

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

***Caenorhabditis elegans: um modelo experimental para a análise dos efeitos agudos de extratos de erva-mate (Ilex paraguariensis) e uma ferramenta para a potencialização do Ensino de Ciências na Escola Básica***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Maria Eduarda de Lima**

**Uruguaiana, RS, Brasil**

**2013**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

***Caenorhabditis elegans*: um modelo experimental para a análise dos efeitos agudos de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e uma ferramenta para a potencialização do Ensino de Ciências na Escola Básica**

por

**Maria Eduarda de Lima**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra em Bioquímica**, pelo programa de Pós-graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Folmer

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daiana Ávila

Uruguaiana, RS, Brasil

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Maria Eduarda de Lima

*Caenorhabditis elegans: um modelo experimental para a análise dos efeitos agudos de extratos de erva-mate (Ilex paraguariensis) e uma ferramenta para a potencialização do Ensino de Ciências na Escola Básica*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestra em Bioquímica.

Área de concentração: Bioprospecção Molecular

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Vanderlei Folmer  
**(Presidente/Orientador)**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nilda Berenice de Vargas Barbosa

---

Prof. Dr. Rodrigo de Souza Balk

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem ele nada existiria. Agradeço também a UNIPAMPA, PPG bioquímica, CNPq e CAPES, pela oportunidade e suporte financeiro para desenvolver meu projeto.

Aos meus orientadores, Daiana Ávila e Vanderlei Folmer, sim posso me considerar privilegiada por ter recebido a orientação de duas pessoas maravilhosas, durante este 1 ano e meio de trabalho. A vocês minha eterna gratidão pelos ensinamentos, multas, e principalmente pelos puxões de orelha, que com certeza contribuíram muito para o meu crescimento. Obrigada também aos demais professores do PPG Bioquímica, que sempre estiveram presentes e prontos para ajudar quando necessário.

Mas, principalmente, gostaria de agradecer e dedicar este trabalho a ela, ela que foi mãe e pai, ela que me criou e me deu todo suporte e educação para que eu chegasse aqui hoje, que aguentou minhas oscilações de humor, que me apoiou sempre, independente de tudo, que me orientou quando eu estava perdida, mesmo sem saber, e que me amou incondicionalmente, a minha mãe Iara Lima.

Não poderia deixar de lembrar e agradecer o pessoal do lab. 403 e dos meus amigos Ana Colpo, Carol, Felipa e Hemerson, que estiveram junto comigo desde o início desta caminhada, e que me ensinaram muito. A galera do GBToxCe, que me acolheu como uma família e esteve junto em todos os momentos, momentos em que foi possível estreitar laços de carinho e amizade, dos quais eu espero que permaneçam fortes.

Ao pessoal do OBEDUC que teve toda paciência para me ensinar algo que para mim era novo, mas que valeu muito a pena.

Ao pessoal da prof. Fran, pela disposição e pelo auxílio no uso do leitor de microplacas.

Aos meus velhos e novos amigos, que entenderam os meus momentos de ausência e mesmo assim estão comigo até hoje, e finalmente à banca, pela disposição em avaliar e contribuir significativamente com o meu trabalho.

Muito Obrigada.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica  
Fundação Universidade Federal do Pampa

***Caenorhabditis elegans: um modelo experimental para a análise dos efeitos agudos de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e uma ferramenta para a potencialização do Ensino de Ciências na Escola Básica***

AUTORA: Maria Eduarda de Lima  
ORIENTADOR: Vanderlei Folmer  
COORIENTADORA: Daiana Ávila  
Uruguaiana, 8 de agosto de 2013

A *Ilex paraguariensis* (Saint-Hilaire) popularmente denominada erva mate, trata-se de uma espécie arbórea que cresce naturalmente em florestas da América do Sul e é muito utilizada no preparo de uma bebida peculiar conhecida como chimarrão, mate ou teterê, dependendo de onde é consumida. Entre as substâncias conhecidas da erva mate estão os polifenóis, saponinas, xantinas, minerais e vitaminas e há um interesse em elucidar os efeitos desses componentes. Em decorrência disto, o presente estudo avaliou os efeitos da exposição aguda a extratos de diferentes ervas-mate (*I. paraguariensis*), provenientes da Argentina, Brasil e Uruguai em *C. elegans*. Objetivando a obtenção de extratos com composição similar aos ingeridos pela população, preparou-se a bebida da forma tradicional e empregou-se uma forma de extração que mimetiza seu consumo. A partir desses extratos (mates) foram realizados testes de sobrevivência, locomoção, reprodução, longevidade, resistência ao estresse e nível de espécies reativas utilizando a cepa Bristol N2 do *C. elegans*. Também verificamos a ativação do fator de transcrição DAF-16 e a regulação das enzimas SOD-3 e Catalase utilizando as cepas transgênicas que possuem a proteína verde fluorescente (GFP) fundida a estas vias, do

nematoide *C. elegans*. Foi possível verificar que os extratos não causaram letalidade e foram capazes de aumentar significativamente o tempo de vida deste organismo modelo. Apontamos a hipótese que esse resultado seja mediado pela ativação do fator de transcrição DAF-16, um gene homólogo ao FOXO (seres humanos), responsável por regular vários processos biológicos tais como longevidade, reprodução e resposta ao estresse. Esse fator, quando ativado transloca do citosol para o núcleo, e ativa a expressão de genes alvo que codificam enzimas antioxidantes, como a SOD-3. Embora os extratos que aumentaram significativamente a longevidade tenham também aumentado a translocação de DAF-16 para o núcleo, curiosamente não aumentaram a expressão das enzimas SOD-3 e Catalase, indicando que podem haver outras vias envolvidas neste efeito. O *Caenorhabditis elegans* é um nematoide de vida livre do solo que tem sido muito utilizado no âmbito da pesquisa científica atual e além de ser um ótimo e bem descrito modelo, pode ser utilizado para potencializar o Ensino de Ciências na Escola Básica através de uma proposta inovadora. Portanto, além da pesquisa científica, o presente trabalho apresentou uma proposta de trabalho diferenciada para o Ensino de Ciências e saúde nos anos iniciais da Escola Básica, utilizando o *C. elegans* como modelo alternativo. Este estudo sintetiza uma contribuição importante para futuras pesquisas, tanto porque pela primeira vez mostra os efeitos de extratos de diferentes nacionalidades obtidos na forma como a população habitualmente consome em *C. elegans*, sendo o ponto de partida para investigações de mecanismos envolvidos nos efeitos supracitados, quanto porque mostrou que métodos alternativos de experimentação científica podem potencializar o aprendizado de Ciências e melhorar a capacidade de entendimento dos alunos, através do despertar da curiosidade e estímulo de uma maior participação efetiva nas aulas, indicando que métodos inovadores devem ser mais explorados.

**Palavras-chave:** antioxidantes; DAF-16; longevidade; escola básica; ensino.

## ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree  
Program of Post-Graduation in Biochemistry  
Federal University of Pampa

*Caenorhabditis elegans*: an experimental model for the analysis of the acute effects of extracts of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) and a tool for empowerment of Science Teaching in Primary School

AUTHOR: Maria Eduarda de Lima

ADVISOR: Vanderlei Folmer

COADVISOR: Daiana Ávila

Uruguaiana, 8 August, 2013

*Ilex paraguariensis* (St. Hilaire) popularly called yerba mate, it is a tree species that grows naturally in the forests of South America and is widely used in the preparation of a peculiar drink known as mate, or tererê, depending on where is consumed. Among the known substances of the mate are polyphenols, saponins, xanthines, vitamins and minerals and there is an interest in elucidating the effects of these components. Due to this, the present study evaluated the effects of acute exposure to extracts of different herbs mate (*I. paraguariensis*), from Argentina, Brazil and Uruguay in *C. elegans*. In order to obtain extracts with similar composition to ingested by the population, prepared to drink the traditional way and we used a form of extraction that mimics its consumption. From these extracts (mates) tests were performed for survival, locomotion, reproduction, longevity, stress resistance and level of reactive species using the Bristol N2 strain of *C. elegans*. We also found activation of the transcription factor DAF-16 and the regulation of the enzymes SOD and Catalase-3 using strains that have transgenic green fluorescent protein (GFP) fused to these pathways, the nematode *C. elegans*. It was possible that the extracts did not cause lethality and were able to significantly increase the

lifespan of this model organism. We point out the possibility that this result is mediated by activation of the transcription factor DAF-16, a gene homologous to the FOXO (humans), responsible for regulating various biological processes such as longevity, reproduction and stress response. This factor, when activated translocates from the cytosol to the nucleus and activates the expression of target genes encode enzymes that antioxidants, such as SOD-3. Although the extracts which have significantly increased the longevity also increased translocation of-16 to DAF core, interestingly not increased expression of SOD and Catalase-3, indicating that other pathways may be involved in this effect. The *Caenorhabditis elegans* is a free-living nematode soil that has long been used in the context of current scientific research and besides being a great and well-described model can be used to enhance the Teaching of Science in Primary School through an innovative. So in addition to scientific research, this paper proposed a differentiated work for Teaching Science and Health in the early years of the Basic School, using *C. elegans* as alternative model. This study summarizes an important contribution to future research, both because the first time shows the effects of extracts obtained from different nationalities in the way people usually consume in *C. elegans*, and the starting point for the investigation of mechanisms involved in the effects described above, as it has shown that alternative methods of scientific experimentation can enhance learning science and to improve understanding of the students, through the awakening of curiosity and stimulate greater effective participation in classes, indicating that innovative methods should be further explored.

**Keywords:** antioxidants; DAF-16; longevity; basic school; teaching.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Revisão de Literatura:

<b>Figura 1:</b> Aparatos utilizados para preparar e beber o chimarrão ou mate.....	9
<b>Figura 2:</b> Via de sinalização semelhante a insulina IGF-1.....	15
<b>Figura 3:</b> Sistema enzimático de Defesa Antioxidante.....	17

### Manuscrito 1:

<b>Figure 1:</b> Extraction method – mimicking the "mate" preparation.....	29
<b>Table 1:</b> Total Phenolic Compunds of <i>Ilex paraguariensis</i> extracts.....	33
<b>Figure 2:</b> Percentage of surviving worms following acute exposure to extracts of <i>Ilex paraguariensis</i> or control.....	34
<b>Figure 3:</b> Protection of reproduction of worms treated with <i>Ilex paraguariensis</i> and pre-exposed at <i>Ilex p.</i> and post-exposed at Paraquat.....	35
<b>Figure 4:</b> <i>Ilex paraguariensis</i> extracts protect of the survival reduction caused by Paraquat. ....	36
<b>Figure 5:</b> Increased of lifespan of worms treated with extracts.....	37
<b>Figure 6:</b> <i>Ilex paraguariensis</i> extracts reduce the ROS levels.....	38
<b>Figure 7:</b> Nuclear migration of transcriptional factor DAF-16 and fluorescence intensity of SOD-3 and CTL1;CTL-2;CTL-3.....	39

### Manuscrito 2:

<b>Tabela 1:</b> Desenho experimental.....	58
<b>Figura 1:</b> Presença ou ausência da morfologia esperada para um verme nos desenhos realizados no Pré e Pós testes.....	61
<b>Figura 2:</b> Presença ou ausência de relação entre vermes e meio ambiente/seres humanos nos desenhos realizados no Pré e Pós - testes.....	62
<b>Figura 3:</b> Presença ou ausência do ciclo de vida dos vermes ilustrados em desenhos realizados por alunos do 1º e 2º ano no Pós - teste.....	63

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**ANOVA:** Análise de Variância

**ATP:** Adenosina Trifosfato

**CAT:** Catalase

**CGC:** *Caenorhabditis* Genetics Center

**DCF:** Dichlorofluorescein

**DCF-DA:** Dichlorofluorescein Diacetate

**DNA:** Ácido Desoxirribonucleico

**EC:** Ensino de Ciências

**ERs:** espécies reativas

**FOXO:** *fork head Box O*

**FUDR:** 5-fluoro-2'-deoxy-uridine

**GAE:** Gallic Acid Equivalent

**GENSQ:** Grupo de Estudos em Nutrição, Saúde e Qualidade de Vida

**GFP:** Green Fluorescent Protein

**GPx:** Glutathione Peroxidase

**H<sub>2</sub>O:** Água

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de Hidrogênio

**IDEB:** Índice de Desenvolvimento da Educação Básica

**NGM:** Nematode Growth Media

**O<sub>2</sub>:** Oxigênio molecular

**PCN:** Parâmetros Curriculares Nacionais

**PISA:** Program for International Student Assessment

**RLs:** radicais livres

**RNA:** Ácido Ribonucleico

**SOD:** superóxido dismutase

**UFRJ:** Universidade Federal do Rio de Janeiro

**UNIPAMPA:** Universidade Federal do Pampa

## SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	III
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	IV
APRESENTAÇÃO.....	VII
1 INTRODUÇÃO .....	2
2 JUSTIFICATIVA .....	6
3 OBJETIVOS .....	7
3.2 Objetivo Geral .....	7
3.3 Objetivos Específicos .....	7
3.3.1 Manuscrito 1: .....	7
3.3.2 Manuscrito 2: .....	8
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	9
4.1 Erva- mate.....	9
4.1.1 Processo de industrialização e beneficiamento da erva-mate .....	10
4.2 Composição fitoquímica da erva-mate .....	11
4.3 Atividades biológicas da <i>Ilex paraguariensis</i> .....	12
4.4 <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	13
4.5 Estresse oxidativo .....	16

4.6 Da Universidade à Escola Básica: uma quebra de paradigmas.....	18
5 MANUSCRITOS CIENTÍFICOS .....	21
5.1 MANUSCRITO 1: <i>Ilex paraguariensis</i> extracts increase lifespan and resistance against oxidative stress in <i>Caenorhabditis elegans</i> : role of DAF-16 pathway .....	22
5.2 MANUSCRITO 2: <i>Caenorhabditis elegans</i> Como Ferramenta Para o Ensino de Ciências na Escola Básica .....	47
6 CONCLUSÕES .....	68
7 PERSPECTIVAS.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	71

## APRESENTAÇÃO

As informações aqui contidas descrevem a organização textual desta dissertação. Os temas abordados estão apresentados no item INTRODUÇÃO. Na REVISÃO DE LITERATURA são descritas informações a respeito dos temas projetados para este estudo.

Os RESULTADOS obtidos na pesquisa, METODOLOGIA e MATERIAIS utilizados, bem como DISCUSSÃO dos resultados e REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS encontram-se nos MANUSCRITOS CIENTÍFICOS que representam o estudo na íntegra.

O MANUSCRITO 1 refere-se ao trabalho realizado para avaliação dos efeitos dos os extratos de *Ilex paraguariensis* de diferentes nacionalidades, obtidos mimetizando o chimarrão em *C. elegans*. O MANUSCRITO 2 refere-se a avaliação das concepções de alunos de uma escola Básica da periferia de Uruguaiana-RS, pré e pós exposição do ciclo de vida do *C. elegans* como modelo de EXPERIMENTAÇÃO CIENTÍFICA.

As CONCLUSÕES referem-se às interpretações e comentários sobre os resultados apresentados nos manuscritos científicos. No item PERSPECTIVAS são observadas possibilidades de continuidade do estudo.

As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS reportam citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, JUSTIFICATIVA e CONCLUSÕES desta dissertação.

## 1 INTRODUÇÃO

A *Ilex paraguariensis*, conhecida popularmente como erva-mate, chá dos Jesuítas, chá Paraguaio ou apenas mate, trata-se de uma espécie pertencente à família *Aquifoliaceae* e gênero *Ilex*. É uma árvore nativa da América do Sul, que contribui como fonte econômica para a região sul do Brasil e para os países Argentina, Uruguai e Paraguai (Felippi 2005, Vieira *et al.*, 2010; Dutra *et al.*, 2010).

A infusão ou decocção das partes aéreas da *I. paraguariensis* é amplamente utilizada no preparo de uma bebida, denominada mate, que é muito apreciada pelo seu peculiar sabor amargo e por suas propriedades estimulantes. O nome Mate é derivado da palavra quíchua "mate" que significa xícara ou vaso. Durante séculos, a erva-mate tem sido utilizada pelos indígenas da América do Sul, sendo o hábito de beber "mate", incorporado pelas sociedades colonizadoras, uma tradição que permanece até a época atual (Felippi, 2005).

A bebida a base de erva-mate recebe diferentes denominações nos locais onde é consumida, tais como "chimarrão" no Sul do Brasil, "mate" na Argentina e Uruguai e "tererê" no Paraguai. Além disso, tem destaque como tradição cultural nos locais onde é costume (Bracesco *et al.*, 2011; Berté *et al.*, 2011). Especialmente no Brasil, os estados que figuram como produtores e consumidores de erva-mate são: Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

Dentre os compostos bioativos presentes na erva-mate são conhecidos os ácidos fenólicos, saponinas, xantinas, minerais e vitaminas. As propriedades desses compostos estão bem documentadas e são reconhecidos seus efeitos como antioxidante, antiinflamatório, antimutagênico, efeito na antiglicação, na redução do peso e como hipocolesterolemiantes (Bracesco *et al.*, 2003; Matsumoto *et al.*, 2009; Mejia *et al.*, 2007; Filip *et al.*, 2010). Alguns estudos epidemiológicos têm encontrado uma associação inversa entre a ingestão de dietas ricas em polifenóis (como frutas, verduras e grãos) e o risco de doenças relacionadas à idade em humanos. Esta associação é atribuída à capacidade dos flavonóides e outros polifenóis de sequestrarem grande variedade de

espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e cloro (Halliwell *et al.*,1996;Block *et al.*, 1992;Willett *et al.*, 1994 ).

A erva-mate também é muito utilizada na medicina popular para o tratamento de artrite, dor de cabeça, constipação, reumatismo, hemorróidas, obesidade, fadiga, retenção de fluidos, hipertensão, digestão lenta e desordens hepáticas (Pio Corrêa, 1984).

O *C. elegans* é um nematoide que habita a porção líquida do solo e que tem sido descrito como uma alternativa para a avaliação bioquímica e toxicológica de diversos xenobióticos, além de ser considerado um modelo adequado para estudar envelhecimento e longevidade. Esta espécie é um dos arquétipos utilizados, atualmente, para investigar os efeitos de extratos brutos de plantas e de seus componentes bioativos (Hope, 1999; Boyd *et al.*, 2003;Muschiol *et al.* 2009; Wen *et al.*, 2011).

Neste contexto há estudos que demonstram que plantas como *Camelia sinensis* e *Eletherococus senticosus* podem promover aumento da resistência ao estresse e aumento na longevidade em *C. elegans*. Zarse *et al.*(2012) e Wiegant *et al* (2009) consideram que esses efeitos possivelmente estejam relacionados à ação antioxidante promovida pelos compostos fenólicos encontrados nos extratos das plantas estudadas.

O uso cada vez mais crescente desta espécie como modelo experimental se deve a sua fácil manipulação, transparência, curto ciclo de vida, facilidade de cultivo e tempo de geração rápido. Além disso, os estudos envolvendo *C. elegans* são viáveis e promissores porque este nematoide possui alto grau de genes homólogos com os humanos. Da mesma forma, geração facilitada de cepas com mutações tipo deleção em genes e a existência de diversas cepas transgênicas expressando a proteína verde fluorescente (do inglês GFP) fundida a genes promotores que codificam proteínas de interesse. Um exemplo é o fator de transcrição DAF-16; essa proteína é um ortólogo do fator FOXO (*fork head Box O*) em humanos, cuja uma das funções é modular o sistema antioxidante (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998; Chalfie *et al.*,1994; Kaletta *et al.*,2006; Wiegant *et al.*,2009;Wen *et al.*,2012).

