



## Área: Ciência de Alimentos

# CONSUMO DE *Ilex paraguariensis* NA MODULAÇÃO *IN VIVO* DE *Bifidobacterium* sp.

Samuel Teixeira Lopes<sup>a\*</sup>, Daiane Santos, Júlia Pedó Gutkoski, Elionio Galvão Frota, Rômulo Pillon Barcelos, Giseli Ritterbusch, Telma Elita Bertolin

*a. Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos, Curso de Engenharia Química, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS.*

*\*E-mail: 173907@upf.br*

**RESUMO** – A microbiota intestinal está relacionada com os processos fisiológicos dos indivíduos e possui influência na promoção da saúde. Escolhas alimentares atuam diretamente na regulação de simbiose ou disbiose no intestino, onde os alimentos bioativos demonstram influência seletiva sobre a microbiota, promovendo a homeostase no organismo. Sendo assim, a *Ilex paraguariensis* é uma planta nativa do sul da América que contém em sua composição substâncias fenólicas, conhecidas pela sua ação antioxidante e, mais recentemente, na atuação sobre o microbioma. Entretanto, o consumo de compostos funcionais é um desafio devido a degradação após a ingestão, sendo que técnicas de encapsulação podem ser empregadas para sua preservação e liberação controlada. Deste modo, objetivamos avaliar a modulação da microbiota intestinal *in vivo* pelo consumo de extrato de erva-mate microencapsulado. Para isso, dois grupos de ratos Wistar machos (n=10) receberam suplementação de microcápsulas com extrato de erva-mate (CE), com dose diária de 3,29 mg de compostos fenólicos, ou sem extrato (CV) durante 45 dias. Ao final desse período quantificou-se o gênero *Bifidobacterium* sp. em amostras de fezes, através da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR). Os resultados demonstraram que não houve um aumento significativo de *Bifidobacterium* sp. (de  $2,10 \times 10^6$  para  $2,52 \times 10^6$  moléculas de DNA/ $\mu$ L de amostra) no grupo CE com a dose suplementada de compostos fenólicos, não sortindo efeito modulador sobre este gênero. Estes resultados preliminares são importantes para ampliar o entendimento das propriedades da erva-mate e sua influência na alimentação.

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

## 1 INTRODUÇÃO

O padrão de alimentação tem sido apontado como um dos principais fatores que influenciam na suscetibilidade à doença, potencializando as estatísticas do aumento de doenças crônicas não transmissíveis como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, obesidade, doenças inflamatórias de intestino, alergias, síndromes metabólicas, distúrbios autoimunes e neuropsiquiátricos (LADDU; HAUSER, 2019; NA ZHANG et al., 2018; KACZMAREK et al., 2019).

Estima-se que o trato gastrointestinal humano é colonizado por mais de 100 trilhões de microrganismos. 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 (LI; WEI, 2015; ACEVEDO; PFEIFFER., 2021). Muitas doenças crônicas não transmissíveis vêm sendo associadas à atividade da microbiota intestinal em desequilíbrio, ou seja, disbiose. A disbiose caracteriza-se pela desordem das comunidades microbianas presentes no intestino (WANG et al., 2017; WU et al., 2020).

Microrganismos do filo Actinobactéria são considerados benéficos na microbiota intestinal, o gênero *Bifidobacterium* sp é um exemplo que pode ser citado. Sua atuação está relacionada com a geração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como acetato, propionato, butirato, lactato e succinato. 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 (ZMORA et al., 2018), além de estarem envolvidos na sensação de saciedade, sinalização de apetite, sendo propiciados por um padrão de alimentação saudável (SHANDU et al., 2017; KIM; SERRE, 2018).

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. Devido à associação da ação da microbiota com a disbiose e diversas patologias, existe um crescente interesse na manipulação do microbioma intestinal para obtenção de efeitos terapêuticos (DANNESKIOLD-SAMSOEA et al., 2019; SANTONI et al., 2021). Assim, o potencial benéfico de uma alimentação com ingestão de alimentos que possuam em sua composição substâncias bioativas, como compostos fenólicos, vem sendo investigada. A comunidade científica vem apontando que esses compostos 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; MA; CHEN, 2020; SHI et al., 2021).

