

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI
E DAS MISSÕES
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, EXTENSÃO E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA**

REGINA ORSO

EFEITO DE FRAÇÃO POLISSACARÍDICA EXTRAÍDA DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St.-Hil) NA REGENERAÇÃO DE PLANÁRIAS (*Girardia tigrina* Girard, 1850)

ERECHIM, FEVEREIRO DE 2020.

REGINA ORSO

EFEITO DE FRAÇÃO POLISSACARÍDICA EXTRAÍDA DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St.-Hil) NA REGENERAÇÃO DE PLANÁRIAS (*Girardia tigrina* Girard, 1850)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ecologia.

Linha de Pesquisa: Ambiente e Tecnologia.

Orientadora: Dr^a. Alice Teresa Valduga

Co-orientadora: Dr^a. Silvane Souza Roman

ERECHIM, FEVEREIRO DE 2020.

O76e Orso, Regina

Efeito de fração polissacarídica extraída da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. -Hil) na regeneração de planárias (*Girardia tigrina* Girard, 1850) / Regina Orso. - 2020. 36 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2020.

“Orientação: Profª Dra Alice Teresa Valduga, Profª Dra. Silvane Souza Roman”

1. Toxicologia 2. Erva-mate 3. Reparo celular 4. Polianilina 5. Modelo animal alternativo I. Título

C.D.U.: 633.77

Catálogo na fonte: bibliotecária Sandra Milbrath CRB 10/1278

REGINA ORSO

EFEITO DE FRAÇÃO POLISSACARÍDICA EXTRAÍDA DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St.-Hil) NA REGENERAÇÃO DE PLANÁRIAS (*Girardia tigrina* Girard, 1850)

BANCA EXAMINADORA

Dr.^a. ALICE TERESA VALDUGA (Orientador)

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim

Dr.^a. SILVANE SOUZA ROMAN (Co-Orientadora)

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim

Dr.^a. NESSANA DARTORA

Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Cerro Largo

Dr. LUIZ UBIRATAN HEPP

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim

Erechim, fevereiro de 2020.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, ao meu pai Remy, minha mãe Marinez e a minha irmã Monise.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida, por ter me dado saúde e força para conseguir chegar até aqui hoje, superando vários obstáculos e conseguindo alcançar meus objetivos.

Agradeço à minha família, pai Remy, mãe Marinez e irmã Monise, por todo o apoio e incentivo, e por todas as vezes que entenderam o motivo da minha ausência durante este período.

Agradeço à professora Alice, por estar agora finalizando mais uma etapa, por toda força, ajuda e apoio. E por todo crescimento que obtive.

Agradeço imensamente à minha madrinha Fernanda, por me escutar desabafar tantas vezes, por todo o apoio e ajuda, por estar sempre presente em todas etapas importantes da minha vida.

Agradeço de coração as minhas amigas, Angélica, Daniela (mesmo longe), Poliana e Tamara. Por confiarem em mim e na minha capacidade, por sempre estarem presentes, pelas tantas vezes que me ouviram desabafar, e por me acalmar em momentos de desespero. Sem vocês eu não conseguiria.

Agradeço a Bruna Puton e Itamar Gonçalves, pela ajuda incansável na obtenção de resultados e estrutura do manuscrito.

Agradeço a Edivania, por toda ajuda e apoio na realização do experimento e construção deste trabalho, além de tudo, obrigada pela grande amizade que construímos.

Agradeço ao PPG em Ecologia da URI, coordenação do curso, aos funcionários da secretaria pela atenção e auxílio. E a CAPES, pela bolsa ofertada.

Aos colegas do mestrado e do laboratório, obrigada pela amizade e por todo auxílio prestado.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcuta)

EFEITO DE FRAÇÃO POLISSACARÍDICA EXTRAÍDA DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St.-Hil) NA REGENERAÇÃO DE PLANÁRIAS (*Girardia tigrina* Girard, 1850)

Autor: Regina Orso
Orientadora: Alice Teresa Valduga
Co-orientadora: Silvane Souza Roman
Data da Defesa: 20 de fevereiro de 2020

RESUMO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil; Aquifoleacea) é uma espécie nativa da América do Sul, processada e consumida principalmente na forma de infusão, apresentando várias propriedades biológicas e nutricionais. Sua composição química tem sido explorada, e desta forma a espécie tem ganhado destaque no cenário internacional. Algumas aplicações já foram constatadas e o consumo da espécie vem se ampliando, sendo utilizada de outras formas além das infusões. Para o estudo da toxicidade dos metabólitos é utilizado um modelo animal para poder testar seus efeitos, portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da fração polissacarídica, isolada da erva-mate, na regeneração da *Girardia tigrina*. A amostra da erva-mate foi obtida de uma planta matriz (27° 37' 15''S; 52° 22' 47'' W; altitude: 687m), em janeiro de 2014. O material foi seco a 35°C em estufa com circulação de ar. O extrato aquoso foi obtido por Soxhlet, e deste extrato foi isolada a fração polissacarídica confirmada por espectroscopia no infravermelho. Esta fração foi utilizada em diferentes concentrações, de acordo com o planejamento fatorial, na solução salina de meio de cultura para o desenvolvimento da *G. tigrina*. As porções da planária foram fotografadas diariamente durante 30 dias, e após, as fotos foram analisadas e expressas em pixels e os valores médios foram comparados em relação ao controle usando ANOVA seguida pelo teste de *Tukey*. Os resultados obtidos indicam que a concentração de 10mg/L da fração polissacarídica, teve um efeito positivo na regeneração das três porções (cabeça, faringe e cauda) da *G. tigrina*. No entanto, a maior concentração utilizada nos ensaios (60mg/L), apresentou certo nível de toxicidade para as porções de cabeça e cauda, causando desintegrações em algumas porções, na porção mediana, a regeneração foi menor que a observada na concentração de 10mg/L, porém, semelhante ao teste controle. O estudo mostra que a fração polissacarídica obtida da erva-mate, em determinadas concentrações, pode favorecer a regeneração de porções lesionadas ou amputadas de *G. tigrina*. Desta forma, constata-se a possível aplicação do polissacarídeo extraído da erva-mate, na área de engenharia de regeneração de tecidos.

Palavras-chave: toxicologia; mate; reparo celular; modelo animal alternativo.

EFFECT OF EXTRACTED POLYSACCHARIDARY FRACTION FROM YERBA-MATE
(*Ilex paraguariensis* St.-Hil) ON PLANARY REGENERATION (*Girardia tigrina* Girard,
1850)

Author: Regina Orso
Advisors: Alice Teresa Valduga
Silvane Souza Roman
Presentation Date: 20 February 2020

ABSTRACT

Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil; Aquifoleacea) is a species native to South America, processed and consumed mainly in the form of infusion, presenting several biological and nutritional properties. Its chemical composition has been explored, and in this way the species has gained prominence in the international scenario. Some applications have already been verified and the consumption of the species has been increasing, being used in other ways besides infusions. To study the toxicity of metabolites, an animal model is used to test its effects, therefore, the aim of the present study was to evaluate the effect of the polysaccharide fraction, isolated from yerba mate, in the regeneration of *Girardia tigrina*. The yerba mate sample was obtained from a matrix plant (27 ° 37 '15" S; 52 ° 22 '47" W; altitude: 687m), in January 2014. The material was dried at 35°C in an oven with air circulation. The aqueous extract was obtained by Soxhlet, and from this extract the polysaccharide fraction confirmed by infrared spectroscopy was isolated. This fraction was used in different concentrations, according to the factorial design, in the saline solution of culture medium for the development of *G. tigrina*. The portions of the planaria were photographed daily for 30 days, and afterwards, the photos were analyzed and expressed in pixels and the average values were compared in relation to the control using ANOVA followed by the Tukey test. The results obtained indicate that the concentration of 10mg / L of the polysaccharide fraction, had a positive effect on the regeneration of the three portions (head, pharynx and tail) of *G. tigrina*. However, the highest concentration used in the tests (60mg / L), presented a certain level of toxicity for the head and tail portions, causing disintegration in some portions, in the median portion, the regeneration was lower than that observed in the concentration of 10mg / L. L, however, similar to the control test. The study shows that the polysaccharide fraction obtained from yerba mate, in certain concentrations, may favor the regeneration of injured or amputated portions of *G. tigrina*. Thus, it is possible to verify the possible application of the polysaccharide extracted from yerba mate, in the area of tissue regeneration engineering.

Key-word: toxicology; kill; cell repair; alternative animal model.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Perfil de regeneração dos fragmentos de cabeça (A) faringe (B) e cauda (C) de planárias tratadas com a fração polissacarídica de erva-mate (10mg/L, 20mg/L e 60mg/L) monitorados por 30 dias. Os dados apresentados são a média das medições realizadas em três experimentos.....26
- Figura 2:** - Comparação da área corporal em planárias originárias da cabeça (A), faringe (B) e cauda (C) após 30 dias (t = 30 dias). * p <0,05 em relação ao controle segundo ANOVA seguido pelo teste de Tukey.....28
- Figura 3:** Em (A) planária originária da faringe do grupo controle em t = 30 dias e em (B) planária originária da faringe do grupo exposto à fração polissacarídica em 10 mg / L em t = 30 dias.....28
- Figura S1:** Espectro de FT-IR (ATR) da fração de polissacarídeo.....35
- Figura S2** - Perfil de regeneração dos fragmentos de cabeça (A) faringe (B) e cauda (C) de planárias tratadas com a fração polissacarídica de erva-mate (0,6 mg/L, 1 mg/L e 2 mg/L) monitorados por 30 dias.....36

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2.0 OBJETIVO E ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	16
REFERÊNCIAS.....	17
3.0 CAPÍTULO	22
EFEITO DE FRAÇÃO POLISSACARÍDICA EXTRAÍDA DA ERVA-MATE (<i>Ilex paraguariensis</i> St.-Hil) NA REGENERAÇÃO DE PLANÁRIAS (<i>Girardia tigrina</i> Girard, 1850).....	23
1. Introdução.....	23
2. Experimento.....	24
2.1 Planárias.....	24
2.2 Extração da fração polissacarídica.....	25
2.3 Efeito da fração polissacarídica na regeneração de <i>G. tigrina</i>	25
2.4 Análise Estatística.....	25
3. Resultados e Discussão.....	26
CONCLUSÃO.....	30
AGRADECIMENTOS.....	30
REFERÊNCIAS.....	30
4.0 CONCLUSÃO GERAL.....	34
5.0 ANEXOS.....	35

1.0 INTRODUÇÃO GERAL

Desde a antiguidade até os dias atuais, as plantas foram utilizadas com interesse terapêutico. Muitas substâncias isoladas de plantas continuam sendo fontes de medicamentos como, por exemplo, os glicosídeos cardiotônicos obtidos da *Digitalis lanata* (popularmente conhecida como ‘dedaleira’) usados para insuficiência cardíaca (FOGLIO, et al, 2006). Os estudos fitoquímico de plantas medicinais envolvem não somente a identificação de drogas vegetais por características morfológicas e anatômicas, mas também o estudo de sua origem e forma de produção, controle de qualidade, composição química, elucidação estrutural e conhecimento das propriedades físico-químicas das substâncias ativas, bem como o estudo de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas (DARTORA, 2014).

