentar valores semelhantes de sobrevivência em comparação a todos os controles, sem diferença significativa, demonstrando que os extratos de erva-mate de 15% e 20% mantiveram a viabilidade celular padrão apesar das radiações ionizantes.

Na análise de sobrevivência quanto mais leveduras crescerem significa um melhor desempenho do grupo. Para os que foram irradiados, normalmente, ocorreria uma diminuição da viabilidade celular pela ação do estressor, já que a radiação gama possui uma ação ionizante ocasionando morte celular ou mutagênese. Entretanto, estas reações podem ser reversíveis através de mecanismos redox pela ação de compostos antioxidantes únicos ou em conjunto (REISZ et al., 2014). Se o crescimento celular dos grupos γ + extrato 15% e γ + extrato 20%

igualaram-se aos controles, valores tidos como padrão de crescimento, quer dizer que houve uma certa proteção das células pelos componentes da erva-mate nestas células. Apesar destes extratos não apresentarem diferença significativa diante dos outros grupos que foram irradiados.

Tabela 2 - Sobrevida do ensaio com leveduras.

Grupo	Sobrevida (UFC/mL)
Controle	400,00±67,55 a
Extrato 5%	372,00±71,63 ab
Extrato 10%	383,00±154,06 abc
Extrato 15%	391,00±71,14 abc
Extrato 20%	379,00±67,43 abc
Ácido ascórbico	367,00±64,09 abcd
γ (gama)	59,83±0,90 e
γ + extrato 5%	75,80±6,39 e
γ + extrato 10%	71,80±8,02 e
γ + extrato 15%	135,63±11,39 abcde
γ + extrato 20%	100,00±12,08 abcde
γ + ácido ascórbico	83,77±13,79 de
p-valor	0,0010

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p>0,05$). UFC: Unidades Formadoras de Colônia.

Fonte: elaborado pelo autor (2019).

O modelo de leveduras é ótimo para verificação do efeito de certos compostos no funcionamento das células *in vivo*. Isto ocorre pela sua capacidade rápida de resposta as modificações do ambiente, como um estímulo ou submissão a estressores (KESZENMAN; CANDREVA; NUNES, 2000). Em ensaio com leveduras geneticamente deficientes em defesas antioxidantes, Piovezam-Borges e colaboradores (2016) compararam o efeito protetor de dois extratos, o de chá preto e mate, sobre a sobrevida destas leveduras. Os autores demonstraram que ambos estimularam o crescimento de cepas de *S. cerevisiae*, sendo que o extrato de erva-mate se mostrou melhor para o crescimento das leveduras em relação ao chá-preto.

Outra pesquisa realizada com leveduras avaliou a atividade antioxidante de compostos isolados como flavonoides, ácido ascórbico e vitamina E em células submetidas ao estressor apomorfina. Soares, Andrezza e Salvador (2003) mostraram que proteção dos flavonoides foi

superior as outras substâncias. Nota-se que os compostos flavonoides, responsáveis pelo aumento da sobrevida descrito pelos autores, estão presentes também nos extratos de erva-mate. Apesar do seu mecanismo de ação antioxidante não ser bem esclarecido, possivelmente ocorre devido a sua capacidade em doar hidrogênios para os radicais livres, estabilizando-os e impedindo o estresse oxidativo de danificar os tecidos causando morte celular. Além do mais, alguns flavonoides podem complexar-se com metais, diminuindo a geração de radicais hidroxila (BRACESCO et al., 2007).

Quando substâncias separadas são estudadas é possível identificar exatamente o composto responsável pela ação no organismo. O extrato de erva-mate por se tratar de uma matriz complexa possui uma variedade de compostos desde nutricionais, como carboidratos, vitaminas e minerais, até antioxidantes, como compostos fenólicos, metilxantinas e saponinas. Devido a esta vasta gama de componentes não podemos atribuir os efeitos no aumento da sobrevivência a apenas um deles, segundo Bracesco et al. (2007) este grupo de compostos possivelmente age sinergicamente neutralizando as EROs por mecanismos de redução e/ou captura destes.

O extrato de erva-mate representa uma forma de consumo conveniente, já que pode ser vantajoso obter essa diversificação de substâncias em um mesmo produto. Assim como a atividade antioxidante pode depender de muitos compostos, salienta-se que a determinação da capacidade antioxidante *in vivo* também resulta de vários elementos como o microrganismo aplicado, agente estressor escolhido, tipo de extrato/composto adicionado ao meio, entre outros (SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2003).

Quando reunimos nossos resultados de caracterização do extrato de erva-mate, compreendido pela quantificação de compostos fenólicos e atividade antioxidante por ABTS, e os resultados obtidos *in vivo* pela análise de sobrevida, o desempenho do extrato de 15% parece ser favorável aos demais. Sendo assim, o extrato aquoso de erva-mate na concentração de 15% foi o escolhido para a continuação desta pesquisa, onde o mesmo passou por um processo de liofilização e logo após foi utilizado na elaboração de microcápsulas. Tanto o extrato liofilizado quanto as microcápsulas de erva-mate foram caracterizados e depois empregados em ensaio *in vivo* em ratos Wistar, etapa final do nosso estudo.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO LIOFILIZADO

O extrato de erva-mate liofilizado foi caracterizado por cromatografia (CLAE) com intuito da identificação e quantificação dos seus principais compostos bioativos. Os resultados

encontram-se na Tabela 3. No apêndice C está apresentado o cromatograma com os respectivos picos dos elementos.

Tabela 3 – Teores de compostos bioativos do extrato de erva-mate liofilizado quantificados por CLAE.

Composto	Quantidade (mg/mL)
Teobromina	87,59±0,52
Cafeína	68,85±1,71
Ácido clorogênico	394,16±4,01

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

De acordo com a Tabela 3 podemos visualizar, dentre os compostos investigados no extrato liofilizado, que o presente em maior quantidade foi o ácido clorogênico, representando quase 395 mg/mL do extrato. O ácido clorogênico é um composto fenólico, dentre muitos inseridos na erva-mate, formado por isômeros de ésteres de ácido cafeico com ácido quínico (PERES et al., 2013). A alta concentração desta substância no extrato de erva-mate é descrito na literatura, onde constata-se que os ácidos clorogênicos, em especial os mono e dicafeoilquínicos, são o principal componente da fração fenólica desta planta (BRAVO; GOYA; LECUMBERI, 2007; COLPO et al., 2016).

Quando compararam diferentes espécies de plantas *Ilex*, Filip et al. (2001) mostraram que a *Ilex paraguariensis* tem maior conteúdo de derivados de ácido cafeoilquínico e flavonóides do que as outras espécies testadas. Estas substâncias são associadas aos possíveis benefícios a saúde pelo consumo frequente da erva-mate, incluindo a promoção da homeostase e proteção das membranas celulares e DNA (BOADO; FRETES; BRUMOVSKY, 2015; BRACESCO et al., 2011; FAGUNDES et al., 2015).

Além do composto fenólico, o segundo elemento identificado em maior quantidade foi a teobromina, seguido da cafeína. Ambos componentes são alcaloides, inclusos na classe das metilxantinas, tendo efeitos estimulantes na atividade cerebral, sistema nervoso central, coração e ação diurética (MEINHART et al., 2010; SCHUSTER, MITCHELL, 2019). Diante disso, a erva-mate tem sido considerado um alimento com apelo funcional por conter o ácido clorogênico como componente majoritário no chimarrão, seguido das metilxantinas (DARTORA et al., 2011; PERES et al., 2013).

Mateos et al. (2018) identificaram 46 compostos fenólicos e duas metilxantinas na erva-mate usando HPLC-DAD, avanços importantes na caracterização desta planta que possui um teor moderado de metilxantinas, com alta potência antioxidante principalmente associada ao seu conteúdo polifenólico. No entanto, já foram relatados mais de 196 compostos químicos voláteis na erva-mate, não podendo-se descartar um efeito global sinérgico do conjunto de seus componentes naturais. Outra questão relevante é a possibilidade de que algum componente modifique a absorção de outro, e por consequência altera-se a atuação no metabolismo antioxidante (HECK; DE MEJIA, 2007).

4.5 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

A eficiência ao encapsular uma substância depende de alguns fatores, dentre eles, a técnica de microencapsulação empregada, os agentes utilizados como encapsulante e núcleo e as condições do processo, tais como temperatura e pH (COMUNIAN; FAVARO-TRINDADE, 2016).

A gelificação iônica externa utilizada neste estudo é uma das tecnologias mais simples e convenientes no campo da encapsulação. Utilizou-se o alginato de sódio como encapsulante pela sua capacidade de gelificação instantânea a temperatura ambiente quando em contato com a solução reticulante de cloreto de cálcio (COMUNIAN; FAVARO-TRINDADE, 2016; YAN et al., 2014).

Durante a elaboração das microcápsulas testaram-se diferentes proporções entre encapsulante e núcleo, de 1:2, 1:3 até 1:5. A eficiência de encapsulação variou conforme este parâmetro como pode-se observar na Tabela 4.

Tabela 4 – Eficiência de Encapsulação das microcápsulas.

Proporção Encapsulante:Núcleo	Eficiência de Encapsulação (%)
1:2	89,93 ± 2,22
1:3	84,35 ± 1,66
1:5	64,73 ± 11,32

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

Nota-se na Tabela 4 que quanto menor a proporção de núcleo para material de parede a eficiência foi mais elevada. Yan et al. (2014) ao otimizarem seu processo de encapsulamento avaliaram que para melhorar a eficiência de encapsulação era necessária uma relação baixa de

ficocianina para alginato, em uma razão de 1,5: 1. Apesar do encapsulante utilizado por estes autores ser igual ao empregado em nosso estudo, seu material de núcleo era distinto e sabe-se que natureza da substância de interesse a se encapsular pode variar completamente as proporções ideais para garantir uma boa eficiência de encapsulação.

Ainda sobre o agente utilizado como encapsulante, soluções com baixas quantidades de alginato são frágeis e permitem a difusão dos compostos encapsulados. Ao passo que soluções muito viscosas afetam a extrusão e formam cápsulas mais duras. Aumentando a porcentagem de alginato formam-se mais cadeias poliméricas e uma rede de gel mais concentrada, com menos poros e uma membrana externa mais grossa. Apesar de melhorar a eficiência de encapsulação pode-se tornar difícil a liberação posterior do biocomposto de núcleo (HADIYANTO et al., 2017).

A concentração de alginato utilizada neste estudo foi de 1,5%, como sugestão para próximos estudos, a variação deste parâmetro pode ser interessante já que formulações de alginato com viscosidade média parecem conseguir encapsular melhor alguns compostos como polifenóis (CUJIC et al., 2016). Córdoba, Deladino e Martino (2013) trabalharam com extrato líquido de erva-mate e para aumentar sua eficiência de encapsulação de 55% para 65% adicionaram amido ao hidrogel de cálcio-alginato.

Apesar dos valores de eficiência apresentados na Tabela 4, o principal intuito com a encapsulação era reter o máximo de compostos bioativos em uma menor quantidade de cápsulas. Por isso, além de utilizarmos um extrato de erva-mate liofilizado, já concentrado quanto ao extrato aquoso, optou-se por usar uma proporção de cinco partes de núcleo para uma de encapsulante. Desta maneira, a eficiência das cápsulas utilizadas foi de 64,73%, ainda que apresentando menor eficácia quando comparada a outras proporções de núcleo para encapsulante, estas continham uma quantidade superior de compostos fenólicos (134,94 mg EAG/g de cápsula).

Como o objetivo da aplicação das microcápsulas era um estudo de suplementação *in vivo* em ratos Wistar, estes tinham limitações quando a quantidade máxima de ingestão de cápsulas. Portanto, era primordial que o conteúdo de compostos fenólicos fosse o mais concentrado possível para suprir a dose-efeito necessária. A dose-efeito a que os animais foram submetidos foi baseada na quantificação de compostos fenólico, logo, a medida de eficiência de encapsulação baseou-se nesta análise.

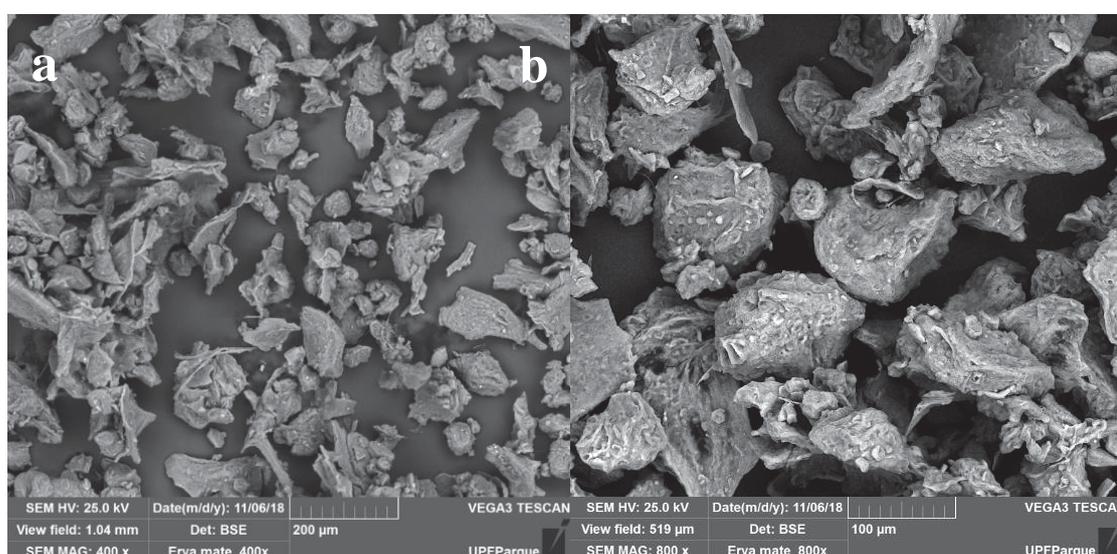
Contudo, existem outras maneiras de avaliar a eficácia de encapsulação, através por exemplo da mensuração de um constituinte presente na matriz ou até mesmo pelo bioatividade de um componente de interesse. Dependendo das características de núcleo podem-se utilizar

diversas metodologias como CLAE, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, espectroscopia ou titulação (COMUNIAN; FAVARO-TRINDADE, 2016).

4.6 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

As microcápsulas de erva-mate e vazias foram avaliadas morfológicamente através de MEV e podem ser visualizadas nas Figuras 7 e 8.

Figura 7 - Micrografias de microcápsulas de erva-mate nos aumentos 400x (a) e 800x (b).



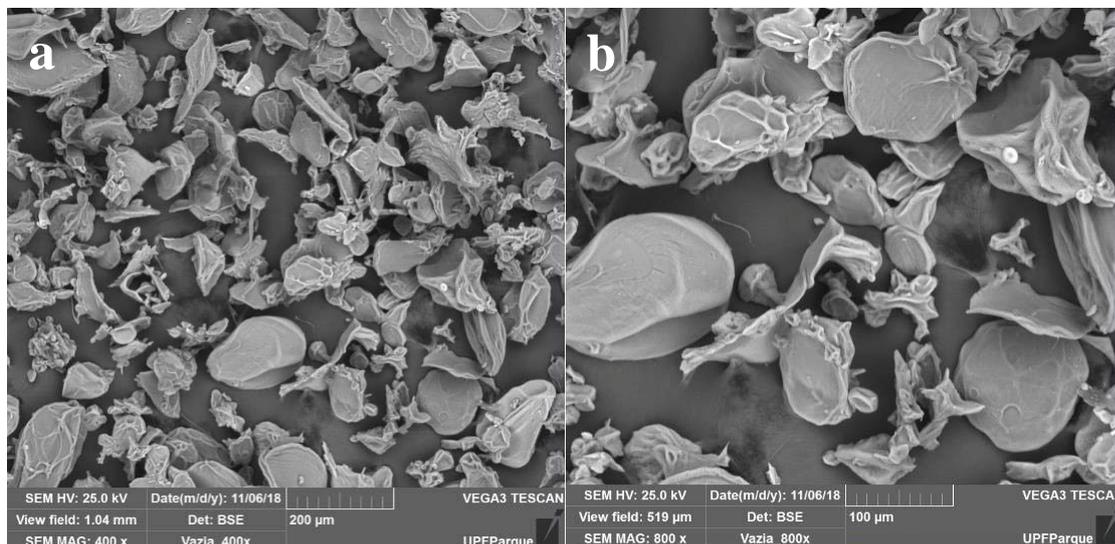
Fonte: próprio autor (2019).

Pelas micrografias nota-se um formato irregular em ambas microcápsulas, no entanto as que contém erva-mate aparentam estar mais irregulares, conforme Figura 7. Isto pode ter ocorrido pois na elaboração das microcápsulas utilizou-se alta proporção de núcleo em relação ao alginato (5:1). Quando Yan et al. (2014) adicionaram 3 partes de núcleo para 1 de alginato também obtiveram partículas sem formato definido, indicando que o melhor seria reduzir pela metade a proporção do núcleo. Esta relação parece ser determinante no formato das microcápsulas, pois a elevada quantidade de extrato liofilizado de erva-mate exigiria provavelmente uma maior concentração de alginato para conseguir desenvolver uma reticulação mais potente e eficaz, melhorando o aspecto das microcápsulas.

Além disso, devido à grande quantidade de sólidos do liofilizado ocorreu um aumento da viscosidade da solução. Como já mencionado antes, esta viscosidade excessiva pode prejudicar a extrusão destas cápsulas, propiciando efeitos adversos em seu formato. Por esta razão as

microcápsulas vazias, somente formadas por alginato em solução reticulante, tenham apresentado uma forma um pouco menos irregular, como demonstra a Figura 8.