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 polifenóis, metilxantinas, triterpeno, saponinas e outros. Evidências científicas têm demonstrando o potencial anti-inflamatório, antiobesidade e cardioprotetor da *Ilex paraguariensis* (BRACESCO et al., 2011; SANTO et al., 2021), sendo promissora para o uso no desenvolvimento de novos alimentos que apresentem interesse para o consumidor e para a indústria, além de representar uma boa alternativa, dada sua composição, para a modulação dos microrganismos presentes no intestino (SAWSAN; ARABY, 2014).

No entanto, 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 pH (MOURA et al., 2018). Neste sentido, técnicas de microencapsulação podem ser utilizadas para minimizar este problema. A encapsulação é uma tecnologia que permite proteger os bioativos das mais adversas condições de exposição ao ambiente externo, promovendo uma liberação controlada de compostos dentro do organismo, pois os agentes encapsulantes servem como membrana de revestimento que protegem as substâncias sensíveis (DEPRISCO; MAURIELLO, 2016; AKDENIZ et al., 2018). Neste sentido, objetivamos avaliar o impacto da ingestão de extrato de erva-mate microencapsulado como potencial agente modulador do gênero *Bifidobacterium* sp. no microbioma intestinal de ratos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Tratamento da matéria-prima

As folhas de erva-mate utilizadas foram selecionadas de diferentes quadrantes da plantação, sendo misturadas para dar origem a uma amostra representativa das condições de cultivo da propriedade. Após a colheita, as folhas foram separadas dos caules e branqueadas, para a inativação enzimática, através de imersão em água a 95 °C por 30 segundos e em seguida imersas em banho de gelo. As folhas branqueadas foram secas em estufa de circulação de ar a 50±2 °C por 20 horas, em camadas com altura ≤ 5 cm para evitar o excesso de sobreposição das folhas. Depois de secas, as mesmas foram trituradas em moinho de facas, com granulometria ≤ 0,5mm, embaladas a vácuo e congelada a -18±2 °C até a sua utilização.

### 2.2 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. O preparo do extrato consistiu em uma suspensão de erva-mate em água na proporção de 15 g de erva para cada 100 mL de água destilada, mantida em banho-maria a temperatura de 90±2 °C durante 5 min. Após esse período de decocção a mistura 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 com 300 mL, mantido em ultra freezer por 24 h a -80±2 °C e posteriormente submetido à liofilização por 80 h a -40±2 °C a fim de concentrar os sólidos e preservar sua atividade.

### 2.3 Microencapsulação do extrato liofilizado

Para a microencapsulação do extrato de erva-mate foi utilizada uma técnica de gelificação iônica por extrusão, utilizando alginato de sódio como material encapsulante reticulado com solução de cloreto de cálcio, conforme a metodologia proposta por Yan et al. (2014), com modificações. Resumidamente, uma suspensão de extrato de erva-mate liofilizado e alginato de sódio foi preparada na proporção de 1:5 partes de sólidos solúveis. Essa mistura foi aspergida através de um bico atomizador de *spray dryer* de 2 mm de abertura seguindo os seguintes parâmetros: vazão de alimentação por bomba peristáltica de 0,3 L.h<sup>-1</sup>, fluxo de ar de aspersão de 600 L.h<sup>-1</sup> a uma pressão de 3 bar.

As partículas atomizadas foram recolhidas em recipiente posicionado a uma altura de 8±5 cm do bico aspersor, contendo uma solução de cloreto de cálcio (1,5%) para promover a reticulação do alginato e formação das microcápsulas. A solução reticulante foi utilizada em uma relação de 1:3 partes de solução de alginato de sódio e as microcápsulas foram reticuladas durante 30 minutos, sob contínua agitação de 100 rpm.

Após esse período, as microcápsulas foram separadas do meio por filtração a vácuo e lavadas com água destilada para retirada do excesso de solução reticulante, congeladas em ultrafreezer a -80±2 °C por 24 horas e liofilizadas a -40±2 °C por 72 horas. Cápsulas vazias foram produzidas seguindo este mesmo método, sem a utilização do extrato de erva-mate para serem utilizadas como controle.

### 2.4 Eficiência de Encapsulação

A eficiência de encapsulação foi determinada através da razão entre o teor de compostos fenólicos totais quantificados no extrato antes da encapsulação e no sobrenadante da solução reticulante, recuperado após a completa reticulação das microcápsulas.



O conteúdo total de polifenóis do extrato e do sobrenadante foi determinado segundo o método descrito por Correia et al. (2004), com modificações propostas por Sousa e Correia (2012). Foi adicionado em tubos de ensaio 1 mL de amostra, 1 mL de álcool 96%, 5 mL de água destilada e 0,5 mL de reativo de Folin-Ciocalteu. Os tubos foram agitados por 10 segundos, em vórtex, e 1 mL de solução de carbonato de sódio  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  5% foi adicionado à reação, seguido de nova agitação por 3 segundos e repouso de 1 hora em ambiente protegido da luz.