A biodiversidade do Brasil é a maior do mundo, com um grande potencial para a pesquisa e a exploração na área de plantas medicinais, com mais de 50 mil espécies catalogadas (ALVES et al., 2000; GASPARRI, 2005) sendo que dentre estas se encontra a *Ilex paraguariensis* (erva-mate). Estima-se uma biota brasileira conhecida de 170.000 a 210.000 espécies (LEWINSOHN; PRADO, 2005). A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St-Hill) é uma espécie nativa extensivamente cultivada na região sul do Brasil, na Argentina e no Paraguai (HAO et al., 2013). Os sistemas de cultivo ocorrem principalmente na forma de monocultura e, também com reposição em sistemas agroflorestais. Folhas e ramos de erva-mate são processados e consumidos principalmente na forma de infusão, no processamento, a erva-mate passa pelo sapeco, efetuado em temperatura elevada, buscando inativação enzimática. A secagem é realizada próxima aos 100°C para em seguida ocorrer à trituração (VALDUGA; BATTESTIN; FINZER, 2003).

A espécie apresenta grande participação na economia nacional, com destaque nos estados do sul do país, que são considerados os principais produtores e consumidores (RESENDE et al., 2000; VIDOR; RUIZ; MORENO, 2002). A erva-mate também possui uma importância social, onde é comercializada por pequenos agricultores e contribui para a fixação do homem no campo (VIDOR; RUIZ; MORENO, 2002). A exploração da erva-mate consiste em uma atividade agrícola importante e representa um auxílio no equilíbrio dos ecossistemas locais, pois aceita o sistema de consorciação com outras espécies e ajuda a conservar a diversidade biológica local (PASINATO, 2004).

O uso da erva-mate já é conhecido desde os primórdios da ocupação do Paraguai, onde os jesuítas e índios guaranis faziam uso de suas folhas (REITZ & EDWIN, 1967). Estas, já processadas são consumidas principalmente na forma de chimarrão (infusão com água quente), tererê (infusão à frio) e chá mate (extrato de água quente de folhas tostadas) (KUNDEL et al., 2018). Porém existem outros produtos no mercado feitos da erva-mate, como chás misturados, chá aromatizado, chás gelados e cosméticos que usam extratos de *I. paraguariensis* (MOSELE, 2002).

Algumas das substâncias presentes na erva-mate, são responsáveis por propriedades bioativas, e apresentam benefícios a saúde relacionados a vários efeitos, dentre eles: efeitos anti-inflamatório (LANZETTI et al., 2008), antioxidante (FILIP et al., 2000; GULLÓN et al., 2018), anti-obesogênico (ANDERSEN; FOGH 2001; ARÇARI et al., 2011), antimutagênico (KAEZER et al., 2012), antibacteriano (COSTA; RACANICCI; SANTANA, 2017), antiviral (LÜCKEMEYER et al., 2012), hipoglicemiante (RIACHI; MARIA, 2017), cardio-proteção (SCHINELLA; FANTIRELLI; MOSCA, 2005) e no trato digestivo (GORZALCZANY et al., 2001). Devido a esse conhecimento, a espécie vem sendo consumida além dos seus locais de origem, sendo utilizados na produção de fitoterápicos (MOSELE, 2002), bem como, no desenvolvimento de novos produtos alimentícios, de limpeza e higiene (DALLABRIDA et al., 2016).

Nas últimas décadas, a erva-mate vem sendo estudada, reportando seu efeito gastro-protetivo em úlceras induzidas por etanol (MARIA-FERREIRA et al., 2013), efeito antineoplásico *in vitro*, em células cancerosas de cólon (PUANGPRAPHANT; BERHOW; MEJIAMATE, 2011) cardioprotetor (SCHINELLA; FANTIRELLI; MOSCA, 2005) e efeito anti-inflamatório (BLUM-SILVA et al., 2016; ARÇARI et al., 2011), o que indica seu potencial terapêutico.

Uma grande diversidade de metabólitos secundários é encontrada em folhas de erva-mate, envolvendo saponinas, metilxantinas e compostos fenólicos, como ácidos fenólicos e flavonoides (HAO et al., 2013). Compostos fenólicos apresentam em sua estrutura sistemas insaturados conjugados, característica que condiciona capacidade de absorção da radiação ultravioleta e visível (GUARATINI et al., 2007), enquanto que metabólitos primários como polissacarídeos têm sido associados ao reparo celular (DARTORA, 2014). Existem numerosas investigações relacionadas aos efeitos biológicos de metabólitos desta planta (VALDUGA; GONÇALVES, 2014). A infusão da erva-mate, na medicina popular, vem

sendo usada para o tratamento de distúrbios hepáticos e digestivos, artrite, reumatismo, entre outras doenças inflamatórias (BRACESCO et al., 2011)

Nas plantas, a parede celular é altamente organizada, ela confere resistência e forma para a célula, rigidez para a planta toda, controla o crescimento celular, participa na comunicação célula-célula e protege a célula contra o ataque de patógenos e predadores (BRETT; WALDRON, 1990), a parede celular contém muitos polissacarídeos, proteínas e compostos aromáticos. Os polissacarídeos são os principais componentes da mesma, destacando-se as pectinas, hemiceluloses e celulose (MCCANN, 2001).

Polissacarídeos possuem um papel importante no desenvolvimento e crescimento de organismos vivos, são organismos naturais que podem ser isolados de animais, fungos, algas superiores e plantas (WANG et al., 2018). Estudos das propriedades de polissacarídeos extraídos de plantas, estão sendo intensificados, pois exibem várias atividades biológicas, incluindo efeitos anticoagulantes, antioxidantes, dentre outros (LIU, et al., 2018). Segundo Yapo (2011), são conhecidos oito tipos de polissacarídeos pécnicos obtidos de plantas, sendo eles, homogalacturonano (HG), ramnogalacturonano-I (RG-I), ramnogalacturonano-II (RG-II), xilogalacturonano (XGA), apiogalacturonano (ApGA), galacturonogalacturonano (gaga), galactogalacturonano (GGA), e arabinogalacturonano (ArGA). A descoberta de propriedades farmacológicas de polissacarídeos, obtidos de plantas, fez aumentar o interesse na investigação de seus usos (YAPO, 2011; WANG et al., 2018).

Nas últimas décadas, vem sendo estudado as propriedades de polissacarídeos extraídos de extratos vegetais. Polissacarídeos isolados de plantas medicinais, certamente, terão uma perspectiva brilhante no campo de alimentos e produtos farmacêuticos, pois, exibem várias atividades biológicas, incluindo efeitos anticoagulantes, antioxidantes, radioprotetores, antiplaquetários, antitussígenos e broncodilatadores (LIU, et al., 2018). Estas atividades tem sido exploradas em diferentes modelos animais, dentre eles, ratos e camundongos (DARTORA, 2014; TAMURA et al., 2013).

O uso de planárias como modelo animal em testes farmacológicos vem sendo abordado em diversos estudos, mostrando assim, a sua importância como uma espécie bioindicadora. (WU; CHEN; LI, 2012; BARROS et al., 2006; PRÁ et al., 2005). Planárias são animais triblásticos invertebrados, da classe Turbellaria do filo Platyhelminthes, acelomados, com hábitos bentônicos, habitando superfície inferior de macrófitas aquáticas, evitando a claridade, sem presença de sistema circulatório, respiratório ou esquelético (KNAKIEVICZ, 2014). As planárias possuem um sistema nervoso centralizado (gânglios

cefálicos e processos do cordão nervoso), e neurotransmissores múltiplos incluindo glutamato, dopamina, serotonina, acetilcolina e GABA (BUTTARELLI; PELLICANO; PONTERI, 2008; NISHIMURA et al., 2010, VYAS et al., 2011). Reproduzem-se sexualmente como hermafroditas ou assexuadamente por fissão transversal (SALÓ, 2006). A reprodução sexuada desta ordem produz ovos que ficam envolvidos por uma cápsula dura e cimentada a substratos. Os ovos eclodem na primavera com a elevação da temperatura da água (RIBEIRO e UMBUZEIRO, 2014).

Acredita-se que as planárias representam o primeiro tipo de organismo que possui cefalização (PAGÁN, 2014; OKAMOTO; TAKEUCHI; AGATA, 2005) apresentando células pluripotentes (UMESONO et al., 2011). As planárias possuem uma capacidade extraordinária de se regenerar. Isso envolve a geração de novos tecidos no local da ferida por processos que incorporam a proliferação celular (formação de blastema) e remodelação de tecidos pré-existentes para restaurar a simetria e a proporção da planária, consistindo em excelentes modelos de laboratório (ZEWDE et al., 2018). A partir de um pequeno pedaço, regeneraram-se, dando origem a todos os tipos de células, incluindo os neurônios. As respostas farmacológicas observadas nas planárias revelam a considerável conservação evolutiva, nos níveis moleculares e funcionais, de proteínas e vias de sinalização presentes em diferentes órgãos e sistemas em todo filo (RAFFA & RAWLS, 2008).

