



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

MAICON ODY DE PAULA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEUROMODULADOR DA ERVA MATE (*Ilex*
paraguariensis St. Hill) EM *Caenorhabditis elegans* E *Danio rerio***

ERECHIM

2020

MAICON ODY DE PAULA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEUROMODULADOR DA ERVA MATE (*Ilex
paraguariensis* St. Hill) EM *Caenorhabditis elegans* E *Danio rerio***

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 Dra. Rosilene Rodrigues Kaizer Perin.

ERECHIM
2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

Rua General Osório, 413D
CEP: 89802-210
Caixa Postal 181
Bairro Jardim Itália
Chapecó - SC
Brasil

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Paula, Maicon Ody de
Avaliação do potencial neuromodulador da erva-mate
(*Ilex paraguariensis* St.Hill) em *Caenorhabditis elegans*
e *Danio rerio* / Maicon Ody de Paula. -- 2020.
100 f.:il.

Orientadora: Doutora Rosilene Rodrigues Kaizer Perin

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia Ambiental, Erechim, RS, 2020.

1. *Ilex paraguariensis*. 2. Alumínio. 3.
Antioxidantes. I. Perin, Rosilene Rodrigues Kaizer,
orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III.
Título.

MAICON ODY DE PAULA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEUROMODULADOR DA ERVA MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hill) EM *Caenorhabditis elegans* E *Danio rerio*

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 17/03/2020.

Orientador (a): Prof^ª. Dra. Rosilene Rodrigues Kaizer Perin

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Rosilene Rodrigues Kaizer Perin – IFRS Campus Sertão

Prof^ª. Dra. Silvane Souza Roman – URI Campus Erechim

Prof. Dr. Leonardo José Gil Barcellos – UPF- Campus Passo Fundo

ERECHIM/RS, 2020

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela força e por me guiar na minha caminhada e por me permitir chegar até aqui e conquistar essa vitória.

Aos meus pais João e Vanice, por todo o amor e apoio em todos os dias difíceis e por acreditarem no meu potencial. Vocês são meu porto seguro, com toda certeza só cheguei aqui com a ajuda de vocês, sou eternamente grato.

Ao meu irmão Marlon, por toda a paciência e pelas palavras de incentivo, que sempre me ajudou.

Ao meu cachorro Yuri membro da família também, pela felicidade contagiante e pelo amor que me proporcionou.

Agradeço a minha orientadora Rosilene, pela oportunidade, por toda a paciência, compreensão e por confiar no meu potencial.

Aos colegas de laboratório, Maria, Renata, Giovana, Ana, Nathália, Wagner e Ani por alegrarem meus dias e por toda ajuda nos experimentos, essa conquista também é de vocês.

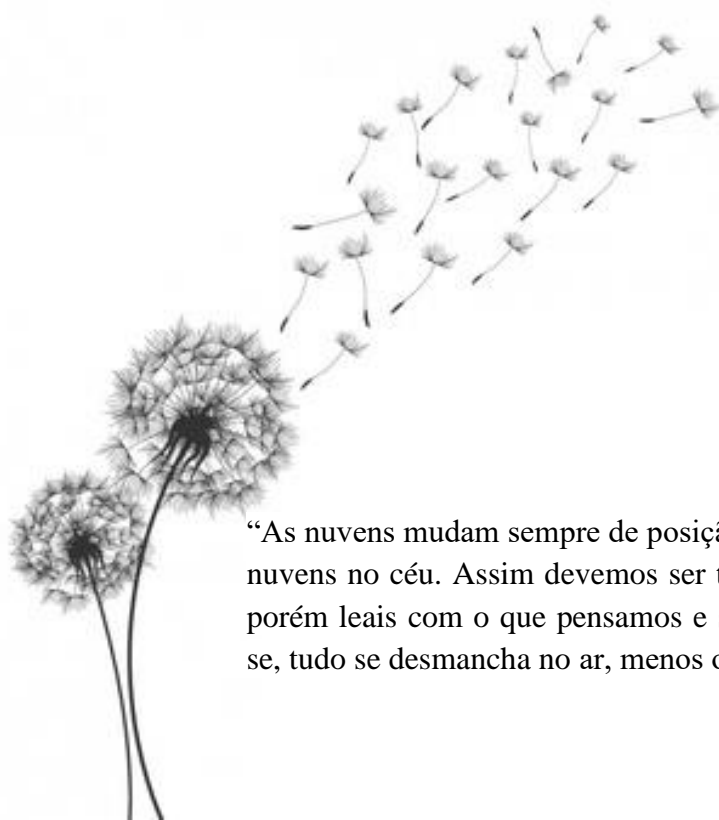
A todos meus familiares, amigos e colegas, obrigado por tudo, e principalmente, por entenderem minha ausência em alguns momentos.

A UFFS, IFRS, URI e UPF, por permitirem a realização dos experimentos desse trabalho.

A CAPES e FAPERGS, pela concessão da bolsa.

A todos os professores pelos ensinamentos e inspirações.

Por fim a todos que de alguma forma me ajudaram, meu mais sincero obrigado!



“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.

(Paulo Beleki)

RESUMO

A erva-mate é uma planta nativa da América do Sul, amplamente consumida na forma do chimarrão. A presença de propriedades antioxidantes já conhecidas na erva mate, torna o estudo desta planta algo bastante relevante, podendo contribuir em pesquisas que avaliam o efeito de seus compostos na proteção contra estresses oxidativos que podem ocasionar doenças neurodegenerativas. Sabe-se que o metal Al, está presente em grande quantidade na crosta terrestre, podendo ser encontrado em tratamento de águas e na própria composição da erva-mate. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar se a planta *Ilex paraguariensis* possui papel preventivo ou remediador frente ao estresse induzido por Al, utilizando as concentrações encontradas na própria erva-mate nos organismos *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) e *Danio rerio* (Zebrafish). Foram avaliados parâmetros enzimáticos e comportamentais em ambos os organismos modelos. Num primeiro momento foi quantificado a presença de Al nos riachos da Bacia Hidrográfica da Corsan Erechim/RS, a fim de avaliar se o Al ingerido no chimarrão, era devido a água do preparo ou a erva-mate e os resultados demonstraram que o conteúdo do Al ingerido é devido a própria erva-mate. Sendo assim foram utilizadas concentrações de Al encontradas na própria planta, baseando-se em um trabalho anterior do grupo de pesquisa, onde foram definidas três concentrações sendo 5,5; 8,0 e 10,5 mg/mL de Al. E o extrato de erva-mate utilizado foi preparado a 75°C simulando uma infusão de chimarrão. Os ensaios de exposição *in vivo* ao Al demonstraram que as doses utilizadas foram tóxicas causando estresse oxidativo que consequentemente interferiram nas atividades enzimáticas e comportamentais. Porém quando os organismos foram submetidos ao extrato de erva-mate, demonstrou que o extrato é capaz de melhorar a resistência enzimática durante condições de estresse oxidativo, e ainda apresentou uma atividade antioxidante mais eficaz após a instalação do dano oxidativo, devido à atividade das enzimas na eliminação das moléculas bioativas, tendo um efeito maior de remediação do que proteção.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*; Alumínio; remediador; antioxidante.

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. It is known that the metal Al is present in large quantities in the earth's crust, and can be found in water treatment and in the composition of yerba mate. In this context, the objective of the work was to evaluate whether the *Ilex paraguariensis* plant has a preventive or remedial role in face of the stress induced by Al, using the concentrations found in the mate herb itself in the organisms *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) and *Danio rerio* (Zebrafish). Enzymatic and behavioral parameters were evaluated in both model organisms. At first, the presence of Al in the streams of the Hydrographic Basin of Corsan Erechim / RS was quantified, in order to assess whether the Al ingested in the chimarrão, was due to the preparation water or the yerba mate and the results showed that the content of the Al ingested is due to the yerba mate itself. Thus, concentrations of Al found in the plant itself were used, based on previous work by the research group, where three concentrations were defined, 5.5; 8.0 and 10.5 mg / ml of Al. And the yerba mate extract used was prepared at 75 ° C simulating an infusion of mate. The *in vivo* exposure tests to Al showed that the doses used were toxic, causing oxidative stress that consequently interfered in enzymatic and behavioral activities. However, when the organisms were submitted to the extract of yerba mate, it demonstrated that the extract is able to improve the enzymatic resistance during oxidative stress conditions, and also presented a more effective antioxidant activity after the installation of the oxidative damage, due to the activity of enzymes in the elimination of bioactive molecules, having a greater remediation effect than protection.

Keywords: *Ilex paraguariensis*; Aluminum; remediation; antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Atividade das enzimas SOD e CAT	30
Figura 2. Sinapse Colinérgica	31
Figura 3. Nematódeo <i>C. elegans</i>	32
Figura 4. Ciclo de Vida do <i>C. elegans</i>	33
Figura 5. <i>Danio rerio</i>	35
Figura 6. Delineamento experimental geral	36
Figura 7. Delineamento experimental da exposição <i>per se</i> . Vermes expostos agudamente durante 1 hora ao Al ou extrato de erva-mate	41
Figura 8. Delineamento experimental da pré-exposição. Vermes expostos agudamente durante 30 min a erva-mate ou água e após 1h ao Al.....	41
Figura 9. Delineamento experimental da pós-exposição. Vermes expostos agudamente durante 1h ao Al e após 30 min à erva-mate ou água	42
Figura 10. Delineamento experimental da pós-exposição. Vermes expostos cronicamente durante 1h ao Al ou água e após 48 h ao Al, erva-mate ou água.....	43
Figura 11. Delineamento experimental de exposição crônica do organismo modelo Zebrafish.....	46
Figura 12. Protocolo de Comportamento social (SOFIATTI, 2018)	48
Figura 13. Protocolo Agressividade (SOFIATTI, 2018)	49
Figura 14. Protocolo Tanque Novo (SOFIATTI, 2018).....	50
Figura 15. Relação Dose-resposta entre a concentração de extrato de erva-mate com a % de inibição de radical DPPH	51
Figura 16. Concentração do Al nos diferentes pontos coletados. (*) Representa uma diferença significativa entre a amostra Tratada e os demais riachos. Foi utilizado a análise de ANOVA <i>one-way</i> , seguido pelo teste <i>pos-hoc</i> de <i>Tukey</i> , sendo considerado significativo $p < 0,05$. Os dados são expressos como média \pm erro padrão. Ensaio realizado em triplicata.....	52

Figura 17. Atividade da acetilcolinesterase (AChE), no tratamento a *per se* . Comparação dos tratamentos com o controle. Dados analisados pela ANOVA *one-way*, seguido por test *post-hoc* de *Tukey* onde a significância é representada por (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$. Os dados são expressos como média \pm erro padrão.....53

Figura 18. Atividade da acetilcolinesterase no organismo *C.elegans*. Onde: A) Pré-exposição ao extrato e B) Pós-exposição ao extrato. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Dados foram analisados pela ANOVA *one-way*, seguida por teste de comparação múltipla de *Dunnett's* com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os dados são expressos como média \pm erro padrão54

Figura 19. Efeito da erva-mate na atividade da SOD no organismo *C.elegans*, representada pela soma de pixels, gerada pela *GFP* (*Green Fluorescent Protein*). Onde: A) Análise a *per se* ; B) Pré-exposição ao extrato e C) Pós-exposição ao extrato de erva-mate. (***) Representa diferença significativa quando comparada ao controle e letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Dados foram analisados pela ANOVA *one-way*, seguida por teste de comparação múltipla *tukey* (grupo *per se*) e *Dunnett's* (demais grupos), com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os dados são expressos como média \pm erro padrão. Experimentos realizados em triplicatas, com $n=6$ vermes55

Figura 20. Efeito da erva-mate na atividade da catalase no organismo *C.elegans*, representada pela soma de pixels, gerada pela *GFP* (*Green Fluorescent Protein*). Onde: A) Análise a *per se* ; B) Pré-exposição ao extrato e C) Pós-exposição ao extrato de erva-mate. (***) Representa diferença significativa quando comparada ao controle. Dados foram analisados usando ANOVA *one-way*, seguido de teste de *tukey* (grupo *per se*) e *Dunnett's* (demais grupos), com nível de significância de 95% ($p < 0,05$), representados com média \pm erro padrão. Experimentos realizados em triplicatas, com $n=6$ vermes.....56

Figura 21. Efeito da erva-mate na atividade da GST no organismo *C.elegans*, representada pela soma de píxels, gerada pela *GFP* (*Green Fluorescent Protein*). Onde: A) Análise a *per se* ; B) Pré-exposição ao extrato e C) Pós-exposição ao extrato de erva-mate. (***) Representa diferença significativa quando comparada ao controle e letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Dados foram analisados usando ANOVA *one-way*, seguido de teste de *tukey* (grupo *per se*) e *Dunnett's* (demais grupos), com nível de significância de 95% ($p < 0,05$), representados com média \pm erro padrão. Experimentos realizados em triplicatas, com $n=6$ vermes.....57

Figura 22. Análise comportamental do tipo bombeamento faríngeo no organismo *C.elegans*. Onde: A) Análise a *per se* ; B) Pré-exposição ao extrato e C) Pós-exposição ao extrato de erva-mate. (***) Representa diferença significativa quando comparada ao controle e letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Dados expressos com média \pm erro padrão., com $n=6$ analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.....58

Figura 23. Análise comportamental do ciclo de defecação no organismo *C.elegans*. Onde: A) Análise a *per se* ; B) Pré-exposição ao extrato e C) Pós-exposição ao extrato de erva-mate. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Dados expressos com média \pm erro padrão, com $n=6$ analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.....59

Figura 24. Atividade da acetilcolinesterase (AChE), em exposição crônica no organismo *C. elegans*. Comparação dos tratamentos com o controle. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Dados foram analisados pela ANOVA *one-way*, seguida por teste de comparação múltipla de *Tukey* com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os dados são expressos como média \pm erro padrão.....60

Figura 25. Atividade da enzima SOD em exposição crônica do organismo *C. elegans*. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Dados foram analisados pela ANOVA *one-way*, seguida por teste de comparação múltipla de *Dunnett's* com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os dados são expressos como média \pm erro padrão.....61

Figura 26. Atividade da enzima CAT em exposição crônica no organismo *C. elegans*. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Dados foram analisados pela ANOVA *one-way*, seguida por teste de comparação múltipla de *Dunnett's* com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os dados são expressos como média \pm erro padrão.....62

Figura 27. Atividade da enzima GST em exposição crônica no organismo *C. elegans*.. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Dados foram analisados pela ANOVA *one-way*, seguida por teste de comparação múltipla de *Dunnett's* com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os dados são expressos como média \pm erro padrão.....62

Figura 28. Gráfico de Análise comportamental do tipo bombeamento faríngeo em exposição crônica. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Dados expressos com média \pm erro padrão, com $n=6$ analisados pelo teste de KruskalWallis.....63

Figura 29. Gráfico de Análise comportamental do ciclo defecação em exposição crônica. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Dados expressos com média \pm erro padrão, com $n=6$ analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.....64

Figura 30. Atividade da acetilcolinesterase (AChE), do Zebrafish em exposição crônica, . Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Dados foram analisados pela ANOVA *one-way*, seguida por teste de comparação múltipla de *Tukey* com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os dados são expressos como média \pm erro padrão.....65

Figura 31. Atividade da enzima CAT do organismo Zebrafish em exposição crônica. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Dados foram analisados pela ANOVA *one-way*, seguida por teste de comparação múltipla de *Dunnett's* com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os dados são expressos como média \pm erro padrão.....66

Figura 32. Análise do nível de peroxidação lipídica do organismo modelo Zebrafish em exposição crônica. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Dados foram analisados pela ANOVA *one-way*, seguida por teste de comparação múltipla de *Dunnett's* com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os dados são expressos como média \pm erro padrão.....67

Figura 33. Comportamento social de peixes expostos cronicamente a diferentes concentrações de Al e uma de erva-mate (75°C). Onde: (A) entradas no segmento do cardume, (B) tempo de permanência no segmento do cardume e (C) tempo de permanência no segmento vazio. Dados expressos com média \pm E.P., com n=9 analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.....68

Figura 34. Agressividade de peixes expostos cronicamente a diferentes concentrações de Al e uma de erva-mate (75°C), submetidos à ambientação de 30s. (A) tempo de permanência no segmento 1, (B) entradas no segmento1. Dados expressos em média \pm E.P., com n=9, analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.....69

Figura 35. Agressividade de peixes expostos cronicamente a diferentes concentrações de Al e uma de erva-mate (75°C), submetidos à ambientação de 10min. (A) tempo de permanência no segmento 1, (B) entradas no segmento1. Dados expressos em média \pm E.P., com n=9, analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.....69

Figura 36. Parâmetros locomotores de peixes expostos cronicamente a diferentes concentrações de Al e uma de erva-mate (75°C). (A) tempo de permanência no topo do aquário (s), (B) entradas na zona superior e (C) distância percorrida (m). Dados expressos em média \pm E.P., com n=9, analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.....70

LISTA DE TABELAS

- Tabela I:** Coordenadas geográficas de cada riacho com seus pontos de coleta.....39
- Tabela II:** Caracterização fitoquímica do extrato de erva-mate. Os dados demonstrados foram analisados em triplicata, apresentados como média \pm desvio padrão.....51

LISTA DE ABREVIATURAS

EROs- Espécies reativas de oxigênio

DA- Doença de Alzheimer

SOD- Superóxido dismutase

CAT- Catalase

GPx- Glutathiona peroxidase

Al- Alumínio

A β - β -amilóide

AChE- Acetilcolinesterase

ACh- Acetilcolina

C. elegans- *Caenorhabditis elegans*

%- Porcentagem

ETA- Estação de Tratamento de Água

NADPH- Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo

UV- Ultra violeta

H₂O- Água

O₂- Oxigênio

ATP – Trifosfato de adenina

O₂⁻ Ânion superóxido

OH- Radical hidroxila

H₂O₂- Peróxido de hidrogênio

DNA- Ácido desoxirribonucleico

ChAT- Colina acetiltransferase

CHT- Transportador de colina

VAcHT- Transportador de acetilcolina vesicular

nAChR- Receptor nicotínico

mAChR- Receptor muscarínico

SNC- Sistema nervoso central

SNP- Sistema nervoso periférico

Acetil- CoA- Acetilcoenzima A

GFP- *Green Fluorescent Protein*

°C- Graus Celsius

cm- Centímetros

g- Gramas

ml- Mililitros

mg/mL- Miligramas por mililitros

nm- Nanômetro

abs- Absorbância

HPLC- *High Performance Liquid Chromatography*

PDA- Detector de Arranjo de Diodos

ml/min- Mililitros por minuto

mg- Miligramas

µg/mL- Microgramas por mililitros

DPPH- Diphenyl-1-picrylhydrazy

ABTS- 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid

µl/mL- Microlitros por mililitros

µmol/L- Micromol por litro

µl- Microlitros

min- Minuto

l- Litros

Pi- Ponto inicial

Pf- Ponto final

USA- Unitad State of America

E. coli- Escherichia coli

h- Hora

s- Segundo

DTNB- Ácido 2-nitrobenzóico

Mm- Milimolar

ASChI- Iodeto de acetiltiocolina

GST- Glutathione S-transferase

Nº- Número

Rpm- Rotações por minuto

µMol- Micromol

TCA- Ácido Tricloroacético

TBARS- Substância reativas ao ácido tiobarbitúrico

MDA- Malonaldeído

RES- Resolução

LISTA DE SIGLAS

CEUA- Comissão Ética de Uso de Animais

CONAMA- Conselho Nacional do Meio Ambiente

IFRS- Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul

LISTA DE SIMBOLOS

~ Aproximadamente

< Menor

± Mais o menos

° Graus

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1 OBJETIVO GERAL	24
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 ERVA-MATE CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES	25
2.2 ALUMÍNIO	26
2.3 ESTRESSE OXIDATIVO X SISTEMA ANTIOXIDANTE.....	28
2.4 ACETILCOLINESTERASE	30
2.5 ORGANISMOS MODELOS.....	32
2.5.1 <i>Caenorhabditis elegans</i>	32
2.5.2 <i>Danio rerio</i> (<i>Zebrafish</i>)	34
3. METODOLOGIA.....	36
3.1 PREPARAÇÃO DO EXTRATO DE <i>Ilex paraguariensis</i>	36
3.2 COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXANTE DE EXTRATO DE ERVA-MATE.....	36
3.2.1 Fenóis totais	36
3.2.2 Flavonóides totais	37
3.2.3 Cromatografia líquida de alta frequência.....	37
3.2.4 Ensaio antioxidante <i>in vitro</i>	38
3.3 COLETA DE ÁGUA DOS RIACHOS DA BACIA HIDROGRÁFICA DA CORSAN-ERECHIM/RS	39
3.5 ORGANISMO MODELO <i>Caenorhabditis elegans</i>	39
3.5.1 MANUTENÇÃO DO <i>C. elegans</i>	39
3.5.2 Tratamentos em <i>C. elegans</i>	40
3.5.2.1 Screening (pré-teste) em exposição aguda	40
3.5.2.2 Exposição Crônica.....	42
3.5.3 Análise enzimática aguda e crônica.....	43
3.5.3.1 Determinações de proteínas totais e atividade da acetilcolinesterase (AChE)....	43
3.5.3.2 Análises enzimáticas da Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione S-transferase (GST).	44
3.5.3 Análise comportamental aguda e crônica	44
3.5.3.1 Batimento faríngeo	44
3.5.3.2 Ciclo de defecação.....	44
3.6 ORGANISMO MODELO <i>Danio rerio</i>	45

3.6.1 Nota ética	45
3.6.2 Procedimento do <i>Danio rerio</i>	45
3.6.3 Tratamento crônico	45
3.6.4 Análise enzimática	46
3.6.4.1 Preparo do extrato.....	46
3.6.4.2 Determinações de proteínas totais e atividade da acetilcolinesterase (AChE)...	46
3.6.4.3 Atividade da Catalase (CAT)	47
3.6.4.4 Análise da peroxidação lipídica (TBARS)	47
3.6.5 Avaliação comportamental	48
3.6.5.1 Comportamento social.....	48
3.6.5.1 Agressividade	48
3.6.5.1 Teste do tanque novo- Ansiedade.....	49
4.0 RESULTADOS	50
4.1 COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DA ERVA-MATE	50
4.1.1 Análises dos compostos da erva-mate	50
4.1.2 Ensaio antioxidante <i>in vitro</i>	51
4.2 CONCENTRAÇÕES DE ALUMÍNIO NA ERVA-MATE E EM RIACHOS.....	51
4.3 ANÁLISES AGUDAS <i>C.elegans</i>	53
4.3.1 Atividade da Acetilcolinesterase.....	53
4.3.2 Atividade enzimática do sistema antioxidante.....	54
4.3.2.1 Superóxido Dismutase (SOD)	54
4.3.2.2 Catalase (CAT).....	55
4.3.2.3 Glutationa S-transferase (GST-4).....	56
4.3.3 Análise comportamental em <i>C. elegans</i>	57
4.3.3.1 Batimento Faríngeo	57
4.3.3.2 Ciclo de defecação.....	58
4.4 ANÁLISES CRÔNICAS	59
4.4.1 Análise crônica em <i>C.elegans</i>	60
4.4.2 Atividade enzimática do sistema antioxidante.....	61
4.4.2.1 Superóxido dismutase (SOD)	61
4.4.2.2 Catalase (CAT)	61
4.4.2.3 Glutationa S-transferase (GST)	62
4.4.3 Análise comportamental em <i>C. elegans</i> após exposição crônica	63
4.4.3.1 Batimento Faríngeo	63
4.4.3.2 Ciclo de defecação.....	63
4.5 ANÁLISES CRÔNICAS EM Zebrafish.....	64

4.5.1 Atividade da Acetilcolinesterase.....	64
4.5.2 Atividade da enzima Catalase (CAT)	65
4.5.3 Análises de peroxidação lipídica (TBARS).....	66
4.5.4 Análise comportamental crônica do Zebrafish	67
4.5.4.1 Comportamento social.....	67
4.5.4.2 Agressividade	68
4.5.4.3 Teste do tanque novo.....	69
5.0 DISCUSSÃO.....	71
6.0 CONCLUSÕES.....	77
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
8.0 ANEXOS.....	97

1. INTRODUÇÃO

O alumínio (Al) está presente em grande quantidade na crosta terrestre, sendo encontrado em alimentos, cosméticos, tratamento de águas, vegetais e no solo (LEINHART et al. 2017; MIGUEL et al, 2010). No entanto, apesar da sua abundância, nenhuma conexão com uma função biológica útil foi descoberta (EXLEY & MOLD, 2015). Os efeitos causados pela exposição a metais englobam o comprometimento no crescimento, na atividade enzimática e comportamento, bem como impactos ecológicos em organismos (JORGE et al., 2013). Estudos demonstraram que níveis elevados de Al são neurotóxicos, desenvolvendo uma maior propensão ao desenvolvimento de diversas patologias como esclerose múltipla, obesidade, Parkinson e a Doença de Alzheimer (AD) (TOMLIJENOVIC, L., 2011).

A erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil., é uma planta amplamente consumida na forma de chimarrão em países da América do Sul, que possui inúmeros efeitos positivos contra a geração de estresse oxidativo. Em relação ao desenvolvimento de novas formas de consumo, o mercado para essa matéria-prima tem aumentado nos últimos anos, em função de consumidores buscarem cada vez mais, produtos que possuam substâncias biologicamente ativas, apresentando benefícios à saúde (BURRIS, 2012).

Entre os inúmeros benefícios que esta planta pode proporcionar à saúde, entre eles estão: a ação hipocolesterolêmica e hepatoprotetora (FILIP e FERRARO, 2003; AÇARI, 2009), a estimulação do sistema nervoso central, a ação diurética (GONZALEZ et al., 1993), a inibição da proliferação de células do câncer de colón (MEJÍA et al., 2010), e principalmente a atividade antioxidante (ANESINI et al., 2012; JAISWAL et al., 2010).

Os organismos possuem um complexo antioxidante enzimático e não-enzimático, que os protege contra as EROs (SODHI, et al., 2008). Os antioxidantes não-enzimáticos são geralmente moléculas pequenas, como ascorbato e glutathione, que são obtidos de forma exógena através da dieta. Já os enzimáticos destacam-se o sistema de defesa antioxidante primário composto por superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (PAMPLONA e COSTANTINI, 2011).

Ensaio com o auxílio de organismos indicadores são frequentemente realizados para fornecer informações sobre potenciais riscos ambientais, bem como, a intoxicação pela exposição aos metais presentes em estudos *in vivo* e *in vitro*, avaliando efeitos agudos e crônicos (SHEN et al., 2009).

Dentre os organismos modelos, está *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), um organismo invertebrado, apresenta fácil cultivo em laboratório e é utilizado para testar os

efeitos de diferentes compostos como fármacos, metais, hormônios, e demais toxicantes (BRENNER, 1974). Além disso, o verme oferece um sistema alternativo e complementar para decifrar os mecanismos bioquímicos de doenças neurodegenerativas, sendo capaz de recapitular vários dos processos celulares que estão na base da etiologia da Doença de Alzheimer (WU & LUO, 2005). Outro modelo animal bastante utilizado é o organismo vertebrado *Danio rerio* (Zebrafish), um peixe que possui alta similaridade fisiológica com os seres humanos, apresenta respostas comportamentais robustas e tem seu genoma inteiramente sequenciado e caracterizado (CACHAT, 2013). O Zebrafish é um modelo inovador e crítico para a pesquisa em neurociência, biologia sensorial, fisiologia do estresse e síndromes comportamentais (ABREU et al., 2017). Vivem em cardumes e apresentam sociabilidade, onde distúrbios nestes comportamentos podem ser facilmente visualizados aumentando sua importância em estudos relacionados ao sistema nervoso (MESHALKINA et al., 2017).

Com isso, este trabalho tem como objetivo avaliar se o extrato da planta *Ilex paraguariensis* possui um papel preventivo ou remediador, frente ao estresse induzido por Alumínio em dois organismos modelos sendo um invertebrado (*C. elegans*) e um vertebrado (*Danio rerio*).

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se o extrato de *Ilex paraguariensis*, exerce papel neuromodulador frente ao estresse induzido por Alumínio.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar se o extrato de erva-mate obtido apresenta um alto potencial antioxidante e compostos fitoquímicos;
- Avaliar se a concentração de Al presente na Bacia Hidrográfica da Corsan-Erechim/RS (ETA) pode influenciar nas propriedades benéficas do chimarrão;
- Avaliar o pré e pós tratamento ao extrato de erva-mate na prevenção e remediação de danos biológicos causados pelo excesso de EROs, devido a exposição ao estressor Al;
- Avaliar o estresse oxidativo em dois modelos biológicos sendo um invertebrado (*C.elegans*) e um vertebrado (*Danio rerio*), utilizando biomarcadores enzimáticos;
- Determinar o efeito do Al sobre o sistema nervoso colinérgico e na geração de espécies reativas de oxigênio;

- Avaliar o efeito sobre os parâmetros comportamentais, batimento faríngeo e defecação, de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) após exposição crônica e ao extrato aquoso de erva-mate e a diferentes concentrações de Al;
- Avaliar o efeito sobre os parâmetros comportamentais, ansiedade, agressividade e preferência social, de *Danio rerio* após exposição crônica e ao extrato aquoso de erva-mate e a diferentes concentrações de Al.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ERVA-MATE CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES

A *Ilex paraguariensis* St. Hil., conhecida popularmente como erva mate, é uma planta pertencente à família *Aquifoliaceae*, encontrada naturalmente no Brasil, Argentina e Paraguai. No Brasil, os estados do Mato Grosso do Sul, Santa Catarina e Rio grande do Sul são os que mais consomem a planta na forma de chimarrão, tererê ou chá mate (BONDARIK et al., 2006).

O chimarrão é uma bebida tradicional, que para seu consumo utiliza-se um recipiente feito da fruta “porongo” (*Lagenaria siceraria*), que é chamado de "cuia", neste a erva ocupa dois terços do espaço interno e o volume livre é completado com água quente formando uma infusão parcial (parte da erva permanece seca) (MEINHART et al., 2010). Na América do Sul, aproximadamente 30% da população consome mais que 1 litro/dia desta bebida (BRACESCO et al. 2011).