Figura 8 - Micrografias de microcápsulas vazias nos aumentos 400x (a) e 800x (b).



Fonte: próprio autor (2019).

Além da irregularidade no formato, pode-se observar um aspecto poroso nas microcápsulas. Isto é capaz de ser decorrente da técnica de geleificação iônica externa. Apesar deste protocolo ser simples, fácil e barato de reproduzir umas das desvantagens é a possibilidade de formação de matrizes porosas (LIU et al., 2002). Sugere-se que para obter cápsulas com formato regular esférico e com menos poros seja necessário, além de acrescentar alginato, aumentar a concentração do reticulante cloreto de cálcio, pois devem existir íons cálcio suficientes para interagir com o alginato (YAN et al., 2014).

Outra questão importante é que as microcápsulas foram submetidas ao processo de liofilização para preservar seu armazenamento, impedindo a degradação de seus compostos bioativos. Pode-se atribuir a este processo também o formato irregular das microcápsulas, já que a eliminação da água pode ocorrer através dos seus poros, ocasionando uma distorção no formato das cápsulas (CUJIC et al., 2016).

Assim como, a retirada de água das cápsulas na liofilização é possível de desestabilizar a matriz estrutural de cálcio-alginato, deixando-as achatadas, evidenciando novamente a importante ligação entre presença suficiente do reticulante para a formação adequada das redes de alginato. Hadiyanto et al. (2017) e Rosenberg, Kopelman e Talmon (1985) relataram formatos irregulares devido a rápida evaporação da água durante a liofilização. Por esse motivo, a secagem sob condições ambientais foi a método de escolha de Deladino et al. (2008)

mantendo a forma esférica das microcápsulas. Entretanto, o formato em si não influencia o conteúdo das microcápsulas, que através de seus compostos bioativos presentes poderão exercer seus possíveis benefícios.

4.7 TAMANHO DE PARTÍCULA

O tamanho de partícula foi avaliado através do método de difração de laser no equipamento *Bettersizer* e o resultados estão apresentados na Tabela 5. No apêndice D está demonstrado um relatório de uma das triplicatas da análise gerado pelo software do equipamento.

Tabela 5 – Porcentagem e tamanho de partícula das microcápsulas de erva-mate medido pelo método de difração de laser.

Porcentagem das microcápsulas	Tamanho de partícula (μm)
10%	59,93 \pm 0,47
50%	180,43 \pm 1,56
90%	376,30 \pm 10,72

Resultados expressos como média \pm desvio padrão. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

A avaliação do tamanho de partícula é útil no quesito de classificação das cápsulas formadas. Estas geralmente são classificadas por tamanho em três categorias: macro- (>5.000 μm), micro- (0.2 – 5.000 μm) e nanocápsulas (<0.2 μm) (RÉ, 1999). Neste trabalho constatou-se que o diâmetro médio de Sauter, D[3,2], foi de 91,42 μm . Este parâmetro relaciona o volume e a superfície das gotas da fase dispersa, proporcionando uma medida do diâmetro médio, onde está a maioria das partículas (BENAVIDES et al., 2016).

Ainda, o parâmetro D90 que representa o tamanho máximo de 90% das cápsulas foi de 376,30 μm , juntamente com as medidas D50 (180,43 μm) e D10 (59,93 μm), todas as porcentagens detectadas demonstram que as cápsulas formadas se enquadram na classificação de microcápsulas, com diâmetros abaixo de 1000 μm . O valor de span apresentado foi de 1,75, indicando uma ampla faixa de distribuição de tamanho, quanto mais próximo o valor de 1 indica uma homogeneidade maior de amostra.

O tamanho de partícula gerado pela técnica de gelificação iônica pode variar de μm até mm, dependendo de qual instrumento é utilizado na extrusão ou aspensão da solução. O

processo de extrusão consegue ocorrer de diferentes formas, alguns protocolos utilizam bomba peristáltica de baixa pressão para o gotejamento, gerando partículas na faixa dos 6 mm (LANÇANOVA, 2014), enquanto outros envolvem o simples gotejamento da solução usando seringas, garantindo tamanho de partículas também na faixa dos mm, diâmetros considerados grandes (CULPI et al., 2010).

Já quando a gelificação é feita através da aspersão da solução com auxílio de um bico concêntrico de pulverização e uma bomba peristáltica, forma-se um jato de líquido que se move através da quebra do ar formando pequenas gotas que caem na solução reticulante, dando forma às microcápsulas (ROCHA, 2017). A realização do procedimento por meio da aspersão gera partículas menores, com tamanho na faixa de μm , em comparação ao método convencional de extrusão.

Estudos que utilizaram técnicas de aspersão, semelhante a que empregamos neste estudo, como Rocha (2017) produziu microcápsulas contendo suco de tomate com tamanho médio de 560,76 μm . Assim como, Nogueira (2013) obteve microcápsulas com tamanho entre 91,3 e 130,4 μm utilizando também um bocal atomizador de alta pressão.

Outra vantagem do método de aspersão além do tamanho reduzido das partículas é maior agilidade de processamento para formação das gotículas. Desta maneira, o método de gelificação iônica pode ser empregado em escala em industrial para produção de microcápsulas ricas em compostos bioativos.

4.8 SOLUBILIDADE DAS MICROCÁPSULAS

As microcápsulas apresentaram solubilidade de $21,2 \pm 1,69\%$ quando submetidas à agitação por 5 min em água. A solubilidade é um fator importante pois é fundamental na definição das condições em que a cápsula poderá ser utilizada e em quais circunstâncias ela será dissolvida. A baixa solubilidade em água era uma característica desejada nas micropartículas produzidas neste estudo, primeiramente pensando que seu veículo de ingestão seria em meio aquoso, para administração no protocolo *in vivo*. Na sequência, a insolubilidade aquosa era requerida pois a cápsula não podia desintegrar-se quando prontamente introduzida, pois o intuito eram os compostos bioativos da erva-mate manterem-se encapsulados durante a passagem do estômago e serem absorvidos sem grandes perdas no tecido alvo, o intestino.

Na gelificação iônica é possível utilizar diversos tipos de hidrocolóides, que são polímero de polissacarídeos que podem dissolver na água ou formar soluções viscosas e/ou géis. O alginato é um destes polissacarídeos utilizado como encapsulante e apesar de ser um

biopolímero solúvel em água ele é capaz de formar uma estrutura de gel através da reticulação, aprisionando os compostos bioativos, em uma estrutura conhecida como “caixa de ovo” (LOPES et al. 2017). A reticulação é a maneira de tornar certas substâncias insolúveis em água e a liberação do material de núcleo pode ser controlada a partir do grau de reticulação. Sendo assim, quanto maior o grau de reticulação mais difícil a difusão do material (LI et al., 2009). A liberação do composto microencapsulado ocorre por difusão através do relaxamento da estrutura do gel.

Apesar da gelificação iônica ser conhecida por desenvolver partículas insolúveis em água, sabe-se que pelo método externo podem-se gerar matrizes porosas. De acordo com Córdoba, Deladino e Martino (2013) a presença de macroporos na matriz de alginato facilita a difusão de moléculas hidrofílicas. Talvez a baixa porcentagem de alginato na elaboração de nossas microcápsulas tenha causado uma porosidade considerável em sua estrutura.

4.9 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROCÁPSULAS

A partir da caracterização das microcápsulas, indicada na Tabela 6, podemos verificar que os teores de umidade (3,49%) e lipídeos (4,81%) foram similares aos apresentados na caracterização da matéria prima (3,41% de umidade e 5,67% de lipídeos). Na sequência, a quantificação de fibras nas microcápsulas demonstrou um valor de 1,35%, percebe-se uma grande variação neste teor quanto a matéria prima (31,64%). No entanto, é um resultado aceitável já que as cápsulas contêm o extrato liofilizado de erva-mate, sendo eliminada a parte das fibras das folhas.

Quanto as cinzas, o valor encontrado foi de 19,09%, teores maiores em relação a matéria prima (5,69%). Possivelmente o que contribuiu para o aumento neste componente foi a participação dos elementos da encapsulação, o alginato de sódio e o cloreto de cálcio, ambos apresentam sais minerais (Na e Ca) em sua composição. Assim como, os carboidratos quantificados nas microcápsulas (62,72%) apresentaram valores mais elevados comparados a erva-mate (39,72%) igualmente devido ao alginato empregado na microencapsulação. O alginato utilizado como material de parede é um polissacarídeo, como já comentado anteriormente, logo, aumenta os teores de carboidratos da amostra.

Tabela 6 – Caracterização físico-química das microcápsulas de erva-mate.

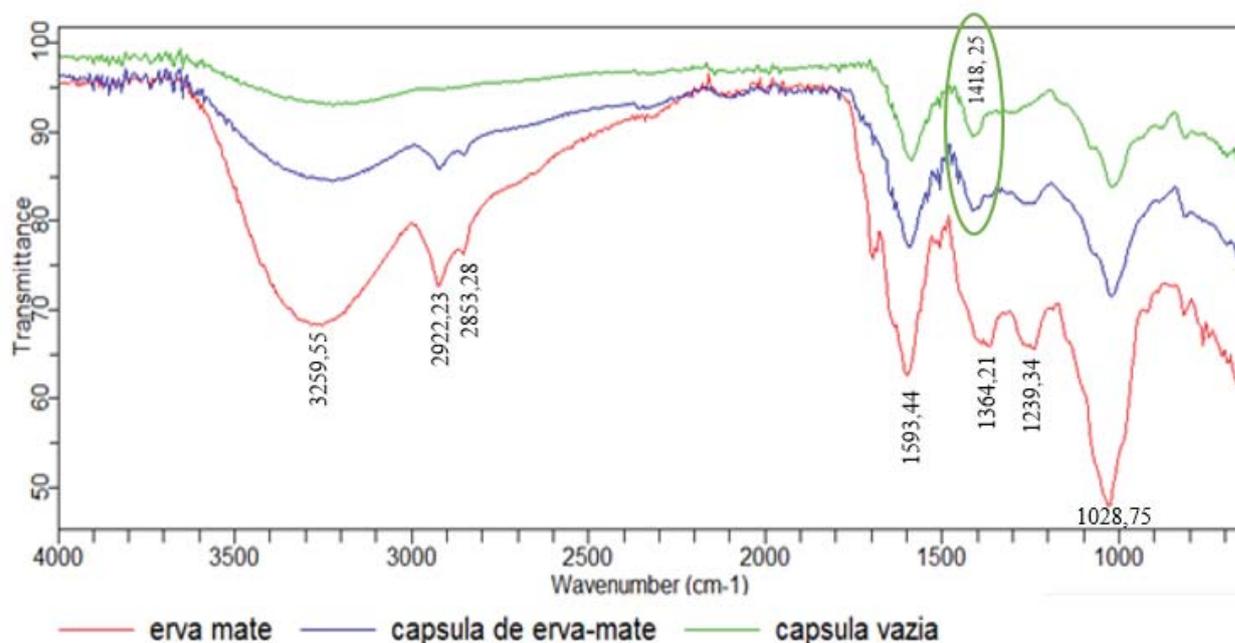
Análise	(%)
Umidade	3,49±0,03
Lipídios	4,81±0,31
Fibras	1,35±0,06
Proteínas	8,61±0,55
Cinzas	19,01±0,49
Carboidratos digeríveis	62,72±0,83

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

4.10 AVALIAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Os espectros das amostras de nosso estudo gerados na análise de FTIR estão apresentados na Figura 9. A espectroscopia auxilia na identificação dos grupamentos funcionais que se encontram nos mais diferentes materiais. O espectro é resultado da interação entre a luz infravermelha que penetrou na camada fina de superfícies de amostras e a composição química das mesmas (LEE; LIONG; JEMAIN, 2017). As substâncias absorvem a radiação infravermelha gerando uma vibração molecular, o grupo molecular característico de cada frequência é então identificado. Sendo assim, esta análise foi capaz de caracterizar a estrutura molecular do extrato liofilizado de erva-mate e a interação deste com os materiais de parede das cápsulas, assim como das cápsulas vazias.

Figura 9 - Espectros gerados na análise de FTIR para extrato liofilizado de erva-mate, microcápsulas de erva-mate e microcápsulas vazias.



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

De acordo com a Figura 9, podemos identificar no extrato liofilizado de erva-mate (linha vermelha) uma banda pronunciada em $3259,55 \text{ cm}^{-1}$ referente ao grupamento hidroxil, que pode estar inserido em componentes como água, álcoois e compostos fenólicos. Podemos inferir que esta banda se refere aos compostos fenólicos, amplamente identificados no extrato de erva-mate (ISTENIC; KOROŠEC; ULRIH, 2016). Ainda no extrato podem ser observadas as bandas $2922,23$ e $2853,28 \text{ cm}^{-1}$ referentes ao estiramento da ligação C-H, representando cadeias alifáticas de carbono, que podem estar presentes em alguns bioativos da erva-mate, como ácido clorogênio e ácido caféico (SANTOS; DE MORAIS, 2015).

Estas três bandas citadas no extrato liofilizado também podem ser observadas nas microcápsulas de erva-mate (linha azul), no entanto, em menor intensidade. Isto pode ocorrer pois a gelificação iônica é uma técnica que gera partículas do tipo microesferas, onde o núcleo encontra-se disperso por toda matriz, inclusive na superfície da cápsula. Sendo assim, os grupamentos funcionais contidos no extrato podem ser detectados em menor intensidade na parte externa das microcápsulas de erva-mate, o que indica que a encapsulação envolveu o material de núcleo protegendo-o.

Outras bandas manifestadas no extrato liofilizado foram em $1364,21 \text{ cm}^{-1}$, referente a grupamentos metil contidos nos compostos antioxidantes do extrato e em $1239,34 \text{ cm}^{-1}$, que

identifica a ligação C-O característica de fenóis, contidos nos compostos antioxidantes do extrato (DELADINO et al., 2008; GULLÓN et al., 2018).

A semelhança vibracional das microcápsulas de erva-mate e vazias é devido ao FTIR medir a superfície da amostra. As vibrações da banda em $1418,25\text{ cm}^{-1}$ nas microcápsulas vazias podem ser características de grupo carboxilatos, encontrados na estrutura de moléculas de alginato, presente na parte externa das cápsulas (HADIYANTO et al., 2017). Esta mesma banda aparece nas microcápsulas de erva-mate, porém com menor intensidade. Isto nos permite concluir que os parâmetros utilizados na encapsulação foram eficientes, já que ambas partículas foram elaboradas como o mesmo material de parede.

Algumas bandas podem ser identificadas em todas amostras pela presença de algum grupamento ou ramificação molecular em comum. A banda em $1593,44\text{ cm}^{-1}$ representa o grupamento amina. No extrato de erva-mate esta banda indica presença das metilxantinas, enquanto para as cápsulas vazias identifica a reticulação do alginato. A banda 1028 cm^{-1} descreve o alongamento de C=O. No extrato de erva-mate este grupamento está presente nos seus compostos antioxidantes da erva-mate, como ácido clorogênico, teobromina e cafeína. Já nas cápsulas vazias essa banda sugere a ligação do Ca^{2+} aos ácidos gulurônicos da rede alginato (BLANDÓN et al., 2016).

A microcápsula de erva-mate apresentou um perfil de vibrações intermediário entre extrato liofilizado e cápsulas vazias. Isto é um aspecto positivo pois espera-se que as microcápsulas de erva-mate tenham similaridades com o extrato liofilizado, já que este perfaz o núcleo das microcápsulas, assim como as cápsulas vazias, pois são compostas somente de alginato, material utilizado como encapsulante. Com isso, demonstra-se a perfeita interação entre as substâncias de material de parede e núcleo.

4.11 ENZIMAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vivo*

Para avaliar a capacidade antioxidante das microcápsulas de erva-mate em comparação a seu extrato livre foi desenvolvido um estudo de suplementação *in vivo* com ratos Wistar por 30 dias. Após este período, a atividade das enzimas SOD, CAT e GPx foram quantificadas no plasma, fígado e cérebro dos animais, bem como atividade antioxidante e peroxidação lipídica nos mesmo tecidos.

Na Tabela 7 podemos observar a quantificação da atividade da SOD no fígado. Os grupos extrato livre e extrato microencapsulado de erva-mate apresentaram diferença significativa ao grupo das microcápsulas vazias. Em ambos grupos contendo erva-mate foram

evidenciados os menores valores enzimáticos da SOD, no entanto, não apresentaram diferença significativa em relação ao controle.

Tabela 7 – Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) medida no fígado de ratos.

Grupo	Fígado (μg de SOD/mg proteína)
Controle	9,47 \pm 4,81 a
Extrato livre	5,20 \pm 1,17 ab
Extrato microencapsulado	7,09 \pm 2,43 ab
Microcápsula vazia	13,85 \pm 3,81 a
p-valor	0,0010

Resultados expressos como média \pm desvio padrão. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tuckey ($p > 0,05$). Fonte: elaborado pelo autor (2019).

As atividades das enzimas CAT e GPx foram igualmente quantificadas e os resultados estão expostos nas Tabelas 8 e 9. Podemos observar que em ambas enzimas o extrato livre, exclusivamente, foi capaz de reduzir os níveis enzimáticos, com diferença significativa aos demais grupos. Esta diminuição conseguiu ser detectada apenas no tecido hepático, onde a CAT e GPx são conhecidas por possuírem alta atividade, enquanto outros órgãos como cérebro possuem pequenas quantidades destas enzimas (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010).