Nas planárias, a cavidade digestiva é geralmente de fundo cego, sendo a boca, equipada com faringe protraível, usada tanto para ingestão quanto para egestão (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005). Esses organismos são principalmente carnívoros e predam invertebrados (protozoários, rotíferos, larvas de insetos, crustáceos, lesmas e anelídeos). Enzimas proteolíticas auxiliam na perfuração do corpo da presa, e o conteúdo parcialmente digerido é liquefeito e bombeado para o interior do trato digestivo pela peristalse faríngea. As planárias liberam o excesso de água e, provavelmente, outros resíduos metabólicos usando os protonefrídeos, que estão espalhados por todo o corpo.

A perda de tecido após lesão é uma ameaça fundamental para todos os agentes de organismos multicelulares. Enquanto a cicatrização de feridas é uma primeira resposta geral para evitar mais danos e invasão de patógenos, a capacidade de induzir a restauração completa e sem cicatriz de partes do corpo perdidas são menos comuns. Ainda, habilidades regenerativas ocorrem em espécies de todo o reino animal, variando de restauração da medula espinhal e coração, bem como regeneração de nadadeiras ou membros inteiros em peixes teleósteos e urodelos anfíbios, ao corpo inteiro e à regeneração bidirecional em

cnidários e platelmintos (ALVARADO, 2000; MATHEW et al., 2007; GALLIOT; GHILA 2010; NACU; TANAKA 2011; SEIFERT et al. 2012). Um dos fatores que auxiliam na regeneração de planárias, é a capacidade de se ajustar dinamicamente aos obstáculos externos, a espécie detecta e se adapta aos tecidos que precisam ser substituídos ou reparados (OWLARN; BARTSCHERER, 2016).

As planárias são facilmente reproduzidas em laboratório e estes pequenos platelmintos tem se mostrado importantes para testes toxicológicos e regenerativos, como bioindicadores de alteração ambiental (PAGÁN, 2017). Eles são um modelo popular em estudos na biologia regenerativa, e de baixo custo. A planária oferece vantagens sem precedentes, por causa de um poderoso conjunto de ferramentas fisiológicas, comportamentais e biológicas, bem como uma população adulta de células estaminais acessíveis e abundantes.

Dartora, (2014) avaliou atividades anti-inflamatória e antiúlcera de polissacarídeos extraídos de folhas de erva-mate, onde o polissacarídeo inibiu significativamente lesões gástricas induzidas por etanol em ratas. Neste sentido, o presente estudo destina-se a utilização da fração polissacarídica isolada de folhas de erva-mate no processo de regeneração da *Girardia tigrina*, bem como descobrir a toxicidade desta fração na espécie.

2.0 OBJETIVO E ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação tem como objetivo geral, avaliar o efeito da fração polissacarídica isolada de folhas de erva-mate sobre a regeneração da *Girardia tigrina*, bem como investigar sua possível toxicidade sobre este organismo.

A dissertação apresenta uma introdução geral, contendo informações conceituais sobre o tema do trabalho e um capítulo apresentado na forma de manuscrito. O capítulo 1, intitula-se “Efeito de fração polissacarídica extraída da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.-Hil) na regeneração de planárias (*Girardia tigrina* Girard, 1850)”. Este manuscrito foi preparado conforme as normas da revista “Chemical Biology & Drug Design”.

REFERÊNCIAS

- ALVARADO, A.S. **Regeneration in the metazoans: why does it happen?.** *Bioessays*, v. 22, n. 6, p. 578-590, 2000.
- ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JR., A.; ZANI, C. L. **Biological screening of brazilian medicinal plants.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.95, p. 367- 373, 2000.
- ANDERSEN, T., & FOGH, J. **Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients.** *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 14(3), 243-250, 2001.
- ARÇARI, D. P., BARTCHEWSKY JR, W., DOS SANTOS, T. W., OLIVEIRA, K. A., DEOLIVEIRA, C. C., GOTARDO, É. M., ... & RIBEIRO, M. L. **Anti-inflammatory effects of yerba maté extract (Ilex paraguariensis) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity.** *Molecular and cellular endocrinology*, 335(2), 110-115, 2011.
- BARROS, G.S.; ANGELIS, D.F.; FURLAN, L.T.; CORREA JUNIOR, B. **Utilização de planárias da espécie Dugesia (Girardia) tigrina em testes de toxicidade de efluente de refinaria de retróleo.** *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 1(1):67-70, 2006.
- BLUM SILVA, C. H.; Luz, A. B. G.; Nascimento, M. V. P. S.; Facchin, B. M. C.; Baratto, B.; Frode, T. S.; Sandjo, L. P.; Dalmarco, E. M.; Reginato, F. H. **Qualitative and quantitative analysis data of the major constituents of ilex paraguariensis leaves by UPLC-PDA and QTOF-MS.** *Data in Brief*, 8,295-299, 2016.
- BRACESCO, N., SANCHEZ, AG., CONTRERAS, V., MENINI, T., & GUGLIUCCI, A. **Recent advances on Ilex paraguariensis research: minireview.** *Journal of ethnopharmacology*, 136(3), 378-384, 2011.
- BRETT, C; WALDRON, K. **Estrutura da parede celular e as funções esqueléticas da parede.** Em *Fisiologia e Bioquímica das paredes celulares das plantas* (pp. 4-57). Springer, Dordrecht, 1990.
- BUTTARELLI, F.R.; PELLICANO, C.; PONTIERI, F.E. **Neuropharmacology and behavior in planarians: translations to mammals.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 147, n. 4, p. 399 408, 2008.
- COSTA, D. E. M., RACANICCI, A. M. C., & SANTANA, Â. P. **Antimicrobial activity of yerba mate (Ilex paraguariensis) extract against microorganisms isolated from chicken meat.** *Ciência Animal Brasileira*, 18, 2017.
- DALLABRIDA, V. R., DUMKE, C. I., MOLZ, S., FURINI, V., & GIACOMELLI, M. B. **O. Com erva-mate não se faz só chimarrão! Situação atual e perspectivas de inovação no setor ervateiro do Planalto Norte Catarinense.** *Desenvolvimento Regional em debate: DRd*, 6(2), 247-273, 2016.

DARTORA, N. **Caracterização estrutural de polissacarídeos de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e suas propriedades biológicas**, 2014.

FILIP, R., LOTITO, S. B., FERRARO, G., & FRAGA, C. G. **Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species**. Nutrition research, 20(10), 1437-1446, 2000.

FOGLIO, M. A., QUEIROGA, C. L., SOUSA, I. D. O., & RODRIGUES, R. A. F. **Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar**. Construindo a história dos produtos naturais, 7, 1-8, 2006.

GALLIOT, B; GHILA, L. **Cell plasticity in homeostasis and regeneration**. Molecular reproduction and development, v. 77, n. 10, p. 837-855, 2010.

GASPARRI, S. **Estudo das Atividades Antioxidante e Mutagênica/Antimutagênica induzidas pelo Extrato Vegetal de *Costus spicatus***. Dissertação Universidade Luterana do Brasil, Mestrado - Diagnóstico Genético e Molecular, Canoas, 2005.

GORZALCZANY, S., FILIP, R., DEL ROSARIO ALONSO, M., MIÑO, J., FERRARO, G. E., & ACEVEDO, C. **Choleretic effect and intestinal propulsion of ‘mate’ (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants**. Journal of Ethnopharmacology, 75(2-3), 291-294, 2001.

GULLÓN, B., EIBES, G., MOREIRA, M. T., HERRERA, R., LABIDI, J., GULLÓN, P. **Yerba mate waste: A sustainable resource of antioxidant compounds**. Industrial crops and products, 113, 398-405, 2018.

GUARATINI, T., CALLEJON, D. R., PIRES, D. C., LOPES, J. N. C., LIMA, L. M., GIANNELLA-NETO, D., LOPES, N. P. **Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa**. Química Nova, 32(3), 717-721, 2009.

HAO, D., GU, X., XIAO, P., LIANG, Z., XU, L., PENG, Y. **Research progress in the phytochemistry and biology of *Ilex* pharmaceutical resources**. Acta Pharmaceutica Sinica B, 3(1), 8-19, 2013.

KAEZER, A.R, AIUB, C.A.F. MAZZEI, J.L. RIBEIRO-PINTO, L.F.; FELZENSZVAL, I. **Antimutagenic effect and phenolic content of green and roasted yerba mate beverages in different packages available in the Brazilian market**. CyTA – Journal of Food, v. 10, n. 2, p. 144–151, 2012.

KNAKIEVICZ, T. **Planarians as invertebrate bioindicators in freshwater environmental quality: the biomarkers approach**. Ecotoxicol. Environ. Contam., v. 9, n. 1, p. 01-12, 2014.

KUNDEL, P. T., CORREA, V. G., CORRÊA, R. C., PERALTA, R. A., SOKOVIĆ, M., CALHELHA, R. C.; PERALTA, R. M. **Antioxidant and antimicrobial activities of a purified polysaccharide from yerba mate (*Ilex paraguariensis*)**. International journal of biological macromolecules, 114, 1161-1167, 2018.

LANZETTI M, BEZERRA FS, ROMANA-SOUZA B, BRANDO-LIMA AC, KOATZ VL, PORTO LC, VALENCA SS. **Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke.** *Nutrition*, v. 24, p. 375–381, 2008.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. **How many species are there in Brazil?** *Conservation Biology*, Boston, v. 19, n. 3, p. 619-624, 2005.