A erva-mate possui diversos benefícios para a saúde, devido as suas propriedades fitoquímicas. Estas incluem os compostos fenólicos como, os derivados cafeoil (ácido cafeico, ácido clorogenico, 3, 4-dicafeoilquínico, ácido 4, 5-dicafeoilquínico ácido e de ácido 3,5-dicafeoilquínico), fitosteróis, saponinas (ALKHATIB, 2014), flavonoides, alcalóides (cafeína, teobromina), esteróides e/ou triterpenos (VALDUGA et al., 1997; PEIXOTO, et al., 2011), muitos estudos apontam também para o acúmulo de cafeína e teobromina (FREITAS et al., 2011).

Estes princípios ativos têm sido utilizados para explicar os vários benefícios associados com o consumo de erva-mate incluindo a ação vasodilatadora, ação anti-mutagênicas, efeitos anti-glicação (ALKHATIB, 2014) e a atividade antioxidante, a qual se destaca (ARÇARI et al., 2009). Os compostos fenólicos presentes na erva-mate são abundantes e presentes também em frutas e legumes. Estes possuem um amplo impacto sobre

o sistema biológico, tendo sua propriedade antioxidante, como característica mais interessante, sendo descrita como capazes de diminuir o estresse oxidativo (KARAKAYA, 2004; BASTOS et al., 2006).

Níveis elevados de estresse oxidativo, são fenômenos apresentados como causa de muitas doenças tendo como solução a ação antioxidante para normalização. Em um estudo prévio do nosso grupo, Bortoli et al. (2018) analisou o potencial antioxidante de extratos de erva-mate em *Caenorhabditis elegans*, um modelo experimental de Doença de Alzheimer. Outros estudos também foram realizados usando a erva-mate como antioxidante em isquemia miocárdica, diabetes, hiperlipidemia entre outros (YUAN et al., 2017; BOAVENTURA et al., 2013; ARCARI et al., 2011).

2.2 ALUMÍNIO

O Al é abundante no meio ambiente, representando 8,8 % da crosta terrestre (BONDY, 2016). Está presente em diferentes áreas, como na construção civil, transportes, tintas, explosivos químicos, medicina, cosmética, e na indústria alimentar (embalagens, panelas), além de muito usado no tratamento de águas como agente coagulante (NIDHEESH, 2018). Sendo assim, o ser humano se expõe ao alumínio inevitavelmente, já que essa substância se encontra disponível na natureza, principalmente devido a sua mobilização por ação antrópica. (ROSALINO, 2011).

A crescente solubilidade desse elemento leva a alterações na sua especiação química, podendo alterar-se da forma particulada e orgânica menos tóxica a formas de monômeros inorgânicos mais tóxicos (WENG et al., 2002). Esse metal encontra-se em forma de monômeros inorgânicos (maior toxicidade) nas águas superficiais, e apresenta efeito de diminuição de diversas espécies de organismos vivos, tendo a capacidade de atravessar as membranas biológicas (WARBY et al., 2008). Por isto é considerado tóxico para as populações vegetais e animais a nível aquático em águas ácidas.

Segundo Bondy (2016) a forma mais comum de exposição humana ao Al é através do trato gastrointestinal, através do consumo diário na dieta, que promove a absorção de cerca de 15 mg de Al (ABAL, 2017). A ingestão de produtos farmacêuticos também pode contribuir na absorção, já que os antiácidos possuem uma concentração bem elevada de Al, quando comparados a outros medicamentos ou qualquer alimento (GREGER, 1993). Os analgésicos como a aspirina, anti-ulcerativos, produtos antidiarreicos, medicamentos hemorroidais e aglutinantes de fósforos, aproveitados em drogas de tratamento da hiperfosfatemia em

pacientes urêmicos com insuficiência renal também possuem diferentes sais de Al, como o Hidróxido de Al ($\text{Al}(\text{OH})_3$), Glicinato de Al ($\text{C}_2\text{H}_6\text{AlNO}_4$), Sulfato de Al ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) e o Silicato de Al (Al_2SiO_5) (GREGER, 1993; SONI et al., 2001; TICHY, 2003; MUDGE et al., 2011).

Além da ingestão de medicamentos, a água potável também contém o Al, sendo esta mais biodisponível, para os organismos. A maioria das Estações de Tratamento de Água (ETA) utilizam o sulfato de Al como agente floculante, que quando adicionado à água atrai pequenas partículas de matéria inorgânica, bactérias, vírus e outros organismos potencialmente perigosos para humanos, ajudando na filtração (CAESB, 2016). A biodisponibilidade do metal na água potável depende do pH, das relações químicas e dos equilíbrios entre os diferentes solutos, tais como silicatos, citratos, cálcio e flúor (CERVANTES et al., 2017). Se os níveis residuais são elevados, o Al pode precipitar no sistema de distribuição e alterações de escoamento podem originar a ressuspensão de sedimentos e um aumento nos níveis desse metal na água distribuída (CASTRO, 2015). Outro fator que pode contribuir no aumento expressivo da concentração residual do Al em águas tratadas são as chuvas ácidas que influenciam as águas superficiais (WANG et al., 2010).

Com isso, há certa preocupação da relação desse metal com a saúde humana, já que o mesmo se encontra em produtos de consumo e disponibilizado na natureza, fazendo com que o ser humano seja exposto inevitavelmente. No passado o Al foi tratado como elemento não nocivo ao organismo humano, mas a partir da década de 70 alguns autores passaram a relacioná-lo a algumas doenças, o que motivou diversos estudos para sua avaliação toxicológica (CERVANTES et al., 2017). Alguns destes autores pesquisaram as relações do Al com a doença de Alzheimer (DA) (OLIVEIRA et al., 2019). O Al foi relacionado à etiologia da doença de Alzheimer e outros tipos de demência com níveis médios de ingestão de Al através do fornecimento de água potável, provando ser a forma mais biodisponível para ser absorvida pelo intestino e que a maior parte do Al ingerido de outras fontes não é absorvido tão rapidamente (MARTYN et al., 1997; FRISARDI et al., 2010).

Análises *in vivo* demonstraram que a administração de Al aumenta a produção de β -amilóide ($\text{A}\beta$), promove sua agregação e inibe sua degradação nos cérebros de organismos modelos, consistente com o processo fisiológico da DA (KAWAHARA & KATO- NEGISHI, 2011; ZHAO et al., 2014). Estudos *in vitro* também demonstraram o acúmulo de $\text{A}\beta$ induzido por Al em neurônios cultivados do córtex cerebral de ratos (KAWAHARA et al., 2001; CHEN et al., 2010). Outro caso estudado, através de exames pós-mortes, revelou uma carga excessiva de Al no cérebro de pacientes após exposição crônica ao metal (WALTON, 2006;

EXLEY & VICKERS, 2014). Em adição, estudos de coorte demonstraram uma relação direta entre a exposição ao Al e o desenvolvimento da DA em cerca de 71% dos participantes do estudo (WANG et al., 2018).

Este potencial neurotóxico do Al está relacionado a sua característica de metal bioacumulador que pode alterar a fluidez de membranas biológicas, uma vez que seus sais são transferidos para o sistema vascular no sangue, na qual a maior parte do metal é ligada à transferrina (HARRIS et al., 2003), podendo entrar no sistema nervoso por meio do transporte através da barreira hematoencefálica usando endocitose da transferrina (BONDY, 2016). Neste trabalho foram avaliados os níveis de Al presentes nos riachos pertencentes à Bacia Hidrográfica da Corsan/ Erechim-RS, e na erva-mate, já que Bortoli (2018) e colaboradores demonstraram a presença de Al na erva-mate, para determinar se o consumo de Al se dá pela água ou pelo consumo da erva-mate.

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO X SISTEMA ANTIOXIDANTE

Em 1985 Helmut Sies, definiu o termo estresse oxidativo como “um distúrbio no equilíbrio pró-oxidante e antioxidante em favor do primeiro” (SIES, 1985), que leva à interrupção da sinalização redox e da função fisiológica (FRIJHOFF, et al. 2015). Nas células e tecidos, o estresse oxidativo é causado pelo desequilíbrio entre a produção e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade dos sistemas biológicos de desintoxicar esses produtos (PIZZINO, et al. 2017). As EROs são normalmente geradas como subprodutos do metabolismo do oxigênio, ou por fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAPDH) e oxidação da xantina oxidase, embora pudessem ser formados por estímulos exógenos, tais como luz UV, entre outros (KONIOR, et al. 2014; YISIREYILI, et al. 2017; PIZZINO, et al. 2017).

A maior parte do O₂ consumido pelos organismos aeróbicos é reduzida com segurança à H₂O em uma reação de transferência de quatro elétrons catalisada pela citocromo oxidase no complexo IV da cadeia respiratória dentro da membrana interna mitocondrial (WILSON, 2017). Isto é acoplado com a fosforilação oxidativa para produzir energia química na forma de trifosfato de adenina (ATP). Assim, a principal função do O₂ nos organismos aeróbicos é servir como um sumidouro para aceitar os elétrons gerados durante o catabolismo oxidativo de combustíveis à base de carbono para a produção eficiente de energia (WILSON, 2017).

No entanto, uma pequena porção de O₂ sofre redução parcial da cadeia respiratória, mas também durante outras atividades fisiológicas/bioquímicas, como fagocitose, ativação do

sistema imune, metabolismo de xenobióticos (GALARIS e PONTOPOULOS, 2008). Isso leva à formação de intermediários potencialmente nocivos, as EROs. Os membros desta família incluem o ânion superóxido (O_2^-), radicais hidroxila ($OH\bullet$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peróxidos lipídicos (GALARIS, et al. 2019). O excesso de geração de EROs pode resultar em dano celular nas formas de peroxidação lipídica, desdobramento de proteínas e danos ao DNA, os quais podem interferir significativamente nas funções celulares (SCHIEBER e CHANDEL, 2014). Além disso, altos níveis de EROs induzem a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, levando à morte celular via apoptose (REYTER, et al. 2007).

Em muitos tecidos a produção aumentada de EROs é promovida pela exposição a diversos fatores exógenos, como o Al que é um agente pro-oxidante (EXLEY, 2004). Para resistir a essa produção excessiva e limitar a atividade peroxidativa das EROs, os organismos vivos possuem dois sistemas antioxidantes, o enzimático e o não-enzimático (SODHI, et al. 2008). Os Antioxidantes não enzimáticos, em sua maioria são exógenos, ou seja, necessitam ser absorvidos pela alimentação apropriada. Os principais podem ser divididos em: Vitaminas Lipossolúveis (vitamina A, vitamina E, beta-caroteno), Vitaminas Hidrossolúveis (vitamina C, vitaminas do complexo B), os bioflavonóides (derivados de plantas), entre outros (VALKO et al., 2007). Já o sistema enzimático temos a enzima denominada superóxido dismutase, juntamente com outras duas – catalase e glutathione peroxidase – são as principais defesas antioxidantes que atuam nos organismos superiores (PAMPLONA e COSTANTINI, 2011)..

A SOD é uma metaloproteína com poder antioxidante enzimático potente. Possui 3 isoformas: a primeira que contém cobre e zinco, presente no citoplasma, a segunda que contém manganês e está presente na mitocôndria e a terceira isoforma presente no meio extracelular (BAR-OR 2015). Estas isoformas participam do processo de detoxificação dos radicais livres, são específicas na remoção do radical superóxido, catalisando a sua dismutação à peróxido de hidrogênio, através da reação que transforma dois ânions de radical superóxido (O_2^-) em um peróxido de hidrogênio menos reativo que o anterior, como demonstrado na Figura 1 (PARIHAR, et al. 2008).

Como resultante da atividade da SOD, o peróxido de hidrogênio, sofre a ação da catalase (CAT) chamada também de hidroperoxidase que está presente no meio intracelular sendo produzida em sua maior parte no fígado, que na presença de ferro livre, catalisa a transformação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Figura 1) (IWASE 2013).

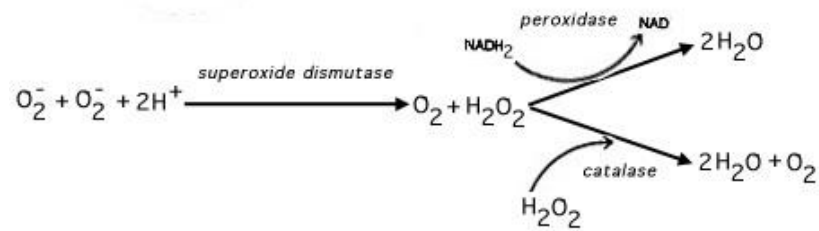


Figura 1. Atividade das enzimas SOD e CAT.

(Fonte: <http://arquivobioqui.blogspot.com/2015/sintese-e-reciclagem-acetilcolina.html>).

2.4 ACETILCOLINESTERASE

A acetilcolinesterase é uma enzima pertencente à família das colinesterases, responsável pela degradação de acetilcolina, um neurotransmissor, que quando presente na fenda sináptica promove a propagação do impulso nervoso. Em situação normal, após o término do estímulo, a acetilcolina é removida por recaptação ou por degradação enzimática, pela enzima acetilcolinesterase (ARAUJO et al., 2016).

Os principais componentes da via colinérgica são: acetilcolina (ACh), acetilcolinesterase (AChE), colina acetiltransferase (ChAT), transportador de colina (CHT), o transportador de acetilcolina vesicular (vAChT) e os receptores nicotínicos (nAChR) e muscarínicos (mAChR) (PAUL et al., 2015). A AChE está presente no Sistema Nervoso Periférico (SNP), onde modula os impulsos nervosos que controlam os batimentos cardíacos, a dilatação dos vasos sanguíneos e a contração dos músculos lisos, e no Sistema Nervoso Central (SNC) está envolvida no controle motor, na cognição e na memória (PETRONILHO, 2011).

O processo detalhado da AChE ocorre da seguinte forma: o neurotransmissor ACh é sintetizado pela colina acetiltransferase a partir de colina e acetilcoenzima A (Acetil-CoA) no axônio terminal, ficando contida em vesículas sinápticas; quando um impulso nervoso atinge o axônio terminal, é liberada a ACh por exocitose para a fenda sináptica, a qual é atraída pelos receptores colinérgicos (nicotínico e muscarínico) localizados na membrana pós-sináptica (Figura 2), resultando na propagação do impulso nervoso (PETRONILHO, 2011). Após efetuar sua função, a ACh é hidrolisada pela enzima AChE em acetato e colina, na fenda sináptica (FUJII et al., 2008). A colina, por sua vez, é em sua maioria recaptada por um transportador de colina (CHT) para o terminal pré-sináptico, onde atua como precursora na síntese de uma nova molécula de ACh (SARTER & PARIKH, 2005).

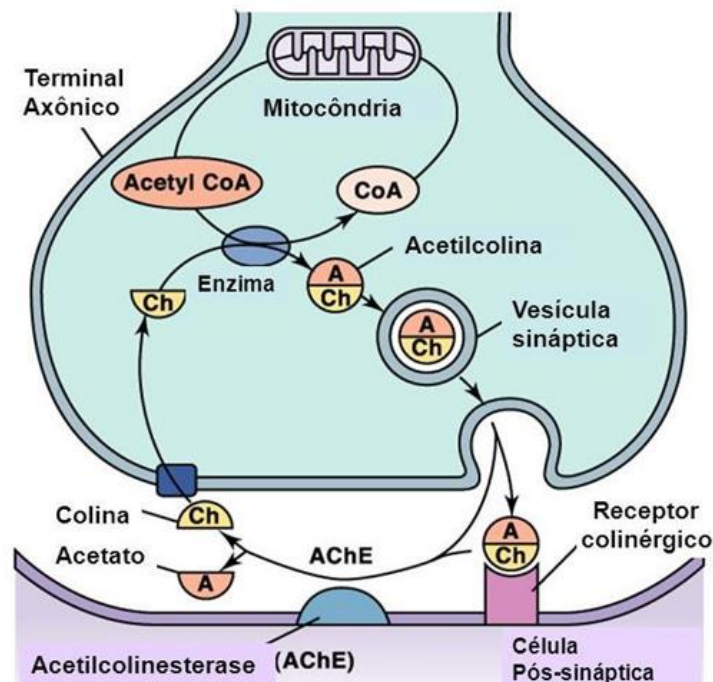


Figura 2. Sinapse Colinérgica

(Fonte:<http://arquivobioqui.blogspot.com/2015/sintese-e-reciclagem-acetilcolina-na.html>).

A AChE desempenha um papel fundamental no SNC e está relacionada ao controle do comportamento, bem como aprendizado e memória, além de atuar na organização cortical do movimento, e controle do fluxo sanguíneo cerebral, portanto, distúrbios nesta enzima remetem a doenças neurológicas (MESULAM et al., 2002; MORETTO et al., 2004). Na DA, há uma diminuição de ACh no cérebro devido à morte dos neurônios colinérgicos, diminuindo os sinais excitatórios (STAHL, 2000). No entanto, evidências clínicas acumuladas até os anos iniciais de 2000, sugerem um efeito sintomático e neuroprotetor "anti-Alzheimer" promovido por fármacos inibidores da acetilcolinesterase (MUNOZ-TORRERO, 2008).

Os inibidores da acetilcolinesterase alteram a função colinérgica central ao inibir as enzimas que degradam a acetilcolina, aumentando, assim, a capacidade da acetilcolina de estimular os receptores nicotínicos e muscarínicos cerebrais (GROSSBERG, 2003). Em pessoas saudáveis a inibição desta enzima causa acúmulo de acetilcolina nas fendas sinápticas causando prejuízos aos organismos como convulsões, déficit cognitivo e perda de memória (ZATTA et al., 2002; EVRON et al., 2007). Por isso, a acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima chave do sistema nervoso colinérgico, atuando na hidrólise do neurotransmissor ACh e assegurando a transmissão normal dos sinais nervosos no organismo, e sua inibição pode causar hiperatividade, perda de coordenação, convulsões, paralisia e outros tipos de alterações comportamentais (ZHANG et al., 2017).

2.5 ORGANISMOS MODELOS

2.5.1 *Caenorhabditis elegans*

O *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (Figura 3), é um nematódeo pertencente à família *Rhabditidae*. Foi introduzido como um modelo experimental para estudos por Sydney Brenner na década de 1970 (BRENNER, 1974). É considerado um importante modelo experimental em áreas de pesquisa como biologia molecular, toxicologia e farmacologia (COX et al., 2012). Uma de suas características que lhes tornam importantes para pesquisas é a sua sequência completa do genoma, o qual foi estabelecido e demonstrado que aproximadamente 60-80% dos genes de doenças humanas e vias de doenças estão presentes neste organismo (KATETTA e HENGARTNER 2006).



Figura 3. Nematódeo *C. elegans*

(Fonte: <http://nematologia.com.br/tag/c-elegans/>)

Dentre as inúmeras vantagens que o *C. elegans* possui para ser um organismo modelo destacam-se: tamanho muito pequeno, transparência, tempo de geração rápido, curto ciclo de vida, capacidade de ser congelado, comportamento simples e mensurável, extensa caracterização genômica, genética e embriológica, além de rastreabilidade genética (HOPE, 1999). Outra característica importante é que o *C. elegans* é ser transparente, permitindo que suas células possam ser acompanhadas individualmente e que os genes repórteres ligados à *GFP* (*Green Fluorescent Protein*) possam ser observados no organismo *in vivo*.

O *C. elegans* possui ciclo de vida rápido, dividido em várias fases (Figura 4). O seu crescimento é dependente de temperatura em torno de 20°C. Em condições normais, o verme permanece na fase L1 durante 14~16 horas, procede para L2 durante 8~9 horas, passa para L3 por ~9 horas, posteriormente para a fase L4 por ~12 horas, e, finalmente, torna-se adulto

(Figura 4). Ao final de cada estágio do desenvolvimento os nematódeos perdem a cutícula que recobre seu corpo, a qual é constituída por uma camada de carboidratos e proteínas que cobrem a hipoderme. O ciclo completo leva cerca de 3,5 dias. O tempo médio de vida dos vermes adultos é de 18 dias à 20 °C. Em casos de estresse, como por exemplo, aglomeração ou falta de alimento, o desenvolvimento é interrompido, caracterizando a “larva dauer”, na qual o organismo consegue viver meses neste estado até o que ocorra a eliminação do fator estressante, fazendo com que o verme desenvolva diretamente para fase L4 (Figura 4) (LY, 2014).

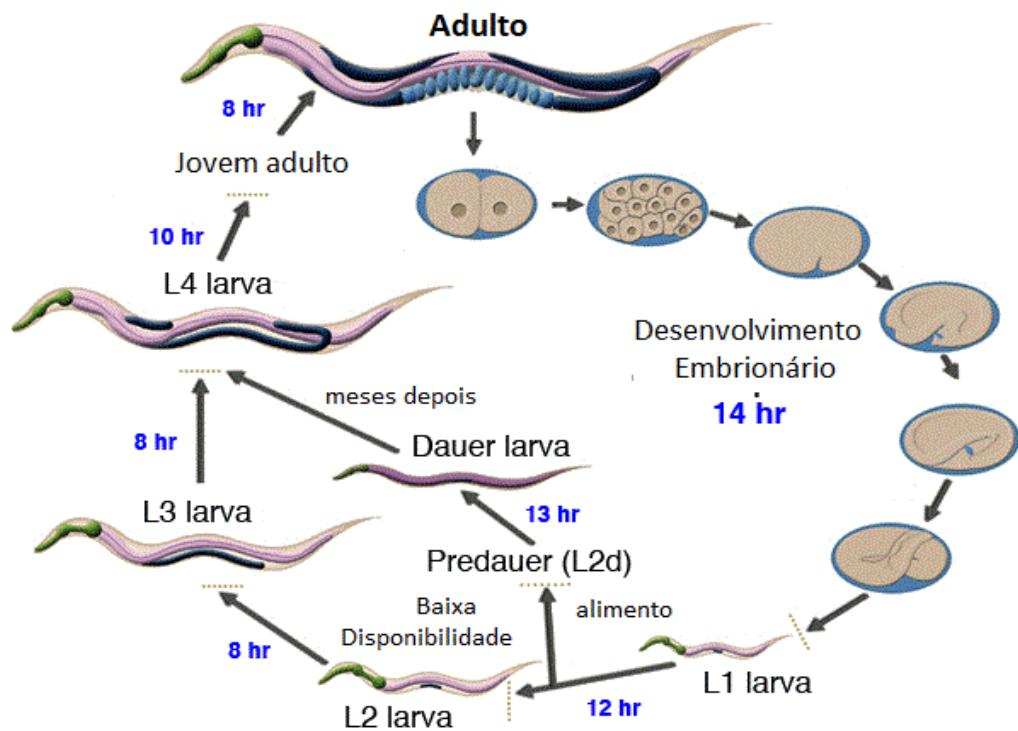


Figura 4. Ciclo de Vida do *C. elegans*

(Fonte: <http://www.sfu.ca/biology/faculty/hutter/hutterlab/research/Celegans.html>)

O nematódeo é predominantemente hermafrodita e a sua reprodução por autofertilização torna fácil a manutenção de mutações gênicas (BARROS, 2010). Um hermafrodita gera entre 200-300 descendentes, já quando um macho cruza com um hermafrodita, o número gerado de descendentes aumenta para 1000 (BARROS, 2010).

Durante sua vida o verme ingere o alimento através da ação propulsiva da faringe, onde a velocidade de contração da faringe é modulada pela presença do alimento, pela sua qualidade, como também pela experiência prévia do animal (AVERY, 1993; YOU et al., 2008). No modelo experimental um programa motor cíclico e estereotipado coordena eventos que envolvem o intestino, músculos e neurônios, resultando na expulsão do conteúdo

intestinal. Cada ciclo de defecação está associado com flutuações nos níveis de cálcio intestinal e ocorre de 45 a 60 segundos (DAL SANTOS et al., 1999). Sendo assim, a propulsão da faringe e o movimento do intestino do nematódeo estão consolidados como sistemas experimentais para estudar fenômenos biológicos como respostas ao estresse e envelhecimento (MCGHEE, 2007).

Sabe-se também que o sistema neuronal de *C. elegans* contém 302 neurônios e 56 células gliais. A conectividade neuronal do nematódeo é simples se comparada a vertebrados, pois apresenta em torno de 5.000 sinapses químicas e 2.000 junções neuromusculares. Diferenças em seu comportamento podem ser facilmente visualizadas e mapeadas com exatidão nas redes neuronais (COX et al., 2012).

Uma semelhança entre mamíferos e *C. elegans* é observada quando se estudam as rotas do estresse oxidativo, onde os danos celulares causados por radicais livres levam a neurotoxicidade causada pelos tóxicos presentes no ambiente, explicando a fisiopatologia de várias doenças, como Huntington, Alzheimer e Doença de Parkinson (BROWNE e BEAL, 2006; YUAN, et al, 2007; MOREIRA et al., 2008).

Existem diversas cepas de *C. elegans* disponíveis, dentre elas a N2, que é a cepa selvagem mais comum utilizada em pesquisas, porém o estudo da DA se concentra principalmente no uso de animais transgênicos, que expressam construções que contém a região codificadora do peptídeo β -amilóide humano (DIMITRIADI & HART, 2010). A cepa transgênica, GMC 101, dvIs100 [pCL354(unc-54:DA-A β 1-42) + pCL26(mtl2: GFP)], difere dos modelos existentes A β que predominantemente expressam amino A β 3-42 truncados, a A β 1-42 é expressa em células do músculo da parede do corpo, onde ela oligomeriza, agregada e resulta em grave e penetrante paralisia progressiva (MC COLL, 2012). A cepa, também transgênica, CL2122; dvIs15(mtl-2: GFP) é utilizada como controle transgênico (MC COLL, 2012).

2.5.2 *Danio rerio* (Zebrafish)

O Zebrafish (*Danio rerio*) é um pequeno teleósteo (3-4 cm), conhecido popularmente no Brasil como Paulistinha, pertence à família *Cyprinidae*, sendo uma espécie bastante conhecida pelo seu uso ornamental (Figura 5). O pioneiro a estudar esta espécie foi George Streisinger que, no final da década de 60, aplicou as técnicas de análise mutacional para estudar o desenvolvimento embrionário do Zebrafish (GRUNWALD & EISEN, 2002)



Figura 5. *Danio rerio*

(Fonte: <https://www.unochapeco.edu.br/>)

Além da alta conservação do genoma com a espécie humana, que compreende entre 70 a 80%, essa espécie ainda possui inúmeros sistemas de neurotransmissores (HOWE et al., 2013). O projeto de sequenciamento do seu genoma foi iniciado em 2001 no *Wellcome Trust Sanger Institute* no Reino Unido e finalizado no ano de 2013, resultando na constatação que esse modelo animal apresenta 26.206 genes codificadores de proteínas, mais do que ratos, humanos e frangos (HOWE et al., 2013; COLLINS et al., 2014). Pesquisadores consideram que esse alto valor é consequência do evento de duplicação do genoma ocorrido nos teleósteos há mais de 300 milhões de anos (TAYLOR et al., 2003).

Além da genética, o Zebrafish apresenta características que favorecem sua produção e que auxiliaram no estabelecimento e popularidade de seu uso como ferramenta de pesquisa. Dentre os atributos, destacam-se a alta fecundidade com geração de grande número de prole, na qual as fêmeas podem apresentar desova semanal, com liberação de 200 a 700 ovos (MIZGIREV & REVSKOY, 2010); rápido desenvolvimento e transparência dos embriões e larvas, favorecendo os estudos relacionados à embriologia e seus órgãos são formados em 24 horas após a fertilização (SANTORIELLO e ZON, 2012); robustez; tolerância a várias condições ambientais e baixo custo para mantê-lo em ambientes laboratoriais, este quando comparado aos organismos modelos tradicionais, como os roedores (ADATTO et al., 2016; NASIADKA e CLARK, 2012).

Este organismo também é sensível a ensaios toxicológicos, que podem demonstrar, por exemplo, alteração em seu comportamento quando expostos a determinado toxicante,

desde o início da vida até a idade adulta (KALUEFF et al., 2013). As vantagens do Zebrafish como organismo modelo possibilitam seu uso em vários campos de pesquisa: neuroquímica, comportamento, desenvolvimento, toxicologia e genética são alguns exemplos. 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).

Sendo assim, esse organismo modelo consolidado para avaliar os efeitos neuroquímicos e comportamentais, e se torna um modelo com boas perspectivas sobre o uso de espécies alternativas em relação a estudos farmacológicos e toxicológicos, além de seu uso para avaliar impactos causados por desastres ecológicos (PERKINS et al., 2013).

3. METODOLOGIA

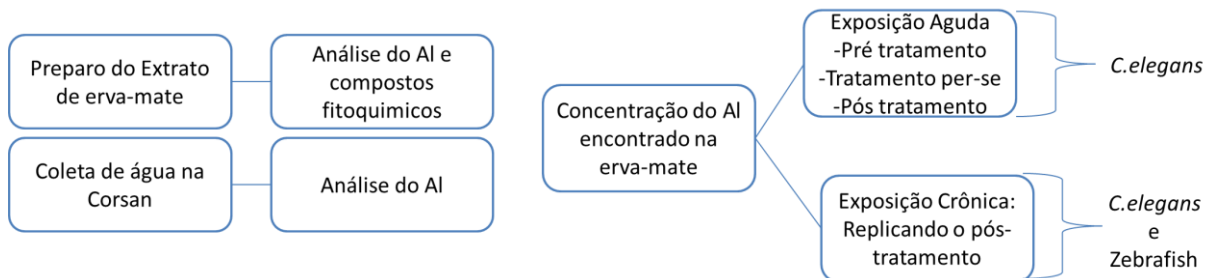


Figura 6: Delineamento experimental geral

3.1 PREPARAÇÃO DO EXTRATO DE *Ilex paraguariensis*

O extrato de folhas foi preparado seguindo o método tradicional para o preparo da infusão de *I. paraguariensis* (Chimarrão). A erva mate foi infusa em meio aquoso usando 7g de erva por 100 mL de água milliQ a 75 ° C por 15 min (BORTOLI et al., 2018). A preparação 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 e depois congelada a -80 ° C até ser utilizada.