Tabela 8 – Atividade da enzima catalase (CAT) medida no cérebro, fígado e plasma de ratos.

Grupo	Fígado (nmol de H₂O₂ reduzidos/minuto/mg proteína)	Cérebro	Plasma
Controle	0,046 \pm 0,011 a	0,019 \pm 0,016 a	0,561 \pm 0,32 a
Extrato livre	0,032 \pm 0,011 b	0,022 \pm 0,027 a	0,496 \pm 0,42 a
Extrato microencapsulado	0,047 \pm 0,007 a	0,012 \pm 0,021 a	0,602 \pm 0,40 a
Microcápsula vazia	0,048 \pm 0,012 a	0,013 \pm 0,015 a	0,589 \pm 0,45 a
p-valor	0,0001	0,6172	0,9380

Resultados expressos como média \pm desvio padrão. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tuckey para fígado e plasma, e pelo teste de Student-Newman-Keuls para cérebro. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

Tabela 9 – Atividade da enzima glutaciona peroxidase (GPx) medida no fígado e cérebro de ratos.

Grupo	Fígado (nmol de H₂O₂ reduzidos/minuto/mg proteína)	Cérebro
Controle	0,023±0,007 a	0,009±0,007 a
Extrato livre	0,017±0,001 b	0,010±0,007 a
Extrato microencapsulado	0,021±0,002 a	0,007±0,004 a
Microcápsula vazia	0,020±0,006 a	0,004±0,003 a
p-valor	0,0020	0,1800

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si ($p>0,05$) pelo teste de Student-Newman-Keuls para fígado, e pelo teste de Tukey para cérebro. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

As alterações nas atividades enzimáticas sinalizam as condições de defesa do organismo. Quando há geração de radicais livres ocorre o acionamento do sistema antioxidante endógeno, as células tendem a aumentar suas defesas primárias. Com isso, as enzimas SOD, CAT, GPx são ativadas, principalmente a SOD que é a precursora na neutralização dos radicais livres, elevando estas enzimas no corpo para converter tais espécies em moléculas estáveis (COLPO, 2017; SANTOS et al., 2018b).

O consumo regular de bioativos dietéticos configura como um reforço exógeno antioxidante no combate as ERO. Existem duas possibilidades de atuação destas substâncias no organismo. A primeira é estimulando a atividade enzimática, como demonstrado em diversos estudos com erva-mate (BOAVENTURA et al., 2015; LIMA, 2017; DE OLIVEIRA et al., 2018). A segunda maneira seria agindo diretamente na neutralização dos radicais livres, pela ação de sequestro dos EROs. Os antioxidantes exógenos ligam-se as espécies reativas e as estabilizam (BARBOSA et al., 2010; SANTOS et al., 2018b).

A erva-mate e seus biocompostos são conhecidos por estabilizar os radicais livres através da doação de elétrons ou pela quelação de metais (LEOPOLDINI; RUSSO; TOSCANO, 2011; SCALBERT et al., 2005). Em nosso estudo com roedores, os grupos suplementados com erva-mate diminuíram a síntese das enzimas SOD, CAT e GPx. Este resultado pode ser entendido por uma ação de “feedback” negativo. As EROs têm ação de sinalizadores celulares que ativam vias de regulação de genes relacionados à expressão de enzimas que regulam o equilíbrio intracelular entre oxidantes e antioxidantes. Supostamente, a ingestão da erva-mate com sua oferta de bioativos antioxidantes foi eficaz e suficiente para garantir a homeostase, reduzindo a necessidade de produção das enzimas endógenas SOD, CAT e GPx.

A modulação antioxidante através da ingestão de compostos bioativos é relatada na literatura por outros autores. Boado, Fretes e Brumovsky (2015) avaliaram que os polifenóis consumidos na infusão de erva-mate tiveram um efeito de economia sobre as defesas antioxidantes naturais em humanos, melhorando a capacidade antioxidante no plasma. Algumas pesquisas em modelos de roedores, como Schinella et al. (2000) relataram que o extrato de erva-mate se mostrou eficiente na eliminação de radicais como o ânion superóxido e na inibição da peroxidação lipídica. Pereira et al. (2017) concluíram que o mate foi capaz de minimizar danos oxidativos durante a menopausa de ratas. Cittadini et al. (2019) pesquisando sobre o efeito de diferentes extratos de plantas verificaram que *a Ilex paraguariensis* apresentou o melhor perfil redox quando o encéfalo completo dos animais foi analisado.

Entretanto, atenta-se para a relevância da homeostase do estado redox, dependente de um aporte de fenólicos adequado. Tanto níveis excessivos quanto deficientes de antioxidantes podem ser prejudiciais ao funcionamento do corpo. Acredita-se que os polifenóis consumidos em quantidades elevadas podem ter efeitos pró-oxidantes, embora estes nunca foram demonstrados *in vivo* (CITTADINI et al., 2019; SCALBERT, 2005). Este é um tópico pertinente, já que falta conhecimento sobre a quantidade ideal de consumo diário referente aos antioxidantes dietéticos.

Isso se deve pelo pouco entendimento sobre a absorção destes compostos no organismo humano. Por isso, também é desafiador entender os diferentes efeitos de extratos livres e encapsulados de erva-mate no organismo. É fato que os antioxidantes contidos naturalmente nos alimentos ajudam a manter a saúde e evitam o aparecimento de doenças, no entanto, qual a ação destes compostos para estes efeitos positivos ainda é incerta. Seus mecanismos de ação não estão bem esclarecidos fisiológica e farmacologicamente (GUPTA et al., 2014; GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010).

Até então, sabe-se que a absorção de micronutrientes e fitoquímicos no corpo após o consumo oral não se dá por completo e uma certa porcentagem não é aproveitada. Os polifenóis são pequenas moléculas orgânicas e quando consumidos podem ser considerados como xenobióticos pelo corpo (SCALBERT, 2005). O ácido clorogênico, por exemplo, que corresponde a 42% dos polifenóis encontrados em extratos de erva-mate, é dito por ser absorvido em um máximo de 33% no intestino delgado em humanos (COLPO et al., 2016). Olthof, Hollman e Katan (2001) através da recuperação parcial deste composto na urina verificaram que provavelmente ele é transformado em outros compostos após a absorção.

Os antioxidantes após ingestão são submetidos ao metabolismo e podem sofrer biotransformações que afetam sua disponibilidade (NIKI, 2010). Para alcançar concentrações

suficientes e produzir seus benefícios, eles devem superar muitas barreiras, incluindo extensas modificações enzimática e químicas até alcançar seu sítio de ação (SCHEEPENS; TAN; PAXTON, 2010). Para auxiliar neste processo e garantir a proteção dos compostos bioativos realizou-se a microencapsulação do extrato de erva-mate. No entanto, os resultados apresentados para as quantificações enzimáticas mostram que o extrato livre foi eficaz na redução da SOD, CAT e GPx no fígado, enquanto o extrato microencapsulado somente reduziu os valores de SOD em relação as microcápsulas vazias.

Os sistemas biológicos são heterogêneos por natureza, o que influencia diretamente na efetividade dos antioxidantes. Os bioativos naturais contidos nos alimentos podem ser hidrossolúveis, lipossolúveis, estarem em sua forma livre ou ligada, e ainda como metabólito de algum composto. Cada componente trabalha cooperativamente no seu respectivo local. As formas nas quais estes circulam influenciarão sua polaridade e, assim, sua localização e bioatividade *in vivo* (RICE-EVANS et al., 2000; SCHEEPENS; TAN; PAXTON, 2010; SCALBERT et al 2005).

A ação antioxidante depende do ambiente químico e físico-químico, que varia de acordo com os tecidos e condições fisiológicas. É sabido que os antioxidantes hidrofílicos são capazes de eliminar principalmente os radicais livres presentes na fase aquosa (NIKI, 2010). Em nossa intervenção *in vivo*, o extrato livre foi composto de um extrato liofilizado de erva-mate ressuspenso em água para a suplementação nos animais. Eventualmente, os compostos bioativos hidrofílicos foram solubilizados pelo organismo e conseguiram exercer sua ação na redução de todas enzimas quantificadas no fígado.

Da mesma maneira, as microcápsulas também foram veiculadas em meio aquoso. Apesar da encapsulação, alguns compostos podem ter interagido com o organismo devido a porosidade das cápsulas, liberando os compostos hidrossolúveis para o meio (CÓRDOBA; DELADINO; MARTINO, 2013). No entanto, as microcápsulas apresentaram influência somente na enzima SOD. Possivelmente, pela ação precursora da SOD na neutralização do radical ânion superóxido (O_2^-) esta é a enzima mais abundante do organismo. Logo, liberação parcial dos compostos hidrofílicos das microcápsulas de erva-mate já conseguiram ser eficaz na sua modulação enzimática.

Já os antioxidantes lipofílicos conseguem penetrar em membranas e lipoproteínas. Ensaio *in vitro* indicam que flavonóides ou seus metabólitos podem cruzar a barreira hematoencefálica com um potencial de penetração influenciada por sua lipofilicidade. Os compostos fenólicos, ou seus metabólitos menos polares, possuem a vantagem de serem mais

absorvidos do que os mais polares (NIKI, 2010; SCHEEPENS; TAN; PAXTON, 2010; YAUDIM et al., 2003).

Provavelmente, os compostos bioativos lipofílicos da erva-mate retidos pela encapsulação conseguiram resistir as intempéries do trato gastrointestinal e foram amplamente distribuídos pelo corpo, atingindo inclusive as membranas do cérebro. Na Tabela 10 constam os resultados do ensaio de peroxidação lipídica, em que se mediram os níveis de malonaldeído (MDA), um produto secundário gerado pela oxidação lipídica.

Podemos observar que o extrato microencapsulado, unicamente, demonstrou diminuir os níveis de TBARS no cérebro, com diferença significativa a todos os outros grupos. A encapsulação favoreceu a entrega dos compostos bioativos lipofílicos, através da proteção do seu núcleo, alcançando locais de membranas. Assim, os extratos de erva-mate microencapsulados foram eficientes contra a peroxidação lipídica cerebral.

Tabela 10 – Quantificação das TBARS medidas em fígado e cérebro de ratos.

Grupos	Fígado (nmol MDA/mg proteína)	Cérebro
Controle	0,271±0,10 a	2,209±0,90 a
Extrato livre	0,374±0,15 a	2,180±0,45 a
Extrato microencapsulado	0,369±0,12 a	0,922±0,31 b
Microcápsula vazia	0,308±0,10 a	1,782±0,29 a
p-valor	0,0690	0,0001

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tuckey ($p > 0,05$). Fonte: elaborado pelo autor (2019).

Contudo, a redução da peroxidação foi visualizada somente no tecido cerebral. Provavelmente isto ocorreu, pois, o cérebro dos mamíferos é um local muito vulnerável a danos oxidativos. Primeiro, por ser formado por membranas com elevados teores de ácidos graxos poli-insaturados, altamente suscetíveis ao processo de oxidação. Segundo, por ser um grande órgão metabolizador de oxigênio, onde a produção de ROS por sistemas enzimáticos e não enzimáticos é um importante fator para o desenvolvimento de processos neurodegenerativos (BIRBEN et al., 2012; POPA-WAGNER, 2013; SCHINELLA et al., 2000).

Em concordância com nossos dados, Colpo (2017) verificou que extratos de erva-mate reduziram a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas, induzidos por uma dieta densa em colesterol. Cittadini et al. (2019) verificarem que extratos de *Ilex paraguariensis* ainda

podiriam ser uma fonte de agentes quimiopreventivos em patologias neurodegenerativas relacionadas com estresse oxidativo.

Matsumoto et al. (2009) relataram que o consumo agudo de erva-mate torrada por mulheres saudáveis diminuiu a oxidação lipídica e aumentou a capacidade antioxidante no plasma. Entretanto, os autores observaram o aumento na expressão de enzimas antioxidantes. Petrilli et al. (2016) não encontraram nenhum efeito da erva-mate na peroxidação lipídica plasmática, possivelmente porque seu estudo envolvia sujeitos com HIV, imunocomprometidos, sujeitos a terapia anti-retroviral.

É reconhecida a interação complexa entre as propriedades físico-químicas dos compostos bioativos e os processos de transporte, metabolismo e absorção destes nos diferentes locais do organismo. (OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2001). Os polifenóis da erva-mate são parcialmente biodisponíveis e são extensivamente metabolizados, principalmente pela microbiota. A conjugação e o metabolismo destes no intestino delgado e fígado geram formas circulantes *in vivo* com maior capacidade antioxidante (GÓMEZ-JUARISTI et al., 2018; RICE-EVANS et al., 2000).

A capacidade antioxidante dos grupos submetidos ao nosso estudo *in vivo* foi quantificada através da redução férrica, e os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Quantificação da atividade antioxidante através da redução férrica no cérebro e plasma de ratos.

Grupo	Cérebro	Plasma
	($\mu\text{g EAG/mL}$)	
Controle	0,152 \pm 0,04 a	0,115 \pm 0,018 a
Extrato livre	0,144 \pm 0,01 a	0,106 \pm 0,008 a
Extrato microencapsulado	0,168 \pm 0,02 a	0,183 \pm 0,065 b
Microcápsula vazia	0,147 \pm 0,05 a	0,106 \pm 0,010 a
p-valor	0,4900	0,0001

Resultados expressos como média \pm desvio padrão. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tuckey ($p > 0,05$). Fonte: elaborado pelo autor (2019).

Na análise de FRAP, o extrato microencapsulado apresentou poder antioxidante mais elevado no plasma, com diferença significativa aos demais grupos. Este resultado supostamente é decorrente dos bioativos permanecerem protegidos externamente pela cápsula, estando em condições de atingir o intestino. A maioria dos polifenóis, por exemplo, são absorvidos nas células intestinais por mecanismos passivos, quando atingem a corrente sanguínea são

convertidos em metabólitos com maior poder antioxidantes em relação as suas moléculas progenitoras não metabolizadas (LEOPOLDINI et al., 2011; SCHEEPENS; TAN; PAXTON, 2010).

O aumento na capacidade antioxidante plasmática após o consumo de alimentos ricos em polifenóis é amplamente relatado na comunidade científica (BOAVENTURA et al., 2015; GÓMEZ-JUARISTI et al., 2018; SCALBERT et al., 2005). Em estudo sobre a biodisponibilidade dos compostos da erva-mate, Boado, Fretes e Brumovsky (2015) verificaram que 120 minutos após ingestão aguda de 300 ml de infusão do mate resultou em um aumento da capacidade antioxidante no plasma, pelos métodos de FRAP e ABTS.

Já os efeitos de extratos encapsulados são mais restritos na literatura. Lee et al. (2009) investigaram a atividade antioxidante *in vitro* da catequina, encapsulada pelo método de gelificação iônica interna, em fluido intestinal simulado. O valor de FRAP da catequina encapsulada aumentou continuamente e finalmente alcançou um valor 1,8 vezes maior do que o da catequina livre, demonstrando que a encapsulação foi capaz de proteger as moléculas do ambiente alcalino e liberá-las de forma gradual.

Mais pesquisas sobre o efeito de extratos encapsulados de erva-mate na atividade antioxidante *in vivo* são necessárias. Córdoba, Deladino e Martino (2013) realizaram a microencapsulação de extratos de erva-mate e analisando o efeito da gelificação sobre os valores de atividade antioxidante das cápsulas concluíram que o método de gelificação iônica utilizado não alterou as atividades antioxidantes. Negrão-Murakami et al. (2016) empregando diferentes materiais de parede na encapsulação de extrato concentrado de erva-mate verificaram que os mesmos não tiveram efeitos no conteúdo fenólico total ou na atividade antioxidante das microcápsulas. Entretanto, a atividade destas cápsulas não foi verificada em sistemas biológicos, somente avaliados nas próprias cápsulas.

O consumo da erva-mate e seus benefícios na atividade antioxidante pode ser explicado pela presença de compostos bioativos redutores e seus metabólitos no plasma (SCALBERT et al., 2005). No entanto, estes compostos necessitam ser adequadamente identificados e quantificados para entender melhor sua colaboração aos efeitos fisiológicos esperados. Se resultados positivos e consistentes ao longo do tempo, o mate pode ser reconhecido como um alimento funcional (RIACHI; DE MARIA, 2017).

Certamente, num futuro próximo, a erva-mate será incluída na dieta, seja por formulações alimentares ou farmacológicas. Já que, através da *Ilex paraguariensis*, quantidades adequadas de antioxidantes qualificados podem contribuir na prevenção de patologias relacionadas ao estresse oxidativo (BAEZA et al., 2017; BRACESCO, 2019).

5 CONCLUSÃO

Na análise de sobrevivência em leveduras o extrato de erva-mate a 15% apresentou melhor atividade antioxidante frente a radiação gama. A microencapsulação deste extrato de erva-mate liofilizado foi capaz de gerar partículas com diâmetro médio de 91,42 μm , solubilidade média de 21,2% e eficiência de encapsulação de 64,73%. Apesar da microscopia de varredura eletrônica demonstrar um formato irregular das microcápsulas, a espectroscopia evidenciou que a gelificação iônica conseguiu microencapsular e proteger os compostos bioativos da erva-mate.