O presente estudo trata-se de uma proposta de aproximação da experimentação científica desenvolvida em grandes centros, como a Universidade, da Escola Básica. Portanto, traz além da pesquisa científica, um método diferenciado para o Ensino de Ciências nos anos iniciais que tem como objetivo principal a potencialização do aprendizado.

Utilizou-se como base para a parte bioquímica extratos obtidos de forma similar aos ingeridos pela população. A metodologia de obtenção dos extratos foi descrita por Colpo (2012). No estudo desenvolvido por este autor foram analisadas a composição fitoquímica e a atividade antioxidante de ervas de diferentes nacionalidades, sendo utilizadas 9 ervas (3 Argentinas, 3 Brasileiras e 3 Uruguaias). As conclusões deste trabalho demonstram que os extratos apresentam elevada concentração de compostos bioativos (polifenóis e metilxantinas) e em relação aos protocolos desenvolvidos (atividade óxido nítrico "scavenger" e capacidade de quelação de ferro) exibem potente ação antioxidante.

Por conseguinte, tal trabalho teve como objetivo investigar a ação destes extratos em um organismo modelo completo e transparente, o *C. elegans*, e expressar seus efeitos sobre o tempo de vida, reprodução, comportamento, e parâmetros de proteção a efeitos tóxicos.

Quanto à interface Bioquímica/ Educação em Ciências, existe uma variedade de ferramentas didáticas que podem ser utilizadas para se trabalhar o ensino de Ciências na Escola Básica.

O estudo de Demczuk *et. al* (2007) utilizou a exposição do ciclo de vida da *Drosophila melanogaster* para investigar as concepções espontâneas de 54 alunos de 2ª e 4ª série do Ensino Fundamental de uma escola em Santa Maria –RS e constataram que os conceitos dos alunos foram modificados positivamente após as observações. Ainda nesse contexto, o *C. elegans*, além de ser um importante recurso para a pesquisa, pode ser um método didático importante nessa busca por propostas diferenciadas que possibilitem uma ampliação do processo ensino-aprendizagem.

Deste modo, utilizamos o método científico com objetivo de potencializar o aprendizado de alunos de uma escola de periferia do município de Uruguaiana-RS, que apresentou IDEB inferior a 3,5, e para tal, utilizou o

nematoide *C. elegans* como ferramenta de ensino e conteúdos relacionados ao ciclo de vida correlacionando aos seres microscópicos e sua implicação para com a saúde humana.

## 2 JUSTIFICATIVA

A erva mate é muito utilizada no preparo de uma bebida peculiar que faz parte dos hábitos e costumes de alguns países da América do Sul. Nas populações da fronteira Argentina, Brasil e Uruguai, a erva mate é simbolicamente associada à camaradagem, diálogo, compartilhamento e sentimento de comunidade (Bracesco *et al.*, 2011).

Embora alguns de seus efeitos já terem sido descritos em humanos, os mecanismos envolvidos ainda não estão completamente claros. A maioria dos trabalhos com *I. paraguariensis* tem sido desenvolvido *in vitro* com extratos etanólicos, o que não corresponde à forma como a população habitualmente consome. Neste sentido, estudos em *C. elegans* possibilitarão maior elucidação destes benefícios uma vez que este modelo é amplamente utilizado devido aos genes homólogos destes nematódeos com os seres humanos e, principalmente, pelo fato deste ser o primeiro trabalho a comparar extratos de erva mate de diferentes nacionalidades, extraídos na forma como a população habitualmente consome neste nematoide.

A aproximação da Pós Graduação com a escola Básica favorece ambos os lados pela ampliação de experiências e conhecimento, mas principalmente, potencializando o processo de ensino aprendizagem no âmbito escolar. As atividades da universidade podem contribuir para atualização dos professores que, muitas vezes, estão despreparados para abordar um ensino que contextualize os conceitos apresentados nos livros com as novidades tecnológicas que permeiam a sociedade (Coutinho, 2010). Sabendo-se a importância do Ensino de Ciências (EC) na escola básica e que este tem sido frequentemente conduzido de forma desinteressante e pouco compreensível, tornam-se indispensáveis propostas inovadoras que despertem o interesse dos alunos e favoreçam o aprendizado.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.2 Objetivo Geral

Investigar os efeitos dos extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*), de diferentes nacionalidades em *Caenorhabditis elegans* e utilizar este nematoide como ferramenta para a potencialização do Ensino de Ciências na Escola Básica.

#### 3.3 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos desta dissertação estão organizados de acordo com os manuscritos 1 e 2, inclusos no presente trabalho. O **manuscrito 1** está relacionado a análise dos efeitos dos extratos de *I. paraguariensis* em *C. elegans*. Já o **manuscrito 2** está associado a verificação das concepções dos alunos pré e pós exposição do ciclo de vida do *C. elegans*, como método alternativo para o EC.

##### 3.3.1 Manuscrito 1:

- Verificar os efeitos dos diferentes extratos de *I. paraguariensis* (m1/m2/m5/m10/m15) na taxa de sobrevivência, reprodução e atividade locomotora de *C. elegans*;

- Investigar se o pré tratamento com os extratos de *I. paraguariensis* (m1/m2/m5/m10/m15) reduz os efeitos tóxicos induzidos pela exposição ao Paraquat em relação à sobrevivência, reprodução e nível de espécies reativas em *C. elegans*;

- Analisar se os extratos causam migração do fator de transcrição DAF-16/FOXO para o núcleo celular e avaliar se estes são capazes de aumentar a expressão das enzimas superóxido dismutase e catalase.

### **3.3.2 Manuscrito 2:**

- Popularizar a ciência e o método científico na escola básica pela apresentação de uma proposta de trabalho diferenciada para o EC e saúde nos anos iniciais;

- Analisar a possibilidade de uso deste modelo com finalidade educativa nos anos iniciais;

- Verificar se as impressões das crianças sobre o que é um verme mudam após as atividades.

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 Erva- mate

A *Ilex paraguariensis* St. Hil. Var. *paraguariensis* (Aquifoliaceae), conhecida popularmente como erva-mate é uma espécie nativa da América do Sul. Esta espécie arbórea ocorre naturalmente nas florestas paranaenses sendo 80% de sua ocorrência no Brasil, mas também existe naturalmente na Argentina e no Paraguai (Vieira *et al.*, 2010, Burtnik, 2006).

A tradicional bebida a base de erva-mate, chamada “chimarrão” no Sul do Brasil, “mate” na Argentina e no Uruguai e “tererê” no Paraguai é muito peculiar, sendo para sua preparação e consumo utilizados aparatos específicos (Figura 1; Colpo, 2012).



Figura 1- Aparatos utilizados para preparar e beber o chimarrão ou mate.

Nesta imagem: 1- cuia; 2- bomba; 3-erva-mate; 4-água quente; 5-mate

Fonte: Colpo, 2012.

No preparo do “chimarrão” ou “mate” utiliza-se um recipiente feito da fruta porongo 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). O extrato aquoso resultante é sugado pelo consumidor usando um canudo de metal, conhecido como bomba (Heck e Mejia, 2007). A adição de água quente é repetida várias vezes, geralmente acompanhando as atividades diárias de tal forma que 1 litro é bebido durante o período médio de uma hora (Bracesco *et al.*, 2011). A preparação do tererê é muito similar a do mate, porém obtido pela maceração da erva em água fria ou gelada. É costume no Paraguai e apreciado na região Centro-Oeste do Brasil (Bastos e Torres, 2003; Meinhart *et al.*, 2010).

Pesquisas que objetivam ampliar o conhecimento da erva-mate (*I. paraguariensis*) têm como foco principal o estudo de compostos presentes em bebidas produzidas a partir das suas folhas. Entre os compostos fitoquímicos presentes em produtos a base de *I. paraguariensis*, veem sendo indicados, principalmente, a presença de minerais, vitaminas e constituintes que são metabólitos secundários da planta (Heinrichs e Malavolta, 2001; Bixby *et al.*, 2005; Bastos *et al.*, 2007; Heck e Mejia, 2007; Sugimoto, 2009; Bracesco *et al.*, 2010).

Esses compostos estão presentes nos extratos consumidos, porém vários fatores podem afetar o que é extraído e conseqüentemente o que é ingerido quando se toma a bebida. Entre os fatores que afetam a composição da erva-mate e dos extratos produzidos a partir dela, pode-se citar:

#### **4.1.1 Processo de industrialização e beneficiamento da erva-mate**

Diferentes produtos podem ser obtidos dos ramos e folhas da planta de erva-mate e dos subprodutos decorrentes do seu beneficiamento agroindustrial. Destacam-se as preparações para chimarrão, tererê e chás (Mazuchowski e Rucker, 1993), no entanto ao longo dos anos, o processo de industrialização e beneficiamento da erva-mate pouco se modificou.

Este processo é composto basicamente por 2 ciclos: o do cancheamento e o do beneficiamento (Rocha Júnior, 2001). Do cancheamento fazem parte as seguintes etapas: colheita, sapeco, secagem, cancheamento. No beneficiamento, propriamente dito, ocorrem as fases de soque, separação e mistura.

Durante as fases do processo industrial, são produzidas mudanças na formação do sabor e na concentração dos compostos bioativos dos produtos a base de *I. paraguariensis*. A formação do sabor se dá pela auto-oxidação dos lipídios presentes nas folhas, que é bastante influenciada pelo tamanho das mesmas, temperatura e grau de aeração da erva.

#### **4.2 Composição fitoquímica da erva-mate**

O processo de produção da erva-mate é um fator que pode influenciar na composição do produto final. Porém fatores como intensidade da luz durante o plantio, idade das folhas, componentes do solo, condições agrônômicas e fatores genéticos também afetam a concentração de compostos (Jacques *et al.*, 2007).

Em relação aos extratos que são consumidos o teor de compostos bioativos pode ser afetado pela forma de extração. Meinhart *et al.* (2010) compararam extratos de ervas consumidas na forma de “chimarrão” e “tererê” e verificaram que o segundo apresenta seis vezes mais cafeína que o primeiro e referem que a completa infusão da erva com água fria nessa forma de preparação pode ser a responsável por esse achado. Colpo (2012) através do uso de extratos obtidos simulando a forma tradicional de preparação demonstrou que a forma de consumo com sucessivas infusões e extrações é outro fator que afeta a composição fitoquímica da bebida.

Vários estudos relatam que entre os principais elementos presentes nos extratos estão os compostos fenólicos e as metilxantinas. Em relação aos compostos fenólicos a mais importante propriedade descrita é a defesa a radicais livres, produzidos normalmente pelo metabolismo das células ou em resposta a fatores externos. Porém a literatura recente está sugerindo que suas ações *in vivo* vão além, visto que podem atuar interferindo em vias

inflamatórias (Soto Vaca, 2012), na regulação do metabolismo energético e na saúde do intestino (Stevenson e Hurst, 2007).

As metilxantinas também possuem importante atividade antioxidante, porém seus efeitos na saúde relacionam-se a ação estimulante do sistema nervoso central e cardiorrespiratório, analgesia, relaxamento da musculatura lisa entre outros (Meinhart *et al.*, 2010; Azam *et al.*, 2003).

### **4.3 Atividades biológicas da *Ilex paraguariensis***

O número de trabalhos envolvendo *I. paraguariensis* é bastante amplo dentro da literatura científica. Por se tratar de uma espécie vegetal amplamente consumida na forma de bebida em países da América do sul, diversos pesquisadores investigam possíveis efeitos biológicos desta planta.

Recentemente, Arçari *et al.* (2013) demonstrou *in vitro* que extratos de erva-mate e os seus principais constituintes (ácido clorogênico, quercetina e rutina) regulam a expressão de genes relacionados com a adipogênese apontando assim, uma importante atividade anti-obesidade. Além disso, estudos recentes verificaram um potencial antioxidante para erva-mate e seus derivados (Boaventura *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2012; Miranda *et al.*, 2008).

Nesse contexto, pode-se citar o trabalho conduzido por Pagliosa *et al.* (2010) onde foram investigados os componentes fitoquímicos e a atividade antioxidante *in vitro* das cascas de *I. paraguariensis*. Embora, não sejam habitualmente consumidas, as cascas revelaram uma significativa atividade *scavenger* proporcional à quantidade de polifenóis presentes. Resultados estes, tão pronunciados quanto os das folhas.

Em outro estudo desenvolvido por Fernandes *et al.* (2012) foi analisado o efeito de derivados de erva-mate (verdes ou torrados) na enzima paraxonase-2, trabalho realizado *in vivo* com 20 (vinte) mulheres saudáveis após o consumo de 500 mL de infusão de erva-mate. Os resultados sugerem que o consumo de erva-mate, nas condições testadas, pode modular positivamente a expressão relativa de RNAm e possivelmente a atividade da enzima paraxonase-2 em monócitos e macrófagos sanguíneos.

Puangpraphant *et al.* (2011) verificaram em um estudo *in vitro*, que as saponinas presentes nas folhas de *I. paraguariensis* exibem ação anti-inflamatória, juntamente com ação de inibição da proliferação de células cancerígenas de cólon. Também foi observado que infusões de erva-mate apresentam potencial antidiabético, por aumentar a tolerância à glicose, aumento do glicogênio hepático e redução da glicação de proteínas. Ainda neste estudo, evidenciou-se um aumento da secreção de insulina o que corrobora para o papel da *I. paraguariensis* na redução da glicose sérica. (Pereira *et al.*, 2012).

Diversos outros efeitos benéficos da *I. paraguariensis* tem sido verificados, incluindo proteção contra danos no DNA (Miranda *et al.*, 2008), atividade vasodilatadora (Paganin *et al.*, 2005), inibição da glicação e aterosclerose (Mosimann *et al.* 2006), efeitos termogênicos (Arcari *et al.*, 2009), efeitos anti-inflamatórios; (Lanzetti *et al.*, 2008, Pimentel *et al.*, 2012).

Embora, haja uma grande diversidade de trabalhos com *I. paraguariensis*, verifica-se a necessidade de estudos *in vivo* e também comparativos entre a erva-mate comercializada em diferentes nacionalidades. Isso auxiliará a expandir a agregação de conhecimento sobre esse importante campo de pesquisa que trata das propriedades biológicas de extratos e/ou produtos a base de erva-mate.

#### **4.4 *Caenorhabditis elegans***

O *Caenorhabditis elegans* é um nematóide de vida livre, habitante da porção líquida do solo e comum em todo o mundo, tem sido amplamente usado como organismo modelo para os mais diversos tipos de pesquisa (Donald, 1997; Schierenberg & Wood, 1985).

Muitos são os atributos experimentais que tornam o *C. elegans* um modelo animal tão bem sucedido e com um número cada vez maior de publicações em biologia do desenvolvimento, genética, envelhecimento e de ecotoxicologia (Mota, M., 2001): Pequeno comprimento (aproximadamente 1mm), o que possibilita a fácil manutenção de grandes quantidades de espécimes (10000 vermes/placa) em placas de petri NGM (Nematode Growth Media) regadas com *E. Coli*; Grande capacidade reprodutiva, pois um hermafrodita

gera entre 200 e 300 descendentes, já quando um macho (0,02% da população) cruza com um hermafrodita este número pode passar de 1000 (Nayak, S. *et al.*, 2004); Curto ciclo de vida de aproximadamente 21 dias, possibilitando a execução de estudos relacionados à longevidade em um espaço temporal praticamente impraticável em modelos mamíferos clássicos; Inúmeras possibilidades relacionadas à genética, já que cerca de 60% dos genes do *C. elegans* possuem homólogos em mamíferos (Kaletta e Hengartner, 2006), além do grande suporte e trabalho em conjunto de vários laboratórios espalhados pelo mundo para a criação, manutenção e ampliação de bases de dados, como o Worm Book, e armazenamento e distribuição gratuita de cepas mutantes e/ou transgênicas, como o CGC (Caenorhabditis Genetics Center).

Além de todas essas características que tornam o *C. elegans* como um modelo experimental adequado, este nematoide também pode ser considerado um bom método alternativo para o ensino de Ciências nas séries iniciais, pois possibilita explorar conteúdos relacionados ao ciclo de vida de alguns animais, aos seres microscópicos e sua relação com a saúde humana.

Com isso, a criação e apresentação de um novo modelo para a prática de um ensino de Ciências mais eficiente e motivador é uma das propostas deste trabalho.

A respeito de conservação de genes e vias entre mamíferos e *C. elegans*, uma desponta como, talvez, a mais interessante e amplamente estudada: A via de sinalização da insulina ou IGF-1 (Figura 2). Ela controla vários processos biológicos tais como longevidade, reserva lipídica, reprodução, resposta ao estresse, termotolerância, resistência a patógenos, metabolismo e autofagia (Lee *et al.*, 2003), regulando a formação da larva dauer (estágio de atividade metabólica baixa durante a restrição calórica). A via da sinalização insulina/IGF-1 é iniciada pelo receptor DAF-2, o homólogo do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) em mamíferos. Quando DAF-2 é ativado fosforila a fosfoinositol 3-kinase, AGE-1, gerando PIP3, que por sua vez recruta as kinases AKT-1, AKT-2, SGK-1 e PDK-1 para a membrana plasmática onde PDK-1 fosforila AKT e SGK-1. O complexo AKT-1/AKT-2/SGK-1 fosforila o fator de transcrição DAF-16, sequestrando-o no citoplasma e então prevenindo a ativação ou repressão de genes-alvos no núcleo (Landis

& Murphy, 2010). O papel desta via de sinalização na longevidade e no metabolismo é conservado em *C. elegans*, *Drosophila* e mamíferos.

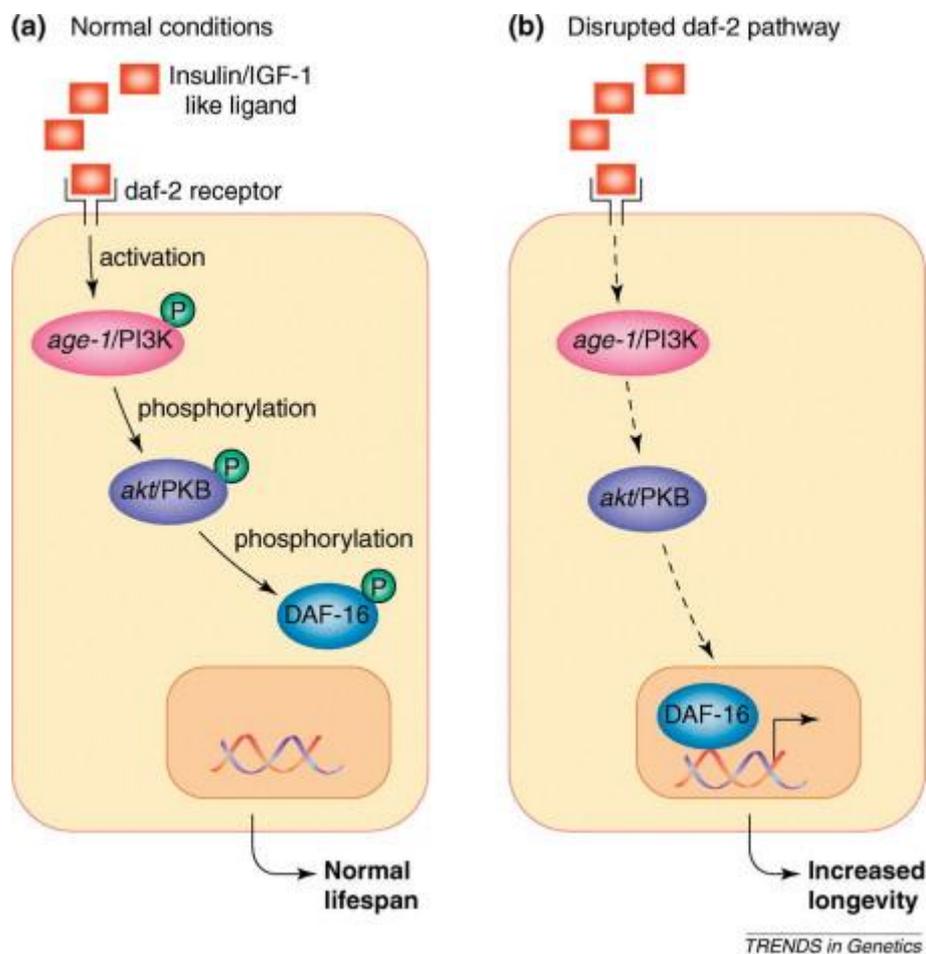


Figura 2: Via de sinalização semelhante à insulina/IGF-1. Fonte. (Carter *et al.*, 2002)

Nesse sentido, estudos com *I. paraguariensis* em *C. elegans* são praticamente inexistentes na literatura científica. Entretanto, alguns trabalhos tem demonstrado os efeitos de espécies vegetais neste modelo, tais como Wilson *et al.* (2006) que verificou que os polifenóis de mirtilo, aumentam o tempo de vida útil e a termotolerância em *C. elegans*. Mais recentemente, um estudo com o flavonóide miricetina mostrou que o aumento do tempo de vida causado no *C. elegans* foi associado com a redução da formação de espécies reativas de oxigênio, expondo uma possível interação entre flavonoides e estresse oxidativo, e que este efeito foi modulado pela via DAF-16 (Büchter *et al.* 2013).