3.2 COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXANTE DE EXTRATO DE ERVA-MATE

3.2.1 Fenóis totais

Para a determinação de fenóis na infusão da erva-mate foi aplicado o método colorimétrico com reagente de Folin- Ciateau seguindo metodologia de Ahn et al (2004) sendo a leitura realizada em espectrofotômetro a 760 nm. As amostras (0,5 mL) foram diluídas para 50 mL, em água destilada, e após, foram filtradas em papel filtro com teor de cinzas de 0,00009 g. Esta solução foi então misturada com 2,5 mL de reagente de Folin-

Ciocalteu durante 5 minutos. Em seguida adicionou-se 2 mL de solução de carbonato de sódio (7,5 %), e, por conseguinte, as amostras foram incubadas durante 5 minutos em banho maria a 50°C e após banho de gelo. A absorbância foi medida a 760 nm contra o branco (metanol) e comparada com a curva padrão de ácido gálico.

3.2.2 Flavonóides totais

Para a quantificação de flavonoides totais foi utilizado o método colorimétrico, seguindo metodologia de Dowd, adaptado (ARVOUET-GRAND et al., 1994; MEDA, et al. 2005) que consiste na adição de cloreto de alumínio e nitrito de sódio à amostra, a fim de promover a formação do complexo flavonoide-alumínio, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro à 510 nm. O conteúdo total de flavonoides foi determinado usando uma curva padrão.

3.2.3 Cromatografia líquida de alta frequência

As análises da quantidade de metilxantinas (cafeína) presentes na erva-mate utilizada para os ensaios foi realizada por meio de *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) modelo Prominence, marca Shimadzu, equipado com Detector de Arranjo de Diodos (PDA). A cafeína e teobromina foram quantificadas de acordo com metodologia de Lopes et al. (2008). Utilizou-se sistema cromatográfico composto de coluna octadecilsilano, mantida à 40°C, empregando como fase móvel, a mistura de água ultrapura MilliQ e metanol Merck (75:25 V/V). As substâncias eluídas foram detectadas no espectro do ultravioleta à 272 nm, com uma razão de fluxo de 1mL/min. A identificação da Cafeína foi realizada por comparação dos tempos de retenção das amostras com o tempo de retenção das soluções padrão.

A solução padrão foi preparada seguindo metodologia de Lopes et al. (2008), diluindo 30 mg de cafeína em 100 mL de fase móvel, 5 mL desta solução foi diluída para 50 mL utilizando o eluente, obtendo-se assim uma concentração final de 30 µg/mL de cafeína respectivamente. As amostras foram preparadas em triplicata e cada uma foi cromatografada em quadruplicata.

3.2.4 Ensaio antioxidante *in vitro*

Para a atividade antioxidante foram utilizados o método de DPPH (Diphenyl-1-picrylhydrazyl) e ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid), conforme descritas abaixo.

O DPPH (método descrito por ROESLER et al., 2007, com modificações):

As amostras foram diluídas em metanol na concentração de 10 mg/mL, em seguida foram homogeneizadas em agitador de tubos (vórtex) por 30 segundos e colocadas em ultrassonificação a 10°C durante 30 min, para posterior diluição em 10; 5; 2,5 e 0,8 µL/mL.

Adicionou-se a cada concentração de extrato etanólico uma solução de DPPH de 0,004% exceto nos brancos, onde foi adicionado o solvente. Uma curva de Trolox foi preparada variando de 10 µmol/L a 250 µmol/L (resultando em 11 pontos a cada 25 µmol/L). Após a adição do DPPH, esperou-se 40 minutos e procedeu-se a leitura no espectrofotômetro a 515 nm.

O decaimento da absorbância das amostras correlacionando ao decaimento da absorbância do controle resulta na porcentagem de sequestro de radicais livres. A capacidade de sequestrar radical livre é expressa como percentual de inibição de oxidação, calculado conforme a fórmula abaixo:

$$\% \text{ Atividade antioxidante} = \frac{(\text{Abs controle DPPH} - \text{Abs amostra}) * 100}{\text{Abs Controle DPPH}}$$

Para ABTS (método descrito por LEE et al., 2003):

Foi utilizada uma solução de ABTS preparada a partir de uma solução de 7 mM, no qual foi adicionado 88 µL de persulfato de potássio e mantido no escuro, à temperatura ambiente por 16 horas. Em seguida as amostras foram preparadas em água na concentração 10 mg/mL, homogeneizadas em agitador de tubos por 30 segundos, seguido de ultrassonificação a 10°C durante 30 min, para posterior diluição em 10; 5; 2,5 e 0,8 µL/mL. Adicionou-se a cada concentração de extrato aquoso uma solução de 2,5 mL de ABTS exceto nos brancos, onde foi adicionado o solvente. Uma curva de Trolox foi preparada variando de 10 µmol/L a 250 µmol/L (resultando em 11 pontos a cada 25 µmol/L). Após a adição do DPPH, esperou-se 6 minutos e procedeu-se a leitura no espectrofotômetro a 734 nm.

3.3 COLETA DE ÁGUA DOS RIACHOS DA BACIA HIDROGRÁFICA DA CORSAN-ERECHIM/RS

As amostras de água foram coletadas em 4 riachos pertencentes a Bacia Hidrográfica da Corsan- Erechim/RS (Tabela I). Cada riacho foi subdividido em dois pontos sendo: ponto inicial (Pi): a nascente; ponto final (Pf): antes do rio desbocar na barragem. Além disso, foram coletadas amostras de água bruta (água de todos os rios misturados no reservatório antes do processo de tratamento) e água tratada (pronta para o consumo). As águas foram armazenadas em frascos de plástico estéreis, para evitar a interação química do Al com a sílica do vidro.

Tabela I: Coordenadas geográficas de cada riacho com seus pontos de coleta.

Riacho	Ponto inicial (Pi): nascente		Ponto final (Pf): antes da barragem	
Água tratada	27°38'21"S	52°16'04"O	---	
Água Bruta	27°38'21"S	52°16'04"O	---	
Rio Ligeirinho	27°42'10"S	52°16'35"O	27°40'42"S	52°14'28"O
Rio Leaozinho	27°39'58"S	52°16'51"O	27°40'29"S	52°14'31"O
Rio Cravo	27°43'18"S	52°18'04"O	27°44'56"S	52°22'02"O
Rio Campo	27°42'55"S	52°15'37"O	27°42'32"S	52°12'39"O

3.4 ANÁLISES DE ESPECTROFOTOMETRIA DE EMISSÃO ATÔMICA

As concentrações do metal Al encontradas na água e no extrato de erva-mate, foram determinadas por espectrofotometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-AES) em um instrumento Shimadzu (modelo AA-7000). Uma curva padrão foi utilizada, preparada a partir de Al-Sigma *Aldrich Standard* para AAS mais água ultrapura MilliQ®. A absorvância utilizada foi de 396 nm, com lâmpada de cátodo oco tipo AS-1, com comprimento de onda de 309,3 nm.

3.5 ORGANISMO MODELO *Caenorhabditis elegans*

3.5.1 MANUTENÇÃO DO *C. elegans*

Foram utilizados neste estudo, diferentes cepas dos nematódeos *Caenorhabditis elegans*: a saber cepas do tipo Selvagem (N2 Bristol), CF 1553, muIs84([P_{sod-3}::GFP]), GA800, wuIs151([ctl-1+ctl-2+ctl-3;myo-2::GFP]) e CL 2166, [(pAF15)gst-4p::GFP::NLS]. Estas cepas foram obtidas a partir do “Caenorhabditis Genetics Center” (USA). Os vermes foram mantidos em placas de Petri em meio de crescimento para nematódeos (*Nematode*

Growth Medium-NGM) à 20°C em incubadora do tipo BOD e alimentados com a bactéria *Escherichia coli* OP50 (*E. coli*), sendo manuseados em câmara de filtro UV, como descrito por Brenner (1974). Posteriormente, os nematódeos foram sincronizados para que todos ficassem na mesma fase larval (L1), com sincronização completa (~ 95%), conforme descrito por Donkin e Dusenbery (1993), técnica adaptada.

3.5.2 Tratamentos em *C.elegans*

3.5.2.1 Screening (pré-teste) em exposição aguda

Os testes foram realizados em três grupos diferentes conforme demonstrado na Figuras 6, 7 e 8. Considerando que os resultados da presença e concentração de Al obtidos neste estudo foram similares aos encontrados em estudo prévio do nosso grupo por Bortoli et al. 2018, foram definidas as concentrações de 5,5 mg/mL; 8,0 mg/ mL e 10,5 mg/ mL de sulfato de alumínio ($Al_2(SO_4)_3$). Os vermes foram colocados em exposição aguda durante 1h ao Al e após 30 min ao extrato de erva-mate e vice-versa (Figuras 6, 7 e 8).

Para a exposição aguda foram utilizados os vermes em estágio larval L4. A cada exposição os nematódeos foram lavados com uma solução de M9, com a finalidade de retirar todo o toxicante ou extrato, antes de ocorrer a exposição novamente. Após os vermes foram utilizados para o preparo de extrato para determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase e demais atividades enzimáticas.

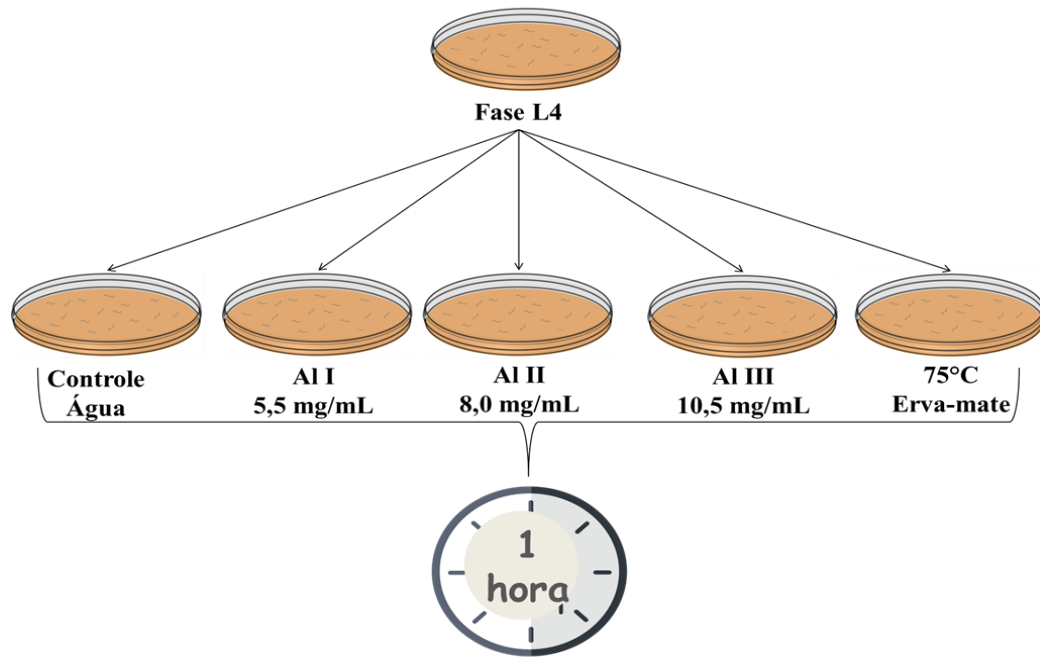


Figura 7. Delineamento experimental da exposição *per se*. Vermes expostos agudamente durante 1 hora ao Al ou extrato de erva-mate

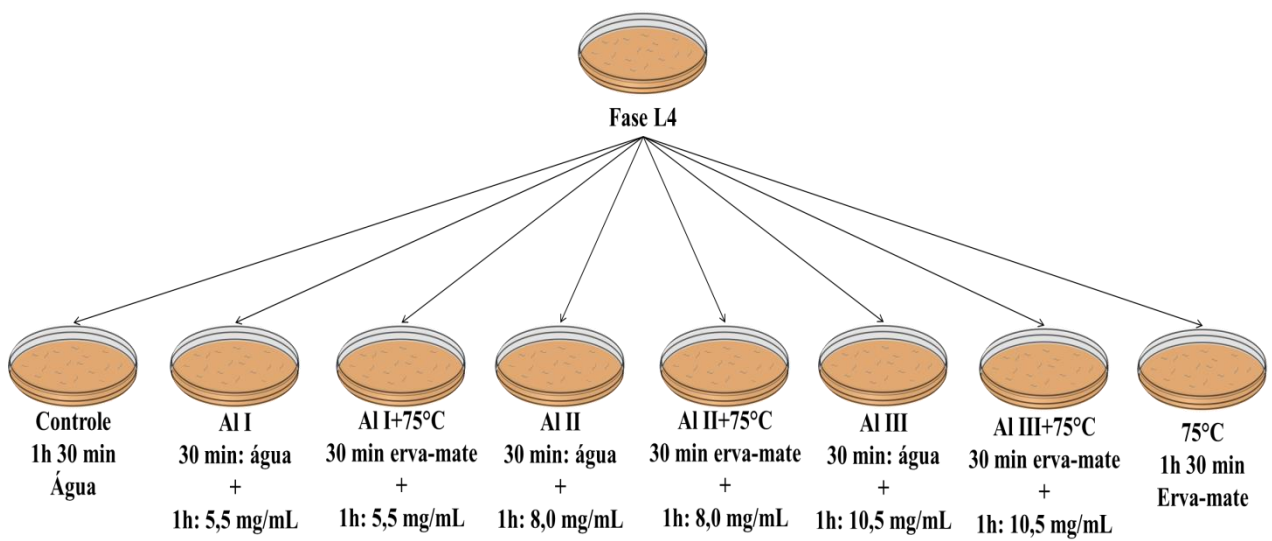


Figura 8. Delineamento experimental da pré-exposição. Vermes expostos agudamente durante 30 min a erva-mate ou água e após 1h ao Al.

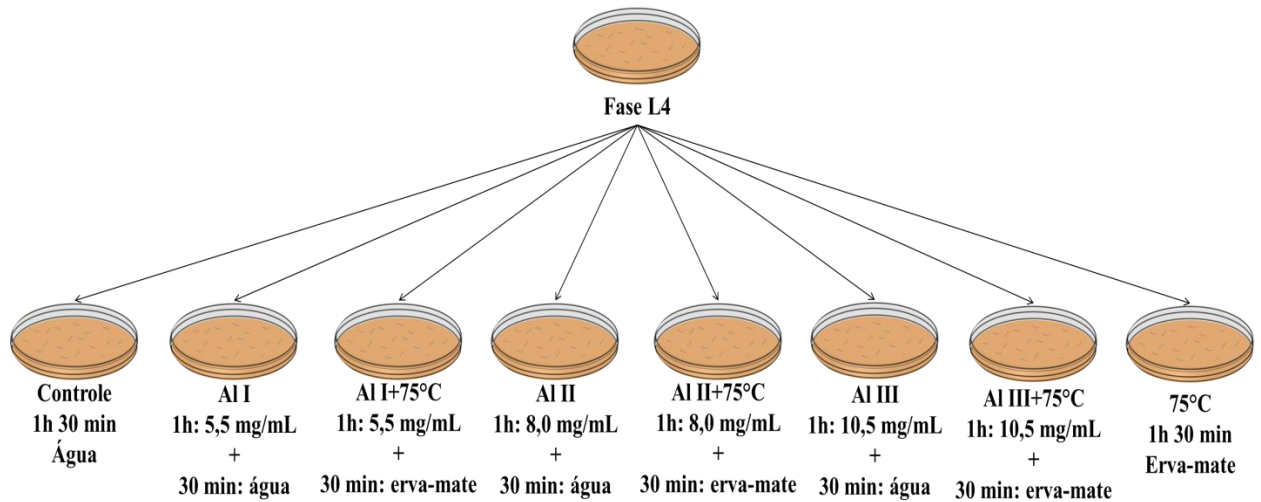


Figura 9. Delineamento experimental da pós-exposição. Vermes expostos agudamente durante 1h ao Al e após 30 min à erva-mate ou água.

3.5.2.2 Exposição Crônica

Após o *screening* (tópico 3.5.2.1), foi escolhido a pós-exposição como um tratamento que evidenciou melhor efeito do extrato de erva-mate, com isso foi realizada a análise crônica utilizando o experimento de pós-exposição à erva-mate, para avaliar o potencial remediador.

Em exposição crônica os vermes foram sincronizados, e mantidos em BOD até o estágio larval L1 (14 horas após sincronização), então foram lavados três vezes em tampão M9 e expostos as diferentes concentrações de Al durante 1h em agitador tipo *Roller*. Após isso, foram lavados novamente três vezes e colocados para crescer em placas contendo água ou Al ou erva-mate, durante 48 h (Figura 9). Os vermes foram mantidos em BOD à 20 °C até o estágio Adulto Jovem (estágio no qual o verme já possui vulva, porém ainda não produz ovos), então, foram feitas as análises enzimáticas e comportamentais, mesmo estágio utilizado na exposição aguda.

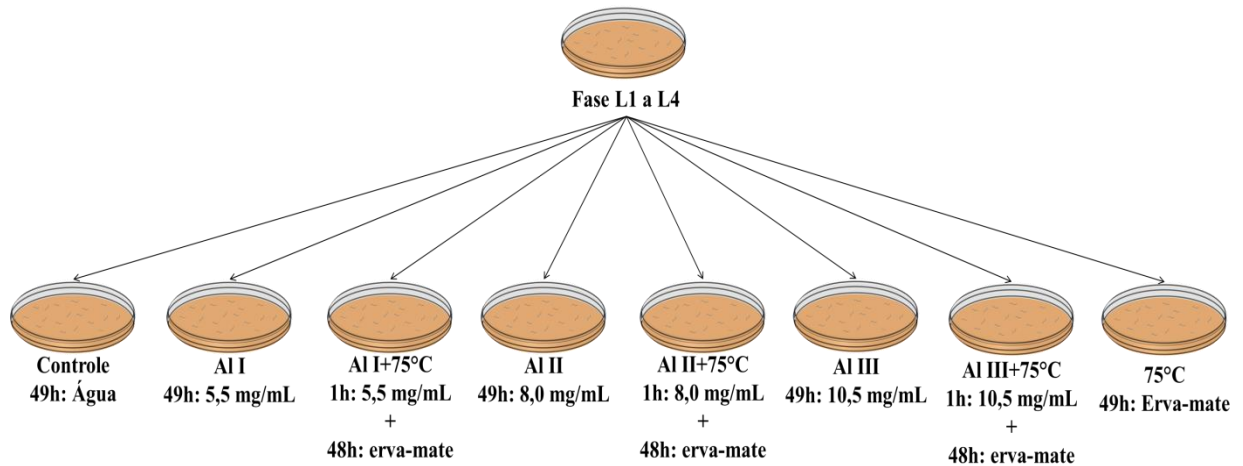


Figura 10. Delineamento experimental da pós-exposição. Vermes expostos cronicamente durante 1h ao Al ou água e após 48 h ao Al, erva-mate ou água.

3.5.3 Análise enzimática aguda e crônica

Neste estudo para ambas as exposições (aguda e crônica) foram realizadas as mesmas análises enzimáticas.

3.5.3.1 Determinações de proteínas totais e atividade da acetilcolinesterase (AChE)

A proteína foi determinada conforme método já estabelecido por Bradford (1976), usando o azul de *Coomassie* como reagente de cor e albumina de bovina sérica como padrão.

A atividade da acetilcolinesterase (AChE), foi realizada usando um ensaio colorimétrico descrito por Cole (2004) com adaptações.

Após a exposição, os vermes foram lavados três vezes em tampão M9 e transferidos para tubos de microcentrífuga. As amostras foram congeladas três vezes em nitrogênio líquido e posteriormente foram sonicadas durante 3 min 40s com intervalos de 10 em 10s. Em seguida as amostras foram centrifugadas durante 30 min a 15.000 x g e os sobrenadantes foram recolhidos e utilizados para a dosagem de proteína e para medir a atividade da AChE.

O ensaio foi realizado utilizando-se 28 μL de amostra que foi misturada em 210 μL de 0,25 mM de 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) e 7 μL de 156 mM de iodeto de acetiltiocolina (ASChI) e incubados durante 5 minutos à temperatura ambiente. A taxa de absorvância foi medida em 405 nm com leituras de 5 minutos e intervalos de 30s pelo método espectrofotométrico. A medição cinética foi registrada e convertida em atividade total da colinesterase usando o coeficiente de extinção para o produto colorido DTNB.

3.5.3.2 Análises enzimáticas da Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione S-transferase (GST).

Para analisar a expressão proteica de todas as enzimas, foram utilizadas três cepas diferentes:

- CF 1553, muIs84([Psod-3::GFP]) → SOD;
- GA 800, wuIs151[(ctl-1+ctl-2+ctl-3;myo-2::GFP)] → CAT;
- CL 2166, [(pAF15)gst-4p::GFP::NLS] → GST.

Essas cepas apresentam uma proteína de marcação verde fluorescente GFP (*Green Fluorescent Protein*), que é ativada em situações de estresse, demarcando a atividade enzimática.

Após a exposição dos vermes (conforme descrito no item 3.5.2.1 e 3.5.2.2), estes foram fixados em lâminas e paralisados utilizando uma solução de 10 mM de azida sódica. Posteriormente foram capturadas fotos utilizando um microscópio de fluorescência em ampliação de 10 vezes, sendo pelo menos 6 fotos em triplicata de cada exposição. As imagens foram analisadas através do *software ImageJ*, no qual foi medida a área de fluorescência de cada verme. Os valores obtidos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.

3.5.3 Análise comportamental aguda e crônica

As análises comportamentais foram realizadas em ambas as exposições (aguda e crônica), seguindo o protocolo previamente estabelecido pela literatura de Wang et al. (2008), ao todo, foram analisados 8 vermes de cada placa.

3.5.3.1 Batimento faríngeo

O batimento faríngeo consiste na contração do músculo da faringe e determina a frequência da alimentação do verme. O batimento faríngeo foi observado através de microscópio (x100) e medido sobre o meio NGM com *E. coli*. O número de contrações do bulbo posterior da faringe de cada verme que foi escolhido aleatoriamente, foi contado pelo tempo de 10 segundos, em triplicata, e a média multiplicada por seis, resultando no número de contrações/minuto.

3.5.3.2 Ciclo de defecação

O comprimento do ciclo de defecação foi avaliado pela contração peristáltica do intestino do verme, seguida de expulsão de suas fezes. O intestino é um dos principais órgãos

do *C. elegans*, responsável pela digestão e assimilação dos alimentos. A análise do ciclo de defecação foi feita marcando o intervalo de tempo entre uma defecação e outra. São obtidos os tempos de três intervalos do ciclo para cada verme, e feita a média entre eles.

3.6 ORGANISMO MODELO *Danio rerio*

3.6.1 Nota ética

Os procedimentos experimentais que utilizaram 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 2229110319 (ANEXO A).

3.6.2 Procedimento do *Danio rerio*

Neste trabalho foram utilizados aproximadamente 800 peixes adultos (150-180 dias) de ambos os sexos (50/50) do tipo selvagem de Zebrafish (*Danio rerio*). Estes foram aclimatados durante sete dias em aquários de 50 L. Os peixes foram 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 uma vez ao dia às 8h da manhã, nesse mesmo horário foram realizadas as exposições.

3.6.3 Tratamento crônico

Os peixes foram expostos cronicamente durante 15 dias a 8 tratamentos, conforme demonstrado na Figura 10. Esse teste foi realizado em triplicata, totalizando $n=72$ peixes para cada tratamento e um total de $n= 576$ peixes. A exposição foi realizada a cada 24 horas.

Como na exposição crônica do *C. elegans*, foi realizada a pós-exposição ao extrato de erva-mate nos peixes, sendo que estes tratamentos foram expostos durante 4 dias (96 horas) ao Al e 11 dias (264 horas) ao extrato de erva-mate. Já os tratamentos que continham somente Al ou água (controle) foram expostos os 15 dias consecutivos (Tabela VI). Após esse período foram realizados as análises comportamentais e a eutanásia dos peixes para posteriores análises enzimáticas.

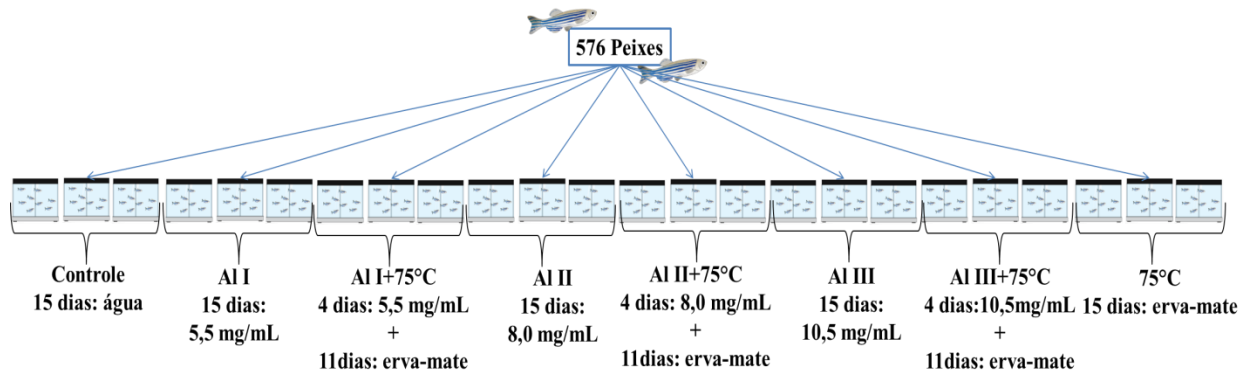


Figura 11. Delineamento experimental de exposição crônica do organismo modelo Zebrafish.

3.6.4 Análise enzimática

3.6.4.1 Preparo do extrato

Os peixes após a análise comportamental foram anestesiados em banho de gelo, em seguida, eutanasiados em nitrogênio líquido por 30 segundos. Em seguida, foram dissecados, retirando-se o cérebro, o qual foi utilizado 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). 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.

3.6.4.2 Determinações de proteínas totais e atividade da acetilcolinesterase (AChE)

A proteína foi determinada conforme método já estabelecido por Bradford (1976), usando o azul de *Coomassie* como reagente de cor e albumina de soro bovino como padrão, para posteriores análises bioquímicas.

Para as análises de determinação da enzima AChE, foi utilizado o extrato de cérebro de peixe (descrito no item 3.6.4.1). A taxa de hidrólise de acetilcolina (8 mM, 30 µL) foi determinada num volume final de 150 µL de sistema (TFK 11 mM, pH 7,0 e DTNB 0,22 mM) e 105 µL água MilliQ, utilizando método anteriormente descrito por Ellman et al., (1961), com adaptações. Antes da adição do substrato, amostras contendo proteína (15 µL) foram pré-incubadas durante 5 min à 25°C. Após foram feitas leituras de absorção num comprimento de onda de 412 nm durante 5 minutos (com intervalos de 30 segundos). A reação que ocorre compreende a reação do substrato sintético acetilcolina com o reagente DTNB, que é um ácido reduzido a tionitrobenzôico, que permite a formação da coloração

amarela. A atividade da acetilcolinesterase foi expressa $\mu\text{molAcSCh/h/mg}$ de proteína. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.6.4.3 Atividade da Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi analisada conforme descrito por Aebi (1984), com adaptações. Em uma cubeta foi adicionado 1000 μ de tampão TFK 50 mM e 10 μL do extrato do cérebro do peixe, e zerado o espectrofotômetro. Após foi adicionado 50 μL de peróxido de hidrogênio (0,3 M) e feita a leitura em 240 nm durante 2 minutos no intervalo de 30 segundos. A atividade da catalase foi determinada com base na velocidade de degradação de H_2O_2 . Os valores são dados em unidades internacionais (U) e foram calculados conforme a fórmula abaixo:

$$U = \frac{\Delta \text{abs} / 40 \times 10^{-6}}{\text{Proteína (mg)}} \times 1000$$

Onde:

- U = μMOL de H_2O_2 degradado/ min/ mg proteína.
- Δabs = variação da absorvância em 1 minuto.
- 40×10^{-6} = coeficiente de extinção molar do H_2O_2 em 240 nm ($\mu\text{Mol.cm}^{-1}$).
- Proteína = proteínas totais utilizadas na cubeta (mg)
- 1000 = fator de diluição da cubeta de leitura.

3.6.4.4 Análise da peroxidação lipídica (TBARS)

A análise de peroxidação lipídica foi realizada conforme descrito por Bertholdi-Vargas et al (2009), com adaptações. Foram homogeneizados 500 μL de amostra de cérebro de peixe juntamente com 100 μL de TCA 10% (ácido tricloroacético) estes foram centrifugados 13000 rpm por 10 min a -4°C . Foi retirado o sobrenadante adicionado 600 μL de TBA 0,67% (ácido tiobarbitúrico) e colocados em banho a 95°C por 30 min. Após foi realizada a análise de absorvância a 532 nm em espectrofotômetro.

Os níveis de peroxidação lipídica foram medidos pela determinação de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este método baseia-se na determinação colorimétrica da presença de malondialdeído (MDA) (532 nm) que é um dos produtos finais da peroxidação de lipídios por espécies reativas de oxigênio. Os valores de TBARS foram calculados a partir da equação da reta obtida por uma curva de calibração com concentrações conhecidas de MDA. Os dados são expressos em nmol de MDA/mg de proteína.

3.6.5 Avaliação comportamental

Em todos os testes comportamentais, os peixes foram filmados por uma câmera Logitech C525 e os vídeos analisados usando ANYmaze® software (Stoelting CO, EUA). Para os três testes, utilizaram-se aquários de teste (20x20x25 cm; largura x altura x profundidade) contendo 6 litros de água variando a configuração conforme o teste.

3.6.5.1 Comportamento social

No teste que avalia o comportamento social, os peixes foram transferidos individualmente para o aquário de teste posicionado entre dois aquários com o mesmo tamanho, um sem peixes e o outro contendo um grupo de 15 peixes da mesma espécie. Entre cada um dos 3 aquários uma barreira opaca foi posicionada para impedir a visualização durante o período de 30 s após a transferência do peixe para o aquário teste. Após esse período de habituação, as barreiras foram removidas e o comportamento do peixe filmado durante 10 s. Para a análise dos vídeos, o aquário de teste foi virtualmente dividido em três segmentos (Figura 11). O primeiro segmento era o mais próximo do aquário contendo o cardume de indivíduos da mesma espécie, enquanto o terceiro segmento correspondia ao lado do aquário vazio. Neste teste avaliou-se o número de entradas, número de cruzamentos e tempo de permanência em cada segmento (GIACOMINI et al., 2016; SOFIATTI, 2018).