As microcápsulas contendo erva-mate demonstraram uma maior capacidade antioxidante plasmática e redução da peroxidação lipídica cerebral em ratos. Em relação as enzimas endógenas antioxidantes se percebeu uma ação incipiente do extrato microencapsulado, pela atenuação dos níveis de SOD. Concluímos que a erva-mate pode ser um importante elemento na dieta dos animais, visto que, o consumo regular durante 30 dias caracterizou benefícios à saúde dos mesmos. No entanto, mais estudos são necessários para o entendimento de como cada substância bioativa é absorvida.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, 121–6, 1984.
- ALKHATIB, A. et al. Functional Foods and Lifestyle Approaches for Diabetes Prevention and Management. **Nutrients**, v. 9, p. 1-18, 2017.
- ARNOUS, A. et al. Correlation of pigment and flavonol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, p. 655-665, 2002.
- AUGUSTIN, M. A. et al. Role of food processing in food and nutrition security. **Trends in Food Science & Technology**, v. 56, p. 115-125, 2016.
- BAEZA, G. et al. Polyphenol content, in vitro bioaccessibility and antioxidant capacity of widely consumed beverages. **J Sci Food Agric**, v.1, p. 1-10, 2017.
- BARBI, R. C. T. **Extração e quantificação de compostos fenólicos e antioxidantes da chia (salvia hispânica l) usando diferentes concentrações de solventes**. Trabalho de Conclusão de Curso, Curso Superior de Engenharia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2016.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 23, n.4, p. 629-643, 2010.
- BARG, M. et al. Evaluation of the protective effect of *Ilex paraguariensis* and *Camellia sinensis* extracts on the prevention of oxidative damage caused by ultraviolet radiation. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 31, p. 195-201, 2014.
- BASSANI, V. L.; GONZÁLES, O. G.; PETROVICK, P. R. Desenvolvimento Tecnológico de Produtos Fitoterápicos. **Revista Fitos**, v.1., n. 1, 2005.
- BENAVIDES, S. et al. Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. **Food Chemistry**, v. 204, p. 77–83, 2016.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as measure of Antioxidant power: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p.70-76, 1996.
- BERALDO, J. C. 2016. **Produção de micropartículas de alginato tendo como cobertura gelatina e colágeno com diferentes graus de hidrólise**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2016.
- BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organ J.**, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.
- BLANDÓN, L. M. et al. Kefiran-alginate gel microspheres for oral delivery of ciprofloxacin. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 1, n. 145, p. 706-715, 2016.

- BLUM-SILVA, C. H. et al. The influence of leaf age on methylxanthines, total phenolic content, and free radical scavenging capacity of *Ilex paraguariensis* aqueous extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 1-6, 2015.
- BOADO, L. S.; FRETES, R. M.; BRUMOVSKY, L. A. Bioavailability and antioxidant effect of the *Ilex Paraguariensis* polyphenols. **Nutrition & Food Science**, v. 45, n. 2, p. 326 – 335, 2015.
- BOAVENTURA, B. C. B. **Atividade antioxidante e crioconcentração dos compostos bioativos do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.)**. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.
- 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, p. 948-954, 2015.
- BOAVENTURA, B. C. B. et al. Enhancement of bioactive compounds content and antioxidant activity of aqueous extract of mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) through freeze concentration technology. **Food Research International**, v. 53, p. 686–692, 2013.
- BORGOGNA, M. et al. Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. **Food Chemistry**, v. 122, p. 416–423, 2010.
- BOTELHO, G.; CANAS, S.; LAMEIRAS, J. Development of phenolic compounds encapsulation techniques as a major challenge for food industry and for health and nutrition fields. **Nutrient Delivery**, v. 1, p. 535–586, 2016
- BRACESCO, N. et al. Antioxidant Activity of a Botanical Extract Preparation of *Ilex paraguariensis*: Prevention of DNA Double-Strand Breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and Human Low Density Lipoprotein Oxidation. **The journal of alternative and complementary medicine**, v. 9, n.3, p. 379–387, 2003.
- BRACESCO, N. et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 378–384, 2011.
- BRACESCO, N. et al. Roles of *Saccharomyces cerevisiae* RAD17 and CHK1 checkpoint genes in the repair of double-strand breaks in cycling cells. **Radiat Environ Biophys**, v. 46, p. 401-407, 2007.
- BRACESCO, N. *Ilex Paraguariensis* as a Healthy Food Supplement for the Future World. **Biomed J Sci & Tech Res**, v. 16, n.1, 2019.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248, 1976.

- BRAGHINI, F. et al. Composição físico-química de erva-mate, antes e após simulação do chimarrão. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 20, p. 7-15, 2014.
- BRAND WILLIAMS, W.; CUVELIER, A. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. Wiss. U. Technol.**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL. **Alimentos Funcionais**, 5 jun. 2008. Disponível em: <bvsm.s.saude.gov.br/bvs/dicas/220_alimentos_funcionais.html>. Acesso em: 20 de Outubro de 2017.
- BRASIL. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Erva-mate**. Resolução RDC n. 303, de 07 de novembro de 2002. Diário Oficial da União, 08 nov. 2002.
- BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERI, L. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v. 40, p. 393–405, 2007.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**, v. 52 p. 302-309, 1978.
- BUREY, P.; BHANDARI, B. R.; HOWES, T.; GIDLEY, M. Gel particles from spray-dried disordered polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 2, p. 206–213, 2008.
- CAMPOS, A. M; LISSI, E. A. Kinetics of the reaction between ABTS derived radical cations and phenols. **Int J Chem Kinetics**, v. 29, p. 219-224, 1997.
- CANO-CHAUCA, M. et al. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, n. 4, p. 420-428, 2005.
- CARLBERG, I; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods Enzymol**, v. 113484–90, 1985.
- CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Natural food additives: Quo vadis?. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, p. 284-295, 2015.
- CASTRO, I. A. **Desenvolvimento de Alimentos Funcionais**, 2013.
- CITTADINI, M. C. et al. Effects of oral phytoextract intake on phenolic concentration and redox homeostasis in murine encephalic regions. **Nutritional Neuroscience**, v. 18, n. 7, 2015.
- COLPO, A. C. et al. Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)-based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. **Food Chemistry**, v. 209, p. 185–195, 2016.
- COLPO, A. Z. C. **Efeitos dos extratos de erva-mate sobre danos oxidativos e sua relação com anti e co-genotoxicidade**. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa, 2017.

COMUNIAN, T. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p.442-457, 2016.

CÓRDOBA, A. L.; DELADINO, L.; MARTINO, M. Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with yerba mate antioxidants. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, p. 315–323, 2013.

COSTA, C. S. et al. Comportamento sedentário e consumo de alimentos ultraprocessados entre adolescentes brasileiros: Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar (PeNSE), 2015. **Cad. Saúde Pública**, v. 34, n. 3, 2018.

CUJIC, N. et al. Chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) extract loaded in alginate and alginate/inulin system. **Industrial Crops and Products**, v. 86, p. 120–131, 2016.

CULPI, T.A et al. Importância de parâmetros de controle na elaboração de micropartículas de Ca²⁺- alginato. **Visão Acadêmica**, v.11, n.1, 2010.

DA SILVEIRA, T. F. F. et al. Chlorogenic acids and flavonoid extraction during the preparation of yerba mate based beverages. **Food Research International**, v. 17, p. 963-999, 2017.

DARTORA, N. UPLC-PDA–MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1453–1461, 2011.

DE OLIVEIRA, E. 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, n.6, p. 1-10, 2018.

DELADINO, L. et al. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 126-134, 2008.

DIAS, M. I. M. F. Cultura in vitro e técnicas de microencapsulação: aumento da produção e da estabilidade de compostos bioativos de espécies vegetais. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Química Sustentável, Universidade do Porto, 2017.

EFING, L. C. et al. Caracterização química e capacidade antioxidante da erva-mate (*Ilex paraguariensis* st. Hil.). **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 27, n. 2, 2009.

ESMELINDRO, M. C. et al. Caracterização físico-química da erva-mate: influência das etapas do processamento industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 193-204, 2002.

ETCHEPARE, M. A. et al. Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 97– 105, 2015.

- FAGUNDES, A. et al. *Ilex paraguariensis*: compostos bioativos e propriedades nutricionais na saúde. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v. 9, n. 53, p. 213-222, 2015.
- FALCONI, A. et al. Waking-promoting action of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*). **Sleep Sci.**, v. 6, n. 1, 2013.
- FATHI, M.; MOZAFARI, M. R.; MOHEBBI, M. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 23, p. 13-27, 2012.
- FAVARETTO, A. **Aspectos alelopáticos, fitoquímicos e anatômicos do capim-annoni-2**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Agronomia, Universidade de Passo Fundo, 2014.
- FERNANDES, C. E. F. et al. Phytochemical profile, antioxidant and hypolipemiant potential of *Ilex paraguariensis* fruit extracts. **Ind. Crop. Prod.**, v. 2015, p. 1-8, 2015.
- FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M. V. J. Modelos experimentais em pesquisa. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 28-34, 2005.
- FILIP, R. et al. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, p. 774-778, 2001.
- FINE, P. V. A. et al. The growth–defense trade-off and habitat specialization by plants in amazonian forests. **Ecology**, v. 87, n. 7, p. 150–162, 2006.
- FINUCANE, M. M. et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. **Lancet**, v. 377, p. 557–67, 2011.
- FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 114–21, 1984.
- FRATINI, F. et al. Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, p. 839–843, 2016.
- FRIZON, C. N. T. et al. Determination of total phenolic compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) combining near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate analysis. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 795-801, 2015.
- FUJII, Y. et al. Ascorbic acid gives different protective effects in human cells exposed to X-rays and heavy ions. **Mutation Research**, v. 699, p. 58–61, 2010.
- FUKUMOTO, L. R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3597-3604, 2000.
- GEORGÉ, S. et al. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 1370–1373, 2005.

- GIBBS, B. F. et al. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 50, p. 213-224, 1999.
- GÓMEZ-JUARISTI, M. et al. Absorption and metabolism of yerba mate phenolic compounds in humans. **Food Chemistry**, v. 240, p. 1028-1038, 2018.
- GULLÓN, B. et al. Yerba mate waste: A sustainable resource of antioxidant compounds. **Industrial Crops & Products**, v. 113, p. 398–405, 2018.
- GUPTA, R. K. et al. Oxidative Stress and Antioxidants in Disease and Cancer: A Review. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, 2014.
- GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, p. 561–564, 2010.
- HADIYANTO et al. Encapsulation of phycocyanin-alginate for high stability and antioxidant activity. **IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.**, v.55, 2017.
- HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I. S.; LAJOLO, F. M. Antioxidant Activity of Dietary Fruits, Vegetables, and Commercial Frozen Fruit Pulps. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 2928–2935, 2005.
- HE, C. et al. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Biomaterials**, v. 31, p. 3657–3666, 2010.
- HE, X.; HWANG, H. Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment. **Journal of food and drug analysis**, v. 24, p. 671-681, 2016.
- HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 138-151, 2007.
- HENRIQUE, A. F. **Caracterização físico-química da erva mate (*Ilex Paraguariensis* a. St. -hil) e infusão, comercializada no sul do brasil propondo critérios de confiabilidade do Produto**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação de Engenharia de Produção, Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020p. Disponível em:
<<http://www.scielo.br/pdf/rbz/v40n7/a30v40n7.pdf>> Acesso em: 27 abr. 2018.
- ISTENIC, K.; KOROŠEC, R. C.; ULRIH, N. P. Encapsulation of (–)-epigallocatechin gallate into liposomes and into alginate or chitosan microparticles reinforced with liposomes. **J Sci Food Agric**, v. 1, p. 1-10, 2016.
- JIMENEZ-GARCIA, S. N. et al. Current Approaches for Enhanced Expression of Secondary Metabolites as Bioactive Compounds in Plants for Agronomic and Human Health Purposes – a Review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 63, n. 2, p. 67–78, 2013.

- KESZENMAN, D. J.; CANDREVA, E. C; NUNES, E. Cellular and molecular effects of bleomycin are modulated by heat shock in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutat Res**, v. 459, p. 29-41, 2000.
- KIM, S. Y. et al. Anti-obesity effects of Yerba Mate (*Ilex Paraguariensis*): a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 338, n 15, p. 1-8, 2015.
- LANÇANOVA, D. **Elaboração de uma nova bebida a base de chá mate e néctar de jabuticaba, adicionada de néctar esferificado**. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, Engenharia de Alimentos, Universidade Federal da Fronteira Sul, 2014.
- LEE, L. C.; LIONG, C.-Y.; JEMAIN, A. A. A contemporary review on Data Preprocessing (DP) practice strategy in ATR-FTIR spectrum. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 163, p. 64–75, 15 abr. 2017.
- LEONARD, S. S. et al. Analysis of Free-Radical Scavenging of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) using Electron Spin Resonance and Radical-Induced DNA Damage. **Journal of food science**, v. 75, n. 1, 2010.
- LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 12, p. 288–306, 2011.
- LI, B-Z. et al. Fabrication of starch-based microparticles by an emulsification-crosslinking method. **Journal of Food Engineering**, v. 92, p. 250–254, 2009.
- LIEN, E. J. et al. Quantitative structure-activity relationship analysis of Phenolic antioxidants. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 285–294, 1999.
- LIMA, C.P. et al. Conteúdo polifenólico e atividade antioxidante dos frutos da palmeira Juçara (*Euterpe edulis Martius*). **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.14, n.2, p.321-326, 2012.
- LIMA, M. E. **Caracterização das propriedades antioxidantes, hipoglicemiantes e neuroprotetoras da erva mate em diferentes modelos**. Tese de Doutorado, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa 2017.
- LIU, R. H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals1–4. **Am J Clin Nutr**, v.78, p. 517–20, 2003.
- LIU, X. D. et al. Characterization of structure and diffusion behaviour of Ca-alginate beads prepared with external or internal calcium sources. **J. microencapsulation**, v. 19, n. 6, p.775-782, 2002.
- LOPES, M. et al. Preparation methods and applications behind alginate-based particles. **Expert opinion on drug delivery**, v. 14, n.6, p.769-782, 2017.
- MANACH, C. et al. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **Am J Clin Nutr**, v. 81, p. 230–42, 2005.

- MARTINS, A. et al. Phenolic extracts of *Rubus ulmifolius* Schott flowers: characterization, microencapsulation and incorporation into yogurts as nutraceutical source. **Food Funct.**, v. 5, p. 1091-1100, 2013a.
- MARTINS, A. P. B. et al. Participação crescente de produtos ultra processados na dieta brasileira (1987-2009). **Rev Saúde Pública**, v. 47, n. 4, p. 656-65, 2013b.
- MATEOS, R. et al. Improved LC-MSn characterization of hydroxycinnamic acid derivatives and flavonols in different commercial mate (*Ilex paraguariensis*) brands. Quantification of polyphenols, methylxanthines, and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 241, p. 232–241, 2018.
- MATSUMOTO, R. L. T. et al. Effects of Mate Tea (*Ilex paraguariensis*) Ingestion on mRNA Expression of Antioxidant Enzymes, Lipid Peroxidation, and Total Antioxidant Status in Healthy Young Women. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 1775–1780, 2009.
- MCCLEMENTS, D. J. et al. Structural Design Principles for Delivery of Bioactive Components in Nutraceuticals and Functional Foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, p. 577–606, 2009.
- MEINHART, A. D. et al. Methylxanthines and Phenolics Content Extracted during the Consumption of Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) Beverages. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, p. 2188–2193, 2010.
- MENDES, G. et al. Alkaloidal metabolites from *Aspergillus felis* and their activities against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Phytochemistry Letters**, v. 17, p. 28–35, set. 2016.
- MENINI, T. et al. Protective action of *Ilex paraguariensis* extract against free radical inactivation of paraoxonase-1 in high-density lipoprotein. **Planta Med**, v. 73, p. 1141-1147, 2007.
- MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidante activity by the use of DPPH Free Radical Method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.
- MESSINA, D. et al. Efecto hipolipemiante del consumo de mate en individuos dislipidêmicos. **Nutr Hosp**, v. 31, n. 5, p. 2131-2139, 2015.
- MILNER, J. A. Molecular Targets for Bioactive Food Components. **J. Nutr.**, v. 134, p. 2492–2498, 2004.
- MISRA, H. P; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v. 247, n. 10, p.3170–5, 1972.
- MORAIS, E. C. 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.

MÜLLER, B.; GROSSNIKLAUS, U. Model organisms — A historical perspective. **Journal of proteomics**, v. 73, p. 2054-2063, 2010.

NASCIMENTO, B. R. et al. Epidemiologia das Doenças Cardiovasculares em Países de Língua Portuguesa: Dados do “Global Burden of Disease”, 1990 a 2016. **Arq Bras Cardiol**, v. 110, n. 6, p. 500-511, 2018.

NEGRÃO-MURAKAMI, A. N. et al. Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) extract through nanofiltration. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2211–2216, 2011.

NEGRÃO-MURAKAMI, A. N. et al. Influence of DE-value of maltodextrin on the physicochemical properties, antioxidant activity, and storage stability of spray dried concentrated mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **LWT - Food Science and Technology**, v. xxx, p. 1-7, 2016.

NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 503–515, 2010.

NOGUEIRA, G. F. **Produção e caracterização de micropartículas com Multicamadas obtidas por gelificação iônica associada à Interação eletrostática**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual de Campinas, 2013.

NUNES, G. L. et al. Microencapsulation of freeze concentrated *Ilex paraguariensis* extract by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 151, p. 60–68, 2015.

OELHKE, K. et al. Potential bioavailability enhancement of bioactive compounds using food-grade engineered nanomaterials: a review of the existing evidence. **Food Funct.**, v. 5, p. 1341-1359, 2014.

OHKAWA, H; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, v. 95, n. 2, p. 351–8, 1979.

OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 66, n. 17, p. 2012–2031, 2005.

OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans. **J Nutr.**, v. 131, n. 1, p. 66-71, 2001.

