

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

**Daiane Santos**

**Modulação do Microbioma Intestinal de Ratos pela *Ilex paraguariensis***

**Passo Fundo**

**2020**

**Daiane Santos**

**Bióloga L.**

**Modulação do Microbioma Intestinal de Ratos pela *Ilex paraguariensis***

Dissertação de Mestrado apresentada para  
obtenção do título de Mestra em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Telma Elita Bertolin

Coorientador: Dr. Rômulo Pillon Barcelos

Linha de pesquisa: Qualidade e Propriedades  
Funcionais de Alimentos

**Passo Fundo**

**2020**

CIP – Catalogação na Publicação

---

S237m Santos, Daiane  
Modulação do microbioma intestinal de ratos pela *Ilex paraguariensis* [recurso eletrônico] / Daiane Santos. – 2020.  
1.3 MB ; PDF.

Orientadora: Profa. Dra. Telma Elita Bertolin.  
Coorientador: Prof. Dr. Rômulo Pillon Barcelos.  
Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, 2020.

1. Sistema gastrointestinal. 2. Erva-mate. 3. Fenóis.  
4. Antioxidantes. I. Bertolin, Telma Elita, orientadora.  
II. Barcelos, Rômulo Pillon, coorientador. III. Título.

CDU: 633.77

---

Catalogação: Bibliotecária Juliana Langaro Silveira - CRB 10/2427

**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

**Modulação do Microbioma Intestinal de Ratos pela *Ilex paraguariensis***

Elaborada por  
**Daiane Santos**

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  
(Orientador)**

**Giseli Aparecida Ritterbusch, Dra., UPF**

**Fernanda Barbisan, Dra., UFSM**

**Passo Fundo, RS, Brasil  
2020**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por tudo por me fortalecer ao longo destes dois anos, me permitindo não desistir apesar do cansaço, por colocar pessoas maravilhosas no meu caminho que me deram apoio e caminharam junto comigo nesta jornada.

A minha família, pelo incentivo, amor e compreensão. Aos meus amados pais e irmã, Edgar Santos, Vera Alice Santos e Vanusa Santos Formighiere pelo esforço que dedicaram para me auxiliar na conclusão deste mestrado, mais uma vez sendo meus pilares, obrigada de coração.

Ao meu querido Fabricio Lucas Benetti, pelo incentivo, apoio, amor e auxílio ao longo destes últimos dois anos e outros tantos. A ti, meu agradecimento e meu amor.

A UPF (Universidade de Passo Fundo) pela bolsa concedida.

A minha orientadora Telma Elita Bertolin, pela orientação, pelo conhecimento transmitido, por ter me desafiado na execução deste lindo trabalho. Obrigada pelo apoio, por ter acreditado no meu potencial, por ter viabilizado esta idéia. Você foi a professora mais afetuosa que trabalhei em minha vida acadêmica, tenho muita gratidão por esta oportunidade.

Ao coorientador Rômulo Pillon Barcelos, pelo auxílio na execução deste projeto, viabilizando a otimização da metodologia de qPCR.

A empresa INOVATE, em especial a Ariana Maia e Clovis Roberto Roman, pelo fornecimento da erva-mate utilizada neste projeto.

As amigas que conquistei nestes dois anos, em especial Paola Manfredini, Viviane Vaz Oleiro Durante, Marieli Rosseto, Lara Franco dos Santos, Elionio Galvão Frota, Bruna Kriger Vargas e Viviane Girardi. Obrigada pela ajuda, dicas, pelos momentos de descontração, espero que este vínculo seja mantido para além da vida acadêmica.

Aos meus queridos ICs, Leticia Eduarda Bender, Cristina de Araújo Barth, em especial a Júlia Gutkoski, Samuel Teixeira Lopes e Kátia Sartor Bittencurt que ficaram comigo até o final do trabalho. Sem vocês nada disso seria possível, muito obrigada pela ajuda, pelas contribuições e companhia. Vocês são maravilhosos!

A querida professora e amiga Giseli Aparecida Ritterbusch, obrigada pelo companheirismo e pela disponibilidade em me auxiliar neste projeto. Agradeço os ensinamentos e a paciência.

A querida professora e amiga Cíntia Guarienti, obrigada pelas dicas e auxílio, mesmo longe, sempre disponível em ajudar com suas contribuições. Agradeço os ensinamentos e a paciência.

As queridas Francieli Amaral e Cleonice Several, obrigada por me receberem no biotério, me auxiliando antes mesmo da execução do experimento com os animais. Obrig por tudo!

A todos os laboratórios de apoio da execução dos experimentos. Laboratório de Virologia na UFGRS, Laboratório de HPLC da UFSM, Laboratório CDSA - UPF obrigada pelo auxílio na execução das análises.

*“Comece fazendo o necessário, depois o que é possível, e de repente, você estará fazendo o impossível”*

São Francisco de Assis

## RESUMO

Estudos vêm demonstrando a relação das escolhas alimentares e a atividade da microbiota intestinal, inferindo efeitos de equilíbrio simbiótico dos microrganismos presentes no intestino ou efeitos contrários a este, os quais podem estar associados a complicações neurodegenerativas, metabólicas e imunológicas. Alimentos com compostos fenólicos presentes em sua composição possuem influência seletiva sobre a microbiota intestinal, neste sentido a erva-mate pode ser uma boa alternativa para realizar esta modulação. A utilização de bioativos é um desafio, pela facilidade de degradação dos mesmos no trato digestório, não conseguindo exercer com totalidade as suas funções, devido a isso, técnicas de encapsulação podem ser empregadas. Neste contexto, objetivamos avaliar o impacto da ingestão de extrato de erva-mate livre e microencapsulado como potencial agente modulador da microbiota intestinal de ratos. Para tal, o extrato de erva mate foi avaliado em relação a compostos fenólicos totais, atividade antioxidante pelos métodos de ABTS e FRAP, comportamento em diferentes pH's e HPLC, apresentando resultados de quantificação da atividade antioxidante de 52,96  $\mu\text{mol Trolox/mL}$  para ABTS e 64,53  $\mu\text{mol Trolox/mL}$  para ensaios de FRAP e 10,17  $\text{mgEAG/mL}$  para compostos fenólicos totais. A quantificação de compostos fenólicos em pH 7,5, simulando pH intestinal foram superiores a quantificação em pH 2,0, simulando pH estomacal. Os compostos identificados em maior abundância no extrato liofilizado da erva-mate foram os isômeros de ácido clorogênico com 14,22g/100g. O extrato foi microencapsulado utilizando a técnica de gelificação iônica, utilizando as concentrações de 1,5% de alginato de sódio e 1,5% de cloreto de cálcio para reticulação. As microcápsulas produzidas foram avaliadas quanto à eficiência de encapsulação, apresentando valores de 46,5%. As cápsulas também foram analisadas com relação a sua morfologia externa, solubilidade em água e comportamento em diferentes valores de pH, demonstrando uma solubilidade de 38,70%. A quantificação da atividade antioxidante das cápsulas de erva-mate em pH de 7,5 e 2,0 não apresentou diferença significativa. A modulação do microbioma intestinal dos ratos pelo extrato de erva-mate foi determinado por testes de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR), para os microrganismos *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp. e *Prevotella* sp. considerados benéficos. Foi avaliado o comportamento da microbiota intestinal de 40 ratos Wistar em diferentes grupos de estudo, com suplementação de 3,29 mg de compostos fenólicos/animal/dia, durante 45 dias, para quatro grupos de animais: extrato livre, extrato microencapsulado de erva-mate, além dos grupos controle: água e cápsulas vazias. Os compostos presentes no extrato da *Ilex paraguariensis* tiveram efeitos na modulação da microbiota intestinal de ratos para os microrganismos estudados, quando avaliados antes e após a ingestão do extrato de erva-mate. Não foi observada diferença significativa nos resultados dos animais suplementados com extrato microencapsulado, frente ao extrato livre de erva-mate, sugerindo a utilização de extrato livre em detrimento do encapsulado. Por fim, estas compreensões poderão possibilitar a expertise e diversificação do uso da erva mate, para estimular uma boa microbiota, caracterizando uma alternativa de controle e prevenção dos agravos decorrentes da má alimentação.

Palavras-chave: microbiota intestinal, erva-mate, compostos fenólicos, metabólitos fenólicos, antioxidantes.

## ABSTRACT

Studies have demonstrated the relationship between food choices and the activity of the intestinal microbiota, inferring the symbiotic balance effects of microorganisms present in the intestine or effects contrary to it, which may be associated with neurodegenerative, metabolic and immunological complications. Foods with phenolic compounds present in their composition have a selective influence on the intestinal microbiota, in this sense yerba mate can be a good alternative to carry out this modulation. The use of bioactive agents is a challenge, due to their easy degradation in the digestive tract, not being able to fully exercise their functions, due to this, encapsulation techniques can be used. In this context, we aim to evaluate the impact of ingesting free and microencapsulated yerba mate extract as a potential modulating agent of the intestinal microbiota of rats. For this, the extract of yerba mate was evaluated in relation to total phenolic compounds, antioxidant activity by ABTS and FRAP methods, behavior at different pH's and HPLC, presenting results of quantification of the antioxidant activity of 52.96  $\mu\text{mol Trolox} / \text{mL}$  for ABTS and 64.53  $\mu\text{mol Trolox} / \text{mL}$  for FRAP assays and 10.17  $\text{mgEAG} / \text{mL}$  for total phenolic compounds. The quantification of phenolic compounds at pH 7.5, simulating intestinal pH was higher than the quantification at pH 2.0, simulating stomach pH. The compounds identified in greater abundance in the lyophilized extract of yerba mate were the isomers of chlorogenic acid with 14.22g / 100g. The extract was microencapsulated using the ionic gelation technique, using the concentrations of 1.5% sodium alginate and 1.5% calcium chloride for crosslinking. The microcapsules produced were evaluated for encapsulation efficiency, with values of 46.5%. The capsules were also analyzed for their external morphology, water solubility and behavior at different pH values, showing a solubility of 38.70%. The quantification of the antioxidant activity of yerba mate capsules at pH 7.5 and 2.0 showed no significant difference. The modulation of the intestinal microbiome of rats by the extract of yerba mate was determined by real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR) tests for the microorganisms *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp. and *Prevotella* sp. considered beneficial. The behavior of the intestinal microbiota of 40 Wistar rats in different study groups was evaluated, with supplementation of 3.29 mg of phenolic compounds / animal / day, for 45 days, for four groups of animals: free extract, microencapsulated herb extract. mate, in addition to the control groups: water and empty capsules. The compounds present in the extract of *Ilex paraguariensis* had effects on the modulation of the intestinal microbiota of rats for the microorganisms studied, when evaluated before and after ingesting the extract of yerba mate. There was no significant difference in the results of the animals supplemented with microencapsulated extract, compared to the free extract of yerba mate, suggesting the use of free extract in detriment to the encapsulated one. Finally, these understandings may enable the expertise and diversification of the use of yerba mate, to stimulate a good microbiota, featuring an alternative to control and prevent diseases resulting from poor diet.

Keywords: gut microbiota, yerba mate, phenolic compounds, phenolic metabolites, antioxidantes.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Dieta como moduladora da microbiota intestinal .....	21
Figura 2 -Influência dos alimentos funcionais sobre a microbiota intestinal .....	23
Figura 3 -Benefícios da erva-mate na promoção da saúde .....	26
Figura 4 - Sensibilidade das cápsulas em diferentes pH's .....	29
Figura 5 - Fluxograma da metodologia do projeto .....	31
Figura 6 - Avaliação morfológica das cápsulas .....	51
Figura 7 - Avaliação da quantificação do material genético de <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Bifidobacterium</i> sp. e <i>Prevotella</i> sp. em relação aos diferentes grupos de estudo .....	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência dos iniciadores utilizados nos testes de qPCR.....	40
Tabela 2 - Quantificação de DNA plasmidial.....	43
Tabela 3 - Caracterização do extrato de erva-mate liofilizado .....	46
Tabela 4 - Identificação de compostos bioativos do extrato de erva-mate .....	47
Tabela 5 – Avaliação do extrato de erva-mate liofilizado em diferentes pHs .....	49
Tabela 6 - Condições preliminares de encapsulação do extrato de erva-mate .....	50
Tabela 7 – Avaliação das cápsulas erva-mate em diferentes condições de pH .....	52
Tabela 8 – Avaliação da modulação do microbioma intestinal - <i>Lactobacillus</i> sp. ....	75
Tabela 9 - Avaliação da modulação do microbioma intestinal - <i>Bifidobacterium</i> sp. ....	75
Tabela 10 – Avaliação da modulação do microbioma intestinal - <i>Prevotella</i> sp. ....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

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

CA: controle água

CE: cápsula com extrato

CV: cápsula vazia

DCNT: doenças crônicas não-transmissíveis

EE: eficiência de encapsulação

EL: extrato livre

DNA: ácido desoxirribonucleico

FRAP: potencial antioxidante redutor férrico

HPLC: cromatografia líquida de alta performance

KCM: meio de cultura de queratinócitos

MEV: microscopia eletrônica de varredura

PCR: reação em cadeia polimerase

POD: peroxidase

PPO: polifenoloxidase óxido redutase

SQR: substâncias químicas de referência

RNA: ácido ribonucleico

TAE: Tris-Acetato-EDTA

TPTZ: 2,4,6-Tris(2 Piridil)- 1,3,5 Triazina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 MICROBIOTA INTESTINAL NA PROMOÇÃO DE SAÚDE E DOENÇA .....</b>	<b>17</b>
2.1.1 Alimentação como moduladora da microbiota intestinal.....	18
2.1.1.1 <i>Ingestão de alimentos com propriedades bioativas .....</i>	<i>22</i>
<b>2.2 ERVA-MATE (ILEX PARAGUARIENSIS) .....</b>	<b>25</b>
<b>2.3 MICROENCAPSULAÇÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1 TRATAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2 OBTENÇÃO DE EXTRATO AQUOSO.....</b>	<b>32</b>
<b>3.3 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO LIOFILIZADO .....</b>	<b>32</b>
3.3.1 Capacidade Antioxidante pelo Radical ABTS .....	32
3.3.2 Capacidade Antioxidante pelo Método de FRAP .....	33
3.3.3 Compostos Fenólicos Totais .....	33
3.3.4 Comportamento do Potencial Antioxidante do Extrato em Diferentes Valores de pH.....	34
3.3.5 Identificação de Compostos Bioativos por HPLC .....	34
<b>3.4 MICROENCAPSULAÇÃO DO EXTRATO LIOFILIZADO .....</b>	<b>35</b>
3.4.1 Eficiência da Encapsulação .....	36
<b>3.5 AVALIAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS .....</b>	<b>36</b>
3.5.1 Comportamento das Microcápsulas em Diferentes pH's.....	36
3.5.2 Solubilidade das Microcápsulas em Água .....	37
<b>3.6 AVALIAÇÃO DA AÇÃO MODULADORA DE EXTRATO DE ERVA-MATE LIVRE E MICROENCAPSULADO NA MICROBIOTA INTESTINAL.....</b>	<b>37</b>
3.6.1 Delineamento Experimental.....	37
3.6.2 Avaliação da Microbiota Intestinal pela Técnica de qPCR.....	38
3.6.2.1 <i>Extração de DNA das Amostras de Fezes .....</i>	<i>38</i>
3.6.2.2 <i>Otimização do Método de qPCR.....</i>	<i>39</i>
3.6.2.3 <i>Clonagem das Bactérias.....</i>	<i>40</i>
3.6.2.4 <i>Construção da Curva Padrão das Bactérias.....</i>	<i>43</i>

3.6.2.5 <i>Quantificação do Material Genético dos Microrganismos pela Técnica de qPCR</i> .....	44
<b>4 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	<b>44</b>
<b>5 ASPECTOS ÉTICOS</b> .....	<b>44</b>
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>
6.1 TRATAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA .....	45
6.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO LIOFILIZADO .....	45
6.3 AVALIAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS DO EXTRATO LIOFILIZADO .....	50
6.4 AVALIAÇÃO DA AÇÃO MODULADORA DE EXTRATO DE ERVA-MATE LIVRE E MICROENCAPSULADO NA MICROBIOTA INTESTINAL .....	53
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	<b>59</b>
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>60</b>
<b>9 APÊNDICE A - CURVA ANALÍTICA DE ABTS</b> .....	<b>69</b>
<b>10 APÊNDICE B - CURVA ANALÍTICA DE FRAP</b> .....	<b>70</b>
<b>11 APÊNDICE C - CURVA ANALÍTICA DE FENÓLICOS TOTAIS</b> .....	<b>71</b>
<b>12 APÊNDICE D - CURVAS PADRÃO PCR REAL TIME</b> .....	<b>72</b>
<b>13 APÊNDICE E - CROMATOGRAMA HPLC</b> .....	<b>74</b>
<b>14 APÊNDICE F - ANÁLISES DA MODULAÇÃO DO MICROBIOMA INTESTINAL</b> .....	<b>75</b>
<b>15 APÊNDICE H - ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	<b>76</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Na atualidade o padrão dos alimentos ingeridos é apontado como um dos principais fatores que influencia na suscetibilidade à doença (LADDU; HAUSER, 2019). A oferta de alimentos calóricos e por vezes de baixo valor nutricional potencializa as estatísticas do aumento de doenças crônicas não transmissíveis (DNT) como, câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, (TILMAN; CLARCK, 2014; NA ZHANG et al., 2018; KACZMAREK et al., 2019) obesidade, doenças inflamatórias de intestino (DII), alergias, síndromes metabólicas, distúrbios autoimunes e neuropsiquiátricos (PARNELL; REIMER, 2012; SHANDU et al; 2017).

Estima-se que o trato gastrointestinal humano é colonizado por mais de 100 trilhões de microrganismos, dez vezes mais do que o número de células somáticas no corpo (LI; WEI, 2015). Estes microrganismos compõem a microbiota intestinal, a qual está relacionada à digestão, absorção de nutrientes, além de inferir outros benefícios para o bem-estar do organismo (CANI; JORDAN, 2018). Muitas doenças crônicas não transmissíveis vêm sendo associadas à atividade da microbiota intestinal em desequilíbrio, ou seja, disbiose (LEY; TURNBAUGH; GORDON, 2006; WANG et al., 2017). A disbiose caracteriza-se pela desordem das comunidades microbianas presentes intestino. A dieta contribui na modulação da composição da microbiota e como consequência influencia os processos bioquímicos do organismo, estabelecendo um sistema de interação entre dieta, microbiota e hospedeiro (DANNESKIOLD-SAMSOEA et al., 2019). Devido à associação da ação da microbiota em disbiose e diversas patologias, existe um crescente interesse na manipulação do microbioma intestinal para obtenção de efeitos terapêuticos (KIM; SERRE, 2018).

O potencial benéfico de uma alimentação com ingestão de vegetais e frutas, os quais possuem diversificada composição em substâncias bioativas, como compostos fenólicos e carotenóides vem sendo investigada (LANGE et al., 2019). A comunidade científica vem apontando que substâncias fitoativas como compostos fenólicos servem como prebióticos, podendo exercer a modulação da microbiota intestinal no hospedeiro e desta forma inferir resultados positivos para saúde do homem (JIÃO et al., 2019).

A erva-mate difundida culturalmente nos países da América do Sul, sendo ingerida principalmente na forma tradicional de “chimarrão”, possui reconhecidas propriedade funcionais e capacidade antioxidante, visto seus biocompostos, como fenóis, metilxantinas, triterpeno, saponinas, flavonóides e outros (BRACESCO et al., 2011). Evidências científicas

têm demonstrando o potencial antiinflamatório, anti-obesidade e cardioprotetor da *Ilex paraguariensis* (JUARISTI et al, 2018), sendo promissora para o uso em desenvolvimento de novos alimentos, que apresentem interesse para o consumidor e para a indústria, além de representar uma boa alternativa, dada as suas características, para modulação dos microrganismos presentes no intestino (SAWSAN; ARABY, 2014).

A atividade biológica de substâncias bioativas, depende da sua biodisponibilidade, da taxa de absorção no sistema circulatório e da degradação pela ação da microbiota intestinal. Existem dificuldades de aplicação ou uso em virtude da instabilidade dos compostos frente a alterações de temperatura e pH (MOURA et al., 2018). Neste sentido, técnicas de microencapsulação podem ser utilizadas para minimizar este problema. A encapsulação é uma tecnologia capaz de proteger os bioativos das mais diversas condições de exposição ao ambiente externo, promovendo uma liberação controlada de compostos dentro do organismo (DESAI; PARK, 2005; DE PRISCO, 2016), os agentes encapsulantes servem como membrana de revestimento que protegem as substâncias sensíveis (AKDENIZ; SUMNU; SAHIN, 2018).

O estudo está inserido na linha de pesquisa 2 do Programa de pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) que trabalha a Qualidade e Propriedades Funcionais de Alimentos - Avaliação de Propriedades Funcionais e Nutraceuticas de Bioprodutos e Compostos. O objetivo geral é avaliar o impacto da ingestão de extrato de erva-mate livre e microencapsulado como potencial agente modulador da microbiota intestinal de ratos. E os objetivos específicos são:

- a) caracterizar o extrato de erva-mate quanto ao perfil antioxidante, compostos fenólicos e comportamento em diferentes pH's;
- b) realizar a microencapsulação do extrato de erva-mate;
- c) verificar a eficiência da técnica de microencapsulação na proteção do extrato de erva-mate *in vitro*;
- d) caracterizar as microcápsulas quanto a morfologia, comportamento em diferentes valores de pH e solubilidade em água;
- e) verificar o efeito modulador do extrato de erva-mate livre e microencapsulado no estímulo de bactérias benéficas da microbiota intestinal de ratos.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 MICROBIOTA INTESTINAL NA PROMOÇÃO DE SAÚDE E DOENÇA**

É estimado que a microbiota intestinal humana seja composta de aproximadamente 10 a 100 trilhões de microrganismos, isso significa que, como um todo, o corpo humano é composto por 10% de células somáticas e 90% por células microbianas (LI et al., 2016). As relações entre os membros do microbioma e o organismo são frequentemente descritas como comensais (um indivíduo é beneficiado enquanto o outro não é afetado), porém o termo mutualista (ambos os indivíduos obtêm benefícios) é considerado mais apropriado (LEY; PETERSON; GORDON, 2006).

A microbiota intestinal atua ativamente de várias formas no organismo e produz subprodutos metabólicos que irão resultar em efeitos locais e sistêmicos (PARNELL; REIMER, 2012; DANNESKIOLD-SAMSOEA et al., 2019). Os avanços na ciência vêm demonstrando que a ação da microbiota intestinal está associada a processos biológicos, como modulação metabólica (LEY; PETERSON; GORDON, 2006; WANG et al., 2017), e determinação de funções fisiológicas através da influência que exerce sobre o sistema imune (HONDA; LITTMAN, 2016).

Os microrganismos presentes no trato gastrointestinal, principalmente no intestino desempenham funções na digestão, aquisição de nutrientes (DANNESKIOLD-SAMSOEA et al., 2019), regulação imunológica (HOLLISTER et al., 2014) e saúde do cérebro (SARKAR; BANERJEE, 2019). O microbioma intestinal está envolvido nos processos metabólicos, nutricionais e fisiológicos do corpo humano, levando à produção de nutrientes como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), vitamina K, vitamina B12, ácido fólico e certos aminoácidos que os seres humanos são incapazes de sintetizar (GERRITSEN et al., 2011; SUNIL et al.; 2017). A complexidade dessas comunicações da microbiota intestinal com diversos sistemas do organismo não é totalmente compreendida pela ciência e provavelmente envolvem múltiplos mecanismos que ainda são investigados (SHANDU et al., 2017).

As pessoas saudáveis possuem diversidade e altas contagens de microrganismos benéficos em sua microbiota intestinal caracterizando um cenário de simbiose, enquanto pessoas doentes possuem contagens microbianas mais baixas e menor diversidade de cepas bacterianas caracterizando um cenário de disbiose da microbiota intestinal (COTILLARD et

al., 2013; LI et al., 2016). Numerosas doenças estão associadas à disbiose da microbiota intestinal, indicando que a mesma se conecta com os sistemas metabólicos do organismo. Desta forma, o desequilíbrio da microbiota intestinal pode estar relacionada direta ou indiretamente ao desenvolvimento de doenças (LI et al., 2016).

Uma alimentação com escassez de fibra alimentar baseada em plantas, que servem de combustível para a microbiota, somando com uma abundância de nutrientes que afetam negativamente a mesma podem ser considerados para entender o surgimento de doenças metabólicas (SONNENBURG; BACKHED, 2016). O consumo de fibras, consideradas pré-bióticas correlaciona-se com o aumento de gêneros benéficos da microbiota como *Roseburia*, *Lachnospira* e *Prevotella* (DANNESKIOLD-SAMSOEA et al., 2019). Desta forma, o consumo de diferentes tipos de alimentos está sendo associado no contexto fisiológico entre a microbiota intestinal e a promoção da saúde ou doença no organismo (MILLON et al., 2018). Neste sentido, de acordo com Na Zhang et al., (2018) o incremento de investigações científicas para a elucidação dos mecanismos fisiológicos, de alguns tantos microrganismos específicos, sob a fisiologia do hospedeiro será crucial para o desenvolvimento de futuras estratégias terapêuticas, visando a prevenção de doenças. Contudo, fatores como, genética do hospedeiro e estilo de vida, também são cruciais neste entendimento (CANI, JORDAN, 2018).

### **2.1.1 Alimentação como moduladora da microbiota intestinal**

A microbiota intestinal é de forma bastante enfática alterada por fatores estocásticos. Os microrganismos presentes no intestino são moldados de acordo com o ambiente e hábitos de vida aos quais são submetidos (ZMORA; SUEZ; ELINAV, 2018). Essas influências estão relacionadas com fatores como: idade do indivíduo, sexo, etnias (HOLLISTER et al., 2014; WANG; et al., 2017), genética do hospedeiro, estado de saúde, estilo de vida, tipo de parto, exposição a medicamentos (SHANDU et al., 2017), exposição a poluentes (JIN et al., 2017) e a prática de exercícios promovem interações com o sistema imune e o aumento no número de comunidades microbianas benignas do microbioma intestinal (CODELLAA, R.; LUZI, L.; TERRUZZI, 2018). No entanto, o padrão da ingestão de alimentos é considerado o principal fator de influência na microbiota intestinal, o qual pode possuir diferenças entre as práticas culturais (CRYAN; DINAN, 2012; SHANDU et al., 2017).