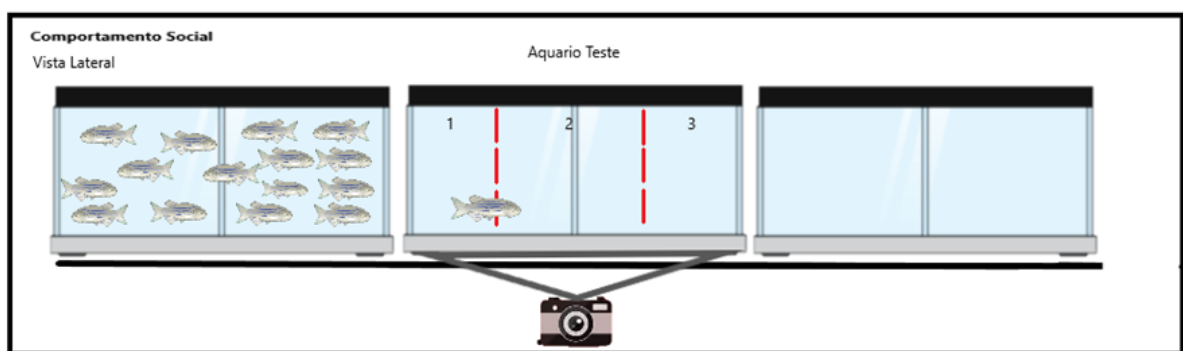


Figura 12. Protocolo de Comportamento social (SOFIATTI, 2018)

3.6.5.1 Agressividade

Para avaliar o comportamento de agressividade foi utilizado o teste de agressividade induzida por espelho (GERLAI, 2000). Utilizamos um aquário teste de 20x20x25 (largura x altura x profundidade), contendo 7 litros de água, e um espelho (45x40 cm), posicionado ao

lado do aquário em um ângulo de $22,5^\circ$, de modo que o lado direito do aquário estava mais próximo do espelho e o lado esquerdo mais afastado, a fim de reproduzir uma imagem próxima ou afastada do peixe.

A interação do peixe com a sua própria imagem foi filmada durante 60 s após dois períodos de aclimatização (30 s e 10 min). Para analisar os vídeos, o aquário foi virtualmente dividido em quatro segmentos do mesmo tamanho, sendo o segmento 1 o mais próximo do espelho e o 4 o mais distante (Figura 12). Quantificou-se o número de entradas em cada segmento e o tempo de permanência em cada um deles (GIACOMINI et al., 2016; SOFIATTI, 2018).

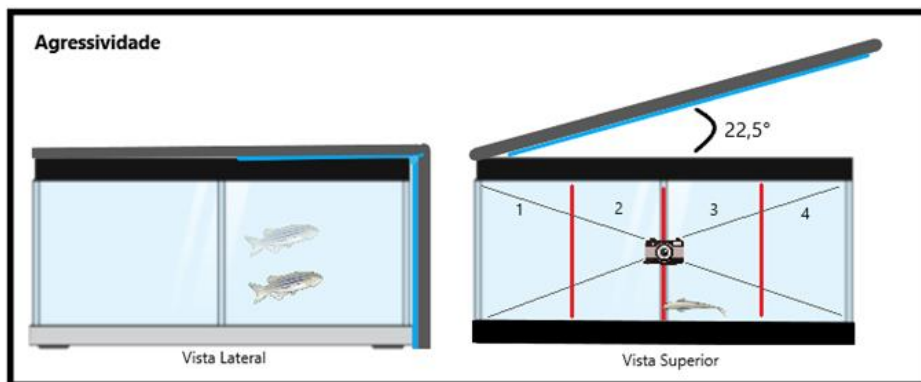


Figura 13. Protocolo Agressividade (SOFIATTI, 2018).

3.6.5.1 Teste do tanque novo- Ansiedade

Este teste avalia aspectos locomotores e o comportamento exploratório e tipo-ansiedade frente a um novo ambiente (ABREU, 2017). Os peixes foram transferidos individualmente para o aquário teste, e em seguida filmados por 6 min. Para análise dos vídeos, o aquário foi virtualmente dividido em três segmentos horizontais iguais (superior, médio e inferior) (Figura 13). Os parâmetros analisados foram: tempo relativo no topo do tanque (s), número de transições ao topo e distância total percorrida (m) (GIACOMINI et al., 2016; SOFIATTI, 2018).

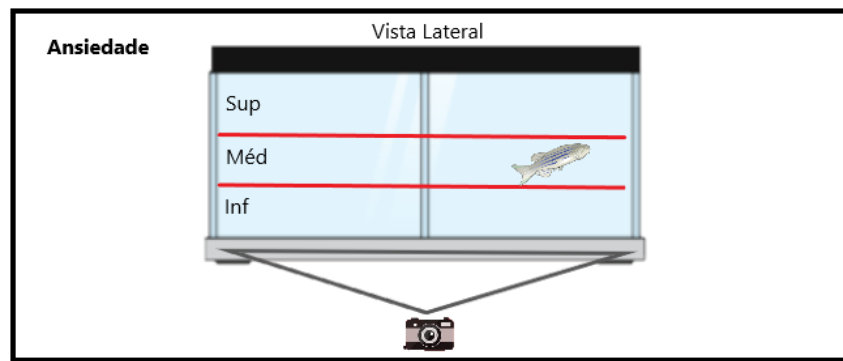


Figura 14. Protocolo Tanque Novo (SOFIATTI, 2018).

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos na concentração de Al nos riachos e das atividades enzimáticas foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA- *oneway*) com *post hoc* de Dunnett's. Para o teste da composição fitoquímica da planta *Ilex paraguariensis* foi utilizada análise de variância de uma via com teste *pos hoc* Tukey. Os testes comportamentais de ambos os organismos modelos foram analisados através do teste estatístico de Kruskal-Wallis (não paramétrico).

Para todas as análises estatísticas foi considerado nível mínimo de 95% de significância ($p < 0,05$), utilizando o software *Graphpad Prism 6.0*.

4.0 RESULTADOS

4.1 COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DA ERVA-MATE

4.1.1 Análises dos compostos da erva-mate

A fim de avaliar o potencial antioxidante da *Ilex paraguariensis*, foram realizadas análises de quantificação dos principais compostos fitoquímicos da planta. O extrato preparado a 75°C apresentou 10,63 µg/mL de cafeína, 42,09 µg/mL de fenóis e 33,28 µg/mL de flavonoides (Tabela II).

Tabela II: Caracterização fitoquímica do extrato de erva-mate. Os dados demonstrados foram analisados em triplicata, apresentados como média \pm desvio padrão.

Extrato Erva mate	Cafeína ($\mu\text{g/mL}$)	Fenóis- equivalentes ao ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$)	Flavonóides- equivalentes a catequina ($\mu\text{g/mL}$)
75°C	10,63	42,09 \pm 0,068	33,28 \pm 0,004

4.1.2 Ensaio antioxidante *in vitro*

Para determinar a atividade do potencial antioxidante do extrato de erva mate obtido, foi utilizado o método *in vitro* de captura do radical DPPH (*Diphenyl-1-picrylhydrazy*). Para a comprovação dos dados foi realizado o teste de ABTS (*2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid*), que segundo estudos é mais eficaz na detecção de antioxidantes em alimentos (FLOEGEL et al., 2011).

Ambos os métodos, demonstraram serem eficazes para a detecção de antioxidantes. Apresentando uma relação dose-resposta, onde quanto maior for à concentração de extrato a ser utilizado, maior será a % de inibição de radicais (Figura 14). Sendo que para inibição de 50% do radical é necessário 27,01 mg/L de extrato de erva-mate.

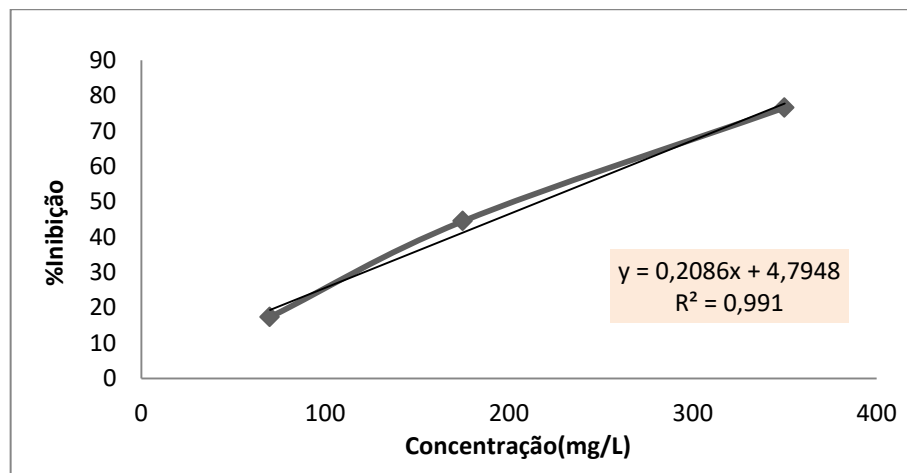


Figura 15. Relação Dose-resposta entre a concentração de extrato de erva-mate com a % de inibição de radical DPPH.

4.2 CONCENTRAÇÕES DE ALUMÍNIO NA ERVA-MATE E EM RIACHOS

Neste estudo, foi realizada a análise das águas coletadas dos riachos que compõe à Bacia Hidrográfica da Corsan/ Erechim-RS. Em cada riacho foram demarcados dois pontos de

coleta sendo Pi: nascente e Pf: ponto final (antes de desbocar na barragem), onde as coordenadas geográficas de cada ponto estão apresentadas na Tabela I, no tópico 3.3. Estas análises foram realizadas para averiguar se as concentrações de alumínio encontradas na infusão de erva mate em trabalho do grupo, Bortoli et al., 2018, seriam atribuídos à água utilizada para o preparo do “chimarrão” ou à própria erva mate.

A Figura 16 demonstra a concentração de Al encontrado em cada ponto de coleta. Quando comparados esses valores com os valores permitidos no ambiente segundo o CONAMA RES. n° 357 de 0,2 mg/L, observou-se que as concentrações estão dentro do permitido, sendo que estas concentrações foram consideradas mínimas.

Além disso, as amostras foram coletadas em dois pontos para analisar se há diferença do Al durante o curso de água e entre os riachos. Os resultados não demonstraram diferença estatística entre os pontos de coleta, mas apresentou diferença ($p < 0,0001$) entre todas as amostras em relação à água tratada (figura 15).

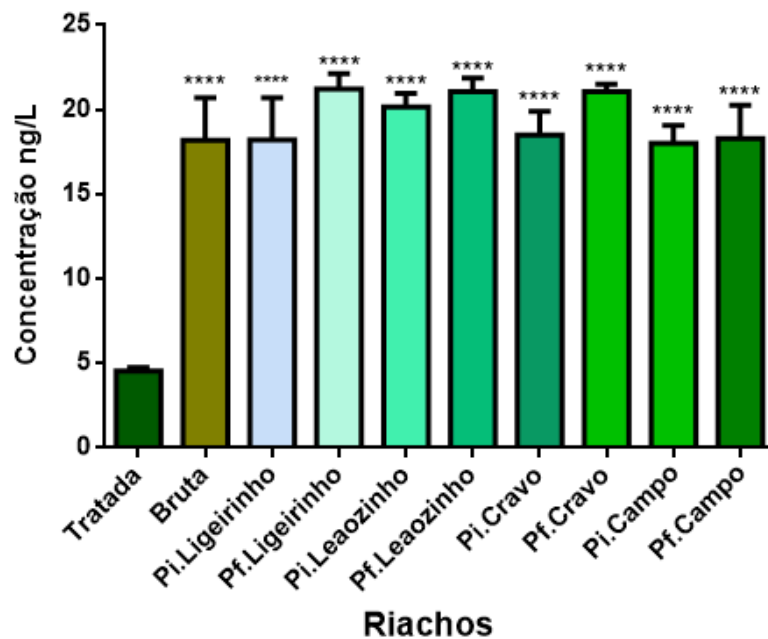


Figura 16. Concentração do Al nos diferentes pontos coletados. (*) Representa uma diferença significativa entre a amostra Tratada e os demais riachos. Foi utilizado a análise de ANOVA *one-way*, seguido pelo teste *pos-hoc* de *Tukey*, sendo considerado significativo $p < 0,05$. Os dados são expressos como média \pm erro padrão. Ensaio realizado em triplicata.

4.3 EXPOSIÇÃO AGUDA *C.elegans*

4.3.1 Atividade da Acetilcolinesterase

Para a atividade da AChE, foram utilizadas as cepas N2 Bristol (selvagem). Os nematódeos foram basicamente divididos em três tipos de exposição, sendo estes: *per se*, caracterizado pela exposição durante 1h às concentrações de Al ou erva; pré-exposição (30 min) e pós-exposição (30 min) ao extrato de erva e o grupo 75°C, caracterizado por exposição constante de 1h30min somente a erva-mate.

Na exposição a *per se*, houve um aumento significativo na atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), nos grupos Al II (124,59%), Al III (133,33%) e no extrato à 75°C (172,67%), quando comparadas ao controle (Figura 16).

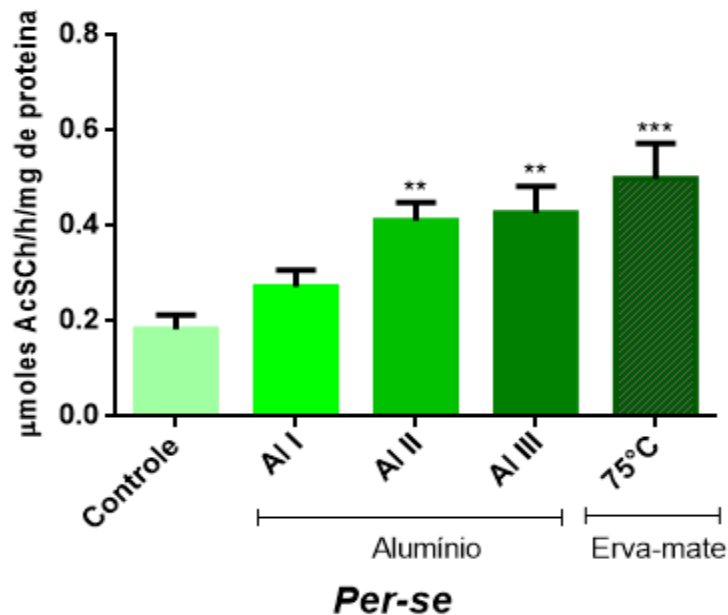


Figura 17. Atividade da acetilcolinesterase (AChE), no tratamento a *per se*. Comparação dos tratamentos com o controle. Dados analisados pela ANOVA *one-way*, seguido por test *pos-hoc* de *Tukey* onde a significância é representada por (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$. Os dados são expressos como média \pm erro padrão.

Na pré-exposição todos os tratamentos contendo somente Al foram iguais ao controle. O grupo Al III+75°C (8,0 mg/mL+ erva-mate) e o grupo somente com erva-mate (75°C) foram diferentes de todos os demais, apresentando um aumento expressivo da atividade da AChE de 133,24% (Al III+75°C) e 172,76% (75°C) em relação ao controle (Figura 17).

Enquanto a pós-exposição apresentou um aumento significativo na atividade da AChE (Figura 12) de todos os grupos expostos ao Al ou erva-mate em relação ao controle, como encontrado na exposição *per se*. Assim, foi possível observar que todas as doses de Al, com exceção de 5,5 mg/mL promoveram uma ativação da AChE, e este comportamento foi exacerbado sempre que havia a pós-exposição ao extrato de erva-mate conjugado ao Al ou administrado individualmente, em relação ao controle.

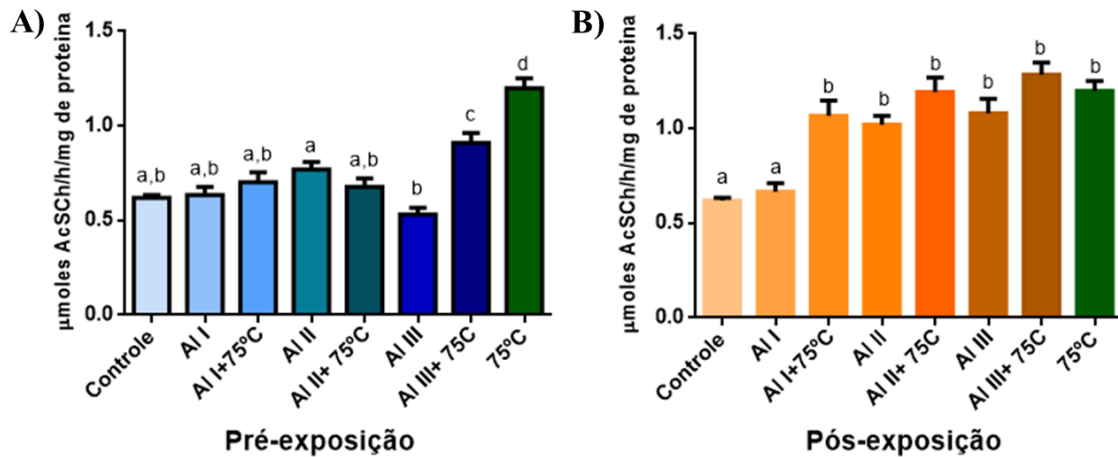


Figura 18. Atividade da acetilcolinesterase no organismo *C.elegans*. Onde: A) Pré-exposição ao extrato e B) Pós-exposição ao extrato. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Dados foram analisados pela ANOVA *one-way*, seguida por teste de comparação múltipla de *Dunnett's* com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os dados são expressos como média \pm erro padrão.

4.3.2 Atividade enzimática do sistema antioxidante

4.3.2.1 Superóxido Dismutase (SOD)

Na exposição à *per se* todos os grupos com Al demonstraram uma diminuição estatisticamente significativa em relação ao controle, sendo, Al I de 14,21%, Al II 10,74% e Al III 9,97%, enquanto o grupo tratado somente com erva-mate (75°C), não apresentou diferença em relação ao controle (Figura 18).

Na pré-exposição, houve uma diferença significativa entre o grupo Al II quando comparado com grupo Al II+75°C (ambos os grupos continham a mesma quantidade de Al 8,0 mg/mL), apresentando uma diminuição na atividade da enzima SOD de 11,42% (Figura 13). Resultado similar ocorreu na pós-exposição, na qual atividade da SOD diminuiu 12,53%, quando o grupo Al II, foi associado com a erva-mate (Al II+75°C) (Figura 18).

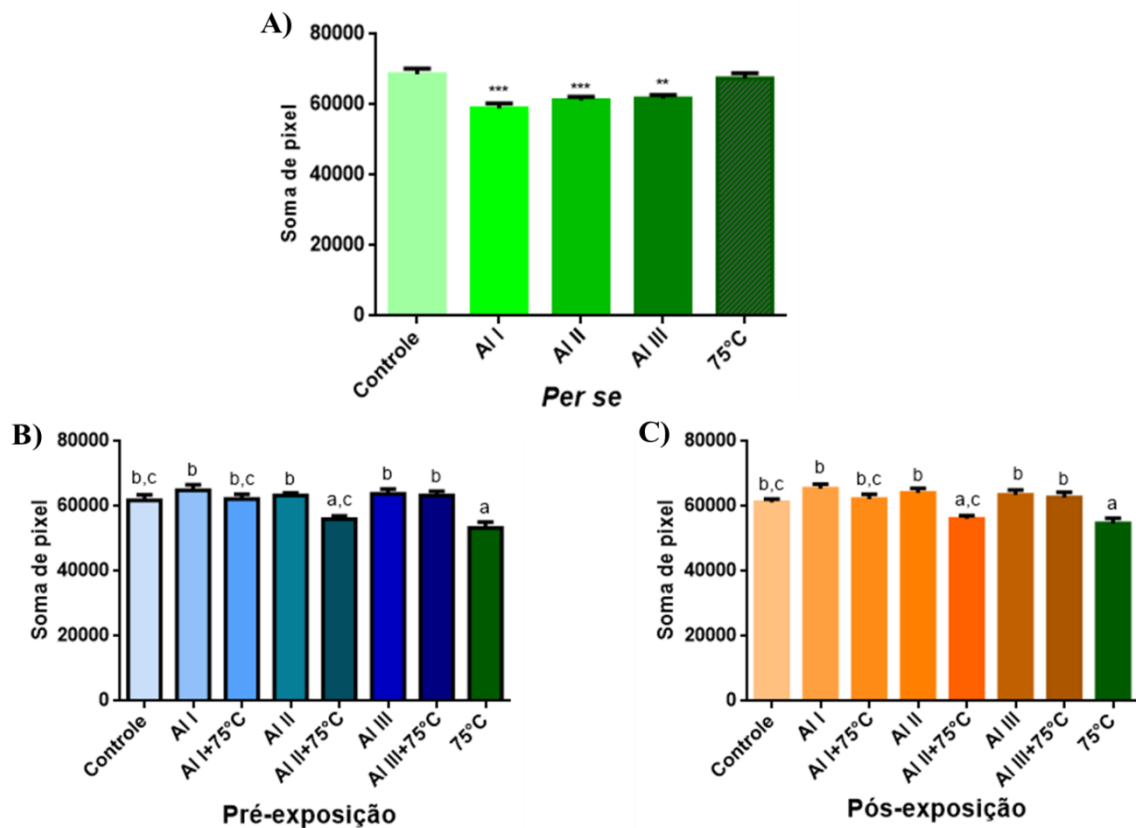


Figura 19. Efeito da erva-mate na atividade da SOD no organismo *C.elegans*, representada pela soma de pixels, gerada pela *GFP* (*Green Fluorescent Protein*). Onde: A) Análise *a per se* ; B) Pré-exposição ao extrato e C) Pós-exposição ao extrato de erva-mate. (***) Representa diferença significativa quando comparada ao controle e letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Dados foram analisados pela ANOVA *one-way*, seguida por teste de comparação múltipla *tukey* (grupo *per se*) e *Dunnett's* (demais grupos), com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os dados são expressos como média \pm erro padrão. Experimentos realizados em triplicatas, com $n=6$ vermes.

4.3.2.2 Catalase (CAT)

Dentre os três grupos analisados, somente a *per se*, apresentou uma diferença significativa, com aumento de 111,07% na quantidade de pixels, quando comparado o extrato de erva-mate ao controle (Figura 19).

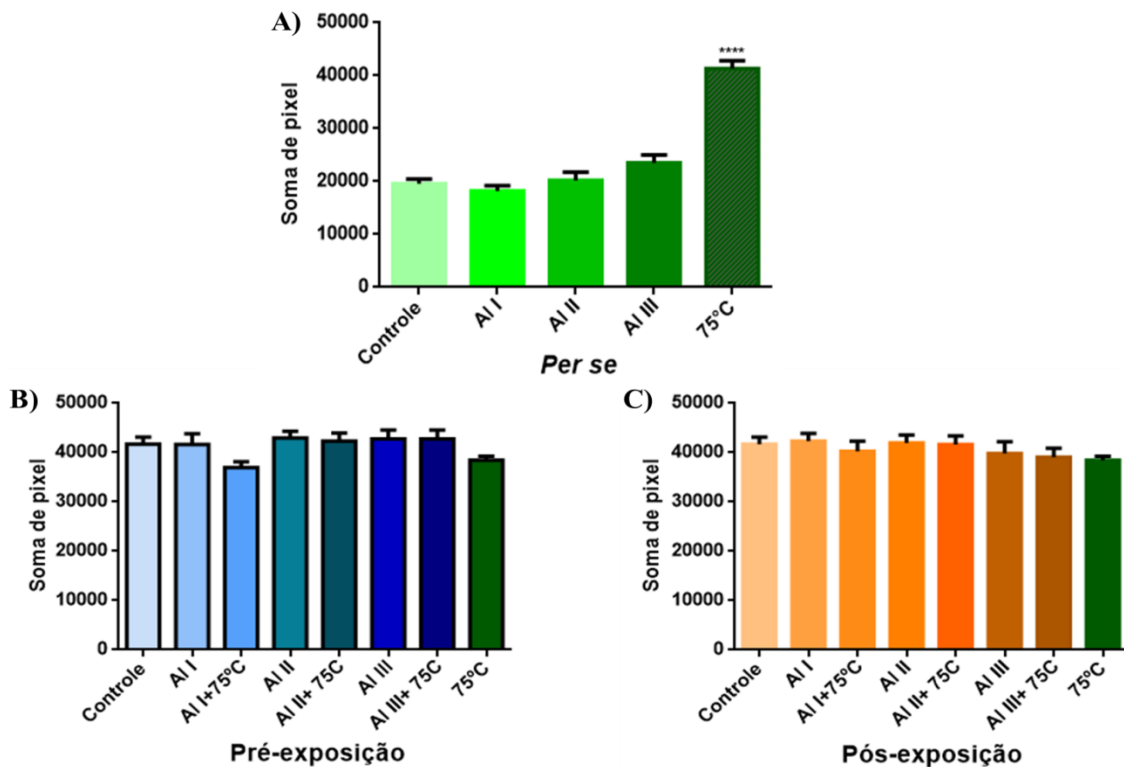


Figura 20. Efeito da erva-mate na atividade da catalase no organismo *C.elegans*, representada pela soma de pixels, gerada pela *GFP* (*Green Fluorescent Protein*). Onde: A) Análise *a per se* ; B) Pré-exposição ao extrato e C) Pós-exposição ao extrato de erva-mate. (***) Representa diferença significativa quando comparada ao controle. Dados foram analisados usando ANOVA *one-way*, seguido de teste de *tukey* (grupo *per se*) e *Dunnett's* (demais grupos), com nível de significância de 95% ($p < 0,05$), representados com média \pm erro padrão. Experimentos realizados em triplicatas, com $n=6$ vermes.

4.3.2.3 Glutathiona S-transferase (GST-4)

Dentre as exposições a análise *a per se* apresentou um aumento significativo no grupo Al I de 11,36% e uma diminuição no Al III de 11,68%, quando comparadas ao controle (Figura 20).

A pré-exposição demonstrou aumento significativo de todos os grupos em relação ao 75°C, com exceção do Al I e Al I+75°C. Já a pós-exposição apresentou uma diminuição significativa entre todos os grupos em relação ao 75°C, (Figura 20). Além disso a atividade da enzima GST foi alta no grupo que recebeu somente o extrato de erva-mate em relação aos demais grupos (Figura 20).

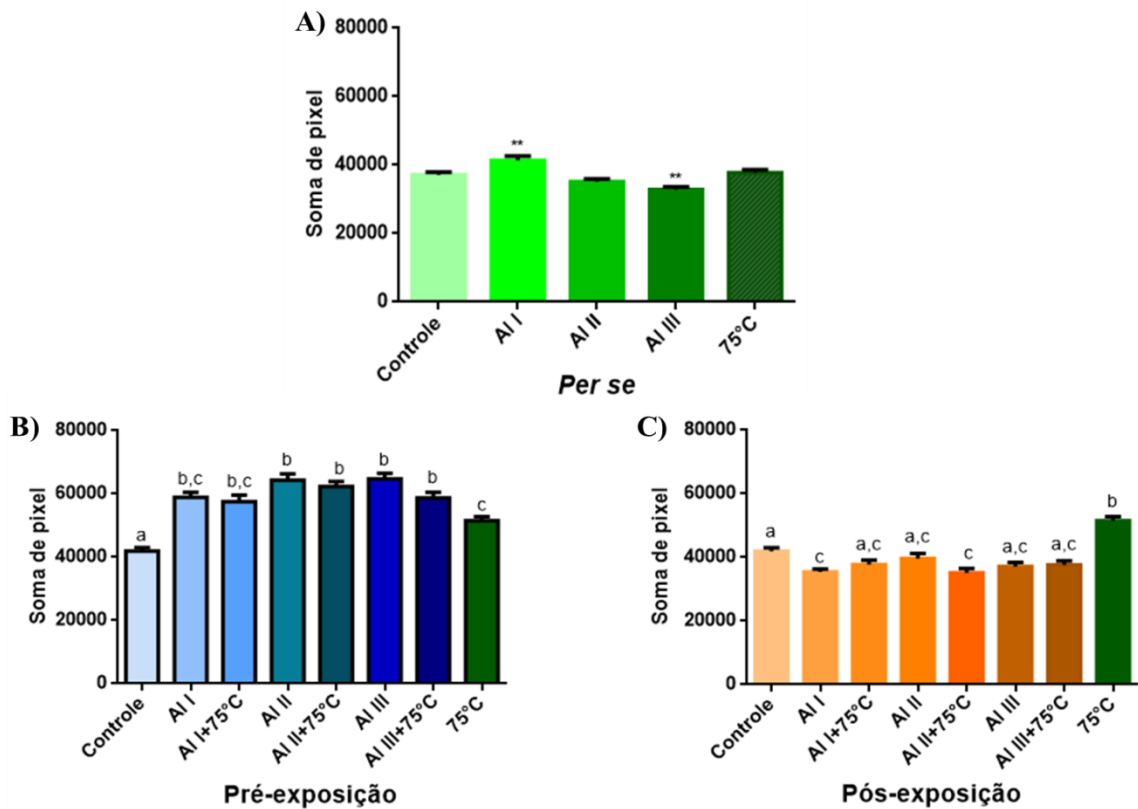


Figura 21. Efeito da erva-mate na atividade da GST no organismo *C.elegans*, representada pela soma de pixels, gerada pela *GFP* (*Green Fluorescent Protein*). Onde: A) Análise *a per se* ; B) Pré-exposição ao extrato e C) Pós-exposição ao extrato de erva-mate. (***) Representa diferença significativa quando comparada ao controle e letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Dados foram analisados usando ANOVA *one-way*, seguido de teste de *tukey* (grupo *per se*) e *Dunnett's* (demais grupos), com nível de significância de 95% ($p < 0,05$), representados com média \pm erro padrão. Experimentos realizados em triplicatas, com $n=6$ vermes.