LIU, J.; BAI, R.; LIU, Y.; ZHANG, X.; KAN, J.; JIN, C. **Isolation, structural characterization and bioactivities of naturally occurring polysaccharide–polyphenolic conjugates from medicinal plants—A review.** *International Journal of Biological Macromolecules*. Volume 107, Part B, February 2018, Pages 2242-2250, 2018.

LÜCKEMEYER D.D, MÜLLER V.D, MORITZ M.I, STOCO P.H, SCHENKEL E.P, BARARDI C.R, REGINATTO F.H, SIMÕES C.M. **Effects of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.(Yerba Mate) on Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 Replication.** *Phytotherapy Research*, v. 26, p. 535–540, 2012.

MARIA-FERREIRA, D., DARTORA, N., DA SILVA, LM., PEREIRA, IT., DE SOUZA, LM., RITTER, DS., BAGGIO, C. H. **Chemical and biological characterization of polysaccharides isolated from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.** *International journal of biological macromolecules*, 59, 125-133, 2013.

MATHEW, L. K., SENGUPTA, S., KAWAKAMI, A., ANDREASEN, E. A., LÖHR, C. V., LOYNES, C. A., TANGUAY, R. L. **Unraveling tissue regeneration pathways using chemical genetics.** *Journal of Biological Chemistry*, 282(48), 35202-35210, 2007.

MCCANN, M. C., BUSH, M., MILIONI, D., SADO, P., STACEY, N. J., CATCHPOLE, G., WILSON, R. H. **Approaches to understanding the functional architecture of the plant cell wall.** *Phytochemistry*, 57(6), 811-821, 2001.

MOSELE, S.H. **Governance in the agribusiness chain of yerba-mate in the Alto-Uruguaí Riograndense.** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 211 p. Masters Dissertation, 2002.

NACU, E; TANAKA, E, M. **Limb regeneration: a new development?.** *Annual review of cell and developmental biology*, v. 27, p. 409-440, 2011.

NISHIMURA, K., KITAMURA, Y., TANIGUCHI, T., AGATA, K.. **Analysis of motor function modulated by cholinergic neurons in planarian *Dugesia japonica*.** *Neuroscience*, 168(1), 18-30, 2010.

OKAMOTO, K; TAKEUCHI, K; AGATA, K. **Neural projections in planarian brain revealed by fluorescent dye tracing.** *Zoological science*, v. 22, n. 5, p. 535-546, 2005.

OWLARN, S., & BARTSCHERER, K. **Go Ahead, Grow A Head! A Planarian's guide to anterior regeneration.** *Regeneration (Oxford, England)*, 3(3), 139–155. DOI:10.1002/REG2.56, 2016.

PAGÁN, O. R. **The first brain: the neuroscience of planarians**. Oxford University Press, USA, 2014.

PAGÁN, O. R. **Planaria: an animal model that integrates development, regeneration and pharmacology**. The International journal of developmental biology, v. 61, n. 8-9, p. 519-529, 2017.

PASINATO, R. **Aspectos etnoentomológicos, socioeconômicos e ecológicos relacionados à cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no município de Salto do Lontra, Paraná, Brasil**. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, 112p, 2004.

PRÁ, D.; LAU, A.H.; KNAKIEVICZ, T.; CARNEIRO, F.R.; ERDTMANN, B. **Environmental genotoxicity assessment of an urban Streamusing freshwater planarians**. Mutation Research, 585(2):79-85, 2005.

PUANGPRAPHANT, M.A.; BERHOW, E.G.; MEJIAMATE, (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) **saponins induce caspase-3-dependent apoptosis in human colon cancer cells in vitro**. Food Chemistry, 125, pp. 1171-1178, 2011.

RAFF, B.R and RAWLS, M.S. **Planaria: A Model for Drug Action and Abuse**. **Molecular biology intelligence unit**. Texas – USA p.112 ISBN 978-1-58706-332-9, 2008.

REITZ, P.R., EDWIN, G. **Aquifoliáceas : flora ilustrada catarinense**. Itajaí : R.Reitz,. 46 p. 1967.

RESENDE, M. D. V., STURION, J. A., DE CARVALHO, A. P., SIMEÃO, R. M., & FERNANDES, J. S. C. **Programa de melhoramento da erva-mate coordenado pela EMBRAPA: resultados da avaliação genética de populações, progênes, indivíduos e clones**. Embrapa Florestas-Circular Técnica (INFOTECA-E), 2000.

RIACHI, L. G., DE MARIA, C. A. B. **Yerba mate: An overview of physiological effects in humans**. *Journal of functional foods*, 38, 308-320. 2017.

RIBEIRO, A.R.; UMBUZEIRO, G.A. **Effects of a textile azo dye on mortality, regeneration, and reproductive performance of the planarian, *Girardia tigrina***. Environmental Sciences Europe, v. 26, n. 22, p. 1-8, 2014.

RUPPERT, E. E., FOX, R. S. & BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**, 7th ed. 2005.

SALÓ, E. **The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarians (*Platyelminthes*)**. Bioessays v. 28, p. 546-59, 2006.

SCHINELLA, G.; FANTINELLI, J.C.; MOSCA, S.M. **Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism**. Clinical Nutrition, v. 24, n. 3, p. 360-366, 2005

SEIFERT, A. W., KIAMA, S. G., SEIFERT, M. G., GOHEEN, J. R., PALMER, T. M., & MADEN, M. **Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice** (*Acomys*). *Nature*, 489(7417), 561, 2012.

TAMURA, A., SASAKI, M., YAMASHITA, H., MATSUI-YUASA, I., SAKU, T., HIKIMA, T., TABUCHI, M., MUNAKATA, H. E KOJIMA-YUASA, A., **O extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) evita lesões hepáticas induzidas por etanol em ratos**. *Journal of Functional Foods* , 5 (4), pp.1714-1723, 2013

UMESONO, Y., TASAKI, J., NISHIMURA, K., INOUE, T., & AGATA, K. **Regeneration in an evolutionarily primitive brain—the planarian *Dugesia japonica* model**. *European Journal of Neuroscience*, 34(6), 863-869., v. 34, n. 6, p. 863-869, 2011.

VALDUGA, A. T.; BATTESTIN, V.; FINZER, J. R. D. **Secagem de extratos de erva-mate em secador por atomização**. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 23, n. 2, p. 184-189, 2003.

VALDUGA, A. T.; GONÇALVES, I. L. **Erva-mate: progressos em pesquisas fitoquímicas/tecnológicas e considerações socioeconômicas**. In: Juliana Stffens; Geciane Toniazzo Backes; Alice Teresa Valduga. (Org.). *Processos Tecnológicos, Biotecnológicos e Engenharia de Processos em Alimentos*. 1ed.Edifapes: Erechim, , p. 103-115, 2014.

VIDOR, M. A., RUIZ, C. P., MORENO, S. V., & FLOSS, P. A. **Variabilidade genética em um ensaio de progênes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. *Ciência Rural*, 32(4), 583-587, 2002.

VYAS, C. A., RAWLS, S. M., RAFFA, R. B., & SHACKMAN, J. G. **Glutamate and aspartate measurements in individual planaria by rapid capillary electrophoresis**. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 63(1), 119-122, 2011.

WANG, M., ZHAO, S., ZHU, P., NIE, C., MA, S., WANG, N., ... & ZHOU, Y. **Purification, characterization and immunomodulatory activity of water extractable polysaccharides from the swollen culms of *Zizania latifolia***. *International journal of biological macromolecules*, 107, 882-890, 2018.

WU,J.P.;CHEN,H.C.;LI,M.H.. **Bioaccumulation and toxicodynamics of cadmium to freshwater planarian and the protective effect of N Acetylcysteine**. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 63(2):220-229, 2012.

YAPO, B. M. **Rhamnogalacturonan-I: a structurally puzzling and functionally versatile polysaccharide from plant cell walls and mucilages**. *Polymer Reviews*, 51(4), 391-413, 2011.

ZEWDE, A. M., YU, F., NAYAK, S., TALLARIDA, C., REITZ, A. B., KIRBY, L. G., & RAWLS, S. M. **PLDT (planarian light/dark test): an invertebrate assay to quantify defensive responding and study anxiety-like effects**. *Journal of neuroscience methods*, 293, 284-288, 2018.

3.0 CAPITULO 1.

EFEITO DE FRAÇÃO POLISSACARÍDICA EXTRAÍDA DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St.-Hil) NA REGENERAÇÃO DE PLANÁRIAS (*Girardia tigrina* Girard, 1850)

Regina Orso; Itamar Luís Gonçalves; Edivania Navarini Bampi; Bruna Maria Saorin; Luiz Ubiratan Hepp; Nessana Dartora; Silvane Souza Roman; Alice Teresa Valduga

Efeito de fração polissacarídica extraída da erva-mate (*Ilex Paraguariensis* St.-Hil) na regeneração de planárias (*Girardia tigrina* Girard, 1850)

Regina Orso^a; Itamar Luís Gonçalves^{b*}; Edivania Navarini Bampi^c; Bruna Maria Saorin^d; Luiz Ubiratan Hepp^a; Nessana Dartora^e; Silvane Souza Roman^a; Alice Teresa Valduga^a.

^aPrograma de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim-RS, Brazil; ^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brasil; ^cDepartamento de Ciências Biológicas, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim-RS, Brasil; ^d Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim-RS, Brasil; ^eDepartamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal da Fronteira Sul Campus Cero Largo, Cero Largo-RS, Brasil.

Highlights

- Polissacarídeo de erva-mate na regeneração

Resumo: O presente estudo avaliou a atividade regenerativa de uma fração do polissacarídeo extraído de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) usando planárias como modelo (*Girardia tigrina*). A concentração de 10 mg/L, melhorou a regeneração da cabeça, faringe e cauda da *G. tigrina*. Ao final de 30 dias, a 10 mg/L, as planárias obtiveram um tamanho 22% -72% maiores que o grupo controle. As partes das planárias expostas a maior concentração utilizada (60mg/mL), mostrou sinais de toxicidade, produzindo desintegração de alguns organismos. Assim, a fração polissacarídica apresentou grande potencial para melhorar a regeneração de segmentos das planárias, destacando seu potencial no uso em regeneração de tecidos.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*; polissacarídeo; toxicidade; regeneração; planárias.