A dissimilaridade do microbioma intestinal encontrado em pessoas que habitam em grandes centros urbanos em comparação a pessoas que vivem em comunidades agrícolas e rurais está sendo investigada. Sugere-se que a dieta singular destes ambientes seja responsável pela diferença na manutenção da simbiose ou disbiose da microbiota intestinal, relacionando a baixa diversidade de microrganismos ao consumo exclusivo de alimentos ultraprocessados (com alta quantidade de sal, açúcar, gorduras, realçadores de sabor) e a falta de ingestão de fibras alimentares e componentes biativos, dieta esta, com frequência observada na sociedade moderna e urbanizada (FILLIPPO et al., 2010; ZMORA; SUEZ; ELINAV, 2018). Mudanças nos padrões alimentares resultam em reflexos na estrutura populacional da microbiota intestinal, indicando que a dieta influencia a composição deste microbioma (NA ZHANG et al., 2018).

A relação da ingestão de alimentos e a microbiota intestinal pode ser notada desde o início da vida, pois a colonização do intestino por microrganismo é dado a partir do leite materno (CHARBONNEAU et al., 2016), depois disto acontece à multiplicação e a diversificação de espécies a partir da adoção de alimentos sólidos e a exposição do indivíduo aos fatores ambientais (LAURSEN et al., 2017).

A redução da diversidade das populações de microrganismos presentes no intestino pode ser interpretada pela diminuição da variedade de alimentos inseridos na dieta, o que faz refletir essa associação e as diferentes respostas da microbiota aos alimentos ingeridos (ZMORA; SUEZ; ELINAV, 2018). O consumo de dietas tipicamente ocidentais (altamente calóricas) tem sido relacionado ao desenvolvimento e progressão de diversas doenças, inferindo em mudanças específicas dos microrganismos da microbiota intestinal (MILLON et al., 2018).

O entendimento que a microbiota era relativamente estável ao longo da vida foi suplantado por resultados de pesquisas que demonstram que os fatores dietéticos alteram a comunidade microbiana e isto resulta em mudanças biológicas no hospedeiro (BROWN et al., 2012; DANNESKIOLD-SAMSOEA et al., 2019). Nesta linha de raciocínio a dieta tem sido apontada para modelar positivamente a composição da microbiota gastrointestinal, isto é, proporcionar aumento de gêneros benéficos e redução de patogênicos. Estudos em camundongos sugeriram que a dieta ajuda a determinar a receptividade de uma comunidade intestinal em relação à sua modulação (HOLLISTER et al., 2014). A alimentação é considerada responsável por 57% a 60% da variação total na composição da microbiota intestinal em animais (ZHANG et al., 2010; LI; WEI, 2015; NA ZHANG et al., 2018).

Os hábitos alimentares representam um aspecto que afeta o crescimento e quantidade das cepas bacterianas intestinais, isto é observado pela vantagem competitiva que alguns alimentos representam para bactérias específicas do intestino (KOREM et al., 2015). Os nutrientes centrais podem ser citados como responsáveis por este mecanismo, por exemplo, as fibras não digeríveis. As fibras não digeríveis são carboidratos que o organismo humano não é capaz de sintetizar, desta forma os mesmos atingem o intestino em forma não digerida. Ao contrário dos humanos, estima-se que o microbioma seja capaz de sintetizar compostos que façam a quebra destes alimentos, *Bacteroides*, *Bifidobacterium* e *Ruminococcus* são exemplos de microrganismos que realizam esta função, fazendo com que este tipo de alimento propicie crescimento destas espécies benéficas (CANTAREL; LOMBARD; HENRISSAT, 2012; ZMORA; SUEZ; ELINAV, 2018).

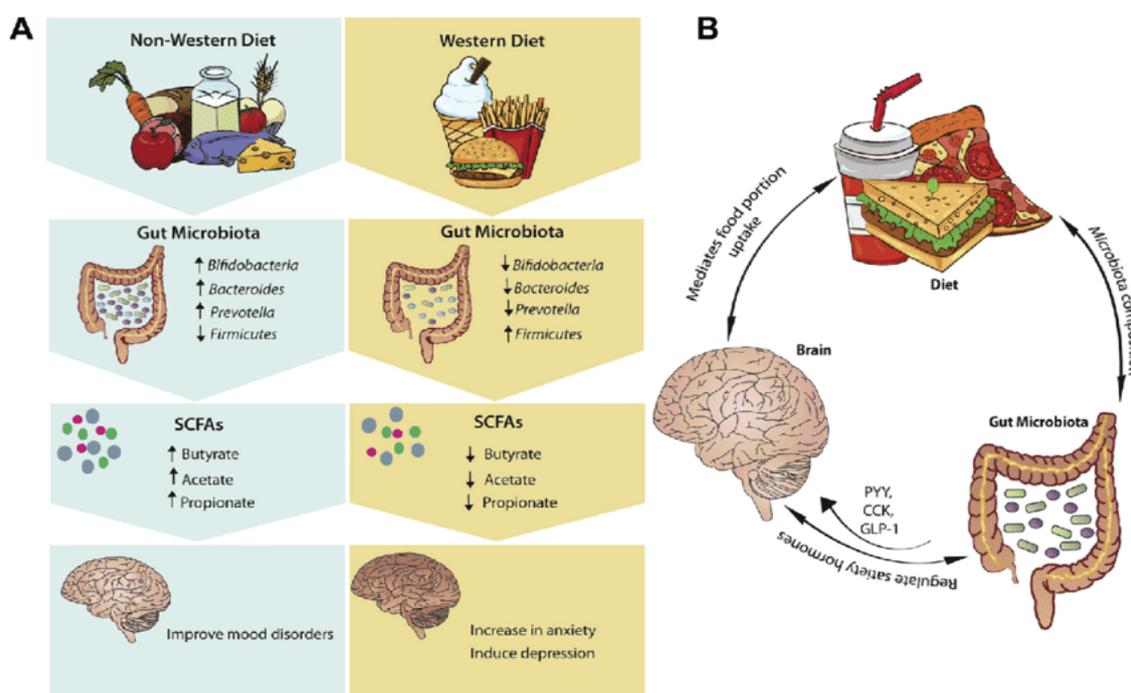
A ingestão de fibras não digeríveis pode influenciar mudanças na composição e atividade da microbiota intestinal e a abundância na geração de metabólitos pela sua ingestão, além de aumentar o volume fecal (DANNESKIOLD-SAMSOEA et al., 2019). A quebra destes compostos resulta na liberação de glicose e substâncias secundárias como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como acetato, propionato, butirato, lactato e succinato, iniciando uma complexa rede metabólica no organismo (FISCHBACH; SONNENBURG, 2011; ZMORA; SUEZ; ELINAV, 2018). A produção destas substâncias possui comprovada influência com as respostas inflamatórias na fisiologia do organismo, pois atuam como moduladores da manutenção das células de defesa (SMITH et al., 2013; ZMORA; SUEZ; ELINAV, 2018). Os ácidos graxos de cadeia curta, em especial o butirato, promovem a diferenciação de células de defesa, fortalecendo a barreira epitelial do intestino. Os mesmos também são responsáveis pela produção dos peptídeos de saciedade, como o peptídeo-1- GLP-1 (KIM; SERRE, 2018).

Como exemplo destas relações, uma dieta rica em gordura ou proteína (dieta típica ocidental) mostra reduções significativas em *Bifidobacterium*, enquanto a suplementação de dieta rica em gordura com adição de fibras fermentáveis e/ou prebióticos se mostrou capaz de restaurar níveis dessas mesmas bactérias. (BROWN et al., 2012; SHANDU et al., 2017).

Uma dieta mediterrânea, caracterizada pelo consumo de frutas, vegetais, legumes, grãos integrais, sementes, ingestão moderada de peixe, aves, produtos lácteos e baixa ingestão de carne vermelha, grãos refinados e açúcar tem sido postulada na contribuição de melhor desempenho na saúde do organismo através da sua relação com o microbioma intestinal (LANGE et al., 2019). O consumo de frutas, peixes e vegetais promove a

diversificação e manutenção da simbiose da microbiota, ao contrário do que pode ser observado no consumo de dietas hiperlipídicas e rica em açúcares, as quais estão associadas ao aumento de *Firmicutes* e redução de *Bacteroidetes* (HILDEBRANDT et al., 2009; SHANDU et al., 2017; KIM; SERRE, 2018). Estes microrganismos são prejudiciais a manutenção da saúde visto que caracterizam-se por serem lipogênicos, propiciados pela dieta lipídica, influenciando na geração de ácidos graxos de cadeia curta e sensação de saciedade, orquestrando a sinalização de apetite e alterações comportamentais como o desenvolvimento de quadros de ansiedade (SHANDU et al., 2017; KIM; SERRE, 2018) e obesidade (JIÃO et al., 2019), como ilustrado na Figura 1.

Figura 1- Dieta como moduladora da microbiota intestinal



Fonte: Shandu et al., 2017

Algumas investigações demonstram que um dos potenciais da microbiota intestinal é a modulação da extração de energia e sinalização de apetite, propondo que a microbiota de indivíduos obesos é mais eficiente em extrair energia de uma determinada dieta do que a microbiota de indivíduos magros, resultando em aumento da adiposidade (PARNELL; REIMER, 2012), essa modulação ocorre principalmente pela base de alimentos presentes na dieta dessas pessoas e o filo *Firmicutes* está associado a este tipo de resposta (TURNBAUGH, et al., 2006; WANG et al., 2017). Mayta-Apaza e colaboradores (2018) sugerem que a microbiota intestinal de indivíduos que consomem predominantemente dieta

com caráter ocidental (alto teor de gordura) pode ter menor capacidade na metabolização de compostos provenientes de alimentos saudáveis e desta forma reduzem a sua biodisponibilidade e com isso os seus potenciais benefícios.

Desta forma, evitar dietas de alimentos ricos em lipídeos e açúcares revela-se como muito importante para o estímulo da colonização de nosso intestino com boas bactérias resultando em bons resultados na manutenção da saúde do homem (ZMORA; SUEZ; ELINAV, 2018).

#### *2.1.1.1 Ingestão de alimentos com propriedades bioativas*

A microbiota intestinal transforma os compostos da dieta em metabólitos bioativos e, os compostos bioativos dos alimentos influenciam o crescimento, a diversificação e a atividade dos microrganismos do intestino e também efeitos fisiológicos em outros tecidos (AURA, 2008; LAPARRA; SANZ, 2010). Assim, a ingestão de alimentos que além de nutrir o organismo também possam proporcionar outros benefícios como: potencial antioxidante, anticolesterolêmico e antiinflamatório são de extrema importância para a manutenção da homeostase do organismo (LAPARRA; SANZ, 2010).

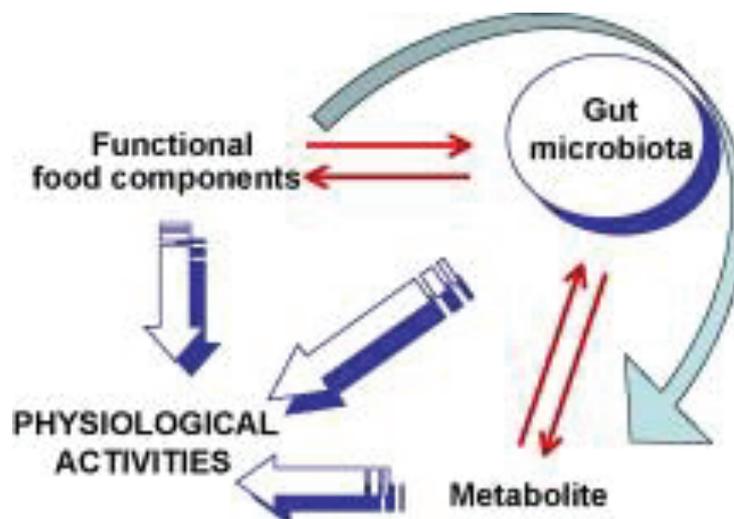
Os compostos fenólicos são substâncias com grande diversidade estrutural, encontradas naturalmente em alimentos naturais como chás, vinhos, frutas, ervas, etc. Esses compostos são facilmente metabolizados e transformados no organismo (ARAÚJO, 2011; NASH et al., 2018; GOWD et al., 2018). Os metabólitos derivados de compostos fenólicos são absorvidos no intestino, circulam no sistema sanguíneo e depois são excretados pela urina (LAPARRA; SANZ, 2010). Estes compostos são pouco absorvidos no intestino delgado, estima-se que 90-95% dos fenólicos da dieta se acumulem no cólon e é neste local que ocorre a sua metabolização (CLIFFORD, 2004; SAWSAN; ARABY, 2014).

A ingestão de alimentos ricos em flavonóis é importante para a modulação da composição da microbiota intestinal, exercendo efeito semelhante à probióticos, ou seja, inibindo o crescimento de gêneros patogênicos e estimulando o desenvolvimento de gêneros benéficos (SAWSAN; ARABY, 2014). Neste contexto, ressalta-se a importância do consumo diário de compostos fenólicos (CHACAR et al., 2018).

Os metabólitos gerados de compostos fenólicos a partir da ação de microrganismos do intestino possuem maior bioatividade que seus precursores (CHEN; SANG, 2014; GOWD et al., 2018) e contribuem para a manutenção da saúde gastrintestinal e auxiliam também modulando a composição do microbioma intestinal. Os polifenóis podem atuar

como promotores do crescimento, proliferação ou sobrevivência das bactérias benéficas no intestino (CHEN; SANG, 2014). A figura 2 ilustra como os alimentos funcionais atuam na modulação da microbiota intestinal e fisiologia do organismo., (Figura 2).

Figura 2 -Influência dos alimentos funcionais sobre a microbiota intestinal



Fonte: Laparra; Sanz, 2010

O efeito protetor destes compostos se deve a capacidade antioxidante dos mesmos, os quais são capazes de neutralizar espécies reativas de oxigênio (EROs), (MAYTA-APAZA et al., 2018) as hipóteses são de que uma dieta contendo antioxidantes, além de controlar o estresse oxidativo, aumenta as populações microbianas consideradas benéficas (MILLON et al., 2018).

A determinação da bioatividade de compostos fenólicos depende de alguns fatores, como sua estrutura química, glicosilação, conjugação com outros fenóis ou ácidos orgânicos e transformação pela ação da microbiota intestinal, ou seja, essas substâncias precisam ser hidrolisadas pelas enzimas intestinais ou pela microbiota antes de serem absorvidas. Dadas estas transformações os compostos fenólicos geralmente são excretados na urina em formas diferentes da ingerida (ARAÚJO, 2011; GIL – SANCHEZ, 2018; ZUGCIC et al., 2019).

No caso dos polifenóis, a maioria das formas fenólicas da dieta é pouco absorvida no intestino delgado e atinge o intestino grosso, onde são extensamente transformados pela microbiota intestinal, podem ser excretados no fígado (como componentes da bili) e serem reabsorvidos no intestino (ARAÚJO, 2011; NASH et al., 2018). Assim, as principais formas bioacessíveis fenólicas (capazes de serem absorvidas) são os metabólitos microbianos (ácidos benzóicos, ácidos fenilpropiônicos, ácidos

fenilacéticos, fenóis, ácidos hipúricos e outros), que são estruturalmente diferentes das formas fenólicas precursoras presentes nos alimentos ingeridos (GIL – SANCHEZ, 2018).

Investigações a respeito dos efeitos de compostos fenólicos de azeite de oliva sobre a microbiota intestinal demonstram que após a suplementação houve aumento significativo de *Bifidobacterium* e redução de população do gênero *Clostridium* (PELAEZ et al., 2017). Avaliações em relação ao consumo do extrato da folha de oliveira elucidam que existe um aumento significativo nos ácidos fenólicos, derivado do metabolismo dos polifenóis pela ação da microbiota intestinal, observou-se também que o metabólito ácido 3,4-dihidroxifenilacético pode ser encontrado no plasma várias horas após a ingestão do extrato (ZUGCIC et al., 2019). Resultados semelhantes foram encontrados em estudos desenvolvidos com bagaço de uva, considerada uma ótima fonte de bioativos, metabólitos como ácido 3-hidroxifenilacético e ácido 2- (4-hidroxifenil) propiônico, derivados de fenóis ácidos, foram correlacionados com o estímulo de *Bifidobacterium*, além destes, sugeriu-se a presença do metabólito Daidzedin (isoflavona) como responsável pela inibição do gênero patogênico *Clostridium* (CHACAR et al., 2018).

A metabolização de compostos fenólicos e antioxidantes também foi estudada com fontes de extratos de amora preta, neste estudo verificou-se que o composto precursor catequina desaparece completamente em contrapartida ao surgimento de novos metabólitos secundários como ácido gálico, ácido 3, 4-di-hidroxibenzóico e 2, 4, 6-tri-hidroxibenzaldeído. Estes metabólitos secundários foram avaliados positivamente para capacidade antidiabética e estes resultados foram sugeridos devido à ação da microbiota intestinal, inferindo a mesma como indispensável para atividade bioativa da amora preta (GOWD et al., 2018).

Muitos estudos vêm demonstrando ao longo dos anos a ação benéfica da ingestão de compostos fenólicos e de seus metabólitos bioativos. Alguns metabólitos provenientes da ação da microbiota intestinal já foram identificados, no entanto o grande desafio é entender a complexidade dessas biotransformações, compreender o exato funcionamento desses elementos e como se relacionam com os sistemas do organismo e a microbiota intestinal (GAUTHAM et al., 2014; NASH et al., 2018). Neste sentido, percebe-se que matrizes vegetais ricas nestes compostos podem ser exploradas para elucidar essas relações, diante disso, a utilização da *Ilex paraguariensis* pode ser considerada para promoção de uma boa microbiota intestinal (SAWSAN; ARABY, 2014).

## 2.2 ERVA-MATE (ILEX PARAGUARIENSIS)

A erva-mate é uma planta com uso tradicional em países da América do Sul (JUNIOR; MORAND, 2016; BARROSO et al., 2019), pertencente à família Aquifoliaceae e cientificamente conhecida como *Ilex paraguariensis*, seu consumo nesta região está associado à tradição guarani, grupo nativo que habitou diferentes países do sul da América. É uma matéria-prima bastante difundida na forma de bebidas preparadas a partir da infusão das folhas, recebendo diferentes designações de acordo com a temperatura em que é preparada ou consumida (JUNIOR; MORAND, 2016). Chá mate e chimarrão são preparos de água quente, já o tereré é uma bebida com água fria (BRACESCO, et al., 2011).

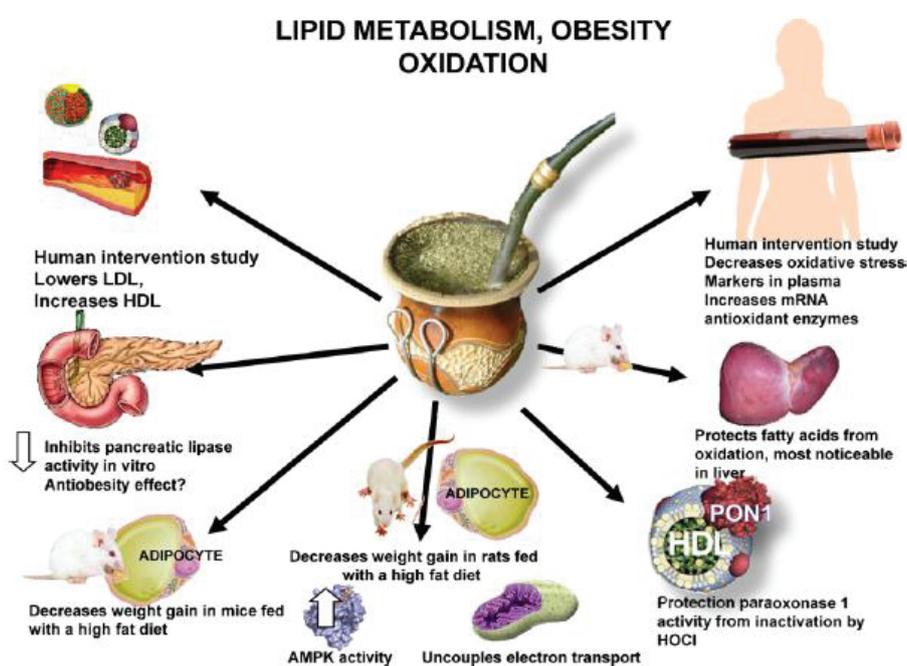
No contexto de produção de erva-mate, o Brasil é o segundo maior produtor, seguido do Paraguai (JUNIOR; MORAND, 2016). O maior consumo *per capita* de erva-mate está no Uruguai com 8 a 10 kg/ habitante/ano, na Argentina o consumo é de cerca de 6,5 kg /habitante/ ano e no sul do Brasil possuímos dados de 3 a 5 kg / habitante/ ano. O consumo médio de folhas secas estimado para esses países é entre 12 e 23 g / habitante/ dia. (HECK; MEJIA, 2007; JUNIOR; MORAND, 2016).

O consumo de erva-mate vem expandindo e recebendo relevância devido ao seu sabor e suas propriedades benéficas para a saúde (JUNIOR; MORAND, 2016). A planta *Ilex paraguariensis* contém uma diversidade de constituintes, como nutrientes, minerais e vitaminas, é caracterizada com aproximadamente 6% de cinzas, 26% proteínas, 4,5% de gordura e 64% de carboidrato em sua composição (SOUZA et al., 2015). A composição fitoquímica desta planta se dá principalmente pela presença de seus polifenóis (ácidos fenólicos e flavonóides), alcalóides (metilxantinas, cafeína, teobromina, teofilina) e terpenos como carotenóides e saponinas (HECK; MEJIA, 2007; JUNIOR; MORAND, 2016; BARROSO et al., 2019). Estes constituintes são responsáveis pelo potencial bioativo da erva-mate, os quais estão presentes principalmente em suas folhas (SOUZA et al., 2015).

As características benéficas do consumo da *Ilex paraguariensis* podem ser citadas, tais como anti-inflamatórias, anti-obesidade (SCHINELLA et al., 2014; SOUZA et al., 2015; ROCHA et al., 2018), anti-câncer, e atividade antioxidante (SCHINELLA et al., 2014; SOUZA et al., 2015) hipoglicemiante (BRACESCO et al., 2011; ROCHA et al., 2018), antimicrobiana (BRACESCO et al., 2011) quimiopreventivas e hipocolesterolêmica (BOANTURA et al., 2012; BARROSO et al., 2019). Nos últimos anos, várias dessas atividades farmacológicas vêm sendo documentadas em artigos científicos, demonstrando o

potencial de ação antioxidante, efeitos cardioprotetores (JUARISTI et al., 2018; CAHUÊ et al., 2019; BARROSO et al., 2019) antiinflamatórios, anti-obesidade desta planta (JUARISTI et al., 2018; ROCHA et al., 2018). Estudos *in vivo* propõem que a utilização de erva-mate na dieta pode melhorar o perfil lipídico plasmático, prevenir gordura hepática, reduzir resistência à insulina e redução de riscos cardiovasculares (JUNIOR; MORAND, 2016; BARROSO et al., 2019)., (Figura 3).

Figura 3 -Benefícios da erva-mate na promoção da saúde



Fonte: Bracesco et al., 2011

O perfil lipídico é conhecido por ser marcador de riscos cardiovasculares, a erva-mate tem sido reconhecido pelo excelente potencial modulador colesterolêmico para redução destes riscos (BRAVO et al., 2014). Este efeito hipocolesterolêmico é associado à presença de saponinas e demais compostos fenólicos presentes no chá mate (BOAVENTURA et al., 2012). Além disto, o uso do chá de mate também é sugerido para a prevenção do diabetes (BOAVENTURA et al., 2013).

As inflamações e oxidação das células deve-se principalmente à espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS), os quais estão relacionados com diversas patologias crônicas. A ingestão de mate, dada sua composição, demonstra funções antioxidantes, a qual retarda este processo oxidativo (RIACHI; MARIA, 2017). A *Ilex paraguariensis* é responsável pela diminuição desses biomarcadores de estresse oxidativo (BOAVENTURA

et al., 2013), a presença de seus bioativos confere a atividade sequestradora das espécies reativas de oxigênio, revelando seu potencial protetor e antioxidante no organismo (SAWSAN; ARABY, 2014). Estudos realizados com ratos sugerem que o tratamento com erva-mate é capaz de manter a defesa antioxidante da enzima catalase, responsável por atenuar radicais livres, em animais tratados com dieta hiperlipídica, contribuindo para a não acumulação de gordura no fígado desses animais (BARROSO et al., 2019).

Os benefícios impostos através do consumo de erva-mate estão muito associados à metabolização de seus compostos, sugerindo que seus metabólitos secundários são biologicamente ativos (KUNGEL et al, 2018). Ácido cafeico e ácido clorogênico são considerados os principais precursores das propriedades bioativas da erva-mate (BRACESCO et al., 2011), remoção de espécies reativas de oxigênio e a modulação das enzimas antioxidantes pode ser explicada pela presença, em maior conteúdo destes compostos (SOUZA et al., 2015). Sugere-se que os polifenóis presentes na erva-mate podem afetar o crescimento e o metabolismo das bactérias do intestino, ativando ou inibindo seu crescimento, dependendo da constituição e concentração (SAWSAN; ARABY, 2014).

A presença de ácido cafeico e ácido clorogênico na erva-mate pode ser responsável pela atividade antimicrobiana de bactérias patogênicas gram-negativas (PUUPPONEN-PIMIA et al., 2005; SAWSAN; ARABY, 2014; LIMA; FARAH, 2019). Avaliações com extrato de erva-mate demonstram o potencial antimicrobiano do mesmo sobre as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, todas consideradas patogênicas e promotoras de disbiose intestinal (VIEITEZ et al., 2018). No intestino os fenólicos desta planta podem agir seletivamente sobre os componentes da microbiota intestinal, influenciando na dinâmica populacional e realizando uma modulação positiva das bactérias no intestino (SAWSAN; ARABY, 2014).

O potencial funcional dos biocompostos da erva-mate faz desta planta uma matéria-prima apropriada para ser explorada em matrizes alimentares, caracterizando uma proposta da utilização da *Ilex paraguariensis* para produção de alimentos saudáveis que tragam proveitos para a saúde do organismo, incluindo uma boa microbiota intestinal. No entanto, existe a necessidade de estudos comprobatórios de que os compostos presentes no mate podem de fato influenciar positivamente os microrganismos presentes no intestino.

A grande dificuldade da utilização de fontes com compostos bioativos na produção de alimentos é a sua instabilidade, estes compostos são altamente suscetíveis a fatores como oxigênio, luz, pH e calor (NUNES et al., 2015). Levando em consideração o cenário atual de

doenças degenerativas associadas com a alimentação e o aumento da demanda por alimentos saudáveis, melhorar o veículo de produtos funcionais representa um papel fundamental na promoção da saúde humana. Este problema pode ser minimizado com a utilização de técnicas de encapsulação (DE PRISCO, 2016).