PEREIRA, A. A. F. et al. *Ilex paraguariensis* supplementation may be an effective nutritional approach to modulate oxidative stress during perimenopause. **Exp Gerontol.**, v. 90, p. 14-18, 2017.

PERES, R. G. et al. HPLC-DAD-ESI/MS Identification and Quantification of Phenolic Compounds in *Ilex paraguariensis* Beverages and On-Line Evaluation of Individual Antioxidant Activity. **Molecules**, v. 18, p. 3859-3871, 2013.

- PETRILLI, A. A. et al. Effect of Chocolate and Yerba Mate Phenolic Compounds on Inflammatory and Oxidative Biomarkers in HIV/AIDS Individuals. **Nutrients**, v. 132, n. 8, p. 1-14, 2016.
- PINHATI, V. R. **Avaliação das atividades biológicas e genotóxicas em dois derivados de guanilhidrazonas**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.
- PIOVEZAM-BORGES, A. C. et al. Antioxidant potential of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) extracts in *Saccharomyces cerevisiae* deficient in oxidant defense genes. **Braz. J. Biol.**, v. 76, n. 2, p. 539-544, 2016.
- POPA-WAGNER, A. et al. ROS and Brain Diseases: The Good, the Bad, and the Ugly. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 1-14, 2013.
- POPKIN, B. M. The Nutrition Transition and Obesity in the Developing World. **J. Nutr.**, v. 131, p. 871–873, 2001.
- POPKIN, B. M; KENAM, W, R. Preventing type 2 diabetes: Changing the food industry. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 30, n. 3, p 373–383, 2016.
- POWELL, J. J. et al. Origin and fate of dietary nanoparticles and microparticles in the gastrointestinal tract. **Journal of Autoimmunity**, v. 34, p. 226-233, 2010.
- PRUDÊNCIO, A. P. A. et al. Phenolic composition and antioxidant activity of the aqueous extract of bark from residues from mate tree (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) bark harvesting concentrated by nanofiltration. **Food and bioproducts processing**, v. 90, p 399–405, 2012.
- PUANGPRAPHANT, S., BERHOW, M. A., & MEJIA, E. G. 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.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biología de las plantas*. **Reverté**, 1992.
- RÉ, M. I. Microencapsulation by Spray Drying. **Drying Technology**, v. 16, n. 6, p. 1195–1236, 1999.
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.
- REISZ, J. A. et al. Effects of ionizing radiation on biological molecules: Mechanisms of damage. **Antiox Redox Signaling**, v. 21, p. 260-292, 2014.
- RESCIGNO, T. et al. Bioactive Nutrients and Nutrigenomics in Age-Related Diseases. **Molecules**, v. 105, n. 22, p. 1-26, 2017.
- RESENDE, P. E. 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.

- RIACHI, L. G.; DE MARIA, C. A. B. Yerba mate: An overview of physiological effects in humans. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 308–320, 2017.
- RICE-EVANS, C. et al. Bioavailability of flavonoids and potential bioactive forms in vivo. **Drug Metabolism and Drug Interactions**, v. 17, n. 1-4, p. 291-310, 2000.
- RICORDI, C.; GARCIA-CONTRERAS, M.; FARNETTI, S. Diet and Inflammation: Possible Effects on Immunity, Chronic Diseases, and Life Span. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 34, n. 1, p.10–13, 2015.
- ROBERT, P. et al. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 1386-1394, 2010.
- ROCHA, L. C. R. **Desenvolvimento de micropartículas contendo suco de tomate via gelificação iônica**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Biomateriais, Universidade Federal de Lavras, 2017.
- ROSE, M., WINSTON, F., HIETER, P. **Methods in yeast genetics. A laboratory course manual**, New York, U.S.A. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.
- ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I. J.; TALMON, Y. Y. A Scanning Electron Microscopy Study of Microencapsulation. **Journal of food science**, v. 50, p. 139-144, 1985.
- SAMPAIO, R. C.; MORAES, C. Estresse oxidativo e envelhecimento: papel do exercício físico. **Motriz**, v. 16, n. 2, p. 506- 515, 2010.
- SANTOS, A. F. et al. Efeito antioxidante da diosmina: revisão integrativa. **ABCS Health Sci.**, v. 43, n. 3, p. 175-180, 2018b.
- SANTOS, C. M.; DE MORAIS, L. C. Parâmetros termodinâmicos da casca de laranja desidratada. **Quim. Nova**, v. 38, n. 4, p. 488-492, 2015.
- SANTOS, C. O. et al. Caracterização, teor de polifenóis totais e atividade antioxidante em diferentes tipos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) para chimarrão. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 73, n. 1, p. 77-86, 2014.
- SANTOS, J. A. S. et al. Estudo do potencial antioxidante da *Anacardium occidentale* L. e determinação de seus compostos fenólicos. **Diversitas jornal**, v. 3, n. 2, p.455-474, 2018a.
- SARTORI, T. et al. Ascorbic acid microencapsulation by spray chilling: Production and characterization. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 353–360, set. 2015.
- SCALBERT, A. et al. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 4, 287–306, 2005.
- SCHEEPENS, A.; TAN, K.; PAXTON, J. W. Improving the oral bioavailability of beneficial polyphenols through designed synergies. **Genes Nutr.**, v. 5, p. 75–87, 2010.

- SCHINELLA, G. R. et al. Antioxidant Effects of an Aqueous Extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, p. 357–360, 2000.
- SCHUSTER, J.; MITCHELL, E. S. More than just caffeine: psychopharmacology of methylxanthine interactions with plant-derived phytochemicals. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 8, n. 89, p. 263-274, 2019.
- SILVA, E.M. et al. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1012–1018, 2007.
- SIMEONI, C. P. et al. Microencapsulação de probióticos: inovação tecnológica na indústria de alimentos. **REGET**, v. 18, p. 66-75, 2014.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. **Elsevier**, v. 299, p. 159–178, 1999.
- SMITHERS, G. W. Food Science - yesterday, today and tomorrow. **Reference Module in Food Sciences**, v. 2016, p. 1-12, 2016.
- SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n. 4, p.1077-1080, 2003.
- SOBEL, R.; VERSIC, R.; GAONKAR, A. G. Chapter 1 - Introduction to Microencapsulation and Controlled Delivery in Foods. **Microencapsulation in the Food Industry**, p. 3–12, 2014.
- SOUSA, B. A.; CORREIA, R. T. P. Phenolic content, antioxidant activity and anti-amylolytic activity of extracts obtained from bioprocessed pineapple and guava wastes. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 01, p. 25 - 30, 2012.
- SOUZA, A. H. P. et al. Phytochemicals and bioactive properties of *Ilex paraguariensis*: An in-vitro comparative study between the whole plant, leaves and stems. **Food Research International**, v. 78, p. 286–294, 2015.
- TAGUCHI, C. et al. Estimated Dietary Polyphenol Intake and Major Food and Beverage Sources among Elderly Japanese. **Nutrients**, v. 7, p. 10269–10281, 2015.
- TILMAN, D; CLARK, M. Global diets link environmental sustainability and human health. **Nature**, v. 515, 2014.
- VALDRAMIDIS, V. P.; KOUTSOUMANIS, K. P. Challenges and perspectives of advanced technologies in processing, distribution and storage for improving food safety. **Current Opinion in Food Science**, v. 12, p. 63–69, 2016.
- VIANA, M. R. A. et al. A racionalidade nutricional e sua influência na medicalização da comida no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 2, p. 447-456, 2017.

VICINI, S.; CASTELLANO, M.; MAURI, M.; MARSANO, E. Gelling process for sodium alginate: New technical approach by using calcium rich micro-spheres. **Carbohydrate Polymers**, v. 134, p. 767-774, 2015.

VIEIRA, V. L. et al. Ações de alimentação e nutrição e sua interface com segurança alimentar e nutricional: uma comparação entre Brasil e Portugal. **Saúde Soc**, v. 22, n. 2, p. 603-617, 2013.

WU, X. et al. Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States. **J. Agric. Food Chem**, v. 52, p. 4026–4037, 2004.

XIONG, Q.; KADOTA, S.; TANI, T.; NAMBA, T. Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. **Biol. Pharm. Bull.**, v.19, p. 446-449, 1996.

YAN et al. Preparation of phycocyanin microcapsules and its properties. **Food and bioproducts processing**, v. 92, p. 89 – 97, 2014.

YOUDIM, K. A. et al. Interaction between flavonoids and the blood–brain barrier: in vitro studies. **Journal of Neurochemistry**, v. 85, p. 180–192, 2003.

ZAKRAJŠEK, T.; RASPOR, P.; JAMNIK, P. *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase as a model organism — characterization at cellular and proteome level. **Journal of Proteomics**, v. 74, p. 2837-2845, 2011.

APÊNDICE A – Artigo científico

Extratos de erva-mate livre e microencapsulado modulam enzimas e atividade antioxidante *in vivo*

Resumo: *Objetivo:* Os benefícios do consumo de erva-mate têm sido amplamente divulgados na comunidade científica. Entretanto, são escassos dados que abordem sobre os efeitos do consumo de microcápsulas contendo erva-mate. O objetivo foi desenvolver microcápsulas e averiguar se extratos microencapsulados de erva-mate atuam melhor na modulação das enzimas e atividade antioxidante *in vivo* em comparação a extratos livres. *Metodologia:* Extrato de erva-mate liofilizado foi utilizado na elaboração de microcápsulas através da técnica de gelificação iônica. As microcápsulas foram avaliadas quanto tamanho de partícula, solubilidade, eficiência de encapsulação, MEV e FTIR. Posteriormente foram testadas no estudo *in vivo*, onde ratos Wistar foram divididos em controle/extrato livre/extrato microencapsulado/microcápsulas vazias. Durante 30 dias os ratos receberam uma vez ao dia, via gavagem, seus respectivos tratamentos. Os grupos da erva-mate receberam dose efeito de 28,57 mg de Compostos Fenólicos/Kg. Foram coletados fígado, cérebro e plasma dos animais, onde foram avaliadas as enzimas SOD, CAT e GPx, atividade antioxidante pelo método de FRAP e peroxidação lipídica por TBARS. *Resultados:* A técnica de gelificação iônica com alginato de sódio foi capaz de gerar partículas com diâmetro médio de 91,42 μm , solubilidade média de 21,2% e eficiência de 64,73%. Apesar do MEV demonstrar um formato irregular das microcápsulas, o FTIR evidenciou que a gelificação iônica conseguiu microencapsular e proteger os compostos biotivos da erva-mate. As microcápsulas de erva-mate aumentaram a capacidade antioxidante no plasma e diminuíram a peroxidação lipídica no tecido cerebral ($p > 0,05$). Com referência ao comportamento das enzimas antioxidantes o extrato microencapsulado e o extrato livre atenuaram os níveis de SOD, com diferença significativa somente ao grupo microcápsulas vazias. Enquanto o extrato livre, exclusivamente, conseguiu reduzir os níveis enzimáticos de CAT e GPx no fígado. *Conclusão:* Nosso estudo em roedores sugere que a ingestão da erva-mate em sua forma microencapsulada é a maneira mais eficiente de promover as defesas antioxidantes no organismo e reduzir a peroxidação lipídica. Concluímos que a erva-mate pode ser um importante elemento na dieta dos animais, visto que, o consumo regular durante 30 dias caracterizou benefícios à saúde dos mesmos. No entanto, mais estudos são necessários para o entendimento de como cada substância bioativa é absorvida.

Free and microencapsulated yerba-mate extracts modulate enzymes and antioxidant activity *in vivo*

Abstract: *Objective:* The benefits of yerba mate have been widely disseminated in the scientific community. However, data on the effects of consumption of microcapsules with yerba mate are scarce. The objective was to develop microcapsules and investigate whether microencapsulated extracts of yerba mate perform better in modulating enzymes and antioxidant activity *in vivo* compared to free extracts. *Methodology:* Lyophilized yerba mate extract was used in the elaboration of microcapsules through the ionic gelation technique. As microcapsules were evaluated as particle size, solubility, encapsulation efficiency, SEM and FTIR. Subsequently they were tested in *in vivo* study, where the rats were divided into control / free extract / microencapsulated extract / empty microcapsules. For 30 days the mice received once a day, via gavage, their related treatments. The yerba mate groups received a dose effect of 28.57 mg of Phenolic Compounds / kg. Liver, brain and plasma were collected from the animals, where the SOD, CAT and GPx enzymes were evaluated, antioxidant activity by the FRAP method and lipid peroxidation by TBARS. *Results:* The ionic gelation technique with sodium alginate was able to generate particles with a mean diameter of 91.42 μm , mean solubility of 21.2% and efficiency of 64.73%. Although the SEM showed an irregular shape of the microcapsules, the FTIR showed that the ionic gelation was able to microencapsulate and protect the bioactive compounds of the yerba mate. Yerba mate microcapsules increased plasma antioxidant capacity and decreased lipid peroxidation in brain tissue ($p > 0.05$). Regarding the behavior of antioxidant enzymes, the microencapsulated extract and the free extract attenuated the levels of SOD, with significant difference only to the empty microcapsule group. While the free extract alone was able to reduce the enzymatic levels of CAT and GPx in the liver. **Conclusion:** Our study in rodents suggests that ingestion of yerba mate in its microencapsulated form is the most efficient way to promote antioxidant defenses in the body and reduce lipid peroxidation. We conclude that yerba mate may be an important element in the diet of animals, since regular consumption during 30 days characterized health benefits. However, further studies are needed to understand how each bioactive substance is absorbed.

Introdução

Com a alteração no padrão alimentar da população instalou-se um quadro mundial preocupante de doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT), com maior incidência para obesidade e outras doenças inflamatórias. A adoção de hábitos de vida saudáveis, como a prática de exercícios e inclusão de alimentos funcionais na dieta, pode contribuir para a promoção da saúde dos indivíduos (NEGRÃO-MURAKAMI et al., 2011; TILMAN; CLARK, 2014). Os compostos funcionais de maior interesse nos alimentos são os antioxidantes, comumente presentes em organismos do reino vegetal, como a *Ilex paraguariensis*. A erva-mate possui importância econômica e cultural expressiva nos países da América do Sul, é amplamente ingerida na forma tradicional de chimarrão e seu consumo é pautado no hábito de compartilhar esta bebida típica.

No extrato de erva-mate é possível obter-se inúmeras substâncias que possivelmente contribuem na ação antioxidante desta planta (HECK; DE MEJIA, 2007). O consumo de biocompostos da erva-mate sugere efeitos positivos na manutenção da saúde, modulando a fisiologia do organismo promovendo ações na redução da inflamação e do estresse oxidativo (PETRILLI et al., 2016), na diminuição de perfil lipídico (MESSINA et al., 2015), na glicemia e obesidade (KIM et al., 2015), entre outros (BRACESCO et al., 2011).

Contudo, estas substâncias bioativas são altamente sensíveis e podem ser degradadas frente a fatores intrínsecos, como a auto-oxidação e quanto a fatores externos. Devido a isso surgiram tecnologias, como a microencapsulação, com o intuito de preservar estes componentes até serem consumidos pelos indivíduos. A microencapsulação é uma técnica capaz de proteger o material encapsulado de condições adversas, como luz, umidade, pH e oxigênio, auxiliando na estabilidade dos compostos funcionais e possibilitando uma liberação controlada destes sob condições específicas (DIAS, 2017; ETCHEPARE et al., 2015). Apesar do aumento das pesquisas com erva-mate nos últimos anos são escassos estudos que abordem sobre o consumo de seu extrato microencapsulado, bem como sobre o efeito protetor *in vivo* destes em comparação a extratos livres.

Materiais e métodos

Microencapsulação

Utilizou-se a técnica de geleificação iônica externa seguindo os princípios descritos por Yan et al. (2014) com modificações. Extrato liofilizado de erva-mate (7,5%) foi preparado para

microencapsulação utilizando alginato de sódio (1,5%) como material de revestimento, numa proporção de 5:1. Após homogênea, esta solução foi atomizada utilizando compressor de ar e bomba peristáltica acoplados a um extensor e um bico atomizador número 3 (LabMiq) em solução de cloreto de cálcio 1,1%. A proporção da solução de alginato com extrato de erva-mate para a solução reticulante de cloreto de cálcio foi de 1:2. Foram utilizados parâmetros de vazão de alimentação de 0,3 L/h, fluxo de ar de 10 L.min⁻¹, pressão de 3 bar e altura de 8 ± 0,5 cm entre o líquido reticulante e o bico aspersor. Microcápsulas vazias também foram produzidas, somente com alginato, seguindo o mesmo protocolo para atuarem como cápsulas controle no ensaio posterior.

Eficiência de microencapsulação

A eficiência de encapsulação foi calculada, segundo Equação 1, medindo a quantidade de compostos fenólicos do extrato liofilizado de erva-mate inicial e do seu residual não encapsulado. A análise foi realizada em triplicata a cada produção de microcápsulas e os resultados estão apresentados em porcentagem.

(1)

$$EE\% = (AA_0 - AA_R * 100)/AA_0$$

sendo,

AA₀: Atividade antioxidante do extrato inicial;

AA_r: Atividade antioxidante do resíduo.

Propriedades físico-químicas das microcápsulas

Tamanho de partícula

A distribuição de tamanho de partícula foi analisada utilizando a técnica de difração de raios laser (*Bettersizer S2*). Foram avaliados o diâmetro médio de Sauter, D[3,2], os parâmetros D10, D50 e D90, no qual se encontram 10%, 50% e 90% do volume total das partículas, respectivamente; e o valor de Span ou largura da distribuição, dada pela Equação 2. A análise foi realizada em triplicata e os resultados estão apresentados em micrômetros (µm).