## 4.5 Estresse oxidativo

Quando um elétron encontra-se sozinho em um orbital atômico, ele é considerado desemparelhado. Espécies que contenham um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada de valência são chamadas de radicais livres (RLs) e geralmente são altamente reativas (Halliwell & Gutteridge, 1990).

Durante processos fisiológicos, ocorre a produção de espécies reativas (ERs), essa produção constitui um processo contínuo, envolvendo algumas funções biológicas relevantes. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. Sua produção, em proporções adequadas, possibilita a geração de energia na forma de ATP como, por exemplo, por meio da cadeia transportadora de elétrons (Ferreira *et al.*, 1997; Shami *et al.*, 2004).

Quando em excesso, essa produção pode causar dano oxidativo a muitas biomoléculas. Uma situação onde há um desequilíbrio entre a geração de radicais livres e o sistema de defesa antioxidante é conhecida como estresse oxidativo. Esse processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos, podendo, se não combatido, levar à morte celular (Halliwell *et al.*, 2004; Barbosa *et al.*, 2010). A produção de espécies reativas pode levar a danos oxidativos em proteínas, membranas e DNA. Além disso, ERs podem atuar nas vias de sinalização celular que modulam várias funções (Galley, 2011).

Para combater a produção excessiva de radicais livres, os organismos desenvolveram sistemas de defesa antioxidante, enzimáticos e não enzimáticos, e que tem basicamente o objetivo de limitar os níveis intracelulares dessas espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes (Ferreira *et al.*, 1997).

De acordo com Sies & Stahl (1995), antioxidante é definido por “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz”. Esses agentes reagem diretamente com as ERs, levando a formação de produtos menos reativos, e podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Sies, 1993; Halliwell e Gutteridge, 2007).

Os antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção do organismo. O primeiro mecanismo de defesa endógena contra as ERs é impedir a sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. São capazes de agir aos ataques das espécies reativas de oxigênio, impedindo sua formação ou sequestram-nas de forma a não permitir sua interação com alvos celulares (Rover Júnior *et al.*, 2001; Barbosa *et al.* 2010).

O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathiona Peroxidase (GPx). Essas enzimas agem impedindo e/ou controlando a formação de EROS. A SOD catalisa a dismutação do Ânion Superóxido em Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e Oxigênio, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), por sua vez pode ser convertido à  $2H_2O$  pela Glutathiona Peroxidase ou  $O_2 + H_2O$  pela Catalase ( Figura 1) (Ferreira *et al.* 1997b)

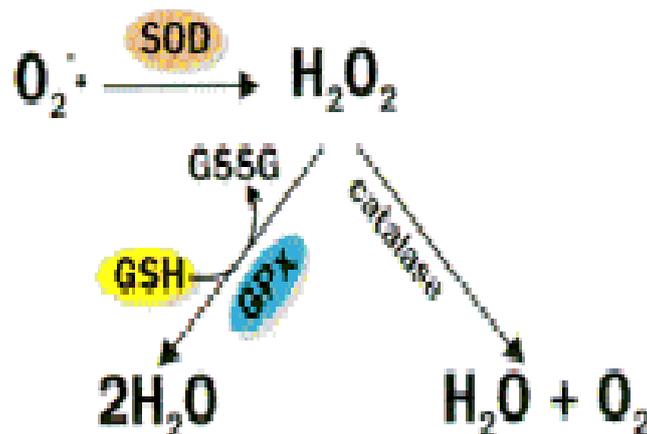


Figura 3: Sistema enzimático de Defesa Antioxidante- Modificado de R&D Systems.

O sistema de defesa não enzimático inclui especialmente antioxidantes de origem dietética, que são adquiridos principalmente a partir de frutas e vegetais, entre os quais se destacam: vitaminas como o ácido ascórbico (vitamina C), minerais e compostos fenólicos. O consumo de frutas e vegetais tem sido relacionado com a diminuição do risco do desenvolvimento de doenças associadas à redução da formação de ER (Pompella, 1997; Bianchi *et al.*, 1999; Barbosa *et al.*, 2010).

Os antioxidantes naturais, principalmente os advindos da dieta tem ganho espaço no âmbito da pesquisa. Alimentos que contêm antioxidantes naturalmente, mas não ricos em calorias, ou seja, frutas, legumes e grãos, ajudam a manter a saúde e retardar o início de doenças (Halliwell e Guteridge, 2010).

De modo geral, os polifenóis e em particular os flavonoides possuem estrutura ideal para o seqüestro de radicais, sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E (Barreiros *et al.* 2006). No que diz respeito às propriedades antioxidantes da erva-mate Schinella (2000) sugere que a ingestão de *Ilex paraguariensis* pode contribuir para aumento das defesas antioxidantes do organismo, minimizando os danos oxidativos associados à formação excessiva de ER de oxigênio/ nitrogênio.

#### **4.6 Da Universidade à Escola Básica: uma quebra de paradigmas**

A Universidade, desde o seu princípio, assume um papel ímpar no que diz respeito à produção e difusão de conhecimento. Boaventura de Sousa Santos (Santos, 1987) especula uma (segunda) ruptura epistemológica, que visa transformar o conhecimento científico em “senso comum”. Em outras palavras, ele está falando de divulgação científica, de tornar o cidadão que está fora do meio acadêmico consciente do conhecimento que se produz na universidade, a fim de participar ativamente dos benefícios de recursos destinados à pesquisa, bem como fazer uso desse conhecimento.

Para o mesmo autor, “o conhecimento deve ir para além do conhecimento Universitário, em termos unidade, e sim migrar para um conhecimento maior, que ele chamou de “pluriverstário” (Santos 2008)”.

Seguindo por essa linha de pensamento, a “Universidade” tem a função de reunir e transpor o conhecimento para a sociedade. Desta forma, medidas que aproximem esta do âmbito escolar, são requeridas, para estreitar estes laços de conhecimento e potencializar o ganho de experiências e aprendizado.

Nesse sentido, surge o vínculo entre a prática científica e a aprendizagem pedagógica na escola básica. Entre as experiências bem

sucedidas está o Departamento de Bioquímica Tuiskon Dick da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) que vem participando sistematicamente de projetos de integração educacional entre a universidade e a rede pública de ensino básico através da Rede Nacional de Educação e Ciência. Esse fato, além de consolidar as atividades de educação, de divulgação científica e integração com a rede pública de ensino básico, originou um Programa de Pós-Graduação em nível de mestrado no ano de 2005, e em nível de mestrado e doutorado a partir de 2008, com interação ampla entre UFRGS/UFSC/FURG.

Cabe destacar, que o conhecimento ofertado em sala de aula em muitos casos não atinge significativamente o aluno, seja no ensino fundamental ou na universidade. Entretanto, o mesmo deve tanger tudo aquilo que contribui para o crescimento e o desenvolvimento das pessoas. De acordo com Gil (1999, p. 19), “o ser humano valendo-se de suas capacidades, procura conhecer o mundo que o rodeia [...] desenvolvendo sistemas mais ou menos elaborados que lhe permitem conhecer a natureza das coisas e o comportamento das pessoas”. Então a busca do conhecimento pode ser adquirida de maneiras distintas, dentre as quais, embora não seja a única e nem a mais importante, destaca-se a experimentação científica como modalidade pedagógica.

Para Garcia (1988, p. 67) conhecer significa [...] descrever um fenômeno ou objeto, sejam em suas particularidades estruturais, seja em seus aspectos funcionais. Ou seja, por meio da prática experimental desenvolvemos essas habilidades e tornamos o conhecimento fruto de nossas observações, descrições, comparações e manipulações de objetos ou fenômenos. Essa ideia é confirmada por Andrade (2001, p. 121) que classifica a pesquisa como conjunto de procedimentos sistemáticos, baseado no raciocínio lógico, que tem por objetivo encontrar soluções para problemas propostos, mediante a utilização de métodos científicos.

As atividades da universidade podem contribuir também para a atualização dos professores que, se prende ao livro didático e, muitas vezes, estão despreparados para abordar um ensino que contextualize os conceitos

apresentados nos livros com as novidades tecnológicas que permeiam a sociedade (Coutinho, 2010).

Estudos com humanos recomendam que a aprendizagem nas crianças ocorra em meio prazeroso e motivador, por influenciar não apenas para aquele momento da formação, mas também outros níveis de ensino. Neste sentido, a participação em experimentos científicos pode incentivar a reflexão sobre os temas propostos, estimulando cognitivamente os alunos e otimizando a aprendizagem escolar através do interesse pelo conhecimento.

A partir desses pressupostos, o presente estudo, é parte de uma parceria com outras instituições de ensino, como a UFRGS e UFSM, de onde vem o projeto principal, que visa integrar os avanços nas áreas da prática pedagógica e criar um espaço na escola para atividades experimentais que visem às descobertas científicas para alunos do ensino básico.

## 5 MANUSCRITOS CIENTÍFICOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão representados sob a forma de dois manuscritos científicos, que se encontram organizados nos itens 5.1 e 5.2.

O manuscrito 1, apresenta os resultados relacionados com a análise dos efeitos dos extratos de erva mate (*Ilex paraguariensis*) de Argentina, Brasil e Uruguai, obtidos na forma como a população habitualmente consome, no nematoide *C. elegans*. Este manuscrito foi submetido à revista: **Journal of Ethnopharmacology**, que tem fator de impacto 2.755, e está apresentado de acordo com as normas desta revista.

O manuscrito 2, apresenta os resultados referentes à proposta de metodologia diferenciada para o Ensino de Ciências e traz as concepções dos alunos após a exposição do ciclo de vida do *C. elegans*, através de intervenções realizadas em uma escola de baixo IDEB do município de Uruguaiana-RS. Este manuscrito foi submetido à revista: **Revista Electrónica de Enseñanza de las Ciencias**, e encontra-se apresentado em concordância com as normas desta.

Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios manuscritos.

**5.1 MANUSCRITO 1: *Ilex paraguariensis* extracts increase lifespan and resistance against oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*: role of DAF-16 pathway**

***Ilex paraguariensis* extracts increase lifespan and resistance against oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*: role of DAF-16 pathway**

Maria E. de Lima<sup>ab</sup>, Ana Z. C. Colpo<sup>ab</sup>, Willian G. Salgueiro<sup>a</sup>, Guilherme E. Sardinha<sup>a</sup>, Daiana Silva Avila<sup>ab</sup>, Vanderlei Folmer<sup>b\*</sup>.

<sup>a</sup>Grupo de Pesquisa em Bioquímica e Toxicologia em *Caenorhabditis elegans* (GBToxCE), Universidade Federal do Pampa, CEP 97500-970, Uruguaiiana, RS, Brazil

<sup>b</sup>Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa, CEP 97500-970, Uruguaiiana, RS, Brazil

**\*Corresponding author:** Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), 97500-970, Uruguaiiana, RS, Brazil. Phone: 55-55-3413-4321/ FAX: 55-55-3413-4321. E-mail: [vanderleifolmer@unipampa.edu.br](mailto:vanderleifolmer@unipampa.edu.br)

Dear Dr.Folmer,

Your submission entitled "Ilex paraguariensis extracts increase lifespan and resistance against oxidative stress in Caenorhabditis elegans: role of DAF-16 pathway" has been received by journal Journal of Ethnopharmacology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/jep/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Journal of Ethnopharmacology.

Dear Dr. Folmer,

Your submission entitled "Ilex paraguariensis extracts increase lifespan and resistance against oxidative stress in Caenorhabditis elegans: role of DAF-16 pathway" has been assigned the following manuscript number: JEP-D-13-02554.

## Abstract

Ethnopharmacological relevance: *Ilex paraguariensis* infusions are widely used as a stimulant and there are many reports of the beneficial effects that the mate can provide to human health.

## Aim of the study

*Ilex paraguariensis*, popularly known as yerba mate, is used to prepare a peculiar drink in South America. The present study was conducted to investigate the effect of acute exposure to extracts of different herbs (*I. paraguariensis*) on behavior, reproductive and survival parameters as well as verify in extracts could protect against the toxic effects induce by paraquat in *Caenorhabditis elegans*.

## Materials and Methods

Herbs were purchased from Argentina, Brazil, and Uruguay. Aqueous extracts of herbs were obtained by mimicking the mate preparation by the population. We tested survival, reproduction, locomotion and longevity in the wild type strain N2. To induce the oxidative damage we used paraquat. The ROS level was measured by known test DCF-DA. To verify the subcellular localization of DAF-16, we used a GFP-tagged transgenic strain. The expression SOD-3 (superoxide dismutase) and CTL-1, 2 and 3 (catalase) was held by fluorescence microscopy.

## Results

*Ilex paraguariensis* extracts significantly increased the life span of nematode *C. elegans*. Moreover, the extracts reduced the ROS formations *per se*, and the changes on survival and reproduction rate induced by paraquat exposure. Regarding the molecular mechanisms, it was observed that the groups pre-treated with extracts had a greater translocation of the transcription factor DAF-16 to the nucleus. However, this effect was not observed by increasing in the accomplisher expression of antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase.

## Conclusion

Our results suggest that the increase of lifespan caused by the different extracts are associated with the DAF-16 pathway modulation and is not mediated by a direct antioxidant activity of the extracts. However, the antioxidant propriety of extracts may be contributing.

Keywords: Longevity, Reactive species, lifespan, yerba mate, 2',7' dichlorofluorescein diacetate

## 1- Introduction

*Ilex paraguariensis*, popularly known as yerba mate, is a tree species native from South America used to prepare a peculiar drink. In countries as Argentina, Brazil, Uruguay and Paraguay, where it is customarily consumed, receives different names such as "mate", "tererê" or "chimarrão" (Bracesco *et al.* 2011; Berté *et al.* 2011). Among the bioactive compounds present in yerba mate, there are phenolic compounds, saponins, xanthines, minerals and vitamins. The properties of these compounds are well documented and are recognized by their antioxidant, antiinflammatory, antimutagenic, anti-glycation and weight reduction properties (Bracesco *et al.*, 2003; Filip *et al.* 2001; Matsumoto *et al.* 2009). Although some of these effects have been described in humans, the mechanisms involved are not yet fully elucidated. The antioxidant activity of the yerba mate may be directly related to the effects reported above, once it's bioactive compounds can protect from the free radicals reactivity. It is generally accepted that free radicals play an important role in the development of tissue damage and pathological events in living organisms (Marroni *et al.*, 2002; Halliwell *et al.* 2007).

Recently, there is great interest in studying natural compounds that assist in preventing and / or mainte a healthy lifespan ("healthspan") in humans. *C. elegans* emerges as an alternative model that enables well-characterized toxicological studies before human clinical trials, thus avoiding possible risks. *C. elegans* is a free-living nematode of little economic importance, found in soil rich in organic matter. Experimentally, it has the advantage of being a simple animal, with a nervous system, reproductive system, and alimentary canal in a small worm(adults are ~1.2 mm in length) allowing it to be handled like a microorganism, with the convenience and low cost that these advantages imply. The advantages to use this nematode are that it has a rapid life cycle and short life-span; a pattern of senescence characterized and the possibility of fluorescent markers at interest genes, which can be observed in animals alive (Mejia *et al.* 2007; Ávila *et al.* 2010).

Among these genes, we mention the DAF-16, which is a factor transcript homologous to transcription factor FOXO (humans). The DAF-16 transcription factor functions as a that acts towards insulin/IGF-1 signaling, responsible for regulating

various biological processes such as longevity, lipid reserves, reproduction, stress response, thermotolerance, resistance pathogens, metabolism and autophagy (Brenner *et al.* 1974). This gene is regulated by a surface receptor, DAF-2 (Murphy *et al.* 2003). It's activity triggers a cascade of phosphorylation that phosphorylates AKT protein and this in turn phosphorylates DAF-16, thereby preventing its translocation to the nucleus. When this response is prevented from operating, by removal or inhibition, the DAF-16 remained unphosphorylated and therefore translocates to the nucleus where it activates the transcription of genes pro longevity, as the SOD-3 CTL-2 1 CTL-and TLC-3, which in turn will encode antioxidant enzymes such as superoxide dismutase and catalase (Vanfleteren *et al.* 1993; Honda *et al.* 1999).

Our driven hypothesis is that the variations of the total polyphenol content in the herbs composition may be due to changes in the cultivation and storage and in the manner of the beverage preparation. Furthermore, we consider that the sequential extractions, that occur along consume may influence the concentration of the substances extracted and the antioxidant potential of the beverage. In this sense we suppose that variations in the concentration of substances can cause changes in lifespan and resistance against oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*, this being an important step towards understanding the influence of these compounds on health. Based in the considerations cited above, this study aimed:

(I) Verify if there is some degree of toxicity, and to investigate whether the extracts of *Ilex paraguariensis* can alter the life of the nematode *C. elegans*;

(II) Analyze whether the extracts of *Ilex paraguariensis* can cause changes in reproduction and / or locomotor activity of *C. elegans*;

(III) Investigate whether the extracts of *Ilex paraguariensis* protect from toxic effects induce by Paraquat exposure;

## 1- Methods

### 2.1- Chemicals

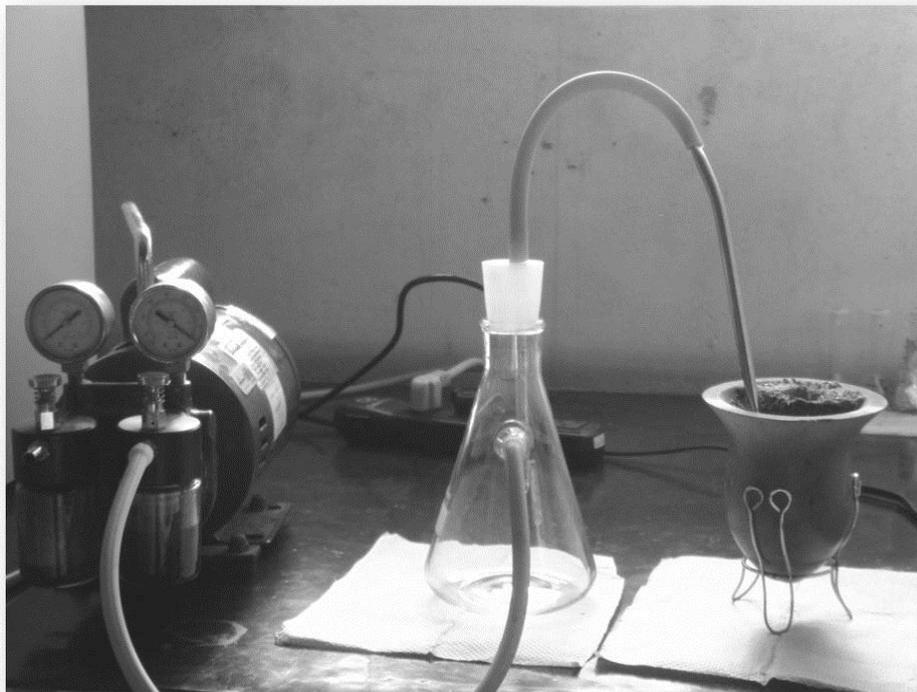
All reagents were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) or from local suppliers.