### 2.3 MICROENCAPSULAÇÃO

O processo de encapsulação de compostos bioativos através de um revestimento polimérico, protege o ativo do ambiente externo, podendo inibir assim, a oxidação, exposição à luz, oxigênio e outros fatores que venham a gerar degradação (DEPYPERE; 2003), isto faz a tecnologia de produção de cápsulas eficiente para aplicação na indústria de alimentos (WANG et al., 2016).

A microencapsulação e ou encapsulação é uma tecnologia capaz de proteger os bioativos das mais diversas condições de exposição (luz, temperatura, oxigênio, dentre outras), promover a liberação controlada, mascarar odor e sabor desagradáveis, além de possibilitar a diluição homogênea do material encapsulado, em um produto alimentício (DESAI; PARK, 2005; DE PRISCO, 2016).

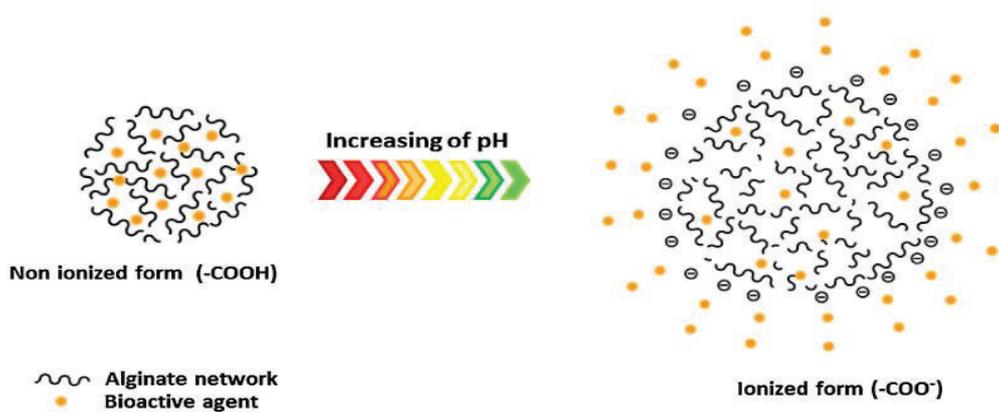
Várias técnicas de encapsulação podem ser empregadas, como a emulsificação, coacervação, gelificação iônica, *spray dryer*, *spray cooling*, em leito fluido e extrusão, entre outros que têm sido desenvolvidas e estudadas. (CASANOVA et al., 2016).A gelificação iônica é uma técnica muito utilizada por tratar-se de um método versátil e simples, baseado nas interações iônicas de polímeros com cargas opostas (BENAVIDES et al. 2016).A vantagem de utilizar a gelificação iônica são as condições suaves, uma vez que não emprega altas temperaturas, agitação vigorosa ou solventes orgânicos (MOURA et al. 2018).

Alguns materiais de parede podem ser utilizados para realizar encapsulação, como goma arábica, proteínas e maltodextrinas. No entanto, deve haver cuidado na escolha do material encapsulante, para que este não altere a funcionalidade desejada para a cápsula (NUNES et al., 2015).Os agentes encapsulantes servem como membrana de revestimento para as cápsulas, com o objetivo de proteger substâncias sensíveis, isolando-as fisicamente do meio ambiente durante a fabricação, armazenamento e manuseio, para posterior liberação no produto final durante a sua fabricação e/ou consumo (AKDENIZ; SUMNU; SAHIN, 2018).

O alginato de sódio é um dos biopolímeros mais utilizados como encapsulante de materiais bioativos devido a sua capacidade em gelificar sob condições brandas, versatilidade, capacidade de formar hidrogéis sensíveis ao pH, e sua solubilidade em água a temperatura ambiente, sem necessidade de aquecimento (LOPES et al., 2016), além da sua notável capacidade de reticulação, sensibilidade ao pH e muco-adesividade (AGUERO et al., 2017).

A sensibilidade a diferentes pH's do alginato, dado a presença de grupos carboxílicos em sua estrutura conferem a este polímero uma desejável característica quando a intenção é uma liberação controlada das cápsulas no trato digestório. Para um  $\text{pH} < 3,4$  os grupos ácido carboxílico estão na forma não ionizada ( $\text{COOH}$ ) levando a uma estrutura insolúvel. Em  $\text{pH} > 4,4$  o grupo carboxílico fica ionizado ( $\text{COO}^-$ ), iniciando uma expansão da cadeia polimérica e o intumescimento da matriz hidrofílica, depois disto há o rompimento da cápsula e liberação do material encapsulado em um  $\text{pH} < 7$ . As características de resposta a diferentes pH's ao longo do trato gastrointestinal e resistência as condições adversas do estômago, fazem do alginato uma alternativa que tem sido explorada para o desenvolvimento de dispositivos para administração via oral (AGUERO et al., 2017)., (Figura 4).

Figura 4 - Sensibilidade das cápsulas em diferentes pH's



Fonte: Agüero et al., 2017

Cápsulas resistentes às condições gástricas estão cada vez mais sujeitas a estudos para entender e aprimorar o mecanismo de liberação do composto bioativo no local de ação desejado (MOURA et al., 2019).

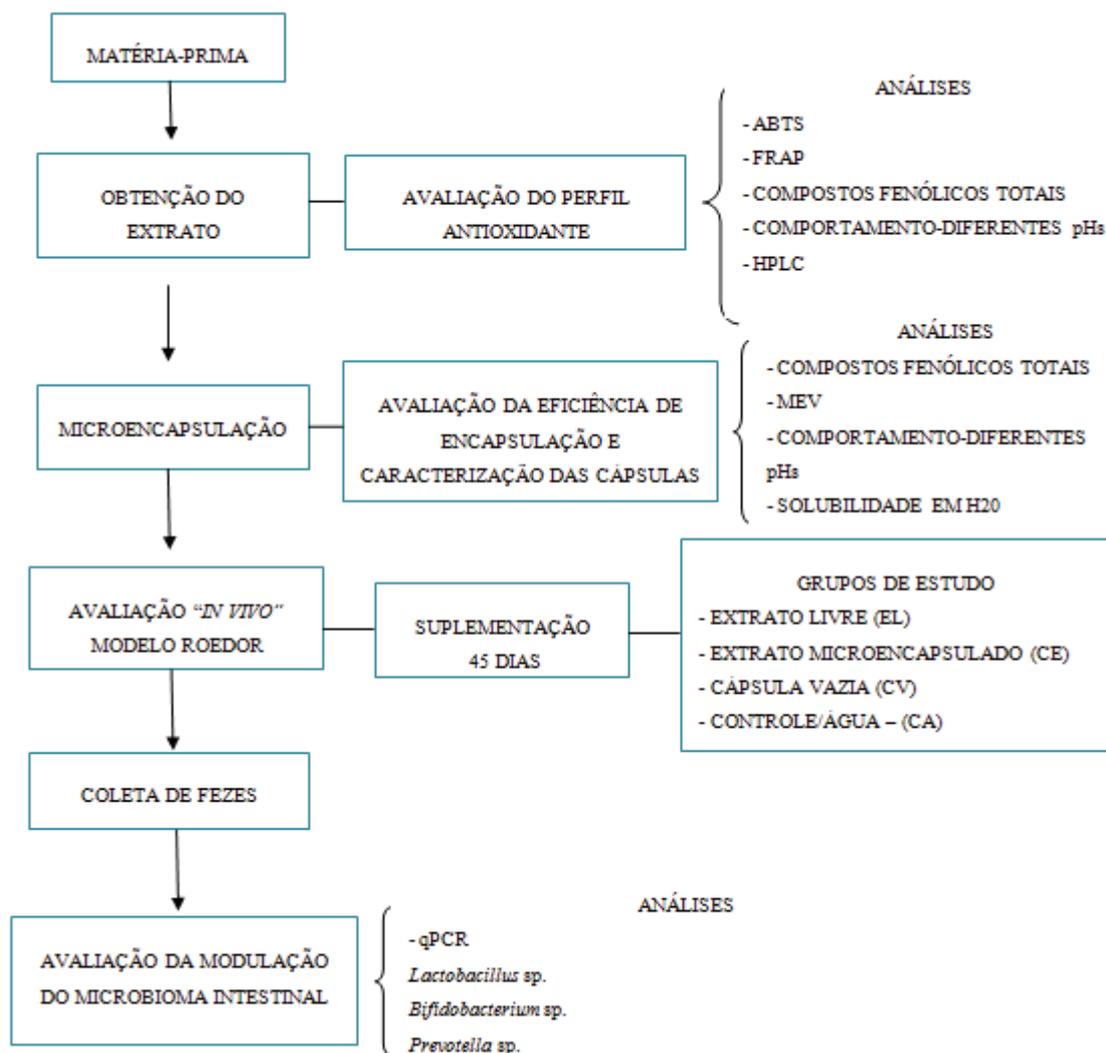
Devido a estas propriedades o alginato pode ser empregado para produzir cápsulas através da técnica de gelificação iônica. Esta técnica tem como princípio a reticulação de cadeias polieletrólíticas do biopolímero na presença de cátions bivalentes como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  entre outros. O uso de íons cálcio, além de produzir melhores resultados, também é interessante devido à aceitabilidade pelo organismo humano, pelo fato de ser o principal componente do sistema esquelético e por atuar na regulação de diversos processos fisiológicos (VASILE; JUDISA; MAZZOBRE, 2018).

O desenvolvimento de microcápsulas pela técnica de gelificação iônica pode ser realizado aliando-se ao *spray dryer*, para atomização da solução polimérica junto ao material a ser encapsulado em solução reticulante de cloreto de cálcio obtendo-se microcápsulas sólidas e de menor tamanho no final do processo.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia está organizada conforme o fluxograma da Figura 5.

Figura 5 - Fluxograma da metodologia do projeto



Fonte: própria autora (2019)

#### 3.1 TRATAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA

As folhas de erva-mate utilizadas foram fornecidas pela empresa INOVAMATE, município de Ilópolis - RS. As folhas colhidas para amostragem são de diferentes quadrantes da plantação de erva-mate, sendo misturadas e dando origem a uma amostra composta. As folhas foram separadas dos caules e branqueadas, este método consiste na imersão das folhas

em água a uma temperatura de 95°C por 30 segundos e em seguida imersas em banho de gelo.

Após o processo de branqueamento o excesso de água foi retirado utilizando papel toalha e as folhas submetidas à secagem em estufa por 20 horas em temperatura de 50°C ± 2 °C formando uma camada < 5 cm para evitar o excesso de sobreposição das folhas. Depois de secas, as mesmas foram trituradas em moinho de facas, em seguida embaladas a vácuo e a amostra congelada à - 18 ± 2°C até a sua utilização.

### **3.2 OBTENÇÃO DE EXTRATO AQUOSO**

O extrato aquoso foi preparado de acordo com o método descrito por Turkmen, Sari e Velioglu (2006) e modificado por Murakami et al. (2011), com adaptações. Em ensaios preliminares, a condição (m/v) de 15g de erva para 100mL de água demonstrou maior teor de compostos fenólicos e potencial antioxidante, para ser utilizada. O preparo do extrato consistiu em uma suspensão de erva mate em água, que foi aquecida por 5 min a 90±2 °C em banho-maria, após foi filtrada em filtro de nylon utilizando uma bomba de vácuo com o intuito de separar o extrato do material em suspensão.

O extrato filtrado foi distribuído em bandejas contendo 250 mL e encaminhado à ultra-freezer por 24 h a -80 ± 2 °C e posteriormente submetido à liofilização por 80 h à -40 ± 2 °C a fim de concentrar os sólidos e preservar sua atividade. A caracterização do extrato liofilizado foi realizada quanto ao teor de compostos fenólicos e análise de potencial antioxidante.

### **3.3 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO LIOFILIZADO**

#### **3.3.1 Capacidade Antioxidante pelo Radical ABTS**

A análise da capacidade antioxidante pelo método do radical ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico) está baseada na metodologia adaptada de RE et al. (1999). O radical catiônico de ABTS foi preparado a partir da reação com a mistura de solução estoque de ABTS (7 mmol/L) com persulfato de potássio (2,45 mmol/L), esta solução foi preparada no mínimo 12 a 16 horas antes da realização da análise e permaneceu em ambiente escuro, em temperatura ambiente.

Para realização da análise a solução de ABTS foi diluída em etanol 96% até obter uma absorbância de 0,695 à 0,705 no espectrofotômetro UV-Vis. Ao atingir a absorbância desejada foi adicionado 1mL desta solução em 10 µL de amostra do extrato de erva-mate previamente pipetada, (10 µL de água para o tubo de branco), em ambiente protegido da luz, seguido de 5 segundos de homogeneização. Esta solução permaneceu em repouso durante 6 minutos no escuro para reação. O extrato de erva-mate liofilizado foi avaliado em diluição apropriada para sua concentração (1:100). Para leitura da absorbância utilizou-se uma cubeta 1mL, o espectrofotômetro foi zerado com etanol a 734nm. Os resultados foram interpretados utilizando uma curva padrão expressa µmol equivalente de Trolox/L de amostra, apresentada no apêndice A. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### **3.3.2 Capacidade Antioxidante pelo Método de FRAP**

O potencial antioxidante redutor férrico (FRAP) foi realizado de acordo com o método proposto por Benzie e Strain (1996) com modificações de Arnous et al. (2002). Para a realização deste ensaio adicionou-se 200 µL de amostra de extrato de erva-mate (200µL de água para o tubo de branco) e 200µL de solução de cloreto férrico 3 mM em tubos de ensaio. Esta mistura permaneceu em repouso durante 30 minutos em banho-maria, em temperatura de 37°C. Após o repouso foi adicionado 3,6mL de solução TPTZ (2,4,6-Tris(2 Piridil)- 1,3,5 Triazina) e os tubos submetidos a um ambiente escuro durante 10 minutos. O extrato de erva-mate liofilizado foi avaliado em diluição apropriada para sua concentração (1:250). O espectrofotômetro UV-Vis foi zerado em 620 nm com a amostra de branco. Os resultados foram interpretados utilizando curva padrão de µmol equivalente de Trolox/L de amostra, apresentada no apêndice B. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### **3.3.3 Compostos Fenólicos Totais**

O conteúdo total de polifenóis dos extratos foi determinado segundo o método descrito por Correia *et al.* (2004), com modificações propostas por Sousa e Correia (2012). Para realização dos testes, foi utilizada uma diluição apropriada para a concentração do extrato de erva-mate liofilizado (1:200). Foi adicionado em tubos de ensaio 1 mL de amostra (1mL de água para o branco), 1 ml de álcool 96%, 5mL de água destilada e 0,5 mL de Folin-Ciocalteu, esta mistura foi agitada por 10 segundos e adicionada de 1 mL de carbonato de

sódio Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5%. Após a adição do carbonato de sódio agitou-se por 3 segundos e os tubos foram submetidos a 1 hora de repouso em ambiente protegido de luz.

A leitura da absorbância foi realizada em Espectrofotômetro UV-Vis, zerado com água a 765 nm. Os resultados foram interpretados utilizando curva padrão expressa em mg equivalentes de Ácido Gálico/mL de amostra, apresentada no apêndice C. Os ensaios foram realizados em triplicata

### **3.3.4 Comportamento do Potencial Antioxidante do Extrato em Diferentes Valores de pH**

Os valores de pH foram medidos através de pHmetro calibrado, pela inserção do eletrodo na solução com o extrato de erva-mate. O comportamento do potencial antioxidante do extrato de erva-mate em diferentes pHs foi realizado de acordo com o método proposto por Chen et al. (2017) com modificações, submetendo o extrato a 3 diferentes condições: pH ácido (2,0 ±2), utilizando solução de ácido clorídrico 0,5 M (HCl), pH básico (7,5 ±2) utilizando solução de carbonato de sódio 0,1 M (NaHCO<sub>3</sub>) e pH intermediário (5,5 ±2) utilizando solução de ácido clorídrico 0,5 M (HCl) e solução de carbonato de sódio 0,1 M (NaHCO<sub>3</sub>) respectivamente.

Para os testes 25 mL de extrato foram preparados utilizando as soluções tampão para ajuste dos pH's desejados, cada pH foi mantido 2 horas em *shaker* à 37 °C sob agitação de 100 rpm.

Esses ensaios visam simular os pHs encontrados no trato digestivo. A análise da quantificação de compostos *in vitro* em cada um dos tratamentos foi realizada no final do tempo estabelecido para cada pH, pelo método de descrito no item 3.3.3. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### **3.3.5 Identificação de Compostos Bioativos por HPLC**

A quantificação dos compostos fenólicos e alcalóides do extrato liofilizado de erva-mate foram analisados com suporte do laboratório de cromatografia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), utilizando a técnica de HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance), acoplada ao detector de matriz fotodiodo (PDA), usando uma coluna C-18 de fase reversa (tamanho de partícula de 5 µm, 150 nm, 4,6 nm) a 38°C. As fases móveis foram compostas por 5% (v/v) de metanol em água acidificada, (0,1% v/v de ácido fórmico) com

solvente (A), 0,1 % (v/v de ácido fórmico em acetonitrila com solvente B, vazão de 1 mL/minuto e o volume de injeção foi de 20 µL de amostra, seguindo o método descrito por Quatrin et al (2019). Os compostos fenólicos das amostras foram identificados por comparação com o tempo de retenção na coluna de padrões autênticos. Os dados espectrais foram obtidos a partir de espectros de absorção visíveis por UV. Os cromatogramas para fins de quantificação foram obtidos a 280 nm para alcalóides e 320 nm e 360 nm para hidroxicinamatos e flavonóides (compostos fenólicos). Os compostos que são isômeros do ácido clorogênico foram identificados com base na ordem do espectro de eluição e absorção (TRUGO; MACRAE, 1984) e quantificados por equivalência de ácido 5-caffeyolquinic e os resultados foram expressos em g/100gramas de extrato liofilizado.

### **3.4 MICROENCAPSULAÇÃO DO EXTRATO LIOFILIZADO**

A técnica de microencapsulação utilizada segue conforme o método proposto por Yan et al. (2014) com modificações, gelificação iônica por extrusão, utilizando alginato de sódio com material encapsulante reticulado com solução de cloreto de cálcio.

Para realização deste método foi previamente preparada uma solução contendo cloreto de cálcio (1,5 %). Cada batelada de cápsula produzida consistiu em homogeneizar 300 mL do extrato de erva mate (concentração de 7,5%) com alginato de sódio (1,5%) formando uma solução que foi mantida sob agitação a 50 °C. Essa mistura foi aspergida através de equipamento spray dryer, sendo impulsionada por bomba peristáltica em uma vazão de alimentação de 0,3 L/hora, fluxo de ar de 10 L.min<sup>-1</sup>, e pressão de 3 bar, passando por um bico atomizador de 2 mm, que realizou a extrusão da amostra. As partículas atomizadas foram recolhidas em recipiente, posicionado em uma altura de 8 ± 5 cm do bico aspersor, contendo a solução de cloreto de cálcio, a qual promoveu a reticulação do alginato e formação das microcápsulas durante 30 minutos, sob agitação. Para realizar esta reticulação as proporções de volume das soluções utilizadas foram de 1:3 (300 mL de alginato de sódio e extrato para 900 mL de cloreto de cálcio). Após a reticulação as microcápsulas foram separadas do meio por filtração á vácuo e lavadas para retirada de resíduos da solução reticulante. Para formação das cápsulas a proporção de material de parede e núcleo foi de 1:5 (1 parte de parede para 5 partes de núcleo).

As microcápsulas formadas foram congeladas por 24 horas em ultrafreezer à  $-80 \pm 2$  °C e liofilizadas por 72 horas à  $-40 \pm 2$  °C. Cápsulas vazias foram produzidas seguindo este mesmo método, sem a utilização do extrato de erva-mate.

### 3.4.1 Eficiência da Encapsulação

Para determinação da eficiência de encapsulação foi coletado o resíduo não encapsulado para análise de compostos fenólicos totais, através do método 3.3.3. A relação dos resultados entre o extrato de erva-mate liofilizado e do residual coletado demonstra a Eficiência de Encapsulação (EE) conforme Equação 1.

$$EE\% = \frac{CF_0 - CF_R}{CF_0} * 100 \quad (1)$$

Considerando:

CF<sub>0</sub>: Compostos fenólicos totais do extrato inicial;

CF<sub>r</sub>: Compostos fenólicos totais do resíduo.

## 3.5 AVALIAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS

A avaliação de formação e estrutura externa das cápsulas foi realizada por microscopia eletrônica de varredura – MEV.

### 3.5.1 Comportamento das Microcápsulas em Diferentes pH's

O comportamento das cápsulas em diferentes valores de pH's visando simular o trato gastrointestinal é realizado conforme descrito no item 3.3.4, substituindo as gramas de extrato por gramas de cápsula de erva-mate (considerando para o cálculo a mesma quantidade de compostos fenólicos utilizada no ensaio de extrato livre). A análise da quantificação de compostos *in vitro* em cada um dos tratamentos foi realizada no final do tempo estabelecido para cada pH, pelo método de descrito no item 3.3.2. Os ensaios foram realizados em triplicata, em pH ácido ( $2 \pm 1$ ) e básico ( $7.5 \pm 1$ ).

### 3.5.2 Solubilidade das Microcápsulas em Água

A solubilidade das microcápsulas em água foi determinada seguindo o método descrito por Cano-Chauca et al. (2005). Para as análises 1 grama microcápsula de erva-mate foi suspensa em 100 mL de água e promovido a agitação em velocidade máxima durante 90 minutos, em temperatura ambiente. Após a agitação a solução foi filtrada em bomba a vácuo. Uma porção de 25 mL do filtrado foi transferida para placa de Petri (previamente tarada) e submetida à secagem em estufa a 105°C por 5 horas. O percentual de solubilidade foi calculado por meio de diferença de massa e expresso em percentual. Os ensaios foram realizados em triplicata.

## 3.6 AVALIAÇÃO DA AÇÃO MODULADORA DE EXTRATO DE ERVA-MATE LIVRE E MICROENCAPSULADO NA MICROBIOTA INTESTINAL

### 3.6.1 Delineamento Experimental

Os ensaios para verificação da modulação da microbiota intestinal foram realizados em 40 animais (ratos Wistar) divididos em 4 grupos (n=10) que receberam diferentes tratamentos: grupo controle (C) que recebeu somente água, grupo extrato aquoso (EL) que recebeu o extrato de erva mate livre (liofilizado), grupo que recebeu extrato liofilizado microencapsulado (CE) e grupo cápsula vazia (CV) que recebeu cápsulas sem extrato a fim de excluir quaisquer interações com o material encapsulante. A dose efetiva que foi suplementada foi calculada com base no proposto por Taguchi et al. (2015) com modificações, prevendo uma quantidade de 3,29 mg de compostos fenólicos/animal/dia. A ingestão do extrato de erva-mate liofilizado livre e microencapsulado aconteceu durante 45 dias (dia 0 até o dia 45), diariamente, uma vez ao dia, via gavagem intragástrica. Além dos extratos os animais tiveram acesso à água, ração *ad libitum* e ambiente com temperatura e luz controlada.

Amostras fecais individuais foram coletadas antes e após a ingestão do extrato de erva-mate. As amostras foram acondicionadas em ultrafreezer com temperatura de -80 ° C até o momento da análise.

### 3.6.2 Avaliação da Microbiota Intestinal pela Técnica de qPCR

Para análise de diversidade bacteriana intestinal, métodos baseados em cultura mostraram-se inadequados, uma vez que uma grande fração da microbiota permanece inculca (GERRITSEN et al., 2011). Desta forma, para a quantificação dos gêneros bacterianos selecionados para este estudo foi utilizado método de Reação em Cadeia Polimerase em tempo real (qPCR), de acordo com proposto pelos autores Chacar et al. (2018).

Os grupos selecionados de bactérias para estudo são: Filo Firmicutes, gênero *Lactobacillus* sp., Filo Bacteroidetes, gênero *Prevotella*, e Filo Actinobactéria, gênero *Bifidobacterium*.

#### 3.6.2.1 Extração de DNA das Amostras de Fezes

A extração do material genético das amostras de fezes coletadas foi realizada utilizando um kit para isolamento de DNA denominado *Purelink Microbiome DNA Purification Kit*, o qual dispõe de todos os reagentes de lise, lavagem e eluição.

Para obtenção do DNA utilizou-se 0,1 grama de amostra em um tubo estéril e adicionado 700  $\mu\text{L}$  de solução tampão (S1—*Lysis Buffer*) para realizar a lise das membranas e liberar o material genético, agitando com auxílio de um vórtex, para total dispersão da amostra. Em seguida foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de tampão de lise (S2—*Lise Enhancer*), agitando novamente no vórtex. Essa mistura foi incubada durante 10 minutos a 65°C para posteriormente ser homogeneizada por 10 minutos na velocidade máxima do vórtex (na posição horizontal). Após a homogeneização a amostra foi centrifugada, durante 5 minutos a 14000 rpm. Uma vez centrifugada, 400  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo estéril e adicionados de 250  $\mu\text{L}$  de tampão S3—*Cleanup Buffer*, agitando brevemente no vórtex para posterior centrifugação a 14000 rpm durante 2 minutos. Após a segunda centrifugação 500  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram levados para um novo tubo, evitando quaisquer sedimentos. Na sequência foram adicionados 900  $\mu\text{L}$  de tampão S4—*Binding Buffer* submetendo o tubo a agitação no vórtex. Após agitação foram transferidos para um tubo de coluna 700  $\mu\text{L}$  da amostra, a qual foi centrifugada a 14000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e este passo foi repetido com o restante da amostra adicionada

do tampão S4, assegurando que toda a amostra passou pelo filtro disposto na coluna, o qual possui a finalidade de reter o material genético.

Após a realização das etapas iniciais de lise e separação dos detritos de fezes, iniciou-se o procedimento de lavagem do DNA, transferindo a coluna para um tubo de recolha limpo, somando a 500 µL de solução tampão S5—*Wash Buffer Concentrate* e centrifugando a 14000 rpm/1 minuto. Todo fluxo de passagem foi descartado e o tubo foi novamente submetido à centrifugação, para total eliminação do tampão de lavagem utilizado.

O último passo da extração foi a eluição do DNA retido na coluna, transferindo a mesma para um tubo limpo e estéril, adicionando 100 µL de tampão de eluição (S6—*Elution Buffer*) para posterior incubação em temperatura ambiente por 1 minuto. A coluna e o tubo foram centrifugados a 14000 rpm/1 minuto após a incubação. O material contido no tubo depois da centrifugação foi o DNA extraído e purificado (a coluna foi descartada). O mesmo foi armazenado em ultrafreezer em temperatura de -80 °C para utilização em longo prazo, conforme orientação do kit de extração.