(2)

$$Span = \frac{D90 - D10}{D50}$$

Solubilidade em água

A solubilidade das microcápsulas foi determinada segundo a metodologia descrita por Cano-Chauca et al. (2005), com adaptações. A solubilidade das microcápsulas em água foi analisada em duplicata. O cálculo foi realizado pela diferença de massa e os resultados foram expressos em percentual.

Morfologia

A morfologia das microcápsulas foi observada sob microscópio eletrônico de varredura (VEGA3 Tescan). As micropartículas foram fixadas em stubs com fita 52 de carbono dupla face e recobertas com uma fina camada de ouro em metalizador Quorum Q150R ES. Observações foram feitas usando microscópio eletrônico de varredura (SEM) em uma aceleração tensão de 20 kV. As imagens apresentadas são resultados de aumentos (*zoom*) de 400 e 800 vezes.

Avaliação por Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O extrato de erva-mate liofilizado, suas microcápsulas e as microcápsulas vazias foram analisados por espectroscopia na região do infravermelho para identificar os grupamentos funcionais presentes. As condições operacionais foram região de varredura 4000 a 650 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e o registro dos espectros se deu através de Transmitância (%T). Os espectros foram obtidos por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), utilizando equipamento Cary 630 FTIR (Agilent Technologies).

Estudo in vivo

Aprovação ética

O protocolo do estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Passo Fundo (UPF, número 043/2017) antes de serem iniciados os experimentos. Os ensaios experimentais foram conduzidos de acordo com a legislação nacional do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Animais e reagentes

32 ratos Wistar machos (160–240 g) foram obtidos através do Biotério da UPF e mantidos em gaiolas, contendo no máximo quatro animais por caixa. Os animais foram

ambientados em condições controladas (temperatura entre $22 \pm 1^\circ\text{C}$, com exaustão do ar e ciclo claro-escuro de 12:12 h) com ração e água ad libitum. Os reagentes de ensaio foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, EUA), e os outros produtos químicos utilizados neste estudo foram de grau analítico e obtidos de fornecedores comerciais padrão.

Protocolo do estudo in vivo

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos ($n = 8$): Controle (C), Extrato Livre (EL), Extrato Microencapsulado (EM), Microcápsulas Vazias (MV). Durante 30 dias, os animais receberam uma vez ao dia via gavagem seus respectivos tratamentos. Para os grupos erva-mate a dose efeito foi de 28,57 mg de Compostos Fenólicos/Kg.

Coleta de material biológico

Ao final do protocolo, os ratos foram eutanaziados e amostras de sangue foram coletadas e centrifugadas a $1500 \times g$ por 15 minutos para isolamento do plasma. Os órgãos fígado e cérebro foram rapidamente removidos, homogeneizados em tampão fosfato de potássio 20mM pH 7,5 e solução de cloreto de sódio 150mM, respectivamente, e centrifugados igualmente. O plasma e o sobrenadante das amostras foram armazenados para realização das análises de peroxidação lipídica e das enzimas e atividade antioxidante.

Análises antioxidantes

Superóxido dismutase (SOD)

Para medir a atividade da enzima SOD foi realizada uma análise cinética iniciada após a adição de adrenalina, segundo metodologia de Misra e Fridovich (1972). A leitura espectrofotométrica foi medida em triplicata a 480 nm e os dados foram corrigidos pelo teor de proteína da amostra. Os valores da enzima estão expressos em Unidades de SOD/mg proteína.

Catalase (CAT)

A atividade da enzima CAT foi determinada através do decaimento de absorbância do peróxido de hidrogênio, segundo metodologia de Aebi (1984). A leitura espectrofotométrica foi medida em triplicata a 240 nm e os dados foram corrigidos pelo teor de proteína da amostra. A atividade enzimática está expressa em nmol de H_2O_2 reduzidos/minuto/mg proteína.

Glutathione Peroxidase (GPx)

A atividade da enzima GPx foi determinada pelo consumo de NADPH a partir da adição do peróxido de hidrogênio 0,4 mM, segundo metodologia de (Flohé e Günzler, 1984). A leitura espectrofotométrica foi medida em triplicata a 340 nm e a atividade da GPx foi determinada usando a extinção molar coeficiente $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os dados foram corrigidos pelo teor de proteína da amostra e estão expressos em nmol de H_2O_2 reduzidos/minuto/mg proteína.

Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica foi estimada pela medição de TBARS de acordo com o método de Buege e Aust (1978). A leitura espectrofotométrica foi medida em triplicata a 532 nm e a absorbância foi comparada com curva analítica previamente desenvolvida usando malonaldeído (MDA) como padrão e corrigidos pelo conteúdo de proteína. Os valores estão expressos em nmol MDA/mg proteína.

Proteína

O teor de proteína foi determinado em todas as amostras para correção nos cálculos de atividade enzimática. O protocolo utilizado foi segundo método descrito por Bradford (1976) utilizando o corante Comassie brilhante azul. O conteúdo de proteína foi medido em triplicata a 595 nm e a absorbância foi comparada com curva analítica previamente desenvolvida usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

Determinação do poder de redução do íon ferro (FRAP)

A avaliação do potencial antioxidante através da redução férrica foi realizado segundo metodologia descrita por Benzie e Strain (1996) com adaptações de Arnous et al. (2002). A quantificação da capacidade antioxidante foi medida em triplicata a 620 nm e a absorbância foi comparada com curva analítica previamente desenvolvida usando Trolox como padrão. Os dados estão expressos em $\mu\text{g EAG/mL}$ de amostra.

Análise Estatística

Os dados foram primeiramente submetidos a teste de Shapiro-Wilk para verificar se havia distribuição normal. Dados considerados paramétricos foram avaliados utilizando Análise de Variância com pós teste de Tukey. No caso de dados não paramétricos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Student-Newman-Keuls. O programa estatístico utilizado foi o SPSS 23.

Resultados e Discussão

Eficiência de Encapsulação

A gelificação iônica externa utilizada neste estudo é uma das tecnologias mais simples e convenientes no campo da encapsulação. Utilizou-se o alginato de sódio como encapsulante pela sua capacidade de gelificação instantânea a temperatura ambiente quando em contato com a solução reticulante de cloreto de cálcio (COMUNIAN; FAVARO-TRINDADE, 2016; YAN et al., 2014). A concentração utilizada foi de 1,5%, como sugestão para próximos estudos, a variação deste parâmetro pode ser interessante já que formulações de alginato com viscosidade média parecem conseguir encapsular melhor alguns compostos como polifenóis (CUJIC et al., 2016).

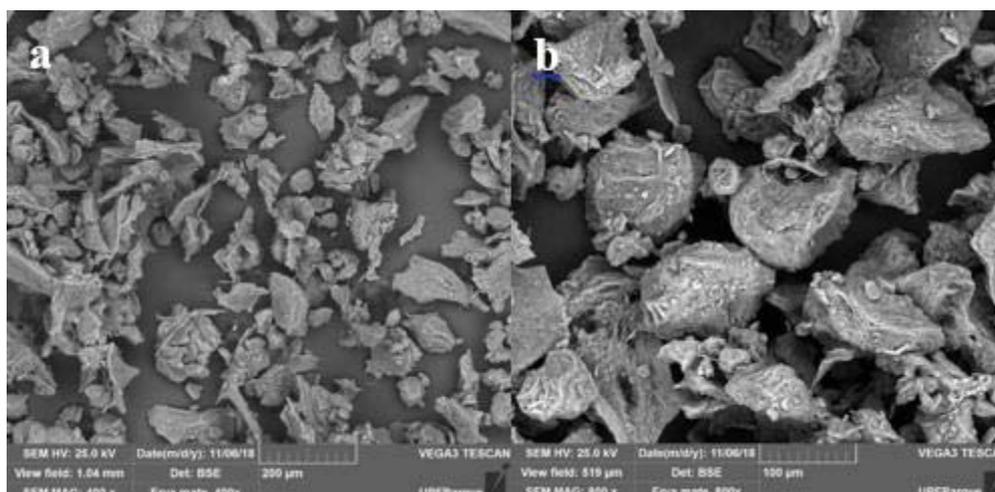
O principal intuito com a encapsulação era reter o máximo de compostos bioativos em uma menor quantidade de cápsulas. Por isso, além de utilizarmos um extrato de erva-mate liofilizado, já concentrado quanto ao extrato aquoso, optou-se por usar uma proporção de cinco partes de núcleo para uma de encapsulante. Desta maneira, a eficiência das cápsulas utilizadas foi de 64,73%, contendo de compostos fenólicos 134,94 mg EAG/g de cápsula.

Morfologia das microcápsulas de erva-mate

Pelas micrografias, que podem ser visualizadas na Figura 1, nota-se um formato irregular nas microcápsulas, isto pode ter ocorrido pois na elaboração destas utilizou-se alta proporção de núcleo em relação ao alginato (5:1). Esta relação parece ser determinante no formato das microcápsulas, pois a elevada quantidade de extrato liofilizado exigiria talvez uma maior concentração de alginato para conseguir desenvolver uma reticulação mais potente e eficaz, melhorando o aspecto das microcápsulas (YAN et al., 2014).

Outra questão importante é que as microcápsulas foram submetidas ao processo de liofilização, podendo contribuir para o formato irregular das microcápsulas. A eliminação da água através dos seus poros causa uma distorção no formato das cápsulas. Assim como, as altas temperaturas empregadas na liofilização são possíveis de desestabilizar a matriz estrutural de cálcio-alginato (CUJIC et al., 2016). Rosenberg, Kopelman e Talmon. (1985) e Hadiyanto et al. (2017) relataram formatos irregulares devido a rápida evaporação da água durante a liofilização.

Figura 1 - Micrografias de microcápsulas de erva-mate nos aumentos 400x(a) e 800x(b).



Tamanho de partícula das microcápsulas de erva-mate

Constatou-se que o diâmetro médio de Sauter, $D[3,2]$, foi de $91,42 \mu\text{m}$, este parâmetro relaciona o volume e a superfície das gotas da fase dispersa, proporcionando uma medida do diâmetro médio, onde está a maioria das partículas (BENAVIDES et al., 2016). Ainda, o parâmetro $D90$ que representa o tamanho máximo de 90% das cápsulas foi de $376,30 \mu\text{m}$, juntamente com as medidas $D50$ ($180,43 \mu\text{m}$) e $D10$ ($59,93 \mu\text{m}$), todas as porcentagens detectadas demonstram que as cápsulas formadas enquadram-se na classificação de microcápsulas, com diâmetros abaixo de $1000 \mu\text{m}$. O valor de span apresentado foi de 1,75, indicando uma ampla faixa de distribuição de tamanho, quanto mais próximo o valor de 1 indica uma homogeneidade maior de amostra.

Solubilidade das microcápsulas de erva-mate

As microcápsulas apresentaram solubilidade de $21,2 \pm 1,69\%$ quando submetidas à agitação por 5 min em água. A solubilidade é um fator importante pois é fundamental na definição das condições em que a cápsula poderá ser utilizada e em quais circunstâncias ela será dissolvida. A baixa solubilidade em água era uma característica desejada nas micropartículas produzidas neste estudo, primeiramente pensando que seu veículo de ingestão seria em meio aquoso, para administração no protocolo *in vivo*. Na sequência, a insolubilidade aquosa era requerida pois a cápsula não podia desintegrar-se quando prontamente introduzida, pois o intuito eram os compostos bioativos da erva-mate manterem-se encapsulados durante a passagem do estômago e serem absorvidos sem grandes perdas no tecido alvo, o intestino.

A reticulação é a maneira de tornar certas substâncias insolúveis em água e a liberação do material de núcleo pode ser controlada a partir do grau de reticulação. Sendo assim, quanto maior o grau de reticulação mais difícil a difusão do material (LI et al., 2009). A liberação do composto microencapsulado ocorre por difusão através do relaxamento da estrutura do gel. Apesar da gelificação iônica ser conhecida por desenvolver partículas insolúveis em água, sabe-se que pelo método externo podem-se gerar matrizes porosas. De acordo com Córdoba, Deladino e Martino (2013) a presença de macroporos na matriz de alginato facilita a difusão de moléculas hidrofílicas. Talvez a baixa porcentagem de alginato na elaboração de nossas microcápsulas tenha causado uma porosidade considerável em sua estrutura.

Análise de espectros no infravermelho de microcápsulas de erva-mate

De acordo com a Figura 9, podemos identificar no extrato liofilizado de erva-mate (linha vermelha) uma banda pronunciada em $3259,55\text{ cm}^{-1}$ referente ao grupamento hidroxil, que pode estar inserido em componentes como água, álcoois e compostos fenólicos. Podemos inferir que esta banda refere-se aos compostos fenólicos, amplamente identificados no extrato de erva-mate (ISTENIC; KOROŠEC; ULRIH, 2016). Ainda no extrato podem ser observadas as bandas $2922,23$ e $2853,28\text{ cm}^{-1}$ referentes ao estiramento da ligação C-H, representando cadeias alifáticas de carbono, que podem estar presentes em alguns bioativos da erva-mate, como ácido clorogênico e ácido caféico (SANTOS; DE MORAIS, 2015).

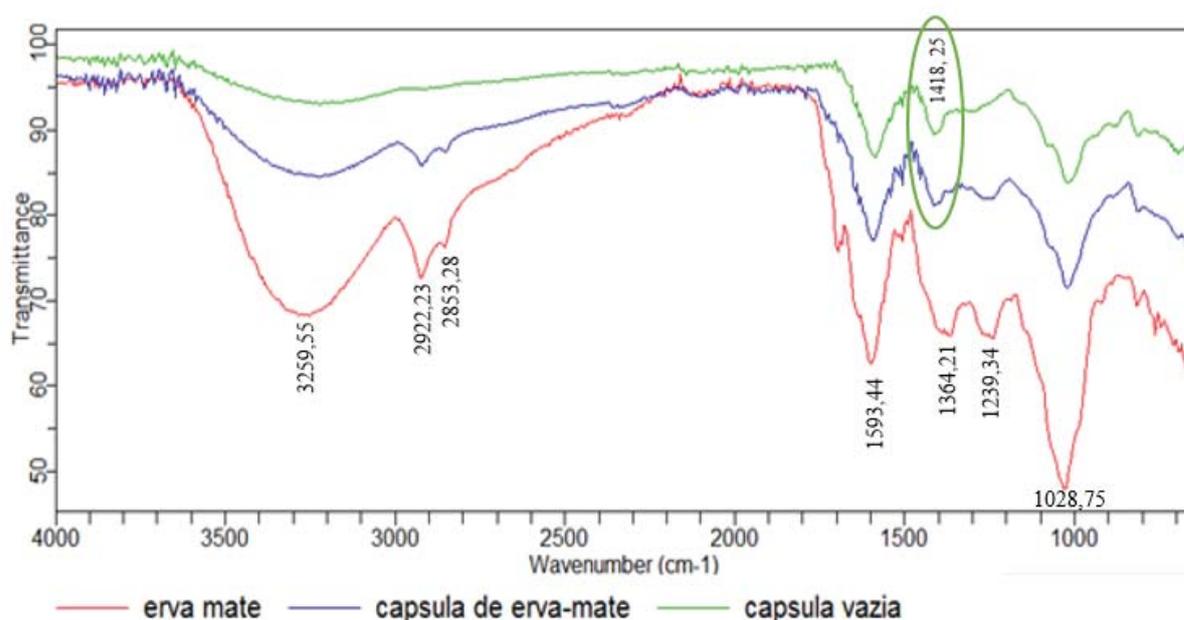
Estas três bandas citadas no extrato liofilizado também podem ser observadas nas microcápsulas de erva-mate (linha azul), no entanto, em menor intensidade. Isto pode ocorrer pois a gelificação iônica é uma técnica que gera partículas do tipo microesferas, onde o núcleo encontra-se disperso por toda matriz, inclusive na superfície da cápsula. Sendo assim, os grupamentos funcionais contido no extrato podem ser detectados em menor intensidade na parte externa das microcápsulas de erva-mate, o que indica que o a que a encapsulação envolveu o material de núcleo protegendo-o.

A semelhança vibracional das microcápsulas de erva-mate e vazias é devido ao FTIR medir a superfície da amostra. As vibrações da banda em $1418,25\text{ cm}^{-1}$ nas microcápsulas vazias podem ser características de grupo carboxilatos, encontrados na estrutura de aminoácidos e em moléculas de alginato, presente na parte externa das cápsulas (HADIYANTO et al., 2017). Esta mesma banda aparece nas microcápsulas de erva-mate, porém com menor intensidade. Isto nos permite concluir que os parâmetros utilizados na encapsulação foram eficientes, já que ambas partículas foram elaboradas como o mesmo material de parede.

Algumas bandas podem ser identificadas em todas amostras pela presença de alguma grupamento ou ramificação molecular em comum. A banda em $1593,44\text{ cm}^{-1}$ representa o grupamento amina. No extrato de erva-mate esta banda indica presença das metilxantinas, enquanto para as cápsulas vazias identifica a reticulação do alginato. A banda 1028 cm^{-1} descreve o alongamento de $\text{C}=\text{O}$. No extrato de erva-mate este grupamento está presente nos seus compostos antioxidantes da erva-mate, como ácido clorogênico, teobromina e cafeína. Já nas cápsulas vazias essa banda sugere a ligação do Ca^{2+} aos ácidos gulurônicos da rede alginato (BLANDÓN et al., 2016).