4.3.3 Análise comportamental em *C. elegans*

4.3.3.1 Batimento Faríngeo

Na exposição *per se*, observou-se um aumento significativo de 15,98% de batimento faríngeo no grupo 75°C (somente erva) em relação ao controle (somente água).

Na pré-exposição comparando todos grupos entre-si, os que continham somente Al, apresentaram uma diminuição do batimento faríngeo em relação ao 75°C, sendo para Al I de 5,74%, Al II 5,95% e Al III 6,80% (Figura 21). O mesmo ocorre na pós-exposição e ainda demonstra que sempre quando expostos a erva-mate, o batimento faríngeo aumenta significativamente (Figura 21), sendo 10,77% (Al I+75°C), 3,87% (Al II+75°C) e 4,30% (Al III+75°C), estes em relação a cada grupo que contem a mesma quantidade de Al.

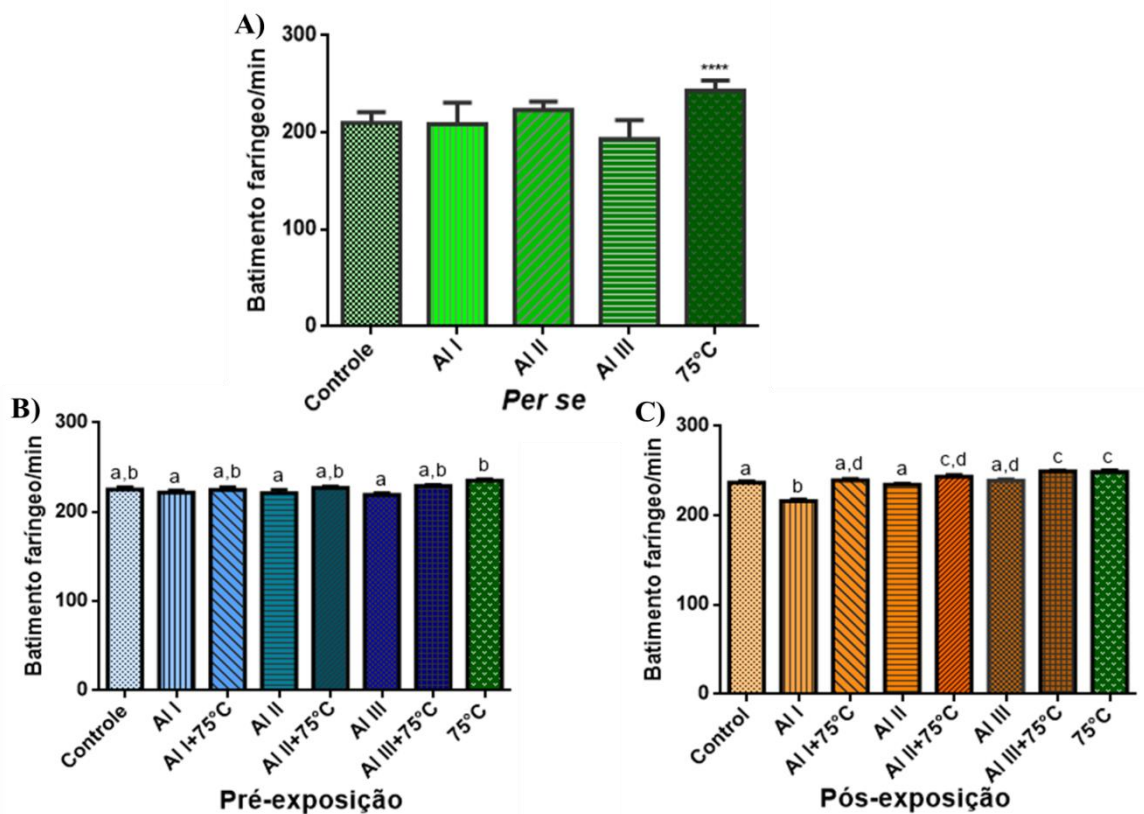


Figura 22. Análise comportamental do tipo bombeamento faríngeo no organismo *C.elegans*. Onde: A) Análise *a per se* ; B) Pré-exposição ao extrato e C) Pós-exposição ao extrato de erva-mate. (***) Representa diferença significativa quando comparada ao controle e letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Dados expressos com média \pm erro padrão., com n=6 analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.

4.3.3.2 Ciclo de defecação

Na exposição *per se* o AI e a erva-mate não alteraram o comportamento dos vermes (Figura 22). Já na pré-exposição houve uma diferença

Na pós-exposição os grupos AI II e AI III quando associados à erva-mate AI II+75°C e AI III+75°C, demonstraram uma diminuição de 22,60% e 20,01% no intervalo entre uma defecação e outra, sendo estes iguais ao grupo que recebeu somente o extrato de erva-mate (75°C) (Figura 22). Este resultado corrobora com a análise de batimento faríngeo, demonstrando que os vermes quando tratados apenas com o extrato de erva-mate demonstram um batimento faríngeo maior, ou seja, o verme se alimenta mais e como consequência diminui o intervalo entre uma defecação e outra, ou seja defeca numa maior frequência.

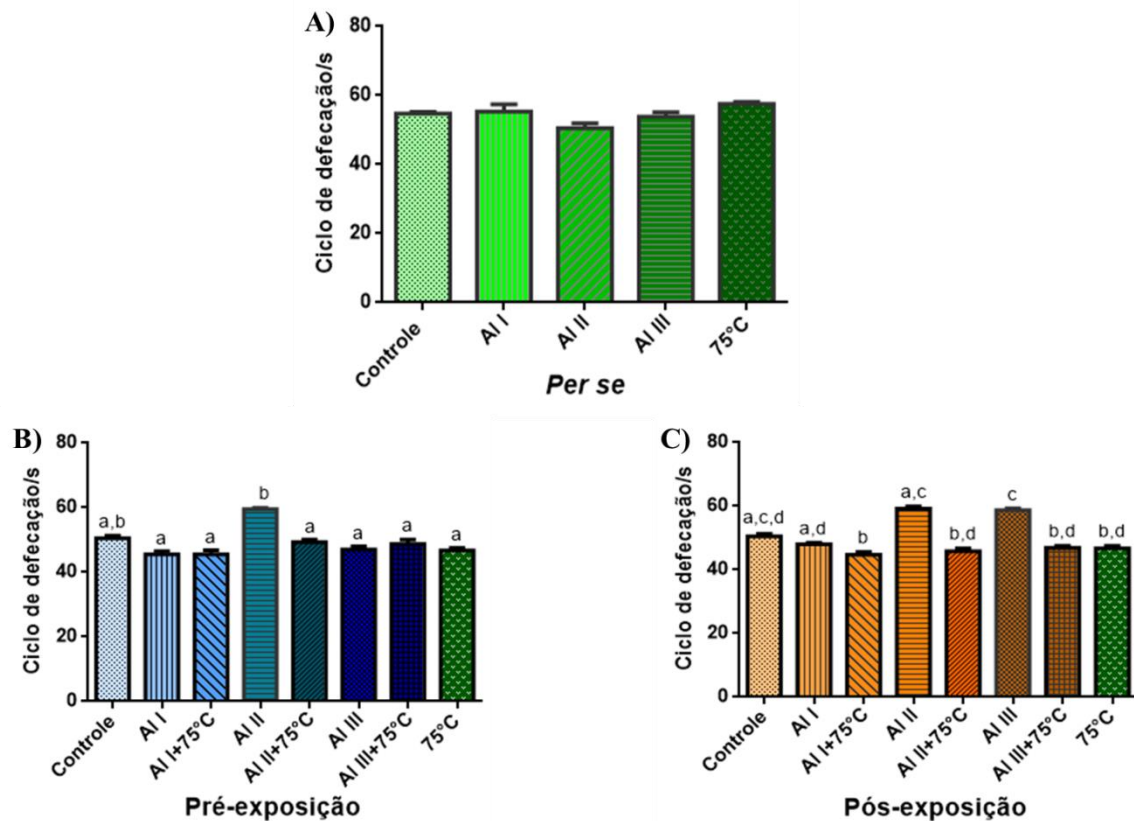


Figura 23. Análise comportamental do ciclo de defecação no organismo *C.elegans*. Onde: A) Análise *a per se* ; B) Pré-exposição ao extrato e C) Pós-exposição ao extrato de erva-mate. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Dados expressos com média \pm erro padrão, com $n=6$ analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.

4.4 EXPOSIÇÕES CRÔNICAS

A análise aguda, foi realizada como um *screening* (pré-teste), para observar se o extrato da planta *Ilex paraguariensis*, possuía um efeito de prevenção ou remediação ao dano causado pelo AI. Assim, considerando os resultados obtidos a partir deste *screening* relativos à atividade da acetilcolinesterase (AChE), a pós-exposição apresentou um aumento em todos os tratamentos com erva-mate, embora estes não tenham sido significativos, podendo ser devido ao curto tempo de exposição. Sendo assim, foi realizado a análise crônica utilizado como o base a pós-exposição. Considerando os diferentes tempos de vida dos organismos modelos, o nematódeo *C. elegans* e o peixe teleósteo Zebrafish, foram realizados diferentes períodos de exposição crônica, sendo da fase larval L1 para a fase larval L4 para vermes, o que corresponde a 48 h de exposição ao AI ou de erva-mate, e para os peixes a exposição crônica foi considerada de 15 dias, onde os peixes foram expostos por 4 dias ao AI ou extrato de erva-mate à 75°C e os demais 11 dias foram expostos ao AI ou ao extrato de erva-mate à

75°. Este planejamento experimental considerou as características dos organismos modelos avaliados e serviu para avaliar o efeito neurotóxico do Al de forma individual através dos grupos Al I (5,5 mg/mL), Al II 8,0 mg/mL e Al III (10,5 mg/mL). Ainda, a exposição crônica ao Al foi finalizada com um período de pós-exposição ao extrato de erva-mate, que serviu para avaliar o potencial efeito neuromodulador da erva-mate.

4.4.1 Análise crônica em *C.elegans*

4.4.1.2 Atividade da Acetilcolinesterase

Na exposição crônica, a atividade da AChE foi inibida em todos os tratamentos, com exceção do Al III, em relação ao grupo controle (Figura 23). Esta inibição foi de 45,57% (Al I), 60,38% (Al I+75°C), 45,77% (Al II), 31,88% (Al II+75°C), 44,58% (Al III+75°C) e 50,30% (75°C).

Conforme observado na atividade da AChE, é possível dizer que tanto a erva-mate como o Al inibiram atividade da AChE, com exceção do grupo Al III. Esta inibição demonstra que a longo prazo a erva-mate possui princípio de remediação que sua própria quantidade de Al, não é tóxica para o Sistema Nervoso Colinérgico.

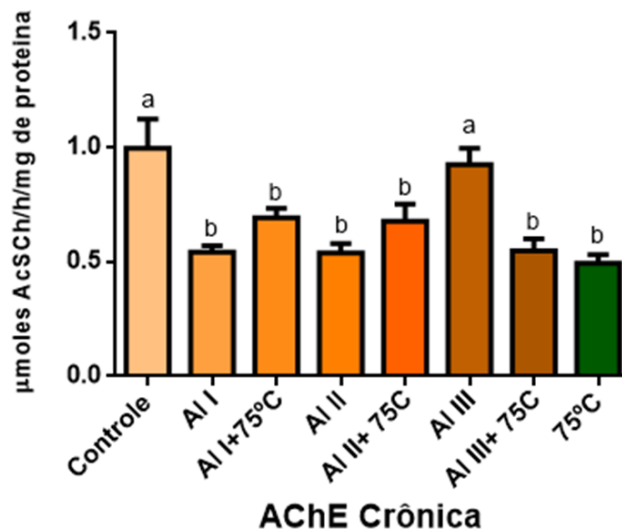


Figura 24. Atividade da acetilcolinesterase (AChE), em exposição crônica no organismo *C. elegans*. Comparação dos tratamentos com o controle. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Dados foram analisados pela ANOVA *one-way*, seguida por teste de comparação múltipla de *Tukey* com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os dados são expressos como média \pm erro padrão.

4.4.2 Atividade enzimática do sistema antioxidante

4.4.2.1 Superóxido dismutase (SOD)

Na exposição crônica a enzima SOD, apresentou um aumento significativo nos grupos Al I (30,18%) e Al II (16,68%), quando comparadas ao controle (Figura 24). Além disso, todos os grupos expostos ao Al, quando foram associados à erva-mate, demonstraram uma diminuição da atividade da SOD de 35,44% (Al I+75°C), 27,85% (Al II+75°C) e 20,22 (Al III+75°C), sendo similares ao grupo 75°C (Figura 24).

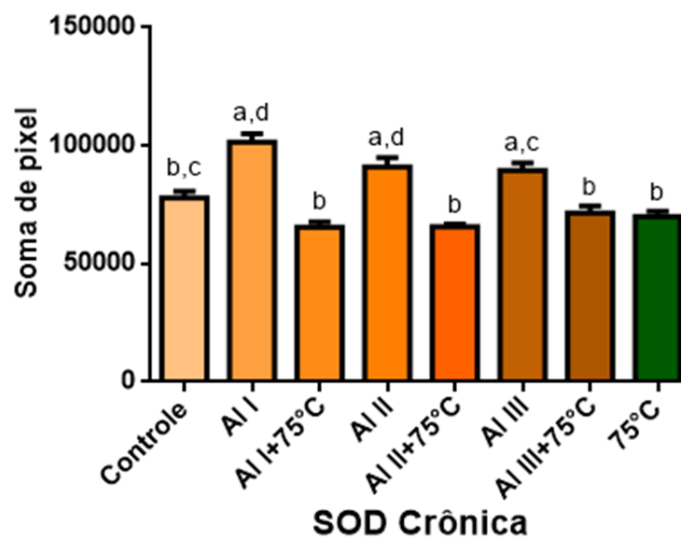


Figura 25. Atividade da enzima SOD em exposição crônica do organismo *C. elegans*. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Dados foram analisados pela ANOVA *one-way*, seguida por teste de comparação múltipla de *Dunnett's* com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os dados são expressos como média \pm erro padrão.

4.4.2.2 Catalase (CAT)

Na exposição crônica foi possível observar que todos os grupos expostos somente ao Al, quando submetidos à erva-mate, apresentaram uma diminuição da atividade da enzima CAT, sendo de 16,87% (Al I+75°C), 12,75% (Al II+75°C) e 12,89% (Al III+75°C), demonstrando que a erva-mate inibiu a atividade desta enzima (Figura 25).

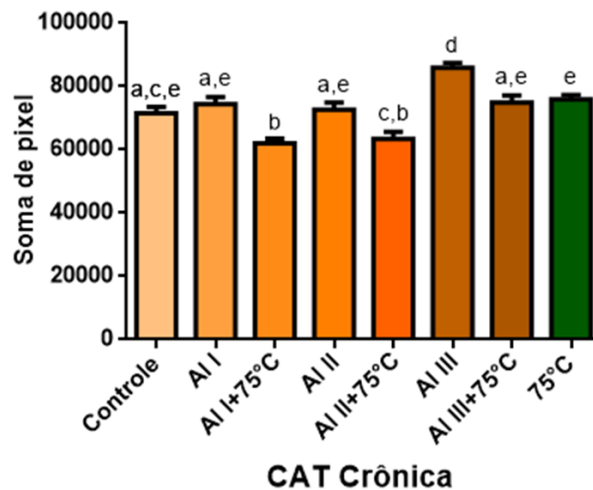


Figura 26. Atividade da enzima CAT em exposição crônica no organismo *C. elegans*. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Dados foram analisados pela ANOVA *one-way*, seguida por teste de comparação múltipla de *Dunnett's* com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os dados são expressos como média \pm erro padrão.

4.4.2.3 Glutathione S-transferase (GST)

Os grupos Al I e Al II, que foram expostos somente ao Al, apresentaram uma diminuição em relação ao controle. Quanto aos grupos que foram expostos a erva-mate todos foram iguais entre si (Figura 26).

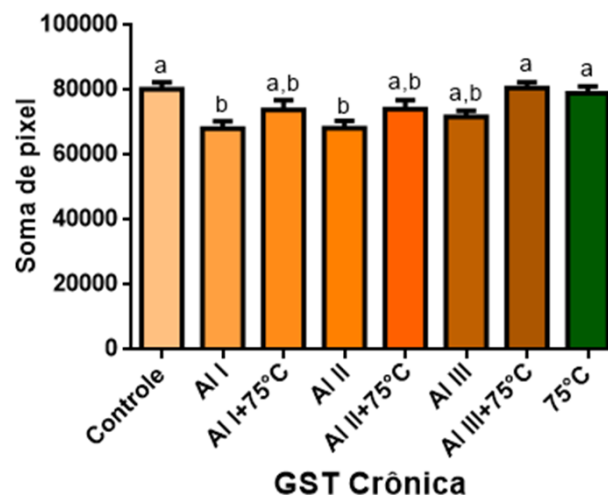


Figura 27. Atividade da enzima GST em exposição crônica no organismo *C. elegans*. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Dados foram analisados pela ANOVA *one-way*, seguida por teste de comparação múltipla de *Dunnett's* com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os dados são expressos como média \pm erro padrão.

4.4.3 Análise comportamental em *C. elegans* após exposição crônica

4.4.3.1 Batimento Faríngeo

Na exposição crônica todos os grupos contendo somente Al foram iguais entre si, apresentando uma diminuição no grupo Al II (16,83%) e Al III (18,48%) em relação ao controle (Figura 27).

Além disso, todos os grupos que possuíam somente Al, após adição do extrato de erva-mate, apresentaram um aumento significativo da frequência do batimento faríngeo de 21,18% (Al I+75°C), 30,92% (Al II+75°C) e 32,58% (Al III+75°C), quando comparados ao grupo controle, sendo iguais ao tratamento com extrato de erva-mate puro (Figura 27). Este resultado foi similar ao encontrado na exposição aguda, demonstrando que a longo prazo o Al é prejudicial, diminuindo drasticamente o batimento faríngeo e a erva-mate, consequentemente, aumentou o comportamento.

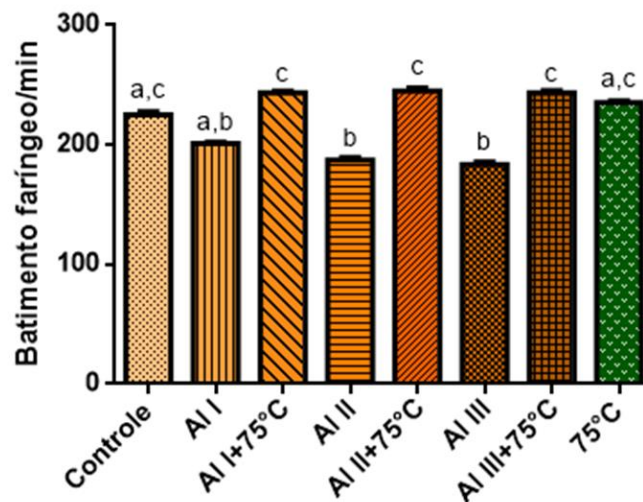


Figura 28. Gráfico de Análise comportamental do tipo bombeamento faríngeo em exposição crônica. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Dados expressos com média \pm erro padrão, com n=6 analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.

4.4.3.2 Ciclo de defecação

Na exposição crônica, os vermes que foram expostos somente ao Al, apresentaram alteração no intervalo de defecação, sendo este maior em relação ao controle para Al II 56,63% e Al III 26,67% (Figura 28).

Todos os grupos contendo somente Al, quando expostos à adição de erva-mate, demonstraram um decréscimo no ciclo de defecação sendo Al I+75°C 17,33%, Al II+75°C

40,52% e Al III+75°C 23,32%, quando comparados ao grupo controle, apresentando resultado similar ao grupo que recebeu somente o extrato de erva-mate (75°C) (Figura 28).

Aqui o Al aumentou o comprimento do ciclo de defecação, inibindo esta atividade, enquanto a erva-mate, reduziu o comprimento do ciclo de defecação, aumentando a frequência deste processo, demonstrando uma ativação do trânsito intestinal do verme.

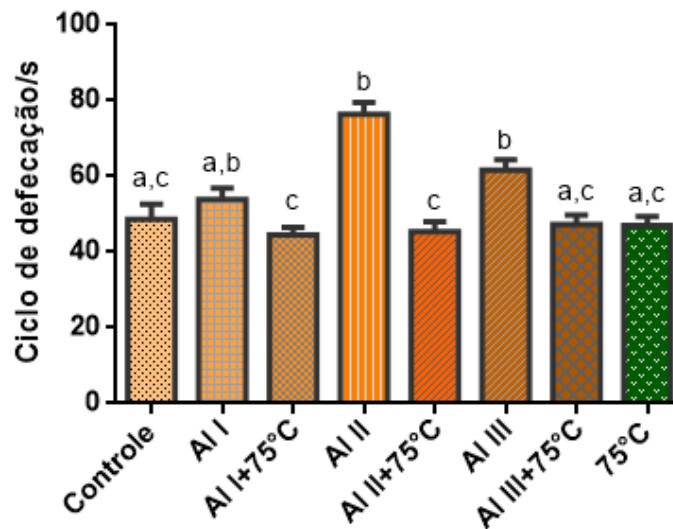


Figura 29. Gráfico de Análise comportamental do ciclo defecação em exposição crônica. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Dados expressos com média \pm erro padrão, com n=6 analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.

4.5 ANÁLISES CRÔNICAS EM Zebrafish

4.5.1 Atividade da Acetilcolinesterase

A atividade da acetilcolinesterase (AChE), demonstrou um aumento em todos os grupos quando comparados ao controle (Figura 29), sendo 87,99% (Al I), 82,15% (Al I+75°C), 110,03% (Al II), 96,95% (Al II+75°C), 91,86% (Al III), 82,33% (Al III+75) e o mais expressivo de 132,99% (75°C).

Além disso, pode-se observar que nos grupos expostos ao Al, a concentração de 8,0 mg/mL (Al II), foi a única a apresentar uma alta atividade da AChE, sendo igual quando comparada ao grupo que recebeu somente extrato de erva-mate obtido a 75°C (Figura 29).

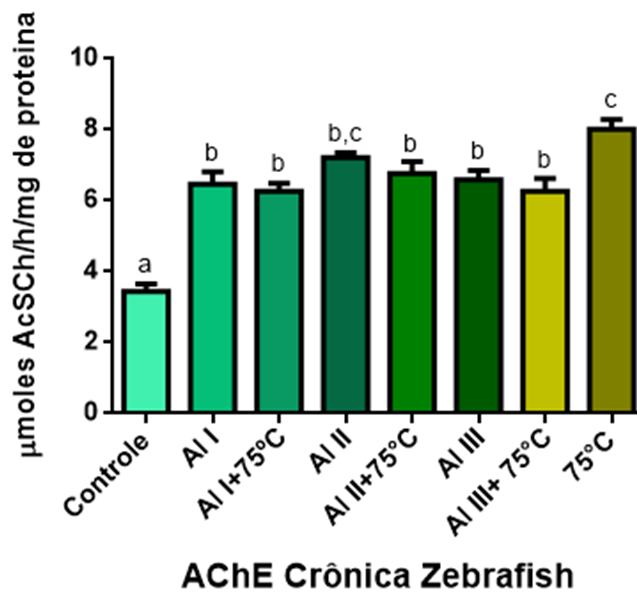


Figura 30. Atividade da acetilcolinesterase (AChE), do Zebrafish em exposição crônica, . Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Dados foram analisados pela ANOVA *one-way*, seguida por teste de comparação múltipla de *Tukey* com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os dados são expressos como média \pm erro padrão.

4.5.2 Atividade da enzima Catalase (CAT)

A atividade da CAT, apresentou um aumento em todos os grupos com exceção do Al I, em relação ao controle, sendo mais expressivo no grupo Al II+75°C de 86,33% (Figura 30).

A concentração de 8,0 mg/mL de Al (Al II) foi a única a demonstrar diferença quando exposto a erva-mate (Al II+75°C), tendo um aumento de 35,30% da atividade da enzima CAT, apresentando o mesmo efeito quando comparada ao grupo 75°C.

Além disso, a concentração mais alta de 10,5 mg/mL de Al (Al III) com ou sem exposição ao extrato de erva-mate apresentou comportamento similar ao tratamento que recebeu somente o extrato de erva-mate obtido a 75°C (Figura 30).

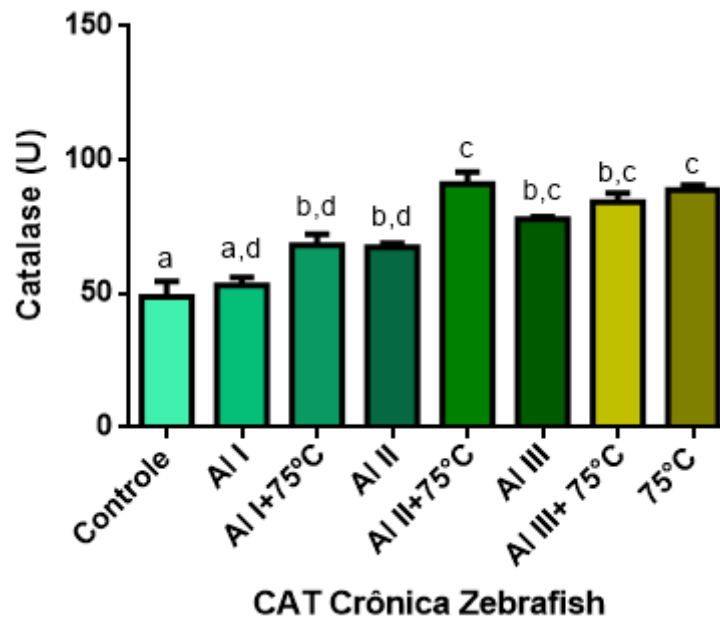


Figura 31. Atividade da enzima CAT do organismo Zebrafish em exposição crônica. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Dados foram analisados pela ANOVA *one-way*, seguida por teste de comparação múltipla de *Dunnett's* com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os dados são expressos como média \pm erro padrão.

4.5.3 Análises de peroxidação lipídica (TBARS)

As espécies reativas de oxigênio (EROS), quando em excesso podem causar grandes danos teciduais, podendo ocasionar a peroxidação dos lipídios das membranas celulares, levando à perda da fluidez e aumento da permeabilidade (NIWA e NIWA, 2011)

Nesta análise observou-se que todos os grupos expostos somente Al, aumentaram o nível de peroxidação lipídica quando comparadas ao controle, sendo 47,14% (Al I), 42,74% (Al II) e 111,96% (Al III) (Figura 31).

Além disso, todos os grupos expostos ao extrato de erva-mate foram iguais entre si e ao grupo erva-mate, onde foi utilizado somente o extrato ao longo da exposição. Ainda, o grupo Al III demonstrou uma diminuição da peroxidação lipídica de 43,56% após adição de erva-mate (Al III+75°C).

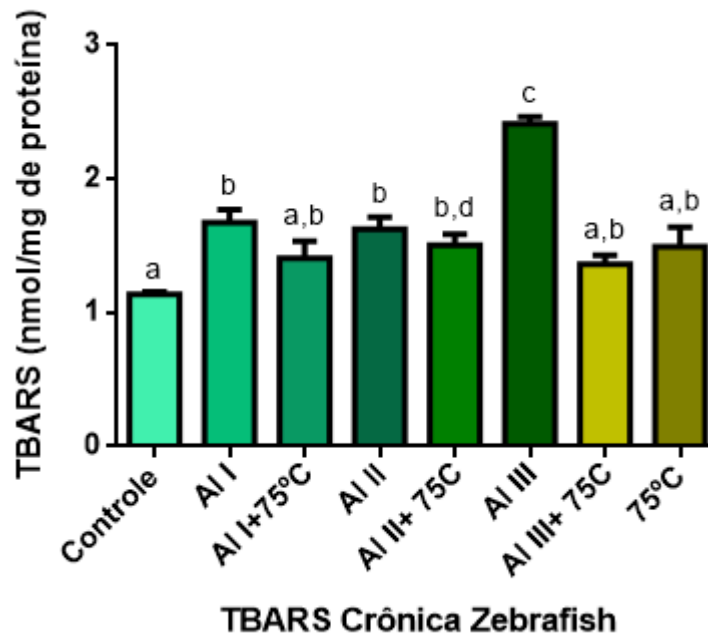


Figura 32. Análise do nível de peroxidação lipídica do organismo modelo Zebrafish em exposição crônica. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Dados foram analisados pela ANOVA *one-way*, seguida por teste de comparação múltipla de *Dunnett's* com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os dados são expressos como média \pm erro padrão.

4.5.4 Análise comportamental crônica do Zebrafish

4.5.4.1 Comportamento social

A exposição crônica ao AI ou a erva-mate não alterou o comportamento social (Figura 32), já que não alterou significativamente o número de entradas no segmento ao lado do cardume (A), o tempo de permanência no segmento ao lado do cardume (B) e o tempo de permanência no segmento do aquário vazio (C).