### 3.6.2.2 Otimização do Método de qPCR

A realização dos ensaios de otimização do método de qPCR contou com suporte do laboratório de Virologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFGRS). Foram utilizados iniciadores *-Invitrogen by Thermo Fischer Scientific* para detecção e quantificação do material genético dos microrganismos selecionados. As sequências dos iniciadores estão descritas na Tabela 1. A reação da PCR convencional para identificação dos microrganismos aconteceu utilizando um total de 25µL na reação, sendo 2 µL de DNA, 2 µL dos iniciadores e o restante completo com mix. A mix utilizada foi composta por 16,6 µL de água, 2,5 µL de buffer, 1 µL de dNTP's, 0,7 µL de MgCl<sub>2</sub> e 0,2 µL da enzima Taq polimerase.

As condições da PCR convencional utilizadas para reação do microrganismo *Prevotella* sp foram desnaturação por 5 minutos a 95°C, seguida de 1 minuto a 95°C, 35 ciclos a 52°C e 1 minuto a 72°C, finalizando com 10 minutos a 72°C. Para os microrganismos *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp utilizou-se as condições de desnaturação por 5 minutos a 95°C, seguida de 1 minuto a 95°C, 35 ciclos a 55°C e 1 minuto a 72°C, finalizando com 10 minutos a 72°C. Antes da clonagem do produto da PCR convencional foi realizada a corrida em gel de agarose para confirmação do tamanho do

amplicon do material genético dos microrganismos, servindo para certificação de que a amplificação na reação da PCR realmente tratava-se das bactérias de interesse.

Tabela 1 – Sequência dos iniciadores utilizados nos testes de qPCR

<b>Iniciador</b>	<b>Sequência</b>	<b>Referência</b>	<b>Amplicon</b>
<i>Prevotella</i> sp. (F)	GAA GGT CCC CCA CAT TG	CHACAR et al, 2018.	786
<i>Prevotella</i> sp. (R)	GCA CTT AAG CCG ACA CCT	CHACAR et al, 2018.	786
<i>Lactobacillus</i> sp. (F)	GAGGCAGCAGTAGGGAATC TTC	POZUELO et al 2012.	126
<i>Lactobacillus</i> sp. (R)	GGCCAGTTACTACCTCTATC CTTCTTC	POZUELO et al 2012.	126
<i>Bifidobacterium</i> sp. (F)	GGG TGG TAA TGC CGG ATG	CHACAR et al, 2018.	513
<i>Bifidobacterium</i> sp. (R)	CCA CCG TTA CAC CGG GAA	CHACAR et al, 2018.	513

Fonte: própria autora (2020)

Para execução da corrida em gel de agarose, a mesma foi preparada em concentração de 1,5%, dissolvendo-a em solução de TAE e acrescentando corante brometo de etídeo (1µL para 25mL de gel preparado), o qual auxilia na visualização da formação das bandas de DNA. Na corrida de eletroforese, adicionou-se 5 µL de padrão GLB, marcador molecular, no primeiro poço de gel, nos demais poços foi adicionado 8 µL de amostra mais 2 µL de GLB. Após 40 minutos de corrida com potência de 110 W foi possível verificar a formação das bandas, dentro do tamanho esperado de amplicon, confirmando o bom desempenho dos iniciadores.

### 3.6.2.3 Clonagem das Bactérias

O procedimento de clonagem do DNA dos microrganismos de interesse iniciou com o cultivo das células competentes, sendo utilizadas células de *Eschericia coli*. As mesmas foram cultivadas em meio BE por 1 hora em shaker com temperatura de 37°C. Para tornar as

células de *E. coli* competentes e aptas para receberem o DNA dos microrganismos, foram transferidos 1mL de bactéria em 10mL de TSS e acondicionado em meio ao gelo por 10 minutos. Posteriormente as bactérias foram centrifugadas, o meio de cultura foi todo eliminado e 50  $\mu$ L bactérias decantadas foram alícotadas em tubos e acondicionadas em temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para execução da clonagem foi utilizado o kit *TOPO TA Cloning*, o qual auxilia na ligação do produto da PCR convencional no plasmídeo (vetor), que irá transferir o material de genético dos microrganismos desejados para as células competentes, que ficaram armazenadas até a sua utilização. O procedimento de ligação dos insertos no plasmídeo consistiu em reações totais 6  $\mu$ L, as condições utilizadas para *Prevotella* sp e *Bifidobacterium* sp foram 1  $\mu$ L do vetor, 2  $\mu$ L do inserto (produto de PCR convencional), 1  $\mu$ L de buffer e 2  $\mu$ L de água. Para o microrganismo *Lactobacillus* sp a reação contou com 1  $\mu$ L do vetor, 4  $\mu$ L do inserto (produto de PCR convencional) e 1  $\mu$ L de buffer, desconsiderando a utilização de água para possibilitar uma quantidade maior de inserto, devido a formação de bandas mais claras na corrida em gel de agarose.

Os tubos contendo os 6  $\mu$ L da reação de ligação foram completados com 10  $\mu$ L de água e adicionados de 10  $\mu$ L de reagente KCM e 30  $\mu$ L de água, totalizando 50  $\mu$ L que foram inseridos nas bactérias armazenada a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A mistura final foi mantida 20 minutos em gelo e posteriormente 10 minutos em temperatura ambiente. Adicionou-se 500  $\mu$ L de meio Agar LB e os tubos foram agitados em shaker por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Após a agitação no shaker, a mistura de *E. coli* + insertos foi centrifugada desprezando 450  $\mu$ L sobrenadantes. Um total de 150  $\mu$ L foi distribuído em placas previamente preparadas. No preparo das placas foi utilizado 15 mL de Agar LB adicionado de antibiótico ampicilina, para inibir crescimento de bactérias não desejadas. Para crescimento dos insetos as placas foram acondicionadas durante 16 horas em estufa com temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ .

Posterior a incubação, algumas colônias dos insertos foram selecionadas para repique em meio líquido. Este meio consiste em 84 mL de meio BE e 840  $\mu$ L de ampicilina. Ponteiras estéreis foram colocadas em contato com as colônias e imersas neste meio, o qual foi submetido a 16 horas de agitação em shaker com temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ .

A partir do crescimento dos insertos em meio líquido é possível realizar a extração do DNA plasmidial, o qual contém o material genético dos microrganismos desejados. Para esta extração foram utilizadas três soluções distintas:

Solução I: preparada com 4,51 gramas de glicose (50nM) em 100mL de água, adicionada de 12,5 mL de Tris-HCL (1M) - pH 7,5 e 2 mL EDTA (0,5M), completo com água ultrapura estéril até 500 mL. Solução autoclavada para utilização.

Solução II: preparada com 860  $\mu$ L de água ultrapura estéril adicionada de 100  $\mu$ L de SDS 10% e 40  $\mu$ L de NaOH (5M).

Solução III: 147,5g de acetato de potássio, adicionado de 57,5 mL de ácido acético glacial 100% e completo com água ultrapura estéril até 500mL.

Após o preparo das soluções, a extração plasmidial iniciou com a transferência de 1,5mL do cultivo de bactérias para um microtubo estéril, o qual foi centrifugado por 5 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi todo descartado com auxílio de uma ponteira, mantendo apenas o *pellet* no fundo do microtubo. Posteriormente 100  $\mu$ L da solução I foram adicionados neste tubo e o mesmo foi homogeneizado com vórtex, na sequência 200  $\mu$ L da solução II foram adicionados. Após a adição da solução II os microtubos foram acondicionados em caixa de isopor com gelo, a partir de então, trabalhando nesta condição. Na continuidade 150  $\mu$ L da solução III foram adicionados e vortecados para homogeneização. Essa mistura foi centrifugada por 5 minutos a 14000 rpm e o sobrenadante coletado em outro microtubo para adição de 1 mL de etanol 100%. O tubo adicionado de etanol foi centrifugado por 5 minutos a 14000 rpm. A etapa seguinte consistiu na lavagem do DNA extraído com 500  $\mu$ L de etanol 70%. A centrifugação foi repetida e todo etanol sobrenadante retirado com uma ponteira estéril. O *pellet* que ficou no tubo foi DNA plasmidial extraído e o mesmo foi ressuscitado em 49  $\mu$ L de água, juntamente com 1  $\mu$ L de enzima RNase, para evitar presença de RNA no tubo.

Realizada a extração do DNA plasmidial, na sequência realizou-se a clivagem deste DNA, ou seja, a separação do material genético do vetor (plasmídeo). Esta etapa aconteceu com a adição da enzima EcoRI. O produto final da extração refere-se ao DNA dos insertos de interesse. Porém, para certificar-se do bom desempenho da clonagem foi realizada uma corrida em gel de agarose com o produto da clonagem. Desta forma foi possível verificar a formação das bandas, dentro do tamanho de amplicom esperado para os iniciadores dos microrganismos desejados.

### 3.6.2.4 Construção da Curva Padrão das Bactérias

A construção das curvas padrão e a quantificação dos microrganismos selecionados nas amostras de fezes dos animais aconteceram com apoio do laboratório CDSA (Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Sanidade Animal) da Universidade de Passo Fundo (UPF). O DNA extraído a partir da clonagem foi quantificado em equipamento Qubit 2.0 Fluorometer, obtendo os valores apresentados na Tabela 2. Após a quantificação do DNA, uma diluição seriada foi realizada com produto da clonagem, tomando como base a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Valor da quantificação (g/}\mu\text{L)}}{\text{Soma do transcrito (pares de base + vetor (TOPO - 3931) \times 649 \times 6,022 \cdot 10^{23})}} = \text{moléculas de } \frac{\text{DNA}}{\mu\text{L}} \quad (3)$$

O expoente apresentado no resultado deste cálculo indicou quantos tubos foram necessários para a execução da diluição, utilizando 90  $\mu\text{L}$  de água e 10  $\mu\text{L}$  de amostra no primeiro microtubo. Uma diluição de  $10^9$  foi considerada para o microrganismo *Prevotella* sp. e de  $10^{10}$  para *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp. conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Quantificação de DNA plasmidial

Iniciador	Quantificação (moléculas de DNA / $\mu\text{L}$ )	Diluição (moléculas de DNA/ $\mu\text{L}$ )
<i>Prevotella</i> sp.	32,7	$6,43 \times 10^9$
<i>Lactobacillus</i> sp.	49,0	$1,21 \times 10^{10}$
<i>Bifidobacterium</i> sp.	53,0	$1,02 \times 10^{10}$

Fonte: elaborado pela autora (2020)

As corridas de qPCR para construção da curva padrão foram realizadas com os pontos -3 à -10 para *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp. e com os pontos -2 à -10 para *Prevotella* sp., considerando reações com total de 20  $\mu\text{L}$ . Cada tubo foi preparado com 10  $\mu\text{L}$  de PowerUp SYBR Green Master Mix (*Thermo Fischer Scientific*), 0,5  $\mu\text{L}$  de cada iniciador para cada bactéria, 1,5  $\mu\text{L}$  de DNA da diluição e 7,5  $\mu\text{L}$  de água livre de DNase e RNase. As condições da corrida e equipamento podem ser visualizadas na descrição do item 3.6.2.5 e as curvas padrões no apêndice D.

### 3.6.2.5 Quantificação do Material Genético dos Microrganismos pela Técnica de qPCR

A execução das análises de qPCR foram realizadas em equipamento *QuantStudio™ 3 Real-Time PCR Systems*. O volume total da reação da qPCR foi de 10  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{L}$  de PowerUp SYBR Green Master Mix (*Thermo Fischer Scientific*), 0,5  $\mu\text{L}$  de cada iniciador para cada bactéria, 1  $\mu\text{L}$  de amostra e 3  $\mu\text{L}$  de água livre de DNase e RNase.

As condições para qPCR utilizadas para reação de todos os microrganismos foi desnaturação por 2 minutos a 50°C, seguidos de 2 minutos a 90°C e 15 segundos a 95°C. Na sequência, anelamento durante 1 minuto a 60°C e Curva *Melting* (95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e finalizando com 15 segundos a 95°C), considerando 40 ciclos para execução da corrida.

## 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi determinada com programa Statistic, utilizando ANOVA e aplicação do teste de Tukey. O valor de (p) inferior a 0,05 foi considerado como uma diferença significativa.

## 5 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Passo Fundo (UPF) sob registro 025/2018.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 TRATAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA

A matéria-prima utilizada consistiu em amostragens de folhas da erva-mate *in natura*, as mesmas foram submetidas aos processos de branqueamento, secagem e armazenamento. Uma das dificuldades da utilização das folhas *in natura* é a ação das enzimas peroxidase (PODs) e polifenoloxidas e óxido redutases (PPOs), que são as principais enzimas do mate e são responsáveis por mudanças indesejáveis, percebidas principalmente na coloração da erva-mate. As PODs e PPOs catalisam a oxidação de monofenóis em difenóis removendo hidrogênio de suas ramificações e originando as quinonas, as quais polimerizam e produzem melaninas, reduzindo a concentração dos compostos fenólicos (NABECHIMA, G. H. et al., 2014). Neste sentido, constitui-se importante a adoção de um método de inativação das mesmas.

Em investigações preliminares do nosso grupo de pesquisa, verificamos o benefício do branqueamento, em que a concentração dos compostos fenólicos foi três vezes maior na folha branqueada (402,63 mgEAG/g) em relação a folha sem tratamento (124,73 mgEAG/g). O branqueamento é conhecido por inativar estas enzimas com temperaturas em torno de 85°C (NEVES; VIEIRA; SILVA, 2012), neste estudo utilizou-se temperatura de 95°C, garantindo a eficiência do procedimento e a manutenção dos padrões de qualidade como concentração de compostos fenólicos e potencial antioxidante (conforme item 6.2), durante o armazenamento da matéria-prima.

### 6.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO LIOFILIZADO

A condição de extração de compostos fenólicos utilizada foi  $90 \pm 2$  °C por 5 minutos. Gao e colaboradores (2013) utilizaram metodologia similar no preparo de extrato, realizando uma infusão com água de acordo com método usual para consumo humano, uma importante característica visto que o estudo de interesse trata-se de modelos *in vivo*. Diferentes solventes como metanol, etanol, acetona podem ser utilizadas para a extração máxima de constituintes ativos, porém o uso de solventes orgânicos torna as aplicações subsequentes desses extratos limitadas para adição em alimentos, experimentos em humanos ou animais devido aos seus resíduos tóxicos (MURAKAMI et al., 2011).

Os extratos produzidos por Gao e colaboradores (2013) utilizaram uma infusão por 20 minutos em temperatura de 80 °C, Rocha et al., (2018) utilizaram a mesma temperatura, porém com tempo de infusão de 15 minutos. Neste contexto, investigações anteriores realizados no laboratório de Bioprocessos da Universidade de Passo Fundo concluíram que extratos preparados com temperaturas mais elevadas aumentam a eficiência de extração até um ponto ótimo, chegando à condição utilizada neste estudo, pois altas temperaturas de extração causam aumento da pressão celular resultando em ruptura dos tecidos e favorecendo o procedimento. No entanto, temperaturas altas aliadas ao longo tempo de exposição podem degradar alguns compostos. A temperatura utilizada varia de acordo com a proporção sólido/solvente e com o tipo de composto que se deseja extrair (SILVA; ROGEZ; LARINDELLE, 2007).

O extrato de erva-mate obtido após a extração foi liofilizado e caracterizado através da quantificação dos seus compostos fenólicos totais e perfil antioxidante, os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Caracterização do extrato de erva-mate liofilizado

<b>Ensaio</b>	<b>Extrato liofilizado</b>
Fenólicos Totais (mg EAG/mL)	10,17±0,22
ABTS (µmol Trolox/mL)	52,96±0,86
FRAP (µmol Trolox/mL)	64,53±0,26

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Fonte: elaborado pela autora (2019).

Os resultados encontrados para compostos fenólicos totais (10,17 mgEAG/mL) são mais elevados do que os obtidos por estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa em folhas de erva-mate *in natura*, secas sob as mesmas condições, onde a quantificação foi em média 8 mgEAG/mL. Estima-se que o tratamento da matéria-prima com o diferencial de branqueamento tenha facilitado esta condição.

A comunidade científica infere o benefício dos polifenóis para a saúde, indicando a importância de boas quantificações destes compostos e sua atividade antioxidante. A modulação da microbiota intestinal é um exemplo destes benefícios, no entanto, os efeitos das interações específicas entre os polifenóis e os microrganismos do intestino permanecem amplamente não caracterizados (LAPARRA; SANZ, 2010).

As concentrações de compostos fenólicos mostram uma correlação com sua capacidade antioxidante total (HECK; MEJIA, 2007), nos ensaios realizados a quantificação

de compostos fenólicos totais de 10,17 mgEAG/mL de amostra foi equivalente a quantificações de atividade antioxidante de 52,96  $\mu\text{mol Trolox/mL}$  para ABTS e 64,53  $\mu\text{mol Trolox/mL}$  para ensaios de FRAP, realizados no extrato de erva-mate liofilizado. Relatos científicos demonstram que a capacidade antioxidante avaliadas *in vitro* através de ensaios FRAP e ABTS de extratos de erva-mate são comparáveis a resultados obtidos de vinho tinto ou chá (JUARISTI et al., 2018), e estes favorecem o aumento das contagens de gêneros bacterianos benéficos do intestino como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (LAPARRA; SANZ, 2010).

A caracterização da atividade antioxidante foi realizada utilizando dois diferentes métodos. Tan e Lim (2015) mencionam a utilização de mais de uma metodologia para avaliação antioxidante como a chave para confiabilidade na eficácia de resultados. A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) e a AOAC Internacional afirmam que os resultados entre diferentes métodos são dificilmente comparados, pois cada um deles é baseado em um diferente mecanismo, levando em consideração o solvente e matriz de amostras.

Além da quantificação dos seus compostos fenólicos totais e perfil antioxidante o extrato de erva-mate liofilizado também foi avaliado em relação à presença de compostos bioativos. Padrões de cafeína, ácido 5-cafeoilquínico, teobromina, isômeros de ácido clorogênico e rutina foram injetados para análise. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Identificação de compostos bioativos do extrato de erva-mate

<b>Composto</b>	<b>Quantificação (g/100g) do extrato liofilizado de erva-mate</b>	<b>nm</b>
Teobromina	0.67 $\pm$ 0.06	280
Cafeína	2.76 $\pm$ 0.19	280
Ácido 5-cafeoilquínico	2.58 $\pm$ 0.01	320
Isômeros de Ácido Clorogênico	14.22 $\pm$ 0.39	320
Rutina	2.31 $\pm$ 0.15	360

Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Fonte: elaborado pela autora (2019).

Compostos fitoquímicos ativos podem ser identificados na erva-mate, dentre tantos, os compostos com presença mais significativa nesta planta são os polifenóis (ácido clorogênico) e xantinas (cafeína e teobromina), seguido pelos alcalóides (ácido cafeico,

ácido 3,4-dicaffeoylquinic, ácido 3,5-dicaffeoylquinic), flavonóides (quercetina, kaempferol e rutina), (HECK; MEJIA, 2007).

Os autores Tan e Lim (2015) explicam que a técnica de HPLC apresenta limitações em matrizes complexas, como extratos brutos de plantas, tornando importante a purificação da amostra, removendo qualquer componente que prejudique a identificação das substâncias de interesse.

Estudos científicos vem sugerindo a relação do metabolismo de compostos após a sua ingestão, à formação de metabólitos bioativos e produtos catabólicos, seguido pela interação com a microbiota intestinal e seus benefícios diretos e indiretos neste contexto (GOWD et al., 2018; JUARISTI et al., 2018). Martin-Pelaez e colaboradores (2017) avaliaram em seus estudos realizados com cacau, que a xantina mais abundante encontrada nesta matriz é a teobromina, seguida pela cafeína, investigações utilizando uma dieta com 10% de cacau em roedores modificou a composição da microbiota intestinal dos mesmos, diminuindo a proporção de *Staphylococcus* sp. e *Clostridium histolyticu*, além de alterar a produção de ácidos graxos de cadeia curta.

Os compostos observados em maior quantidade na caracterização do extrato de erva-mate foram o ácido clorogênico com 14,22 gramas, seguido da cafeína com 2,76 gramas e ácido 5-cafeoilquinico com 2,58 gramas. Estudos realizados por Bhandarkar; Brown e Panchal (2019) demonstram ações benéficas relacionadas ao ácido clorogênico, em dietas hiperlipídicas, o mesmo atenuou alterações cardiovasculares, hepáticas e metabólicas, sugerindo o potencial deste bioativo. Outras investigações utilizando café evidenciaram o aumento da produção de ácidos graxos de cadeia curta devido ao efeito de ácido cafeico e ácido clorogênico, essa constatação aconteceu em função da ação de metabolização realizada pela microbiota intestinal (COWAN et al., 2014).

Os ácidos graxos de cadeia curta são os principais produtos finais da fermentação microbiana no intestino, acetato e lactato são relacionados com a fermentação realizada pelo gênero de *Bifidobacterium*, considerado benéfico à saúde humana. Pérez-Burillo e colaboradores (2020) evidenciaram essa relação a partir da ingestão de café e correlacionaram a mesma com a presença de ácidos fenólicos, dentre eles, o ácido clorogênico.

Investigações realizadas por Ma e Chen (2020) declaram que suplementação com polifenóis estimula a abundância bactérias intestinais promotoras de saúde, como os gêneros

de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em paralelo a inibição do gênero patogênico *Clostridium* na microbiota intestinal de seres humanos.

Compostos fitoquímicos e seus produtos metabólicos, dentre eles, todos os identificados na caracterização do extrato de erva-mate, exercem efeitos similares aos prebióticos, promovendo desta forma a modulação do microbioma intestinal (LAPARRA; SANZ, 2010), demonstrando o potencial desta planta para seletividade dos microrganismos intestinais.

O extrato de erva-mate liofilizado também foi avaliado em relação ao seu comportamento frente a diferentes condições de pH, simulando as condições do trato gastrointestinal, conforme os resultados apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Avaliação do extrato de erva-mate liofilizado em diferentes pHs

<b>Condição de pH da amostra</b>	<b>mg EAG/mL</b>
2,0± 1,0	9,43±0,55 <sup>a</sup>
5,5± 1,0	11,62±0,23 <sup>b</sup>
7,5± 1,0	11,21±0,10 <sup>b</sup>

Os resultados expressam a média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo Teste Tukey ( $P > 0,05$ ). Fonte: elaborado pela autora (2019).

O extrato liofilizado de erva-mate demonstrou uma redução do teor de compostos fenólicos quando submetidos a pH mais baixo, simulando pH estomacal. Faria, Marques e Mercadante (2011) obtiveram resultados semelhantes constatando que a capacidade antioxidante, avaliada pelo radical ABTS, em extrato funcional de jambolão variou de acordo com os valores de pH, com tendência a aumento da atividade em valores de pH mais elevados.

Chen e colaboradores (2017) observaram este mesmo comportamento com folhas de batata, correlacionando a estabilidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante com pH e interações enzimáticas ocorridas durante a digestão gastrointestinal. Os estudos mencionados também encontram resultados similares para pHs de transição e básicos. No caso da *Ilex paraguariensis*, estima-se que o resultado encontrado em pH 5,5 (11,62 mgEAG/mL) tenha sido propiciado por estar próximo ao pH do extrato in natura, obtendo desta forma uma boa quantificação de fenólicos.

Estes resultados demonstram que os compostos presentes em extratos de plantas são sensíveis a mudanças de pH, alterando a sua capacidade de ação de acordo com a condição a que são submetidos, estas características limitam a aplicação destes extratos em alimentos,

pois além do trânsito gastrointestinal, existem condições de preparo e processamento dos mesmos. Neste sentido a proteção de bioativos por técnicas de encapsulação são necessárias (WANG et al., 2016).

### 6.3 AVALIAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS DO EXTRATO LIOFILIZADO

As microcápsulas de erva-mate foram produzidas utilizando a técnica de gelificação iônica. A gelificação iônica é uma técnica de encapsulação simples (BENAVIDES et al. 2016), apresentando vantagens de não empregar altas temperaturas, agitação vigorosa ou solventes orgânicos (MOURA et al. 2018). O alginato de sódio é uma boa opção de encapsulante uma vez que possui capacidade em gelificar sob condições brandas (LOPES et al., 2016) e boa capacidade de reticulação em cloreto de cálcio, além de possuir característica de muco-adesividade, importante para adesão no intestino (AGUERO et al., 2017).

As condições de trabalho utilizadas para execução das cápsulas foram 1,5% de alginato de sódio e 1,5% de cloreto de cálcio, estes parâmetros de trabalho demonstraram a melhor eficiência de encapsulação, conforme expresso na Tabela 6.

Tabela 6 - Condições preliminares de encapsulação do extrato de erva-mate

<b>Alginato de Sódio (%)</b>	<b>Cloreto de cálcio (%)</b>	<b>Eficiência de encapsulação%</b>
1,5	1,5	55,97±0,08 <sup>b</sup>
2,0	1,5	39,72±0,01 <sup>a</sup>
2,0	2,0	39,72±0,02 <sup>a</sup>

Os resultados expressam a média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo Teste Tukey ( $p > 0,05$ ). Fonte: elaborado pela autora (2019).

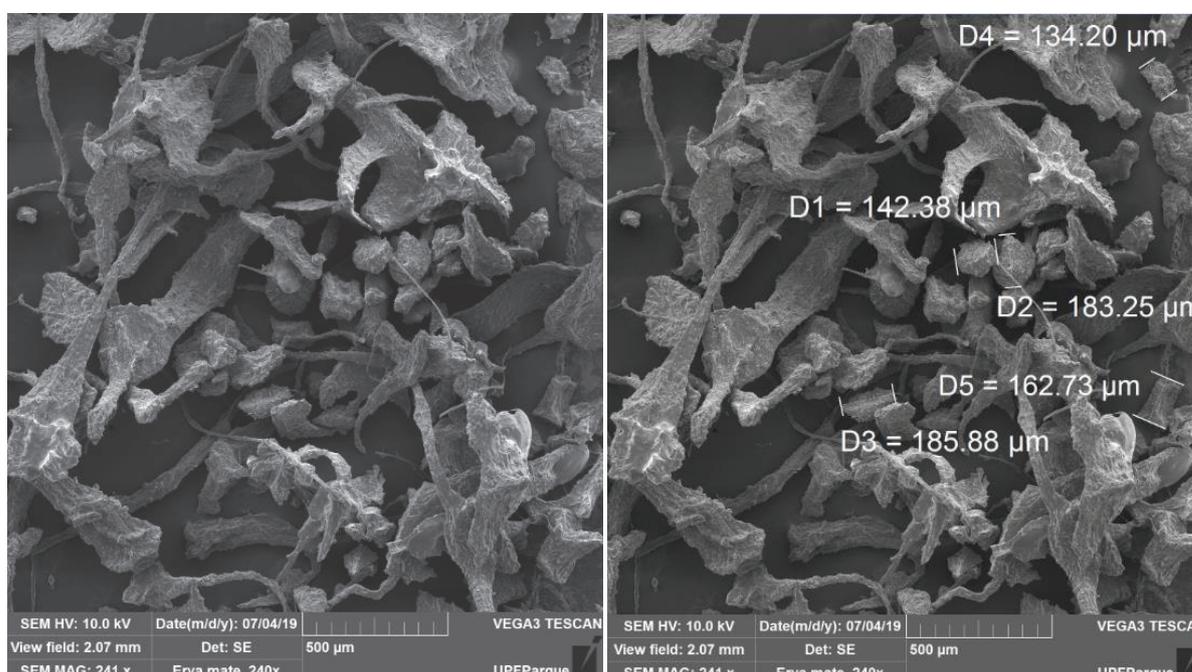
Singh, Kaur e Kumar (2018) obtiveram resultados semelhantes, com eficiência máxima de encapsulação de 55% para antioxidante ( $\alpha$ -tocoferol - vitamina E), utilizando 1,5% de alginato de sódio. Bajpai e Sharma (2004) relatam o aumento da concentração de alginato interferindo na degradação da cápsula, retardando este processo. Além disso, tornando a troca iônica mais lenta, o que pode prejudicar a encapsulação. Os mesmos autores mencionam que deve haver uma quantidade mínima ideal deste constituinte para formação da microcápsula.