A microcápsula de erva-mate apresentou um perfil de vibrações intermediário entre extrato liofilizado e cápsulas vazias. Isto é um aspecto positivo pois espera-se que as microcápsulas de erva-mate tenham similaridades com o extrato liofilizado, já que este perfaz o núcleo das microcápsulas, assim como as cápsulas vazias, pois são compostas somente de alginato, material utilizado como encapsulante. Com isso, demonstra-se a perfeita interação entre as substâncias de material de parede e núcleo.

Figura 9 - Espectros gerados na análise de FTIR para extrato liofilizado de erva-mate, microcápsulas de erva-mate e microcápsulas vazias.



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Análises antioxidantes

Podemos observar na Tabela 7 a quantificação da SOD no fígado. Os grupos extrato livre e extrato microencapsulado de erva-mate demonstraram reduzir significativamente os valores enzimáticos da SOD em relação ao grupo das microcápsulas vazias, porém sem diferença entre eles.

Tabela 1 – Quantificação de superóxido dismutase (SOD).

Grupo	Fígado (unidades de SOD/mg proteína)
Controle	9,47±4,81 a
Extrato livre	5,20±1,17 ab
Extrato microencapsulado	7,09±2,43 ab
Microcápsula vazia	13,85±3,81 a
p-valor	0,0010

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tuckey ($p>0,05$). Fonte: elaborado pelo autor (2019).

Quanto as enzimas CAT e GPx, como demonstram as Tabelas 2 e 3, podemos observar que somente o extrato livre de erva-mate foi capaz de reduzir os níveis enzimáticos. A diminuição foi detectada no tecido hepático provavelmente pela CAT e GPx possuem alta atividade no fígado, enquanto órgãos como cérebro possuem pequenas quantidades destas enzimas (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010).

Tabela 2 – Quantificação de catalase (CAT).

Grupo	Fígado (nmol de H₂O₂ reduzidos/minuto/mg proteína)	Cérebro	Plasma
Controle	0,046±0,011 a	0,019±0,016 a	0,561±0,32 a
Extrato livre	0,032±0,011 b	0,022±0,027 a	0,496±0,42 a
Extrato microencapsulado	0,047±0,007 a	0,012±0,021 a	0,602±0,40 a
Microcápsula vazia	0,048±0,012 a	0,013±0,015 a	0,589±0,45 a
p-valor	0,0001	0,6172	0,9380

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si ($p>0,05$) pelo teste de Tuckey para fígado e plasma, e pelo teste de Student-Newman-Keuls para cérebro. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

Tabela 3 – Quantificação de glutathiona peroxidase (GPx).

Grupo	Fígado (nmol de H₂O₂ reduzidos/minuto/mg proteína)	Cérebro
Controle	0,023±0,007 a	0,009±0,007 a
Extrato livre	0,017±0,001 b	0,010±0,007 a
Extrato microencapsulado	0,021±0,002 a	0,007±0,004 a
Microcápsula vazia	0,020±0,006 a	0,004±0,003 a
p-valor	0,0020	0,1800

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Student-Newman-Keuls para fígado, e pelo teste de Tukey para cérebro. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

Alterações nas atividades enzimáticas sinalizam as condições de defesa do organismo. Quando há geração de radicais livres ocorre o acionamento do sistema antioxidante endógeno, as células tendem a aumentar suas defesas primárias. Com isso, as enzimas SOD, CAT, GPx são ativadas, principalmente a SOD que é a precursora na neutralização do radicais livres, elevando estas enzimas no corpo para converter tais espécies em moléculas estáveis (COLPO, 2017; SANTOS et al., 2018b).

O consumo regular de bioativos dietéticos configura como um reforço exógeno antioxidante no combate as ERO. Existem duas possibilidades de atuação destas substâncias no organismo. A primeira é estimulando a síntese enzimática, como demonstrado em diversos estudos com erva-mate (BOAVENTURA et al., 2015; LIMA, 2017; DE OLIVEIRA et al., 2018). A segunda maneira seria agindo diretamente na neutralização dos radicais livres, pela ação de sequestro dos EROs. Os antioxidantes exógenos ligam-se as espécies reativas e as estabilizam (BARBOSA et al., 2010; SANTOS et al., 2018b).

A erva-mate e seus biocompostos são ditos por estabilizar os radicais livres através da doação de elétrons ou pela quelação de metais (LEOPOLDINI; RUSSO; TOSCANO, 2011; SCALBERT et al., 2005). Em nosso estudo *in vivo* os grupos suplementados com erva-mate diminuíram a síntese enzimática, possivelmente por uma ação de “feedback” negativo. As espécies reativas têm ação de sinalizadores celulares, que ativam vias de regulação de genes relacionados à expressão de enzimas responsáveis por manter o equilíbrio intracelular entre oxidantes e antioxidantes. Supostamente, a ingestão da erva-mate com sua oferta de bioativos foi eficaz e suficiente na proteção antioxidante, garantindo a homeostase e reduzido a necessidade de produção das enzimas SOD, CAT e GPx.

Os antioxidantes após ingestão são submetidos ao metabolismo e podem sofrer biotransformações que afetam sua disponibilidade (NIKI, 2010). Para alcançar concentrações suficientes e produzir seus benefícios, eles devem superar muitas barreiras, incluindo extensas modificações enzimática e químicas até alcançar seu sítio de ação (SCHEEPENS; TAN; PAXTON, 2010). Para auxiliar neste processo e garantir a proteção dos compostos bioativos realizou-se a microencapsulação do extrato de erva-mate. No entanto, os resultados apresentados para as quantificações enzimáticas mostram que o extrato livre foi eficaz na redução da SOD, CAT e GPx no fígado, enquanto o extrato microencapsulado somente reduziu os valores de SOD em relação as microcápsulas vazias.

Os sistemas biológicos são heterogêneos por natureza, o que influencia diretamente na efetividade dos antioxidantes. Os bioativos naturais contidos nos alimentos podem ser hidrossolúveis, lipossolúveis, estarem em sua forma livre ou ligada, e ainda como metabólito de algum composto. Cada componente trabalha cooperativamente no seu respectivo local. As formas nas quais estes circulam influenciarão sua polaridade e, assim, sua localização e bioatividade *in vivo* (RICE-EVANS et al., 2000; SCHEEPENS; TAN; PAXTON, 2010; SCALBERT et al 2005).

A ação antioxidante depende do ambiente químico e físico-químico, que varia de acordo com os tecidos e condições fisiológicas. É sabido que os antioxidantes hidrofílicos são capazes de eliminar principalmente os radicais livres presentes na fase aquosa (NIKI, 2010). Em nossa intervenção *in vivo*, o extrato livre foi composto de um extrato liofilizado de erva-mate ressuspenso em água para a suplementação nos animais. Eventualmente, os compostos bioativos hidrofílicos foram solubilizados pelo organismo e conseguiram exercer sua ação na redução de todas as enzimas quantificadas no fígado.

Da mesma maneira, as microcápsulas também foram veiculadas em meio aquoso. Apesar da encapsulação, alguns compostos podem ter interagido com o organismo devido a porosidade das cápsulas, liberando os compostos hidrossolúveis para o meio (CÓRDOBA; DELADINO; MARTINO, 2013). No entanto, as microcápsulas apresentaram influência somente na enzima SOD. Possivelmente, pela ação precursora da SOD na neutralização do radical ânion superóxido (O_2^-) esta é a enzima mais abundante do organismo. Logo, a liberação parcial dos compostos hidrofílicos das microcápsulas de erva-mate já conseguiram ser eficazes na sua modulação enzimática.

Já os antioxidantes lipofílicos conseguem penetrar em membranas e lipoproteínas. Ensaio *in vitro* indicam que flavonóides ou seus metabólitos podem cruzar a barreira hematoencefálica com um potencial de penetração influenciada por sua lipofilicidade Os

compostos fenólicos, ou seus metabólitos menos polares, possuem a vantagem de serem mais absorvidos do que os mais polares (NIKI, 2010; SCHEEPENS; TAN; PAXTON, 2010; YODIM et al., 2003).

Supostamente, os compostos bioativos lipofílicos da erva-mate retidos pela encapsulação conseguiram resistir as intempéries do trato gastrointestinal e foram amplamente distribuídos pelo corpo, atingindo inclusive as membranas do cérebro. Na tabela 4 constam os resultados do ensaio de peroxidação lipídica, em que mediram-se os níveis de malonaldeído (MDA), um produto secundário gerado pela oxidação lipídica.

Tabela 4 – Quantificação das TBARS.

Grupos	Fígado (nmol MDA/mg proteína)	Cérebro
Controle	0,271±0,10 a	2,209±0,90 a
Extrato livre	0,374±0,15 a	2,180±0,45 a
Extrato microencapsulado	0,369±0,12 a	0,922±0,31 b
Microcápsula vazia	0,308±0,10 a	1,782±0,29 a
p-valor	0,0690	0,0001

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tuckey ($p > 0,05$). Fonte: elaborado pelo autor (2019).

Podemos observar que o extrato microencapsulado, unicamente, demonstrou diminuir significativamente os níveis de TBARS no cérebro. Aparentemente, a encapsulação favoreceu a entrega dos compostos bioativos lipofílicos, através da proteção do seu núcleo, alcançando locais de membranas. Assim, os extratos de erva-mate microencapsulados foram eficientes contra a peroxidação lipídica cerebral.

Contudo, a redução da peroxidação foi visualizada somente no tecido cerebral. Provavelmente isto ocorreu pois o cérebro dos mamíferos é um local muito vulnerável a danos oxidativos. Primeiro, por ser formado por membranas com elevados teores de ácidos graxos poli-insaturados, altamente suscetíveis ao processo de oxidação. Segundo, por ser um grande órgão metabolizador de oxigênio, onde a produção de ROS por sistemas enzimáticos e não enzimáticos é um importante fator para o desenvolvimento de processos neurodegenerativos (BIRBEN et al., 2012; POPA-WAGNER, 2013; SCHINELLA et al., 2000).

Em concordância com nossos dados, Colpo (2017) verificou que extratos de erva-mate reduziram a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas, induzidos por uma dieta densa

em colesterol. Cittadini et al. (2019) verificarem que extratos de *Ilex paraguariensis* ainda poderiam ser uma fonte de agentes quimiopreventivos em patologias neurodegenerativas relacionadas com estresse oxidativo.

Matsumoto et al. (2009) relataram que o consumo agudo de erva-mate torrada por mulheres saudáveis diminuiu a oxidação lipídica e aumentou a capacidade antioxidante no plasma. Entretanto, os autores observaram o aumento na expressão de enzimas antioxidantes. Petrilli et al. (2016) não encontraram nenhum efeito da erva-mate na peroxidação lipídica plasmática, possivelmente porque seu estudo envolvia sujeitos com HIV, imunocomprometidos, sujeitos a terapia anti-retroviral.

É evidente que existe uma interação complexa entre as propriedades físico-químicas dos compostos bioativos e os processos de transporte, metabolismo e absorção destes nos diferentes locais do organismo. (OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2001). Os polifenóis da erva-mate são parcialmente biodisponíveis e são extensivamente metabolizado, principalmente pela microbiota. A conjugação e o metabolismo destes no intestino delgado e fígado geram formas circulantes *in vivo* com maior capacidade antioxidante (GÓMEZ-JUARISTI et al., 2018; RICE-EVANS et al., 2000).

A capacidade antioxidante dos grupos submetidos ao nosso estudo *in vivo* foi quantificada através da redução férrica, e os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Quantificação da atividade antioxidante através da redução férrica.

Grupo	Cérebro ($\mu\text{g EAG/mL}$)	Plasma
Controle	0,152 \pm 0,04 a	0,115 \pm 0,018 a
Extrato livre	0,144 \pm 0,01 a	0,106 \pm 0,008 a
Extrato microencapsulado	0,168 \pm 0,02 a	0,183 \pm 0,065 b
Microcápsula vazia	0,147 \pm 0,05 a	0,106 \pm 0,010 a
p-valor	0,4900	0,0001

Resultados expressos como média \pm desvio padrão. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tuckey ($p > 0,05$). Fonte: elaborado pelo autor (2019).

Na análise de FRAP, o extrato microencapsulado apresentou significativamente poder antioxidante mais elevado no plasma. Este resultado supostamente é decorrente dos bioativos permanecerem protegidos externamente pela cápsula, estando em condições de atingir o

intestino. A maioria dos polifenóis, por exemplo, são absorvidos nas células intestinais por mecanismos passivos, quando atingem a corrente sanguínea são convertidos em metabólitos com maior poder antioxidantes em relação as suas moléculas progenitoras não metabolizadas (LEOPOLDINI et al., 2011; SCHEEPENS; TAN; PAXTON, 2010).

O aumento na capacidade antioxidante plasmática após o consumo de alimentos ricos em polifenóis é amplamente relatado na comunidade científica (BOAVENTURA et al., 2015; GÓMEZ-JUARISTI et al., 2018; SCALBERT et al., 2005). Em estudo sobre a biodisponibilidade dos compostos da erva-mate, Boado, Fretes e Brumovsky (2015) verificaram que 120 minutos após ingestão aguda de 300 ml de infusão do mate resultou em um aumento da capacidade antioxidante no plasma, pelos métodos de FRAP e ABTS.

Já os efeitos de extratos encapsulados são mais restritos na literatura. Lee et al. (2009) investigaram a atividade antioxidante *in vitro* da catequina, encapsulada pelo método de gelificação iônica interna, em fluido intestinal simulado. O valor de FRAP da catequina encapsulada aumentou continuamente e finalmente alcançou um valor 1,8 vezes maior do que o da catequina livre, demonstrando que a encapsulação foi capaz de proteger as moléculas do ambiente alcalino e liberá-las de forma gradual.

Mais pesquisas sobre o efeito de extratos encapsulados de erva-mate na atividade antioxidante *in vivo* são necessárias. Córdoba, Deladino e Martino (2013) realizaram a microencapsulação de extratos de erva-mate e analisando o efeito da gelificação sobre os valores de atividade antioxidante das cápsulas concluíram que o método de gelificação iônica utilizado não alterou as atividades antioxidantes. Negrão-Murakami et al. (2016) empregando diferentes materiais de parede na encapsulação de extrato concentrado de erva-mate verificaram que os mesmos não tiveram efeitos no conteúdo fenólico total ou na atividade antioxidante das microcápsulas. Entretanto, a atividade destas cápsulas não foi verificado em sistemas biológicos, somente avaliados nas próprias cápsulas.

O consumo da erva-mate e seus benefícios na atividade antioxidante pode ser explicado pela presença de compostos bioativos redutores e seus metabólitos no plasma (SCALBERT et al., 2005). No entanto, estes compostos necessitam ser adequadamente identificados e quantificados para entender melhor sua colaboração aos efeitos fisiológicos esperados. Se resultados positivos e consistentes ao longo do tempo, o mate pode ser reconhecido como um alimento funcional (RIACHI; DE MARIA, 2017).

Certamente, num futuro próximo, a erva-mate será incluída na dieta, seja por formulações alimentares ou farmacológicas. Já que, através da *Ilex paraguariensis*, quantidades

adequadas de antioxidantes qualificados podem contribuir na prevenção de patologias relacionadas ao estresse oxidativo (BAEZA et al., 2017; BRACESCO, 2019).

Conclusão

As microcápsulas contendo erva-mate demonstraram de forma significativa maior capacidade antioxidante plasmática e reduziram a peroxidação lipídica cerebral em ratos. Em relação as enzimas endógenas antioxidantes se percebeu uma ação incipiente do extrato microencapsulado, pela atenuação dos níveis de SOD. Concluimos que a erva-mate pode ser um importante elemento na dieta dos animais, visto que, o consumo regular durante 30 dias caracterizou benefícios à saúde dos mesmos. No entanto, mais estudos são necessários para o entendimento de como cada substância bioativa é absorvida.

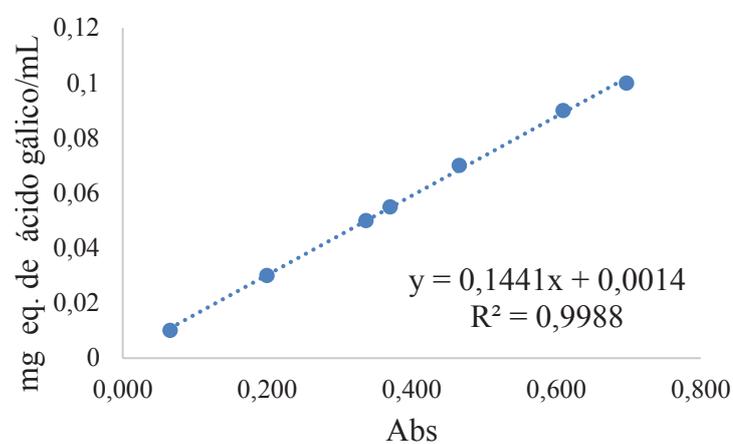
Referências

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105121–6, 1984.
- BOADO, L. S.; FRETES, R. M.; BRUMOVSKY, L. A. Bioavailability and antioxidant effect of the *Ilex Paraguariensis* polyphenols. **Nutrition & Food Science**, v. 45, n. 2, p. 326 – 335, 2015.
- BRACESCO, N. et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 378–384, 2011.
- CANO-CHAUCA, M. et al. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, n. 4, p. 420-428, 2005.
- COMUNIAN, T. A. et al. Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 373–379, 2013.
- DIAS, M. I. M. F. Cultura *in vitro* e técnicas de microencapsulação: aumento da produção e da estabilidade de compostos bioativos de espécies vegetais. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Química Sustentável, Universidade do Porto, 2017.
- ETCHEPARE, M. A. et al. Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 97– 105, 2015.
- FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 105114–21, 1984.

