



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS ERECHIM
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

DIEGO TESSARO

BENEFÍCIOS DO USO DE SUPLEMENTOS NA ERVA-MATE
(Ilex paraguariensis)

ERECHIM-RS

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS ERECHIM
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

DIEGO TESSARO

BENEFÍCIOS DO USO DE SUPLEMENTOS NA ERVA-MATE
(Ilex paraguariensis)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Rosilene Rodrigues Kaiser Perin (*in memoriam*) e Prof. Dr. Paulo Afonso Hartmann

ERECHIM-RS

2021

DIEGO TESSARO

***BENEFÍCIOS DO USO DE SUPLEMENTOS NA ERVA-MATE
(Ilex paraguariensis)***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS. Para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, defendido em banca examinadora em 31 de março de 2021.

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Rosilene Rodrigues Kaiser Perin (*in memoriam*) e Prof. Dr. Paulo Afonso Hartmann.

Aprovado em: 31/03/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Afonso Hartmann - UFFS Campus Erechim

Prof. Sc. Leandro Galon - UFFS Campus Erechim

Prof^a Dr^a. Noryam Bervian Bispo - IFRS Campus Sertão

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida, por me guiar nesta minha caminhada e por me permitir a conquistar os meus objetivos.

Aos meus pais Ocimar e Flavia, pelo o amor e apoio em todos os dias difíceis e por acreditarem no meu potencial. Vocês são meu porto seguro!

Ao meu irmão Pedro Henrique, por sempre estar ao meu lado.

A minha namorada Vanieli, pelo incentivo, pelo apoio, pelos momentos em que não pude estar presente.

A minha eterna orientadora Prof^a. Dr^a. Rosilene Rodrigues Kaizer Perin (*in memorian*), por sempre me incentivar, apoiar em todos os momentos, por não desistir e acreditar sempre em meu potencial, pois sem o seu apoio nada estaria se concretizando. Meu eterno agradecimento a senhora.

Ao meu orientador Dr. Paulo Afonso Hartmann por estar presente em um momento muito difícil para um discente, pelo apoio, pela compreensão, pelos ensinamentos e conselhos, o meu muito obrigado.

O meu agradecimento aos meus amigos e colegas de laboratório, Wagner, Nathália, Wallace, Ana Paula, Amanda, por todo apoio, pelos dias que se fizeram ausentes em suas famílias para estarem presentes nos experimentos, vocês são parte fundamental desta conquista.

A UFFS e IFRS, pela oportunidade de realizar meus estudos e experimentos.

A todos os Professores que de uma forma ou outra me ajudaram com seus ensinamentos e inspirações.

Aos meus colegas pela troca de conhecimentos, experiências acadêmicas e também de vida.

Por fim, a todos de que uma forma ou outra estiveram presentes, o meu muito obrigado.

RESUMO

A erva-mate é uma planta nativa da América do Sul, amplamente consumida por meio de infusão de suas folhas secas e moídas, conhecida como “chimarrão”, “mate” e/ou “tererê”. A presença de propriedades antioxidantes na erva-mate torna o estudo desta planta relevante, podendo contribuir em pesquisas que avaliam o efeito de seus compostos na proteção contra estresses oxidativos que podem ocasionar doenças neurodegenerativas. Apesar de possuir benefícios a saúde, há relatos de presença de metais pesados em extratos obtidos a partir de infusão de suas folhas, sendo o ferro (Fe) encontrado em grande quantidade na erva-mate. Para reverter efeitos cumulativos de Fe no organismo, é indicado o uso de Deferoxamina (DFX), sendo um potente quelante deste metal. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antioxidante do extrato microencapsulado de erva-mate, o efeito do ferro, e os benefícios da suplementação desse produto com Deferoxamina (DFX) tendo como organismo modelo o *Danio rerio* (Zebrafish). A metodologia foi realizada a partir da obtenção do extrato líquido da erva-mate, onde foi preparado a 85°C simulando uma infusão do chimarrão. Para a obtenção de microcápsulas de erva-mate, o extrato líquido juntamente com a maltodextrina (agente encapsulante) foram submetidas à secagem em *spray dryer*. Foram avaliados os efeitos da exposição aguda ao extrato microencapsulado de erva-mate, erva-mate associado ao Fe, erva-mate associado ao Fe mais a DFX e erva-mate associado a DFX, sobre o *status* do sistema antioxidante enzimático e peroxidação lipídica em Zebrafish. Observou-se que a suplementação do extrato de erva-mate pode ser considerada benéfica para o organismo utilizado no estudo, pois foi observada peroxidação lipídica, principalmente no grupo tratado com Fe + Erva + DFX, contribuindo para o *status* do sistema de defesa antioxidante enzimático, demonstrando serem bons candidatos para a suplementação da erva-mate.

Palavras-chave: *Danio rerio*, Antioxidantes, Microencapsulado, Deferoxamina.

ABSTRACT

Yerba mate is a plant native to South America, widely consumed in the form of chimarrão. The presence of antioxidant properties already known in yerba mate, makes the study of this plant something very relevant, and may contribute to research that evaluates the effect of its compounds in the protection against oxidative stresses that can cause neurodegenerative diseases. Despite having health benefits, there are reports of the presence of heavy metals in extracts obtained from the infusion of its leaves, where iron (Fe) is found in large quantities in yerba mate. To reverse the cumulative effects of Fe in the body, the use of Deferoxamine (DFX) is indicated, being a potent chelator of this metal. In this context, the objective of this work was to evaluate the antioxidant potential of the microencapsulated extract of yerba mate, the effect of iron, and the benefits of supplementing yerba mate with Deferoxamine (DFX) using *Danio rerio* (Zebrafish) as a model organism. The methodology was carried out by obtaining the liquid extract of yerba mate, where it was prepared at 85°C simulating an infusion of chimarrão. To obtain yerba mate microcapsules, the liquid extract together with the maltodextrin (encapsulating agent) was subjected to spray dryer drying. The effects of acute exposure to the microencapsulated extract of yerba mate, yerba mate associated with Fe, yerba mate associated with Fe plus DFX and yerba mate associated with DFX, on the *status* of the enzymatic antioxidant system and lipid peroxidation were evaluated. Zebrafish. However, it was observed that the supplementation of yerba mate extract can be considered beneficial for the organism used in the study, a consequence that lipid peroxidation was not observed, especially in the group treated with Fe + Yerba + DFX, contributing to the *status* of the system enzymatic antioxidant defense, proving to be good candidates for yerba mate supplementation.

Keywords: *Danio rerio*, antioxidants, microencapsulated, deferoxamine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Frutos (A), Folhas (B) e forma de consumo (C) de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i>).	12
Figura 2: Dados da Produção Agrícola Municipal (PAM) 2017 de erva-mate plantada.	13
Figura 3: Organismo modelo usado no presente estudo: <i>Danio rerio</i>	16
Figura 4: Metabolismo do Ferro em humanos.	18
Figura 5: Formação de dois complexos entre o metal (M) e o agente quelante (C). Na estrutura A ocorre a formação de um complexo estável onde impede a interação com biomoléculas (B). Na estrutura B ocorre uma formação de um complexo que permite reações com as biomoléculas.	20
Figura 7: Exposição aguda do organismo modelo Zebrafish aos diferentes tratamentos.	23
Figura 8: Atividade da enzima CAT (U/mg de proteína/minuto) em cérebro de Zebrafish após exposição crônica ao extrato microencapsulado de erva-mate, Fe e DFX.	25
Figura 9: Atividade da enzima SOD ($\mu\text{mol}/\text{min}$ de proteína) em cérebro de Zebrafish, após exposição crônica ao extrato microencapsulado de erva-mate, Fe e DFX.	26
Figura 10: Análise do nível de peroxidação lipídica (nmol de MDA/mg de Proteína) em cérebro (A) e corpo (B) de Zebrafish em exposição crônica ao extrato microencapsulado de erva-mate, Fe e DFX.	27
Figura 11: Atividade da peroxidação pelo FOX (oxidação do ferro por xilenol laranja) (CHP/g peso úmido) em corpo de Zebrafish após exposição crônica ao extrato microencapsulado de erva-mate, Fe e DFX.	28

LISTA DE ABREVIATURAS

A β	Beta-amiloide
Al	Alumínio
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Cu	Cobre
DA	Doença de Alzheimer
DFX	Deferoxamina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Doença de Parkinson
EDTA	Ácido Etileno Diamina Tetra-Acético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
Fe	Ferro
FOX	Oxidação do Ferro por Xilenol Laranja
Fpn1	Hemocromatose clássica tipo I
GPx	Glutationa-peroxidase
GR	Glutationa-redutase
HfE	Hemocromatose clássica tipo I
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFRS	Instituto Federal do Rio Grande do Sul
PAM	Produção Agrícola Municipal
Pb	Chumbo
PEVS	Produção de Extrativismo Vegetal e da Silvicultura
SOD	Enzima Superóxido Dismutase
TBARS	Substância Reativa ao Ácido Tiobarbitúrico
TfR	Receptor de Transferrina
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	OBJETIVOS	11
2.1	OBJETIVO GERAL	11
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3	REVISÃO DA LITERATURA	12
3.1	ERVA-MATE	12
3.2	MICROENCAPSULAMENTO	14
3.3	ORGANISMO MODELO	16
3.4	FERRO	17
4	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1	NOTA ÉTICA	21
4.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO DE ERVA-MATE	21
4.3	MICROENCAPSULAMENTO	21
4.4	PROCEDIMENTOS DO <i>DANIO RERIO</i>	22
4.5	TRATAMENTO AGUDO	22
4.6	ANÁLISE ENZIMÁTICA	23
4.6.1	<i>Preparo do extrato</i>	23
4.6.2	<i>Atividade da Catalase (CAT)</i>	23
4.6.3	<i>Análise da peroxidação lipídica (TBARS)</i>	24
4.6.4	<i>Análise Superóxido Dismutase (SOD)</i>	24
4.6.5	<i>Análise da peroxidação pelo FOX</i>	24
4.6.6	<i>Análises estatísticas</i>	24
5	RESULTADOS	25
5.1	ANÁLISES EM ZEBRAFISH	25
5.1.1	<i>Atividade da Catalase (CAT)</i>	25
5.1.2	<i>Análise Superóxido Dismutase (SOD)</i>	25
5.1.3	<i>Análises de peroxidação lipídica (TBARS)</i>	26
5.1.4	<i>Análise da peroxidação pelo FOX (oxidação do ferro por xilenol laranja)</i>	28
6	DISCUSSÃO	29
7	CONCLUSÃO	32
8	TRABALHOS FUTUROS	32
	REFERÊNCIAS	33
	ANEXOS	42

1 INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguayensis*, St. Hill), é uma espécie nativa da América do Sul e tem sua área de ocorrência natural restrita a três países: Brasil, Paraguai e Argentina (VIEIRA et al., 2010). Esta planta é utilizada para preparo, por meio de infusão de suas folhas secas e moídas, de uma bebida utilizada por grande parte da população. Recebe diferentes nomes, dependendo da região e forma de preparo: no sul do Brasil é conhecido como “chimarrão”, na Argentina e Uruguai “mate”, e “tererê” no Paraguai (BRACESCO et al., 2010; HECK e MEJIA, 2007). Apresenta grande importância cultural estado do Rio grande do Sul e nacional e contribuindo no processo de desenvolvimento econômico, social cultural e também ambiental (PICOLOTTO et al., 2013). A cultura da erva mate também tem um papel fundamental, em especial, para agricultura familiar ou pequenos produtores, ou mesmo para áreas de cultivo onde a semeadura de outras culturas, como milho, soja, trigo, cevada, canola não são possíveis de serem práticas pela declividade elevada do terreno ou pelas características físicas e químicas do solo serem desfavoráveis. Ainda essa cultura pode ser cultivada em consórcio com outras como milho, feijão, soja, dentre outras, para assim se ter maximização do uso da terra e maior retorno econômico ao produtor.