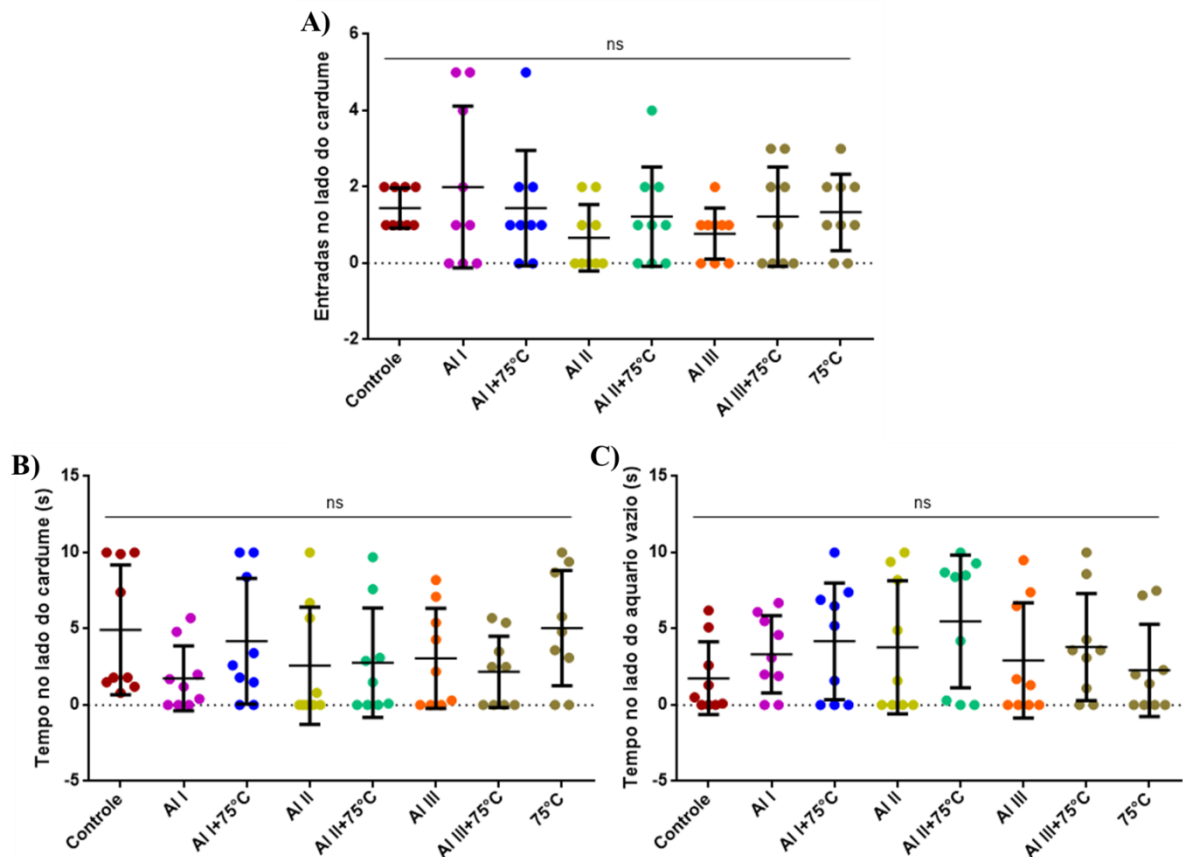


Figura 33. Comportamento social de peixes expostos cronicamente a diferentes concentrações de AI e uma de erva-mate (75°C). Onde: (A) entradas no segmento do cardume, (B) tempo de permanência no segmento do cardume e (C) tempo de permanência no segmento vazio. Dados expressos com média \pm E.P., com n=9 analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.

4.5.4.2 Agressividade

A exposição crônica ao AI e erva-mate, não alterou o comportamento de agressividade dos peixes nos dois tempos de ambientação (30s e 10 min) (Figuras 33 e 34).

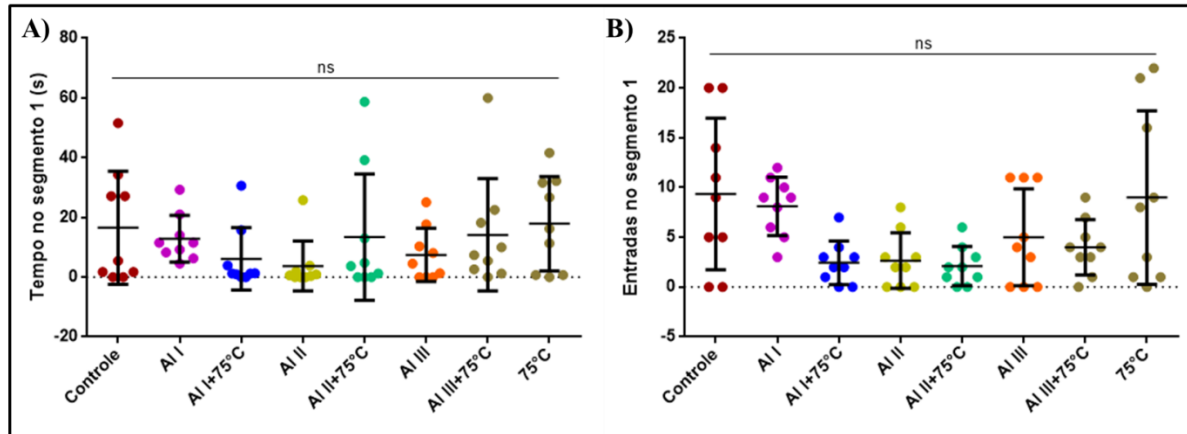


Figura 34. Agressividade de peixes expostos cronicamente a diferentes concentrações de AI e uma de erva-mate (75°C), submetidos à ambientação de 30s. (A) tempo de permanência no segmento 1, (B) entradas no segmento 1. Dados expressos em média \pm E.P., com n=9, analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.

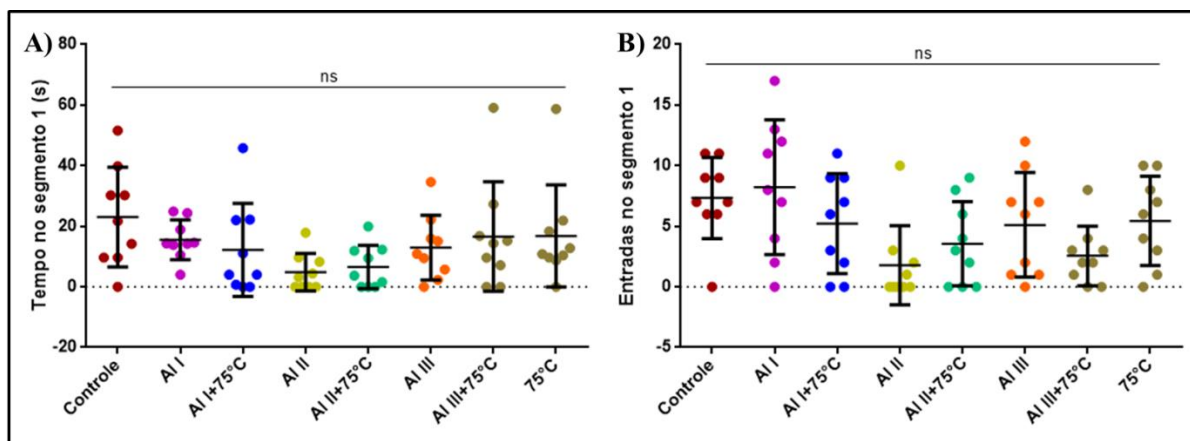


Figura 35. Agressividade de peixes expostos cronicamente a diferentes concentrações de AI e uma de erva-mate (75°C), submetidos à ambientação de 10min. (A) tempo de permanência no segmento 1, (B) entradas no segmento 1. Dados expressos em média \pm E.P., com n=9, analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.

4.5.4.3 Teste do tanque novo

A exposição crônica ao tratamento AI II+75°C e 75°C, provocaram uma diminuição significativa em relação ao controle em todos os parâmetros avaliados no teste do tanque novo (Figura 35). Esta diminuição foi de 99,38% (AI II+75°C) e 99,92% (75°C), para o parâmetro de tempo na zona de superfície (Figura 35 A); 100% para os dois grupos no parâmetro de entradas na zona superior (Figura 35 B) e 98,20% (AI II+75°C) e 99,37% (75°C) para o parâmetro de distância percorrida (Figura 35 C).

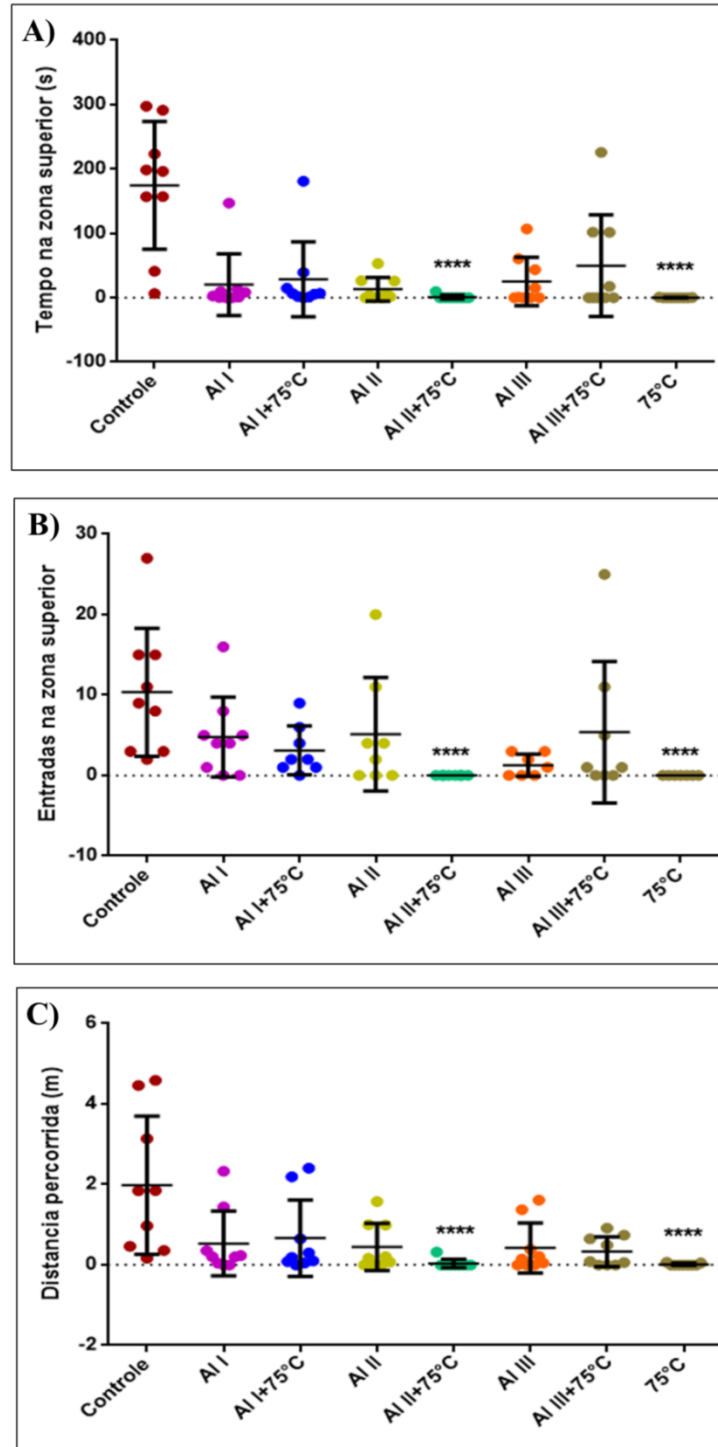


Figura 36. Parâmetros locomotores de peixes expostos cronicamente a diferentes concentrações de Al e uma de erva-mate (75°C). (A) tempo de permanência no topo do aquário (s), (B) entradas na zona superior e (C) distância percorrida (m). Dados expressos em média \pm E.P., com n=9, analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.

5.0 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que uma pequena quantidade de extrato de erva-mate obtido à 75°C, apresenta uma quantidade significativa de compostos fenólicos de 42,09 µg/mL, sendo este o principal composto capaz de gerar uma alta atividade antioxidante (COLPO, 2012).

Os compostos antioxidantes são responsáveis em diminuir o estresse oxidativo ocasionado pelas EROs (WOJTUNIK-KULESZA et al., 2016). Com base na análise de DPPH e ABTS realizada, demonstrou que é necessário 27,01 mg/mL do extrato obtido para inibir 50% dos danos causados pelos radicais livres. Salientando uma relação com os compostos fenólicos que agem como antioxidantes primários inativando os radicais livres (POKORNY et al., 2001).

Além das propriedades fitoquímicas, a erva-mate apresenta alguns metais em sua composição como o Al (GAIAD et al., 2006), que também é encontrado e utilizado no tratamento de águas (NIDHEESH, 2018). Desta forma há certa preocupação, já que o chimarrão é preparado basicamente por uma infusão de água com a erva-mate. Ainda, sabe-se que esta bebida é consumida diariamente por cerca de 70% da população dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná (BRACESCO et al., 2011).

Com isso, a fim de determinar se a presença de Al no chimarrão era exclusivo da erva-mate, foi analisada a concentração de Al encontrada nos riachos pertencentes à Bacia Hidrográfica da Corsan- Erechim/RS. A análise através de espectrofotometria de emissão atômica demonstrou baixos índices do metal na água dos riachos variando entre 18,20 a 21,07 ng/L. Além disso, a água para o consumo (água tratada) apresentou apenas 4,54 ng/L, evidenciando que o tratamento de água é eficiente na remoção de Al. Enquanto a erva-mate apresentou concentrações de Al similares ao estudo de Bortoli et al. (2018), sendo basicamente entre 5,5 a 10,5 mg/mL, isso evidencia que o Al consumido no chimarrão é proveniente da própria erva-mate. Sendo assim, para este trabalho foram utilizadas as concentrações de 5,5; 8,0 e 10,5 mg/mL de Al, conforme estudo prévio do grupo de pesquisa (Bortoli et al., 2018).

Alguns pesquisadores têm mostrado que o Al pode causar mudanças na atividade da acetilcolinesterase (AChE) (BORTOLI et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2019), uma enzima chave em sinapses colinérgicas, incluindo junções neuromusculares (ABBAS e WINK, 2010), tem como função hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) em acetato e colina na fenda sináptica (ARAUJO et al., 2016).

Aqui, utilizando o organismo modelo *C. elegans* foi observado um aumento na atividade da AChE em exposição aguda, de 1h30min, de todos os grupos quando comparado ao controle. De fato, estudos demonstram que exposições agudas, podem rapidamente causar uma ativação das vias colinérgicas centrais que é correlacionada com a liberação transiente da ACh (IMPERATO et al., 1991, DAZZI et al., 1995). Assim, este aumento da atividade da AChE induzido pelo Al pode, à longo prazo, ocasionar um efeito neurotóxico para os indivíduos (FERREIRA et al, 2008).

Ainda, os três tratamentos (per se, pré e pós-exposição), demonstraram um aumento expressivo na atividade da AChE no grupo que recebeu o extrato de erva-mate obtido à 75°C, quando comparado ao controle, sendo este relacionado à presença de metilxantinas que apresentam propriedades de estimulação do sistema nervoso central (SNC) (MEINHART et al., 2010; AZAM et al., 2003).

Quanto as análises das enzimas antioxidantes a superóxido dismutase (SOD) durante 1h 1h de exposição (*per se*) ao Al, ocorreu a diminuição da atividade da enzima em relação ao controle. Resultado semelhante foi encontrado por Fagundez e colaboradores (2014), o qual observou a diminuição da atividade da SOD em *C.elegans* expostos ao metal Ferro (Fe).

Além disso, na pré e pós exposição, foi observado que a concentração de 8,0 mg/mL, quando associado à erva-mate, diminuiu a atividade da SOD. Neste caso a erva-mate foi capaz de restaurar o sistema de defesas antioxidantes, inibindo os efeitos prejudiciais promovidos pelo Al sobre este sistema. Este resultado foi similar ao encontrado por Peixoto (2015), que demonstrou que a exposição em camundongos ao extrato de cagaita (*Eugenia dysenterica*) após a intoxicação por Al, conseguiu restaurar o sistema antioxidante, devido aos seus compostos fenólicos.

A reação da enzima SOD tem como produto final a formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que em grandes quantidades é prejudicial à célula. Com isso, o produto desta reação é o substrato da enzima CAT, também chamada de hidroperoxidase, que tem como função catalisar o H_2O_2 em água (H_2O) e oxigênio (O_2).

A atividade da CAT, está fortemente relacionada ao consumo de substâncias com propriedades antioxidantes, tais como flavonoides e taninos (CHENG et al., 2014), corroborando com o presente trabalho onde somente o grupo que recebeu o extrato de erva-mate obtido à 75°C apresentou um aumento expressivo da atividade da CAT, quando comparada ao controle.

Quanto a GST no tratamento *per se* do organismo *C. elegans*, demonstrou um aumento na concentração 5,5 mg/mL de Al e uma diminuição em 10,5 mg/mL de Al, este

comportamento enzimático é caracterizado por uma resposta bifásica, comum para metais. A resposta bifásica é caracterizada por um aumento na resposta a dose baixa (5,5 mg/mL), e uma diminuição em resposta a uma dose alta (10,5 mg/mL) (KUMAR, 1999). De fato, alguns trabalhos de exposição *in vitro* e *in vivo* ao Al, relatam o efeito bifásico em enzimas (BORTOLI et al., 2018; NOREMBERG et al., 2016).

O Al está relacionado a doenças neurodegenerativas, podendo ocasionar degeneração neuronal nas regiões do cérebro que são responsáveis pelas funções cognitivas, prejudicando a neurotransmissão, que conseqüentemente provoca mudanças comportamentais, levando os pacientes a demência (LI e LE, 2013). Sendo assim, análises comportamentais ajudam a interpretar as atividades enzimáticas, demonstrando melhores resultados para a investigação da intoxicação por Al na DA, e do papel do extrato da erva-mate.

Quanto ao comportamento dos nematódeos o batimento faríngeo e o ciclo de defecação dos vermes intoxicados com o Al quando associados à erva-mate, apresentaram um aumento do batimento faríngeo e uma diminuição no ciclo de defecação. Esta resposta demonstra um efeito sinérgico, demonstrando que os vermes quando submetidos a erva-mate alimentaram-se mais tendo um maior batimento faríngeo e por conseqüência houve mais defecação, diminuindo o intervalo entre uma defecação e outra.

Já a pré exposição vermes tratados com Al apresentaram uma diminuição do batimento faríngeo em relação ao controle, ou seja, o verme alimentou-se menos que o grupo controle, presumindo que a exposição ao Al provocou inibição deste comportamento. Petronilho e colaboradores (2011), demonstraram que a conseqüência do aumento na atividade da AChE é a diminuição nos níveis de acetilcolina nas sinapses nervosas, podendo representar um déficit cognitivo e motor. Corroborando com o nosso trabalho, onde a diminuição dos batimentos faríngeos pode estar relacionada ao aumento na atividade da AChE que foi observada em todos os grupos de Al.

Considerando o que foi encontrado no comportamento, podemos sugerir que o aumento da hidrólise da acetilcolina na fenda sináptica, ocasionado pela ativação da AChE, reduziu o nível de neurotransmissores no sistema de sinapses neuromusculares, promovendo a paralisia do organismo, quando exposto ao Al. Além disso, um estudo realizado por Lima e colaboradores (2014), observou um aumento no tempo de vida do nematóide *C. elegans*, ao expor o verme a infusões de erva-mate. Corroborando com as análises comportamentais, já que quando submetidos ao extrato da planta, apresentaram uma estimulação nos parâmetros comportamentais.

Diversos estudos demonstraram que o efeito a longo prazo de erva-mate é benéfico e seus resultados são mais relevantes do que uma exposição aguda (COLPO et al. 2017; ABBAS & WINK, 2010). Com isso foi realizada uma exposição crônica utilizando dois organismos evolutivamente distintos, sendo estes *C.elegans* e Zebrafish.

O organismo *C. elegans* apresentou uma inibição da atividade da AChE em todos os tratamentos, com exceção do Al III (10,5 mg/mL). A inibição da AChE é a estratégia terapêutica para o tratamento de doenças (TAN et al., 2018). Numa revisão da atividade anticolinesterásica de compostos isolados de plantas, 260 compostos demonstram ação de inibição da enzima da AChE (BARBOSA FILHO et al. 2006). Entre eles estão os flavonoides, os quais receberam destaque nesse trabalho devido a sua grande quantidade (33,28 µg/mL) encontrada no extrato de erva-mate, conferindo-a propriedades semelhantes a alguns fármacos, com a função anti-colinesterásica, ou seja, inibem a ação da AChE fazendo com que o impulso nervoso não termine.

Já o organismo Zebrafish, apresentou um aumento da AChE em todos os grupos quando comparados ao controle, sendo semelhante ao encontrado por Kaizer et al (2005), quando administrado Al na dieta de camundongos. Além disso, no grupo que recebeu somente extrato obtido a 75°C, apresentou um expressivo aumento de 132,99%. Sendo este semelhante ao encontrado na fase aguda do organismo *C.elegans*, devido à estimulação do sistema nervoso através das metilxantinas que fazem parte composição fitoquímica da erva-mate (MEINHART et al., 2010, AZAM et al., 2003).

A atividade da AChE, está amplamente envolvida no desenvolvimento dos sistemas nervoso periférico e central e desempenha um importante papel na regulação do movimento muscular (ALTENHOFEN et al., 2017). Com isso, conforme realizado em exposição aguda com *C. elegans*, foram realizados testes comportamentais em ambos os organismo durante a exposição crônica.

Para *C. elegans* o comportamento na exposição crônica o batimento faríngeo e a defecação apresentaram um efeito sinérgico, conforme observado também em exposição aguda. Os grupos expostos somente ao Al (Al I, Al II e Al III), apresentaram um baixo batimento faríngeo e um alto intervalo de defecação, já os grupos que foram associados a erva-mate (Al I+75°C, Al II+75°C e Al III+75°C), apresentaram comportamentos iguais ao controle e ao grupo exposto somente ao extrato. Sabe-se que o H₂O₂ provoca sintomas comportamentais graves, como o declínio do bombeamento faríngeo (KUMSTA et al., 2011), corroborando com o presente trabalho, onde foi observado que os grupos expostos somente ao Al, apresentam alta atividade da CAT, em resposta a uma maior quantidade de H₂O₂ na

célula, podendo este influenciar na diminuição do batimento faríngeo do *C. elegans*. Segundo Akiyama et al (2012) uma exposição prolongada a uma dieta contendo Al pode induzir estresse e comprometimento cognitivo, mesmo em pacientes que não estão em estágio avançado da DA. Com isso, pode se presumir que o Al a longo prazo provocou maior estresse oxidativo ao organismo *C. elegans*, e conseqüentemente, isso alterou o seu comportamento.

Para o Zebrafish os tratamentos com erva-mate e Al não influenciaram significativamente nos comportamentos de interação social e agressividade. Com relação ao teste de tanque novo, que é utilizado para determinar o comportamento do tipo ansiedade, os animais expostos cronicamente nos tratamentos Al II+75°C e 75°C, permaneceram menos tempo no segmento superior do aquário teste e mais tempo no segmento inferior, e, além disso, o número de entradas no segmento superior foi reduzido, quase nulo quando comparados com os outros grupos. Desta forma, a erva-mate apresentou um efeito ansiogênico no Zebrafish.

Conforme demonstrado na análise fitoquímica da planta, esta apresentou acúmulo de cafeína. Estudos apontam que a cafeína pode atuar em diversos sistemas, dentre os quais, pode-se destacar sua principal ação que ocorre nos receptores adenosinérgicos, devido à similaridade estrutural que essa metilxantina apresenta com a adenosina. A adenosina é produzida principalmente a partir do metabolismo de adenosina trifosfato (ATP) e exerce várias funções SNC, na modulação da liberação de neurotransmissores, como a acetilcolina, plasticidade sináptica e neuroproteção em eventos isquêmicos, hipóxia e estresse oxidativo (SHETH et al., 2014). Com isso, a cafeína bloqueia os receptores adenosinérgicos, resultando alterações no comportamento tipo ansiedade (FERRE, 2010). Esse bloqueio permite que a cafeína desencadeie uma ação contrária à adenosina promovendo a liberação de diversos neurotransmissores excitatórios como o glutamato (FERRE, 2010).

Quanto a análise das enzimas antioxidantes na exposição crônica a SOD tem como produto final o H₂O₂, que é o substrato da CAT, a qual hidroliza em H₂O e O₂, explicando o efeito sinérgico observado em *C.elegans*, onde os grupos contendo somente Al demonstraram um aumento na atividade das mesmas, quando comparados ao controle. Para o Zebrafish, a enzima antioxidante CAT, apresentou um aumento em todos os grupos contendo Al em relação ao controle, sendo similar ao observado por Peixoto et al. (2015), onde camundongos expostos ao Al, apresentaram um aumento nas atividades das enzimas do sistema antioxidante. Ainda Atli e colaboradores (2007), descreve que organismos expostos a metais pesados, apresentam um aumento de EROs, como peróxido de hidrogênio, radical superóxido e radical hidroxil, o que pode elevar a atividade das enzimas do sistema de defesa

antioxidante, como a catalase, superóxido dismutase e glutationa-s-transferase, em resposta a este estresse oxidativo.

Além disso, todos os grupos com Al quando associados a erva-mate, apresentaram uma diminuição na atividade das enzimas SOD e CAT para *C.elegans*, o que pode ser atribuído à ação quelante dos polifenóis, que atuam formando complexos estáveis com os metais tóxicos, promovendo a redução de sua toxicidade (KUMAR e GIL, 2014). Já para o Zebrafish a concentração de 8,0 mg/mL, foi a única que apresentou um aumento quando associado à erva-mate.

Ainda em *C. elegans*, foi avaliada a atividade da GST em exposição crônica, onde todos os grupos expostos à erva-mate foram iguais ao controle e ao grupo submetido constantemente ao extrato de erva-mate. Corroborando com este estudo, Colpo (2017), observou que extratos de erva-mate são capazes de aumentar significativamente a capacidade de resistir ao estresse oxidativo induzido por metais, melhorando a homeostase *redox* restaurando a atividade da enzima GST.

As doenças neurodegenerativas estão normalmente associadas ao estresse oxidativo tem como consequência a peroxidação lipídica (MADANI et al., 2010). A membrana lipídica, por apresentar em sua estrutura grande quantidade de lipídeos, está susceptível a alterações em sua estrutura provocada pela lipoperoxidação, fazendo com que ocorram modificações em sua forma de mosaico fluido, prejudicando a flexibilidade, ancoramento de receptores de membrana, permeabilidade e atividade biológica celular (SAMPAIO e MORAES, 2010).

Os resultados de peroxidação lipídica em Zebrafish evidenciaram o aumento significativo nos níveis de MDA nos grupos tratados com Al, demonstrando que o Al promoveu danos aos lipídeos de membrana neuronais através da potencialização do estresse oxidativo. Sendo semelhante ao encontrado por Sood e colaboradores (2015), demonstraram o aumento da produção de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em cérebros de 48 camundongos tratados com Al. Além disso, neste trabalho observou-se que a peroxidação lipídica promovida pelo Al foi atenuada nos grupos expostos a erva-mate, evidenciando que a erva-mate pode atuar como um neuromodulador contra ação lesiva promovida pelo alumínio no sistema nervoso central.

Diante do exposto, o presente estudo demonstrou que a presença de Al no chimarrão é devido à erva-mate e não à água usada para preparar a infusão, e que as concentrações encontradas nesta foram similares ao estudo de Bortoli et al. (2018). Durante exposição aguda e crônica as concentrações de alumínio podem causar efeitos neurotóxicos nos dois organismos modelos estudados, afetando as análises enzimáticas e comportamentais. Porém,

quando os grupos expostos ao Al foram associados à erva-mate, esta conseguiu restaurar as atividades enzimáticas revertendo a toxicidade causada pelo Al, demonstrando que o extrato de erva-mate é capaz de melhorar a resistência durante condições de estresse oxidativo *in vivo*. Além disso, a erva-mate apresentou um efeito de reversão maior que uma proteção, evidenciando que os compostos fitoquímicos presentes no extrato da planta *Ilex paraguariensis* obtido à 75°C, temperatura característica para o preparo e consumo do chimarrão, apresentam uma atividade antioxidante mais eficaz após a instalação do dano oxidativo, provavelmente devido à atividade de eliminação das moléculas bioativas.

6.0 CONCLUSÕES

- Ao consumir o chimarrão, o Al que é ingerido é devido a própria erva-mate e não a água utilizada para o preparo;
- O Al encontrado na erva-mate não faz mal a saúde, já que a planta possui um alto potencial antioxidante, sobrepondo o metal;
- A planta *Ilex paraguariensis*, possui uma alta atividade antioxidante e esta é devido a sua grande quantidade de compostos fenólicos;
- Tanto na exposição aguda quanto crônica no organismo *C. elegans*, as concentrações de Al utilizadas diminuiram o comportamento. Porém, quando os organismos foram associados a erva-mate, a planta apresentou um efeito neuromodulador protegendo o verme;
- Quanto ao comportamento do Zebrafish, a erva-mate alterou o comportamento de ansiedade, tendo efeito ansiogênico, esse fato pode ser devido a cafeína encontrada na planta;
- A concentração de 10,5 mg/mL de Al, provocou maior estresse no Zebrafish, resultando na peroxidação lipídica.
- A erva-mate apresentou um efeito neuromodulador tanto na exposição aguda como crônica, auxiliando, caracterizando na diminuição do estresse oxidativo de todas as enzimas antioxidantes em ambos os organismos.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, S.; WINK, M. Epigallocatechin gallate inhibits beta amyloid oligomerization in *Caenorhabditis elegans* and affects the daf-2/insulin-like signaling pathway. **Phytomedicine**, v. 17, n. 11, p. 902-909, 2010.

ABAL. **Exposição ao Alumínio**. São Paulo: Associação Brasileira do Alumínio. 2017.

ABLAIN, J.; ZON, L.I. Of fish and men: using Zebrafish to fight human disease. **Trends in Cell Biology**, v. 23, p. 584-586, 2013.

ABREU, M. S.; GIACOMINI, A. C.; RODRIGUEZ, R.; KALUEFF, A. V.; BARCELLOS, L. J. G. Effects of ZnSO₄-induced peripheral anosmia on Zebrafish behavior and physiology. **Behavioural brain research** 320: 275-281, 2017.

AÇARI, D. P. **Efeitos biológicos do consumo de chá-mate (*Ilex paraguariensis*) frente à obesidade em camundongos**. São Paulo, 2009, 74p. Dissertação (Mestrado do Programa de Pós-graduação em Nutrição e Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo (USP), 2009.

ADATTO, I.; KRUG, L.; ZON L.I. The Red Light District and Its Effects on Zebrafish Reproduction. **Zebrafish**, v. 13, p. 226-229, 2016.

Aebi, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v.105, p. 121-126, 1984.

AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; BANG, K. S.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of própolis collected in various areas of Korea. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 7289-7792, 2004.