A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis a 765 nm e os resultados foram quantificados de acordo com uma curva analítica expressa em mg equivalentes a ácido gálico por mL de amostra (mgEAG/mL).

A relação dos resultados entre o extrato de erva-mate liofilizado e do sobrenadante coletado demonstra a Eficiência de Encapsulação (EE), conforme Equação 1.

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

Onde  $CF_0$ : Compostos fenólicos totais do extrato inicial e  $CF_R$ : Compostos fenólicos totais do resíduo.

## 2.5 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 g de microcápsulas foram ressuspensas em 100 mL de água e submetidas a agitação por agitador magnético em velocidade máxima durante 90 minutos, em temperatura ambiente. Após a agitação, as microcápsulas foram separadas por filtração a vácuo e uma porção de 25 mL do filtrado foi transferida para placa de Petri (previamente tarada) e submetida a 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.

## 2.6 Avaliação Morfológica das Microcápsulas

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

## 2.7 Comportamento das Cápsulas em Diferentes Valores de pH

O perfil de liberação do extrato foi determinado através do método proposto por Chen et al. (2017) com modificações, submetendo o extrato microencapsulado a diferentes condições: pH ácido ( $2,0 \pm 0,30$ ), ajustado com solução de ácido clorídrico (HCl)  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  e pH básico ( $7,5 \pm 0,30$ ) utilizando solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ . Para os testes, 2,3 g de cápsulas, contendo 252,5 mg de compostos fenólicos foram homogeneizadas em 25 mL de água. A solução foi preparada utilizando as soluções para ajuste dos pH's desejados. Cada ensaio foi mantido por 2 horas em *shaker* a 37 °C sob agitação de 100 rpm.

Esse ensaio visa simular os pHs encontrados no trato digestivo. A análise da quantificação da atividade antioxidante *in vitro* em cada um dos tratamentos foi realizada no final do tempo estabelecido para cada pH, pelo método de FRAP, potencial antioxidante redutor férrico. Esta quantificação foi realizada 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  $\mu\text{L}$  de amostra da solução de cápsulas de erva-mate, após o tempo de *shaker* e 200  $\mu\text{L}$  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  $37 \pm 2$  °C. Após o repouso foi adicionado 3,6 mL de solução TPTZ (2,4,6-Tris (2 Piridil)-1,3,5 Triazina) e os tubos submetidos a um ambiente protegido da luz durante 10 minutos. O espectrofotômetro UV-Vis foi zerado em 620 nm com a amostra de branco. Os resultados foram interpretados utilizando curva padrão de  $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox/L de amostra.

## 2.8 Delineamento experimental da suplementação in vivo

Os ensaios para verificação da modulação da microbiota intestinal foram realizados em 20 animais (ratos Wistar, machos) divididos em 2 grupos ( $n=10$ ) que receberam diferentes tratamentos: grupo controle, que recebeu cápsulas vazias (CV) e o grupo que recebeu extrato de erva-mate microencapsulado (CE). A dose efeito que foi suplementada foi calculada de acordo com os valores reportados por Taguchi et al. (2015) com modificações, prevendo uma quantidade de 3,29 mg de compostos fenólicos/animal/dia.

A suplementação aconteceu uma vez ao dia por via de gavagem intragástrica, durante 45 dias ininterruptos. 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 suplementação das microcápsulas de erva-mate e microcápsulas controle. As amostras foram acondicionadas em ultrafreezer com temperatura de -80 °C até o momento da análise.



## 2.8.1 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. Desta forma, para a quantificação do gênero bacteriano selecionado para este estudo foi utilizado o método de reação em cadeia polimerase em tempo real (qPCR), proposto pelos autores Chacar et al. (2018). O grupo de bactéria selecionado para estudo foi o Filo Actinobactéria, gênero *Bifidobacterium* sp.

A extração de DNA das amostras de fezes dos animais foi realizada utilizando um kit para isolamento de DNA denominado *Purelink Microbiome DNA Purification Kit*. As análises de qPCR foram realizadas em equipamento *Quant Studio™ 3 and 5 Real-Time PCR Systems*. O volume total da reação da qPCR foi de 10 µL, sendo 5 µL de PowerUp SYBR Green Master Mix (*Thermo Fischer Scientific*), 0,5 µL de cada iniciador para a bactéria, 1 µL de amostra (DNA) 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.