A erva-mate é uma planta arbórea que apresenta em suas folhas uma diversidade de compostos químicos, reconhecidos por desempenharem efeitos benéficos à saúde humana (RIGO et al., 2014). Os estudos dos compostos presentes em bebidas elaboradas a partir de suas folhas ganharam maior destaque em função da sua capacidade antioxidante (CORREA et al., 2011).

A ingestão de extratos de erva-mate tem potencial para que ocorra um crescimento das defesas antioxidantes do organismo, reduzindo os ataques de radicais livres (SCHINELLA et al., 2000). A erva-mate apresenta grande potencial antioxidante devido a presença de polifenóis (SILVA et al., 2008), que constituem cerca de 11% do peso da matéria seca (PIZARRO et al., 1994). As suas propriedades antioxidantes estão associadas ao alto teor de compostos fenólicos, principalmente o ácido clorogênico e seus derivados de (3,4-di-O-cafeoilquínico), (3,5-di-O-cafeoilquínico), e (4, ácidos--S dicafeoilquínico 5-de, ácido caféico), bem como a presença de flavonoides como quercetina, rutina, kaempferol e luteolina (SCHMALKO e MEJIA, 2008).

Os compostos fenólicos são descritos como eficazes na redução do estresse oxidativo, onde engloba o conjunto de condições intra e extracelulares, sendo relacionado com a precaução e retardo de doenças, em consequência à perda dessas espécies reativas de oxigênio (EROs) (BASTOS et al., 2006). Contudo, pode ocorrer um estresse oxidativo devido a uma perda das

defesas antioxidantes ou um acréscimo na produção destas espécies reativas (HALLIWELL e GUTTERIDE, 2010).

O estresse oxidativo tem seus danos minimizados pelo sistema de defesa antioxidante não enzimático ou enzimático, sendo este último representado principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona-peroxidase (GPx) e também a glutathiona-redutase (GR) (BONNEFOY et al., 2002). A SOD é uma metaloenzima abundante em células aeróbicas como os neurônios que dismuta o radical superóxido à peróxido de hidrogênio. Já a CAT é uma ferrihemoenzima que tem como principal função dismutar o peróxido de hidrogênio, formando água e oxigênio molecular (FRIDOVICH, 1998).

Embora receba atenção devido ao elevado teor de compostos bioativos, a erva-mate pode ter seus efeitos reduzidos por fatores externos e internos, devido à alta sensibilidade destes compostos à temperatura, oxidação, pH e luz (DE CAMPOS et al., 2007; SHINELLA et al., 2000), condições de clima, de solo, de cultivo, dentre outros. Neste contexto, houve avanço em estudos com o objetivo de aprimorar a composição do extrato aquoso de erva-mate, com o uso de tecnologias de concentração, devido a grande diversidade de fitoquímicos com propriedades funcionais, como os compostos fenólicos, alcaloides, flavonoides e terpenóides (MURAKAMI et al., 2011; PRUDÊNCIO et al., 2012; BOAVENTURA et al., 2013). Este avanço possibilitou sua aplicação na produção de medicamentos e cosméticos, bem como, no desenvolvimento de novos produtos e ingredientes de suplementação alimentar (DONADUZZI et al., 2000; VIEIRA et al., 2008). Berté et al. (2011) elaboraram extratos de erva-mate aplicando a tecnologia *spray drying* e indicaram, com base na análise da capacidade antioxidante e da composição fitoquímica do produto obtido, que com o a utilização dessa tecnologia é possível compor uma fonte de matéria prima para indústria.

O consumo de biocompostos de erva-mate propicia efeitos positivos na manutenção a saúde e são capazes de modular a fisiologia do organismo, promovendo ações neuroprotetoras (CITTADINI et al., 2019; COLPO et al., 2016), atuando na redução da inflamação e do estresse oxidativo (PETRILLI et al., 2016), na diminuição de perfil lipídico (BRACESCO, et al., 2019). Para manter e melhorar sua disponibilidade pode ser empregado processos de microencapsulamento, uma tecnologia que vem crescendo e devido a capacidade de contornar problemas relacionados à estabilidade dos compostos bioativos e ao desempenho de sua atividade antioxidante (AUGUSTIN e HEMAR, 2008; DE VOS et al., 2010). Um requisito importante neste processo é a eficiência do encapsulamento, que está diretamente relacionada ao núcleo e ao material da parede escolhidos. É essencial escolher um sistema que considere a afinidade entre os ativos e a parede, bem como a finalidade e o mecanismo de liberação (DE

VOS et al., 2010). A liberação controlada do material encapsulado pode ocorrer em função de diferentes condições, como pH, temperatura e umidade, sendo capaz de ocorrer de forma gradativa ou instantânea (WANG et al., 2007). Assim, vêm sendo utilizado em processos de microencapsulação materiais de parede como a maltodextrina, por produzir microcápsulas mais estáveis, permitir uma maior proteção aos agentes encapsulados contra a oxidação e também por apresentar propriedades físico-químicas desejáveis, como por exemplo, a alta solubilidade em água, baixa viscosidade, e produção de soluções incolores (GHARSALLAOUI et al., 2007; ELNAGGAR et al., 2010).

Embora a erva-mate possua benefícios à saúde, há relatos da presença de altos níveis de metais pesados em extratos obtidos a partir de infusão de suas folhas (BORTOLI et al., 2018). Isto deve-se ao fato de a erva-mate crescer naturalmente em solos com pH ácido, o que promove um aumento da biodisponibilidade de íons, que são facilmente solubilizados na forma de sais básicos, como é o caso do ferro (Fe) (GAIAD et al., 2006).

O Fe está presente em grande quantidade na erva-mate, sendo um componente vital da hemoglobina e participando da produção e liberação de energia no corpo. É fundamental para a homeostase celular, importante para o metabolismo energético, síntese de DNA e indispensável para o transporte de oxigênio (LUNDBLAD e DAVIES, 2016). Porém, quando em excesso é depositado em tecidos por todo o corpo, podendo ocorrer sintomas e complicações caso acumule nos órgãos endócrinos (especialmente o pâncreas, as gônadas e a hipófise), no fígado e no coração (KAUR et al 2003). No cérebro, a principal forma de armazenamento de ferro é na forma orgânica, sendo leve e não- reativa a L-ferritina, onde estabiliza o complexo oxidante ferro-catalisado, promovendo um armazenamento duradouro de (BEARD, 2001).

Para reverter este efeito cumulativo do Fe, a Organização Mundial da Saúde recomenda o uso da Deferoxamina (DFX), comumente empregada para o tratamento de várias doenças hematológicas. A DFX tem um bom perfil de segurança e é um potente quelante de ferro, onde tem sido estudado em eventos cardiovasculares (HURN et al., 1995) e na sepse (RITTER et al., 2004). Há indicativos que a DFX diminui o dano oxidativo e a mortalidade após a indução de sepse (RITTER et al., 2004), podendo prevenir ou até mesmo reverter os efeitos da produção de radicais livres (VULCANO et al., 2000). Segundo Halliwell e Gutteride (2010), os antioxidantes não enzimáticos também fazem parte do complexo antioxidante de manutenção do estado redox, como a deferoxamina.

Boaventura et al. (2015) mostram uma melhora nos sistemas antioxidantes de defesa e peroxidação lipídica em indivíduos saudáveis que ingeriram 200 mL de infusão de chá mate concentrada em jejum. Amostras de sangue destes indivíduos apresentaram aumento

significativo das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase, glutaciona peroxidase e de glutaciona reduzida e melhora na capacidade antioxidante sérica sem promover efeitos pró-oxidantes. Pereira et al., (2017) obtiveram resultado semelhante ao tratar ratos Wistar fêmeas na perimenopausa com 20 mg de chá mate/dia. Foi obtida uma redução no estresse oxidativo, ocasionado pela ativação de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase e glutaciona peroxidase e redução de malondialdeído, ou seja, nos níveis de peroxidação lipídica.

O uso de organismos modelos é uma ferramenta que permite avaliar o efeito do consumo de substâncias com potencial antioxidante, como o extrato de erva-mate microencapsulado, sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos. O *Danio rerio*, conhecido popularmente por peixe-zebra ou zebrafish, tem grande potencial de uso como organismo modelo, devido a sua rápida capacidade reprodutiva, seu genoma sequenciado e seus processos definidos de desenvolvimento (SUN et al., 2015).

Neste estudo foi determinado o potencial neuroprotetor do consumo do extrato microencapsulado de erva-mate em zebrafish, avaliando conjuntamente uma possível influência do Ferro (Fe) presente na erva-mate, sobre o *status* do sistema antioxidante enzimático, por meio da determinação da atividade da Superóxido dismutase (SOD) e Catalase (CAT), e da Peroxidação Lipídica através de TBARS e FOX. Adicionalmente, avaliou-se o efeito do consumo do extrato microencapsulado de erva-mate associado à Deferoxamina (DFX) e seu papel para prevenir ou estimular o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, e os efeitos benéficos da suplementação na erva-mate.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar o potencial antioxidante do extrato microencapsulado de erva-mate, o efeito do Fe, e os benefícios da suplementação da erva-mate com Deferoxamina (DFX) usando como modelo experimental o Zebrafish;

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da exposição aguda ao extrato microencapsulado de erva-mate sobre o status do sistema antioxidante enzimático e peroxidação lipídica em Zebrafish (*Danio rerio*);
- Avaliar o efeito da exposição aguda ao extrato microencapsulado de erva-mate associado ao Fe sobre o status do sistema antioxidante enzimático e peroxidação lipídica em Zebrafish;
- Avaliar o efeito da exposição aguda ao extrato microencapsulado de erva-mate associado ao Fe mais DFX sobre o status do sistema antioxidante enzimático e peroxidação lipídica em Zebrafish;
- Avaliar o efeito da exposição aguda ao extrato microencapsulado de erva-mate associado a DFX sobre o status do sistema antioxidante enzimático e peroxidação lipídica em Zebrafish.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ERVA-MATE

A *Ilex paraguariensis*, popularmente conhecida como erva-mate, é uma planta de espécie nativa da América do Sul pertencente à família das Aquifoliaceae, sendo principalmente cultivada no Uruguai, Argentina, Paraguai e Brasil. As folhas e talos, uma vez processados, são utilizados na preparação de chás e bebidas, que podem ser consumidos como uma infusão preparada com água fria ou quente, chamada de "mate" no Uruguai e na Argentina, "tererê" no Paraguai e "chimarrão" no Brasil (Figura 1). O consumo nesses países tem uma conotação cultural, sendo uma tradição adquirida das populações nativas locais. Os consumidores podem beber de 1 a 2 L da infusão por dia, fomentando a sua cadeia produtiva (DARTORA et al., 2011; DELADINO et al., 2008; DELADINO et al., 2013; HECK e DE MEJIA, 2007).



Figura 1: Frutos (A), Folhas (B) e forma de consumo (C) de erva-mate (*Ilex paraguariensis*).

O cultivo da erva-mate pode ser por meio do sistema de produção extrativista, em que é colhida de plantas provenientes exclusivamente da regeneração natural conduzidas sob a sombra de espécies arbóreas nativas (erva-mate nativa) ou de plantios monoespecíficos e equiâneos com espaçamento definido e a pleno sol (erva-mate plantada). Na maior parte dos

casos, ocorrem, situações intermediárias com ervais nativos adensados ou então plantios com espécies arbóreas nativas ou exóticas plantadas no intuito de proporcionar sombra para a cultura (EMBRAPA, 2014). O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) reconhece essa diferença de acordo com a origem da produção; os dados sobre a erva-mate nativa são publicados no documento Produção do Extrativismo Vegetal e da Silvicultura (PEVS) e os dados sobre a erva-mate plantada são publicados no documento Produção Agrícola Municipal (PAM).