### 2.2- Yerba- mate

To develop this study were used herbs purchased in markets. Three different brands acquired in Argentina, three in Brazil and three in Uruguay. In the choice of herbs it was considered "traditional" presentation form. The herbs being named Ar 1, Ar 2 and Ar 3 to Argentine brands, Br 1, Br 2 and Br 3 to Brazilian brands and Uy 1, Uy 2 and Uy 3 to Uruguayan brands.

### 2.3- Obtaining extracts

The aqueous extracts were obtained mimicking the "mate" preparation (as can be seen in Figure 1) , by its addition in a medium size gourd, with the amount of yerba enough to occupy one third of the volume of the bowl (85 g), the free volume was completed successively with water (70 ml) at 80°C. The water in the bowl remained in contact with the herb for 1 minute and right after the water was sucked through a "pump" mate attached to a suction system. The extracts from the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 5<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> infusions (mate) were filtered, and stored for subsequent experiments. The number 15 is equivalent to kill 1L of water amount usually consumed by people taking mate.



**Figure 1:** Extraction method – mimicking the "mate" preparation.

#### 2.4- Strains and growth conditions

*C. elegans* strains were routinely propagated at 20 °C on Nematode Growth Medium (NGM) plates containing a lawn of *Escherichia coli* strain *OP50* as a food source (Brenner *et al.* 1974). Strains used in this study were: N2 (var. Bristol); TJ356, zls356[(Pdaf-16::daf-16::GFP);GA800,wuIs151[(ctl-1+ctl-2+ctl-3;myo-2::GFP)] and CF1553,muIs84([Psod-3::GFP]).The strains and the *OP50* bacteria were obtained from the Caenorhabditis Genetics Center.

#### 2.5- Extracts pré-treatment

Two thousand synchronized L1 worms per mate were treated at 22 °C for 30 min by constant agitation in a rotator with each of the extracts of *Ilex paraguariensis*, of different nationalities, followed by three washes with 85 mM NaCl solution at the end of the incubation. Worms were placed on *OP50*-seeded NGM plates and the number of surviving worms on each dish at 24 h post exposure was counted.

#### 2.6- Paraquat exposure

For induce toxic effects in *C. elegans*, two thousand synchronized L1 worms were exposed at Paraquat (Gramoxone 200 ®) as pro-oxidant agent at the concentration of 1mM for 30min, after the pre-treatment with extracts of *Ilex paraguariensis*, followed by three washes with 85 mM NaCl solution at the end of the incubation. After the worms were transferred to NGM plates, 24h after the alive worms were counted.

#### 2.7- Brood Size

After 24h of acute exposure at extracts of *Ilex paraguariensis* or at extracts followed by Paraquat, worms were individually transferred to new NGM plates seeded with *OP50*. For assessing brood size, nematodes were monitored and transferred to a new plate every 1.5 days, and the total number of eggs released on the plates was scored (Guo *et al.*, 2009). The data were expressed as percent of control. The experiments were repeated triplicates in three independent worm preparations.

#### 2.8- Behavior

The behavioral parameter was performed to evaluate the motor activity of worms treated only with extracts of *Ilex paraguariensis*. For motor activity, the animals

were transferred to NGM plates without *OP50* and used the new card for 1 minute. Soon after, the number of times that the animal moved its head upwards during the movement were counted for 1 minute (head trashes).

## 2.9- Lifespan experiments

We have chosen to test whether the 1 ° and 15 ° mates best weed every nationality in the strain N2 (Bristol). After the acute exposure at *Ilex paraguariensis* extracts, live and healthy-looking worms (around 20 per condition; in duplicates) were collected on the same day at the late L4 stage and transferred every 2 days to new *OP50*-seeded NGM/FUDR (5-fluoro-2'-deoxy-uridine, Sigma) plates. Survival was assessed each day until all the worms died. All tested *C. elegans* strains were assessed in parallel and each experiment was performed three times. Plotted curves represent averages of those three independent experiments.

## 2.10- ROS measurement

After the treatment only with extracts of *Ilex p.* the worms were washed two additional times in Saline buffer and were transferred to a 96-well plate and were added 2'7' dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) at a final concentration of 3,25mM and their fluorescence levels were measured (excitation: 485 nm; emission: 535 nm), as previously described by Liao *et al.* (2011) with modifications, using a plate reader CHAMELEON™V Hidex Model 425-106, pre-heated at 37°C. The fluorescence from each well was measured for 120 min at 10 min intervals. Fluorescence measurements were normalized to time zero values and rates of increase or decrease in fluorescence (reflecting ROS levels) were expressed as percent control. The experiments were performed in triplicates in three independent worm preparations.

## 2.11- Fluorescence quantification

After the pre-treatment with different extracts the GFP expressing strains (CF1553 [muls84], GA800 [wuls154]) were transferred right after the end of the washes into 200µL Saline buffer in a well of 96-well plate. Total GFP fluorescence was measured using 485 nm excitation and 530 nm emission filters. Overall GFP fluorescence of GFP-expressing populations was assayed using a plate reader CHAMELEON™V Hidex Model 425-106. All experiments were made in duplicates and repeated at least four times.

### 2.12- Epifluorescence microscopy

For each slide, at least 30 worms, of strain TJ356, previously exposed at extracts, as a described, were mounted on 2% agarose pads and anaesthetized with few drops of levamisole 22.5 $\mu$ M. Fluorescence observations were performed under epifluorescence microscopy; housed in air-conditioned rooms (20-22°C) for image acquisitions and scoring the expression levels.

### 2.13- Statistical analysis

For survival and longevity analysis we performed a dose-response curve and plotted sigmoidal dose response curve using nonlinear regression followed by Bonferroni post hoc test. For the other analysis one-way ANOVA followed by post hoc Dunnet. For all the experiments, the effects of *Ilex p.* treatment were compared to untreated controls assayed in parallel. P values <0.05 are considered statistically significant. In all figures, error bars represent the standard error of the mean. The analyses were performed using GraphPad Prism version 5 for Windows (GraphPad Software, USA).

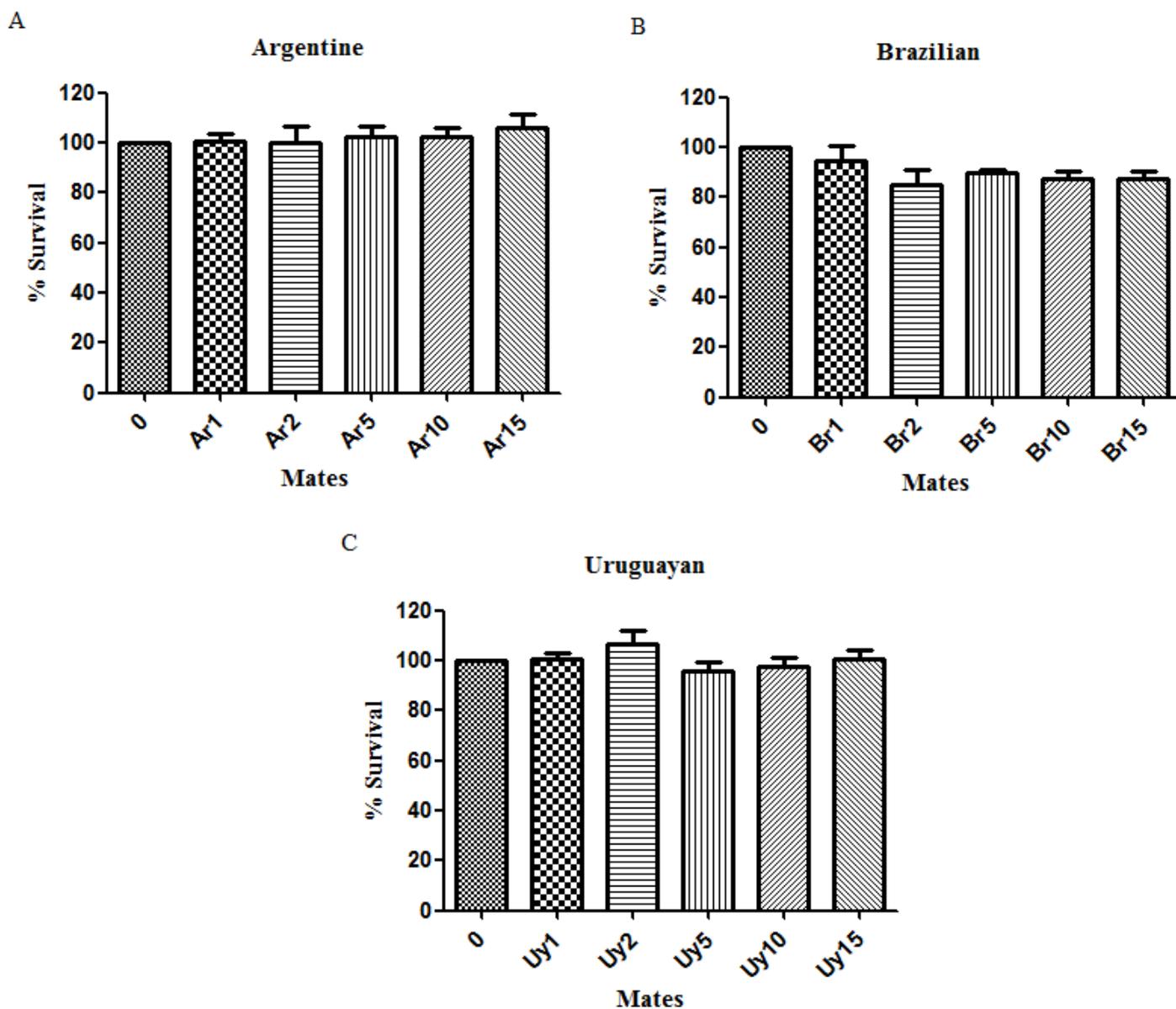
## 2- Results

<b>Total Phenolic Compounds mg/mL GAE</b>	<b>Argentine</b>	<b>Brazilian</b>	<b>Uruguayan</b>
<b>M1</b>	7,11	7,98	10,33
<b>M2</b>	9,67	5,99	14,51
<b>M5</b>	6,94	4,59	12,33
<b>M10</b>	3,59	3,38	5,47
<b>M15</b>	2,21	1,91	5,14

**Table 1:** Total phenolic compounds in sequential extractions performed with herbal of different nationalities, expressed in mg/ml galic acid equivalent. This previous study analyzed the extracts of *Ilex paraguariensis* used in this manuscript (Colpo, 2012).

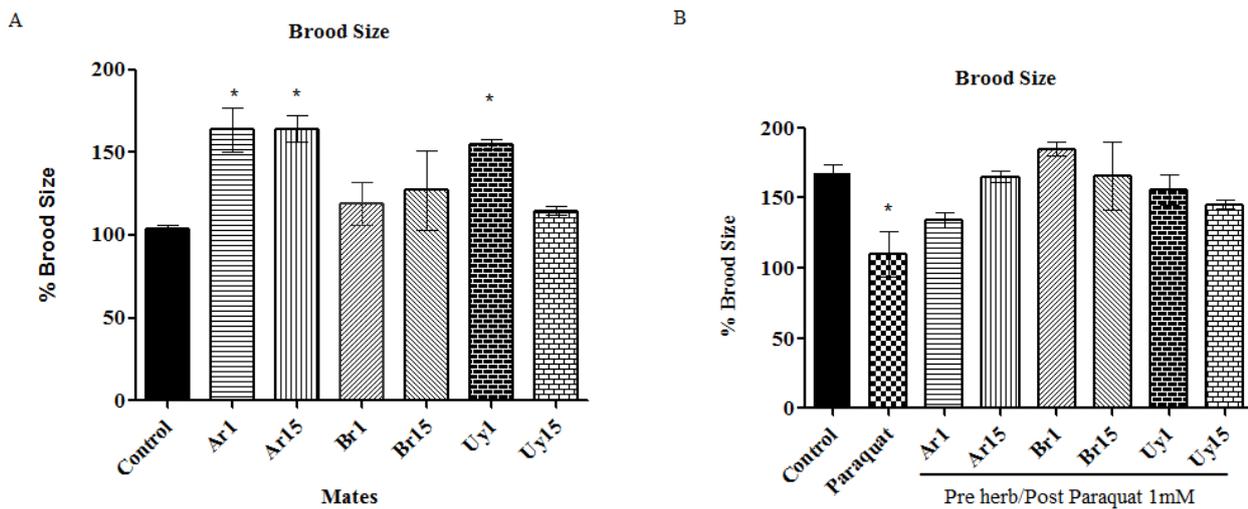
### 3.1- *Ilex paraguariensis* extracts did not cause toxic effects in *C. elegans*

The figure 2 shows that the acute exposure to the different extracts did not alter the survival rate of the nematode *C. elegans*, at any of the concentrations tested. As we did not observe toxic effects any tested concentrations, we decided to study extracts 1° and 15° of *Ilex paraguariensis*.



**Figure 2:** Percentage of surviving worms after acute exposure to extracts of *Ilex paraguariensis* or control (NaCl). There was no difference between the survival of treated compared to control in any of the nine tested herbs. The figure is representative with one herb of each nationality, but all showed similar behavior. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM.

In addition, the extracts did not change the motor activity of the worms, with relation of head trashes (data not shown). Moreover, to reproductive the first extract of mate herb Uruguay (Uy1), and the first and last extracts of Argentine herb (Ar1, Ar15) increased brood size of *C. elegans* ( $p < 0.05$ ). However, when the nematodes were pre-exposed to extracts and post-exposed to paraquat (1mM), were able to protect the reduction of brood size caused by paraquat ( $P < 0,05$ ) to the control levels (Figures 3A and 3B).

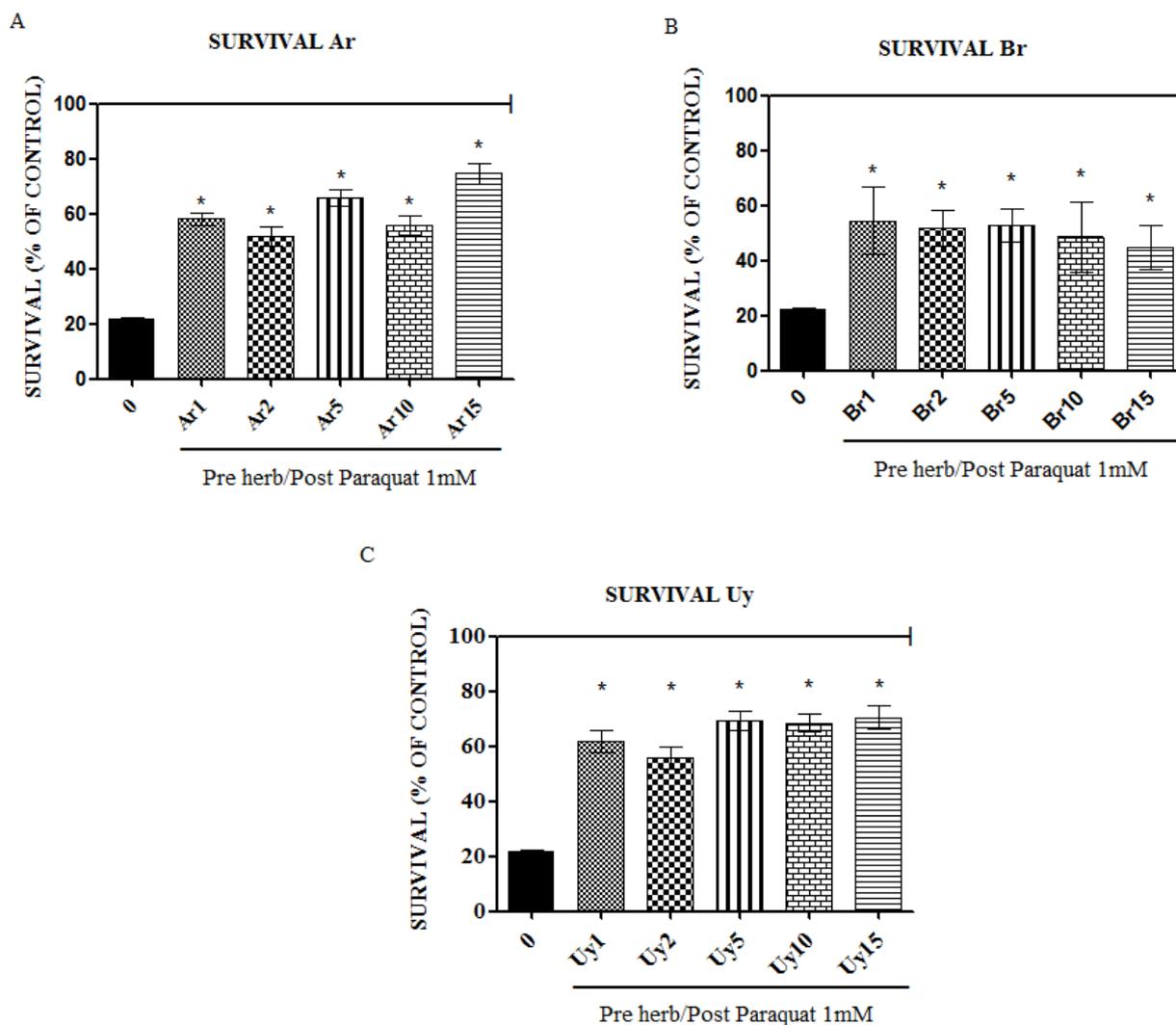


**Figure 3:** Reproduction parameter of worms pre-treated with *Ilex paraguariensis* and exposed to Paraquat (1mM). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* indicates  $p < 0.05$  as compared to control.

### 3.2- *Ilex paraguariensis* extracts exert a protective activity against the toxic effects induced by Paraquat in *C. elegans*

To examine whether the extracts of *Ilex paraguariensis* could exert antioxidant activity in *C. elegans*, we utilize the paraquat, a known superoxide generator, to cause toxic effects in *C. elegans*.