1.Introdução

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) é uma planta originária da América do Sul e é intensamente investigada devido à sua composição fitoquímica (Valduga, Gonçalves, Magri, & Delalibera Finzer, 2019). Esta planta é consumida principalmente pela infusão de suas folhas e há interesse em inserir seus extratos em vários alimentos, como o queijo (Faion et al., 2015), chocolate (Zanchett, Mignoni, Barro, & Rosa, 2016), bebidas oxidadas (Molin et al., 2014; Molin et al., 2011), iogurte (Preci et al., 2011) e outros.

Entre os metabólitos mais interessantes presentes em suas folhas estão compostos fenólicos (flavonóides e ácidos clorogênicos), metilxantinas (cafeína e teobromina) e saponinas (Valduga et al., 2019). Nos últimos anos, atenção especial tem sido focada nos metabólitos primários presente nas folhas de erva-mate e sua distribuição em diferentes plantas de erva-mate (Valduga, Gonçalves, Dartora, Mielniczki-Pereira, & Souza, 2016). Entre os metabólitos primários, os polissacarídeos têm um papel metabólico e estrutural significativo nas plantas, estando envolvido no metabolismo da energia, bem como na arquitetura estrutural da parede celular. Este grupo de biomoléculas é um material natural

abundante, biocompatível e biodegradável, além de possuir propriedades distintas como hidrofobicidade, resistência mecânica e estabilidade. Também é o material de partida para a fabricação de hidrogel. Hidrogéis à base de polissacarídeos mostrou potencial na cicatrização de feridas e na engenharia de tecidos (Zhu et al., 2019). Polissacarídeos como alginato, celulose, quitosana e ácido hialurônico são aplicados em produtos farmacêuticos, formulações para a cicatrização de feridas infectadas, como foi comprovado em modelos animais e ensaios clínicos (Ribeiro et al., 2020).

A investigação inicial do polissacarídeo da fração de erva-mate começou com o isolamento e caracterização de um ramnogalacturonano da extração aquosa de suas folhas (Dartora et al., 2013). As investigações mostraram o efeito desse fármaco em sepse (Dartora et al., 2013), lesão gástrica em ratos induzida por etanol (Maria-Ferreira et al., 2013), efeitos antimicrobianos e antioxidantes *in vitro* (Kungel et al., 2018).

Planárias são pequenos invertebrados platemintos que vivem em ecossistemas de água doce (Stocchino, Sluys, Harrath, Mansour e Manconi, 2019). Este organismo é usado em investigações ligadas à regeneração, devido à sua capacidade de produzir um organismo novo e completo a partir de fragmentos (Wenemoser e Reddien, 2010). Tem sido utilizado em estudos neurofarmacológicos concentrando-se principalmente no comportamento de dependência de drogas devido à presença de neurotransmissores (Baker, Deats, Boor, Pruitt e Pagán, 2011; Pagan, 2017; Pagán, 2014; Pagán et al., 2008; Raffa, 2008), bem como em investigações toxicológicas (Pagán, Coudron e Kaneria, 2009; Pagán, Rowlands e Urban, 2006; Van Huizen, Tseng e Beane, 2017) e monitoramento ambiental (Wu & Li, 2018). O uso da planaria está associado às suas vantagens únicas, que incluem: (i) fácil e barata manutenção em laboratório, (ii) maior número de organismos em ensaios, possibilitando resultados a serem obtidos, (iii) maior número de ensaios farmacológicos pode ser realizado e (iv) o uso de um animal inteiro em vez da cultura celular (Pagan, 2017).

Apesar de existirem numerosos estudos farmacológicos sobre os efeitos dos extratos, uma propriedade biológica pouco investigada é seu possível efeito sobre regeneração de tecidos. De acordo com o nosso conhecimento, não há publicações que relatem a ação sobre a cura. Considerando essa falta de dados na literatura e a capacidade especial de regeneração encontrada em planárias, o objetivo da presente pesquisa foi investigar o efeito da fração de polissacarídeo isolada das folhas de erva-mate na regeneração das planárias.

2. Experimento

2.1 Planárias

As planárias foram gentilmente doadas por Dra. Suzana Bencke Amato (Departamento de Zoologia Universidade Federal do Rio Grande do Sul) e mantida em recipientes retangulares de plástico medindo 30 x 15 x 10 cm com água deionizada e sais inorgânicos (NaHCO₃ 0,024g / L; CaSO₄ 0,018 g / l; MgSO₄ 0,030 g / L; e KCl 0,001g/L), constituindo 1/3 do volume do destinatário. Os recipientes foram mantidos a 23°C no escuro e as planárias foram alimentados com pequenos cubos de fígado bovino uma vez por semana durante 1,5 horas. Após esse processo, os alimentos foram removidos e a solução iônica substituída.

2.2 Extração da fração polissacarídica

O material vegetal foi coletado na cidade de Barão de Cotegipe em janeiro de 2014 (Valduga et al., 2016). Folhas com pecíolos foram coletadas de uma colheita homogênea a pleno sol. As folhas foram secas a peso constante (teor de umidade inferior a 5%) a 35°C em estufa com circulação de ar e depois foram triturados e peneirados (2mm). A fração polissacarídica foi isolada de acordo com a metodologia publicada anteriormente (Kungel et al., 2018). As folhas (100 g) foram submetidas à extração aquosa (500mL) em um extrator Soxhlet por um período de 6 horas. Os extratos foram evaporados para um volume menor e maior peso molecular. Os componentes foram então precipitados por adição de etanol frio (3 volumes) e separados por centrifugação (8000 rpm a 4°C x 20 min). Os sedimentos foram então dissolvidos em água, dialisados contra água da torneira por 48h para remover os demais compostos de baixo peso molecular, produzindo uma fração bruta de polissacarídeo. Isso foi três vezes congelado e descongelado em temperatura ambiente, produzindo polissacarídeos solúveis e frações insolúveis, que foram separadas por centrifugação como descrito acima. A fração solúvel foi então liofilizada para obter a fração de polissacarídeo usada em ensaios biológicos. Posteriormente, a presença de erva-mate fração de polissacarídeo foi confirmada por espectroscopia de infravermelho usando um ATR espectrofotômetro Spectrum BXII ATR de Perkin Elmer.

2.3 Efeito da fração polissacarídica na regeneração de *G. trigrina*

Planárias de tamanho semelhante foram anestesiadas previamente, colocando-as no gelo e depois fragmentadas em três partes: cabeça, faringe e cauda. Os fragmentos foram dispostos em Placas de Petri com solução iônica previamente preparada e exposta à fração de polissacarídeo em concentrações de 0,6 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L no primeiro ensaio, e após 10 mg/L, 20 mg/L e 60 mg/L. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e foram utilizados planárias expostas apenas a solução como controle. Todos os dias, durante 30 dias, todas as placas de Petri eram fotografadas. A área de cada animal foi medida usando o software AxioVision SE64. O valor da área foi representado em pixels quadrados. Durante os 30 dias de investigação, todos os fragmentos foram alimentados uma vez por semana com pequenas porções de fígado bovino.

2.4 Análise estatística

Os valores médios da área corporal de cada ensaio foram plotados contra o tempo (t) do experimento no software GraphPad Prism 6.0. Os valores médios da área corporal foram comparados em t = 30 dias usando ANOVA seguido pelo teste de Tukey, considerando $p < 0,05$ como significativo.

3 Resultados e discussão

A fração polissacarídica foi isolada com rendimento de 0,65% e correlacionada perfeitamente com as bandas de absorção na região infravermelha de dados publicados anteriormente (Kungel et al., 2018). O espectro FT-IR da fração polissacarídica isolada das folhas de erva-mate pode ser consultado em informações de suporte eletrônicas (**Figura S1**). Para o ensaio biológico, a área corporal dos planárias foi medida em fotos usando o Software AxionVision SE64. A média dos valores da área foi plotada contra o tempo, produzindo uma curva de crescimento para cada segmento e cada concentração. O efeito do polissacarídeo isolado de erva-mate na regeneração das planárias foi avaliado no primeiro momento em concentrações de 0,6 mg/L, 1 mg/L e 2 mg/L. Essas concentrações não produziram melhoria na regeneração nem efeitos tóxicos nos organismos expostos (**Figura S2**). Devido à falta de efeito nessas concentrações, o ensaio foi repetido usando 10 mg/L, 20 mg/L e 60 mg/L de fração de polissacarídeo. A cabeça das planárias expostas a um concentração de 10 mg/L teve maior efeito no crescimento do que o controle, da mesma forma com 20 mg/L e 60 mg/L, ao longo do tempo investigado. A 60 mg/L, vale ressaltar que a área corporal foi menor que o grupo controle, indicando a presença de toxicidade produzida por concentrações da fração polissacarídica nesses organismos. Em concentrações de 20 mg/L, a resposta foi semelhante ao controle, o que pode estar associado à presença de leve toxicidade. A partir de $t = 10$ dias, a porção da cabeça apresentou crescimento linear. As curvas de crescimento para as planárias expostas à fração polissacarídica estão representados na **Figura 1a**.

Considerando o crescimento da faringe (**Figura 1b**), pode-se observar que 10 mg/L e 20 mg/L produziram respostas semelhantes e melhoraram o crescimento se comparado ao controle, enquanto 60 mg/L produziram uma resposta semelhante ao controle. Esta última descoberta pode estar relacionada ao leve toxicidade de 60 mg/L em planárias. A existência da faringe, como estruturas anatômicas usadas para ingestão de alimentos, pode ter permitido que o crescimento da faringe iniciasse antes do crescimento da cabeça, como pode ser observado no gráfico (**Figura 1b**), onde o crescimento linear começa em $t = 5$ dias. Nas planárias, a faringe é considerada um órgão autônomo, com uma estrutura diferenciada, com função especializada e características específicas associadas à sua regeneração (Kreshchenko, 2009).