De acordo com dados publicados pela PAM em 2018, no Brasil a área plantada ou destinada à colheita de erva-mate em 2017 foi de 75.810 hectares, com produção de 619.003 toneladas e, valor de produção de R\$ 501.633,00, conforme demonstrado na Figura 2 (IBGE, 2018).

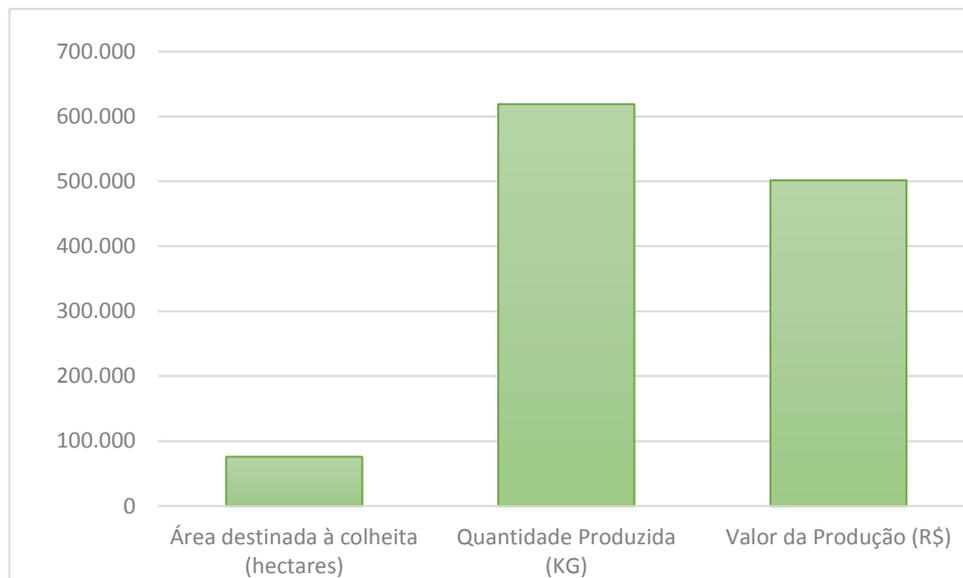


Figura 2: Dados da Produção Agrícola Municipal (PAM) 2017 de erva-mate plantada.

Fonte: IBGE, (2018).

A erva-mate não é consumida como um produto bruto, sendo necessário processamento antes de chegar ao consumidor. A sua produção industrial pode ocorrer de diferentes maneiras, mas de forma geral o processamento consiste nas etapas de colheita, torrefação/branqueamento ou sapeco, secagem, moagem, envelhecimento e embalagem. Após a colheita (mecanizada ou manual) a erva-mate é exposta diretamente ao fogo à temperatura entre 250 e 550°C durante um período que pode variar de 20 segundos a 8 minutos, com variações de acordo com o país em que a mesma é processada. Na sequência as folhas são expostas a uma corrente de ar quente para redução da umidade, sendo que, existem diferentes maneiras de se efetuar essa etapa de secagem, podendo durar de 3 a 18 horas. Em seguida é feita a trituração e a erva. Em países

como Argentina e Uruguai, o produto é submetida ao envelhecimento, que também apresenta variações, podendo ser natural (condições naturais de temperatura e umidade por cerca de 9 a 12 meses) ou forçado (armazenado sob condições controladas de temperatura, umidade e circulação de ar, pelo período de 30 a 60 dias). Normalmente, para o mercado brasileiro, durante o beneficiamento para chimarrão, a erva-mate é embalada e comercializada de imediato, garantindo assim uma característica apreciada pela maioria do mercado consumidor, a coloração verde. Por fim, a erva é misturada e embalada (JUNIOR; MORAND, 2016; HECK; DE MEJIA, 2007; ISOLABELLA et al., 2010; POLIDORO et al., 2016; EMBRAPA, 2014).

No processamento industrial da erva-mate podem ocorrer algumas mudanças no perfil e concentração de compostos bioativos, modificando suas atividades farmacológicas (LÓPEZ et al., 2006). Isobella et al. (2010), demonstraram que a erva-mate após as etapas de processamento (sapeco, secagem e envelhecimento) possui maior teor de princípios ativos, quando comparado a folhas verdes. A composição da erva-mate pode variar não só com as diferenças no processamento, mas também com a qualidade da matéria prima e as condições a qual a planta foi cultivada (CARDOZO et al., 2007). Segundo Streit et al. (2007) a exposição da planta a luz solar excessiva pode levar a um aumento no nível de polifenóis.

3.2 MICROENCAPSULAMENTO

As substâncias bioativas são intensamente variáveis e podem ser danificadas por vários fatores prejudicando a sua funcionalidade no organismo. Nesse caso, micro e nanotecnologias, como a microencapsulação, podem ser técnicas promissoras, vindo para agregar na proteção de compostos como as enzimas, células, medicamentos, cosméticos, extratos e ingredientes alimentares (BOTELHO et al., 2016).

O microencapsulamento pode proteger compostos, tendo como principal intuito reduzir perdas, proteger o material encapsulado, controlar o tipo de liberação, encobrir odor e/ou sabor do composto de interesse, a fim de melhorar a sua processabilidade (FANG et al., 2010; LAINE et al., 2008). Os fitoquímicos tidos como bioativos, a exemplo dos compostos fenólicos, podem ser protegidos por diferentes materiais de parede empregados no processo de encapsulação.

Conforme descrito por Risch e Reineccius (1995), uma das primeiras aplicações na indústria alimentícia foi o encapsulamento de aromatizantes por *spray dryer*, na década de 30. Desde então a tecnologia de encapsulação tem sido utilizada e, em decorrência das inúmeras atribuições benéficas, segue em rápida expansão. Em consequência disso o uso dos componentes encapsulados pode trazer benefícios à saúde dos consumidores (AUGUSTIN e

HEMAR, 2008; DESAI e JIN PARK, 2005; FANG; BHANDARI, 2010) e, propriedades adicionais a ingredientes e embalagens de alimentos.

De acordo com Kwak (2014) a microencapsulação é a tecnologia na qual os materiais de núcleo enriquecido com compostos de interesse são embalados em materiais de parede para formar um sistema de proteção. Esta tecnologia pode ser aplicável para materiais sólidos, líquidos ou gasosos. Os materiais, encapsulados ou não, com tamanho superior a 5000 μm são denominadas macro, entre 0,2 a 5000 μm micro, e menores que 100 nm, materiais nanométricos (AUGUSTIN e HEMAR, 2008; SILVA et al., 2014; TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008).

Quanto à sua morfologia, os encapsulados são constituídos por duas partes, chamadas de núcleo e parede, sendo que o núcleo consiste no material de interesse que se deseja encapsular e a parede confere a sua proteção ao ambiente externo, através da redução da taxa de evaporação e de transferência de material do núcleo para o meio circundante. Uma grande variedade de materiais de revestimento pode ser utilizada nas formulações, e estes materiais são classificados em quatro categorias: polímeros solúveis em água, polímeros insolúveis em água, material não polimérico solúvel em água e material não polimérico insolúvel em água (FANG e BHANDARI, 2010).

No encapsulamento para aplicações em alimentos, de modo geral, utilizam-se proteínas, carboidratos, gorduras, surfactantes de baixo peso molecular e co-polímeros. A estrutura molecular destes materiais e como eles podem ser montados em microestruturas físicas demonstra sua utilidade como encapsulantes relacionando-se a suas propriedades emulsionantes, sua viscosidade e formação de redes de gel (AUGUSTIN e HEMAR, 2008). Os carboidratos (amido, amidos modificados e gomas) são os materiais mais utilizados para a encapsulação em decorrência de sua aptidão em uma gama de compostos, além de sua diversidade e em alguns casos, baixo custo (RUTZ et al., 2013).

A maltodextrina ou amidos hidrolisados são amplamente utilizados na microencapsulação por *spray drying* de ingredientes alimentícios, onde estes carboidratos são formados pela hidrólise parcial, por ação de ácidos ou enzimas, do amido de milho e encontram-se disponíveis em diferentes dextroses equivalentes (DE), na qual indicam o nível de hidrólise do polímero de amido (GHARSALLAOUI et al., 2007). Maltodextrina tem uma grande utilização como material de parede devido a fatores como o baixo custo, auxílio na secagem de alimentos difíceis de desidratar, como sumos de frutos, baixa higroscopicidade, e por possuírem propriedades antioxidantes e de retenção de compostos voláteis (SOUZA et al., 2015). Sendo assim, é desejável a aplicação de maltodextrina como material de parede e com o objetivo de obter uma microencapsulação por *spray drying* eficaz, uma boa proteção contra a oxidação,

com alta retenção do material ativo e alta eficiência de encapsulação a baixo custo (JAFARI et al., 2008).

Mais uma vantagem desta tecnologia de microencapsulamento é a capacidade de camuflar possíveis odores e sabores desagradáveis na estruturação de novos produtos, o encapsulante se torna eficiente em reduzir as interações entre o núcleo e fatores externos, tendo uma diminuição tanto nas reações que possam vir a causar em perdas no aroma e sabor, quanto reduzir prejuízos em valores nutricionais dos alimentos (BORGOGNA et al., 2010).

O emprego desta técnica foi ampliado e estudos como o de Deladino et al. (2008) concluíram que a encapsulação permitiu adaptar a liberação de antioxidantes naturais de erva-mate.

3.3 ORGANISMO MODELO

O *Danio rerio* conhecido popularmente como zebrafish e/ou paulistinha é um pequeno peixe teleóstero de água doce medindo em torno de três a quatro centímetros, pertencente à família Cyprinidae (Figura 3) (SPENCE et al., 2008). O zebrafish pode ser considerado um interposto entre os seres humanos, por exemplo, tornando-se oportuno para a pesquisa nas áreas da genética, farmacologia e na toxicologia (MAXIMINO et al, 2011, GRUNWALD e EISEN, 2002).



Figura 3: Organismo modelo usado no presente estudo: *Danio rerio*.

Além da alta semelhança do genoma com a espécie humana, que compreende entre 70 a 80%, essa espécie ainda possui inúmeros sistemas de neurotransmissores semelhantes aos dos mamíferos (HOWE et al., 2013). Este teleóstero possui grande sensibilidade quando exposto a ensaios toxicológicos, podendo demonstrar, por exemplo, alteração em seu comportamento quando expostos a determinado toxicante, desde o início da vida até a idade adulta (KALUEFF

et al., 2016). Apesar de ser um modelo relativamente novo, o aumento de metodologias desenvolvidas ou adaptadas ao zebrafish podem impulsionar ainda mais o seu uso (REOLON et al., 2017).

Um grande interesse na pesquisa com o zebrafish é o seu uso para determinação das mutações e identificação de genes funcionalmente importantes. Por isso, uma das suas principais vantagens apoia-se no fato de seu genoma haver sido inteiramente sequenciado e de possuir homólogos em mamíferos (BRIGGS, 2002).

Seus hábitos são especialmente diurnos, no qual durante o período da manhã mostram seus maiores níveis de atividade, estes animais dormem com frequência, embora não tão somente durante a noite e este claro processo circadiano de atividade, é responsável por administrar tanto seus processos fisiológicos, bioquímicos, como comportamentais (DAMMSKI et al., 2011).