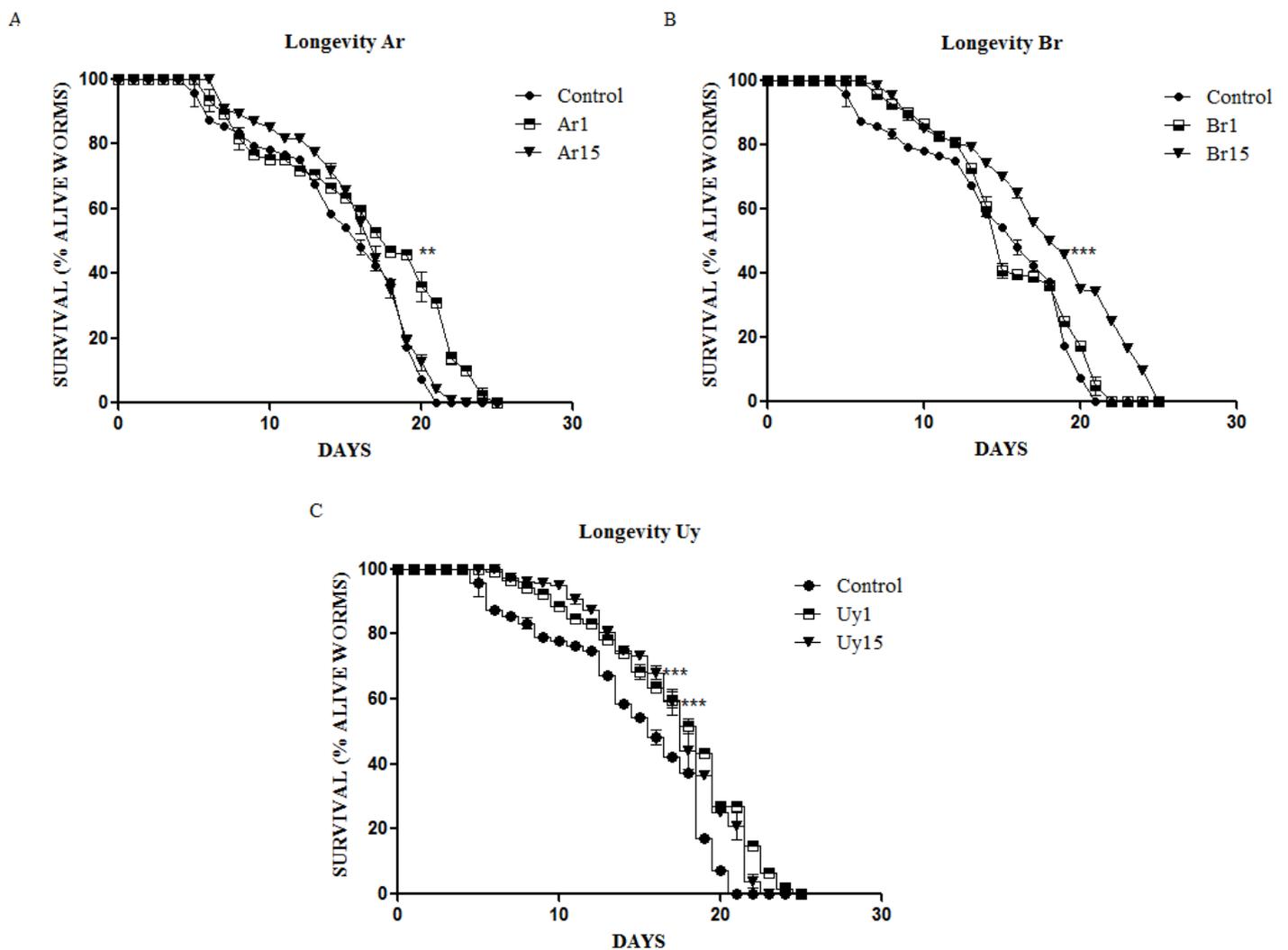
Our results showed that all extracts were able in protecting the nematode *C. elegans*, of mortality induce by paraquat. The survival rate of worms pre-treated with extracts was of 20 to 60% higher compared with those not treated, as can be seen in Figure 4.



**Figure 4:** *Ilex paraguariensis* extracts protect of the survival reduction caused by Paraquat. The line indicates the control group (100%). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* indicates statistical difference ( $p < 0.05$ ) from PQ(1mM) group.

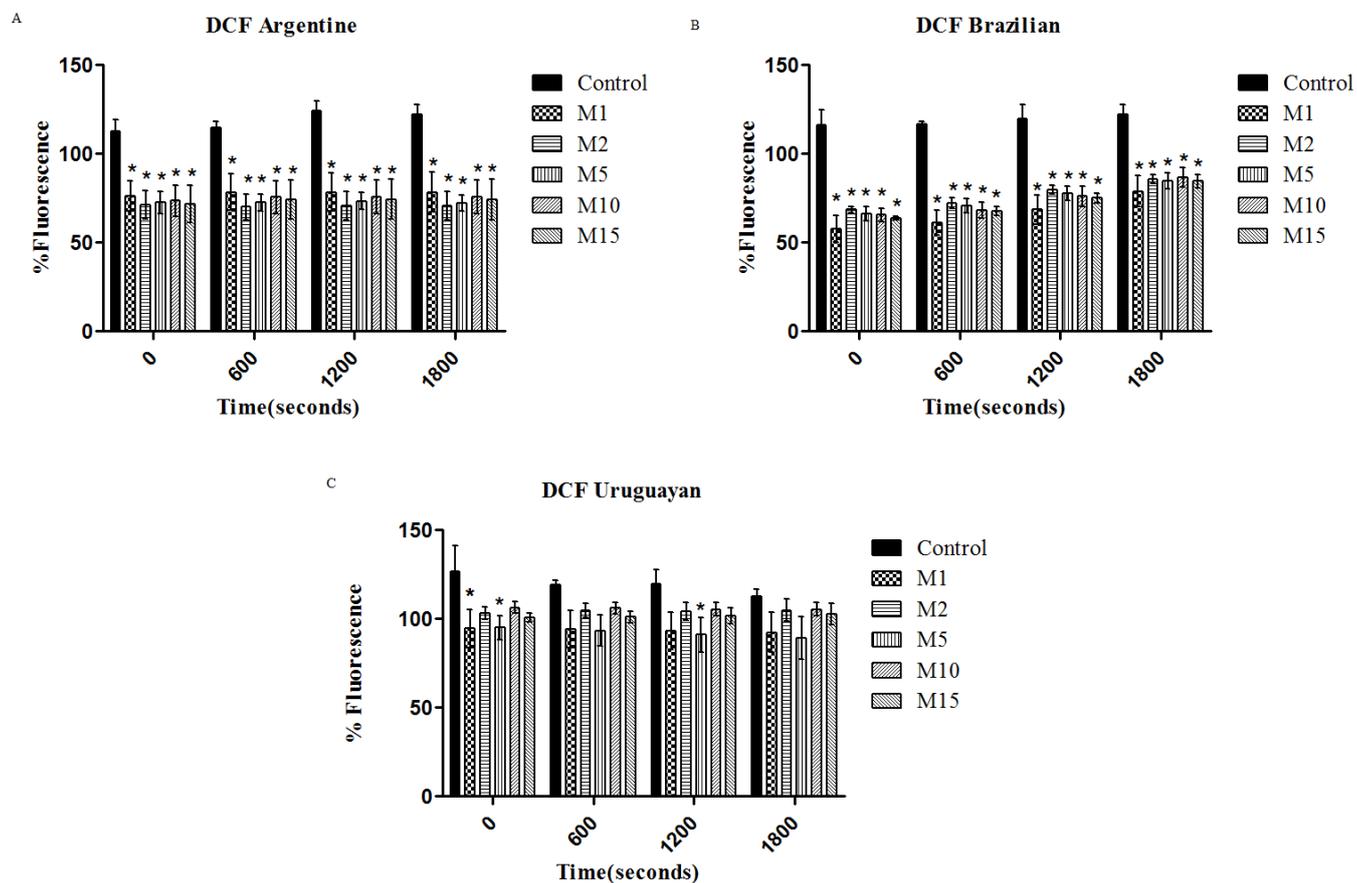
### 3.3- *Ilex paraguariensis* extends *C. elegans* lifespan

Considering that the oxidative estress accelerates aging processes and the antioxidant properties of *Ilex paraguariensis* has been described in the literature we evaluate the effects of extracts (1 and 15) on *C. elegans* lifespan. Our results show that the extracts Uy1, Uy15, Ar11 and Br15 (Figure 5) were able in increasing significantly the lifespan of *C. elegans* when compared to control exposed only to buffer saline.



**Figure 5:** Lifespan of worms treated with extracts (m1 and m15). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*\* indicates  $p < 0.05$  and \*\*\*  $p < 0.001$  as compared to control group.

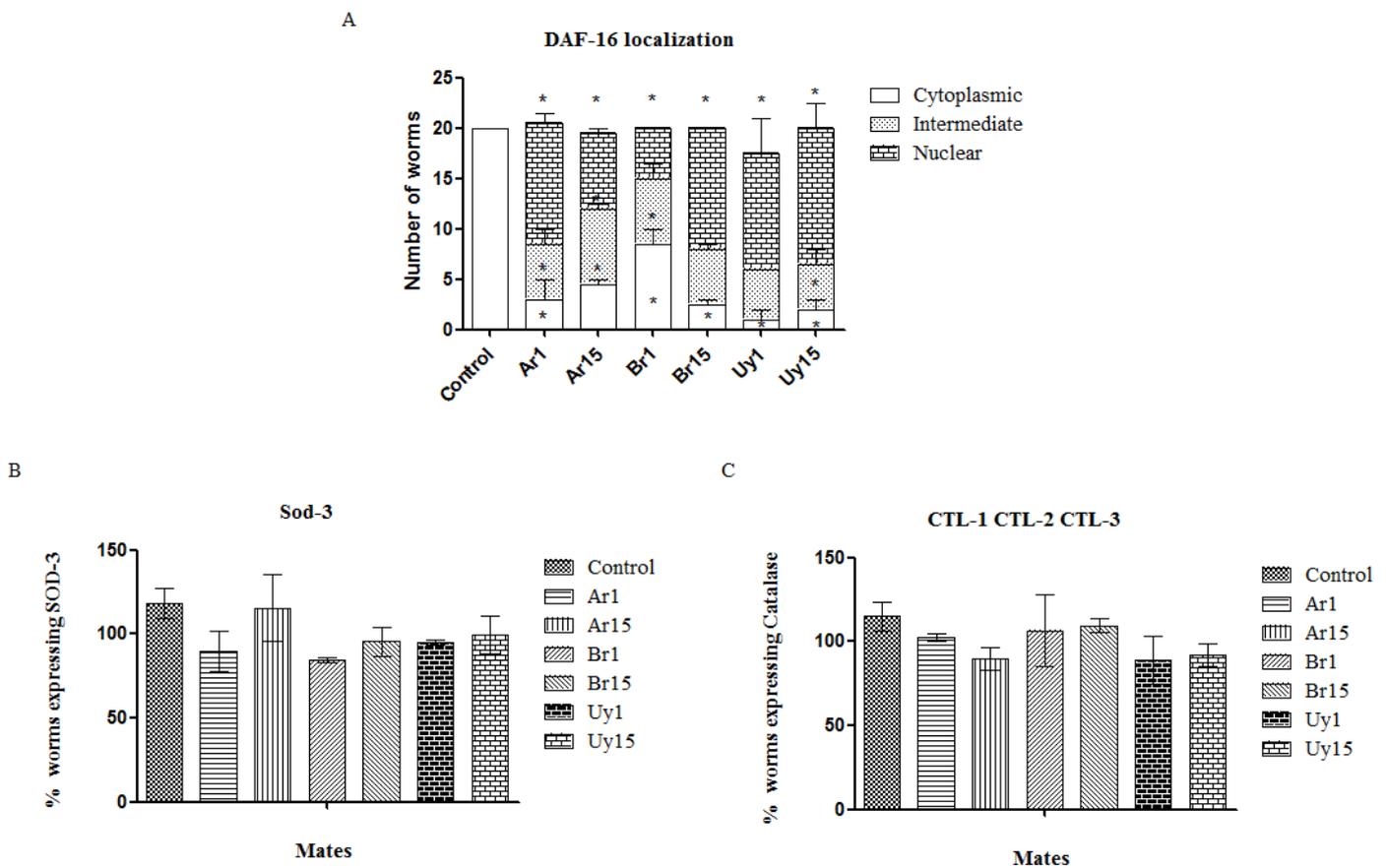
Moreover, all extracts of Argentine and Brazilian herbs exercised scavenger activity measured by DCF-DA the method (Figure 6).



**Figure 6:** *Ilex paraguariensis* extracts reduce the ROS levels. Data are expressed mean  $\pm$  SEM. \* indicates  $p < 0.05$  as compared to controls.

### 3.4- The extracts increased the migration of DAF-16 into the nucleus

The acute exposure to all extracts was able to enhance nuclear localization of DAF-16 (Fig.7A), especially those that increased the lifespan of nematodes, but it does not increase the expression of catalase (CTL-1 CTL-2 CTL-3) or the superoxide dismutase-3 (SOD-3), antioxidant enzymes that are targets of DAF-16 (Fig.7B and 7C).



**Figure 7:** *Ilex paraguariensis* extracts on the nuclear migration of transcriptional factor DAF-16(A), fluorescence intensity of SOD-3 (B) and CTL1;CTL-2;CTL-3 (C) in *C. elegans*. Figure 6 A: \* indicate  $p < 0,05$  compared to the same location of the control group, Data are expressed as mean  $\pm$  SEM.

## Discussion

*Ilex paraguariensis* is used to prepare the “mate”, a traditional drink much appreciated in the countries of South America (Bracesco *et al.* 2010, Berté *et al.* 2011). The present study showed that herbs from different nationalities, extracted mimicking the manner people consume the mate, protected the nematode *C. elegans* from the toxic effects and increased its lifespan. These beneficial effects of the extracts might be correlated with its high levels of polyphenols and flavonoids, as shown by a previous study from our group (Colpo, 2012).

Most studies with yerba mate are performed by isolating some of its main constituents or by preparation of ethanolic extracts (Bracesco *et al.* 2011). Notably, this present study used an extraction method that is performed and traditionally consumed daily by the population. Many effects of *Ilex paraguariensis* have been already found well described in the literature, especially the antioxidant (Bracesco *et al.* 2011). Thus, the present study evaluated the commercial yerba mate and sought to perform extraction in a similar manner as that is prepared and consumed by the population. In southern Brazil formed a triple border with Argentina and Uruguay, and in these regions the "mate" is seen as a social habit where people make conversation wheel while enjoying its bitter taste, as it is known. Considering the culture; relevance of its use, studies like this, which evaluate the *in vivo* effects of *Ilex paraguariensis*, may help to transpose this knowledge to the population.

Many studies have been conducted with *C. elegans* to examine whether fruit and plants used by the population may exert beneficial effects in this model (Wilson *et al.* 2006, Wiegant *et al.* 2009; Guha *et al.* 2012). A classic example was reported by Zarse *et al.* (2009) who used a compound isolated from green tea, L-theanine, and found that treatment with this compound increased significantly the lifespan in *C. elegans*. Similarly, Fan *et al.* analyzed the effects of the extract of spinach in lifespan, thermal and oxidative stress in *C. elegans*, and verified that the extract increased the survival and a greater protection against the two types of stress. The replacement by antioxidants vegetables which may be acquired by the diet is becoming ideal.

This study showed for the first time that treatment with extracts of *Ilex paraguariensis* was able to extend the average life span of the nematode *C. elegans*. Notably, the extracts protected worms from the toxic effects caused by pro-oxidant paraquat.

According to the free radical theory of aging, oxidative stress is directly related to the reduction of the lifetime in model organisms (Halliwell *et al.* 2007a). Some of our extracts caused a significant increase in lifespan of *C. elegans*, therefore, we seek to find out whether this effect could be related to the reduction in the level of reactive species or reduction / attenuation of oxidative stress in nematodes. The extracts caused a decrease in ROS levels *per se*, and increased survival of the nematode after exposure to paraquat. This result can be partially explained by the amount of phenolic compounds present in the extracts that should be exerting its antioxidant activity (Colpo, 2012). Some extracts with lower content of polyphenols significantly increased the lifespan in *C. elegans*, in contrast to those with higher amount that did not show this effect. On that basis, we believe that there is an interaction between molecular pathways, such as the DAF-16 cascade, and antioxidant effects of the extracts.

DAF-16 is a transcription factor homologous to the human FOXO, belonging to the IGF-1/insulin-like signaling pathway, in which it is the central determinant of the endocrine control of stress response, aging, fat metabolism, fertility, and diapause in *C. elegans*. When the worm is submitted to stress or caloric restriction situations, DAF-16 migrates into the nucleus and may modulate the transcription of antioxidant enzymes such as SOD-3, CTL-1 and CTL-2 (Vanfleteren *et al.* 1993; Honda *et al.* 1999; Murphy *et al.* 2003).

We used a strain which has a GFP transgenically fused to the DAF-16 to verify whether the treatment with the extracts of *Ilex paraguariensis* would increase the factor translocation to the nucleus of the cell, and in turn, the target genes, responsible for the increased lifespan and resistance to stress in *C. elegans* would be transcribed. Interestingly, we noted that the same extracts that significantly increased the lifespan of *C. elegans* also increased the translocation of DAF-16 to the nucleus. On the other hand, the exposure to the different extracts did not increase the expression of superoxide dismutase and catalase antioxidant enzymes. However, the DAF-16 also receives input from various other pathways that regulate the lifespan, such as the JNK pathway (Oh *et*

al, 2006), and these pathways may be helping in this effects, but, due the technical restrictions we could not assay them.

Buchter et al. (2013) found that the flavonoid myricetin significantly increased the life of the nematode *C. elegans*, and in consonance with our results, concluded that the effect of myricetin in *C. elegans* lifespan is dependent on DAF-16 and not mediated by anti-oxidative property of the flavonoid. Similarly, Duha *et al.* (2012) suggested that cranberry supplementation confers increased longevity and stress resistance in *C. elegans* through pathways modulated by DAF-16 and OSR-1 (osmotic stress resistant-1). Since the insulin/IGF-like signaling (IIS) cascade is a key regulator of lifespan, Grunz *et al.* (2012) tested isolated structures of some flavonoids and found an increased DAF-16 translocation and SOD-3 promoter activity were observed with all flavonoids but was independent of their ROS scavenging capability and their effects on lifespan.

In summary our results showed that extracts of different nationalities of *Ilex paraguariensis*, extracted in the same as way people habitually consume, were able to increase the lifespan of the nematode *C. elegans*, an effect that was associated to the reduction of ROS levels and to the activation of the transcription factor DAF-16. Furthermore, the extracts protected against the toxic effects of paraquat, which is a superoxide generator and a very toxic pesticide. Notably, although some extracts have high phenolic composition, they did not depict increase on *C. elegans* lifespan. We suggest that the effects mentioned above may result of an association between the modulatory role of the extracts on DAF-16 pathway and their antioxidant properties. As the migration of DAF-16 to the nucleus did not increase SOD and CAT levels, the exact mechanisms by which *Ilex paraguariensis* interacts with the insulin pathway to affect lifespan requires further analysis. Thus, in the future, we will examine other molecular pathways and / or genes involved in the effects reported in this manuscript.

#### 4- Acknowledgment

The authors are grateful to the FAPERGS, CAPES and CNPq for financial support for the development of study.