O principal objetivo deste estudo é conseguir reter o máximo de compostos bioativos dentro das cápsulas, neste sentido o emprego do extrato concentrado (liofilizado) e maior

quantidade de núcleo em relação à quantidade de material de parede. Por se tratar de uma investigação *in vivo* é preferível manter esta condição, fator que corrobora para que a eficiência de encapsulação não seja mais representativa. Desta forma, a eficiência das cápsulas utilizadas no protocolo *in vivo* foi de 46,5%, contendo 59,11 mg compostos fenólicos/g de cápsula.

As cápsulas produzidas foram avaliadas em relação a sua morfologia, esta análise pode ser observada na Figura 6, expressa com aumento de 240x.

Figura 6 - Avaliação morfológica das cápsulas



Caracterização morfologia e estrutural das microcápsulas de erva-mate através da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV. Fonte: própria autora (2019)

É possível verificar o formato irregular das cápsulas, as mesmas não apresentam formato esférico e variam seu tamanho entre de 134,20 µm até 185,88 µm.

O autor Cujic e colaboradores (2016) sugerem que o processo de liofilização das cápsulas induz a destruição das suas paredes tornando-as menos arredondadas, afirmando que a desidratação que ocorre durante a secagem perturba a integridade estrutural do das microesferas. Os mesmos autores afirmam também que os poros visualizados através da metodologia de microscopia eletrônica de varredura se devem a evaporação da água neste procedimento.

López-Cordoba et al (2014) verificaram em cápsulas de erva-mate produzidas a partir da técnica de gelificação iônica que a quantidade de bioativos encapsulados não sofreu alteração no processo de liofilização, porém o formato das cápsulas de alginato ficou irregular após a secagem das mesmas. Neste sentido, entendemos que apesar de irregulares as cápsulas foram capazes de manter seu objetivo, protegendo os compostos encapsulados.

A solubilidade das cápsulas foi avaliada submetendo as mesmas a imersão em solução aquosa e agitação por 90 minutos, o resultado apresentado foi uma média de solubilidade de  $38,70 \pm 2,84\%$ . A baixa solubilidade em água era uma característica desejada, uma vez que as microcápsulas precisaram ser ressuspensas para suplementação *in vivo*. Porém, López-Cordoba et al (2014) relatam a solubilidade do alginato de sódio na presença de água, corroborando para que as cápsulas que possuam este hidrogel como material de parede também apresentem esta característica, a qual pode interferir no desempenho das estruturas.

Ensaio de avaliação de performance das microcápsulas em diferentes condições de pH também foram realizados, os resultados estão representados na Tabela 7.

Tabela 7 – Avaliação das cápsulas erva-mate em diferentes condições de pH

<b>Condição de pH da amostra</b>	<b>Tempo (1 hora) μmol ETrolox/mL</b>	<b>Tempo (2 horas) μmol ETrolox/mL</b>
2,0±1,0	10,77±2,91 <sup>a</sup>	11,36±1,75 <sup>a</sup>
7,5±1,0	6,67±0,58 <sup>a</sup>	9,13±2,04 <sup>a</sup>

Os resultados expressam a média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo Teste Tukey ( $p > 0,05$ ). Fonte: elaborado pela autora (2019).

A utilização do alginato de sódio é desejável quando o objetivo é uma cápsula com liberação controlada no trato digestório, sua insolubilidade em pHs ácidos faz com que a cápsula se mantenha íntegra nestas condições (AGUERO et al., 2017). Em pHs mais elevados espera-se que ocorra o intumescimento da cápsula e por fim o seu rompimento, liberando os compostos bioativos (LOPES et al., 2016). Neste caso, estima-se uma quantificação maior de atividade antioxidante em pH básico, porém, não foi observado nos ensaios realizados, resultados com diferença estatística, entre as quantificações em pH 7,5 e pH 2,0.

López-Cordoba e colaboradores (2014) mencionam que as altas taxas de difusão de materiais ativos através da matriz macroporosa de alginato limitam sua aplicação como sistemas de liberação controlada, induzindo uma liberação antecipada dos bioativos.

Levando em consideração que as microcápsulas foram produzidas em uma proporção de 1 parte de parede para 5 partes de núcleo, essa afirmação auxilia no entendimento do desempenho das cápsulas independente da condição de pH.

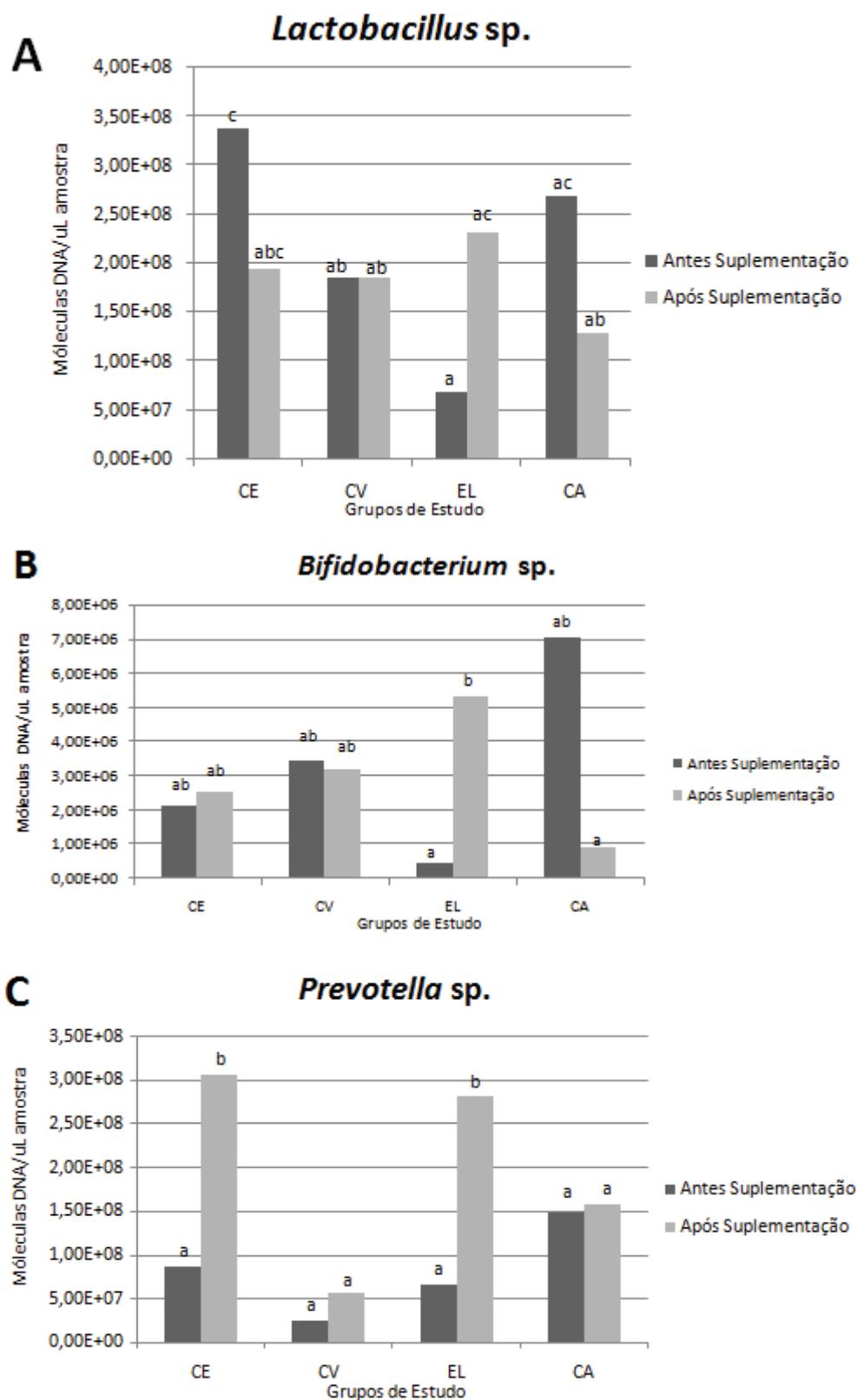
Os resultados apresentados na tabela 7 podem estar relacionados ao índice de solubilidade das microcápsulas, resultados acima de 35% foram verificados em agitação durante 90 minutos. Para análises de pH, as microcápsulas foram ressuspensas em água e permaneceram sob agitação por 2 horas, o que indica que as mesmas podem ter sido solubilizadas, desta forma a liberação de seus compostos iniciou ainda durante a primeira hora de ensaio, não apresentando diferença significativa para quantificação realizada em duas horas de simulação das condições de pH.

#### **6.4 AVALIAÇÃO DA AÇÃO MODULADORA DE EXTRATO DE ERVA-MATE LIVRE E MICROENCAPSULADO NA MICROBIOTA INTESTINAL**

Para avaliar a capacidade de modulação da microbiota intestinal através da ingestão de extrato de erva-mate livre e microencapsulado foi realizada uma suplementação *in vivo* com ratos Wistar por 45 dias. Amostras de fezes individuais dos animais foram analisadas antes e depois da suplementação através da técnica de qPCR para monitoramento dos microrganismos *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp. e *Prevotella* sp.

Os resultados obtidos em termos de quantificação de material genético para o gênero *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Prevotella* podem ser observados através da Figura 7.

Figura 7 - Avaliação da quantificação do material genético de *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp. e *Prevotella* sp. em relação aos diferentes grupos de estudo



CE: grupo de animais que recebeu suplementação de cápsula com extrato de erva-mate. CV: grupo de animais que recebeu suplementação de cápsulas vazias. EL: grupo de animais que recebeu suplementação de extrato

livre. CA: grupo de animais que recebeu suplementação com água, grupo controle. Os grupos de estudo (n=10) foram suplementados desde o dia 0 até o dia 45 (1x ao dia) com dose efeito de 3,29mg de compostos/animal. Fonte: própria autora (2020)

Os valores estão expressos em forma de exponencial, obtidos através da média de avaliação dos animais de cada tratamento (n=10). Foi possível perceber o desempenho do extrato de erva-mate na modulação do microbioma intestinal para os microrganismos mencionados. Estes dados corroboram com as investigações existentes na literatura, citadas ao longo desta discussão, sobre a ação de compostos bioativos de diferentes matrizes alimentares na modulação intestinal, inserindo a *Ilex paraguariensis* neste contexto e comprovando a efetividade da dose equivalente a 3,29 mg de compostos fenólicos/animal/dia utilizados ao longo deste estudo.

Os animais inseridos no grupo de estudo que recebeu suplementação com extrato livre de erva-mate obtiveram desempenho considerável no aumento de *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp. e *Prevotella* sp.. Uma elevação na quantidade de moléculas de DNA/ $\mu$ L de amostra pode ser verificada ao final do estudo em comparação as avaliações realizadas antes do início da ingestão da *Ilex paraguariensis*. Na avaliação para o gênero *Bifidobacterium* sp. uma quantidade de  $4,40 \times 10^5$  moléculas de DNA/ $\mu$ L de amostra foi observado antes do consumo de extrato de erva-mate, após 45 dias, este número foi elevado a  $5,33 \times 10^6$  moléculas de DNA/ $\mu$ L de amostra, demonstrando uma diferença significativa na modulação deste microrganismo. Também foi possível verificar diferença significativa nas respostas encontradas para *Prevotella* sp. onde a quantidade de moléculas de DNA/ $\mu$ L aumentou de  $6,58 \times 10^7$  para  $2,83 \times 10^8$ . Com relação ao gênero *Lactobacillus* sp. o aumento na quantificação das moléculas de DNA/ $\mu$ L de amostra foi observado, apesar de não significativo, verificou-se uma elevação de  $6,73 \times 10^7$  para  $2,31 \times 10^8$ .

Algumas avaliações *in vitro* contidas na literatura indicam a boa performance dos compostos bioativos sobre a microbiota intestinal, Owolabi e colaboradores (2020) testaram a ação de amido não digerível e metabólitos fenólicos de arroz roxo no microbioma, concluindo que ambos estão correlacionados ao aumento das quantidades de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. São encontrados também estudos *in vivo* relatando o comportamento de compostos fenólicos na microbiota intestinal, Li e outros (2020), após induzir uma dieta hiperlipídicas em cães entenderam que os filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, os mais abundantes no intestino, estão envolvidos na relação de simbiose ou disbiose intestinal, caracterizando obesidade e doenças crônica, todavia, efeito contrário foi

observado nos animais que receberam juntamente na sua dieta compostos fenólicos provenientes de chá verde.

A característica probiótica dos polifenóis é bastante consolidada na comunidade científica, indicando modulação principalmente nos gêneros de bactérias benéficas, como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (QUATRIN et al., 2020), ambos avaliados positivamente no estudo com erva-mate.

São inexistentes na literatura trabalhos que incluam a *Ilex paraguariensis* como moduladora intestinal, os relatos encontrados contemplam matrizes que possuem compostos em sinergia com a erva-mate, como por exemplo, chá verde, citado anteriormente. Zhu e colaboradores estudaram as ações do chá verde na microbiota de roedores, confirmando as descrições já existentes, indicando aumentos da cepa de *Lactobacillus reuteri* em consonância a redução da família Clostridiaceae, utilizando em seu estudo dose de 6,7 mg de compostos fenólicos/animal/dia durante 140 dias. Nossas investigações com erva-mate totalizaram 45 dias com dose de compostos fenólicos inferiores, o que nos indica o potencial desta planta, propondo que pode haver melhores resultados se suplementada em maior quantidade durante mais tempo de estudo, expandindo as investigações para outros microrganismos, promotores de disbiose, por exemplo.

É possível encontrar relatos disponíveis na comunidade científica, de autores que indicam menor performance nas investigações para modulação do gênero *Prevotella*. Larsen et al (2019) mencionam que apesar de positiva, uma menor abundância foi encontrada com relação a este microrganismo após a ingestão de fibras de batata, quando comparado a *Bifidobacterium*, por exemplo. Atribuições semelhantes foram relatadas por Li e colaboradores (2020), em seu estudo com a utilização de chá verde, não caracterizando diferença significativa em alguns gêneros, dentre eles, *Prevotella* sp.

Na figura 7 podemos perceber o resultado alcançado após a suplementação com *Ilex paraguariensis* para o microrganismo *Prevotella* sp., a abundância encontrada é relativamente superior nos animais que receberam extrato de erva-mate livre e microencapsulado em relação aos grupos controle. A quantificação máxima detectada nos grupos controle foi de  $1,58 \times 10^8$  moléculas de DNA/ $\mu$ L de amostra, com relação à quantificação encontrada nos grupos suplementados com extrato de erva-mate, os valores encontrados foram de  $2,83 \times 10^8$  e  $3,06 \times 10^8$  moléculas de DNA/ $\mu$ L de amostra, para extrato livre e microencapsulado, respectivamente. Essa resposta é estatisticamente significativa e indica o bom desempenho da erva-mate na modulação intestinal deste gênero.

Na avaliação dos grupos controle após os 45 dias de estudo, para os microrganismos *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp. as maiores quantificações são  $1,84 \times 10^8$  e  $3,19 \times 10^6$  de moléculas de DNA/ $\mu\text{L}$  de amostra, respectivamente. Esses resultados são inferiores, quando comparados aos animais suplementados com *Ilex paraguariensis* ( $2,31 \times 10^8$  e  $5,33 \times 10^6$ , respectivamente), embora essa resposta não se apresente forma significativa, indica que a quantificação foi maior para os animais que receberam erva-mate. Ao observar estes mesmos grupos, antes e após o tempo de tratamento, a característica é a manutenção da população existente no intestino ou uma redução na abundância dos microrganismos avaliados, mesmo que esta redução não seja estatisticamente significativa. A hipótese que explica este comportamento é indução de estresse nos animais durante todo o período de estudo. Levando em consideração que todos os indivíduos foram submetidos as mesmas condições e os grupos controle não tiveram como apoio em sua dieta compostos capazes de promover simbiose, neste sentido, sob estresse, resultaram na disbiose observada.

Neste contexto, Shi e colaboradores (2019) verificaram em suas investigações com aves, que os animais submetidos a estresse, os quais continham elevações na quantidade do hormônio cortisol em seus organismos, apresentaram alterações significativas na composição da microbiota intestinal, como aumento do filo Firmicutes e reduções do filo Bacterioidetes, caracterizando uma situação de disbiose intestinal. Ainda sobre a influência do estresse na população microbiana, Audet (2019) faz uma abordagem bastante interessante sobre a propensão da ocorrência da disbiose em mulheres quando comparadas aos homens, devido às flutuações hormonais e estresse a que são submetidas biologicamente ao longo da vida. Audet relata que o estresse ocasionado pelos hormônios femininos é capaz de impulsionar crescimento e redução de cepas específicas na microbiota intestinal das mulheres, tendo fortes implicações na modulação do seu microbioma.

Os animais suplementados com microcápsulas de erva-mate não apresentaram diferença estatística na modulação intestinal em comparação ao seu extrato livre. Os resultados encontrados para o gênero *Lactobacillus* foram  $1,92 \times 10^8$  para extrato microencapsulado e  $2,31 \times 10^8$  para extrato livre, para *Bifidobacterium* as quantificações foram  $2,52 \times 10^8$  no grupo que recebeu cápsulas de erva-mate e  $5,33 \times 10^8$  no grupo que foi suplementado com extrato livre, a resposta verificada para o gênero *Prevotella* foi  $3,06 \times 10^8$  para cápsulas em consonância a  $2,83 \times 10^8$  para extrato livre. As avaliações prévias de caracterização das microcápsulas indicavam uma estrutura irregular, porosa, consideravelmente solúvel em água e com índice de eficiência de encapsulação abaixo de

50%. Além das considerações estruturais das cápsulas, a dose efeito suplementada aos animais foi fixada em 3,29 mg de compostos fenólicos/animal/dia. Porém, parte das microcápsulas se perdia no processo de suplementação, decantadas no tubo ou na própria agulha utilizada na gavagem intragástrica. Considerando que houve uma perda de substâncias bioativas, isso que pode explicar a performance dos grupos que receberam extrato microencapsulado quando comparados com os animais que receberam extrato livre.

Embora as microcápsulas de erva-mate não tenham apresentado melhores resultados que o seu extrato livre, o objetivo principal deste trabalho foi alcançado, pois, foi observado que a *Ilex paraguariensis* teve efeito modulador sobre a microbiota intestinal de ratos, confirmando a hipótese de que seus compostos fenólicos possuem ação seletiva sobre os microrganismos presentes no intestino.

## 7 CONCLUSÕES

A quantificação de compostos fenólicos no extrato de erva-mate evidencia o potencial antioxidante desta matéria-prima.

A técnica de gelificação iônica para obtenção de microcápsulas de extrato de erva-mate, nas condições estudadas, apresentaram resultados estatisticamente semelhantes ( $p > 0,05$ ) ao extrato livre. Diante disso, sugere-se a utilização de extrato livre em detrimento do encapsulado.

O extrato de *Ilex paraguariensis* tem efeito na modulação da microbiota intestinal de ratos para os microrganismos estudados, *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp., e *Prevotella* sp. quando avaliados antes e após a ingestão do extrato de erva-mate.

A simbiose da microbiota intestinal promovida pelos microrganismos *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp., e *Prevotella* sp. evidenciam mais um benefício da utilização da *Ilex paraguariensis* na dieta. Os resultados obtidos foram em modelo roedor, o que não descaracteriza a possibilidade deste comportamento ser estendido para o modelo humano.

## 8 REFERÊNCIAS

AGUERO, L. et al. Alginate microparticles as oral colon drug delivery device: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 168, p. 32-43, 2017.

AKDENIZ, B.; SUMNU, G.; SAHIN, S. Microencapsulation of phenolic compounds extracted from onion. **Journal Food Process Preservation**, v.42, p.01-08, 2018.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos: teoria e prática**. 5.ed. Viçosa, Minas Gerais: Ed. UFV, 2011.

ARNOUS, A.; MAKRIS, D.; KEFALAS, P. 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.

AUDET, M. Stress-induced disturbances along the gut microbiota-immune-brain axis and implications for mental health: Does sex matter? *Frontiers in Neuroendocrinology*, v.54, p. 01-15, 2019.

AURA, A. M. Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. **Phytochem**, v. 7, p. 407-429, 2008.

BAJPAI, S. K.; SHARMA, S. Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca<sup>2+</sup> and Ba<sup>2+</sup> ions. **Reactive & Functional Polymers**, v. 59, p.129–140, 2004.

BARROSO, M. V. Mate tea reduces high fat diet-induced liver and metabolic disorders in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1547–1555, 2019.

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.

BHANDARKAR, N. S.; BROWN, L.; PANCHAL, S. K. Chlorogenic acid attenuates high-carbohydrate, high-fat diet-induced cardiovascular, liver, and metabolic changes in rats. **Nutricion Research**, v. 62, p. 78-88, 2019.

BRACESCO, N. et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 378–384, 2011.

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

BOAVENTURA, B. C. B. et al. Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. **Nutrition**, v. 28, p. 657–664, 2012.

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

BROWN, K. et al. Diet-Induced Dysbiosis of the Intestinal Microbiota and the Effects on Immunity and Disease. **Nutrients**, v.4, p. 1095-1119, 2012.

CANI, P. D.; JORDAN, B. F. Gut microbiota- mediated inflammation in obesity: a link with gastrointestinal cancer. **Nature**, v. 25, p1-12, 2018.

CANO-CHAUCA, M.; STRINGHETA, P. C.; RAMOS, A. M.; CAL-VIDAL, J. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Oxford, v. 5, n. 4, p. 420-428, 2005.

CANTAREL, B. L.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. Complex carbohydrate utilization by the healthy human microbiome. **PLOS One**, v.7, p.28742, 2012.

CASANOVA, F.; ESTEVINHO, N.; SANTOS, L. Preliminary studies of rosmarinic acid microencapsulation with chitosan and modified chitosan for topical delivery. **Powder Technology**, v. 297, p. 44–49, 2016.

CAHUÊ, F. et al. *Ilex paraguariensis*, exercise and cardioprotection: A retrospective analysis. **Journal of Functional Foods**, v. 53, p.105–108, 2019

CHACAR, S. et al. Identification of Phenolic Compounds-Rich Grape Pomace Extracts Urine Metabolites and Correlation with Gut Microbiota Modulation, **Antioxidants**, v. 7, p 75-81, 2018.

CHACAR, S. et al. The Impact of Long-Term Intake of Phenolic Compounds-Rich Grape Pomace on Rat Gut Microbiota. **Journal of Food Scienci**, v.83, n.1, p. 246-251, 2018.

CHARBONNEAU, M. R. et al. Sialylated milk oligosaccharides promote microbiota-dependent growth in models of infant undernutrition. *Cell*, v.164, p. 859–871, 2016

CHEN, H.; SANG, S. Biotransformation of Tea Polyphenols by Gut Microbiota. **Journal of Functional Foods**, v.7, p.26-42, 2014.

CHEN, Y. et al. Influence of in vitro gastrointestinal digestion on the bioavailability and antioxidant activity of polyphenols from *Ipomoea batatas* leaves. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 52, n. 5, p. 1131–1137, 2017.

CLIFFORD, M. N. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. **Planta Med**, v. 70, n. 12, p. 1103-1114, 2004.

- CODELLAA, R.; LUZI, L.; TERRUZZI, I. Exercise has the guts: How physical activity may positively modulate gut microbiota in chronic and immune-based diseases. **Digestive and Liver Disease**, v. 50, p.331–34, 2018.
- CORREIA, R. T.; MCCUE, P.; MAGALHÃES, M. M.; MACÊDO, G.; SHETTY, K. Production of phenolic antioxidants by the solid-state bioconversion of pineapple was temixed with soy flour using *Rhizopus Oligosporus*. **Process. Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 2167-2172, 2004.
- COTILLARD, A. et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. **Nature**, v. 500, p 585-588, 2013.
- COWAN, T. E. et al. Chronic coffee consumption in the diet-induced obese rat: impact on gut microbiota and serum metabolomics. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25. p. 489–495, 2014.
- CRYAN, J. F.; DINAN, T. G.; Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behavior. **Nature**, v.13, p.701-712, 2012.
- CUJIC, N. et al. Chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) extract loaded in alginate and inulin system. **Industrial Crops and Products**, v. 86, p. 120–131, 2016.
- DANNESKIOLD- SAMSOEA, N. B., et al. Interplay between food and gut microbiota in health and disease. **Food Research International**, v.115, p. 23–31, 2019.
- DEPRISCO, A.; MAURIELLO, G. Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 27–39, 2016.
- DEPYPERE, F.E.A. Food powder microencapsulation: principles, problems and opportunities. *Applied Biotechnology*, **Food Science and Policy**, v.1, n. 2, p. 75-94, 2003.
- DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, 2005.
- Editorial Antioxidant methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 64, p. 145–146, 2017.
- FARIA, A. F.; MARQUES, M. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygiumcumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry**, v. 126, p.1571–1578, 2011.
- 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.
- FILLIPPO, C. et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proc. Natl Acad. Sci**, v.107, p. 14691–14696, 2010.

FISCHBACH, M. A.; SONNENBURG, J. L. Eating for two: how metabolism establishes interspecies interactions in the gut. **Cell Host Microbe**, v. 10, p.336–347, 2011.

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

GAUTHAM V. S. et al. Prediction and quantification of bioactive microbiota metabolites in the mouse gut. **Nature**, v.6492, p.01-13, 2014.

GERRITSEN, J et al. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probióticos. **Genes Nutr**, v. 6, p. 209–240, 2011.

GOWD, V. et al. Antioxidant and antidiabetic activity of blackberry after gastrointestinal digestion and human gut microbiota fermentation. **Food Chemistry**, v. 269, p.618–627, 2018.