Pesquisas com zebrafish mostraram que os contaminantes presentes na água podem atrapalhar o sistema antioxidante, aumentando a suscetibilidade ao dano oxidativo (SACHETT et al. 2018; VALADAS et al. 2019). Estudos demonstraram que o ferro presente na água pode ser absorvido pelo peixe via brânquias, pele ou alimentação (ROEDER e ROEDER, 1966; ANDERSEN, 1997). Também, esse teleósteo oferece um excelente sistema para a análise de genes envolvidos no metabolismo do ferro (FRAENKEL, 2005). Seus principais componentes com homologia em humanos já foram descritos, como o Transportador bivalente de Metal 1, (DMT1), (DONOVAN, et al. 2002), o Receptor de Transferrina (TfR), (WINGERT, et al. 2004), Ferroportina (Fpn1), (DONAVAN et al, 2000), também conhecida como IREG1 (MCKIE et al., 2000) e MTP1 (ABBOUD e HAILE, 2000). Estas e outras características tornam a análise da metabolização do ferro possível neste modelo animal.

3.4 FERRO

O ferro (Fe) é um elemento necessário para o equilíbrio do organismo, já que participa de múltiplos processos metabólicos como cofator para inúmeras enzimas, no transporte de oxigênio, na síntese de DNA e em reações químicas de oxidação-redução (DOMINGOS, 2007). Este metal tem sido descrito como um elemento importante na patogênese dos mecanismos da neurodegeneração, sendo um dos metais mais abundantes na terra e essencial para todos os organismos (BURY, 2003). O entendimento do seu metabolismo e das disfunções relacionadas ao estresse oxidativo é fundamental para desvendar a fisiopatologia de doenças neurodegenerativas, como Doença de Parkinson (DP) e Doença de Alzheimer (DA), cada vez

mais prevalentes no nosso meio devido ao aumento da expectativa de vida (FERNANDEZ et al., 2007). Em estudos prévios do grupo de pesquisa, foi determinado um elevado teor de ferro, em uma concentração de 22,05 mg/L, em extratos aquosos de erva-mate obtidos à temperatura de 85°C (BORTOLLI, et al., 2018).

A sua absorção pode ser apontada com base em dois tipos de ferro: ferro heme e ferro não heme. A ingestão do ferro heme, que constitui a menor porção de ferro alimentar, ocorre principalmente através de fontes animais que são provenientes de porções heme das hemácias do sangue desses animais. O ferro não heme, é adquirido a partir das fontes vegetais e animais, onde é a maior parcela de ferro alimentar (SANTOS, 2010).

A absorção de ferro acontece em duas etapas: inicialmente, a absorção dos íons de ferro²⁺ do lúmen intestinal para a mucosa intestinal, e posterior transferência para o plasma onde se liga à transferrina, para ser transportado para os locais de armazenamento (LIMA, et al., 2001). Os íons ferro³⁺, ou seja, no estado trivalente, provenientes dos vegetais e cereais, necessitam serem convertidos em ferro²⁺ pela ação do citocromo B duodenal (Dcytb), logo após esta conversão, estes são absorvidos pela ação do transportador de metal bivalente-1 (DMT-1). Também, o ferro heme é absorvido pela proteína condutora do heme-1 (HCP1), que está localizada na membrana apical das células do duodeno (Figura 4) (GROTTO, 2008).

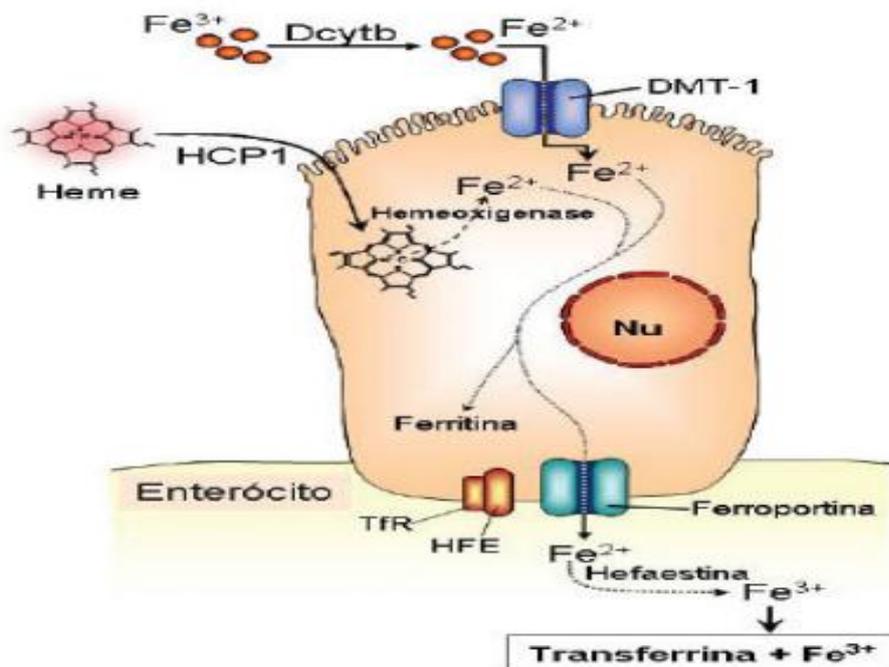


Figura 4: Metabolismo do Ferro em humanos.

Fonte: Grotto, 2008.

Segundo Falangola et al (2007), existe duas vezes mais ferro na neurópila de pacientes com Doença de Alzheimer do que em pacientes que não possuem demência. A Ferritina aumenta com a idade, sendo seu acúmulo considerado fator de risco para DA (QUINTANA 2006). Sabe-se que o peptídeo Beta-amiloide ($A\beta$) tem sítios de ligação com íons metais e que a interação entre $A\beta$ e ferro é um dos elementos causadores pela agregação e depósito do $A\beta$ (FALANGOLA et al., 2005; HUANG et al., 2004).

Quando ocorre a escassez de ferro pela perda crônica de sangue, devido em especial a ausência progressiva dos estoques de ferritina e hemossiderina, a eritropoiese estimulada, reduzida ingestão dietética de ferro, a inibição da absorção intestinal e a inibição da liberação do ferro da mesma forma, contribuem para a esta deficiência (HÖRL, 2008).

Por outro lado, o excesso de ferro predispõe a uma deposição nociva, e em sua forma aguda pode haver acidose, insuficiência hepática e choque (BRAGA et al, 2006). Doenças como a Hemocromatose Hereditária, identificada por distúrbio do metabolismo do ferro (COUTO, 2007), onde há uma mutação nas proteínas Hfe (Hemocromatose clássica tipo I), Fpn1 (Hemocromatose tipo IV, também conhecida como doença da ferroportina), dentre outras, ocasiona acúmulo de ferro no fígado e outros tecidos como coração, glândula pituitária e cérebro (FERNANDEZ et al., 2007). Estudos demonstraram que a absorção de ferro a partir do intestino delgado desses pacientes é altamente elevada (POWELL et al., 1970).

Zhang et al. (2005) evidenciaram o papel neuroprotetor de um quelante de Fe em um tipo de degeneração nigral induzido por inibidor de proteossomo, onde ocorreu uma menor perda de neurônios dopaminérgicos e diminuiu a presença de α -sinucleína em corpos de Lewy. A deferoxamina (DFX) é um ácido tri-hidroxâmico, usado como agente quelante hexadentado em intoxicações por metais, sendo um deles o ferro (BOSQUE et al., 1995).

A DFX quela o ferro, incluindo completamente a superfície do Fe^{3+} , estruturando um complexo estável (com blindagem completa do metal), onde impede a reação entre biomoléculas e o metal, o qual iria proporcionar a formação de radicais livres. A quelação com o Ácido etileno diamina tetra-acético (EDTA) recobre apenas parcialmente a superfície do Fe^{3+} levando à formação de um complexo aberto (blindagem incompleta) que proporciona a realização de determinadas reações (Figura 5) (FLORA e PACHAURI, 2010).

Segundo Alves et al. (2019), a deferoxamina foi eficaz na redução da toxicidade de metais, quando adicionada ao grupo exposto com alumínio e ferro, os resultados obtidos foram semelhantes aos atingidos no grupo controle, em especial ao grupo pré-tratado com DFX.

Fonte: Flora e Pachauri, 2010.

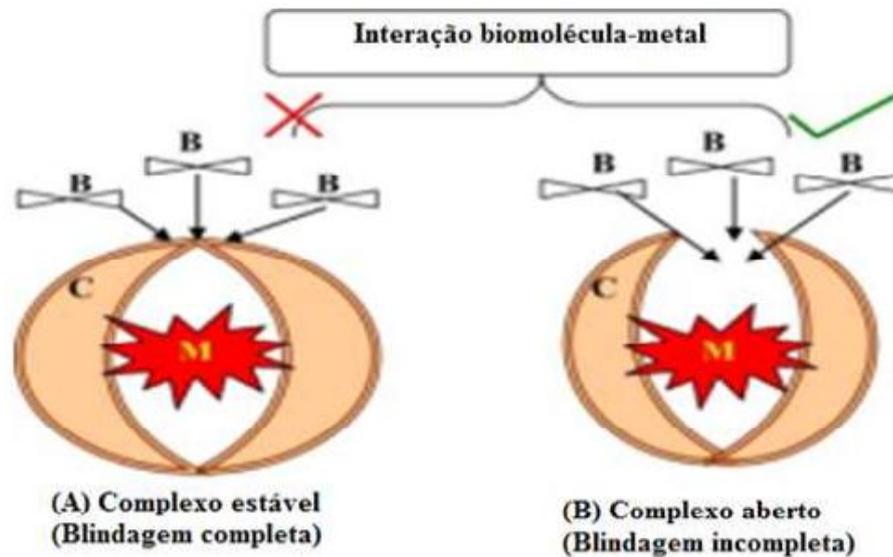


Figura 5: Formação de dois complexos entre o metal (M) e o agente quelante (C). Na estrutura A ocorre a formação de um complexo estável onde impede a interação com biomoléculas (B). Na estrutura B ocorre uma formação de um complexo que permite reações com as biomoléculas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Nota ética

Os procedimentos experimentais com o organismo modelo Zebrafish têm parecer favorável da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/IFRS) conforme protocolo nº 7849300320 (ANEXO).

4.2 Obtenção do extrato de erva-mate

A erva-mate escolhida para este trabalho é originada de uma empresa da região norte do estado do Rio Grande do Sul. Seu processo de industrialização passa por etapas que são descritas segundo Bendlin (2003):

- Colheita: manual ou mecanizada;
- Sapeco: onde a erva-mate disposta na parte superior e recebe as chamas pela base, a erva-mate circula pelo cilindro até a parte inferior, por onde sai sapecada;
- Secagem: desidratação por corrente de ar quente;
- Moagem: realizada por um equipamento chamado de soque (moagem pelo pilão);
- Beneficiamento: realizado visando adequar o produto aos padrões de mercado, a erva passa por peneiras, ventiladores, filtros e coletores de pó, com a finalidade de separar a erva cancheada em pó, folhas, talos e paus. Após, as frações são misturadas na proporção correta de acordo com o tipo comercial e por fim embalada.

Para obtenção do extrato líquido, foi utilizada uma proporção de erva-mate beneficiada tipo chimarrão e água de 1:3 (p/v), e mantida em decocção durante 30 minutos à temperatura de 85 °C, (adaptado de Burgardt, 2000). Logo após foi filtrada através de papel de filtro à temperatura ambiente e transferida para tubos falcon protegidos por papel alumínio para evitar a passagem da luz.

4.3 Microencapsulamento (Secagem em *spray-dryer*)

As diferentes soluções (extrato líquido + agente encapsulante) foram submetidas à secagem em *spray dryer* para obtenção das diferentes microcápsulas de erva-mate. As condições operacionais de secagem foram temperatura do ar de entrada 185 °C e de saída 83 °C, com pressão do ar de 4,5 bar, fluxo do ar de secagem com 5,5 m³/h e vazão máxima de

alimentação de 200 g/minuto. As soluções foram mantidas a 40 °C durante a alimentação sob agitação.