Em relação à cauda (**Figura 1c**), foram encontrados menores efeitos da fração polissacarídica sobre o crescimento. Essa porção precisava de mais tempo que o desenvolvimento da faringe. Quando comparado com a faringe, era necessário um tempo maior para iniciar o crescimento. Portanto, cada segmento exigia quantidades diferentes de tempo para detectar o trauma e ativar seu processo de reparo. O primeiro passo na regeneração das planárias envolve contração muscular e epiderme extensão da ferida, um processo que leva ao fechamento da lesão. Como resultado dessas mudanças, as células identificadas como blastema são organizadas sob a epiderme e a substituição de segmentos é iniciada (Wenemoser & Reddien, 2010). Esse mecanismo pode ser responsável pela diminuição do tamanho da ferida ou falta de crescimento observado nos primeiros dias após a lesão. Isso foi também observado que a ejeção da faringe nos segmentos de cabeça e cauda ocorre no primeiros dias após a amputação, sugerindo a existência de uma seleção de tecidos para reposição durante o crescimento do corpo. Uma investigação sobre a farinfe das

planárias de espécie *Schmidtea mediterrânea* relatou que a nova faringe ficou visível 5-6 dias após a amputação (Wenemoser & Reddien, 2010).

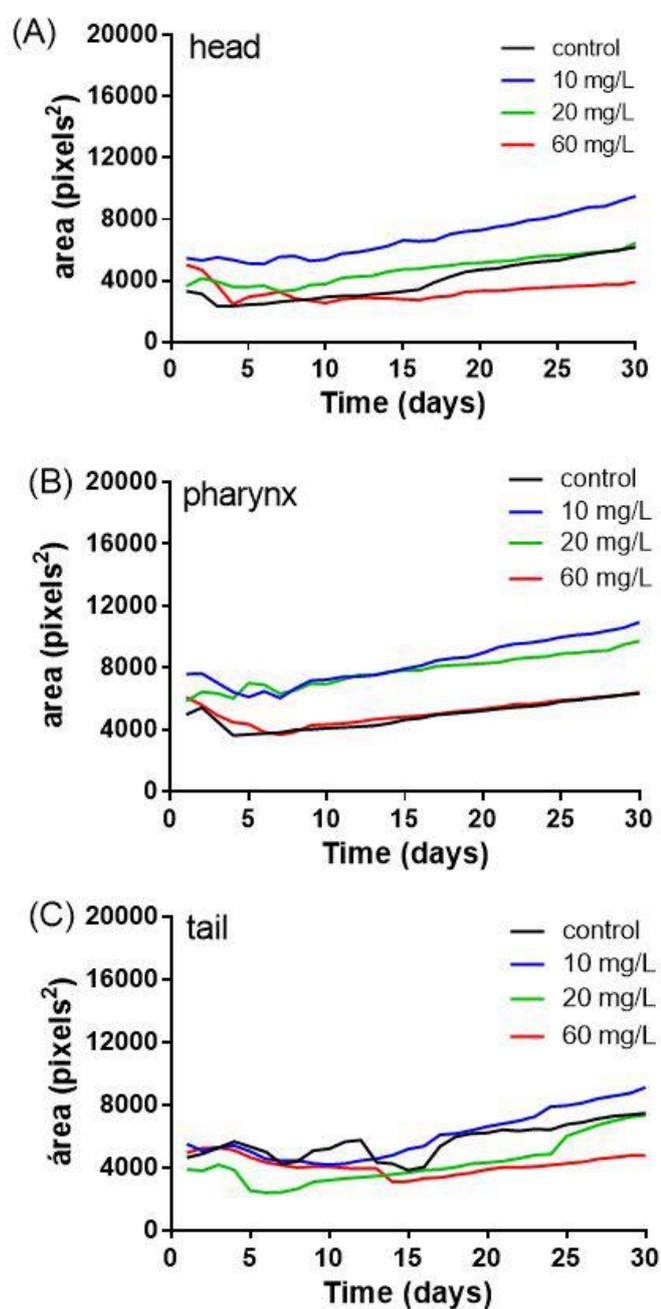


Figura 1 - Perfil de regeneração dos fragmentos de cabeça (A) faringe (B) e cauda (C) de planárias tratadas com a fração polissacarídica de erva-mate (10mg/L, 20mg/L e 60mg/L) monitorados por 30 dias. Os dados apresentados são a média das medições realizadas em três experimentos.

A maior concentração (60mg/L) produziu efeitos diferentes em cada segmento. Para cabeça e cauda, essa concentração produzia curvas abaixo da curva de controle, enquanto que para a faringe, essa concentração produziu um comportamento semelhante ao grupo controle. Outro interessante aspecto observado ao investigar a diferença de toxicidade da fração de polissacarídeo nos segmentos, era que a faringe era o único segmento em que a perda do organismo era não observada, fato que não ocorreu nos ensaios com cabeça e cauda.

Além disso, observou-se que, ao final da investigação (t = 30 dias), a concentração de 10mg/L produziu planárias mais compridas que o grupo controle, independentemente do segmento (veja a **Figura 2**). A concentração de 60mg/L não foi analisada na Figura 2 porque o experimento não foi finalizado em triplicado devido a mortes que ocorreram em algumas repetições. O potencial de regeneração da amostra investigada pode ser melhor analisada através do cálculo da melhora na porcentagem da área corporal em relação ao controle após 30 dias. Quando esta análise foi realizada para 10mg/L, as planárias originárias do segmento da cabeça foram 54% maiores que o controle (**Figura 2a**). Resultados mais extensos foram obtidos quando essa comparação foi realizada com organismos originários da faringe, que, após 30 dias, eram 72% maiores que o grupo controle (**Figura 2b**). Este resultado é mostrado na **Figura 3**, onde as planárias desenvolvidas a partir da faringe do grupo controle é comparado com as planárias expostas a 10mg/L de polissacarídeo após 30 dias de exposição. O menor efeito da fração polissacarídica foi observado na cauda, que após 30 dias na concentração de 10mg/L produziu planárias 22% maior que o grupo controle (**Figura 2c**). A concentração investigada mais promissora, capaz de para estimular o crescimento, foi de 10mg/L para todos os segmentos (cabeça, faringe e cauda).

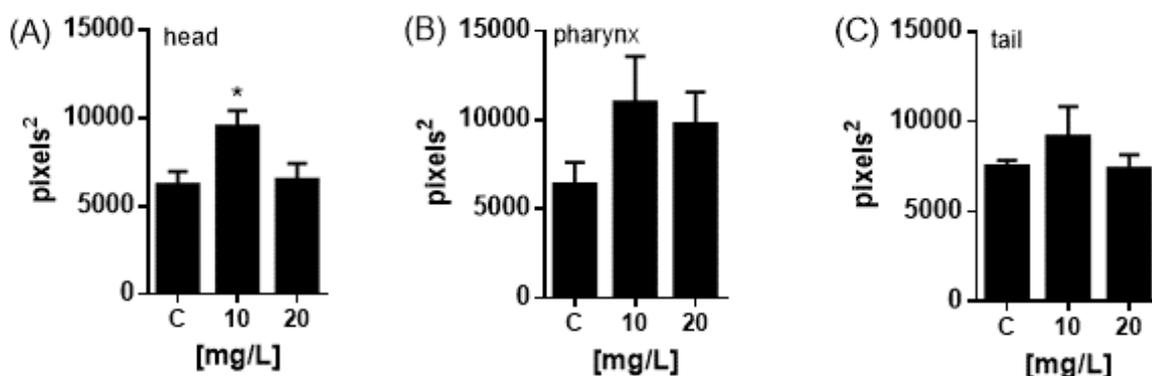


Figura 2 - Comparação da área corporal em planárias originárias da cabeça (A), faringe (B) e cauda (C) após 30 dias (t = 30 dias). * p < 0,05 em relação ao controle segundo ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

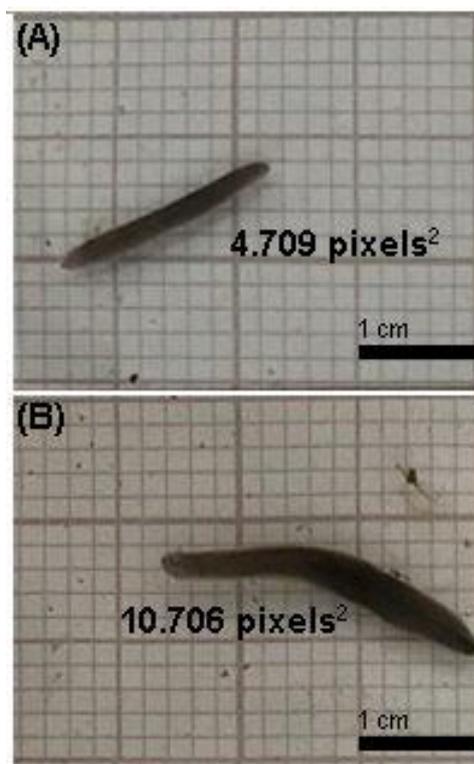


Figura 3 - Em (A) planária originária da faringe do grupo controle em $t = 30$ dias e em (B) planária originária da faringe do grupo exposto à fração polissacarídica em 10 mg / L em $t = 30$ dias.