GIL - SANCHEZ, I. et al. Dynamic gastrointestinal digestion of grape pomace extracts: Bioaccessible phenolic metabolites and impact on human gut microbiota. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 68, p.41-52, 2018.

HECK, C.I.; 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.

HILDEBRANDT, M. A. et al. High- fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. **Gastroenterology**, v. 137, p.1716–1724, 2009.

HOLLISTER, B. E.; GAO, C.; VERSALOVIC, J. Compositional and Functional Features of the Gastrointestinal Microbiome and Their Effects on Human Health. **Gastroenterology**, v. 146, n. 6, p. 1449–1458, 2014.

HONDA, K.; LITTMAN, R. D. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. **Nature**, v.535, p. 75-84, 2016

JIÃO, X. et al. Blueberry polyphenols extract as a potential prebiotic with anti-obesity effects on C57BL/6 J mice by modulating the gut microbiota. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.64, p. 88–100, 2019.

JIN, Y. et al. Effects of environmental pollutants on gut microbiota. **Environmental Pollution**, v. 222. p.1-9, 2017.

JIN, Y. et al. Polystyrene microplastics induce microbiota dysbiosis and inflammation in the gut of adult zebrafish. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 322-329, 2018.

JUARISTI, M. G. et al. Absorption and metabolism of yerba mate phenolic compounds in humans. **Food Chemistry**, v. 240, p. 1028-1038, 2018.

JUNIOR, E. L. C.; MORAND, C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human Cardiovascular health – A review. **Journal of Functional Foods**, v 21, p. 440-454, 2016.

KACZMAREK, J. L. et al. Broccoli consumption affects the human gastrointestinal microbiota. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.63, p. 27–34, 2019.

KIM, J. S.; SERRE, C. B. Diet, gut microbiota composition and feeding behavior. **Physiology & Behavior**, v. 192, p.177–181, 2018.

KOREM, T. et al. Growth dynamics of gut microbiota in health and disease inferred from single metagenomic samples. **Science**, v.349, p.1101–1106, 2015.

KUNGEL, T.A. N. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of a purified polysaccharide from yerba mate (*Ilex paraguariensis*). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 1161–1167, 2018.

LADDU, D.; HAUSER, M. Addressing the Nutritional Phenotype Through Personalized Nutrition for Chronic Disease Prevention and Management. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 62, p. 9–14, 2019.

LANGE, K. W. et al. Medical foods in Alzheimer’s disease. **Food Science and Human Wellness**, 22 de fevereiro de 2019. Disponível em: < <https://www-sciencedirect.ez116.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S2213453019300059>> Acesso em: março de 2019.

LAPARRA, M. J.; SANZ, Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. **Pharmacological Research**, v. 61, p. 219–225, 2010.

LARSEN, N. et al. Effect of potato fiber on survival of *Lactobacillus* species at simulated gastric conditions and composition of the gut microbiota in vitro. **Food Research International**, v.125. p. 01-09, 2019.

LEY, R. E.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine. **Cell**, v. 124, p. 837–848, 2006.

LEY, R. E.; TURNBAUGH, P.J.; GORDON, J. Microbial Ecology: Human microbes associated gut with obesity. **Nature**, v. 444, p. 1022-1023, 2006.

LI, D. et al. The gut microbiota: A treasure for human health. **Biotechnology Advances**, v. 34, p. 1210–1224, 2016.

LI, H.; WEI, C. Diet, Gut Microbiota and Obesity. **Journal Nutrition Health Food Science**, v. 3, n.4, p. 1-6, 2015.

LI, Y. et al. Green tea polyphenols decrease weight gain, ameliorate alteration of gut microbiota, and mitigate intestinal inflammation in canines with high-fat-diet-induced obesity. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v, 78, p 01-09, 2020.

LIMA, J. P.; FARAH, A. Methylxanthines in stimulant foods and beverages commonly consumed in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 78, p. 75–85, 2019.

LOPES, M. et al. Preparation methods and applications behind alginate-based particles. **Expert Opinion on Drug Delivery**, p. 1-14, 2016

LÓPEZ-CORDOBA, A. et al. Release of yerba mate antioxidants from corn starch–alginate capsules as affected by structure. **Carbohydrate polymers**, v, 99, p.150-157, 2014.

MA, G., CHEN, Y. Polyphenol supplementation benefits human health via gut microbiota: A systematic review via meta-analysis. **Journal of Functional Foods**, v. 66, p. 01-11, 2020.

MAYTA-APAZA, A. C. et al. Impact of tart cherries polyphenols on the human gut microbiota and phenolic metabolites in vitro and in vivo. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.59, p.160–172, 2018.

MARTÍN-PELÁEZ, S. et al. Effect of cocoa's theobromine on intestinal microbiota of rats. **Mol. Nutr. Food Res**, v. 61, p.1-10, 2017.

MILLION, M. et al. New insights in gut microbiota and mucosal immunity of the small intestine. **Human Microbiome Journal**, v. 7, n. 8, p. 23–32, 2018.

MOURA, S. C. S. R. et al. Encapsulating anthocyanins from Hibiscus sabdariffa L. calyces by ionic gelation: Pigment stability during storage of microparticles. **Food Chemistry**, v. 241 p. 317-327, 2018.

MOURA, S. C. S. R. et al. Release of anthocyanins from the hibiscus extract encapsulated by ionic gelation and application of microparticles in jelly candy. **Food Research International**, v.121, p. 542–552, 2019.

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.

NABECHIMA, G. H. et al. Effect of the Mild Temperature and Traditional Treatments on Residual Peroxidase Activity, Color, and Chlorophyll Content on Storage of Mate (*Ilex paraguariensis*) Tea. **Journal of Food Science**, v.79, n. 2, p. 163-168, 2014.

NASH, V. et al. The effects of grape and red wine polyphenols on gut microbiota – A systematic review. **Food Research International**, v. 113, p. 277–287, 2018.

NA ZHANG, M. D. et al. Time for food: The impact of diet on gut microbiota and human health. **Nutrition**, v. 51-52, p. 80–85, 2018.

NEVES, F. I. G.; VIEIRA, M. C.; SILVA, C. L. M. Inactivation kinetics of peroxidase in zucchini (*Cucurbita pepo* L.) by heat and UV-C radiation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 13, p. 158–162, 2012.

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

OWOLABI, I. O. et al. Gut microbiota metabolism of functional carbohydrates and phenolic compounds from soaked and germinated purple rice. **Journal Functional Foods**, v. 66, p 01-13, 2020.

PARNELL, J. A.; REIMER, R. A. Prebiotic fiber modulation of the gut microbiota improves risk factors for obesity and the metabolic syndrome. **Gut Microbes**, v. 3, p. 29-34, 2012.

PELAEZ, S.M. et al. Effect of virgin olive oil and thyme phenolic compounds on blood lipid profile: implications of human gut microbiota. **Eur J Nutr**, v. 56, p.119–131, 2017.

PÉREZ-BURILLO S. et al. Bioactivity of food melanoidins is mediated by gut microbiota. **Food Chemistry**, p. 01-38, 2020.

PUUPPONEN-PIMIA, R. et al. Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p. 991–1000, 2005.

QUATRIN, A. et al. Bioaccessibility and catabolism of phenolic compounds from jaboticaba (*Myrciaria trunciflora*) fruit peel during in vitro gastrointestinal digestion and colonic fermentation. **Journal of Functional Foods**, v. 65, p. 01–14, 2020.

QUATRIN, A. et al. Characterization and quantification of tannins, flavonols, anthocyanins and matrix-bound polyphenols from jaboticaba fruit peel: A comparison between *Myrciariatrunciflora* and *M. jaboticaba*. *J. Food Comp. Anal.*, v.78, p.59-74, 2019.

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.

RIACHI, L. G.; MARIA, C. A. B. Yerba mate: An overview of physiological effects in humans. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 308–320, 2017.

ROCHA, D. S. et al. Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on the metabolism of diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.105, p.370–376, 2018.

SARKAR, R. S.; BANERJEE, S. Gut microbiota in neurodegenerative disorders. **Journal of Neuroimmunology**, v. 328, p. 98–104, 2019.

SAWSAN, M. E.; ARABY, E. Microbial regulation and protective effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in gamma-irradiated mice intestine. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, p. 64-73, 2014.

SCHINELLA, G.; NEYRET, E.; CÓNSOLE, G.; TOURNIER, H.; PRIETO, J.M.; RIOS, J.L.; GINER, R.M. An aqueous extract of *Ilex paraguariensis* reduces carrageenan-induced edema and inhibits the expression of cyclooxygenase-2- and inducible nitric oxide synthase in animal models of inflammation. **Planta Med**, v. 80, p. 961-968, 2014.

SHANDU, V. K. et al. Feeding the microbiota-gut-brain axis: diet, microbiome, and neuropsychiatry. **Translational Research**, v.179, p.223-244, 2017.

SHI, D. et al. Impact of gut microbiota structure in heat-stressed broilers. **Poultry Science**, v. 98, p. 2405-2413, 2019.

SILVA, E. M.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, v. 55, p. 381–387, 2007.

SMITH, P. M. et al. The microbial metabolites, short- chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. **Science**, v. 341, p.569–573, 2013.

SINGH, J.; KAUR, K.; KUMAR, P. Optimizing microencapsulation of  $\alpha$ -tocopherol with pectin and sodium alginate. **Food Scientists & Technologists**, v. 55, n. 9, p.3625–3631, 2018.

SONNENBURG, J. L; BACKHED, F. Diet–microbiota interactions as moderators of human metabolism. **Nature**, v. 535, p. 56-64, 2016.

SOUSA, B. A.; CORREIA, R. T. P. Phenolic content, antioxidant activity and antiamyolytic activity of extracts obtained from bioprocessed pineapple and guava wastes. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 01, p. 25-30, Jan./Mar., 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.

SUNIL, T. et al. The Host Microbiome Regulates and Maintains Human Health: A Primer and Perspective for Non-Microbiologists. **Cancer Research**, v.77, p. 1783-1812, 2017.

TAGUCHI, C. et al. Estimated Dietary Polyphenol Intake and Major Food and Beverage Sources among Elderly Japanese. **Nutrients**, v. 7, p. 10269–10281, 2015.

TAN, J. B. L.; LIM, Y. Y. Critical analysis of current methods for evaluating activity antioxidant and antibacterial properties of plant extracts. **Food Chemistry**, v. 172, p. 814-822, 2015.

TILMAN, D.; CLARK, M. Global diets link environmental sustainability and human health. **Nature**, v. 515, p.518-532, 2014.

TRUGO, L.C.; MACRAE, R. Chlorogenic acid composition of instant coffees. *Analyst* 109:263-266; 1984.

TURKMEN, N.; SARI, F.; VELIOGLU, Y. S. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciolteu methods. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods*, v. 99, p. 835-842, 2006.

TURNBAUGH, P.J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, p. 1027-1031, 2006.

VASILE, F. E.; JUDISA, M. A.; MAZZOBRE, M. F. Impact of *Prosopis alba* exudate gumon sorption properties and physical stability of fish oil alginate beads prepared by ionic gelation. **Food Chemistry**, v. 250, p. 75-82, 2018.

VIEITEZ, I. et al. Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 133, p. 58–64, 2018.

WANG, B. et al. The Human Microbiota in Health and Disease. **Engineering**, v. 3, p. 71–82, 2017.

WANG, J. et al. Characterization and storage properties of a new microencapsulation of tea polyphenols. **Industrial Crops and Products**, v.89, p. 152–156, 2016.

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

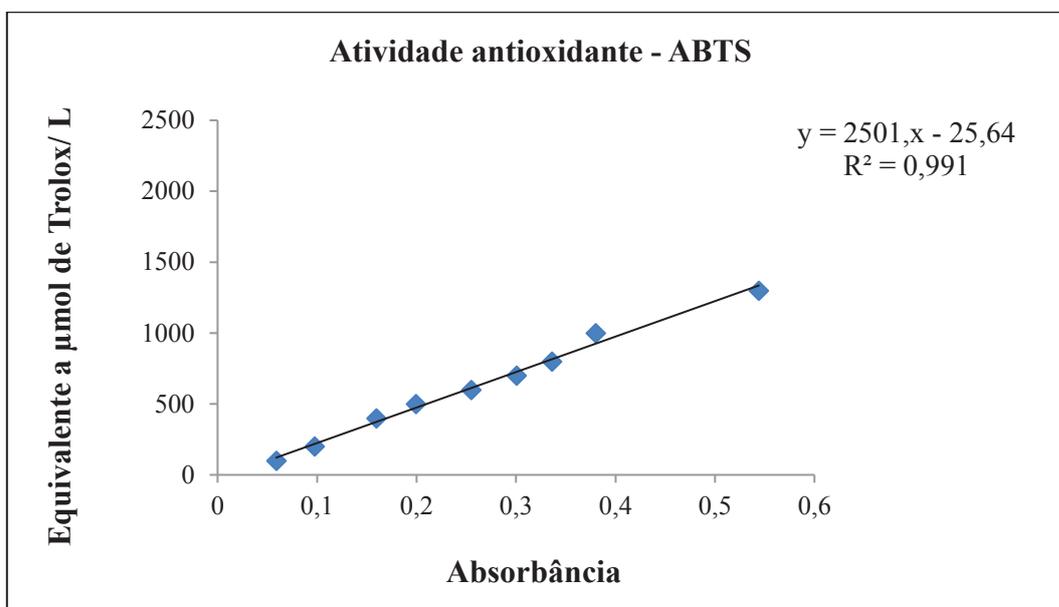
ZHANG, C. et al. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. **The ISME Journal**, v. 4, p. 232-241, 2010.

ZHU, J. et al. Preventive consumption of green tea modifies the gut microbiota and provides persistent protection from high-fat diet-induced obesity. **Journal of Functional Foods**, v. 64. p. 01-09, 2020.

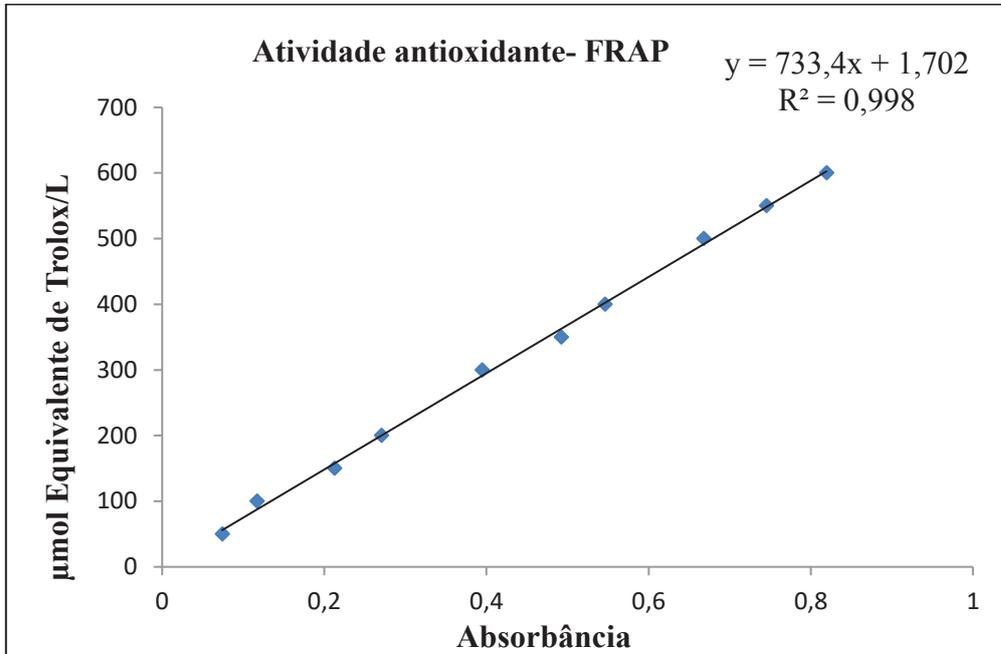
ZMORA, N.; SUEZ, J.; ELINAV, E. You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. **Nature**, 27 de setembro de 2018. Disponível em: < <https://www-nature.ez116.periodicos.capes.gov.br/articles/s41575-018-0061-2> > Acesso em: novembro de 2018.

ZUGCIC, T. et al. From extraction of valuable compounds to health promoting benefits of olive leaves through bioaccessibility, bioavailability and impact on gut microbiota. **Trends in Food Science & Technology**, v. 83, p. 63-77, 2019.

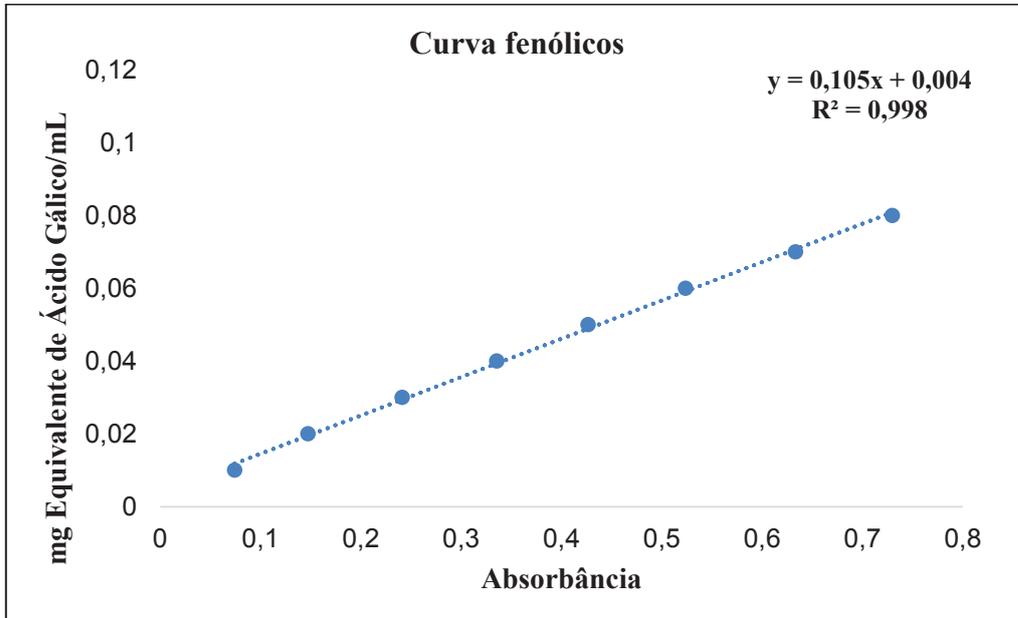
## 9 APÊNDICE A - CURVA ANALÍTICA DE ABTS



## 10 APÊNDICE B - CURVA ANALÍTICA DE FRAP

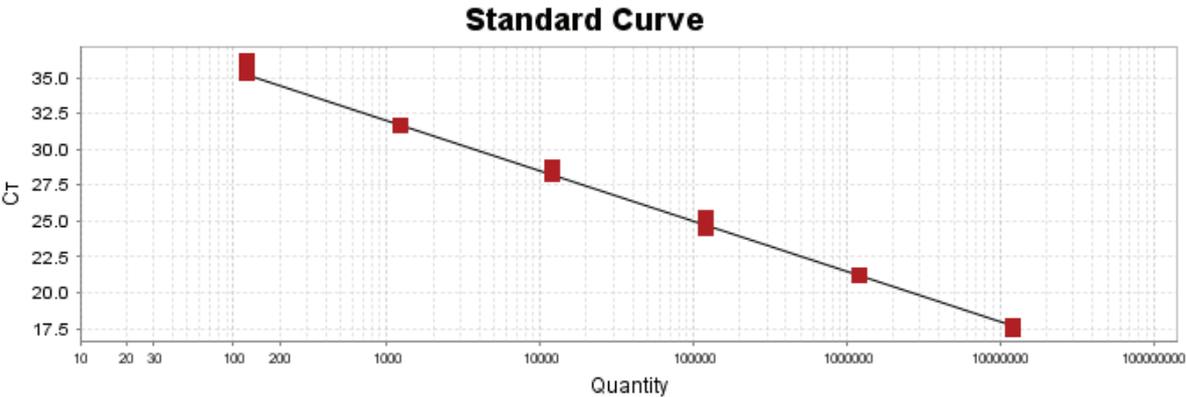


## 11 APÊNDICE C - CURVA ANALÍTICA DE FENÓLICOS TOTAIS



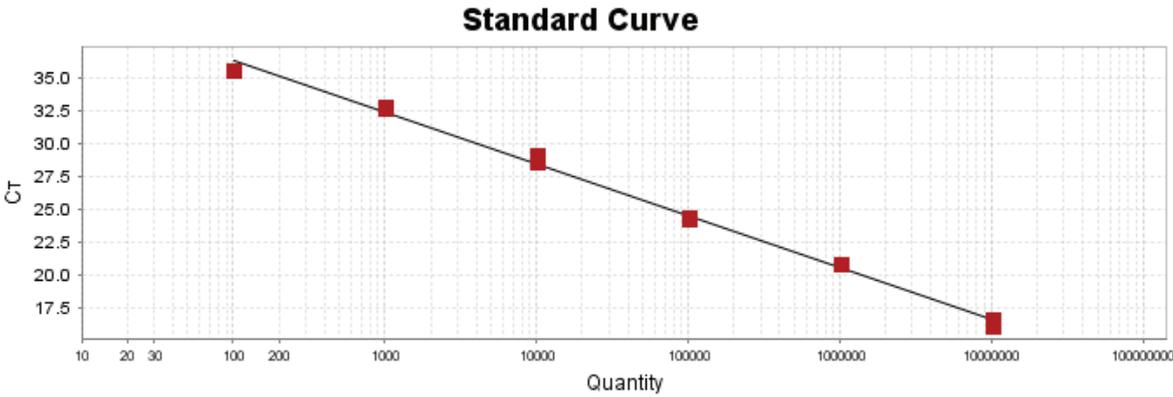
# 12 APÊNDICE D - CURVAS PADRÃO PCR REAL TIME

*Lactobacillus* sp.



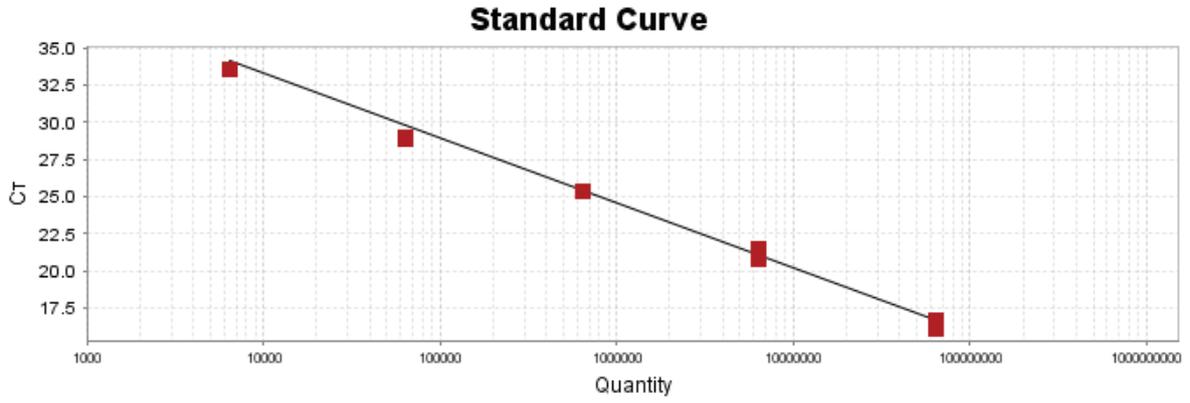
Target: Target 1 Slope: -3.51 Y-Inter: 42.528 R<sup>2</sup>: 0.987 Eff%: 92.694 Error: 0.125

*Bifidobacterium* sp.



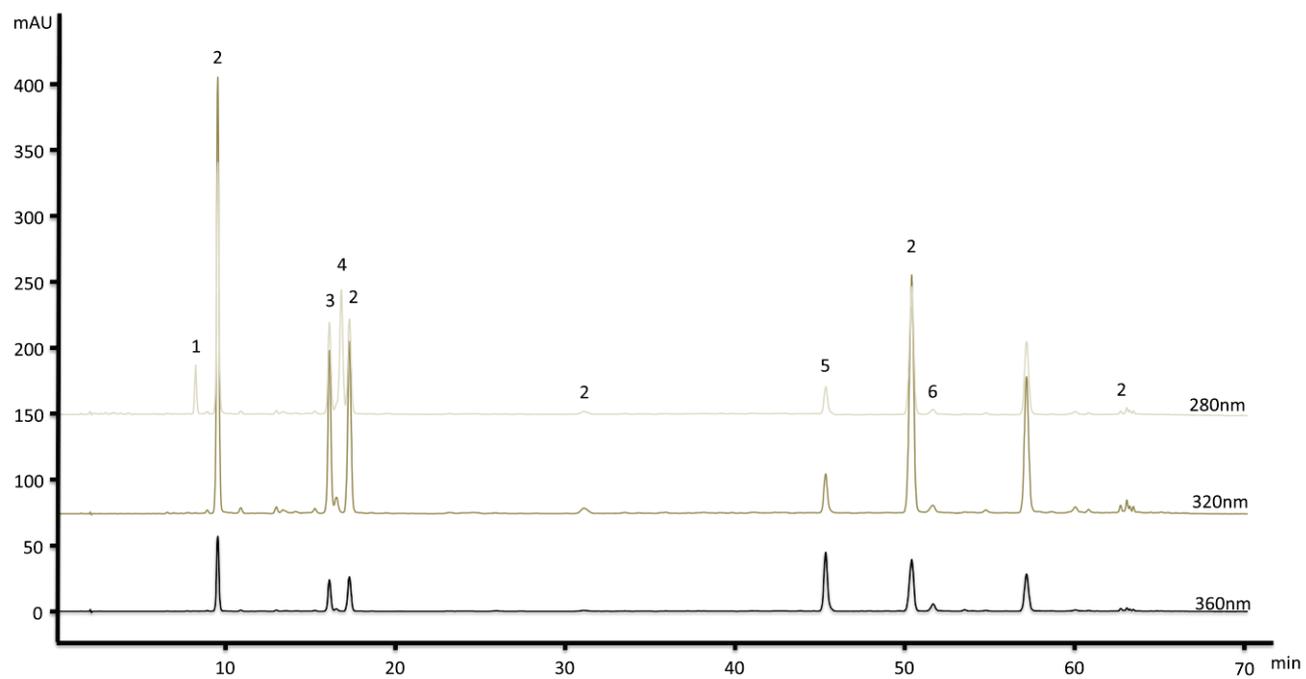
Target: Target 1 Slope: -3.946 Y-Inter: 44.216 R<sup>2</sup>: 0.996 Eff%: 79.224 Error: 0.084

*Prevotella* sp.