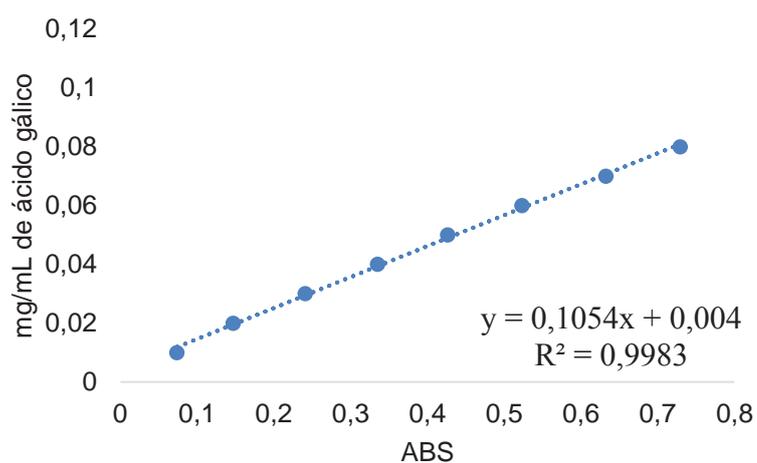
- HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 138-151, 2007.
- KIM, S. Y. et al. Anti-obesity effects of Yerba Mate (*Ilex Paraguariensis*): a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 338, n 15, p. 1-8, 2015.
- MESSINA, D. et al. Efecto hipolipemiante del consumo de mate en individuos dislipidêmicos. **Nutr Hosp**, v. 31, n. 5, p. 2131-2139, 2015.
- MISRA, H. P; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v. 247, n. 10, p.3170–5, 1972.
- NEGRÃO-MURAKAMI, A. N. N. et al. Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) extract through nanofiltration. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2211–2216, 2011.
- PETRILLI, A. A. et al. Effect of Chocolate and Yerba Mate Phenolic Compounds on Inflammatory and Oxidative Biomarkers in HIV/AIDS Individuals. **Nutrients**, v. 132, n. 8, p. 1-14, 2016.
- SCALBERT, A. et al. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 4, 287–306, 2005.
- TILMAN, D; CLARK, M. Global diets link environmental sustainability and human health. **Nature**, v. 515, 2014.

APÊNDICE B – Curvas analíticas

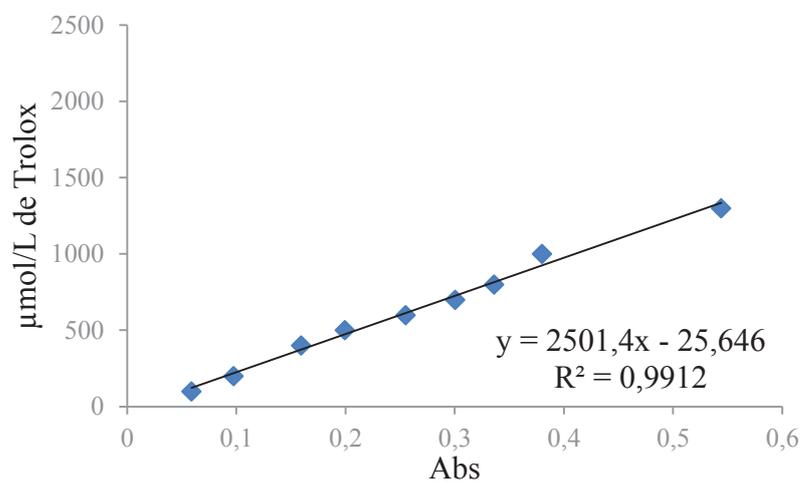
Curva Analítica de Compostos Fenólicos 1



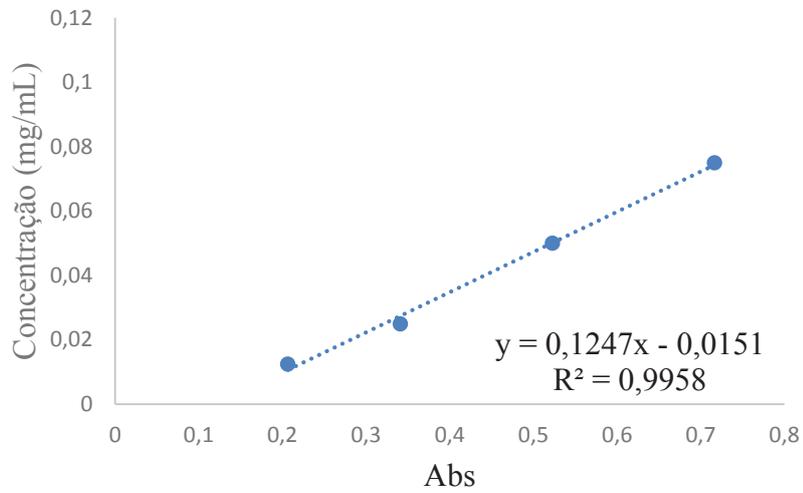
Curva Analítica de Compostos Fenólicos 2



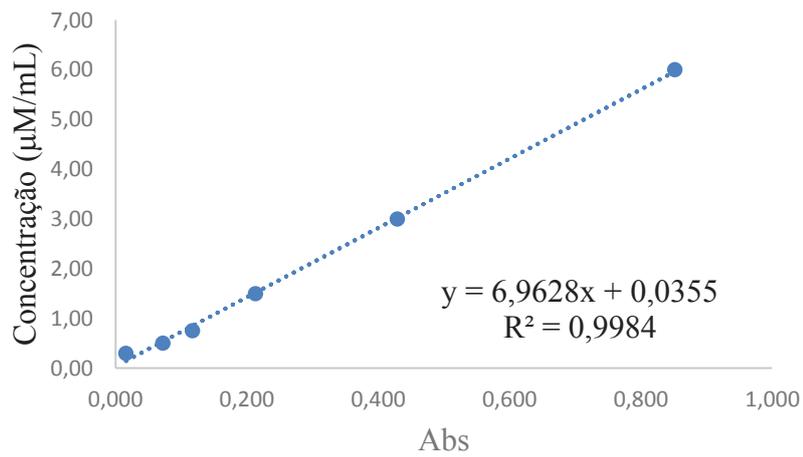
Curva Analítica de ABTS



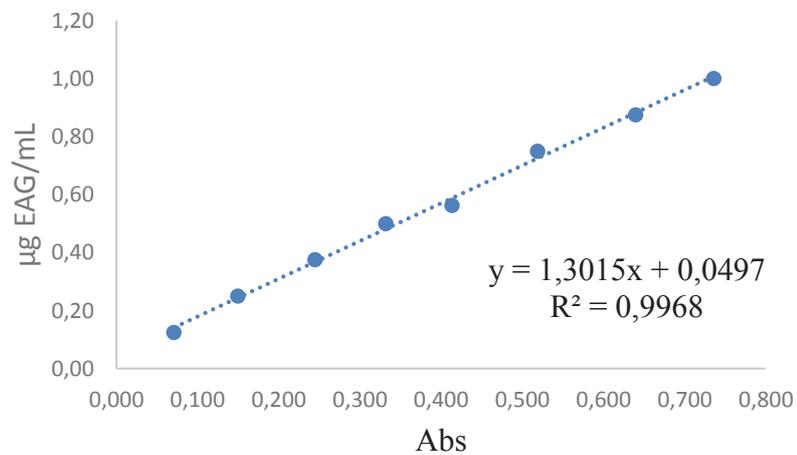
Curva Analítica de Proteínas



Curva Analítica TBARS



Curva Analítica FRAP

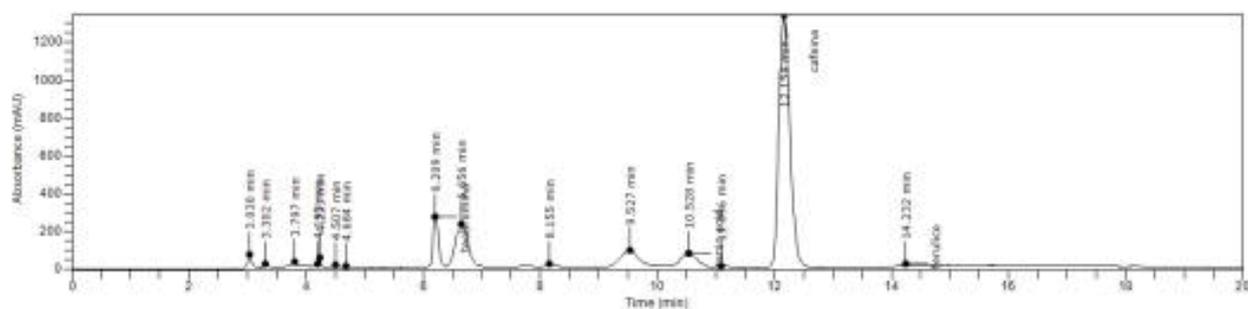


APÊNDICE C – CLAE

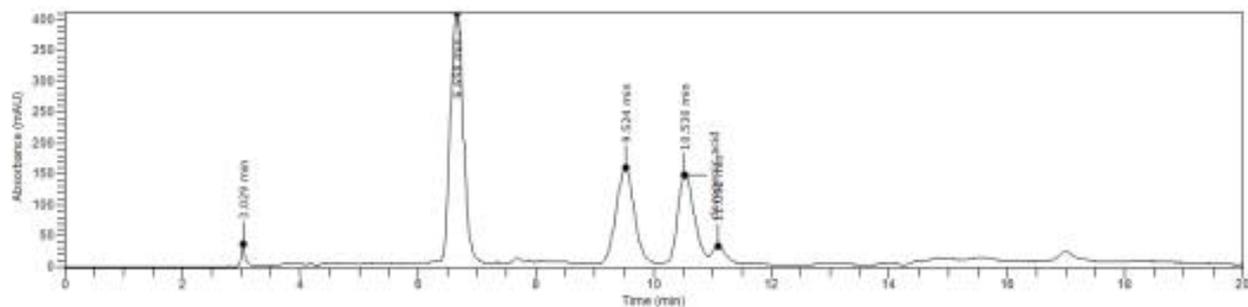
Sample Report - Multi-Channel, Suitability

Sample Name	amostra Bruna		
Batch Group/Name	Charise/amostra bruna - Copy 01-01-2005 04-46-40		
Acquisition Date/Time	1/1/2005 5:57:29 AM		
Acquisition Method	cafeina teob aci clorog		
Processing Method	cafeina teob aci clorog		
Instrument Name	Flexar		
Vial Number	5	Injection Number	1
Operator	UPF	Chromera Version	3.2.0.4847

amostra Bruna : 280:500:10 : 1



amostra Bruna : 330:10:400:10 : 1



APÊNDICE D – ANÁLISE DE TAMANHO DE PARTÍCULA



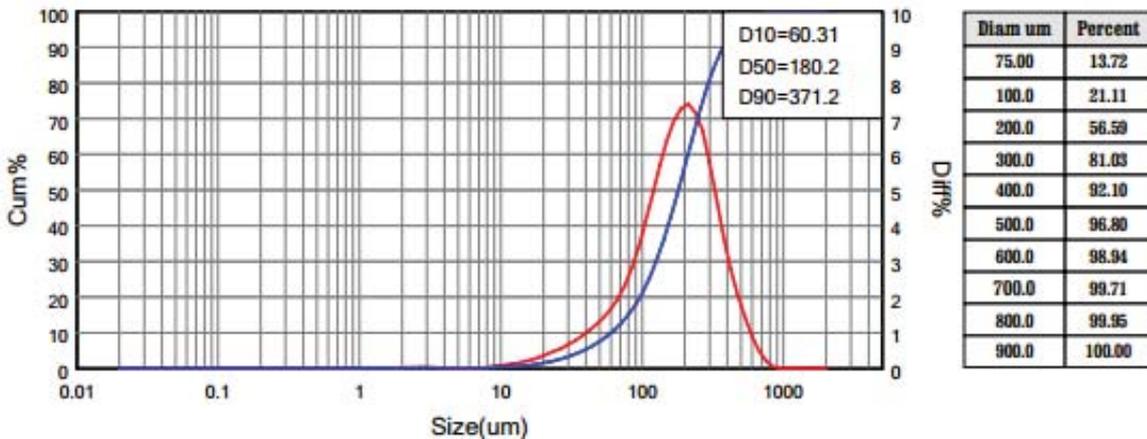
Betttersizer S2-WD(Wet) Particle Size Analysis Report

Range : 0.02um - 2000um

Sample : Cápsula 4-1	Number : 1#	Sample Owner : Betttersize
Operator : Adriana	Time : 2018-11-05 14:43:35	Measured By : Betttersize
Method : Laser	Preparation:	Medium : Water
Dispersant:	Ultrasound:	Stirring:
Optical : Fraunhofer	Mode : 8.0 - General	Distribution : Volume
Particle RI :	Medium RI :	Remark :

D[4,3] : 179.8 um	D[3,2] : 114.2 um	SSA : 23.86 m ² /kg	OBS. : 17.03 %
D[2,1] : 10.43 um	D[1,0] : 1.796 um	SPAN : 1.725	Residual : 1.521 %

D03 = 28.41 um	D06 = 42.98 um	D10 = 60.31 um	D16 = 83.20 um	D25 = 111.4 um
D75 = 268.5 um	D50 = 180.2 um	D84 = 319.5 um	D90 = 371.2 um	D97 = 506.4 um



Diam um	Diff%	Cum%	Diam um	Diff%	Cum%	Diam um	Diff%	Cum%	Diam um	Diff%	Cum%
0.020-0.022	0.00	0.00	0.355-0.399	0.00	0.00	6.324-7.096	0.00	0.25	112.4-126.1	4.92	30.24
0.022-0.025	0.00	0.00	0.399-0.447	0.00	0.00	7.096-7.962	0.01	0.26	126.1-141.5	5.69	35.93
0.025-0.028	0.00	0.00	0.447-0.502	0.00	0.00	7.962-8.933	0.04	0.30	141.5-158.8	6.41	42.34
0.028-0.031	0.00	0.00	0.502-0.563	0.00	0.00	8.933-10.02	0.07	0.37	158.8-178.2	6.94	49.28
0.031-0.035	0.00	0.00	0.563-0.632	0.00	0.00	10.02-11.24	0.09	0.46	178.2-199.9	7.28	56.56
0.035-0.039	0.00	0.00	0.632-0.709	0.00	0.00	11.24-12.61	0.13	0.59	199.9-224.4	7.41	63.97
0.039-0.044	0.00	0.00	0.709-0.796	0.00	0.00	12.61-14.15	0.15	0.74	224.4-251.7	7.17	71.14
0.044-0.050	0.00	0.00	0.796-0.893	0.00	0.00	14.15-15.88	0.21	0.95	251.7-282.5	6.68	77.82
0.050-0.056	0.00	0.00	0.893-1.002	0.00	0.00	15.88-17.82	0.25	1.20	282.5-316.9	5.78	83.60
0.056-0.063	0.00	0.00	1.002-1.124	0.01	0.01	17.82-19.98	0.32	1.52	316.9-355.6	4.74	88.34
0.063-0.070	0.00	0.00	1.124-1.261	0.01	0.02	19.98-22.44	0.40	1.92	355.6-399.0	3.69	92.03
0.070-0.079	0.00	0.00	1.261-1.415	0.02	0.04	22.44-25.17	0.48	2.40	399.0-447.7	2.78	94.81
0.079-0.089	0.00	0.00	1.415-1.588	0.01	0.05	25.17-28.25	0.56	2.96	447.7-502.3	2.06	96.87
0.089-0.100	0.00	0.00	1.588-1.782	0.02	0.07	28.25-31.69	0.67	3.63	502.3-563.6	1.45	98.32
0.100-0.112	0.00	0.00	1.782-1.999	0.00	0.07	31.69-35.56	0.78	4.41	563.6-632.4	0.92	99.24
0.112-0.126	0.00	0.00	1.999-2.244	0.03	0.10	35.56-39.90	0.91	5.32	632.4-709.6	0.50	99.74
0.126-0.141	0.00	0.00	2.244-2.517	0.03	0.13	39.90-44.77	1.07	6.39	709.6-796.2	0.21	99.95
0.141-0.158	0.00	0.00	2.517-2.825	0.04	0.17	44.77-50.23	1.24	7.63	796.2-893.3	0.05	100.00
0.158-0.178	0.00	0.00	2.825-3.169	0.04	0.21	50.23-56.36	1.42	9.05	893.3-1002	0.00	100.00
0.178-0.199	0.00	0.00	3.169-3.556	0.03	0.24	56.36-63.24	1.66	10.71	1002-1124	0.00	100.00
0.199-0.224	0.00	0.00	3.556-3.990	0.01	0.25	63.24-70.96	1.94	12.65	1124-1261	0.00	100.00
0.224-0.251	0.00	0.00	3.990-4.477	0.00	0.25	70.96-79.62	2.32	14.97	1261-1415	0.00	100.00
0.251-0.282	0.00	0.00	4.477-5.023	0.00	0.25	79.62-89.33	2.80	17.77	1415-1588	0.00	100.00
0.282-0.316	0.00	0.00	5.023-5.636	0.00	0.25	89.33-100.2	3.41	21.18	1588-1782	0.00	100.00
0.316-0.355	0.00	0.00	5.636-6.324	0.00	0.25	100.2-112.4	4.14	25.32	1782-2000	0.00	100.00

Dandong Betttersize Instruments Ltd. [Http : //betttersize.com.hk](http://betttersize.com.hk) E-mail : info@betttersize.com Tel : 0086-415-6184440