4.4 Procedimentos do *Danio rerio*

Neste trabalho foram utilizados 180 peixes adultos (150-180 dias) de ambos os sexos (50/50) do tipo selvagem de zebrafish (*Danio rerio*). Os mesmos foram aclimatados em aquários de 50 L antes de serem expostos, mantidos sob fotoperíodo natural (14 horas de luz/10 horas escuro). A densidade foi de aproximadamente 2 peixes/L. A temperatura da água foi mantida entre 26 e 28°C; pH próximo à 7,0; oxigênio dissolvido em $6,5 \pm 0,4$ mg/L e amônia total de <0,01 mg/L. A alimentação foi controlada, onde os peixes receberam ração indicada para a espécie duas vezes ao dia, às 8:00 horas e às 17:30 horas até a saciedade, no horário da alimentação pela parte da manhã, eram realizadas as exposições aos tratamentos.

4.5 Tratamento Agudo

Os peixes foram expostos durante sete dias a nove diferentes tratamentos (Figura 7), cada tratamento tinha um número de 20, totalizando 180 peixes. A exposição aos tratamentos foi realizada na parte da manhã a cada 24 horas. Os peixes foram distribuídos nos seguintes grupos: grupo A (somente água), grupo B (contendo Maltodextrina), grupo C (Ferro), Grupo D (Ferro e erva-mate), Grupo E (Ferro, erva-mate e Deferoxamina), grupo F (Ferro e Deferoxamina), grupo G (somente Deferoxamina), grupo H (Deferoxamina e erva-mate) e o grupo I (contendo somente erva-mate).

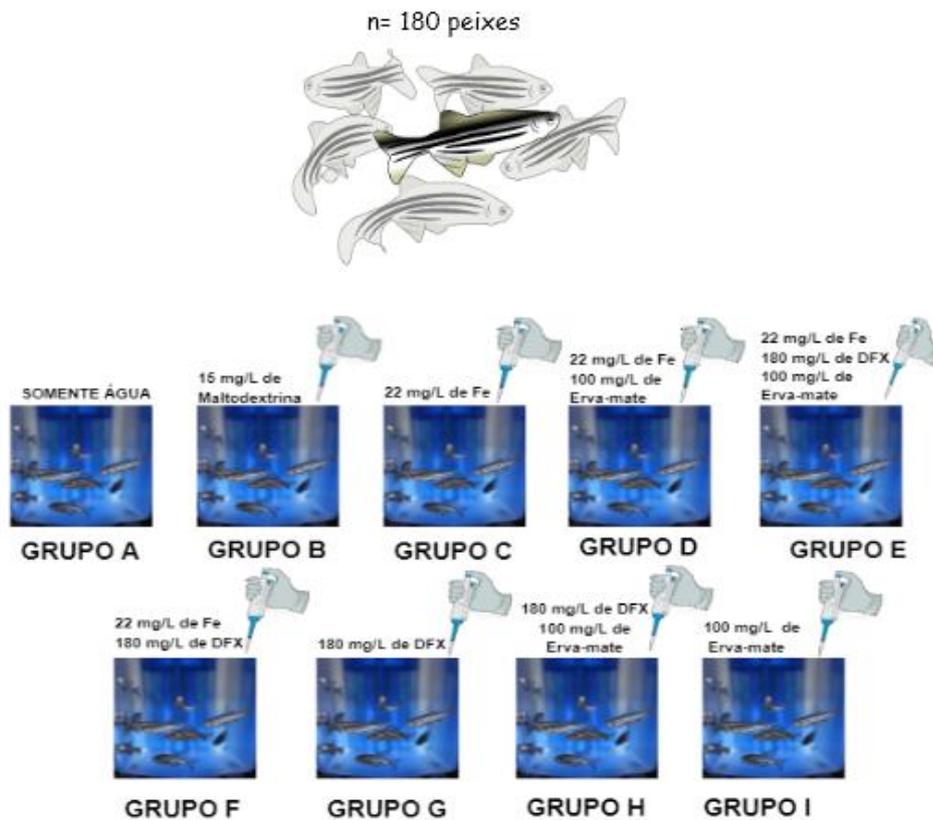


Figura 6: Exposição aguda do organismo modelo Zebrafish aos diferentes tratamentos.

4.6 ANÁLISE ENZIMÁTICA

4.6.1 Preparo do extrato

Após o término do tratamento, os peixes foram anestesiados em banho de gelo, em seguida, eutanasiados em nitrogênio líquido por 30 segundos. Logo após, foram dissecados, retirando-se o cérebro e armazenado o corpo, os quais foram utilizados para o preparo do extrato. Um *pool* de quatro cérebros de peixes foi homogeneizado em 1mL de Tampão Tris HCl (50 mM e pH 7,4) para as análises de CAT, SOD e TBARS. Após foram centrifugados a 7000 rpm (rotações por minuto) por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi retirado e armazenado a -80°C para posteriores análises. Já para a análise de FOX, 0,1 gramas de corpo triturado foi homogeneizado em 2000 µL de álcool metílico (1:20) e centrifugada a 1000 g por 10 minutos a 4°C.

3.6.2 Atividade da Catalase (CAT)

A enzima catalase catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio nos produtos água e oxigênio. Sua concentração é avaliada pela determinação espectrofotométrica da velocidade

de decomposição do peróxido de hidrogênio (0,3 M) adicionado à amostra. Tal velocidade é diretamente proporcional a atividade enzimática, a qual obedece a uma cinética de pseudo primeira ordem. A atividade da enzima CAT foi determinada seguindo o protocolo de HODGES (1997). Os resultados foram expressos em unidades de U/mg de proteína/min.

4.6.3 Análise da peroxidação lipídica (TBARS)

A análise de peroxidação lipídica foi realizada conforme o método descrito por Wills (1987). Os resultados obtidos foram expressos em nmoles por mg de proteína.

4.6.4 Análise Superóxido Dismutase (SOD)

A determinação da enzima SOD baseia-se na inibição da reação do radical superóxido com a adrenalina. A SOD presente na amostra estudada compete pelo radical superóxido através do sistema de detecção de acordo com Mc CORD e FRIDOVICH, 1969 e FRIDOVICH, 1974. Os resultados obtidos foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

4.6.5 Análise da peroxidação pelo FOX

A análise da peroxidação através da técnica de FOX foi baseada na oxidação do Fe^{+2} por lipoperóxido em um pH ácido na presença de um corante, o laranja de xilenol. Dessa forma, a reação do peróxido de hidrogênio com Fe^{+2} em pH ácido na presença de laranja de xilenol induz a formação de um complexo, o Fe^{+3} laranja de xilenol. Em solução ácida, o corante mostra somente um pico a 560 nm e a absorvância cresce linearmente com o aumento da concentração do corante. A análise avalia, portanto, a concentração de hidroperóxido lipídico na amostra segundo (JIANG et.al.; 1991). O resultado foi expresso em nmoles por mg de proteína.

4.6.6 Análises estatísticas

Os dados obtidos, foram submetidos a análise de variância (ANOVA) de uma via (*one-way*) complementada pelo teste *pos hoc* Tukey. Para tal, utilizou-se o software *Graphpad Prism* 7.0, na significância de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISES EM ZEBRAFISH

5.1.1 Atividade da Catalase (CAT)

Os resultados demonstram que o uso de Fe+DFX apresentou melhor resultado para a atividade da enzima CAT ao se comparar com os demais tratamentos testados. Os demais tratamentos, inclusive a testemunha não apresentou diferenças estatísticas ao se comparar todos entre si (Figura 8).

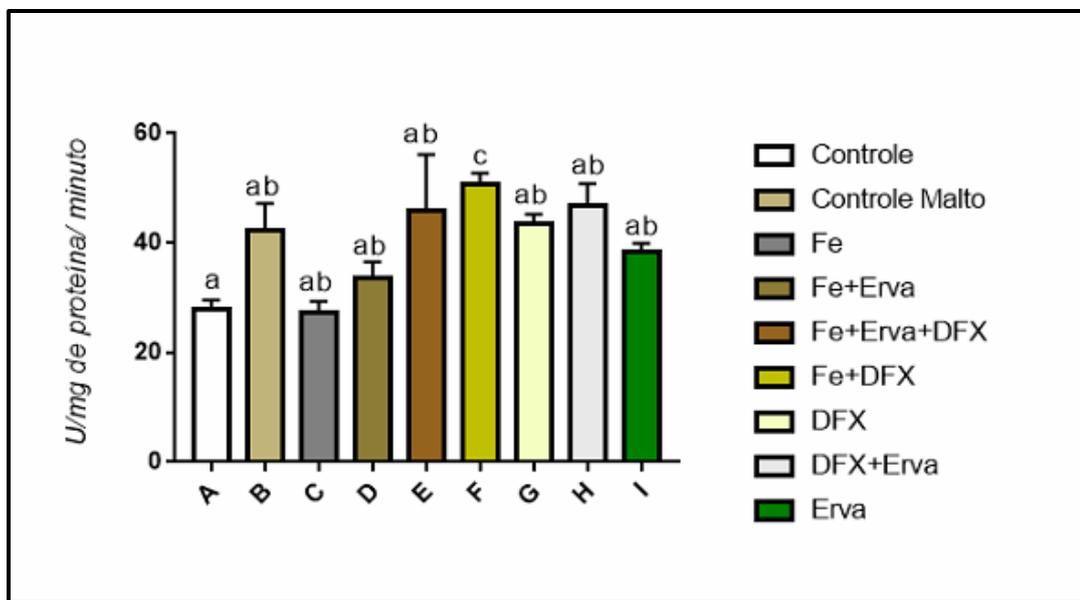


Figura 7: Atividade da enzima CAT (U/mg de proteína/minuto) em cérebro de Zebrafish após exposição crônica ao extrato microencapsulado de erva-mate, Fe e DFX.

5.1.2 Análise Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da enzima SOD (Figura 9) foi aumentada em 59% no grupo C (Fe), 106,5% no grupo D (Fe + erva) e 91% no grupo H (DFX + Erva) ao se comparar esses grupos com o controle em que se usou somente água (grupo A). O Grupo C exposto ao Fe, teve um aumento na atividade da enzima de 55% em relação ao grupo E (Fe + Erva + DFX), 47% ao grupo F (Fe + DFX), 20,4% ao grupo de exposição G (DFX) e 28% ao I (Somente Erva). Os grupos D (Fe + Erva) e G (DFX + Erva) apresentaram uma inibição na atividade da enzima SOD de 30 e 39%, respectivamente, quando comparados ao grupo C (Fe). Ainda, os grupos D (Fe + Erva) e H (DFX + Erva) tiveram um aumento significativo sobre a atividade da enzima quando comparado com todos os demais grupos. Para o grupo D (Fe + Erva) houve um aumento da

atividade de 55% em relação do grupo B (Controle Malto), 65% grupo E (Fe + Erva + DFX), 59% grupo F (Fe + DFX), 39% grupo G (DFX), e 44,5% em relação ao grupo I (Erv). Enquanto que o grupo H (DFX + Erva) apresentou uma ativação da SOD correspondente a 58% em relação ao grupo B (Controle Malto), 68% ao grupo E (Fe + Erva + DFX), 62% ao grupo F (Fe + DFX), 43% ao grupo G (DFX), e 48% em relação ao grupo I (Somente Erva), respectivamente.