Nossos resultados dão suporte ao papel da fração polissacarídica da erva-mate no reparo tecidual em planárias. Ramnogalacturonano isolado de erva-mate na dose de 10mg/kg melhorou a taxa de sobrevivência de ratos com sepse, o que se comparou favoravelmente com a dexametasona usada como controle nesta investigação. A investigação também destacou que esta dose da fração polissacarídica inibiu a expressão das enzimas inflamatórias iNOS e COX-2 em 29% e 32%, respectivamente (Dartora et al., 2013). O efeito gastroprotetor contra lesões induzidas por etanol em ratos, também foi investigado na fração polissacarídica erva mate. A fração de polissacarídeo a 10mg/kg produziu um resultado semelhante ao dos ratos tratados com omeprazol 10mg/kg (Maria-Ferreira et al., 2013). O mesmo material produziu atividade antioxidante no ensaio DPPH com um valor de IC50 de 1,25mg/mL e atividade antimicrobiana contra várias cepas bacterianas e fúngicas (Kungel et al., 2018), que podem ajudar a explicar seu efeito sobre sepse (Dartora et al., 2013). A segurança deste composto foi demonstrada nas células PLP2 (fígado), até a concentração máxima testada (400mg/mL) (Kungel et al., 2018). As planárias têm sido utilizadas em muitos estudos ligados à regeneração. No entanto, é difícil comparar quantitativamente a regeneração entre animais tratados de maneiras diferentes (Adler, Seidel, McKinney e Alvarado, 2014). Investigando o efeito de certos compostos na planária a regeneração é monitorada principalmente por imunocoloração de células ativas mitóticas (Kreshchenko et al., 2008) e análise do tamanho de blastema usando microscopia de contraste de luz (Ermakova, Ermakov, Tiras, & Lednev, 2009; Porfiriev et al., 2017). Nesse contexto, a análise digital de fotos para avaliação do crescimento corporal das planárias é outro avanço relatado em nossa investigação. Essa abordagem é amplamente utilizada em

estudos toxicológicos, utilizando o nematóide *Caenorhabditis elegans* como alternativa modelo animal (Gonçalves et al., 2020).

O efeito de compostos estruturalmente diferentes foi avaliado no crescimento planariano. Alguns estudos relataram um efeito negativo da índole no crescimento (Lee, Williams, Levin & Wolfe, 2018), bem como uma melhoria no crescimento produzido pelo neuropeptídeo F (Kreshchenko et al., 2008). Além disso, verificou-se que a melatonina reduz seletivamente a atividade mitótica das células na região anterior parte das planárias (Ermakova et al., 2009). Entretanto, nossos resultados são a primeira investigação do efeito de um polissacarídeo isolado de plantas neste animal.

Conclusão

A fração de polissacarídeo isolada das folhas de erva-mate a 10mg/L melhorou a regeneração de planárias amputadas. Os organismos obtidos por tratamento com esta concentração, foi 22-72% maior que o grupo controle ao final de 30 dias. Uma concentração 60mg/L mostraram efeitos tóxicos em planárias, principalmente na cabeça e cauda. Estes resultados mostram que a fração polissacarídica das folhas de erva-mate representa um uso potencial no processo de regeneração tecidual.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Dra Suzana Bencke Amato, do Departamento de Zoologia da Federal Universidade do Rio Grande do Sul pela doação das planárias e instruções para seu cultivo; e Rebecca Joy Armstrong por revisão final do manuscrito. Os autores agradecem ao CNPq e CAPES pelas bolsas.

Referências

- Adler, C. E., Seidel, C. W., McKinney, S. A., & Alvarado, A. S. J. E. (2014). Selective amputation of the pharynx identifies a FoxA-dependent regeneration program in planaria. *eLife*, 3, e02238. doi:10.7554/eLife.02238.001
- Baker, D., Deats, S., Boor, P., Pruitt, J., & Pagán, O. R. (2011). Minimal structural requirements of alkyl γ -lactones capable of antagonizing the cocaine-induced motility decrease in planarians. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 100(1), 174-179. doi:10.1016/j.pbb.2011.08.013
- Dartora, N., de Souza, L. M., Paiva, S. M., Scoparo, C. T., Iacomini, M., Gorin, P. A., Sasaki, G. L. (2013). Rhamnogalacturonan from *Ilex paraguariensis*: a potential adjuvant in sepsis treatment. *Carbohydr Polym*, 92(2), 1776-1782. doi:10.1016/j.carbpol.2012.11.013
- Ermakova, O. N., Ermakov, A. M., Tiras, K., & Lednev, V. V. (2009). Melatonin effect on the regeneration of the flatworm *Girardia tigrina*. *Ontogenez*, 40(6), 466-469. doi:10.1134/S1062360409060083

- Faion, A. M., Beal, P., Ril, F. T., Cichoski, A. J., Cansian, R. L., Valduga, A. T., Valduga, E. (2015). Influence of the addition of natural antioxidant from mate leaves (*Ilex paraguariensis* St. Hill) on the chemical, microbiological and sensory characteristics of different formulations of Prato cheese. *Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 1516-1524. doi:10.1007/s13197-013-1045-4
- Gonçalves, I. L., Rockenbach, L., Göethel, G., Säuer, E., Porto Kagami, L., Machado das Neves, G., . . . Eifler-Lima, V. L. (2020). New pharmacological findings linked to biphenyl DHPMs, kinesin Eg5 ligands: anticancer and antioxidant effects. *Future Medicinal Chemistry*, xx(xx), xxx-xxx.
- Kreshchenko, N. D. (2009). Pharynx regeneration in planarians. *Russian Journal of Developmental Biology*, 40(1), 1-13. doi:10.1134/S1062360409010019
- Kreshchenko, N. D., Sedelnikov, Z., Sheiman, I. M., Reuter, M., Maule, A. G., & Gustafsson, M. K. (2008). Effects of neuropeptide F on regeneration in *Girardia tigrina* (Platyhelminthes). *Cell and Tissue Research*, 331(3), 739-750. doi:10.1007/s00441-007-0519-y
- Kungel, P. T. A. N., Correa, V. G., Corrêa, R. C. G., Peralta, R. A., Soković, M., Calhelha, R. C., . . . Peralta, R. M. (2018). Antioxidant and antimicrobial activities of a purified polysaccharide from yerba mate (*Ilex paraguariensis*). *Int J Biol Macromol*, 114, 1161- 1167. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.04.020
- Lee, F. J., Williams, K. B., Levin, M., & Wolfe, B. E. (2018). The Bacterial Metabolite Indole Inhibits Regeneration of the Planarian Flatworm *Dugesia japonica*. *iScience*, 10, 135-148. doi:10.1016/j.isci.2018.11.021
- Maria-Ferreira, D., Dartora, N., da Silva, L. M., Pereira, I. T., de Souza, L. M., Ritter, D. S., . . . Baggio, C. H. (2013). Chemical and biological characterization of polysaccharides isolated from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. *Int J Biol Macromol*, 59, 125-133. doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.04.038
- Molin, R. F., Dartora, N., Borges, A. C. P., Gonçalves, I. L., Di Luccio, M., & Valduga, A. T. (2014). Total Phenolic Contents and Antioxidant Activity in Oxidized Leaves of Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(6), 997- 1003. doi:10.1590/S1516-8913201402305.
- Molin, R. F., Valduga, A. T., Di Luccio, M., Dartora, N., Cichoski, A. J., Pistore, M., & Rigo, E. (2011). Assessment of oxidation of leaves of *Ilex paraguariensis* (St. Hil) *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(2), 337-345. doi:10.1590/S1516-89132011000200016
- Pagan, O. R. (2017). Planaria: an animal model that integrates development, regeneration and pharmacology. *Int J Dev Biol*, 61(8-9), 519-529. doi:10.1387/ijdb.160328op
- Pagán, O. R. (2014). *The first brain: the neuroscience of planarians*: Oxford University Press.

- Pagán, O. R., Coudron, T., & Kaneria, T. (2009). The flatworm planaria as a toxicology and behavioral pharmacology animal model in undergraduate research experiences. *Journal of Undergraduate Neuroscience Education*, 7(2), 48-52.
- Pagán, O. R., Rowlands, A. L., Azam, M., Urban, K. R., Bidja, A. H., Roy, D. M., . . . Afshari, L. K. (2008). Reversal of cocaine-induced planarian behavior by parthenolide and related sesquiterpene lactones. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 89(2), 160-170. doi:10.1016/j.pbb.2007.12.008
- Pagán, O. R., Rowlands, A. L., & Urban, K. R. (2006). Toxicity and behavioral effects of dimethylsulfoxide in planaria. *Neuroscience Letters*, 407(3), 274-278. doi:10.1016/j.neulet.2006.08.073
- Porfiriev, A., Yuganova, K., Belyaev, A., Vyshtakaliuk, A., Zobov, V., & Semenov, V. (2017). The Effect of 1-Ascorbate 1-(2-Hydroxyethyl)-4,6-Dimethyl-1,2-Dihydropyrimidin 2- One on the Regeneration of the Planarian *Girardia tigrina*. *BioNanoScience*, 7(4), 570-573. doi:10.1007/s12668-017-0451-x
- Preci, D., Cichoski, A. J., Valduga, A. T., de Oliveira, D., Valduga, E., Treichel, H., . . . Cansian, R. L. J. A. e. N. (2011). Formulation of light yogurt using extract of mate tea (*Ilex paraguariensis* St. Hil) and probiotic addition/Desenvolvimento de iogurte light co extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) e adicao de probioticos. *Brazilia Journal of Food and Nutrition*, 22(1), 27-39. doi:10.1590/S1413-70542016000100011
- Raffa, R. B. (2008). *Planaria: a model for drug action and abuse*: CRC Press.
- Ribeiro, D. M. L., Carvalho Júnior, A. R., de Macedo, V., Rodrigues, G. H., Chagas, V. L., Silva, L. d. S., . . . Zagnignan, A. (2020). Polysaccharide-Based Formulations for Healing of Skin-Related Wound Infections: Lessons from Animal Models and Clinical Trials. *Biomolecules*, 10(1), 63.
- Stocchino, G. A., Sluys, R., Harrath, A. H., Mansour, L., & Manconi, R. (2019). The invasive alien freshwater flatworm *Girardia tigrina* (Girard, 1850)(Platyhelminthes, Tricladida) in Western Europe: new insights into its morphology, karyology and reproductive biology. *Contributions to Zoology*, 1(aop), 36-56. doi:10.1163/18759866-20191406
- Valduga, A. T., Gonçalves, I. L., Dartora, N., Mielniczki-Pereira, A. A., & Souza, L. M. d. (2016). Phytochemical profile of morphologically selected yerba-mate progenies. *Ciência e Agrotecnologia*, 40(1), 114-120.
- Valduga, A. T., Gonçalves, I. L., Magri, E., & Delalibera Finzer, J. R. (2019). Chemistry, pharmacology and new trends in traditional functional and medicinal beverages. *Food Research International*, 120, 478-503. doi:10.1016/j.foodres.2018.10.091