## 2.9 Análise estatística

A análise estatística foi determinada com programa Statistica (versão 7.0), utilizando ANOVA e aplicação do teste de Tukey. Os resultados são expressos pela média ± desvio padrão. O valor de (p) inferior a 0,05 foi considerado como uma diferença significativa.

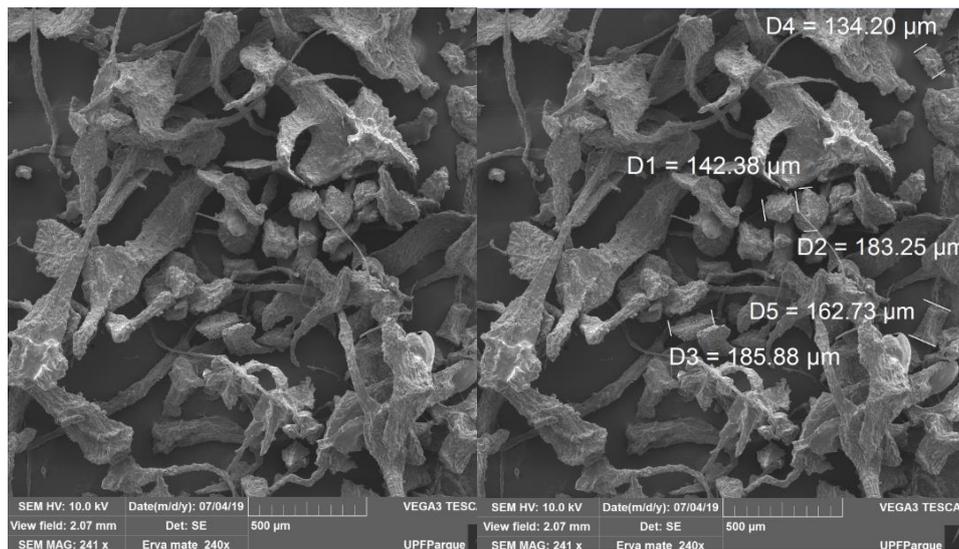
## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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 mucoadesividade, importante para adesão no intestino (AGUERO et al., 2017). O principal objetivo desta técnica no presente estudo foi conseguir reter o máximo de compostos bioativos dentro das cápsulas, neste sentido adotou-se o emprego do extrato concentrado (liofilizado) e a utilização de uma maior quantidade de núcleo em relação à quantidade de material de parede. Bajpai e Sharma (2004) relatam que o aumento da concentração de alginato retarda o processo de degradação da cápsula, interferindo no seu rompimento e podendo influenciar na eficiência de encapsulação.

O resultado para eficiência da encapsulação dos bioativos utilizada no protocolo *in vivo* foi de 46,5%, contendo 59,11 mg EAG de compostos fenólicos por grama de cápsula. As microcápsulas também foram avaliadas com relação ao seu perfil de solubilidade em água, apresentando uma média de 38,70±2,84%. A baixa solubilidade em água era uma característica desejada, uma vez que as microcápsulas precisaram ser ressuspensas antecipadamente para suplementação *in vivo*. Com relação à sua morfologia, empregou-se avaliação através da microscopia eletrônica de varredura, a qual pode ser observada na Figura 1, expressa com aumento de 240x.



Figura 1 - Avaliação morfológica das cápsulas



Fonte: Autores (2019)

É possível verificar na Figura 1 o formato irregular das cápsulas. As mesmas não apresentam formato esférico e variam seu tamanho entre de 134,20 µm até 185,88 µm. Os autores 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 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 ação no processo de liofilização, porém o formato das cápsulas de alginato ficou irregular após a secagem das mesmas. Neste sentido, sugerimos que apesar de irregulares as cápsulas protegeram minimamente os compostos de interesse, porém o formato irregular e poroso pode ter influenciado no perfil de liberação das mesmas no modelo *in vivo*, resultado que também foi corroborado através das observações nos ensaios *in vitro*, submetendo as estruturas em diferentes condições de pH, Tabela 1.

Tabela 1 – Avaliação das cápsulas erva-mate em diferentes condições de pH

Condição de pH da amostra	Tempo (1 hora) µmol Trolox/mL	Tempo (2 horas) µmol Trolox/mL
2,0±0,30	10,77±2,91 <sup>a</sup>	11,36±1,75 <sup>a</sup>
7,5±0,30	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: Autores (2019).