**Target:** Target 1 **Slope:** -4.374 **Y-Inter:** 50.819 **R<sup>2</sup>:** 0.983 **Eff%:** 69.295 **Error:** 0.204

### 13 APÊNDICE E - CROMATOGRAMA HPLC



Cromatogramas adquiridos a 280nm, 320nm e 360nm. Pico 1: Teobromina; Pico 2: Isômeros de ácidos clorogênicos; Pico 3: ácido 5-cafeoilquínico; Pico 4: Cafeína; Pico 5: Rutina.

## 14 APÊNDICE F - ANÁLISES DA MODULAÇÃO DO MICROBIOMA INTESTINAL

Tabela 8 – Avaliação da modulação do microbioma intestinal - *Lactobacillus* sp.

<b>Grupo de Estudo</b>	<b>Antes da suplementação (moléculas DNA/uL amostra)</b>	<b>Após da suplementação (moléculas DNA/uL amostra)</b>
CE	3,36E+08 ±0,88	1,92E+08±1,85
CV	1,84E+08±1,94	1,84E+08±2,0
EL	6,73E+07±1,60	2,31E+08±1,51
CA	2,68E+08±1,48	1,27E+08±1,62

Os resultados estão apresentados em forma de exponencial como média ± desvio padrão. CE – Cápsula com Extrato, CV – Cápsula Vazia, EL – Extrato Livre, CA – Controle Água.

Tabela 9 - Avaliação da modulação do microbioma intestinal - *Bifidobacterium* sp.

<b>Grupo de Estudo</b>	<b>Antes da suplementação (moléculas DNA/uL amostra)</b>	<b>Após da suplementação (moléculas DNA/uL amostra)</b>
CE	2,10E+06±2,28	2,56E+06±3,29
CV	3,42E+06±2,26	3,19E+06±3,56
EL	4,40E+05±2,10	5,33E+06±3,98
CA	7,02E+06±3,15	8,99E+05±2,18

Os resultados estão apresentados em forma de exponencial como média ± desvio padrão. CE – Cápsula com Extrato, CV – Cápsula Vazia, EL – Extrato Livre, CA – Controle Água.

Tabela 10 – Avaliação da modulação do microbioma intestinal - *Prevotella* sp.

<b>Grupo de Estudo</b>	<b>Antes da suplementação (moléculas DNA/uL amostra)</b>	<b>Após da suplementação (moléculas DNA/uL amostra)</b>
CE	8,74E+07±2,37	3,06E+08±1,34
CV	2,36E+07±3,33	5,67E+07±3,72
EL	6,68E+07±3,49	2,83E+08±1,89
CA	1,49E+08±2,40	1,58E+08±3,18

Os resultados estão apresentados em forma de exponencial como média ± desvio padrão. CE – Cápsula com Extrato, CV – Cápsula Vazia, EL – Extrato Livre, CA – Controle Água.

## 15 APÊNDICE H - ARTIGO CIENTÍFICO

### MODULAÇÃO DO MICROBIOMA INTESTINAL DE RATOS PELA *Ilex paraguariensis*

Daiane Santos<sup>1</sup>; Telma Elita Bertolin<sup>1</sup>; Rômulo Pillon Barcelos<sup>2</sup>; Giseli Ritterbusch<sup>3</sup>

1. Programa de pós-graduação em ciência e tecnologia de alimentos - Universidade de Passo Fundo.
2. Programa de pós-graduação em bioexperimentação - Universidade de Passo Fundo.
3. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - Universidade de Passo Fundo.

#### RESUMO

Estudos vêm demonstrando a relação das escolhas alimentares e a atividade da microbiota intestinal, inferindo efeitos de equilíbrio simbiótico dos microrganismos presentes no intestino ou efeitos contrários a este, os quais podem estar associados a complicações neurodegenerativas, metabólicas e imunológicas. Alimentos com compostos fenólicos presentes em sua composição possuem influência seletiva sobre a microbiota intestinal, neste sentido a erva-mate pode ser uma boa alternativa para realizar esta modulação. Neste contexto, objetivamos avaliar o impacto da ingestão de extrato de erva-mate como potencial agente modulador da microbiota intestinal de ratos. Para tal o extrato de erva mate foi avaliado em relação a compostos fenólicos totais, atividade antioxidante pelos métodos de ABTS e FRAP, comportamento em diferentes pH's e HPLC, apresentando resultados de quantificação da atividade antioxidante de 52,96  $\mu\text{mol Trolox/mL}$  para ABTS, 64,53  $\mu\text{mol Trolox/mL}$  para ensaios de FRAP e 10,17  $\text{mgEAG/mL}$  para compostos fenólicos totais. A quantificação de compostos fenólicos em pH 7,5, simulando pH intestinal foram superiores a quantificação em pH 2,0, simulando pH estomacal. Os compostos identificados em maior abundância no extrato liofilizado da erva-mate foram os isômeros de ácido clorogênico com 14,22g/100g. A modulação do microbioma intestinal dos ratos pelo extrato de erva-mate foi determinado por testes de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR), para os microrganismos *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp. e *Prevotella* sp. considerados benéficos. Foi avaliado o comportamento da microbiota intestinal de 20 ratos Wistar em diferentes grupos de estudo, com suplementação de 3,29 mg de compostos fenólicos/animal/dia, durante 45 dias, para os grupos de animais: extrato livre e controle água. Os compostos presentes no extrato da *Ilex paraguariensis* tiveram efeitos na modulação da microbiota intestinal de ratos para os microrganismos estudados, quando avaliados antes e após a ingestão do extrato de erva-mate. Por fim, estas compreensões poderão possibilitar a expertise e diversificação do uso da erva mate, para estimular uma boa microbiota, caracterizando uma alternativa de controle e prevenção dos agravos decorrentes da má alimentação.

Palavras-chave: microbiota intestinal, erva-mate, compostos fenólicos, metabólitos fenólicos, antioxidantes.

## ABSTRACT

Studies have demonstrated the relationship between food choices and the activity of the intestinal microbiota, inferring the symbiotic balance effects of microorganisms present in the intestine or effects contrary to it, which may be associated with neurodegenerative, metabolic and immunological complications. Foods with phenolic compounds present in their composition have a selective influence on the intestinal microbiota, in this sense yerba mate can be a good alternative to carry out this modulation. In this context, we aim to evaluate the impact of ingesting yerba mate extract as a potential modulating agent of the intestinal microbiota of rats. For that, the extract of yerba mate was evaluated in relation to total phenolic compounds, antioxidant activity by the ABTS and FRAP methods, behavior at different pH's and HPLC, presenting results of quantification of the antioxidant activity of 52.96  $\mu\text{mol Trolox} / \text{mL}$  for ABTS, 64.53  $\mu\text{mol Trolox} / \text{mL}$  for FRAP assays and 10.17  $\text{mgEAG} / \text{mL}$  for total phenolic compounds. The quantification of phenolic compounds at pH 7.5, simulating intestinal pH was higher than the quantification at pH 2.0, simulating stomach pH. The compounds identified in greater abundance in the lyophilized extract of yerba mate were the isomers of chlorogenic acid with 14.22g / 100g. The modulation of the intestinal microbiome of rats by the extract of yerba mate was determined by real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR) tests for the microorganisms *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp. and *Prevotella* sp. considered beneficial. The behavior of the intestinal microbiota of 20 Wistar rats in different study groups was evaluated, with supplementation of 3.29 mg of phenolic compounds / animal / day, for 45 days, for the groups of animals: free extract and water control. The compounds present in the extract of *Ilex paraguariensis* had effects on the modulation of the intestinal microbiota of rats for the microorganisms studied, when evaluated before and after ingesting the extract of yerba mate. Finally, these understandings may enable the expertise and diversification of the use of yerba mate, to stimulate a good microbiota, featuring an alternative to control and prevent diseases resulting from poor diet.

Keywords: gut microbiota, yerba mate, phenolic compounds, phenolic metabolites, antioxidantes.

## INTRODUÇÃO

Na atualidade o padrão dos alimentos ingeridos é apontado como um dos principais fatores que influencia na suscetibilidade à doença (LADDU; HAUSER, 2019). A oferta de alimentos calóricos e por vezes de baixo valor nutricional potencializa as estatísticas do aumento de doenças crônicas não transmissíveis (DNT) como, câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, (TILMAN; CLARCK, 2014; NA ZHANG et al., 2018; KACZMAREK et al., 2019) obesidade, doenças inflamatórias de intestino (DII), alergias, síndromes metabólicas, distúrbios autoimunes e neuropsiquiátricos (PARNELL; REIMER, 2012; SHANDU et al; 2017).

Estima-se que o trato gastrointestinal humano é colonizado por mais de 100 trilhões de microrganismos, dez vezes mais do que o número de células somáticas no corpo (LI; WEI, 2015). Estes microrganismos compõem a microbiota intestinal, a qual está relacionada à digestão, absorção de nutrientes, além de inferir outros benefícios para o bem-estar do organismo (CANI; JORDAN, 2018). Muitas doenças crônicas não transmissíveis vêm sendo associadas à atividade da microbiota intestinal em desequilíbrio, ou seja, disbiose (LEY; TURNBAUGH; GORDON, 2006; WANG et al., 2017). A disbiose caracteriza-se pela desordem das comunidades microbianas presentes no intestino. A dieta contribui na modulação da composição da microbiota e como consequência influencia os processos bioquímicos do organismo, estabelecendo um sistema de interação entre dieta, microbiota e hospedeiro (DANNESKIOLD-SAMSOEA et al., 2019). Devido à associação da ação da microbiota em disbiose e diversas patologias, existe um crescente interesse na manipulação do microbioma intestinal para obtenção de efeitos terapêuticos (KIM; SERRE, 2018).

O potencial benéfico de uma alimentação com ingestão de vegetais e frutas, os quais possuem diversificada composição em substâncias bioativas, como compostos fenólicos e carotenóides vem sendo investigada (LANGE et al., 2019). A comunidade científica vem apontando que substâncias fitoativas como compostos fenólicos servem como prebióticos, podendo exercer a modulação da microbiota intestinal no hospedeiro e desta forma inferir resultados positivos para saúde do homem (JIÃO et al., 2019).

A erva-mate difundida culturalmente nos países da América do Sul, sendo ingerida principalmente na forma tradicional de “chimarrão”, possui reconhecidas propriedades funcionais e capacidade antioxidante, visto seus biocompostos, como fenóis, metilxantinas, triterpeno, saponinas, flavonóides e outros (BRACESCO et al., 2011). Evidências científicas têm demonstrando o potencial antiinflamatório, anti-obesidade e cardioprotetor da *Ilex paraguariensis* (JUARISTI et al., 2018), sendo promissora para o uso em desenvolvimento de novos alimentos, que apresentem interesse para o consumidor e para a indústria, além de representar uma boa alternativa, dada as suas características, para modulação dos microrganismos presentes no intestino (SAWSAN; ARABY, 2014). Neste contexto, o objetivo geral é avaliar o impacto da ingestão de extrato de erva-mate livre e microencapsulado como potencial agente modulador da microbiota intestinal de ratos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Tratamento da matéria-prima*

As folhas de erva-mate utilizadas são de diferentes quadrantes da plantação, sendo misturadas e dando origem a uma amostra composta. As folhas foram separadas dos caules e branqueadas, este método consiste na imersão das folhas em água a uma temperatura de 95°C por 30 segundos e em seguida imersas em banho de gelo. Após o processo de branqueamento e as folhas submetidas à secagem em estufa por 20 horas em temperatura de 50°C ± 2 °C formando uma camada < 5 cm para evitar o excesso de sobreposição das folhas. Depois de secas, as mesmas foram trituradas em moinho de facas, em seguida embaladas a vácuo e a amostra congelada à - 18 ± 2°C até a sua utilização.

### *Obtenção de extrato aquoso*

O extrato aquoso foi preparado de acordo com o método descrito por Turkmen, Sari e Velioglu (2006) e modificado por Murakami et al. (2011), com adaptações. A condição (m/v) de 15g de erva para 100mL de água foi utilizada. O preparo do extrato consistiu em uma suspensão de erva mate em água, que foi aquecida por 5 min a 90±2 °C em banho-maria, após foi filtrada em filtro de nylon utilizando uma bomba de vácuo com o intuito de separar o extrato do material em suspensão. O extrato filtrado foi distribuído e encaminhado à ultra-freezer por 24 h a -80 ± 2 °C e posteriormente submetido à liofilização por 80 h à -40 ± 2 °C a fim de concentrar os sólidos e preservar sua atividade. A caracterização do extrato liofilizado foi realizada quanto ao teor de compostos fenólicos e análise de potencial antioxidante.

### *Caracterização da capacidade antioxidante do extrato de erva-mate pelo radical ABTS*

A análise da capacidade antioxidante pelo método do radical ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiasolína-6-ácido sulfônico) está baseada na metodologia adaptada de RE et al. (1999). O radical catiônico de ABTS foi preparado a partir da reação com a mistura de solução estoque de ABTS (7 mmol/L) com persulfato de potássio (2,45 mmol/L), esta

solução foi preparada no mínimo 12 a 16 horas antes da realização da análise e permaneceu em ambiente escuro, em temperatura ambiente.

Para realização da análise a solução de ABTS foi diluída em etanol 96% até obter uma absorbância de 0,695 à 0,705 no espectrofotômetro UV-Vis. Ao atingir a absorbância desejada foi adicionado 1mL desta solução em 10 µL de amostra do extrato de erva-mate, em ambiente protegido da luz, seguido de 5 segundos de homogeneização. Esta solução permaneceu em repouso durante 6 minutos no escuro para reação. Os resultados foram interpretados utilizando uma curva padrão expressa µmol equivalente de Trolox/L de amostra.

#### *Caracterização da capacidade antioxidante do extrato de erva-mate pelo método de FRAP*

O potencial antioxidante redutor férrico (FRAP) foi realizado de acordo com o método proposto por Benzie e Strain (1996) com modificações de Arnous et al. (2002). Para a realização deste ensaio adicionou-se 200 µL de amostra de extrato de erva-mate (200µL de água para o tubo de branco) e 200µL de solução de cloreto férrico 3 mM em tubos de ensaio. Esta mistura permaneceu em repouso durante 30 minutos em banho-maria, em temperatura de 37°C. Após o repouso foi adicionado 3,6mL de solução TPTZ (2,4,6-Tris(2 Piridil)- 1,3,5 Triazina) e os tubos submetidos a um ambiente escuro durante 10 minutos. Os resultados foram interpretados utilizando curva padrão de µmol equivalente de Trolox/L de amostra.

#### *Quantificação de compostos fenólicos totais do extrato de erva-mate*

O conteúdo total de polifenóis dos extratos foi determinado segundo o método descrito por Correia et al. (2004), com modificações propostas por Sousa e Correia (2012). Para realização dos testes foi adicionado em tubos de ensaio 1 mL de amostra, 1 ml de álcool 96%, 5mL de água destilada e 0,5 mL de Folin-Ciocalteu, esta mistura foi agitada por 10 segundos e adicionada de 1 mL de carbonato de sódio Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5%. Após a adição do carbonato de sódio agitou-se por 3 segundos e os tubos foram submetidos a 1 hora de repouso em ambiente protegido de luz.

Os resultados foram interpretados utilizando curva padrão expressa em mg equivalentes de Ácido Gálico/mL de amostra.

### *Comportamento do potencial antioxidante do extrato em diferentes valores de pH*

Os valores de pH foram medidos através de pHmetro calibrado, pela inserção do eletrodo na solução com o extrato de erva-mate. O comportamento do potencial antioxidante do extrato de erva-mate em diferentes pHs foi realizado de acordo com o método proposto por Chen et al. (2017) com modificações, submetendo o extrato a 3 diferentes condições: pH ácido ( $2,0 \pm 2$ ), utilizando solução de ácido clorídrico 0,5 M (HCl), pH básico ( $7,5 \pm 2$ ) utilizando solução de carbonato de sódio 0,1 M ( $\text{NaHCO}_3$ ) e pH intermediário ( $5,5 \pm 2$ ) utilizando solução de ácido clorídrico 0,5 M (HCl) e solução de carbonato de sódio 0,1 M ( $\text{NaHCO}_3$ ) respectivamente. Para os testes 25 mL de extrato foram preparados utilizando as soluções tampão para ajuste dos pH's desejados, cada pH foi mantido 2 horas em *shaker* à 37 °C sob agitação de 100 rpm. A análise da quantificação de compostos *in vitro* em cada um dos tratamentos foi realizada no final do tempo estabelecido para cada pH, pelo método de quantificação de fenólicos totais.

### *Identificação de compostos bioativos do extrato por HPLC*

A quantificação dos compostos fenólicos e alcalóides do extrato liofilizado de erva-mate foram analisados pela técnica de HPLC, acoplada ao detector de matriz fotodiodo (PDA), usando uma coluna C-18 de fase reversa (tamanho de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , 150 nm, 4,6 nm) a 38°C. As fases móveis foram compostas por 5% (v/v) de metanol em água acidificada, (0,1% v/v de ácido fórmico) com solvente (A), 0,1 % (v/v de ácido fórmico em acetonitrila com solvente B, vazão de 1 mL/minuto e o volume de injeção foi de 20  $\mu\text{L}$  de amostra, seguindo o método descrito por Quatrin et al (2019). Os compostos fenólicos das amostras foram identificados por comparação com o tempo de retenção na coluna de padrões autênticos. Os dados espectrais foram obtidos a partir de espectros de absorção visíveis por UV. Os cromatogramas para fins de quantificação foram obtidos a 280 nm para alcalóides e 320 nm e 360 nm para hidroxicinamatos e flavonóides (compostos fenólicos). Os compostos que são isômeros do ácido clorogênico foram identificados com base na ordem do espectro de eluição e absorção (TRUGO; MACRAE, 1984) e quantificados por equivalência de ácido 5-caffeyolquinic e os resultados foram expressos em g/100gramas de extrato liofilizado.

## *Avaliação da ação moduladora de extrato de erva-mate na microbiota intestinal*

### *Delineamento experimental*

Os ensaios para verificação da modulação da microbiota intestinal foram realizados em 20 animais (ratos Wistar) divididos em 2 grupos (n=10) que receberam diferentes tratamentos: grupo controle (CA) que recebeu somente água, grupo extrato aquoso (EL) que recebeu extrato de erva-mate. A dose efeito que foi suplementada foi calculada com base no proposto por Taguchi et al. (2015) com modificações, prevendo uma quantidade de 3,29 mg de compostos fenólicos/animal/dia. A ingestão do extrato de erva-mate aconteceu durante 45 dias (dia 0 até o dia 45), diariamente, uma vez ao dia, via gavagem intragástrica. Além dos extratos os animais tiveram acesso à água, ração *ad libitum* e ambiente com temperatura e luz controlada. Amostras fecais individuais foram coletadas antes e após a ingestão do extrato de erva-mate. As amostras foram acondicionadas em ultrafreezer com temperatura de -80 ° C até o momento da análise.

### *Avaliação da microbiota intestinal pela técnica de qPCR*

Para análise de diversidade bacteriana intestinal, métodos baseados em cultura mostraram-se inadequados, uma vez que uma grande fração da microbiota permanece inculca (GERRITSEN et al., 2011). Desta forma, para a quantificação dos gêneros bacterianos selecionados para este estudo foi utilizado o método de PCR em tempo real (qPCR), de acordo com proposto pelos autores Chacar et al. (2018). Os grupos selecionados de bactérias para estudo são: Filo Firmicutes, gênero *Lactobacillus* sp., Filo Bacteroidetes, gênero *Prevotella*, e Filo Actinobactéria, gênero *Bifidobacterium*.

### *Extração de DNA das amostras de fezes*

A extração do material genético das amostras de fezes coletadas foi realizada utilizando o kit para isolamento de DNA denominado *Purelink Microbiome DNA Purification Kit*, o qual dispõe de todos os reagentes de lise, lavagem e eluição.

Para obtenção do DNA utilizou-se 0,1 grama de amostra em um tubo estéril e adicionado 700 µL de solução tampão (S1—*Lysis Buffer*) para realizar a lise das membranas

e liberar o material genético, agitando com auxílio de um vórtex, para total dispersão da amostra. Em seguida foram adicionados 100 µL de tampão de lise (*S2-Lise Enhancer*), agitando novamente no vórtex. Essa mistura foi incubada durante 10 minutos a 65°C para posteriormente ser homogeneizada por 10 minutos na velocidade máxima do vórtex (na posição horizontal). Após a homogeneização a amostra foi centrifugada, durante 5 minutos a 14000 rpm. Uma vez centrifugada, 400 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo estéril e adicionados de 250 µL de tampão S3—*Cleanup Buffer*, agitando brevemente no vórtex para posterior centrifugação a 14000 rpm durante 2 minutos. Após a segunda centrifugação 500 µL do sobrenadante foram levados para um novo tubo, evitando quaisquer sedimentos. Na sequência foram adicionados 900 µL de tampão S4—*Binding Buffer* submetendo o tubo a agitação no vórtex. Após agitação foram transferidos para um tubo de coluna 700 µL da amostra, a qual foi centrifugada a 14000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e este passo foi repetido com o restante da amostra adicionada do tampão S4, assegurando que toda a amostra passou pelo filtro disposto na coluna, o qual possui a finalidade de reter o material genético.

Após a realização das etapas iniciais de lise e separação dos detritos de fezes, iniciou-se o procedimento de lavagem do DNA, transferindo a coluna para um tubo de recolha limpo, somando a 500 µL de solução tampão S5—*Wash Buffer Concentrate* e centrifugando a 14000 rpm/1 minuto. Todo fluxo de passagem foi descartado e o tubo foi novamente submetido à centrifugação, para total eliminação do tampão de lavagem utilizado.

O último passo da extração foi a eluição do DNA retido na coluna, transferindo a mesma para um tubo limpo e estéril, adicionando 100 µL de tampão de eluição (*S6—Elution Buffer*) para posterior incubação em temperatura ambiente por 1 minuto. A coluna e o tubo foram centrifugados a 14000 rpm/1 minuto após a incubação. O material contido no tubo depois da centrifugação foi o DNA extraído e purificado (a coluna foi descartada). O mesmo foi armazenado em ultrafreezer em temperatura de -80 °C para utilização em longo prazo, conforme orientação do kit de extração.

#### *Quantificação do material genético dos microrganismos pela técnica de qPCR*

A execução das análises de qPCR foram realizadas em equipamento *QuantStudio™ 3 Real-Time PCR Systems*. O volume total da reação da qPCR foi de 10 µL, 5 µL de

PowerUp SYBR Green Master Mix (*Thermo Fischer Scientific*), 0,5 µL de cada iniciador para cada bactéria, 1 µL de amostra e 3 µL de água livre de DNase e RNase.

As condições para qPCR utilizadas para reação de todos os microrganismos foi desnaturação por 2 minutos a 50°C, seguidos de 2 minutos a 90°C e 15 segundos a 95°C. Na sequência, anelamento durante 1 minuto a 60°C e Curva *Melting* (95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e finalizando com 15 segundos a 95°C), considerando 40 ciclos para execução da corrida. Para tal, foram consideradas as sequências dos iniciadores, conforme descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Sequência dos iniciadores utilizados nos testes de qPCR

<b>Iniciador</b>	<b>Sequência</b>	<b>Referência</b>	<b>Amplicon</b>
<i>Prevotella</i> sp. (F)	GAA GGT CCC CCA CAT TG	CHACAR et al, 2018.	786
<i>Prevotella</i> sp. (R)	GCA CTT AAG CCG ACA CCT	CHACAR et al, 2018.	786
<i>Lactobacillus</i> sp. (F)	GAGGCAGCAGTAGGGAATC TTC	POZUELO et al 2012.	126
<i>Lactobacillus</i> sp. (R)	GGCCAGTTACTACCTCTATC CTTCTTC	POZUELO et al 2012.	126
<i>Bifidobacterium</i> sp. (F)	GGG TGG TAA TGC CGG ATG	CHACAR et al, 2018.	513
<i>Bifidobacterium</i> sp. (R)	CCA CCG TTA CAC CGG GAA	CHACAR et al, 2018.	513

Fonte: elaborado pela autora (2020)

### *Análise estatística*

A análise estatística foi determinada com programa Statistic, utilizando ANOVA e aplicação do teste de Tukey. O valor de (p) inferior a 0,05 foi considerado como uma diferença significativa.

### *Aspectos éticos*

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Passo Fundo (UPF) sob registro 025/2018.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

### *Tratamento da matéria-prima*

A matéria-prima utilizada consistiu em amostragens de folhas da erva-mate *in natura*, as mesmas foram submetidas aos processos de branqueamento, secagem e armazenamento. Uma das dificuldades da utilização das folhas *in natura* é a ação das enzimas peroxidase (PODs) e polifenoloxidas e óxido redutases (PPOs), que são as principais enzimas do mate e são responsáveis por mudanças indesejáveis, percebidas principalmente na coloração da erva-mate. As PODs e PPOs catalisam a oxidação de monofenóis em difenóis removendo hidrogênio de suas ramificações e originando as quinonas, as quais polimerizam e produzem melaninas, reduzindo a concentração dos compostos fenólicos (NABECHIMA, G. H. et al., 2014). Neste sentido, constitui-se importante a adoção de um método de inativação das mesmas. O branqueamento é conhecido por inativar estas enzimas com temperaturas em torno de 85°C (NEVES; VIEIRA; SILVA, 2012), neste estudo utilizou-se temperatura de 95°C, garantindo a eficiência do procedimento e a manutenção dos padrões de qualidade como concentração de compostos fenólicos e potencial antioxidante durante o armazenamento da matéria-prima.

### *Obtenção e caracterização do extrato liofilizado*

A condição de extração de compostos fenólicos utilizada foi  $90 \pm 2$  °C por 5 minutos. Gao e colaboradores (2013) utilizaram metodologia similar no preparo de extrato, realizando uma infusão com água de acordo com método usual para consumo humano, uma importante característica visto que o estudo de interesse trata-se de modelos *in vivo*. Diferentes solventes como metanol, etanol, acetona podem ser utilizados para a extração máxima de constituintes ativos, porém o uso de solventes orgânicos torna as aplicações subsequentes desses extratos limitadas para adição em alimentos, experimentos em humanos ou animais

devido aos seus resíduos tóxicos (MURAKAMI et al., 2011). A temperatura utilizada varia de acordo com a proporção sólido/solvente e com o tipo de composto que se deseja extrair (SILVA; ROGEZ; LARINDELLE, 2007).

O extrato de erva-mate obtido após a extração foi liofilizado e caracterizado através da quantificação dos seus compostos fenólicos totais e perfil antioxidante, os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Caracterização do extrato de erva-mate liofilizado

<b>Ensaio</b>	<b>Extrato liofilizado</b>
Fenólicos Totais (mg EAG/mL)	10,17±0,22
ABTS (µmol Trolox/mL)	52,96±0,86
FRAP (µmol Trolox/mL)	64,53±0,26

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Fonte: elaborado pela autora (2019).