## 5- References

- Ávila D S, Benedetto A, Au C, Manarin F, Keith E, Soares F A, Rocha J B T, Aschner, M. 2010. Organotellurium and organoselenium compounds attenuate Mn-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans* by preventing oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* 52: 1903–1910.
- Berté, K. A. S., 2011. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Yerba-Mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., Aquifoliaceae) Extract as Obtained by Spray Drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v: 59, 5523–5527
- Bracesco N, Dell M, Rocha A, Behtash S, Menini T, Gugliucci, A.; Nunes E., 2003. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*, prevention of DNA double- strand breaks in *Saccharomyces Cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*
- Bracesco N., Sanchez A.G., Contreras V., Menini T., Gugliucci A., 2011. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *Journal of Ethnopharmacology*., doi:10.1016/j.jep.2010.06.032
- Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditiselegans*. *Genetics* 77:71–94
- Buchter, C.; Ackermann, D.; Havermann, S.; Honnen, S.; Chovolou, Y.; Fritz, G.; Kampkotter, A.; Wätjen, W., 2013. Myricetin-Mediated Lifespan Extension in *Caenorhabditis elegans* Is Modulated by DAF-16. *Int. J. Mol. Sci*, 14, 11895-11914
- Colpo, A.Z. C., 2012. Perfil fitoquímico e capacidade antioxidante de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hill.). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pampa - Programa de Pós Graduação em Bioquímica
- Fan, D.; Hodges, D. M.; Zhangc, J.; Kirby, C. W.; Ji, X.; Locke, S. J.; Critchley, A. T.; Prithiviraj, B. (2011) Commercial extract of the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* enhances phenolic antioxidant content of spinach (*Spinacia oleracea* L.) which protects *Caenorhabditis elegans* against oxidative and thermal stress. *Food Chemistry* 124; 195–202

Grunz, G.; Haas, K.; Soukup, S.; Klingenspor, M.; Kulling, S.E.; Daniel, H.; Britta, S., 2012. Structural features and bioavailability of four flavonoids and their implications for lifespan-extending and antioxidant actions in *C. elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development* 133; 1–10

Guha, S.; Cao, M.; Kane, R. M.; Savino, A.M.; Zou, S.; Dong, Y., 2012. The longevity effect of cranberry extract in *Caenorhabditis elegans* is modulated by daf-16 and osr-1. *AGE*; DOI 10.1007/s11357-012-9459-x

Guo Y., Yang Y., Wang D. 2009. Induction of reproductive deficits in nematode *Caenorhabditis elegans* exposed to metals at different developmental stages. *Reprod Toxicol*; 28:90-5

Filip,R.; Lopez P., Giberti G., Coussio J., Ferraro G.,2001. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia*72:774–8

Halliwell, B. & Gutteride, J.M.C., 2007. Free radicals in biology and medicine. New York, (capitols 3, 4, 5)

Halliwell, B.; Gutteride, J.M.C. 2007a. Antioxidant defenses: endogenous and diet derived. In *Free radicals in biology and medicine*, Ed. 4 , New York, 581pp

Honda, Y.; Honda, H., 1999. The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB journal* : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 13 (1999) 1385-1393

Liao, V.H., Yu, C.W., Chu, Y.J., Li, W.H., Hsieh, Y.C., Wang, T.T., (2011). Curcumin-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev* 132, 480-487

Marroni, N.P.2002. Dano oxidativo e regulação biológica pelos radicais livres. In *Estresse oxidativo e antioxidantes*. Ed.1, Ed. ULBRA, Canoas, RS, Brazil, 189 pp

Matsumoto, R.L.; Bastos, D.H.; Mendonça, S.; Nunes, V.S.; Bartchewsky, W.; Ribeiro, M.L.; De Oliveira, P.C. Effects of mate tea( *Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA

expression of antioxidant enzymes ,lipid peroxidation, and total antioxidants status in healthy young women. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v:57: 1775–1780, 2009

Mejia E.G., Heck C.I. 2007. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. *Journal of food science*. v: 72:138-151

Murphy, C.T.; Mc Carroll,S.A.; Bargmann, C.I.; Fraser, A.; Kamath, R.S.; Ahringer, J.; Li, H.; Kenyon, C., 2003. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 424 (2003) 277-283

Oh, S.K., Mukhopadhyay, A., Svzrikapa, N., Jiang, F., Davis, R.J., Tissenbaum, H.A., 2006. JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocationof forkhead transcription factor/DAF-16. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (12), 4494–4499

Vanfleteren, J.R., 1993. Oxidative stress and ageing in *Caenorhabditis elegans*, *The Biochemical journal*, 292 ( Pt 2) (1993) 605-608

Wiegant, F.; Surinova, S.; Ytsma, E.; Langelaar-Makkinje, M.; Wikman, G.; Post, J. A. 2009. Plant adaptogens increase lifespan and stress resistance in *C. elegans*. *Biogeroltology*. v: 10: 27-42

Wilson, M.A.; Shukitt-Hale, B.; Kalt, W.; Ingram, D.K.; Joseph, J.A.; Wolkow, C.A., 2006. Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 5 pp59–68

Zarse K., Jabin S., Ristow M. 2012. L-Theanine extends lifespan of adult *Caenorhabditis elegans*. *Europe Jornal Nutricion*. Doi: 10.1007/s00394-012-0341-5,20

## Glossary

ANOVA: analysis of variance;

CTL-1;CTL-2;CTL-3: catalase;

DCF-DA: 2',7' dichlorofluorescein diacetate;

GFP: green fluorescent protein;

“Mate”, “Tererê”: drink prepared with yerba mate consumed in South America;

ROS: reactive oxygen species;

SOD-3: superoxide dismutase.

## **5.2 MANUSCRITO 2: *Caenorhabditis elegans* Como Ferramenta Para o Ensino de Ciências na Escola Básica**

## ***Caenorhabditis Elegans* Como Ferramenta Para o Ensino de Ciências na Escola Básica.**

**Maria Eduarda de Lima, Andréia C. Fernandes Salgueiro, Cristiane Soares, Dandara Escoto, Geovana Pereira, Olavo Lopes, Daiana Ávila e Vanderlei Folmer**

Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, Campus Uruguaiana, Brasil. E-mails: [mduda\\_89@hotmail.com](mailto:mduda_89@hotmail.com); [acfsalgueiro@gmail.com](mailto:acfsalgueiro@gmail.com); [cristi.soa@gmail.com](mailto:cristi.soa@gmail.com); [dandaraescoto@gmail.com](mailto:dandaraescoto@gmail.com); [g\\_c.pereira@hotmail.com](mailto:g_c.pereira@hotmail.com); [professorolavolopes@hotmail.com](mailto:professorolavolopes@hotmail.com); [vanderleifolmer@unipampa.edu.br](mailto:vanderleifolmer@unipampa.edu.br)

**Resumo:** Sabendo – se da importância do Ensino de Ciências (EC) na escola básica e que este tem sido frequentemente conduzido de forma desinteressante e pouco compreensível, o presente trabalho teve como intuito principal apresentar uma proposta diferenciada para o EC e saúde nos anos iniciais do ensino fundamental utilizando como modelo o *Caenorhabditis elegans*, um nematoide de vida livre do solo largamente usado para pesquisas científicas. Participaram estudantes de 1º e 2º ano do ensino fundamental, totalizando 38 alunos. O delineamento experimental foi composto por um pré - teste, no qual foram analisadas as percepções dos alunos quanto à pergunta “O que é um verme?”, seguido por momentos de observações nas quais os alunos puderam acompanhar o ciclo de vida do nematoide em questão e registrar as observações em desenhos, e finalmente por um pós - teste, realizado 10 dias após o término das observações a fim de traçar as possíveis mudanças de impressões. Por fim, consideramos que métodos alternativos podem exercer influência positiva no aprendizado de ciências para crianças das séries iniciais, e que modelos como este devem ser propostos e colocados em prática para despertar o interesse dos alunos por todas as disciplinas da grade curricular.

**PALAVRAS CHAVE:** Ensino de Ciências; Experimentação; Métodos Alternativos; Nematoide; Anos Iniciais.

**Abstract:** Knowing the importance of Science Education (SE) in elementary school and that this has often been conducted so uninteresting and somewhat understandable, this work has primary intent to present a proposal for differentiated SE and health in the early years of teaching key using as a model the *Caenorhabditis elegans* a nematode free-living soil widely used for scientific research. Students participated from 1st and 2nd year of elementary school, totaling 38 students. The experimental design consisted of a pre - test, which analyzed the perceptions of students as to the question "What is a worm?" Followed by moments of observations in which students were able to follow the life cycle of the nematode in question and record observations in drawings, and finally a post - test, performed 10 days after the end of the observations in order to trace the possible changes of impressions. Finally, we consider alternative methods may have a positive influence on science learning for children of the lower grades, and models like this should be proposed and put into practice to arouse students' interest in all subjects of the curriculum.

**KEYWORDS:** Science Education; Experimentation; Alternative Methods; nematode; Early Years.

"A aprendizagem significativa implica sempre alguma ousadia: Diante do problema posto, o aluno precisa elaborar hipóteses e experimentá-las" (PCN, 1997).

## **Introdução**

### *Parâmetros Curriculares Nacionais e Ensino de Ciências na Escola Básica*

Os Parâmetros Curriculares Nacionais (PCN) são um conjunto de documentos que servem como referências de qualidade para os Ensinos Fundamental e Médio no Brasil. Elaborados pelos órgãos competentes do Governo Federal, têm por objetivos propiciar subsídios à elaboração e reelaboração do currículo escolar, tendo em vista um Projeto Político Pedagógico (PPP) construído em função da cidadania do educando.

De acordo com os PCN o ensino de Ciências, relativamente recente na escola fundamental, tem sido desenvolvido de acordo com diferentes propostas educacionais, que se sucedem ao longo das décadas como elaborações teóricas e que, de diversas maneiras, se expressam nas salas de aula (PCN, 1997). Assim, muitas práticas, ainda hoje, são baseadas na mera transmissão de informações, tendo como recurso exclusivo o livro didático e sua transcrição.

Desta forma, a despeito de sua importância, do interesse que possa despertar e da variedade de temas que o envolvem, o ensino de Ciências tem sido frequentemente conduzido de forma desinteressante e pouco compreensível (PCN, 2007). De fato, diante dos atuais modelos vigentes na escola básica para o trabalho do ensino de Ciências, nos deparamos com uma área pouco atrativa para estudantes e professores, isto é/ou parece ser reflexo da falta de ações e práticas inovadoras dentro e fora da sala de aula. Na tentativa de conciliar ciência, inovação e sociedade dentro da escola faz-se necessário buscar alternativas para o desenvolvimento de atividades que além de instigar os alunos façam com que os professores atualizem sua prática para que esta seja refletida em todas as suas ações dentro e fora do ambiente escolar.

Conforme os PCN (1997) se faz necessário que o ensino de Ciências no ensino fundamental seja compreendido e identificado pelos estudantes como parte fundamental para a construção de seu conhecimento e para o desenvolvimento de sua cidadania. Ainda, considerando-se a obrigatoriedade do ensino fundamental no Brasil, não se pode pensar no ensino de Ciências como propedêutico ou preparatório, voltado apenas para um futuro distante (PCN, 1997). O estudante não é só cidadão do futuro, mas já é cidadão hoje, e, nesse sentido, conhecer Ciência é ampliar a sua possibilidade de desenvolvimento intelectual e participação social, para assim viabilizar sua capacidade plena de exercício da cidadania (PCN, 1997). Nesta perspectiva, compreendemos que a escola é parte integrante no processo de cidadania do educando e que o ensino de Ciências tem a capacidade de integrar o aluno e fazer com que este interaja com o contexto social atual como um cidadão pleno, participativo e autônomo no que condiz à construção de seu conhecimento.

De fato, para Folmer *et al.* (2009), a participação do sujeito no processo de construção do próprio conhecimento, induz a mudanças de atitude e

aumenta a motivação pelo tema proposto. Desta forma, a orientação proposta nos PCN reconhece a importância da participação construtiva do aluno e, ao mesmo tempo, da intervenção do professor para a aprendizagem de conteúdos específicos que favoreçam o desenvolvimento das capacidades necessárias à formação do indivíduo (PCN, 2007).

Nomeadamente, o ensino de Ciências pode desenvolver um importante papel ao proporcionar ao educando uma ampla mostra de experiências. Isso pode fazer com que os estudantes passem a refletir mais sobre suas interpretações, abrindo um novo horizonte de conhecimento e incentivando-os à constante pesquisa, em busca de novas ideias sobre o mundo em que vivem (Demczuk *et al.*, 2007).

Sabe-se que as diferentes Ciências se utilizam de diferentes métodos de investigação, sendo impreciso definir as etapas de um método científico único e igualmente significativo para todas as Ciências e suas diferentes abordagens. Apesar disso, são constantes na prática científica os procedimentos de observação, de experimentação, de hipotetização, de quantificação, de comparação e a busca de resultados (PCN, 2007). Desta forma, o presente trabalho caracteriza-se como uma estratégia metodológica que considera a ampla interação entre pesquisadores, professores e alunos, sendo o primeiro objetivo popularizar a ciência e o método científico na escola básica.

#### *Ensino de Ciências e Educação em Saúde na Escola*

Os PCN fazem referência à escola como a instituição que privilegiadamente pode transformar-se num espaço genuíno de promoção para a saúde (PCN, 2009). No contexto da proposta dos PCN se concebe a educação escolar como uma prática que tem a possibilidade de criar condições para que todos os alunos desenvolvam suas capacidades e aprendam os conteúdos necessários para construir instrumentos de compreensão da realidade e de participação em relações sociais, políticas e culturais, condições estas fundamentais para o exercício da cidadania na construção de uma sociedade democrática e não excludente (PCN, 1997).

Por resolução da Lei de Diretrizes e Bases de 1971, a saúde foi inserida formalmente no currículo escolar por definição de Programas de Saúde os quais deveriam ser trabalhados não como disciplina, mas sim de modo transversal e contínuo, por meio de atividades que levassem o educando ao desenvolvimento de hábitos saudáveis no sentido de preservar a saúde individual e coletiva.

Desta forma, nos últimos anos, tem sido notável o aumento no investimento de recursos públicos na promoção de saúde e de educação preventiva voltada ao cuidado e ao bem estar físico, social e mental. A longevidade atingida pela maioria da população, além do exponencial crescimento da densidade demográfica, tem contribuído para que a saúde seja discutida e promovida em todos os espaços sociais, e prioritariamente na escola onde o educando começa a identificar-se e formar-se como um cidadão.

Assim, atividades que relacionem práticas de promoção de saúde e qualidade de vida devem ser fomentadas tanto em atividades contínuas, inseridas no dia-a-dia da sala de aula, quanto em atividades pontuais como cursos, palestras e seminários para a formação continuada de professores e na formação inicial dos alunos. Desta forma, a criação e apresentação de novos modelos para a prática de um ensino de Ciências mais eficiente, motivador e que articule entre outras temáticas a saúde, deve ser uma das preocupações no ambiente escolar. Pois, entendemos que ao desenvolver atividades voltadas ao ensino de Ciências não podemos deixar de falar em saúde uma vez que estas duas áreas da educação perpassam naturalmente entre si.

Nesta perspectiva, acreditamos que associar o processo da alfabetização com o da descoberta científica aliada à educação em saúde pode contribuir para melhorar o desempenho escolar, bem como os parâmetros avaliados pelo Índice de Desenvolvimento da Educação Básica (IDEB) no Brasil.

De fato, a infância e a adolescência são épocas decisivas na construção de condutas e a escola, portanto, passa a assumir papel destacado por sua potencialidade para o desenvolvimento de um trabalho sistematizado e contínuo (PCN, 2009). Para Silva et. al. (2012) o ensino de Ciências está intimamente conectado a experimentação em todos os níveis educacionais, todavia, nos anos iniciais do ensino fundamental estas podem ainda estar atreladas ao desenvolvimento de uma ferramenta lúdica trazendo um aspecto motivacional que pode servir de fomento a aprendizagem.

O processo de alfabetização escolar inicia-se em torno dos seis a sete anos de idade em virtude de achados já bem consolidados em psicologia cognitiva que mostram que nessa fase as estruturas cognitivas já atingiram a maturidade necessária para esse tipo de aprendizagem. Essa fase é descrita como o início das operações concretas, ou seja, o indivíduo já está apto a fazer relações entre objetos cognitivos de representação concreta (Sternberg, 2000). Assim, a criança está apta a compreender experimentos científicos que não envolvam conceitos abstratos, sendo esse aprendizado um estímulo para o desenvolvimento de suas estruturas cognitivas. A exposição a esse tipo de estímulo (experimentos científicos) poderia não só favorecer o desenvolvimento de conhecimentos em ciência, mas também melhorar globalmente a capacidade de aprendizagem.

#### *Índice de Desenvolvimento da Educação Básica (IDEB)*

O IDEB constitui-se em um instrumento de avaliação da qualidade da educação no Brasil, sendo calculado com base no desempenho do estudante e na taxa de aprovação das escolas. A série histórica de resultados do IDEB teve início em 2005, a partir de onde foram estabelecidas metas bienais de qualidade a serem atingidas não apenas pelo País, mas também por escolas, municípios e unidades da Federação. A lógica é a de que cada instância evolua de forma a contribuir, em conjunto, para que o Brasil atinja o patamar educacional da média dos países desenvolvidos. Em termos

numéricos, isso significa progredir da média nacional 3,8, registrada em 2005 na primeira fase do ensino fundamental, para um IDEB igual a 6,0 em 2022 (INEP, 2008). No entanto, nos últimos anos, as notas alcançadas pelas escolas brasileiras têm sido abaixo da média esperada. No município de Uruguaiana, local onde foi desenvolvido o presente trabalho, o desempenho das escolas não foge a esta realidade. Em 2007, o IDEB do município, tanto na quarta série (Brasil 4,0 – Estado 4,5 – Município 4,2), quanto na oitava série do ensino fundamental (Brasil 3,5 – Estado 3,7 – Município 3,6) foi abaixo do esperado e inferior à média estadual.

Com base no exposto, torna-se necessário buscar alternativas que possam aproximar o interesse dos estudantes dos conteúdos abordados nas escolas. Segundo Borges (2002) o ensino tradicional, da escola primária aos cursos de graduação, tem se mostrado pouco eficaz, seja do ponto de vista dos estudantes e professores, quanto das expectativas da sociedade. Além disso, segundo os Parâmetros Curriculares Nacionais (1997) em relação ao ensino de Ciências na Escola, este vem sendo conduzido de forma pouco interessante e de difícil compreensão para os alunos. Este fato evidencia-se pelos baixos desempenhos obtidos pelos estudantes brasileiros nas disciplinas de ciências e matemática no PISA - Program for International Student Assessment (INEP, 2008).

Podemos ainda apontar como um dos motivos para o baixo desempenho dos estudantes brasileiros o que Freire (1996) identificou como “educação bancária”, onde o educador tem como principal função “depositar” conteúdos que muitas vezes são tratados de forma compartimentada e desconectada da realidade, sendo para os alunos conceitos sem significado. Cabello *et al.* (2010) ressalta ainda que o ensino tradicional leva à fraca construção de conhecimento e como consequência o desinteresse em obter respostas. Assim, este modelo tradicional e limitado utilizado no ensino de uma forma geral é pouco estimulante para os alunos, sendo que eles apenas recebem e memorizam os conteúdos não desenvolvendo a consciência crítica que é fundamental para sua inserção no mundo.

Em contrapartida à educação bancária, Galiuzzi e Moraes (2002) argumentam em favor do educar pela pesquisa. De fato, a investigação científica, através do método científico, visa estimular o questionamento, a argumentação, a crítica e a validação dos argumentos assim construídos, transformando o educando em protagonista de seu próprio conhecimento.

#### *Aproximação Entre Universidade e Escola de Educação Básica Através da Pesquisa*

À universidade é concernido o papel de produção de conhecimento científico e tecnológico para a sociedade. Porém, entende-se que tais conhecimentos devem ser relevantes, em um sentido de contribuir para o desenvolvimento social e econômico das comunidades. Nessa percepção a escola, é um espaço de formação de sujeitos para a cidadania, um local onde o conhecimento científico não apenas deva ser disseminado, mas que, sendo uma fonte de vivências e informações, também produz saberes essenciais para formação constante dos sujeitos. Como elucidado por Pimenta (2002) *apud* Borges e Fontoura (2010), a necessidade de uma relação dialógica entre as escolas de educação básica e as faculdades de

educação nos possibilita enxergar caminhos a serem percorridos por ambos os espaços.