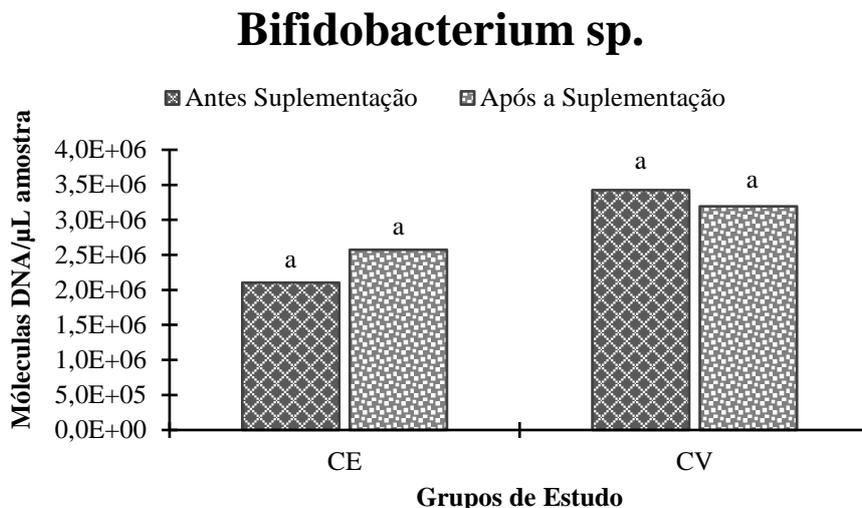
A utilização do alginato de sódio é desejável quando o objetivo é uma cápsula com liberação controlada no trato digestório, já que sua insolubilidade em pHs ácidos faz com que a cápsula de mantenha íntegra nestas condições (AGUERO et al., 2017). Em pHs mais elevados espera-se que ocorra o intumescimento da cápsula e por fim o seu rompimento, liberando os compostos bioativos (LOPES et al., 2016). Neste caso, estima-se uma quantificação maior de da 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 1 podem estar relacionados ao índice de solubilidade das microcápsulas, resultados acima de 35% que foram verificados em agitação durante 90 minutos e seu formato poroso. Para análises de pH, as microcápsulas foram ressuspendidas 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.

No protocolo *in vivo*, os resultados obtidos a partir da aplicação das microcápsulas, para quantificação de material genético do gênero avaliado, podem ser observados através da Figura 2.



Figura 2 - Avaliação da quantificação do material genético de *Bifidobacterium* sp. em relação aos diferentes grupos de estudo.



CE: grupo de animais que recebeu suplementação de extrato de erva-mate microencapsulado. CV: grupo de animais que recebeu suplementação com cápsulas vazias, grupo controle. Fonte: próprio autor (2020).

Os valores estão expressos em forma de exponencial, obtidos através da média de avaliação dos animais de cada tratamento (n=10). 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 suplementação com *Ilex paraguariensis*. Na avaliação para o gênero *Bifidobacterium* sp. uma quantidade de  $2,10 \times 10^6$  moléculas de DNA/μL de amostra foi observado antes do consumo de extrato de erva-mate, após 45 dias, este número foi elevado a  $2,52 \times 10^6$  moléculas de DNA/μL de amostra. Na avaliação do grupo controle, após os 45 dias de estudo, obtivemos a quantificação de  $3,19 \times 10^6$  moléculas de DNA/μL de amostra. Esse resultado não é significativo quando comparado aos animais suplementados com microcápsulas de *Ilex paraguariensis*.

As avaliações prévias de caracterização das microcápsulas indicavam uma estrutura irregular, porosa e com 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 era perdida 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 do grupo que recebeu extrato microencapsulado quando comparados com os animais do grupo controle, sem diferença significativa. Investigações realizadas por Ma e Chen (2020) declaram que suplementação com polifenóis estimula a abundância de 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. Neste sentido, sugere-se a utilização de uma dose efeito contendo maior teor dos compostos e maior tempo de ingestão, a fim de melhorar a eficiência dos resultados obtidos. Além disso, os animais suplementados com microcápsulas de erva-mate não apresentaram diferença estatística na modulação intestinal, podendo sugerir também a utilização do extrato livre em substituição às microcápsulas.