- Van Huizen, A. V., Tseng, A.-S., & Beane, W. S. (2017). Methylisothiazolinone toxicity and inhibition of wound healing and regeneration in planaria. *Aquatic Toxicology*, *191*, 226-235. doi:10.1016/j.aquatox.2017.08.013
- Wenemoser, D., & Reddien, P. W. (2010). Planarian regeneration involves distinct stem cell responses to wounds and tissue absence. *Dev Biol*, *344*(2), 979-991. doi:10.1016/j.ydbio.2010.06.017
- Wu, J. P., & Li, M. H. (2018). The use of freshwater planarians in environmental toxicology studies: Advantages and potential. *Ecotoxicol Environ Saf*, *161*, 45-56. doi:10.1016/j.ecoenv.2018.05.057
- Zanchett, C. S., Mignoni, M. L., Barro, N. P. R., & Rosa, C. D. (2016). Desenvolvimento de chocolate branco com extrato de erva-mate *Brazilian Journal of Food Technology*, *19*. doi:10.1590/1981-6723.7315
- Zhu, T., Mao, J., Cheng, Y., Liu, H., Lv, L., Ge, M., . . . Lai, Y. (2019). Recent Progress of Polysaccharide-Based Hydrogel Interfaces for Wound Healing and Tissue Engineering. *Adv. Mater. Interfaces*, *6*(17), 1900761. doi:10.1002/admi.201900761

4.0 CONCLUSÃO GERAL

A presente pesquisa teve como objetivo principal avaliar o efeito da fração polissacarídica isolada de folhas de erva-mate na regeneração de planárias (*Girardia tigrina*). Em todos os ensaios, a *G. tigrina* apresentou capacidade regenerativa após injúria por amputação. O polissacarídeo na concentração de 10mg/L teve um efeito positivo na regeneração de todas as porções da *G. tigrina*. A maior concentração utilizada, 60mg/L, apresentou toxicidade nas porções de cabeça e cauda da *G. tigrina*, o mesmo não ocorreu nas porções medianas que tiveram seu crescimento similar ao teste controle. A porção mediana da planária (faringe) teve um efeito regenerativo superior quando comparadas as demais porções.

Em virtude destes achados, a fração polissacarídica isolada de folhas de erva-mate pode ser utilizada também na engenharia de regeneração de tecidos, bem como, outros trabalhos que possam explorar mais os benefícios da fração polissacarídica isolada das folhas de erva-mate, desta forma, seriam pertinentes outros estudos que abordassem questões como:

- Estresse oxidativo do polissacarídeo;
- Comportamento da *G. tigrina*, através da exposição ao polissacarídeo, se o animal quando exposto apresenta algum comportamento diferente (teste ansiolítico e ansiogênico);
- Composição centesimal das planárias, para descobrir e detalhar em qual mecanismo o polissacarídeo agiu para aumentar a regeneração.

5.0 ANEXOS

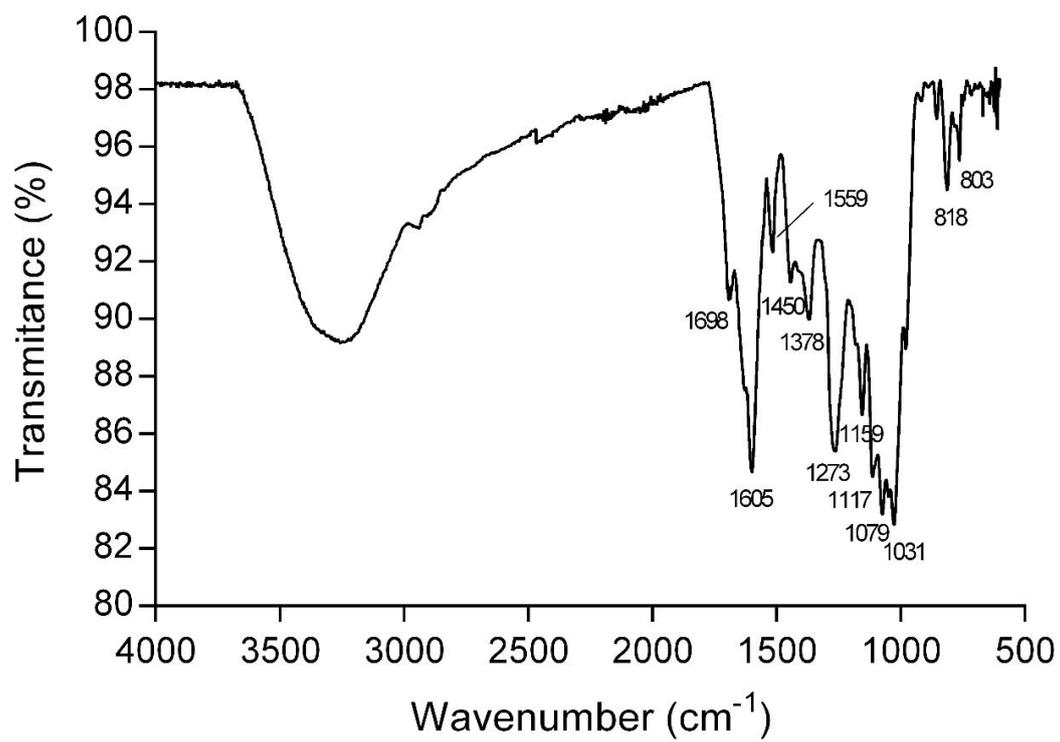


Figura S1 - Espectro de FT-IR (ATR) da fração de polissacarídeo.

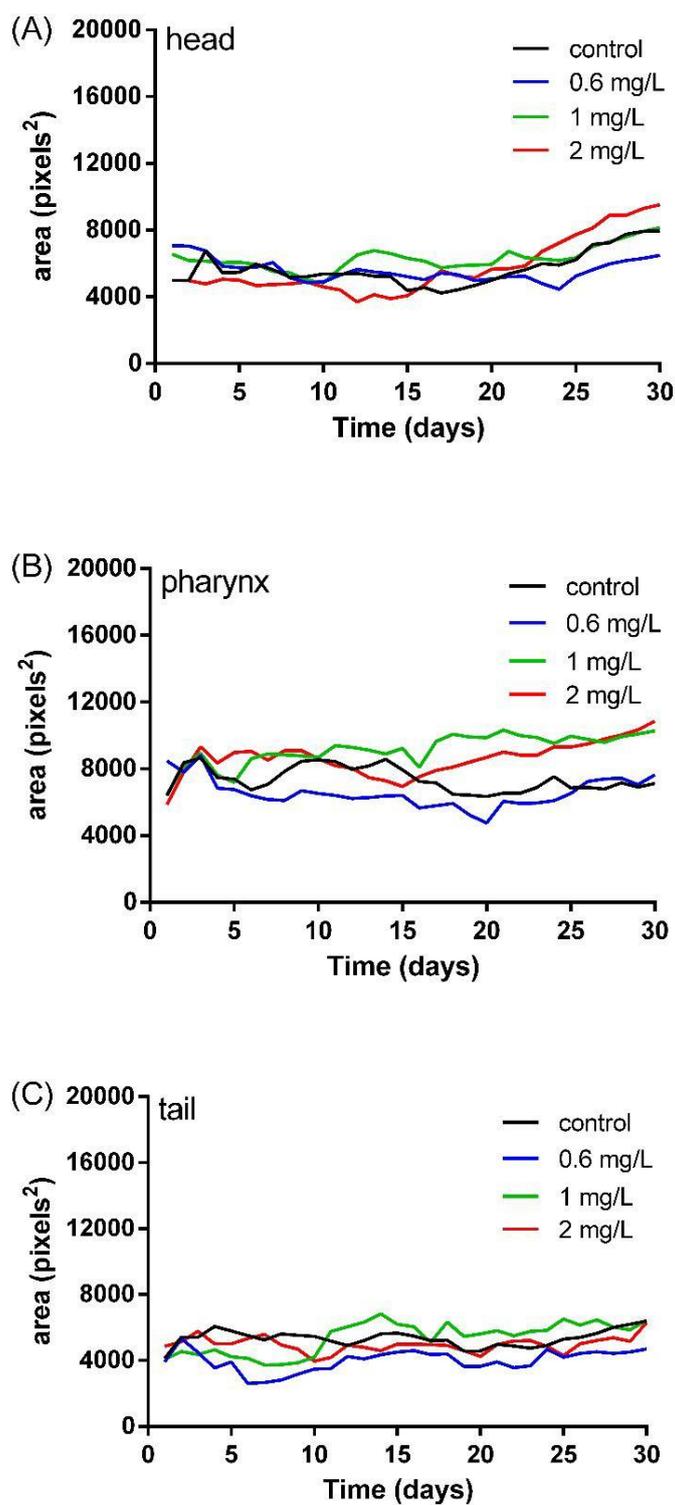


Figura S2 - Perfil de regeneração dos fragmentos de cabeça (A) faringe (B) e cauda (C) de planárias tratadas com a fração polissacarídica de erva-mate (0,6 mg / L, 1 mg / L e 2 mg / L) monitorados por 30 dias.