Com a compreensão de que a escola e a Universidade devem constituir uma parceria a fim de potencializar a realidade social em que estão inseridas, nos últimos anos o Grupo de Estudos em Nutrição, Saúde e Qualidade de Vida (GENSQ) busca inserir-se nos diversos contextos que norteiam a educação básica, considerando os diferentes graus de complexidade que vão desde a educação infantil (Lanes *et al.*, 2012), ensino médio (Moreira *et al.*, 2011) até a formação de professores para os anos iniciais (Lara *et al.*, 2013).

De fato, a base para os trabalhos do GENSQ ocorreu a partir de sua inserção na Rede Nacional de Educação e Ciências, fundada pelo professor Leopoldo de Meis. Nos anos 80, sensibilizado com a situação do precário desenvolvimento social no país inteiro, e principalmente no Rio de Janeiro é que o professor Leopoldo de Meis, do instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), compreendeu que a promoção do conhecimento científico produzido nos laboratórios de pesquisa poderia potencializar a aprendizagem e o interesse pela ciência de alunos em condições de vulnerabilidade socioeconômica e, assim, modificar a realidade onde estão inseridos; de tal modo foram criados os chamados Cursos Experimentais de Curta Duração ou Cursos de Férias.

Os Cursos de Férias proporcionam a professores e estudantes do ensino básico oportunidades de interação com pesquisadores, gerando um ambiente propício à criação de experiências pedagógicas inovadoras e criando condições para que estudantes e professores possam desenvolver atividades de iniciação científica nos laboratórios de pesquisa e assim reproduzir estas experiências em sala de aula. Neste sentido, o trabalho inicialmente desenvolvido pelo professor De Meis recebeu inúmeros incentivos e financiamentos ampliando-se assim por todo Brasil e dando origem a Rede Nacional de Educação e Ciência, que atualmente conta com a participação com 19 universidades, dentre elas está a Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) com a participação efetiva do GENSQ.

No entanto, tais cursos não se apresentam apenas como um espaço de formação inicial e continuada, mas ainda como a ascensão destes sujeitos ao contexto universitário, tornando-se eixo fundamental para que vislumbrem expectativas para sua qualificação profissional.

As atividades da universidade podem contribuir para atualização dos professores que, muitas vezes, estão despreparados para abordar um ensino que contextualize os conceitos apresentados nos livros com as novidades tecnológicas que permeiam a sociedade (Coutinho, 2010). Ainda, entende-se que a cooperação entre universidade e escola pode contribuir para promoção de métodos alternativos privilegiados tanto para a investigação quanto para atuação docente (Giovani, 1998 *apud* Coutinho,

2010), bem como, desenvolver o interesse dos alunos desde jovens ao conhecimento e a complexidade científica.

### *Caenorhabditis Elegans como um Modelo Para o Ensino de Ciências na Escola Básica*

Existem diversas ferramentas didáticas que podem ser utilizadas para se trabalhar o ensino de Ciências na escola básica. Entre estas é possível citar o uso de organismos vivos como o *Caenorhabditis elegans*. Além de ser um importante recurso para a pesquisa em todos os níveis, modelos alternativos podem ser um recurso didático interessante à medida que possibilitam explorar conteúdos relacionados ao ciclo de vida de alguns animais, aos seres microscópicos e sua relação com a saúde humana. Com isso, a criação e apresentação de um novo modelo para a prática de um ensino de Ciências mais eficiente e motivador é uma das propostas deste trabalho.

O *C. elegans* é um nematoide de vida livre do solo, que surgiu como um novo modelo para a pesquisa por ser geneticamente mapeado e bem descrito, além de apresentar um fácil cultivo, tempo de reprodução rápido e curto ciclo de vida. Este verme é hermafrodita e, quando adulto, é capaz de colocar ovos que ao eclodirem geram larvas que passam por quatro estágios (L1/L4) até chegarem à vida adulta, quando se tornam capazes de gerar mais ovos e continuar o ciclo de vida (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998; White, 1988)

O uso cada vez mais crescente do *C. elegans* no âmbito da pesquisa deve-se a sua simplicidade e ao fato que, dos modelos animais, *C. elegans* é certamente o mais rápido e mais passível de baixo custo (Kaletta *et al.*, 2006). Além disso, *C. elegans* tem sido amplamente utilizado como um sistema experimental para estudos biológicos. Particularmente para os estudos de envelhecimento, longevidade e algumas doenças, pois outra peculiaridade deste microrganismo é a presença de genes homólogos aos de humanos (aproximadamente 60%) (Komura, T. *et al.* 2012, Kaletta *et al.* 2006).

Com base no exposto, este estudo tem como objetivo a aplicação de uma proposta de trabalho diferenciada na promoção do ensino de ciências e saúde nos anos iniciais do ensino fundamental, com vistas a potencializar os processos de ensino e aprendizagem baseado no método científico como ferramenta para a popularização da ciência e da tecnologia.

### **Materiais e métodos**

O presente estudo foi realizado no período de 05/04/2013 a 12/04/2013 com duas turmas dos anos iniciais do Ensino Fundamental da Escola Estadual de Primeiro Grau Senador Salgado Filho, em Uruguaiana, Rio Grande do Sul. Esta escola obteve IDEB inferior a 3,5 na avaliação de 2011 e está situada na periferia da cidade, sendo a maioria de seus alunos

pertencentes a famílias de baixa renda. A escolha de uma instituição de baixo IDEB tem por objetivo proporcionar uma melhora na aprendizagem e consequentemente nos índices da instituição escolar envolvida. Intervenções deste tipo possibilitam, na maioria das vezes, ações novas nas escolas, onde muitas vezes os professores estão adaptados a uma rotina diária de ensino (transmissão de conteúdos), muitas vezes sem sair da sala de aula. As atividades realizadas possibilitam sair do cotidiano, trabalhar com o novo, mudar a estrutura da rotina de sala de aula, possibilitando através de atividades diferenciadas uma aprendizagem significativa.

Participaram do estudo uma turma de 1º ano, com 22 alunos, e uma de 2º ano com 16 alunos. A turma de primeiro ano era formada por 11 meninas e 11 meninos em idades entre 5 e 6 anos. A turma de segundo ano era composta por 9 meninos e 7 meninas. Destes 15 tinham idades entre 7 e 8 anos. E uma menina com 13 anos que, portanto, era repetente.

Para a realização desta atividade foram utilizados *C. elegans* adquiridos no Laboratório do Grupo de Pesquisa em Bioquímica e Toxicologia em *Caenorhabditis elegans*, da Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana. Os vermes foram mantidos à 20°C, em placas de *Petri* contendo meio para manutenção de nematoides (NGM) e alimentados com a bactéria *E. coli* OP50, em dose não prejudicial à saúde humana,.

O intuito desta atividade foi proporcionar aos alunos situações que permitissem o acompanhamento do ciclo de vida de *C. elegans*, com registro das observações e descrições de como esse ciclo ocorre ao final de cada dia. Para isto, foram disponibilizados folha de ofício e lápis de cor aos alunos. Os monitores foram orientados a questionar os desenhos e registrar os discursos dos alunos.

As atividades experimentais foram desenvolvidas no espaço do laboratório de ciências da escola a fim de desmistificar o ensino de Ciências para alunos do ensino básico. Com isso, proporciona-se uma quebra na rotina de sala de aula, tirando aquele aluno, talvez pela primeira vez, deste ambiente tradicional de exposição de conteúdos na tentativa de que este compreenda que existem ciência e conhecimento para além da sala de aula. E ainda, o uso do laboratório de ciências se dá para que os alunos reconheçam na escola os seus outros ambientes pedagógicos e que coloquem em uso este espaço, assim como os equipamentos nele disponíveis. Para o desenvolvimento da atividade no laboratório, foram utilizados dois microscópios de propriedade da escola sendo que, um deles equipado com câmera foi utilizado para projetar a imagem do nematoide na parede, e o outro para que os alunos pudessem observar o verme na placa (sem bactéria).

Partindo do princípio que um nematoide só pode ser visto com um equipamento especializado, no caso o microscópio, não sendo visto a olho nu, assim como muitos microrganismos presentes no nosso dia-a-dia,

aproveitamos para retomar com as crianças a importância dos hábitos de higiene, especialmente o de lavagem de mãos. Desta forma, ao final de cada dia de observação, foi realizada uma prática didática de lavagem das mãos, onde as mãos dos alunos eram pintadas com tinta hipoalérgica e as crianças eram estimuladas a lavar corretamente as mãos até retirar toda a tinta.

Além do estímulo e orientação para que os estudantes desenvolvessem o hábito e compreendessem a importâncias de higienizar as mãos, estes também eram estimulados a desempenhar seu papel de investigadores da ciência, uma vez que antes do início de cada atividade, ao entrar naquele novo ambiente os alunos eram vestidos com avental/jaleco e, nos momentos necessários, faziam a utilização de luvas, ou seja, quando manipularam as placas contendo os nematoides.

## Desenho experimental

Tabela 1:

Dias de Observação	Atividades	Material	Observações possíveis	Questionamentos
<b>Pré-teste</b>	Solicitado que as crianças realizassem um desenho sobre "O que é um verme?" na concepção delas. Apresentação de uma história: menino com dor de barriga após almoçar sem ter lavado as mãos.	- Folha sulfite; - Lápis de cor;	-	- O que é um verme? - Porque o menino teve dor de barriga? - Qual a importância de lavar as mãos?
<b>1º dia de observação</b>	-Observação do verme adulto na placa NGM; -Desenho do que observou e descrição verbal do desenho.	-Folha de ofício; -Lápis de cor; -Placa de Petri com NGM/OP50+ nematoide adulto.	-Verme adulto, com ovos na barriga.	-O que está vendo? -Se mexe? -Tem "alguma coisa" na barriga dele?
<b>2º dia de observação</b>	-Observação do verme adulto colocando ovos na placa; -Desenho do que observou e descrição verbal do desenho.	-Folha sulfite; -Lápis de cor; -Placa de Petri com NGM/OP50+ nematoide adulto colocando ovos.	-Verme adulto colocando ovos.	-O que está vendo? -O que mudou de ontem para hoje? -O que é aquele "pontinho"? -Todos os ovos continuam na barriga?
<b>3º dia de observação</b>	-Observação do verme adulto, ovos sem eclodir e eclodidos na placa; -Desenho do que observou e descrição verbal do desenho.	-Folha sulfite; -Lápis de cor; -Placa de Petri com NGM/OP50+ nematoide adulto, ovos e larvas;	-Verme adulto com ovos postos, ovos que eclodiram e são larvas no primeiro estágio larval;	-O que aconteceu de ontem para hoje? -Será que os ovos colocados ficam sempre "fechados" ou eles nascem um dia? -De onde vieram essas larvas?
<b>4º dia de observação</b>	- Observação do verme adulto e larvas na placa; -Desenho do que observou e descrição verbal do desenho.	-Folha sulfite; -Lápis de cor; -Placa de Petri com NGM/OP50+ verm e adulto + larvas;	-Verme adulto, com as larvas no primeiro, segundo, terceiro e quarto estágio larval;	-Cadê os ovos que estavam aí? -O que aconteceu com eles? -Essas larvinhas são todas do mesmo tamanho? -De onde elas vieram?
<b>5º dia de observação</b>	- Observação do verme adulto, larvas na placa e vermes adultos com ovos na barriga; -Arte com massa de modelar sobre o que foi observado durante a semana e descrição verbal do trabalho produzido.	-Folha sulfite; -Massa de modelar; -Placa de Petri com NGM/OP50+ verm e adulto+ larvas+ vermes adulto com ovos na barriga;	-Verme adulto, com as larvas no segundo, terceiro e quarto estágio larval e vermes adultos com ovos na barriga que estão por iniciar sua própria ninhada;	-Retomada geral dos eventos do ciclo: -Quantos vermes tinham no primeiro dia? -O que tinha na barriga dele? -Esses ovos permaneceram na barriga ou saíram? -Eles ficaram sempre ovos ou nasceram os "filhinhos"? -Os "filhinhos" cresceram ou ficaram sempre pequenos?
<b>Pós - Teste 10 dias após as intervenções.</b>	Solicitado que as crianças realizassem um desenho "O que é um verme?" (Idem pré teste).	- Folha sulfite; - Lápis de cor;		-O que é um verme?

## Resultados e Discussão

De acordo com os PCN (ANO) para se alfabetizar científica e tecnologicamente novas gerações deve-se “Mostrar a ciência como um conhecimento que colabora para a compreensão do mundo e suas transformações”. De fato, para Delizoicov *et. al* (2001), o ensino de Ciências deverá possibilitar às crianças “a apropriação de conhecimentos relacionados à ciência e à tecnologia, para que possam ler o mundo a sua volta e atuar nele de forma consciente, crítica e responsável”.

A partir desse pressuposto, inicialmente investigamos as concepções de alunos do 1º e 2º ano das séries iniciais acerca do seu conhecimento sobre “O que é um verme?”. O termo verme, popularmente, remete de modo geral a um vasto rol de animais alongados e de corpo mole, sem esqueleto interno ou externo, que são encontrados praticamente em qualquer habitat. Aproveitando que o nematoide escolhido para a metodologia de ensino é um microrganismo não visível a olho nu, aliamos a exposição do seu ciclo de vida à importância de hábitos de higiene, como o de lavar as mãos.

Realizamos “intervenções” nas quais os alunos foram levados ao laboratório de ciências da escola, onde um dos objetivos foi explorar esse ambiente pouco utilizado pelas professoras, mas principalmente, para aproximá-los da ciência, através da exposição do ciclo de vida de um organismo completo, simples e muito utilizado atualmente para pesquisa científica, o nematoide *C. elegans*.

O delineamento experimental foi dividido em três partes, que constituiu primeiramente na realização de um pré - teste, um segundo momento no qual foi realizada a exposição do ciclo de vida do nematoide para os alunos, através de observações, e um pós - teste, visando a influências das observações na concepção dos alunos (Tabela 1).

Segundo Lanes *et. al.*(2012), a utilização do desenho como método de avaliação da criança é uma ótima escolha, pois é o meio de representação e comunicação da criança. É uma atividade fundamental, pois a partir de seus desenhos a criança expressa ideias, sentimentos, descobertas, explora as suas curiosidades e descobertas.

Na análise do pré - teste, 100% das crianças do primeiro ano questionadas não souberam dizer o que era um verme, e tampouco sabiam qual a sua morfologia para desenhá-lo. Dos alunos do segundo ano, apenas 13,33% souberam desenhar a morfologia correta do verme e relataram que já teriam o visto na “terra”, referindo-se as minhocas. Essa associação dos alunos do segundo ano pode ser devido a uma maior vivência destes no ambiente escolar e também por apresentarem uma maturidade cognitiva melhor desenvolvida do que os alunos do primeiro ano, com idade inferior.

Quanto ao pós - teste, 50% das crianças do primeiro ano e 100% das crianças do segundo ano souberam desenhar o verme na morfologia esperada após as observações do seu ciclo de vida, apontando que as intervenções apresentaram influência positiva nessa questão.

Quando a análise foi realizada por sexos, as meninas do primeiro ano apresentaram um desempenho melhor no pós-teste, comparado aos meninos ( $p=0,007$ ), porém no segundo ano, os meninos sobressaíram-se e apresentaram uma morfologia correta em maior número do que as meninas ( $p= 0,0001$ ).

Por outro lado, segundo a aprendizagem construtivista de Piaget (1974) acredita-se que o sujeito acrescenta interpretações próprias às sequências exteriores que ele aprende. Para Lanes *et al.* (2012), a criança se expressa a partir do modo como ela percebe o mundo, levando-se em conta o processo de maturação, seu meio social e cultural. Deste modo, as crianças que não desenharam o verme na morfologia correta nem no pós-teste, podem ter associado essa nomenclatura a algum outro momento do seu meio social.

Um exemplo interessante é a criança que desenhou a figura 1B, apresentou a mesma morfologia de "verme" tanto no pré, quanto no pós-teste e relatou ter visto este "verme" em um filme. Esse resultado salienta o que Campos (1987) afirma que o indivíduo desenha o que sente e não o que vê, pois mesmo após o aluno ter observado a morfologia correta de um verme, continuou a crer na sua concepção.

De acordo com Vygotsky (1997), a imaginação da criança atua de maneira diferente em cada período do desenvolvimento infantil, de modo a respeitar a escala do seu desenvolvimento.

Quando analisado se as crianças em suas respostas e/ou desenhos relacionaram o que era um verme ao meio ambiente ou aos humanos, novamente a maioria não relacionou, tanto no pré, 25% e 26,66%, quanto no pós - teste, 31,25% e 13,33%, no primeiro e segundo ano respectivamente. No pré - teste explica-se porque eles não sabiam do que se tratava, já no pós - teste acreditamos que o fato deles terem observado somente o nematoide no decorrer do seu ciclo, com o auxílio de um microscópio acoplado a câmera, impossibilitou que realizassem essa relação, restringindo seus desenhos somente ao que observaram. Esse resultado também pode estar relacionado ao fato que as crianças, quando questionadas preferem não tentar, por medo ou vergonha de errar.

Silva (1998) defende o fato que a escolarização pode oferecer tanto a possibilidade de ampliação, bem como desenvolvimento do repertório gráfico da criança, quanto pode abafá-lo e/ou prejudica-lo.

Quanto à presença ou não do ciclo de vida no pós - teste, no primeiro ano, 68,75% não apresentou, 18,75% apresentou de modo incompleto

(ausência de um dos elementos - adulto, ovos ou filhote), e apenas 12,5% apresentou de maneira completa, já no segundo ano todos apresentaram o ciclo de vida, desses, 80% o ciclo estava completo e, em apenas 20% o ciclo estava incompleto. Pode se dizer que obtivemos influência positiva parcial nos alunos do 1º ano e total nos alunos de 2º ano.