## 4 CONCLUSÃO

A suplementação com microcápsulas de erva-mate não apresentou uma modulação significativa de *Bifidobacterium* sp. em ratos, demonstrando resultados estatisticamente semelhantes no período antes e após a suplementação. Ademais, as microcápsulas de erva-mate não apresentaram diferença significativa frente às microcápsulas controle. Estes resultados são fundamentais para nortear novas investigações acerca do uso da *Ilex paraguariensis*, desta forma, sugere-se para estudos futuros a utilização de uma dose efeito mais significativa, em período de tempo mais extenso, incluindo extrato livre de erva-mate para avaliação em detrimento do encapsulado e incluindo novos gêneros do microbioma intestinal.

## 5 AGRADECIMENTOS

CNPq/MCTIC - Projeto: Erva-mate como componente funcional no desenvolvimento de processos e produtos alimentares (Processo: 442743/2016-5).

Laboratório de Virologia - UFGRS.



Laboratório CDSA (Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Sanidade Animal) – UPF.

## 6 REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, M. A. W., PFEIFFER, J. Microbiota-immune system interactions and enteric virus infection. **Current Opinion in Virology**, v. 46, p. 15–19, 2021.
- AGUERO, L.; ZALDIVAR-SILVA, D.; PEÑA, L.; DIAS, M. L. Alginate microparticles as oral 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.
- ARNOUS, A.; MAKRI, 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.
- 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.
- BENAVIDES, S.; CORTÉS, P.; PARADA, J.; FRANCO, W.. 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.
- BRACESCO, N. et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 378–384, 2011.
- 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.
- CHACAR, S.; TARIGHI, M.; FARES, N.; FAIVRE, J. F.; LOUKA, N.; MAROUN, R. G. Identification of Phenolic Compounds-Rich Grape Pomace Extracts Urine Metabolites and Correlation with Gut Microbiota Modulation, **Antioxidants**, v. 7, p 75–81, 2018.
- CHEN, Y.; FU, Z. F.; TU, Z. C.; WANG, H.; ZHANG, L.; XIE, X.; LIU, G. 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- LI, H.; WEI, C. Diet, Gut Microbiota and Obesity. *Journal Nutrition Health Food Science*, v. 3, n.4, p. 1–6, 2015.
- LOPES, M.; ABRAHIM, B.; VEIGA, F.; SEIÇA, R.; CABRAL, L. M.; ARNAUD, P.; RIBEIRO, A. J. Preparation methods and applications behind alginate-based particles. **Expert Opinion on Drug Delivery**, p. 1–14, 2016.
- LÓPEZ-CORDOBA, A.; DELADINO, L.; MARTINO, M. 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.
- MOURA, S. C.; BERLING, C. L.; GERMER, S. P.; ALVIM, I. D.; HUBINGER, M. D. Encapsulating anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. calyces by ionic gelation: Pigment stability during storage of microparticles. **Food Chemistry**, v. 241 p. 317–327, 2018.
- 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.
- 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.
- SANTO A. T. E. et al. Decaffeination of yerba mate by supercritical fluid extraction: Improvement, mathematical modelling and infusion analysis. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 168, p. 01–10, 2021.



- SANTONI M., MICCINI F., BATTELLI N. Gut microbiota, immunity and pain. *Immunology Letters*, v. 229, p. 44–47, 2021.
- 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, Y. et al. Encapsulation of bioactive polyphenols by starch and their impacts on gut microbiota. *Current Opinion in Food Science*, v. 38, p. 102–11, 2021.
- 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
- 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-Cioltu methods. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods*, v. 99, p. 835-842, 2006.
- TAGUCHI, C.; FUKUSHIMA, Y.; KISHIMOTO, Y.; SUZUKI-SUGIHARA, N.; SAITA, E.; TAKAHASHI, Y.; KONDO, K. Estimated Dietary Polyphenol Intake and Major Food and Beverage Sources among Elderly Japanese. *Nutrients*, v. 7, p. 10269–10281, 2015.
- YAN et al. Preparation of phycocyanin microcapsules and its properties. *Food and bioproducts processing*, v. 92, p. 89-97, 2014.
- WANG, B. et al. The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering*, v. 3, p. 71–82, 2017.
- WU, H. et al. Antibiotic-induced dysbiosis of the rat oral and gut microbiota and resistance to *Salmonella*. *Archives of Oral Biology*, v. 114, p. 104730, 2020
- ZMORA N., SUEZ J., ELINAV E. You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. *Nature Rev Gastroenterol Hepatol*, v. 16,p. 35–56, 2019.