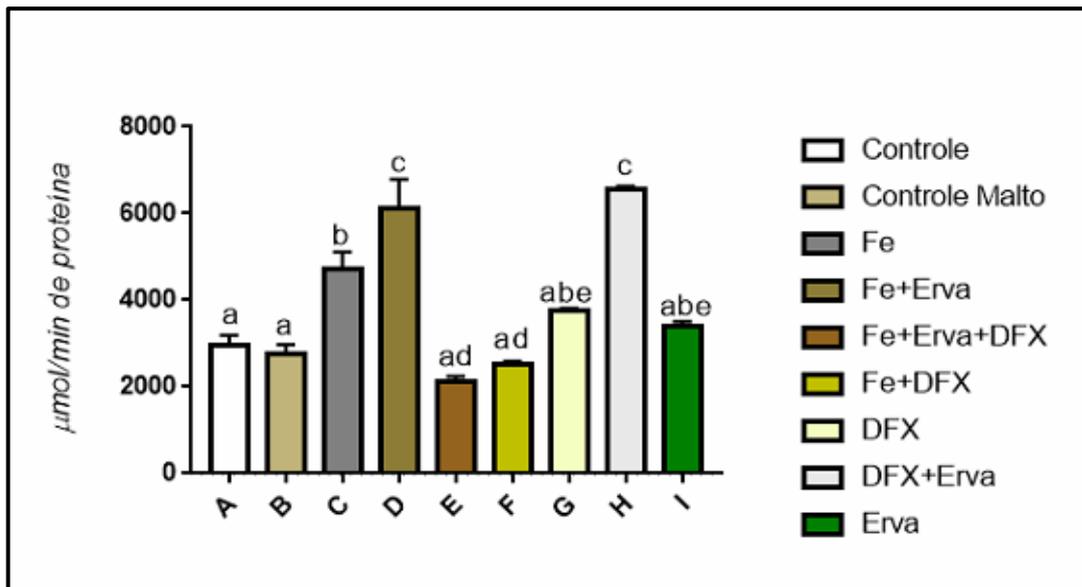


Figura 8: Atividade da enzima SOD ($\mu\text{mol}/\text{min}$ de proteína) em cérebro de Zebrafish, após exposição crônica ao extrato microencapsulado de erva-mate, Fe e DFX.

5.1.3 Análises de peroxidação lipídica (TBARS)

Os níveis de peroxidação lipídica em cérebro de Zebrafish na exposição aguda (Figura 10, A) foram reduzidos nos diferentes grupos de exposição, como segue 15% C (Fe), 47% D (Fe + Erva), 59% E (Fe + Erva + DFX), 73,5% F (Fe + DFX), 52% G (DFX), 62% H (DFX + Erva) e 59% I (somente Erva), quando comparados ao grupo A (Controle, somente água). A peroxidação lipídica de corpo (Figura 10, B) foi aumentada no grupo D (Fe + Erva) quando comparado ao grupo controle (A) de 50%, grupo B (Controle Malto) de 62%, grupo C (Fe) de 61%, grupo E (Fe + Erva + DFX) de 59%, grupo F (Fe + DFX) de 42,5%, grupo G (DFX) de 36%, e grupo H (DFX + Erva) de 58%, respectivamente.

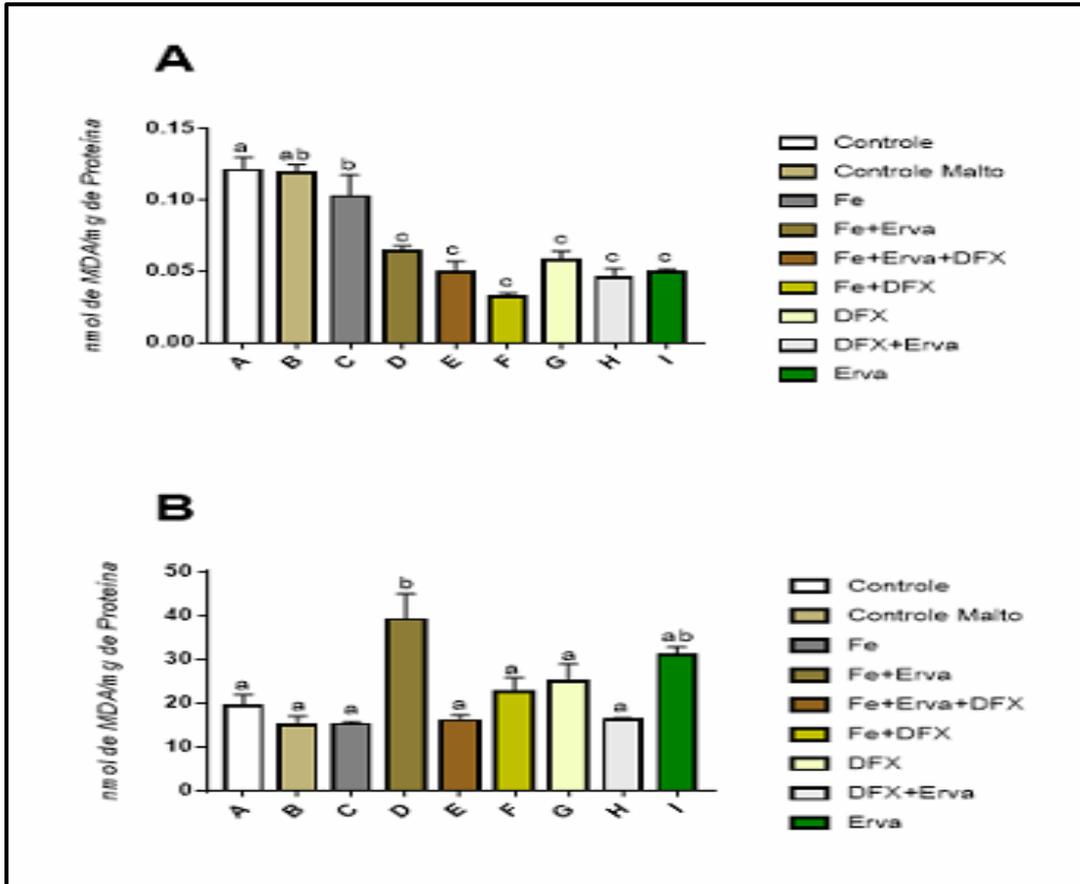


Figura 9: Análise do nível de peroxidação lipídica (nmol de MDA/mg de Proteína) em cérebro (A) e corpo (B) de Zebrafish em exposição crônica ao extrato microencapsulado de erva-mate, Fe e DFX.

5.1.4 Análise da peroxidação pelo FOX (oxidação do ferro por xilenol laranja)

Nas análises utilizando a técnica de FOX para determinação da lipoperoxidação em corpo de Zebrafish (Figura 11), não foram observadas alterações significativas entre os diferentes grupos de exposição.

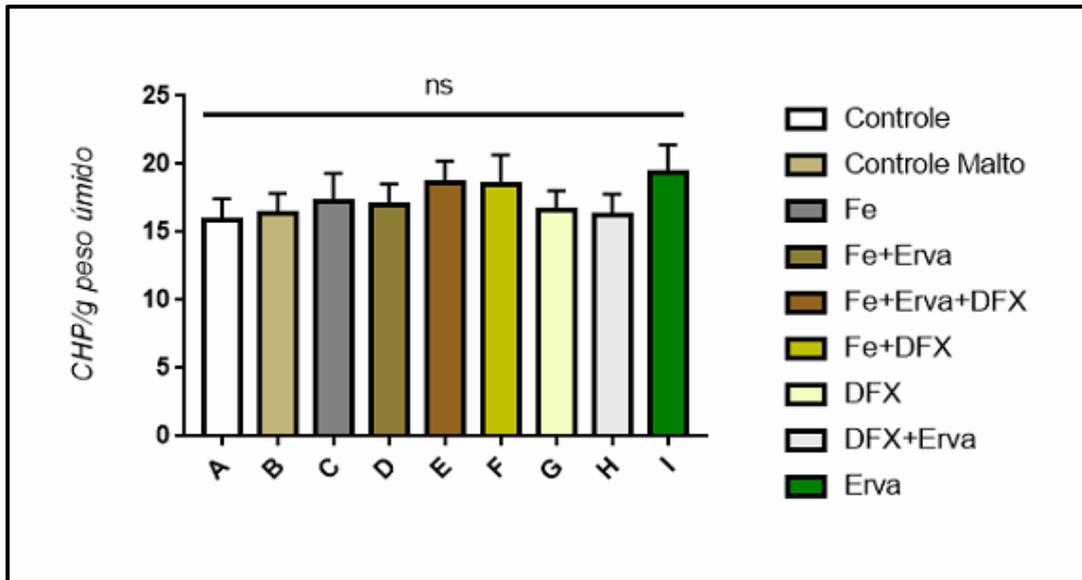


Figura 10: Atividade da peroxidação pelo FOX (oxidação do ferro por xilenol laranja) (CHP/g peso úmido) em corpo de Zebrafish após exposição crônica ao extrato microencapsulado de erva-mate, Fe e DFX.

6 DISCUSSÃO

Os níveis elevados de EROs promovem danos a diversas moléculas, dentre as quais o DNA, proteínas, carboidratos e lipídios, desencadeando alterações fisiológicas que acometem o organismo vivo, estando associadas ao envelhecimento precoce e ao desenvolvimento de doenças crônicas (COMINETTI et al, 2011), como as doenças neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer e Huntington), cardiovasculares e até mesmo alguns tipos de câncer (LÓPEZ-ÁLARCÓN e DENICOLA 2013).

O desequilíbrio de EROs nas células é resultante da geração exagerada de radicais ou quebra da velocidade de remoção destes, conduzindo, assim, a oxidação de biomoléculas com decorrente perda de suas ações biológicas e/ou instabilidade homeostática, cuja manifestação se dá a partir do dano oxidativo contra as células e tecidos (BARBOSA et al, 2010). Sabe-se que a linha de defesa antioxidante do organismo conta com o sistema não-enzimático, onde estão envolvidos compostos antioxidantes encontrados na alimentação e/ou suplementação, e com o sistema antioxidante enzimático, onde atuam enzimas antioxidantes para a catálise de compostos prejudiciais para o organismo em compostos inertes (HERCBERG et. al, 2004).

Na atividade da enzima Catalase o grupo tratado com Ferro + DFX foi modulado positivamente. Esta ativação pode estar relacionada a excessos de metais que podem alterar a atividade da CAT, devido a alterações conformacionais na estrutura da enzima dependendo das concentrações de determinadas moléculas no meio de reação (SILVA, 2007). Neste contexto, a ativação da CAT impediu maiores danos causados pelo excesso da EROs nas membranas, pois quando se analisa o mesmo grupo quanto a peroxidação lipídica não se observa alterações em relação ao controle.

A atividade da enzima superóxido dismutase foi modulada positivamente nos grupos tratados com Fe (C), Fe + Erva (D) e DFX + Erva (H). Isto indica que a suplementação da erva-mate com Ferro e Deferoxamina de forma isolada pode ativar a enzima SOD. Observou-se que a atividade enzimática não foi modulada no grupo tratado com erva-mate de forma isolada. A enzima SOD pertence ao grupo das metaloenzimas, a qual necessita um cofator metálico para seu bom funcionamento, este cofator em animais pode ser Cobre ou Zinco. Em um estudo de Bortoli (2017) foram quantificadas as concentrações de metais presentes no extrato aquoso de erva-mate nas mesmas condições do presente estudo, as concentrações encontradas foram de 2,71 mg/L para Cu, 10,2 mg/L de Al, 0,37 mg/L de Pb e 22,05 mg/L de Fe. Com isso, observou-se que quando o extrato microencapsulado de erva-mate é adicionado às exposições de forma isolada, por conta dos outros metais presentes, o Cu pode estar menos biodisponível como

cofator da enzima SOD. Quando se adiciona DFX ao extrato de erva e até mesmo quando se adiciona DFX ao grupo de Fe + Erva (D), devido as suas propriedades quelantes para com outros metais (Al e Fe), pode tornar o Cu mais biodisponível para as reações bioquímicas.