AKIYAMA, H.; HOSOKAWA, M.; KAMETANI, F.; KONDO, H.; CHIBA, M.; FUKUSHIMA, M.; TABIRA, T. Long-term oral intake of aluminium or zinc does not accelerate Alzheimer pathology in AbPP and AbPP/tau transgenic mice. **Neuropathology**, v. 32, p. 390-397, 2012

ALKHATIB, A. Yerba Maté (*Ilex Paraguariensis*) ingestion augments fat oxidation and energy expenditure during exercise at various submaximal intensities. **Nutrition & Metabolism**, p. 1-7, 2014.

ALTENHOFEN, S.; NABINGER, D. D.; WIPRICH, M. T.; PEREIRA, T. C. B.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D. Tebuconazole alters morphological, behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 180, p. 483-490, 2017.

ANESINI, C.; TURNER, S.; COGOI, L.; FILIP, R. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). **LWT – Food Science and Technology**, v.45, p.299–304, 2012.

ANESINI, C.; FERRARO, G.; FILIP, R. Peroxidase-like activity of *Ilex paraguariensis*. **Food Chemistry**, v. 97, p. 459-464, 2005.

ARAÚJO, C. R. M; SANTOS, V. L.; GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Revista Virtual de Química**, v. 8, p. 1818-1834, 2016.

ARCARI, D. P.; PORTO, V. B.; RODRIGUES, R. V. R.; MARTINS, F.; DE LIMA, J.; SAWAVA, C. H. F.; RIBEIRO, M. L.; CARVALHO, P. D. O. Effect of mate tea (*Ilex paraguariensis*) supplementation on oxidative stress biomarkers and LDL oxidisability in morbo and hyperlipidaemic humans. **Journal of Functional Foods**, v.3, p. 190-197, 2011.

ARVOUED-GRAND, A.; VENNAT, B.; POURRAT, A.; LEGRET, P. Standardisation d'um Extrait de Propolis et Identification des Principaux Constituants. **Journal de Pharmacie de Belgique**, v.49, p. 462-468, 1994.

ATLI, G.; CANLI, M. Enzymatic responses to metal exposure in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology- Part C Toxicology**, v.145, p. 282-287, 2007.

AVERY, -L. The genetics of feeding in *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 133, p. 897-917, 1993.

AZAM, S.; HADI, N.; KHAN, N.U.; HADI, S.M. Antioxidant and pro oxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. **Medicinal Science Monitor**, v. 9, p. 325-330, 2003.

BARBOSA FILHO, J. M.; MEDEIROS, K. C. P.; DINIZ, M. F. F. M.; BATISTA, L. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; DA-CUNHA, E. V. L.; ALMEIDA, J. R. G.S; QUINTANS-JUNIOR, L. J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.258-85, 2006.

BAR-OR, D.; BAR-OR, R.; RAEL, L. T.; BRODY, E. N. Oxidative stress in severe acute illness. **Redox Biology**, p. 340- 345, 2015.

BARROS, A. G. A. **Regulação da homeostase energética pelo sistema dopaminérgico no modelo *Caenorhabditis elegans***. Tese (Medicina Molecular)- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2010.

BASTOS, D. H. M.; FORNARI, A. C.; YARA, S. Q.; TORRES, E. A. F. S. Bioactive compounds Content of Chimarrão Infusions Related to the Moisture of Yerba Maté (*Ilex Paraguariensis*) Leaves. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 399-404, 2006.

BERTHOLDO-VARGAS, L. R.; MARTINS, J. N.; BORDIN, D.; SALVADOR, M.; SCHAFER, A. L.; DE BARROS, N. M.; BARBIERI, L.; STIRPE, F.; CARLINI, C. R. Type 1 ribosome-inactivating proteins - Entomotoxic, oxidative and genotoxic action on *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) and *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 55, 51-58, 2009.

BIXBY, M.; SPIELER, L.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life science**, n. 77, p. 345-358, 2005.

BOAVENTURA, B. C. B.; PIETRO, P. F. D.; KLEIN, A.; STEFANUTO, A.; MORAIS, E. C. D.; ANDRADE, F. D.; WAZLAWIK, E.; SILVA, E. L. D. Antioxidant potential of mate tea (*Ilex paraguariensis*) in type 2 diabetic mellitus and pre-diabetic individuals. **Journal of Functional Foods**, v.3. p. 1057-1064, 2013.

BONDARIK, R., KOVALESKI, J.L. & PILATTI, L.A. A produção de erva-mate e o início da atividade industrial no estado do Paraná. In: II Encontro de Engenharia e Tecnologia dos Campos Gerais. Ponta Grossa, Brasil, 2006.

BONDY, S. C. Low levels of aluminum can lead to behavioral and morphological changes associated with Alzheimer's disease and age-related neurodegeneration. **Neurotoxicology**, v.52, p.229-226, 2016.

BORTOLI, P. M.; ALVES, C.; COSTA, E.; VANIN, A. P.; SOFIATTI, J. R.; SIQUEIRA, D. P.; DALLAGO, R. M.; TREICHEL, H.; VARGAS, G. D. P. L.; KAIZER, R. R. *Ilex paraguariensis*: Potencial antioxidante on aluminium toxicity, in na experimental modelo of Alzheimer's disease. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.181, p.104- 110, 2018.

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A. G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GLUGLIUCCI, A. Recent advences on *Ilex paraguariensis* research:mini review. **Journal Ethnopharmacol**, v.136, p. 378-384, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, n.77, p.71–94, 1974.

BROWNE, S.E.; BEAL, M.F. Oxidative damage in Huntington's disease pathogenesis, Antioxid. **Redox Signal**, p. 2061–2073, 2006.

BURRIS, K. P.; HARTE, F.M.; DAVIDSON, P. M.; STEWART, C. N.; ZIVANOVIC, S. Composition and bioactive properties of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.): a review. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 72, p. 268-274, 2012.

CACHAT, J.; KYZAR, E. J.; COLLINS, C.; GAIKWARD, S.; GREEN, J.; ROTH, A.; EL-OUNSJ, M.; DAVIS, A.; PHARM, M.; LANDSMAN, S.; STEWART, A. M.; KALUEFF, A. V. Unique and potente effects of acute ibogaine on zebrafish: The developing utility of novel aquatic models for hallucinogenic drug reserach. **Behav Brain Res.**, p.258-269, 2013.

CAESB- Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal. **Relatório da Qualidade da Água Distribuída pela CAESB**, p. 1-4, 2016

CASTRO, I. L. R. **Elaboração de Ferramentas para Avaliar a Eficiência de Tratamento de uma ETA- ETA de S.Jorge** (Mestrado em Engenharia do Ambiente)- Universidade de Trás dos Montes e Alto Douro- Vila Real, 2015.

CERVANTES, C. A. M.; LOPEZ, S. L.; PERES, D. M.; MONTALVO, A. G. The aluminum used in wastewater treatment and its possible relationship with Alzheimer's disease. **Journal of negative e no positive results**, v.3, p. 139-143, 2017.

CHALFIE, M.; TU, Y.; EUKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PRASHER, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v. 11, p. 802-805, 1994.

CHEN, T. J.; HUNG, H. S.; WANG, D. C.; CHEN S. S. The protective effect of rho-associated kinase inhibitor on aluminum-neurotoxicity in rat cortical neurons. **Toxicological Sciences**, v.116, p.264-272, 2010.

CHENG, D.; XI, Y.; CAO J.; CAO, D.; MA, Y.; JIANG, W. Protective effect of apple (Ralls) polyphenol extract against aluminum-induced cognitive impairment and oxidative damage in rat. **Neurotoxicology**, v. 45, p. 111-120, 2014.

CHRISTEN, Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, p. 621-629, 2000.

COLE, R. D.; ANDERSON, G. L.; WILLIAMS, P. L. The nematode *Caenorhabditis elegans* as a model of organophosphate-induced mammalian neurotoxicity. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 194, p. 248–256, 2004.

COLLINS, J. E.; WHITE S.; SEARLE S. M. J.; STEMPLE D. L. Incorporating RNA-seq data into the zebrafish Ensembl genebuild. **Genome Res**, v.22, p.2067-2078, 2012.

COLPO, A. Z. C. **Perfil fitoquímico e capacidade antioxidante de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.Hill)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) Universidade Federal do Pampa, 2012.

COLPO, A. Z. C. **Efeitos dos extratos de erva-mate sobre danos oxidativos e sua relação com anti e co-genotoxicidade**. Uruguaiiana, 2017. Dissertação (Doutorado no Pós-graduação em Bioquímica)- Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), 2017.

CORREA, M. C.; MALDONADO, P.; DA ROSA, C. S.; LUNKES, G.; LUNKES, D. S.; KAIZER, R. R.; AHMED, M.; MORSCH, V. M.; PEREIRA, M. E.; SCHETTINGER, M. R. Oxidative stress and erythrocyte acetylcholinesterase (AChE) in hypertensive and ischemic patients of both acute and chronic stages. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, p. 314-324, 2007.

COX, M. M.; DOUDNA, J. A.; O'DONNELL, M. *Biologia Molecular: Princípios e Técnicas*. Porto Alegre: Artmed. 2012.

CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C. L.; PROCOPIO, J. *Entendendo a Gordura: Os ácidos Graxos*. Barueri - São Paulo: ed. Manole; 2002. p. 411.

DAIBER, A. Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta**, p.897-906, 2010.

DAL SANTOS, P.; LOGAN, M. A.; CHISHOLM, A. D.; JORGENSEN, E. M. The Inositol Trisphosphate Receptor Regulates a 50-Second Behavioral Rhythm in *C. elegans*. **Cell Press**, v. 98, p. 757-767, 1999.

DAZZI, L.; MOTZO, C.; IMPERATO, A.; SERRA, M.; GESSA, G. L.; BIGGIO, G. Modulation of basal and stress-induced release of acetylcholine and dopamine in rat brain by abercanil and imidazenil, two anxiolytic gamma-aminobutyric acid receptor modulators. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 273, p. 241-247, 1995.

DIMITRIADI, M.; HART, A.C. Neurodegenerative disorders: Insights from the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Neurobiology Diseases**, v. 40, p. 4-11, 2010.

DONKIN, S.G.; DUSENBERG, D.B. A soil toxicity test using the nematode *Caenorhabditis elegans* and an effective method of recovery. **Arch. Environmental Contamination Toxicology**, n.25, p.145-151, 1993.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; JR, V. A.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

EVASON, K.; HUANG, C.; YAMBEN, I.; COVEY, D. F.; KORNFELD, K. Anticonvulsant medications extend worm life-span. **Science**, v. 307, p. 258-262, 2005.

EVRON, T. et al. Adaptive changes in acetylcholinesterase gene expression as mediators of recovery from chemical and biological insults. **Toxicology**, v. 233, n. 1-3, p. 97-107, 2007.

EXLEY, C. The pro-oxidant activity of aluminum. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, p. 380-387, 2004.

EXLEY, C.; VICKERS, T. Elevated brain aluminum and early onset Alzheimer's disease in an individual occupationally exposed to aluminum: a case/report. **Journal of Medical Case Reports**, v.8, 2014.

EXLEY, C.; MOLD, M. J. The binding, transport and fate of aluminium in biological cells. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 30, p. 90-95, 2015.

FAGUNDEZ, D. A. **Avaliação dos efeitos neurotóxicos do ferro *in vivo* em *Caenorhabditis elegans***. Uruguaiana, 2014. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Bioquímica)-Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), 2014.

FERRE, S. Role of the central ascending neurotransmitter systems in the psychostimulant effects of caffeine. **Journal of Alzheimers Disease**, v. 1, p. 35-49, 2010.

FERREIRA, P. C.; PIAI, K. A.; TAKAYANAGUI, A. M. M.; SEGURA-MUNOS, S. I. Alumínio como fator de risco para a doença de Alzheimer. **Revista Latino Americana de Enfermagem**, v. 16, 2008.

FILIP, R.; FERRARO, G.E. Researching on new species of “Mate”: *Ilex brevicauspis* phytochemical and pharmacology study. **European Journal of Nutrition**, v. 42, n. 1, p. 50-54, 2003.

FLOEGEL, A. *et al.* Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal and Food Composition and Analysis**, v. 2, p. 1043- 1048, 2011.

FREITAS, G. B. L.; ANDRIOLA, A.; GAUER, A. G.; IENK, L. S. S. Erva-mate, muito mais que uma tradição, um verdadeiro potencial terapêutico. **Revista eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 101-113, 2011.

FRIJHOFF, J. WINYARD, P. G.; ZARKOVIC, N.; DAVIES S. S.; STOCKER, R.; CHENG, D.; KNIGHT A. R.; TAYLOR, E. L.; OETTRICH, J.; RUSKOVKA, T.; GASPAROVIC, A. C.; CUADRADO, A.; WEBER, D.; POULSEN H. E.; GRUNE, T.; SCHIMIDT, H. H.; GHEZZI, P. Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 23, p. 1144- 1170, 2015.

FRISARDI, V.; SOLFRIZZI, V.; CAPURSO, C.; KEHOE, P. G.; IMBIMBO, B. P.; SANTAMATO, A.; DELLEGRAZIE, F.; SERIPA, D.; PILOTTO A.; CAPURSO, A.; PANZA F. Aluminum in the diet and Alzheimer’s disease: from current epidemiology to possible disease-modifying treatment. **Journal of Alzheimers Disease**, v. 20, p. 17-30, 2010.

FUJII, T.; TAKADA-TAKATORI, Y.; KAWASHIMA, K. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: expression of an independent, non-neuronal cholinergic in lymphocytes and its clinical significance in immunotherapy. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 106, p.186-192, 2008.

GAIAD, S.; RAKOCEVIC, M.; REISMANN, C. B. N 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.

GALARIS, D.; BARBOUTI, A.; PONTOPOULOS, K. Iron homeostasis and oxidative stress: intimate relationship. **Biochimica et biophysica Acta (BBA)- Molecular Cell Research**, 2019.

GALARIS, D.; PONTOPOULOS, K. Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. **Critical Review in Clinical Laboratory Sciences**, v. 45, p. 1- 23, 2008.

GALEY, H. F. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. **British Journal of Anaesthesia**. V, 107, p. 57-64, 2011.

GERLAI, R.; LAHAV, M.; GUO, S.; ROSENTAL, A. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 67, p. 773-782, 2000.

- GIACOMINI, A. C. V. V.; ABREU, M. S.; GIACOMINI, L. V.; SIEBEL, A.M.; ZIMERMAN, F. F.; RAMBO, C. L.; MOCELIN, R.; BONAN, C. D.; PIATO, A. L.; BARCELLOS, L. G. J. Fluoxetine and diazepam acutely modulate stress induced-behavior. **Behavioural Brain Research**, n.296 p.301–310, 2016.
- GONZALEZ, A.; FERREIRA, F.; VIZQUEZ, A.; MOYNAA, P.; PAZ, E. A. Biological screening of Uruguayan medicinal-plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, p. 217-220, 1993.
- GREER, E. R.; PEREZ, C. L.; ASHRAFI, K. Neural and Molecular dissection of a *C.elegans* sensory circuit that regulates fat and feeding. **Cell metabolism**, v. 2, p. 118-131, 2008.
- GREGER, J. L. Aluminum metabolism. **Annual Review of Nutrition**, v. 13, p. 43-63, 1993.
- GROSSBERG, G. T. Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: getting on and staying on. **Current Therapeutic Research**, v. 64, p.216-35, 2003.
- GRUNWLD, D. J.; EISEN, J. S. Hadwater of the zebrafish- emergence of a new model vertebrate. **Nature Reviews Genetics**, v.9, p. 717-724, 2002.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants-que vadis? **Trends Pharmacological Sciences**, v. 32, p. 125-130, 2011.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. New York, (capítulos 3, 4, 5), 2007.
- HARRIS, W. R.; WNAG, Z.; HAMADA, Y. Z. Copetition between transferrin and the serum ligands citrate and phosphate for the binding of aluminum. **Inorganic Chemistry**, v.42, p. 3262-3273, 2003.
- HOPE, I.A. Background on *Caenorhabditis elegans*, em: I.A. Hope (Ed.), *C. elegans: A Practical Approach*, Oxford University Press, New York, p. 1–15, 1999.
- HOUSE, E.; ESIRI, M.; FORSTER, G.; INCE, P. G.; EXLEY, C. Aluminium, iron and cooper in human brain tissues donated to the Medical Research Council's cognitive functions and ageing study. **Metallomics**, v. 4, p. 56-65, 2011.
- HOWE, K.; et al. The Zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v.496, p. 498–503, 2013.
- IMPERATO, A.; PUGLISSI-ALLEGRA, S.; CASOLINI, P.; ANGELUCCI, L. Changes in brain dopamine and acetylcholine release during and following stress are independent of the pituitary-adrenocortical axis. **Brain Research**, v. 538, p. 111-117,1991.
- IWASE, T.; TAJIMA, A.; SUGIMOTO, S.; OKUDA, K.; HIRONAKA, I.; KAMATA, Y.; TAKADA, K.; MIZUNOE, Y. A simple assay for measuring catalase activity: a visual approach. **Scientific Reports**, v. 3, 2013.

- JAISWAL, R.; SOVDAT, T.; VIVAN, F.; KUHNERT, N. Profiling and characterization by LC-MSn of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in mate (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.5471–5484, 2010.
- JORGE, M. B.; LORO, V. L.; BIANCHINI, A.; WOOD, M.; GILLIS, P. L. Mortality, bioaccumulation and physiological responses in juvenile freshwater mussels (*Lampsilis siliquoidea*) chronically exposed to copper. **Aquatic Toxicology**, v. 126, p. 137–147, 2013.
- KAIZER, R. R.; CORREA, M. C.; SPANEVELLO, R. M.; MORSCH, V. M.; MAZZANTI, C. M.; GONÇALVES, J. F.; SCHETINGER, M. R. C. Acetylcholinesterase activation and enhanced lipid peroxidation after long-term exposure to low levels of aluminum on different mouse brain regions. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, p. 1865-1870, 2005.
- KALUEFF, A. V.; GEBHARDT, M.; STEWART, A. M.; CACHAT, J. M.; BRIMMER, M.; CHAWLA, J. S.; CRADDOCK, C.; KYZER, E. J.; ROTH, A.; LANDSMAN, S.; GAIKWAD, S.; ROBINSON, K.; BAATRUP, E.; TIERNEY, K.; SCHAMCHUK, A.; NORTON, W.; MILLER, N.; NICOLSON, T.; BRAUBACH, O.; GILMAN, C.P.; PITTMAN, J.; ROSEMBERG, D. B.; GERLAI, R.; ECHEVARRIA D.; LAMB, E.; NEUHAUSS, S. C.; WENG, W.; BALLY-CUIF, L.; SCHNEIDER, H. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 70-86, 2013.
- KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 453-464, 2004.
- KATETTA, T; HENGARTNER M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature Review Drug Discovery**, v. 5, p. 987-399, 2006.
- KAWAHARA, M.; KATO-NEGISHI, M. Link between aluminum and the pathogenesis of Alzheimer's disease: the integration of the aluminum and amyloid cascade hypotheses. **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2011, p. 1-17, 2011.
- KAWAHARA, M.; KATO, M.; KURODA, Y. Effects of aluminum on the neurotoxicity of primary culture neurons and on the aggregation of beta-amyloid protein. **Brain Research Bulletin**, v. 55, p.211-217, 2001.
- KONIOR, A.; SCHRAMM, A.; CZESNIKIEWICZ-GUZYK, M.; GUZYK, T. J. NADPH oxidases in vascular pathology. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, p. 2794- 2814, 2014.
- KUMAR, S. Aluminium-induced biphasic effect. **Medical Hypotheses**, v.52, p.557–559, 1999.
- KUMAR, V.; GILL, K. D. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in aluminium neurotoxicity and its amelioration: a review. **Neurotoxicology**, v. 41, p. 154-166, 2014.

- KUMSTAR, C.; THAMSEN, M.; JAKOB, U. Effects of oxidative stress on behavior, physiology, and the redox thiol proteome of *Caenorhabditis elegans*, v. 1, p. 1023-1037, 2011.
- LEE, K. W.; KIM, Y. J.; LEE, H. J.; LEE, C. Y. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7292-7295, 2003.
- LI J.; LE W. Modeling neurodegenerative diseases in *Caenorhabditis elegans*. **Experimental Neurology**, v. 250, p. 94-103, 2013.
- LIMA, M. E. *Caenorhabditis elegans*: um modelo experimental para análises dos efeitos agudos de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e uma ferramenta para a potencialização do Ensino de Ciências na Escola Básica. Dissertação (Mestrado do Programa de Pós-graduação em Bioquímica) - Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), 2013.
- LOPES, G. C.; MACHADO, F. A. V.; TOLEDO, C. E. M.; SAKURAGUI, C. M.; MELLO, J. C. P. Chemotaxonomic significance of 5-deoxyproanthocyanidins in *Stryphnodendroni species*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 36, n. 12, p. 925-931, 2008.
- LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164-175, 2014.
- LY, K. N. *Caenorhabditis elegans* model to Study the molecular mechanisms of Alzheimer's Disease. 2014. Dissertação (Philosophy in Biological Sciences)- University of Auckland, New Zealand, 2014.
- MADANI, A.; NEHAL, M.; HAQUE, S.; KHAN, A. A. Perspective of oxidative stress in a biological system and prevention by naturally occurring antioxidant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, n. 4, p. 287-295, 2010.
- MAHESH, T.; MENON, V. P. Quercetin alleviates oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. **Phytother Res**, v. 18, p. 123-127, 2004.
- MARTYN, C. N.; COGGAN, D.; INSKIP, H.; LACEV, R. F.; YOUNG, W. F. Aluminium concentrations in drinking water and risk of Alzheimer's disease. **Epidemiology**, v.8, p.281-286, 1997.
- MCCOLL G.; ROBERTS, B. R.; PUKALA, T. L.; KENCHE, V. B.; ROBERTS, C. M.; LINK, C. D.; RYAN, T. M.; MASTERS, C. L.; BARNHAM, K. J.; BUSH, A. L.; CHERNY, R. A. Utility of an improved model of amyloid-beta (A β (1-42)) toxicity in *Caenorhabditis elegans* for drug screening for Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegener**, v. 7, 2012.
- MCGHEE, J. D. The *C. elegans* intestine. WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, 2007.

MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOUлма, O.G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, p. 571-577, 2005.

MEINHART, A. D; BIZZOTO, C. S; BALLUS, C. A; POLONY RYBKA, A. Ç.; SOBRINHHO, M. R.; CERRO-QUINTANA, R. S.; TEIXEIRA-FILHO, J.; GODOY, H. T. Methylxanthines and phenolics content extracted during the consumption of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.24, p. 2188-2193, 2010.

MEJIA, G. E; SONG, Y. S.; CALEB, C. I.; RAMIREZ-MARES, M. V. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidante capacity and *in vitro* of colon câncer cell proliferation. **Journal of functional foods**, v.2, n.1, p.23-34, 2010.

MESULAM, M. M. et al. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyse acetylcholine. **Neuroscience**, v. 110, p. 627-639, 2002.

MESHALKINA, D. A. ; KIZLYK, M. N.; KYSIL, E. V.; COLLIER, A. D.; ECHEVARRIA, D. J.; ABREU, M. S.; BARCELLOS, L. J. G.; SONG, C.; KALUEFF, A. V. Understanding Zebrafish cognition. **Behavioural processes**, v. 141, p. 229-241, 2017.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.9, p. 405-410, 2002.

MIZGIREV, I.; REVSKOY, S. Generation of clonal zebrafish lines and transplantable hepatic tumors. **Nat Protoc**, v. 5, p. 383-394, 2010.

MOREIRA, P.I; SANTOD, M. S.; OLIVEIRA, C. R.; SHENK, J. C.; NUNOMURA, A.; SMITH, M. A.; ZHU, X.; PERRY, G. Alzheimer disease and the role of free radicals in the pathogenesis of the disease. **CNS Neurological Disorders Drug Targets**, v.7, p.3-10, 2008.

MORETTO, M. B. et al. Effect of subchronic treatment with mercury chloride on NTPDase, 5'-nucleotidase and acetylcholinesterase from cerebral cortex of rats. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 17, p. 255-260, 2004.

MUDGE, D. W.; JOHNSON, D. W.; HAWLEY, C. M.; CAMPBELL S. B.; ISBEL, N. M.; VAN EPS, C. L.; PETRIE, J. J. B. Do aluminum-based phosphate binders continue to have a role in contemporary nephrology practice? **BMC Nephrology**, p. 12-20, 2011.

MUNOZ-TORRERO, D. Acetylcholinesterase Inhibitors as Disease-Modifying Therapies for Alzheimers Disease. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, 2008.

NASIADKA, A.; CLARK M. D. Zebrafish Breeding in the Laboratory Environment. **ILAR J**, v. 53, p. 161-168, 2012.

NIDHEESH, P. V.; KHATRI, J.; ANANTHA-SINGH, T. S.; GANDHIMATHI, R.; RAMESH, S. T. Review of zero-valent aluminum based water and wastewater treatment methods. **Chemosphere**, v.200, p.621-631, 2018.

- NIWA, R.; NIWA, Y. S. The fruit fly *Drosophila melanogaster* as a model system to study Cholesterol metabolism and homeostasis. **Cholesterol**, p. 1-6, 2011.
- NOREMBERG, S.; BOHRER, D.; SCHETINGER, M. R.; BAIROS, A.V.; GUTIERRES, J.; GONÇALVES, J. F.; VEIGA, M.; SANTOS, F.W. Silicon Reverses Lipid Peroxidation but not Acetylcholinesterase Activity Induced by Long-Term Exposure to Low Aluminum Levels in Rat Brain Regions. **Biol Trace Elem Res**, v. 169, p. 77-85, 2016.
- OLIVEIRA, V. E.; VANIN, A. P.; CONCATO, A. C.; TAMAGNO, W. A.; TREICHEL, H.; KAIZER, R. R. P. The toxicological paradigms of aluminum and the etiology of Alzheimer's disease in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Quality Management**, v. 29, 2019.
- PAMPLONA, R.; COSTANTINI, D. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. **American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 301, p. 843-863, 2011.
- PARIHAR, A.; PARIHAR, M. S.; MILNER, S.; BHAT, S. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. **Burns**, v.34, p. 6 –17, 2008.
- PAUL, S.; JEON, W. K.; BIZON, J. L.; HAN, J. S. Interaction of basal forebrain cholinergic neurons with the glucocorticoid system in stress regulation and cognitive impairment. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 7, 2015.
- PEIXOTO, M. P. G.; KAISER, S.; VERZA S. G.; RESENDE, P. E. D.; TRETER, J.; PAVEL, C.; BORRE, G. L.; ORTEGA, G. G. LC-UV assay method and UPLC/Q-TOF-MS characterization of saponins from *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (mate) unripe fruits. **Phytochemical Society of North America**, v. 23, p. 415–420, 2011.
- PEIXOTO, L. F. **Avaliação do efeito protetor do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Eugenia dysenterica* DC. sobre a neurotoxicidade induzida pelo alumínio.** Goiânia, 2015. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas)- Universidade Federal de Goiás (UFG), 2015.
- PERKINS, E. J. et al. Current perspectives on the use of alternative species in human health and ecological hazard assessments. **Environmental Health Perspectives**.v.121, p. 1002-101, 2013.
- PETRONILHO, E. C.; PINTO, A. C.; VILLARA, J. D. F. Acetilcolinesterase: alzheimer e guerra química. **Revista Militar de Ciência e Tecnologia**, 2011.
- PIRES, M. A. **Antioxidant activity evaluation of commercial extracts of rosemary and green tea and its influence on the stability of chicken burger during frozen storage.** 2014. Dissertação (Faculdade de zootecnia e engenharia de alimentos)- Universidade de São Paulo, 2014.

PIZZINO, G.; IRRERA, N.; CUCINOTTA, M.; PALLIO, G.; MANNINO, F.; ARCORACI, F.; SQUADRITO, F.; ALTAVILLA, D.; BITTO, A. Oxidative stress: Harms and benefits for human health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2017.

POKORNY, J. Introduction In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food : Practical applications Cambridge**. Woodhead Publishing, p. 3-5, 2001.

PRAKASH, A., KUMAR, A. Effect of N-acetyl cysteine against aluminium-induced cognitive dysfunction and oxidative damage in rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 2, p. 98-104, 2009.

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, 2018.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciências Tecnologia Alimentos**, v. 27, p. 53-60, 2007.

ROSALINO, M. R. R. **Potenciais Efeitos da Presença de Alumínio na Água de Consumo Humano**. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente, Perfil Sanitário) – Faculdade de Ciência e Tecnologias, Universidade de Lisboa. Lisboa, 2011.

RYTER, S. W.; KIM, H. P.; HOETZEL, A.; PARK, J. W.; NAKAHIRA, K.; WANG, X.; CHOI, A. M. Mechanisms of cell death in oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, p. 49- 89, 2007.

SAMPAIO, R. C.; MORAES, C. Estresse oxidativo e envelhecimento: papel do exercício físico. **Revista de Educação física**, v. 16, p. 506-515, 2010.

SANT'ANNA, M. C. B. **Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo para estudo de toxicidade induzida por ferro**. Porto Alegre, 2009. Dissertação (Mestrado do Programa de Pós-graduação em Biologia celular e molecular)- Faculdade de Biociências da Pontífica Universidade Católica do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2009.

SANTORIELLO C.; ZON L. I. Science in medicine Hooked! Modeling human disease in zebrafish. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, p. 2337-1343, 2012.

SARTER, M., PARIKH, V. Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. **Nature Reviews**, v. 6, p. 48-56, 2005.

SCHIEBER, M.; CHANDEL N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Current Biology**, v. 24, p. 453- 462, 2014.

SHARMA, B.; SINGH, N.; SINGH, M. M odulation of celecoxib and streptozotocin induced experimental dementia of Alzheimer's disease by pitavastatin and donepezil. **Journal of Psychopharmacol**, v. 22, p. 162-171, 2008.

SHEN, L.; XIAO, J.; YE, H.; WANG, D. Toxicity evaluation in nematode *Caenorhabditis elegans* after chronic metal exposure. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, p. 125–132, 2009.

SHETH, S.; BRITO, R.; MUKHERJEA, D.; RYBAK, L. P.; RAMKUMAR, V. Adenosine receptors: expression, function and regulation. **International Journal of Molecular Science**, v. 15, p. 2024-2052, 2014.