A comunidade científica infere o benefício dos polifenóis para a saúde, indicando a importância de boas quantificações destes compostos e sua atividade antioxidante. A modulação da microbiota intestinal é um exemplo destes benefícios, no entanto, os efeitos das interações específicas entre os polifenóis e os microrganismos do intestino permanecem amplamente não caracterizados (LAPARRA; SANZ, 2010).

As concentrações de compostos fenólicos mostram uma correlação com sua capacidade antioxidante total (HECK; MEJIA, 2007), nos ensaios realizados a quantificação de compostos fenólicos totais de 10,17 mgEAG/mL de amostra foi equivalente a quantificações de atividade antioxidante de 52,96 µmol Trolox/mL para ABTS e 64,53 µmol Trolox/mL para ensaios de FRAP, realizados no extrato de erva-mate liofilizado. Relatos científicos demonstram que a capacidade antioxidante avaliadas *in vitro* através de ensaios FRAP e ABTS de extratos de erva-mate são comparáveis a resultados obtidos de vinho tinto ou chá (JUARISTI et al., 2018), e estes favorecem o aumento das contagens de gêneros bacterianos benéficos do intestino como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (LAPARRA; SANZ, 2010).

A caracterização da atividade antioxidante foi realizada utilizando dois diferentes métodos. Tan e Lim (2015) mencionam a utilização de mais de uma metodologia para avaliação antioxidante como a chave para confiabilidade na eficácia de resultados. A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) e a AOAC Internacional afirmam que os resultados entre diferentes métodos são dificilmente comparados, pois cada um deles é

baseado em um diferente mecanismo, levando em consideração o solvente e matriz de amostras.

Além da quantificação dos seus compostos fenólicos totais e perfil antioxidante o extrato de erva-mate liofilizado também foi avaliado em relação à presença de compostos bioativos. Padrões de cafeína, ácido 5-cafeoilquínico, teobromina, isômeros de ácido clorogênico e rutina foram injetados para análise. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Identificação de compostos bioativos do extrato de erva-mate

<b>Composto</b>	<b>Quantificação (g/100g) do extrato liofilizado de erva-mate</b>	<b>nm</b>
Teobromina	0.67 ± 0.06	280
Cafeína	2.76 ± 0.19	280
Ácido 5-cafeoilquínico	2.58 ± 0.01	320
Isômeros de Ácido Clorogênico	14.22 ± 0.39	320
Rutina	2.31 ± 0.15	360

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Fonte: elaborado pela autora (2019).

Compostos fitoquímicos ativos podem ser identificados na erva-mate, dentre tantos, os compostos com presença mais significativa nesta planta são os polifenóis (ácido clorogênico) e xantinas (cafeína e teobromina), seguido pelos alcalóides (ácido cafeico, ácido 3,4-dicaffeoylquinic, ácido 3,5-dicaffeoylquinic), flavonóides (quercetina, kaempferol e rutina), (HECK; MEJIA, 2007).

Os autores Tan e Lim (2015) explicam que a técnica de HPLC apresenta limitações em matrizes complexas, como extratos brutos de plantas, tornando importante a purificação da amostra, removendo qualquer componente que prejudique a identificação das substâncias de interesse.

Estudos científicos vem sugerindo a relação do metabolismo de compostos após a sua ingestão, à formação de metabólitos bioativos e produtos catabólicos, seguido pela interação com a microbiota intestinal e seus benefícios diretos e indiretos neste contexto (GOWD et al., 2018; JUARISTI et al., 2018). Martin-Pelaez e colaboradores (2017) avaliaram em seus estudos realizados com cacau, que a xantina mais abundante encontrada nesta matriz é a teobromina, seguida pela cafeína, investigações utilizando uma dieta com 10% de cacau em roedores modificou a composição da microbiota intestinal dos mesmos,

diminuindo a proporção de *Staphylococcus* sp. e *Clostridium histolyticu*, além de alterar a produção de ácidos graxos de cadeia curta.

Os compostos observados em maior quantidade na caracterização do extrato de erva-mate foram o ácido clorogênico com 14,22 gramas, seguido da cafeína com 2,76 gramas e ácido 5-cafeoilquínico com 2,58 gramas. Estudos realizados por Bhandarkar; Brown e Panchal (2019) demonstram ações benéficas relacionadas ao ácido clorogênico, em dietas hiperlipídicas o mesmo atenuou alterações cardiovasculares, hepáticas e metabólicas, sugerindo o potencial deste bioativo. Outras investigações utilizando café evidenciaram o aumento da produção de ácidos graxos de cadeia curta devido ao efeito de ácido cafeico e ácido clorogênico, essa constatação aconteceu em função da ação de metabolização realizada pela microbiota intestinal (COWAN et al., 2014).

Os ácidos graxos de cadeia curta são os principais produtos finais da fermentação microbiana no intestino, acetato e lactato são relacionados com a fermentação realizada pelo gênero de *Bifidobacterium*, considerado benéfico à saúde humana. Pérez-Burillo e colaboradores (2020) evidenciaram essa relação a partir da ingestão de café e correlacionaram a mesma com a presença de ácidos fenólicos, dentre eles, o ácido clorogênico.

Investigações realizadas por Ma e Chen (2020) declaram que suplementação com polifenóis estimula a abundância bactérias intestinais promotoras de saúde, como os gêneros de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em paralelo a inibição do gênero patogênico *Clostridium* na microbiota intestinal de seres humanos.

Compostos fitoquímicos e seus produtos metabólicos, dentre eles, todos os identificados na caracterização do extrato de erva-mate, exercem efeitos similares aos prebióticos, promovendo desta forma a modulação do microbioma intestinal (LAPARRA; SANZ, 2010), demonstrando o potencial desta planta para seletividade dos microrganismos intestinais.

O extrato de erva-mate liofilizado também foi avaliado em relação ao seu comportamento frente a diferentes condições de pH, simulando as condições do trato gastrointestinal, conforme os resultados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Avaliação do extrato de erva-mate liofilizado em diferentes pHs

Condição de pH da amostra	mg EAG/mL
2,0± 1,0	9,43±0,55 <sup>a</sup>
5,5± 1,0	11,62±0,23 <sup>b</sup>
7,5± 1,0	11,21±0,10 <sup>b</sup>

Os resultados expressam a média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo Teste Tukey ( $P > 0,05$ ). Fonte: elaborado pela autora (2019).

O extrato liofilizado de erva-mate demonstrou uma redução do teor de compostos fenólicos quando submetidos a pH mais baixo, simulando pH estomacal. Faria, Marques e Mercadante (2011) obtiveram resultados semelhantes constatando que a capacidade antioxidante, avaliada pelo radical ABTS, em extrato funcional de jambolão variou de acordo com os valores de pH, com tendência a aumento da atividade em valores de pH mais elevados.

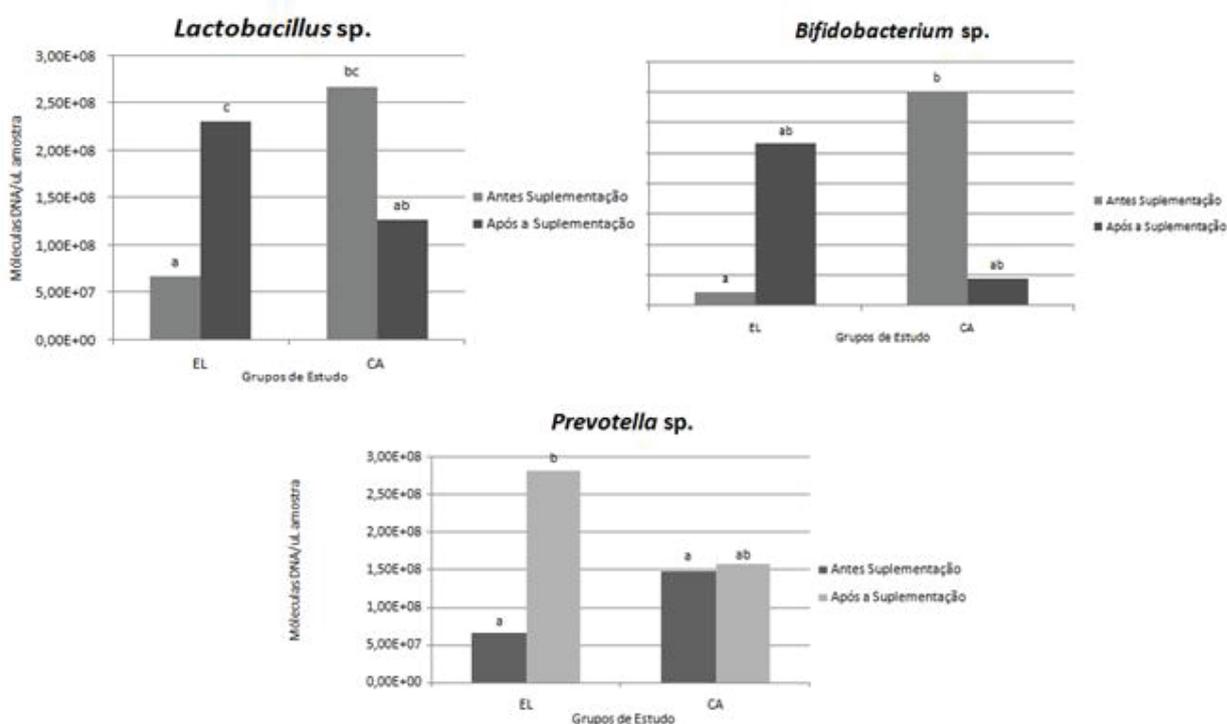
Chen e colaboradores (2017) observaram este mesmo comportamento com folhas de batata, correlacionando a estabilidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante com pH e interações enzimáticas ocorridas durante a digestão gastrointestinal. Os estudos mencionadas também encontram resultados similares para pHs de transição e básicos. No caso da *Ilex paraguariensis*, estima-se que o resultado encontrado em pH 5,5 (11,62 mgEAG/mL) tenha sido propiciado por estar próximo ao pH do extrato in natura, obtendo desta forma uma boa quantificação de fenólicos.

#### *Avaliação da ação moduladora de extrato de erva-mate livre e microencapsulado na microbiota intestinal*

Para avaliar a capacidade de modulação da microbiota intestinal através da ingestão de extrato de erva-mate livre e microencapsulado foi realizada uma suplementação *in vivo* com ratos Wistar por 45 dias. Amostras de fezes individuais dos animais foram analisadas antes e depois da suplementação através da técnica de qPCR para monitoramento dos microrganismos *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp. e *Prevotella* sp.

Os resultados obtidos em termos de quantificação de material genético para o gênero *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Prevotella* podem ser observados através da Figura 1.

Figura 1 - Avaliação da quantificação do material genético de *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp. e *Prevotella* sp. em relação aos diferentes grupos de estudo



EL: grupo de animais que recebeu suplementação de extrato livre. CA: grupo de animais que recebeu suplementação com água, grupo controle. Os grupos de estudo (n=10) foram suplementados desde o dia 0 até o dia 45 (1x ao dia) com dose efeito de 3,29mg de compostos/animal. Fonte: própria autora (2020)

Os valores estão expressos em forma de exponencial, obtidos através da média de avaliação dos animais de cada tratamento (n=10). Foi possível perceber o desempenho do extrato de erva-mate na modulação do microbioma intestinal para os microrganismos mencionados. Estes dados corroboram com as investigações existentes na literatura, citadas ao longo desta discussão, sobre a ação de compostos bioativos de diferentes matrizes alimentares na modulação intestinal, inserindo a *Ilex paraguariensis* neste contexto e comprovando a efetividade da dose equivalente a 3,29 mg de compostos fenólicos/animal/dia utilizados ao longo deste estudo.

Os animais inseridos no grupo de estudo que recebeu suplementação com extrato livre de erva-mate obtiveram desempenho considerável no aumento de *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp. e *Prevotella* sp.. Uma elevação na quantidade de moléculas de DNA/μL de amostra pode ser verificada ao final do estudo em comparação as avaliações realizadas antes do início da ingestão da *Ilex paraguariensis*. Na avaliação para o gênero *Lactobacillus* sp. uma quantidade de  $6,73 \times 10^7$  moléculas de DNA/μL de amostra foi observado antes do

consumo de extrato de erva-mate, após 45 dias, este número foi elevado a  $2,31 \times 10^8$  moléculas de DNA/ $\mu\text{L}$  de amostra, demonstrando uma diferença significativa na modulação deste microrganismo. Também foi possível verificar diferença significativa nas respostas encontradas para *Prevotella* sp. onde a quantidade de moléculas de DNA/ $\mu\text{L}$  aumentou de  $6,58 \times 10^7$  para  $2,83 \times 10^8$ . Com relação ao gênero *Bifidobacterium* sp. o aumento na quantificação das moléculas de DNA/ $\mu\text{L}$  de amostra foi observado, apesar de não significativo, verificou-se uma elevação de  $4,40 \times 10^5$  para  $5,33 \times 10^6$ .

Algumas avaliações *in vitro* contidas na literatura indicam a boa performance dos compostos bioativos sobre a microbiota intestinal, Owolabi e colaboradores (2020) testaram a ação de amido não digerível e metabólitos fenólicos de arroz roxo no microbioma, concluindo que ambos estão correlacionados ao aumento das quantidades de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. São encontrados também estudos *in vivo* relatando o comportamento de compostos fenólicos na microbiota intestinal, Li e outros (2020), após induzir uma dieta hiperlipídicas em cães entenderam que os filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, os mais abundantes no intestino, estão envolvidos na relação de simbiose ou disbiose intestinal, caracterizando obesidade e doenças crônica, todavia, efeito contrário foi observado nos animais que receberam juntamente na sua dieta compostos fenólicos provenientes de chá verde.

A característica probiótica dos polifenóis é bastante consolidada na comunidade científica, indicando modulação principalmente nos gêneros de bactérias benéficas, como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (QUATRIN et al., 2020), ambos avaliados positivamente no estudo com erva-mate.

São inexistentes na literatura trabalhos que incluam a *Ilex paraguariensis* como moduladora intestinal, os relatos encontrados contemplam matrizes que possuem compostos em sinergia com a erva-mate, como por exemplo, chá verde, citado anteriormente. Zhu e colaboradores (2020) estudaram as ações do chá verde na microbiota de roedores, confirmando as descrições já existentes, indicando aumentos da cepa de *Lactobacillus reuteri* em consonância a redução da família Clostridiaceae, utilizando em seus estudos doses de 6,7 mg de compostos fenólicos/animal/dia durante 140 dias. Nossas investigações com erva-mate totalizaram 45 dias com dose de compostos fenólicos inferiores, o que nos indica o potencial desta planta, propondo que pode haver melhores resultados se suplementada em maior quantidade durante mais tempo de estudo, expandindo as investigações para outros microrganismos, promotores de disbiose, por exemplo.

É possível encontrar relatos disponíveis na comunidade científica, de autores que indicam menor performance nas investigações para modulação do gênero *Prevotella*. Larsen et al (2019) mencionam que apesar de positiva, uma menor abundância foi encontrada com relação a este microrganismo após a ingestão de fibras de batata, quando comparado a *Bifidobacterium*, por exemplo. Atribuições semelhantes foram relatadas por Li e colaboradores (2020), em seu estudo com a utilização de chá verde, não caracterizando diferença significativa em alguns gêneros, dentre eles, *Prevotella* sp.

Na figura 1 podemos perceber o resultado alcançado após a suplementação com *Ilex paraguariensis* para o microrganismo *Prevotella* sp., a abundância encontrada é relativamente superior nos animais que receberam extrato de erva-mate livre após 45 dias de estudo. A quantificação máxima detectada antes da suplementação foi de  $6,58 \times 10^7$  moléculas de DNA/ $\mu$ L de amostra, com relação à quantificação encontrada após a suplementação com extrato de erva-mate, os valores encontrados foram de  $2,83 \times 10^8$  de DNA/ $\mu$ L de amostra. Essa resposta é estatisticamente significativa e indica o bom desempenho da erva-mate na modulação intestinal deste gênero.

Na avaliação do grupo controle após os 45 dias de estudo, para os microrganismos *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp. as maiores quantificações são  $1,27 \times 10^8$  e  $8,99 \times 10^5$  de moléculas de DNA/ $\mu$ L de amostra, respectivamente. Esses resultados são inferiores, quando comparados aos animais suplementados com *Ilex paraguariensis* ( $2,31 \times 10^8$  e  $5,33 \times 10^6$ , respectivamente), embora essa resposta não se apresente forma significativa para o gênero *Bifidobacterium*, indica que a quantificação foi maior para os animais que receberam erva-mate. Ao observar estes mesmos grupos, antes e após o tempo de tratamento, a característica é uma redução na abundância dos microrganismos avaliados, mesmo que esta redução não seja estatisticamente significativa. A hipótese que explica este comportamento é indução de estresse nos animais durante todo o período de estudo. Levando em consideração que todos os indivíduos foram submetidos as mesmas condições e o grupo controle não obteve como apoio em sua dieta compostos capazes de promover simbiose, neste sentido, sob estresse, resultaram na disbiose observada.

Neste contexto, Shi e colaboradores (2019) verificaram em suas investigações com aves, que os animais submetidos a estresse, os quais continham elevações na quantidade do hormônio cortisol em seus organismos, apresentaram alterações significativas na composição da microbiota intestinal, como aumento do filo Firmicutes e reduções do filo Bacteroidetes, caracterizando uma situação de disbiose intestinal. Ainda sobre a influência

do estresse na população microbiana, Audet (2019) faz uma abordagem bastante interessante sobre a propensão da ocorrência da disbiose em mulheres quando comparadas aos homens, devido às flutuações hormonais e estresse a que são submetidas biologicamente ao longo da vida. Audet relata que o estresse ocasionado pelos hormônios femininos é capaz de impulsionar crescimento e redução de cepas específicas na microbiota intestinal das mulheres, tendo fortes implicações na modulação do seu microbioma.

O extrato obtido a partir da infusão das folhas da *Ilex paraguariensis* teve efeito modulador sobre a microbiota intestinal de ratos, confirmando a hipótese de que seus compostos fenólicos possuem ação seletiva sobre os microrganismos presentes no intestino e propondo a possibilidade da realização de novas investigações, com outros modelos experimentais, contemplando microrganismos patogênicos do microbioma intestinal.

## CONCLUSÃO

A quantificação de compostos fenólicos no extrato de erva-mate evidencia o potencial antioxidante desta matéria-prima;

O extrato de *Ilex paraguariensis* tem efeito na modulação da microbiota intestinal de ratos para os microrganismos estudados, *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp., e *Prevotella* sp. quando avaliados antes e após a ingestão do extrato de erva-mate.

A simbiose da microbiota intestinal promovida pelos microrganismos *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp., e *Prevotella* sp. evidenciam mais um benefício da utilização da *Ilex paraguariensis* na dieta. Os resultados obtidos foram em modelo roedor, o que não descaracteriza a possibilidade deste comportamento ser estendido para o modelo humano.

## REFERÊNCIAS

ARNOUS, A.; MAKRIS, D.; KEFALAS, P. 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.

AUDET, M. Stress-induced disturbances along the gut microbiota-immune-brain axis and implications for mental health: Does sex matter? *Frontiers in Neuroendocrinology*, v.54, p. 01-15, 2019.

BHANDARKAR, N. S.; BROWN, L.; PANCHAL, S. K. Chlorogenic acid attenuates high-carbohydrate, high-fat diet-induced cardiovascular, liver, and metabolic changes in rats. **Nutricion Research**, v. 62, p. 78-88, 2019.

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.

BRACESCO, N. et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 378–384, 2011.

CANI, P. D.; JORDAN, B. F. Gut microbiota- mediated inflammation in obesity: a link with gastrointestinal cancer. **Nature**, v. 25, p1-12, 2018.

CHACAR, S. et al. Identification of Phenolic Compounds-Rich Grape Pomace Extracts Urine Metabolites and Correlation with Gut Microbiota Modulation, **Antioxidants**, v. 7, p 75-81, 2018.

CHACAR, S. et al. The Impact of Long-Term Intake of Phenolic Compounds-Rich Grape Pomace on Rat Gut Microbiota. **Journal of Food Scienci**, v.83, n.1, p. 246-251, 2018.

CHEN, Y. et al. Influence of in vitro gastrointestinal digestion on the bioavailability and antioxidant activity of polyphenols from *Ipomoea batatas* leaves. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 52, n. 5, p. 1131–1137, 2017.

CORREIA, R. T.; MCCUE, P.; MAGALHÃES, M. M.; MACÊDO, G.; SHETTY, K. Production of phenolic antioxidants by the solid-state bioconversion of pineapple was temixed with soy flour using *Rhizopus Oligosporus*. **Process. Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 2167-2172, 2004.

COWAN, T. E. et al. Chronic coffee consumption in the diet-induced obese rat: impact on gut microbiota and serum metabolomics. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25. p. 489–495, 2014.

DANNESKIOLD- SAMSOEA, N. B., et al. Interplay between food and gut microbiota in health and disease. **Food Research International**, v.115, p. 23–31, 2019.

FARIA, A. F.; MARQUES, M. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygiumcumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry**, v. 126, p.1571–1578, 2011.

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

GOWD, V. et al. Antioxidant and antidiabetic activity of blackberry after gastrointestinal digestion and human gut microbiota fermentation. **Food Chemistry**, v. 269, p.618–627, 2018.

HECK, C.I.; 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.

JIÃO, X. et al. Blueberry polyphenols extract as a potential prebiotic with anti-obesity effects on C57BL/6 J mice by modulating the gut microbiota. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.64, p. 88–100, 2019.

JUARISTI, M. G. et al. Absorption and metabolism of yerba mate phenolic compounds in humans. **Food Chemistry**, v. 240, p. 1028-1038, 2018.

KACZMAREK, J. L. et al. Broccoli consumption affects the human gastrointestinal microbiota. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.63, p. 27–34, 2019.

KIM, J. S.; SERRE, C. B. Diet, gut microbiota composition and feeding behavior. **Physiology & Behavior**, v. 192, p.177–181, 2018.

LADDU, D.; HAUSER, M. Addressing the Nutritional Phenotype Through Personalized Nutrition for Chronic Disease Prevention and Management. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 62, p. 9–14, 2019.

LANGE, K. W. et al. Medical foods in Alzheimer's disease. **Food Science and Human Wellness**, 22 de fevereiro de 2019. Disponível em: < <https://www-sciencedirect.ez116.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S2213453019300059>> Acesso em: março de 2019.

LAPARRA, M. J.; SANZ, Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. **Pharmacological Research**, v. 61, p. 219–225, 2010.

LARSEN, N. et al. Effect of potato fiber on survival of *Lactobacillus* species at simulated gastric conditions and composition of the gut microbiota in vitro. **Food Research International**, v.125. p. 01-09, 2019.

LEY, R. E.; TURNBAUGH, P.J.; GORDON, J. Microbial Ecology: Human microbes associated gut with obesity. **Nature**, v. 444 , p. 1022-1023, 2006.

LI, H.; WEI, C. Diet, Gut Microbiota and Obesity. **Journal Nutrition Health Food Science**, v. 3, n.4, p. 1-6, 2015.

LI, Y. et al. Green tea polyphenols decrease weight gain, ameliorate alteration of gut microbiota, and mitigate intestinal inflammation in canines with high-fat-diet-induced obesity. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v, 78, p 01-09, 2020.

MA, G., CHEN, Y. Polyphenol supplementation benefits human health via gut microbiota: A systematic review via meta-analysis. **Journal of Functional Foods**, v. 66, p. 01-11, 2020.

MARTÍN-PELÁEZ, S. et al. Effect of cocoa's theobromine on intestinal microbiota of rats. **Mol. Nutr. Food Res**, v. 61, p.1-10, 2017.

- 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.
- NABECHIMA, G. H. et al. Effect of the Mild Temperature and Traditional Treatments on Residual Peroxidase Activity, Color, and Chlorophyll Content on Storage of Mate (*Ilex paraguariensis*) Tea. **Journal of Food Science**, v.79, n. 2, p. 163-168, 2014.
- NA ZHANG, M. D. et al. Time for food: The impact of diet on gut microbiota and human health. **Nutrition**, v. 51-52, p. 80–85, 2018.
- NEVES, F. I. G.; VIEIRA, M. C.; SILVA, C. L. M. Inactivation kinetics of peroxidase in zucchini (*Cucurbita pepo* L.) by heat and UV-C radiation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 13, p. 158–162, 2012.
- OWOLABI, I. O. et al. Gut microbiota metabolism of functional carbohydrates and phenolic compounds from soaked and germinated purple rice. **Journal Functional Foods**, v. 66, p 01-13, 2020.
- PARNELL, J. A.; REIMER, R. A. Prebiotic fiber modulation of the gut microbiota improves risk factors for obesity and the metabolic syndrome. **Gut Microbes**, v. 3, p. 29-34, 2012.
- PÉREZ-BURILLO S. et al. Bioactivity of food melanoidins is mediated by gut microbiota. **Food Chemistry**, p. 01-38, 2020.
- QUATRIN, A. et al. Characterization and quantification of tannins, flavonols, anthocyanins and matrix-bound polyphenols from jaboticaba fruit peel: A comparison between *Myrciariatrunciflora* and *M. jaboticaba*. *J. Food Comp. Anal.*, v.78, p.59-74, 2019.
- 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.
- SAWSAN, M. E.; ARABY, E. Microbial regulation and protective effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in gamma-irradiated mice intestine. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, p. 64-73, 2014.
- SHANDU, V. K. et al. Feeding the microbiota-gut-brain axis: diet, microbiome, and neuropsychiatry. **Translational Research**, v.179, p.223-244, 2017.
- SHI, D. et al. Impact of gut microbiota structure in heat-stressed broilers. **Poultry Science**, v. 98, p. 2405-2413, 2019.
- SILVA, E. M.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, v. 55, p. 381–387, 2007.

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, Jan./Mar., 2012.

TAN, J. B. L.; LIM, Y. Y. Critical analysis of current methods for evaluating activity antioxidant and antibacterial properties of plant extracts. **Food Chemistry**, v. 172, p. 814-822, 2015.

TILMAN, D.; CLARK, M. Global diets link environmental sustainability and human health. **Nature**, v. 515, p. 518-532, 2014.

TRUGO, L.C.; MACRAE, R. Chlorogenic acid composition of instant coffees. *Analyst* 109:263-266; 1984.

TURKMEN, N.; SARI, F.; VELIOGLU, Y. S. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods*, v. 99, p. 835-842, 2006.

WANG, B. et al. The Human Microbiota in Health and Disease. **Engineering**, v. 3, p. 71-82, 2017.

ZHU, J. et al. Preventive consumption of green tea modifies the gut microbiota and provides persistent protection from high-fat diet-induced obesity. **Journal of Functional Foods**, v. 64, p. 01-09, 2020.