Os níveis de peroxidação lipídica em cérebro de peixe obtidos pelo método de TBARS mostram que todos os grupos de exposição foram capazes de reduzir a taxa de peroxidação lipídica das membranas, quando comparados ao grupo controle. Isto implica na preservação da integridade celular, o que é fundamental para a manutenção do status saudável do sistema nervoso central (SOARES, 2016). Quando se analisa a taxa de peroxidação lipídica no corpo dos animais, observou-se que o grupo tratado com Fe + Erva (D) teve a variável estudada incrementada, além da peroxidação, este grupo teve a atividade da SOD aumentada, como supracitado, sugerindo que a linha de defesa enzimática antioxidante primária foi ativada para reverter a situação da peroxidação.

Quanto aos níveis de peroxidação lipídica determinados através da técnica de FOX, percebe-se que nenhum dos grupos de tratamento teve alterações estatísticas, o que sugere que os extratos não causaram danos celulares aos organismos (ARAUJO, 2016). Provavelmente este resultado se deva ao fato de que esta técnica é caracterizada pela percepção do processo inicial de peroxidação lipídica. Corroboram com esses resultados os obtidos por Colpo (2017) que identificou que extratos de erva-mate reduziram a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas, induzidos por uma dieta densa em colesterol. Ainda segundo Citadinni et al. (2019) esses verificaram que os extratos de erva-mate podem ser uma fonte de agentes quimiopreventivos em patologias neurodegenerativas relacionadas ao estresse oxidativo.

A ingestão da erva-mate e os seus benefícios na atividade antioxidante pode ser explicado pela presença de compostos bioativos redutores e seus metabólitos no plasma (SCALBERT et al., 2005). Espera-se que no futuro a erva-mate seja incluída na dieta, seja por formulações alimentares ou farmacológicas, já que através dela encontram-se quantias adequadas de antioxidantes que podem contribuir na prevenção de patologias relacionadas ao estresse oxidativo (BAEZA et al., 2017; BRACESCO, 2019).

O cenário de epidemiologia está sendo caracterizado por um quadro crescente e também contínuo de uma transição nutricional, sendo evidenciado por grandes mudanças alimentar e nos níveis de atividade física. No entanto, faz-se necessário a valorização e a utilização de alimentos que além de nutrir, promovam saúde e funcionalidade (POPKIN e KENAN JR., 2016). O fator saúde tem se tornado uma das principais motivações e justificativas nas escolhas alimentares da população mundial, e é nesse contexto que se reconhece a importância dos

alimentos funcionas, onde a erva-mate tem se tornado grande destaque pela quantidade de propriedades antioxidantes (MARTINS et al.; 2016).

Com o aumento de a erva-mate ser usada como uma fonte de alimentação, o mercado mundial consumidor passará por transformações, necessitando cada vez mais de avanços tecnológicos para garantir produtos de qualidade, gerando grandes oportunidades para o setor ervateiro dos países produtores. Com isso o presente estudo demonstra ser importante na busca de alternativas para o melhoramento do produto erva mate, como a suplementação que pode ser efetuada na mesma.

7 CONCLUSÃO

A suplementação do extrato de erva-mate pode ser considerada benéfica para o organismo modelo usado no presente estudo (Zebrafish), visto que, não foi observada peroxidação lipídica, principalmente no grupo tratado com Fe + Erva + DFX (E). Este resultado foi associado a ativação das enzimas antioxidantes nos grupos C, D e H para SOD, e no grupo F para CAT, concatenados a uma redução nos níveis de peroxidação lipídica em cérebro, determinado pela técnica de TBARS, em todos os grupos com exceção dos grupos controle A e B, e o grupo I (Erva). Desta forma, pode-se considerar que a exposição ao Fe e à Deferoxamina trouxe benefícios ao organismo modelo, contribuindo para o status do sistema de defesa antioxidante enzimático, e, portanto, demonstrando serem bons candidatos para a suplementação da erva-mate. Neste contexto, devido ao hábito de consumo da erva-mate já consolidado na sociedade regional e em crescimento no mercado internacional, o implemento da suplementação com Fe e DFX pode auxiliar na redução dos danos oxidativos do organismo, prevenindo doenças crônicas, sendo assim uma boa opção para adaptações dietéticas.

8 TRABALHOS FUTUROS

Para fundamentar os resultados encontrados, este estudo terá continuidade, avaliando o *status* do sistema nervoso, em especial o sistema nervoso colinérgico, através da atividade da enzima Acetilcolinesterase e de parâmetros comportamentais. Ainda, serão determinados os níveis do hormônio cortisol para avaliar uma possível resposta de estresse dos animais ao consumo da erva-mate suplementada com Fe e DFX. Para enfim estabelecer o potencial neuroprotetor e funcional do extrato microencapsulado de erva-mate isolado, bem como, da sua possível suplementação com Fe e DFX para o consumo.

REFERÊNCIAS

- ABBOUD, S.; HAILE, D.J. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 19906-19912, 2000.
- ALVES, C. et. al. Deferoxamine pretreatment inhibits metal neurotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Quality Management**, v. 29, p. 121-127, 2019.
- ANDERSEN, Ø. Acúmulo de ferro de veiculação hídrica e expressão de ferritina e transferrina nos estágios iniciais de desenvolvimento da truta marrom (*Salmo trutta*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 16, p. 223-231, 1997.
- ARAÚJO, E. S. et al. Impacto da suplementação de vitamina C sobre níveis de peroxidação lipídica e glutathiona reduzida em tecido hepático de camundongos com imunossupressão induzida por ciclofosfamida. **Revista de Nutrição**, v. 29, n. 4, p. 579-587, 2016.
- AUGUSTIN, M.A.; HEMAR, Y. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 4, p. 902–912, 2008.
- BAEZA, G. et al. Polyphenol content, *in vitro* bioaccessibility and antioxidant capacity of widely consumed beverages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.1, p. 1-10, 2017.
- BARBOSA, K.B.F. et al. Estresse Oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, p.629-643, 2010.
- BASTOS, D.H.M. et. al Bioactive compounds Content of Chimarrão Infusions Related to the Moisture of Yerba Maté (*Ilex Paraguariensis*) Leaves. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 399-404, 2006.
- BEARD, J.L. IronBiology in Immune Function, Muscle Metabolism and Neural Functioning. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 568-580, 2001.
- BENDLIN, R.C.S. Secagem Conectiva de Erva-Mate. (Dissertação). Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Florianópolis/SC, 2003, 77p.
- BERTÉ, K.; RUCKER, N.; HOFFMANN-RIBANI, R. Yerba maté *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. **Phytotherapie**, v. 9, n. 3, p. 180–184, 2011.
- BOAVENTURA, B.C.B. et al. Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) infusion obtained by freeze concentration technology on antioxidant status of healthy individuals. **Food Science and Technology**, v. 62, n. 2, p. 948-954, 2015.
- 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.

- BONNEFOY, M. Antioxidants to slow aging, facts perspectives. **Press Med**, v. 31, p. 1174-1184, 2002.
- BORGOGNA, M. et al. Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. **Food Chemistry**, v. 122, p.416-423, 2010.
- BORTOLI, M. P.; et. al. *Ilex paraguariensis*: Potential antioxidant on aluminium toxicity, in an experimental model of Alzheimer's disease. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 181, p. 104-110, 2018.
- BOSQUE, M.A.; DOMINGO, J.L.E.; CORBELLA, J. Assessment of the developmental toxicity of deferoxamine in mice. **Springer-verlag**, v. 69, p. 467-471, 1995.
- BRACESCO, N. et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 3, p. 378-384, 2010.
- BRACESCO, N. *Ilex paraguariensis* as a Healthy Food Supplement for the Future World. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v. 16, n. 1, 2019.
- BRAGA, J.; AMANCIO, O.; VITALLE, M. **O ferro e a saúde das populações**. Editora Roca, São Paulo, 2006.
- BRIGGS, J.P. The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol**, p. 282, 2002.
- BURY, N.; GROSELL, M. Iron acquisition by teleost fish. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 13, p. 97-105, 2003.
- CITTADINI, M. C. et al. Effects of oral phytoextract intake on phenolic concentration and redox homeostasis in murine encephalic regions. **Nutritional Neuroscience**, v. 18, n. 7, 2015.
- COLPO, A.C. et al, Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) – based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. **Food Chemistry**, v. 2019, p. 185-195, 2016.
- COLPO, A.C. **Efeitos dos extratos de erva-mate sobre danos oxidativos e sua relação com anti e co-genotoxicidade**. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em bioquímica, Universidade Federal do Pampa, 2017.
- COMINETTI, C., et. al. Considerações sobre estresse oxidativo, selênio e nutrigenética. Nutrire: **Revista Sociedade Brasileira Alimentos Nutrição**, v. 36, n. 3, p. 131-153, 2011.
- CORREA, G. et. al. Desenvolvimento de uma progênie biclonal de erva-mate em Machadinho, RS. Colombo, Paraná: **Embrapa Florestas**, 2011.
- COUTO, C. **Doenças Hepáticas Metabólicas: Hemocromatose**. Prática Hospitalar, ano IX, n. 54, 2007.

- DAMMSKI, A.P. et al. **Zebrafish- Manual de Criação em Biotério**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba PR, 1º Edição, 2011.
- DARTORA, N. et al. UPLC-PDA-MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1453–1461, 2011.
- DE CAMPOS, R.M.L. et al. Fatty acid and volatile compounds from salami manufactured with yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract and pork back fat and meat from pigs fed on diets with partial replacement of maize with rice bran. **Food Chemistry**, v. 103, n. 4, p. 1159–1167, 2007.
- DE VOS, P. et al. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 292–302, 2010.
- DELADINO, L. et al. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 1, p. 126–134, 2008.
- DELADINO, L. et al. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 126-134, 2008.
- DELADINO, L. et al. Major phenolics in yerba mate extracts (*Ilex paraguariensis*) and their contribution to the total antioxidant capacity. **Food and Nutrition Sciences**, v. 4, n. 8, p. 154–162, 2013.
- DESAI, K. G. H. & JIN PARK, H. **Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients**. [s.l.: s.n.]. v. 23. 2005.
- DOMINGOS, C. R. B. Aumento de ferro, hemocromatose hereditária e defeitos no gene HFE. O que conhecemos na população brasileira?. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 4, p. 339-343, 2007.
- DONADUZZI, C. M.; COELHO, S. R. M.; CARDOZO JUNIOR, E. L.; GALLO, A. G.; HUPPES, G. K.; KUHN, I. M. V.; SCHICHEL, C. Teores de cafeína, polifenóis totais e taninos em amostras de erva-mate comercializadas na região de Toledo, Paraná. **Congresso sul-americano da Erva-mate**, Reunião técnica da Erva-mate, 2000, Encantado. Anais. Porto Alegre: Comissão dos Organizadores / Universidade do Rio Grande do Sul / Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, 2000. p.158-161.
- DONOVAN, A., et al. The zebrafish mutant gene chardonnay (cdy) encodes divalent metal transporter 1 (DMT1). **Blood**, n. 100, p. 4655-4659, 2002.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA**. Cultivo da erva-mate. EMBRAPA Florestas. 2 ed. 2014.
- FALANGOLA, M. F.; LEE S.P.; NIXON, R.A. Histological co-Localization of iron in Ab plaques of PS/APP transgenic mice. **Neurochem Res**, v. 30, n. 5, 2005.
- FALANGOLA, M.F.