SIES, H. Oxidative stress: Introductory remarks. **Elsevier**, p. 1- 8, 1985.

SRIRAKSA, N.; WATTANATHORN, J.; MUCHIMAPURA, S.; TIAMKAO, S.; BROWN, K.; CHAISIWAMINGKOL, K. Cognitive-enhancing effect of quercetin in a rat model of Parkinson's disease induced by 6- hydroxydopamine. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2012.

SOFIATTI, J. R. O. **Efeitos neuroendócrinos e comportamentais do hormônio estrogênio em Zebrafish**. Erechim, 2018. Dissertação (Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental)- Universidade Federal Fronteira Sul (UFFS), 2018.

SODHI, S.; SHARMA, A.; BRAR, A. S.; BRAR, R. S. Effect do α -tocopherol and selenium on antioxidante status, lipid peroxidation and hepatopathy induced by malathion in chicks. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 90, p. 82-86, 2008.

SONI, M. G.; WHITE, A. M.; FLAMM, G.; BURDOCK, G. A. Safety Evaluation of Dietary Aluminum. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 33, p. 66-79, 2001.

SOOD, P. K.; VERMA, S.; NAHAR, U.; NEHRU, B. Neuroprotective Role of Lazaroids Against Aluminium Chloride Poisoning. **Neurochem Res**, v. 40, p. 1699-1708, 2015.

STAHL, S. M. The new cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease, part 2: illustrating their mechanisms of action. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 61, p.813–814, 2000.

TAN, C. H.; FAN C. C.; MORMINO, E. C.; SUGRUE, L. P.; BROCE, I. L.; HESS, C. P.; DILLON, W. P.; BONHAM, L. W.; YOKOYAMA, J. S.; KARCH, C. M.; BREWER, J. B.; RABINOVICI, G. D.; MILLER, B. L.; SCHELLENBERG, G. D.; KAUPPI, K.; FELDMAN, H. A.; HOLLAND, D.; MCEVOY, L. K.; HYMAN, B. T.; BENNET, D. A.; ANDREASSEN, O. A.; DALE, A. M.; DESIKAN, R. S. Polygenic hazard score: an enrichment marker of Alzheimer's associated amyloid and tau deposition. **Acta Neuropathologica**, v. 135, p. 85-93, 2018.

TAYLOR, J. S.; BRAASCH I.; FRICKEY T.; MEYER A.; PEER Y Van de. Genome duplication, a trait shared by 22 000 species of ray-finned fish. **Genome Res**, v.13, p.382-390, 2003.

THAL, D. R. Clearance of amyloid β -protein and its role in the spreading of Alzheimer's disease pathology. **Frontiers in Aging Neuroscience**, p. 7-25, 2015.

TICHY, M. A. Aluminum in the dialysis patient. **Journal of Renal Nutrition**, v. 13, p. 1-3, 2003.

TOMLIJENOVIC, L. Aluminium and Alzheimer's disease: After a century of controversy, is there a plausible link? **Journal of Alzheimer's Disease**, v.23, p. 567-598, 2011.

TONIN, A. A. Componentes dos sistemas purinérgico e colinérgico nos processos inflamatórios e neurológicos em roedores infectados experimentalmente com *Toxoplasma gondii*. UFSM. 2014.

VALDUGA, E. et al. Caracterização química da folha de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Erva mate) e de outras espécies utilizadas na adulteração do mate. Boletim do CEPPA, Curitiba, v. 15, p. 25-36, jan./jun., 1997.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VIEIRA, M. A.; ROVANIS, A. A.; MARASCHIN, M.; SIMAS, K. N.; PAGLIOSA, C. M.; PODESTA, R.; AMBONI, R. D. M. C.; BARRETO, P. L. M.; AMANTE, E. R. Chemical Characterization of Candy Made of Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) residue. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.56, n.12, p. 4637-4642, 2008.

WALTON, R. Aluminum in hippocampal neurons from humans with Alzheimer's disease. **Neurotoxicology**, v.27, p.385-394, 2006.

WANG, W.; YANG, H.; WANG, X.; JIANG, J. ZHU, W. Effects of fulvic acid and humic acid on aluminum speciation in drinking water. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, p. 211–217, 2010.

WARBY, R.; JOHNSON, C. E.; DRISCOLL, C. T. Changes in Aluminum Concentrations and Speciation in Lakes Across the Northeastern U.S. Following Reductions in Acidic Deposition. **Environmental Science and Technology**, v. 42, p. 8668-8674, 2008.

WENG, L.; TEMMINGHOFF, E. J.; VAN RIEMSDIJK, W. H. Aluminum speciation in natural waters: measurement using Donnan membrane technique and modeling using NICADonnan. **Water Research**, v.36, p. 4215-4226, 2002.

WILSON, D. F. Oxidative phosphorylation: regulation and role in cellular and tissue metabolism. **Journal of Physiology**, v. 23, p. 7023-7038, 2017.

WOJTUNIK-KULESZA, K. A.; ONISZCZUK, A.; ONISZCZUK, T.; WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M. The influence of commin free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's Disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 78, p. 39-49, 2016.

YANA, M. H.; WANG, X.; ZHU X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 90-101, 2013.

YISIREYILI, M.; HAYASHI, M.; WU, H.; UCHIDA Y.; YAMAMOTO K.; KIKUCHI, R.; SHOAIH HAMRAH, M.; NAKAYAMA, T.; WU CHENG, T.; MATSUSHITA, T.; NAKAMURA, S.; NIWA, T.; MUROHARA, T.; TAKESHITA, K. Xanthine oxidase inhibition by febuxostat attenuates stress-induced hyperuricemia, glucose dysmetabolism, and prothrombotic state in mice. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

YOU, Y. J.; KIM, J.; RAIZEN, D. M.; AVERY, L. Insulin, cGMP, and TGF- β Signals Regulate Food Intake and Quiescence in *C. elegans*: A Model for Satiety. **Cell Metabolism**, v. 7, p. 249-257, 2008.

YUAN, Y.; PAN, S.; YANG, S.; LIU, Y.; XU, Q. Antioxidant and cardioprotective effects of *Ilex cornuta* on myocardial ischemia injury. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, p. 94-104, 2017.

YUAN, H.; ZHENG, J. C.; LIU, P.; ZHANG, S. F.; XU, J. Y.; BAI, L. M. Pathogenesis of Parkinson's disease: oxidative stress, environmental impact factors and inflammatory processes. **Neuroscience Bulletin**, v.23, p. 125–130, 2007.

ZANANDREA, R.; ABREU, M. S.; PIATO, A.; BARCELLOS, L. J. G.; GIACOMINI, A. C. V. V. Lithium prevents scopolamine-induced memory impairment in zebrafish. **Neuroscience letters**, v. 664, p. 34-37, 2018.

ZATTA, P.; ZAMBENEDETTI, P.; KILYEN, H.; BEIJE, T. *In vivo* and *in vitro* effects of aluminum on the activity of mouse brain acetylcholinesterase. **Brain Research Bulletin**, v. 59, p. 41-45, 2002.

ZHANG, T.; YANG, M.; PAN, H.; LIS, S.; REN, B.; REN, Z.; XING, N.; QI, L.; REN, Q.; XU, S.; SONG, J.; MA, J. Does time difference of the acetylcholinesterase (AChE) inhibition in different tissues exist? A case study of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to cadmium chloride and deltamethrin. **Chemosphere**, v. 168, p. 908-916, 2017.

ANEXOS

ANEXO A- CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL (CEUA)



**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do potencial toxicológico do Alumínio em *Caenorhabditis elegans* e *Danio rerio*", protocolada sob o CEUA nº 2229110319, sob a responsabilidade de **Rosilene Rodrigues Kaizer Perin e equipe; Maicon Ody de Paula** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/IFRS) na reunião de 01/04/2019.

We certify that the proposal "Evaluation of aluminum toxicological potential in *Caenorhabditis elegans* and *Danio rerio*", utilizing 1500 Fishes (males and females), protocol number CEUA 2229110319, under the responsibility of **Rosilene Rodrigues Kaizer Perin and team; Maicon Ody de Paula** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal Institute of Rio Grande do Sul (CEUA/IFRS) in the meeting of 04/01/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [05/2019](#) a [03/2020](#)

Área: [Laboratório de Bioquímica E Biologia Molecular](#)

Origem: [Animais provenientes de estabelecimentos comerciais](#)

Espécie: [Peixes](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [0 a 7 meses](#)

N: [1500](#)

Linhagem: [Danio rerio \(zebrafish\)](#)

Peso: [2 a 5 g](#)

Resumo: O Al é abundante no meio ambiente, representando 8,8 % da crosta terrestre, encontrado em diferentes áreas, como na construção civil, transportes, tintas, explosivos químicos, medicina, cosmética e na indústria alimentar. Além disso, o sulfato de alumínio é utilizado como agente coagulante nas Estações de Tratamento de Água (ETA). No entanto, apesar da sua abundância, nenhuma conexão com uma função biológica útil foi descoberta. Porém estudos demonstraram que níveis elevados de Al são neurotóxicos, desenvolvendo uma maior propensão a diversas patologias como a Doença de Alzheimer (AD), sendo que esse metal pode alterar a fluidez de membranas biológicas, uma vez que seus sais são transferidos para o sistema vascular no sangue, na qual a maior parte do metal é ligada à transferrina, podendo entrar no sistema nervoso por meio do transporte através da barreira hematoencefálica. Este processo afeta os mecanismos bioquímicos, sendo assim de suma importância as análises toxicológicas, pois são responsáveis por detectar os danos causados pelos radicais livres (EROs) e quantificá-los podendo contribuir para reduzir o risco de doenças neurodegenerativas, relacionadas ao processo oxidativo. Dessa forma são utilizados organismos modelos para testes in vivo, que neste projeto são um nematódeo de solo *Caenorhabditis elegans* e o peixe *Danio rerio*, a escolha de ambos leva em consideração sua alta similaridade genética com o ser humano, fácil cultivo em laboratório e organismos modelos bem conceituados na literatura, em relação à exposição a metais, processos comportamentais e a DA. Sendo assim o objetivo desta proposta é avaliar o efeito toxicológico de concentrações de Alumínio, encontradas em riachos pertencentes à Bacia Hidrográfica da Corsan Erechim/RS, utilizando os organismos modelos *C. elegans* e *Danio rerio*.

Local do experimento: Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular - IFRS Câmpus Sertão.

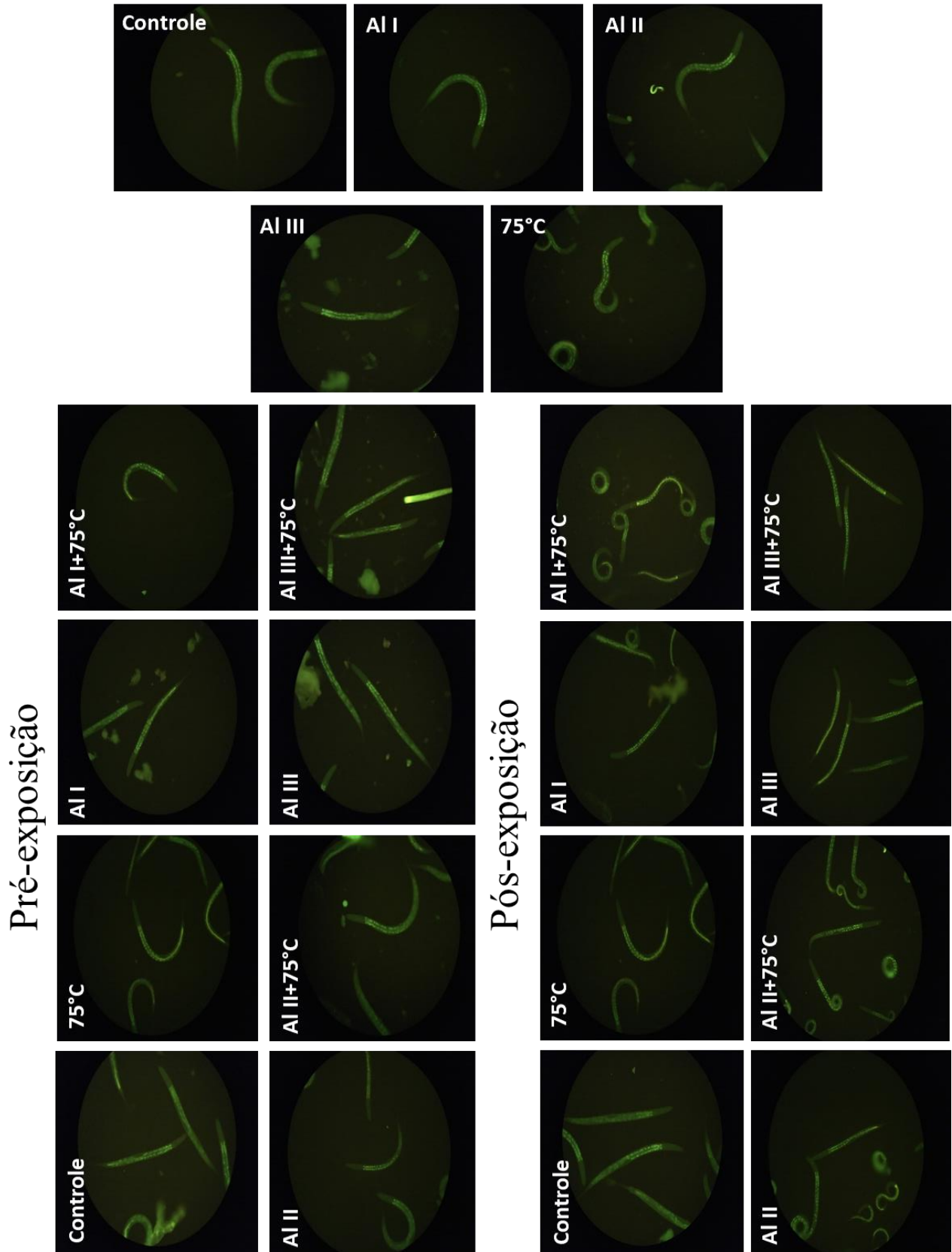
Sertão, 02 de abril de 2019

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

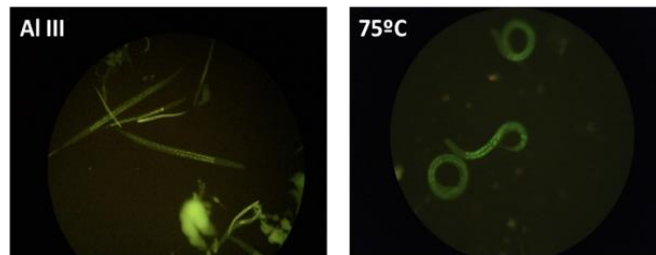
EXPOSIÇÃO AGUDA
 ANEXO B- FOTOS POR FLUORESCÊNCIA DA ENZIMA SOD EM

Per se

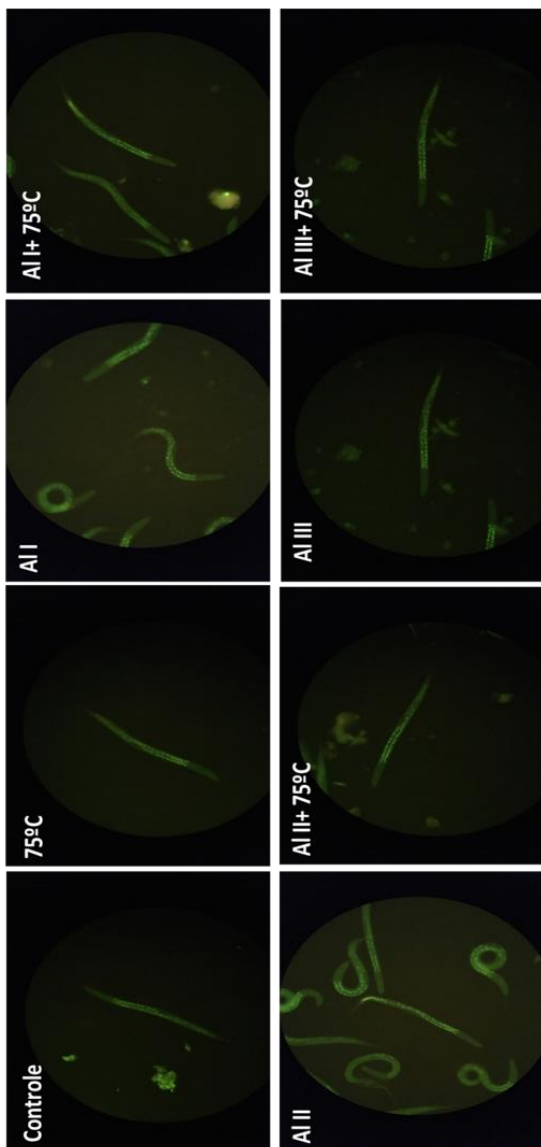


EXPOSIÇÃO AGUDA
 ANEXO B- FOTOS POR FLUORESCÊNCIA DA ENZIMA CAT EM *C.elegans*

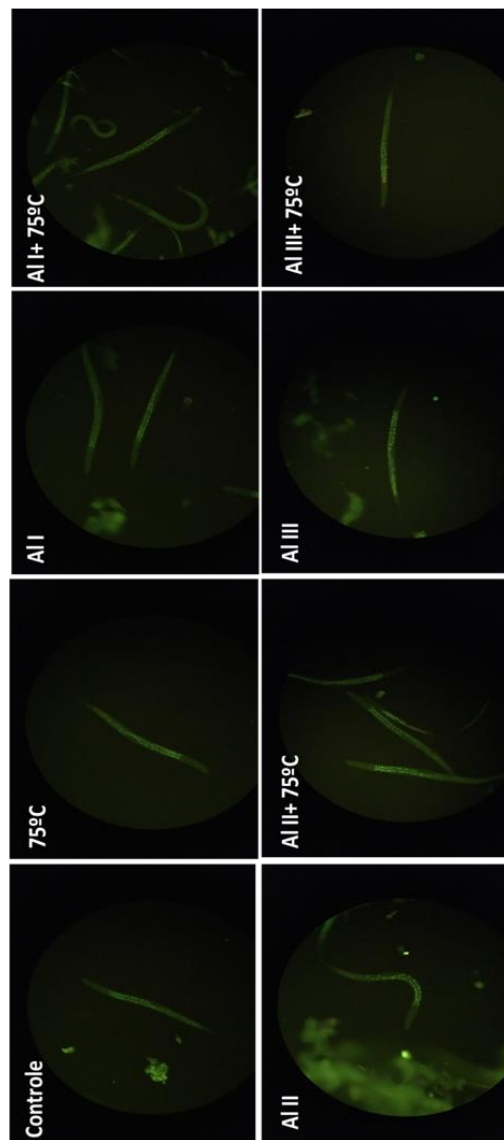
“Per-se”



Pré-exposição

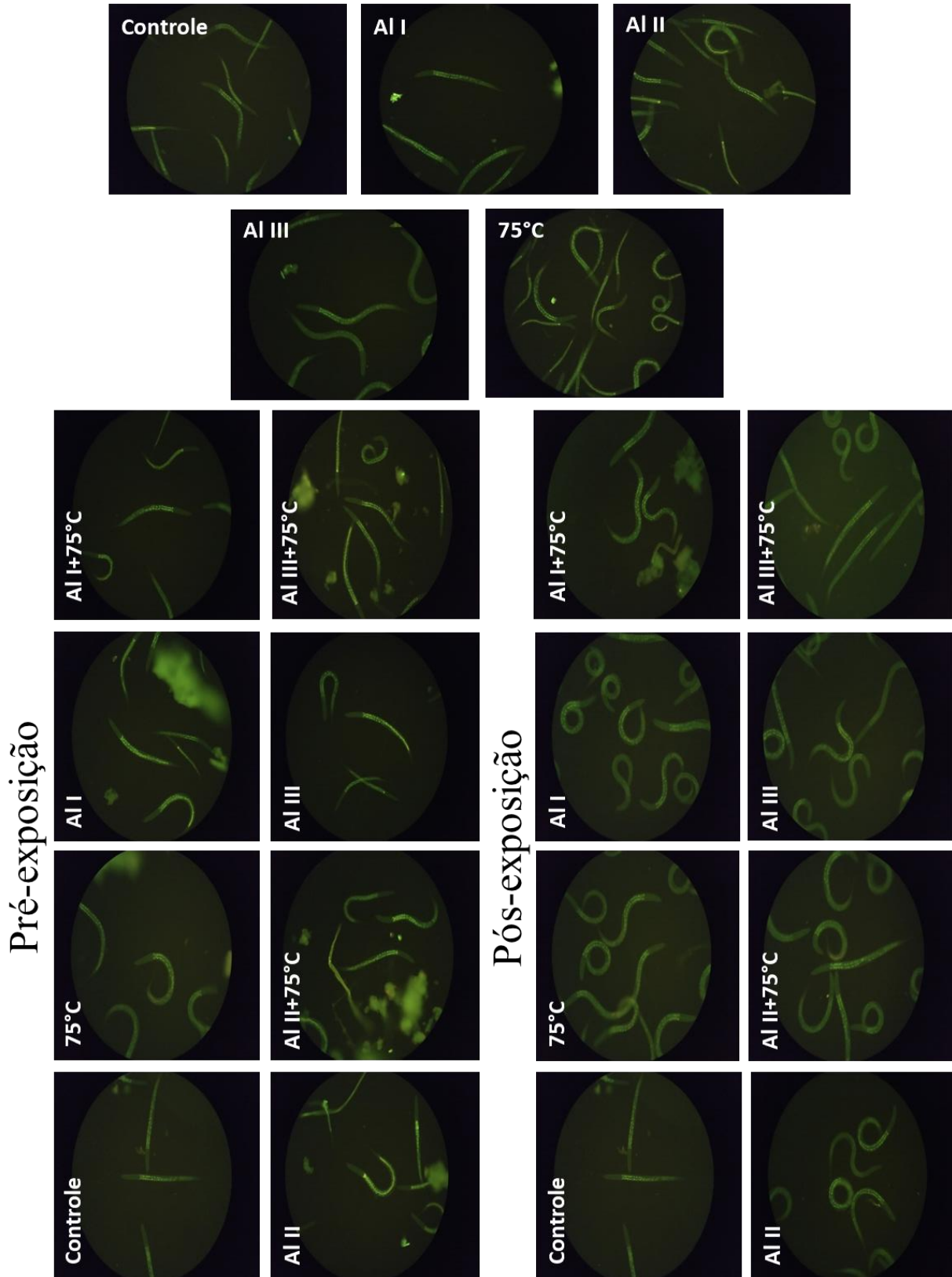


Pós-exposição

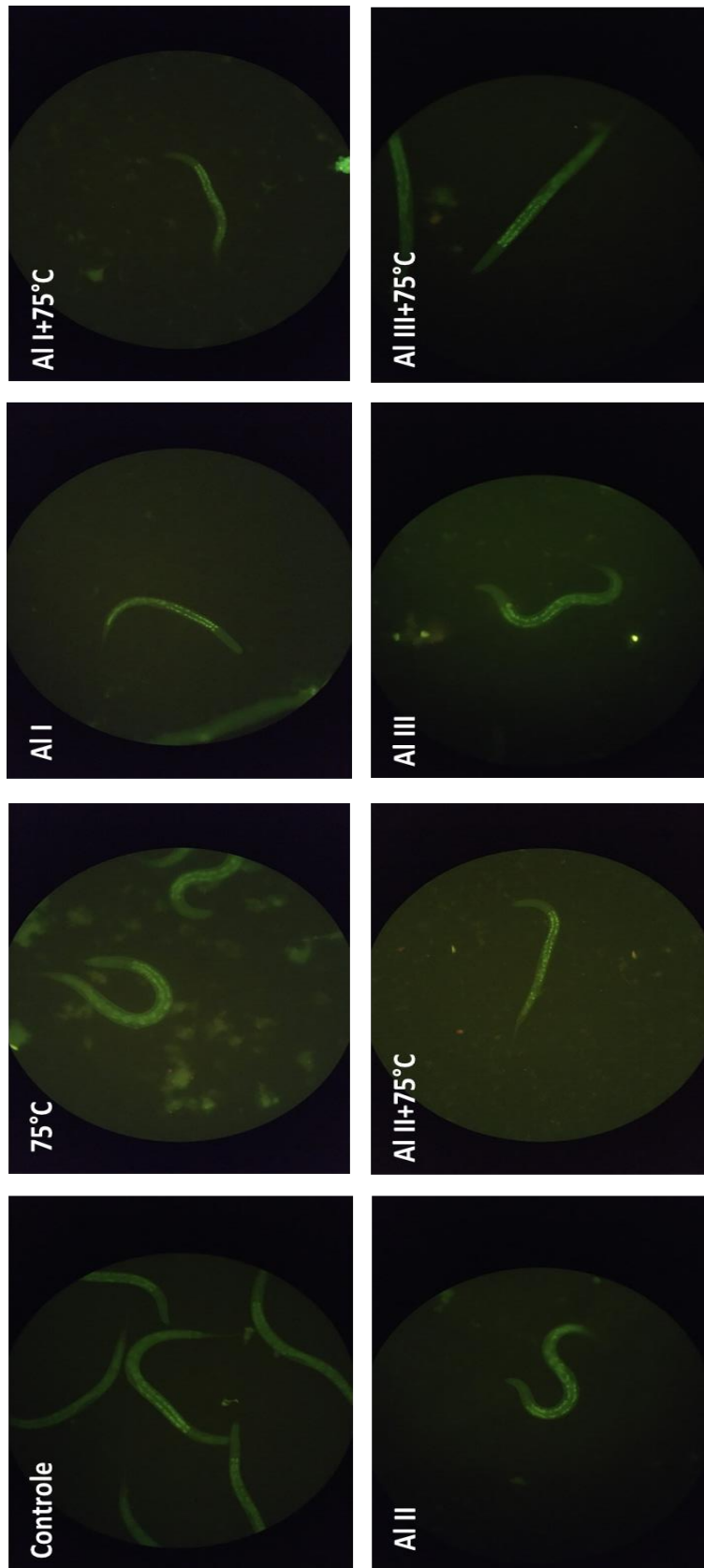


EM EXPOSIÇÃO AGUDA
 ANEXO B- FOTOS POR FLUORESCÊNCIA DA ENZIMA GST EM *C.elegans*

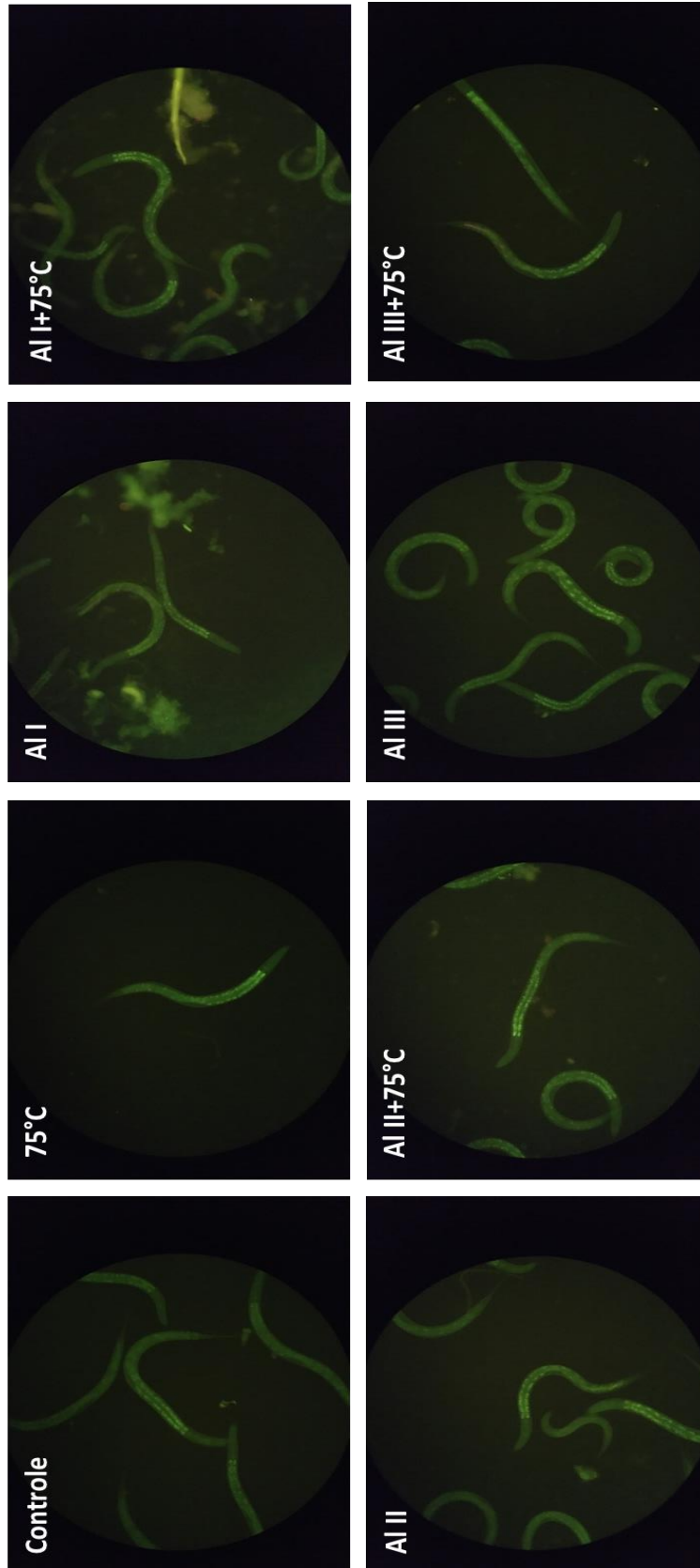
Per se



ANEXO C- FOTOS POR FLUORESCÊNCIA DA ENZIMA SOD EM *C.elegans*
EM EXPOSIÇÃO CRÔNICA



ANEXO C- FOTOS POR FLUORESCÊNCIA DA ENZIMA CAT EM *C.elegans*
EM EXPOSIÇÃO CRÔNICA



ANEXO C- FOTOS POR FLUORESCÊNCIA DA ENZIMA GST EM *C.elegans*
EM EXPOSIÇÃO CRÔNICA