- et al. Histological Localization of iron in Ab plaques of PS/APP transgenic mice. **Neurochem Res**, v. 30, p. 2001-2005, 2005.
- FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols - A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 10, p. 510–523, 2010.
- FERNANDEZ, L. L. et al. Ferro e neurodegeneração. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 17, n. 4, p. 218-224, 2007.
- FLORA, S. J. S. E; PACHAURI, V. Chelation in Metal Intoxication. **International Journal of Environmental Research Public Health**, v. 7, p. 2745-2788, 2010.
- FRAENKEL, P., et al. Ferroportin 1 is required for normal iron cycling in zebrafish. **The Journal of Clinical Investigation**, n. 115, p. 1532-1541, 2005.
- FRIDOVICH, I. **Superoxide dismutases**. *Adv. Enzymol*, v. 41, p. 35-97, 1974.
- FRIDOVICH, I. The trail to superoxide dismutase. **Protein Science**, v. 7, p. 2688-2690, 1998.
- GAIAD S.; RAKOCEVIC, M.; REISSMANN, C.B. Nitrogen sources affect growth, nutrient content, and net photosynthesis in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 49, p.689–697, 2006.
- GHARSALLAOUI, A. et al. Applications of spray drying in Microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107-1121, 2007.
- GRUNWALD, D., EISEN, J. Headwaters of the zebrafish - emergência de um novo modelo de vertebrado. **Nature Reviews Genetics**, v.3, p, 717–724, 2002.
- GROTTO, H. Z. W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, p. 390-397, 2008.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDE J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. New York, p.725, 2010.
- HECK, C. I.; SCHMALKO, M.; DE MEJIA, E. G. Effect of growing and drying conditions on the phenolic composition of Mate teas (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 18, p. 8394–8403, 2008.
- HECK, C.; SCHMALKO M.; DE MEJIA, E. G. Effect of Growing and Drying Conditions on the Phenolic Composition of Mate Teas (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 56, p. 8394-8403, 2008.
- 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, p.138-15, 2007.

- HERCBERG, S. et al. The SU.VI.MAX Study: A Randomized, Placebo-Controlled Trial of the Health Effects of Antioxidant Vitamins and Minerals. **Archives of internal medicine**, v. 164, p. 2335-2342, 2004.
- HODGES, M. et al. Antioxidant enzyme responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines D. **Journal of Experimental Botany**, vol. 48, n. 310, p. 1105-1113, 1997.
- HÖRL, W. New insights into intestinal iron absorption. **Nephrol Dial Transplant**, v. 10, p. 3063-3064, 2008.
- HOWE K.; et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v.496, p. 498–503, 2013.
- HUANG X. et al. Trace metal contamination initiates the apparent auto-aggregation, amyloidosis, and oligomerization of Alzheimer's A β peptides. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 9, p. 954-960, 2004.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção Agrícola Municipal: culturas temporárias e permanentes. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613#resultado> >
- ISOBELLA, S. et al. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry**, v. 122, p.695-699, 2010.
- JAFARI, S.M.; ASSADPOOR, E.; H.E, Y.; BHANDARI. B. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. **Drying Technology**, v.26, n.7, p. 816-835, 2008.
- JIANG, Y.Z., et al. Medição de hidroperóxidos lipídicos por oxidação de Fe 2+ na presença de laranja xilenol. Comparação com o ensaio TBA e um método iodométrico. **Lipids**, 1991.
- JUNIOR, C.; L.; MORAND, C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health - a review. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 440–454, 2016.
- KALUEFF, A. V. et al. Zebrafish neurobehavioral phenomics for aquatic neuropharmacology and toxicology research. **Aquatic Toxicolog.**v. 170, p. 297-309, 2016.
- KWAK, H.-S. **Nano and Microencapsulation for Foods**. 1 ed. UK, Wiley Blackwell, 2014.
- LIMA, I. V.; PEDROZO, M. F. M. **Ecotoxicologia do ferro e os seus compostos**, Centro de recursos ambientais, Salvador, v. 4, 2001.
- LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 11, p. 51, 2012.
- LUNDBLAD, L.; DAVIES, A. I. The values and motivations behind sustainable fashion consumption. **Journal of Consumer Behaviour**, v. 15, p. 149-162, 2016.

- MARTINS, N.; BARROS L.; FERREIRA, I. C. F. *In vivo* antioxidante activity of phenolic compounds: Fcatcs and gaps. **Trends in Food Science & Technology**, v.48, p. 1-12, 2016.
- MAXIMINO, C. et al. Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**. v. 35, n. 2, p. 624-631, 2011.
- MCKIE, A.T., et al. A novel duodenal iron regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. **Molecular Cell**, v. 5, p. 299-309, 2000.
- MURAKAMI, A. N. N. et al. Concentration of phenolic componunds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil). Extract through nanofiltration. **LWT – Food Science and Techonology**, v. 44, p. 2211-2216, 2011.
- PEREIRA, A. A. et al. *Ilex paraguariensis* supplementation may be an effective nutritional approach to modulate oxidative stress during perimenopause. **Experimental Gerontology**, v. 90, p. 14-18, 2017.
- PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146–152, 2012.
- PETRILLI, A. A. et al. Effect of Chocolate and Yerba Mate Phenolic Compounds on Inflammatory and Oxidative Biomarkers in HIV/AIDS Individuals. **Nutrients**, v. 132, n. 8, p. 1-14, 2016.
- PICOLOTTO, P. VARGAS, G. M.; RIGO, L.; OLIVEIRA, S. V. A dinâmica de produção e de comercialização da erva-mate nos cinco Polos ervateiros do Estado do Rio Grande do Sul. **In: Seminário de Jovens Pesquisadores em Economia e Desenvolvimento**, 1., 2013, Santa Maria. Anais. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria.p. 1-21. 2013.
- PIZARRO, F. et al. Factores que modificam el estado de nutrición de hierro: contenido de taninos de infusiones de hierbas. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 44, n. 4, p. 277-280, 1994.
- POLIDORO, A. S. et al. Characterization of volatile fractions in green mate and mate leaves (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry (GC × GC/TOFMS). **Microchemical Journal**, v. 128, p. 118–127, 2016.
- POWELL, L. W.; CAMPBELL, C.B.; WILSON, E. Intestinal mucosal uptake of iron and iron retention in idiopathic haemochromatosis as evidence for a mucosal abnormality. **Gut**, n 11, p. 727-731, 1970.

- PRUDÊNÇIO, A. P. A. et al. Phenolic composition and antioxidant activity of the aqueous extract of bark from residues from mate tree (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) bark harvesting concentrated by nanofiltration. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 399-405, 2012.
- QUINTANA C.; BELLEFQIH S.; LAVAL J.Y. Study of localization of iron, ferritin, and hemossiderin in Alzheimer's disease hippocampus by analytical microscopy at the subcellular level. **Journal of Structural Biology**, v.153, p.42-54, 2006.
- REOLON, G. K. et al. Sex and the housing: Effects on behavior, cortisol levels and weight in zebrafish. **Behavioural brain research**, v. 336, p. 85-92, 2017.
- RIGO, L.; SCHEIN, C. I.; OLIVEIRA, S. V.; ANDREATTA, T.; **Análise do mercado da erva-mate no Brasil e no Rio Grande do Sul. Área Temática - D.** Estudos setoriais, cadeias produtivas, sistemas locais de produção. 15 p. 2014.
- RISCH, S. J.; REINECCIUS, G. A. Encapsulation and controlled release of food ingredients. **ACS Symposium Series**, p. 51-90, 1995.
- RITTER, C., ANDRADES, M. E., REINKE, A., MENNA-BARRETO, S., MOREIRA, J. C. F., DAL-PIZZOL, F. Treatment with n-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 32, p. 342-349, 2004.
- ROEDER, M.; ROEDER, R.H. Effect of iron on the growth rate of fishes. **Journal Nutrition**, n. 90, p. 86-90, 1966.
- RUTZ, K. J., et al. Microencapsulation of purple Brazilian cherry juice in xanthan, tara gums and xanthan-tara hydrogel matrixes, **Carbohydrate Polymers**, v.98, p.1256-1265, 2013.
- SACHETT, A. et al. O cloridrato de ractopamina induz alterações comportamentais e desequilíbrio do estado oxidativo em peixes-zebra. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, n. 81, p. 194-201, 2018.
- SANTOS, A. F. S. **Ferro: Benefícios a Saúde**. 8ª Mostra Acadêmica Unimep, 2010.
- SCALBERT, A. et al. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, p.287-306, 2005.
- SCHINELLA, G. R. et al. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, n. 2, p. 357-360, 2000.
- SUN, H. J. et al. Short-term exposure of arsenite disrupted thyroid endocrine system and altered gene transcription in the HPT axis in zebrafish. **Environmental Pollution**. v. 205, p. 145-152, 2015.
- SILVA, E. L. da, et al. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation; **Food Research International**; v.41, p. 973-979, 2008.

- SILVA, J.G. **Estudo voltamétrico da interação dos íons Zn²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺ e Pb²⁺ com a enzima catalase.** 2007.
- SILVA, P. T. DA et al. Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. **Ciência Rural**, v. 44, n. 7, p. 1304–1311, 2014.
- SOARES, A. A. et al. Avaliação da peroxidação lipídica no plasma de ratos submetidos à lesão tecidual e tratados com hidrogel de poliamido de mandioca. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 19, n. 3, 2016.
- SOUZA, A.L.R. et al. Microencapsulação de sucos e polpas de frutas por spray drying: uma revisão. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 17, n. 3, p. 327-338, 2015.
- SPENCE, R. et al. The behavior and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 83, n. 1, p. 13-34, 2008.
- STREIT, N. M.; HECKTHEUER, L. H. R.; CANTO, M. W.; MALLMANN, C. A.; STRECK, L., PARODI, T. V.; CANTERLE, L. P. Relation among taste-related compounds (phenolics and caffeine) and sensory profile of erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Food Chemistry**, v. 102, p. 560–564, 2007.
- TRINDADE, C. S. F.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103–112, 2008.
- VALADAS, J. et al. O propiconazol induz comportamento anormal e estresse oxidativo em peixes-zebra. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 27808-27815, 2019.
- VIEIRA, M.A. et al. Chemical characterization of candy made of erva-mate (*Ilex paraguariensis* A St. Hil.) residue. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 4637–4642, 2008.
- VIEIRA, M.A. et al. Phenolic acids and methylxanthines composition and antioxidant properties of mate (*Ilex paraguariensis*). **Residue. Journal of food Science**, v. 75, p. 283- 285, 2010.
- VULCANO, M., MEISS, P. R., ISTURIZ, A. M. Deferoxamine reduces tissue injury and lethality in LPS-treated mice, **International Journal of Immunopharmacology**, v. 22, p. 635-644, 2000.
- WANG, X. et al. Silk microspheres for encapsulation and controlled release. **Journal of Controlled Release**, v. 117, n. 3, p. 360–370, 2007.
- WINGERT, R.A., et al. The chianti zebrafish mutant provides a model for erythroid-specific disruption of transferrin receptor 1. **Development**, n. 131, p. 6225-6235, 2004.

ZHANG X. et al. Neuroprotection by iron chelator against proteasome inhibitor-induced nigral degeneration. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 333, p. 544-549, 2005

ANEXOS



INSTITUTO FEDERAL DE
EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
RIO GRANDE DO SUL
Câmpus Sertão

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Sertão, 30 de março de 2020
CEUA N 7849300320

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE PROPOSTA À COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CPF: 960.774.170-68

Título do projeto: BENEFÍCIOS DO USO DE SUPLEMENTOS NA ERVA-MATE(Ilex paraguariensis)

Responsável: Rosilene Rodrigues Kaizer Perin

Equipe: Diego Tessaro

Telefone: 54 96272212

e-mail: rosilene.perin@sertao.ifrs.edu.br

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Federal do Rio Grande do Sul, avaliará os documentos seguindo calendário de reuniões vigentes. Todo o processo poderá ser acompanhado no sistema (<http://www.ceua.sertao.ifrs.edu.br>) por meio da sua senha de acesso.

Prof. Eliezer Jose Pegoraro
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Juliana dos Santos
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Federal do Rio Grande do Sul