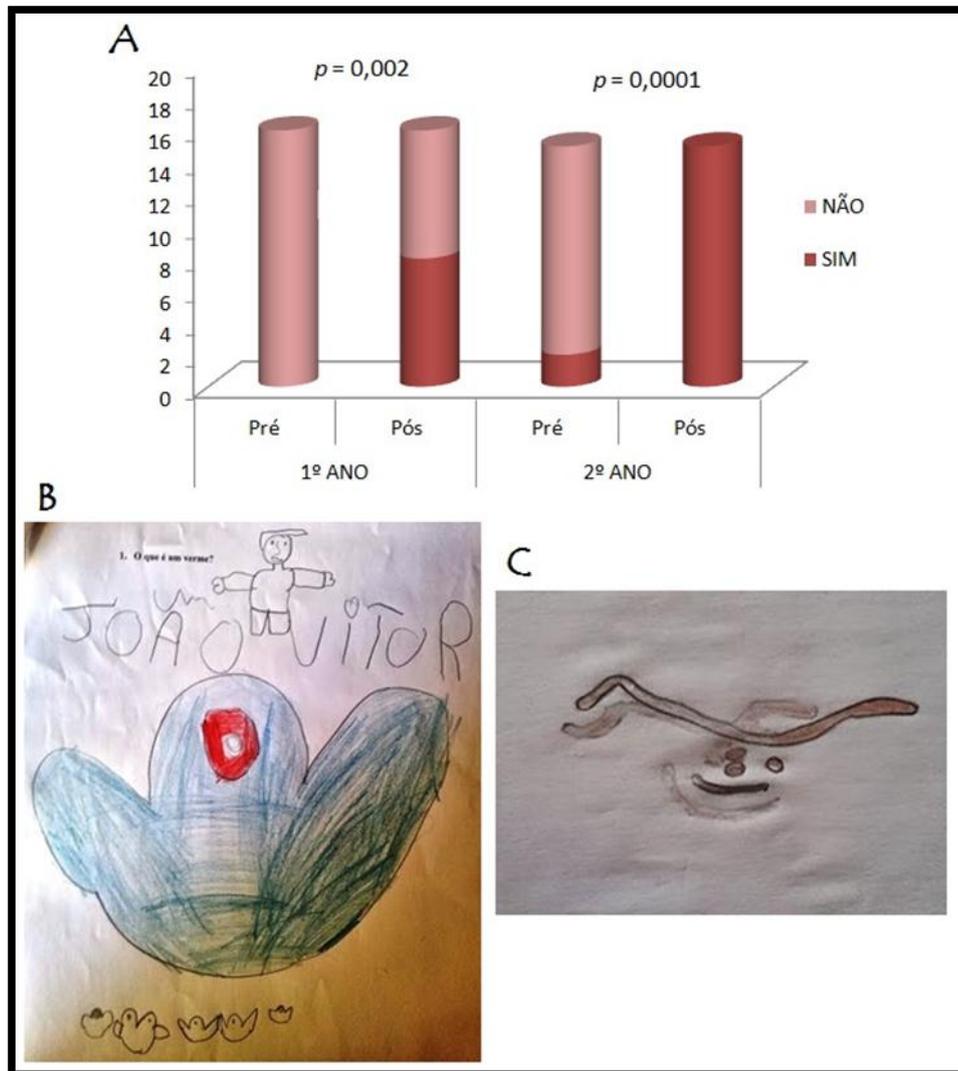


Figura 1. (A) Teste Exato de Fisher para comparação da presença ou ausência da morfologia esperada para um verme nos desenhos realizados no Pré e Pós - testes em resposta à pergunta: "O que é um verme?"; (B) Exemplo de um desenho com ausência da morfologia esperada; (C) Exemplo de um desenho com a presença da morfologia esperada.

A criança da figura B relatou: "Eu vi um verme em um filme e ele era assim.". Essa criança não mudou sua concepção após ter observado o verme na morfologia correta durante as intervenções, pois, no pós - teste, desenhou o verme com a mesma morfologia errônea do pré - teste. Já a criança que desenhou o verme na morfologia esperada (figura C) mudou

sua concepção e foi possível notar que as observações influenciaram positivamente, pois no pós - teste conseguiu representar da maneira correta.

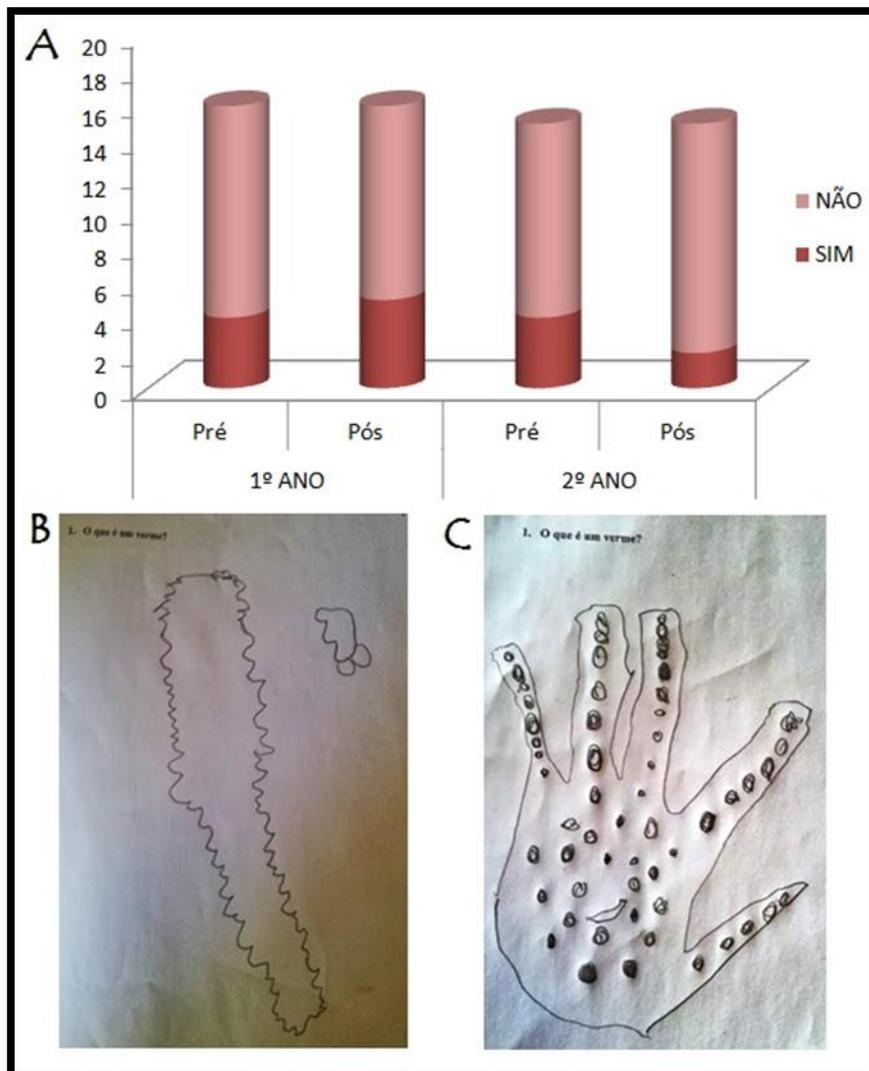


Figura 2. (A) Teste Exato de Fisher para comparação da presença ou ausência de relação entre vermes e meio ambiente/seres humanos nos desenhos realizados no Pré e Pós - testes em resposta à pergunta: "O que é um verme?"; (B) Exemplo de um desenho com ausência de relação entre vermes e meio ambiente/ser humano; (C) Exemplo de um desenho com a presença de relação entre vermes e meio ambiente/ser humano.

A criança da figura B não relacionou o verme com o meio ambiente e/ou seres humanos no pré nem no pós - teste e quando questionada sobre o que teria desenhado, apenas respondeu "Um verme". Já a criança da figura C, relatou: "O verme está nas mãos junto com os micróbios e as bactérias".

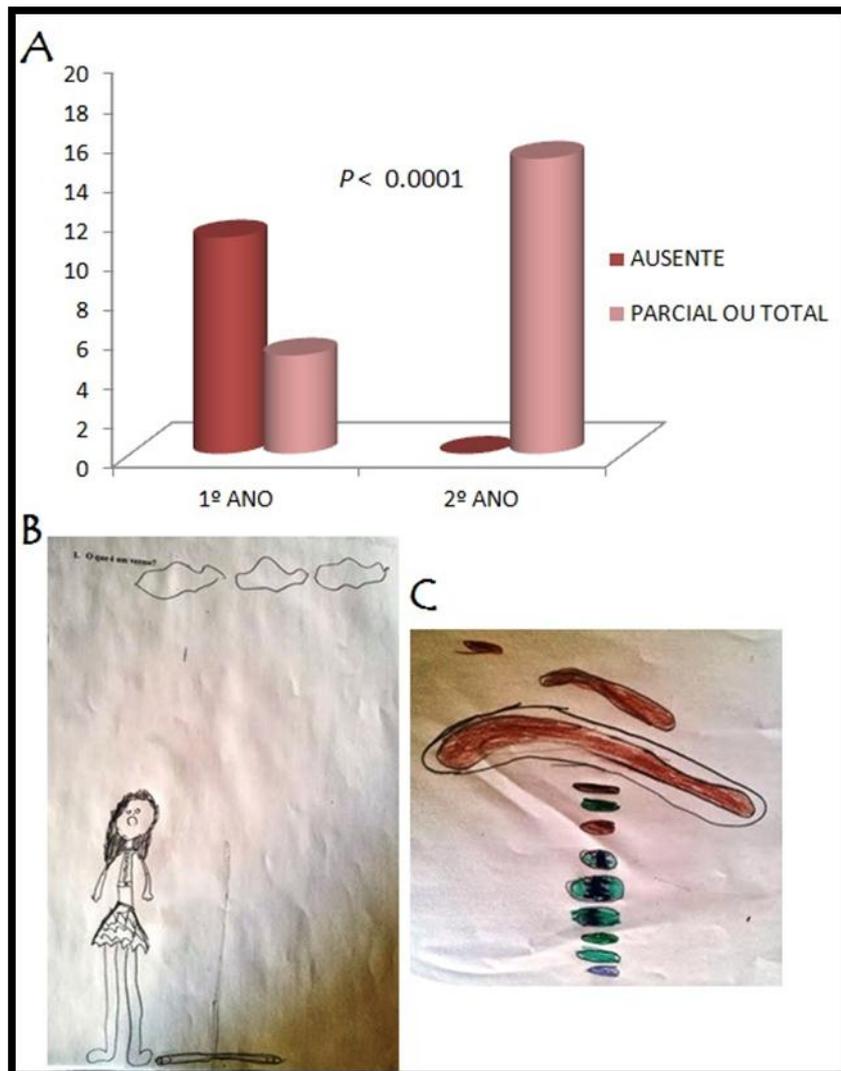


Figura 3. (A) Teste Exato de Fisher para comparação entre da presença ou ausência do ciclo de vida dos vermes ilustrados em desenhos realizados por alunos do 1º e 2º ano no Pós - teste em resposta à pergunta: "O que é um verme?"; (B) Exemplo de um desenho com a ausência do ciclo de vida; (C) Exemplo de um desenho representando o ciclo de vida dos vermes.

Na figura B, a criança relatou ter desenhado "O verme entrando no pé da menina", não apresentando seu ciclo de vida. Na figura C, a criança apresentou o ciclo de vida completo e quando questionada quanto ao que teria desenhado respondeu: "O papai verme, a mamãe verme os ovinhos e os filhinhos saindo dos ovinhos." Nesse desenho é possível observar ainda o ovo eclodindo, antes da saída do verme.

A única categoria que apresentou diferenças significativas entre os sexo foi a morfologia esperada, porém, não houve uma diferença clara entre meninos e meninas, no entanto salientamos que é necessário um n maior para observar melhor essas diferenças, ou aumentar o tempo de "intervenções".

Ensinar Ciências para os anos iniciais tem como fato inicial a promoção da aprendizagem de conhecimentos que contribuam para compreensão dos fenômenos naturais que permeiam a realidade do aluno e lhe ofereçam aporte para participar no meio em que vive de maneira crítica e reflexiva, considerando-se as consequências que essa intervenção pode ocasionar o que é reforçado pelos PCN que trazem que a Ciência deve ser mostrada:

como um conhecimento que colabora para a compreensão do mundo e suas transformações, para reconhecer o homem como parte do universo e como indivíduo, é a meta que se propõe para o ensino da área na escola fundamental. A apropriação de seus conceitos e procedimentos pode contribuir para o questionamento do que se vê e ouve, para a ampliação das explicações acerca dos fenômenos da natureza, para a compreensão e valorização dos modos de intervir na natureza e de utilizar seus recursos, para a compreensão dos recursos tecnológicos que realizam essas mediações, para a reflexão sobre questões éticas implícitas nas relações entre Ciência, Sociedade e Tecnologia. (BRASIL.1997, p.21)

Para isso faz-se necessário uma ação docente que estimule os alunos a buscar por respostas e a tomar decisões, de maneira que eles atuem ativamente na construção do seu conhecimento. Oliveira (2006, p.35) corrobora que "A cópia e a repetição de conceitos não propiciam a construção de conhecimento, também não é capaz de desenvolver uma postura crítica em relação ao ambiente, já que não despertam a curiosidade e participação ativa do aluno que pode se transformar em atitude".

Popularizar a ciência e o método científico na escola básica, não é tarefa simples como pensamos. Ao nos depararmos e nos inserirmos em seu contexto, a escola nos apresenta a realidade de uma sociedade que prioriza determinados conhecimentos para o desenvolvimento intelectual do sujeito. E, assim, é perceptível que "alternativas metodológicas, que permitiriam a abertura do leque de temas, direcionadas para o ensino de Ciências, como o contar de histórias infantis com conteúdos científicos" (LIMA, 2001) ou a experimentação para as séries iniciais, são pouco conhecidas ou consideradas.

Os anos iniciais do ensino fundamental, nas escolas brasileiras, apresentam professores formados na área da Pedagogia, nos cursos Normal Superior ou mesmo em cursos de Magistério. Tais professores em atuação nessa etapa, em sua maioria, possuem pouca ou nenhuma formação que os habilite a desenvolver em sala de aula o ensino na disciplina de Ciências, que integra o currículo dos anos iniciais; uma vez que esta área ainda é pouco trabalhada dentro da carga horária dedicada a estes cursos. A realidade de formação desses professores, carente de reflexão sobre a

Ciência e sobre o seu ensino, provoca uma grande insegurança quanto ao desenvolvimento do conhecimento científico em sala de aula, e, com isso, resulta em um trabalho pouco ou nada inovador, limitado a proposições do livro didático que, por melhor que seja produzido, pouco contribui para um primeiro contato atraente do aluno com o mundo dinâmico da Ciência.

Considerando a importância da educação básica e do ensino de Ciências para a constituição do aluno como sujeito e a exemplo de muitas outras áreas do conhecimento, é fundamental que a aprendizagem em Ciências para os anos iniciais da educação ocorra em meio a um processo prazeroso e instigante, sob pena de prejudicar não apenas este momento específico de formação, mas também os resultados de sua longa relação com a área em outros níveis de ensino. Neste sentido, esta proposta torna-se uma ferramenta para inovação das práticas do ensino de ciências na escola básica e ao tempo que tem o potencial de motivar os alunos, incentivando a reflexão sobre os temas propostos, estimulando a sua participação ativa no desenvolvimento da aula e contribuindo para a possibilidade efetiva de aprendizagem.

### **Considerações Finais**

Atividades diferenciadas em espaços escolares tradicionais ainda são uma alternativa consideravelmente satisfatória para a potencialização dos processos de ensino-aprendizagem, mesmo que pontuais. Proporcionar a descoberta de um laboratório, a utilização de um jaleco e a aproximação ao método científico para a aquisição de conhecimento pode fomentar o anseio de fazer ciência nas crianças, principalmente nos anos iniciais.

Neste sentido, ressaltamos a importância de novas propostas metodológicas para o ensino na escola, sobretudo ao ensino de ciências ainda pouco difundido nos anos iniciais, abordando modelos experimentais utilizados na pesquisa, como no caso do *C. elegans*, e de maneira reconstruindo suas possibilidades para além da pesquisa de base mas o aproximando do ensino escolar.

Como evidenciado anteriormente, este trabalho surge como uma proposição de aproximar o conhecimento científico produzido nos centros de pesquisa e nas Universidades a realidade escolar. Assim, colaborar para (re)significar conceitos do cotidiano transpondo para o mundo científico, e vice-versa, contribuindo não somente no campo dos conhecimentos específicos mas também para a formação integral do sujeito.

## Referências bibliográficas

Borges, T. (2002). Novos rumos para o laboratório escolar de ciências. *Caderno Brasileiro de ensino de Física*, 19, 13, 291-313.

Borges, L.P.C e H.A. Fontoura (2010). Diálogos entre a escola básica e a universidade: a circularidade de saberes na formação docente. *InterMeio: revista do Programa de Pós-Graduação em Educação*, 16, 32, 143- 156.

Brasil. Lei nº 5692, de 11 de dezembro de 1971(1971). Fixa as Diretrizes e Bases para o ensino de 1 e 2º graus. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 12 ago.

Cabello, K.S.A. La Rocque, L. e I.C.F. Sousa (2010). Uma história em quadrinhos para o ensino e divulgação da hanseníase. *Revista Electrónica de Enseñanza de las Ciencias*, 9, 1, 225-241.

Campos, D.M. (1987). A importância do teste do desenho como Instrumento de Diagnóstico Psicológico. Vozes, Petrópolis, 17ª edição, pp 11-25.

Carvalho, A. M. P. de. et al (1998). *Ciências no ensino fundamental: o conhecimento físico*. São Paulo: Scipione.

Coutinho, R.X. (2010). A Influência da Produção Científica nas Práticas de Professores de Educação Física, Ciências e Matemática em Escolas Públicas Municipais de Uruguaiana– RS. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Educação em Ciências: Química da Vida e Saúde. UFSM, Santa Maria, RS.

Delizoicov, D. (2001). Alfabetização Científica no Contexto das Séries Iniciais. *Ensaio- Pesquisa em Educação em Ciências*, 3, 1, 1-17.

Demczuk, O.M.; Sepel, L.M.N. e E.L.S. Loreto (2007). Investigação das concepções espontâneas referentes a ciclo de vida e suas implicações para o ensino nas séries iniciais. *Revista Electrónica de Enseñanza de las Ciencias*, 6, 1, 117-128.

Folmer, V.; Barbosa, N.B.V.; Soares, F.A.A. e J.B.T. Rocha (2009). Experimental activities based on ill-structured problems improve Brazilian school students' understanding of the nature of scientific knowledge. *Revista Electrónica de Enseñanza de las ciencias*, 8, 1, 232-254.

Freire, P (1996). *Pedagogia da autonomia: saberes necessários à prática educativa*. São Paulo: Paz e Terra.

Galiazzi, M. e R. Moraes (2002). Educação pela pesquisa como modo, tempo e espaço de qualificação da formação de professores de ciências. *Ciência & Educação*, 8, 2, 237-252.

IDEB. Disponível em: <http://sistemasideb.inep.gov.br/resultado/>

Instituto Nacional de Estudos e Pesquisas Educacionais (2008). Resultados nacionais – Pisa 2006: Programa Internacional de Avaliação de Alunos (Pisa). Brasília: O Instituto, 153.

Kaletta, T.; Hengartner, M. O.(2006). Finding function in novel targets: *C-elegans* as a model organism. *Nature Reviews Drug Discovery* 5(5): 387-398

Komura,T. Ikeda,T. Hoshino,K. Shibamura,A. Nishikawa,Y.(2012).*Caenorhabditis elegans* as an Alternative Model to Study Senescence of Host Defense and the Prevention by Immunonutrition. *Advances in Experimental Medicine and Biology* Volume 710, 2012, pp 19-27

Lanes, D.V.C; Santos, M.E.T; Silva, E.F.S.J.; Lanes, K.G.; Puntel, R.L. e V. Folmer (2012). Estratégias lúdicas para a construção de hábitos alimentares saudáveis na educação infantil. *Revista Ciências & Ideias*, 4, 1, 1-12.

Lara, S.; Salgueiro, A.C.F.; Lara, M.; Puntel, R.L. e V. Folmer (2013). Educação e saúde no contexto escolar: Saúde cardiovascular como tema gerador no curso normal médio. *Revista Electrónica de Enseñanza de las Ciencias*, 12, 1, 167-190.

Lima, M. C. B. (2001). *Explique o que tem nessa história*. Tese (Doutorado em Educação) - Faculdade de Educação, Universidade de São Paulo. São Paulo.

Lüdke, M. e Cruz, G.B. (2005). Aproximando Universidade e Escola de Educação Básica Pela Pesquisa. *Cadernos de Pesquisa*. 35, 125, 81-109.

Moreira, B.L.R.; Rocha, J.B.T.; Puntel, R.L. e V. Folmer (2011). Educação sexual na escola: implicações para a práxis dos adultos de referência a partir das dúvidas e curiosidades dos adolescentes. *Revista Electrónica de Enseñanza de las Ciencias*, 10, 1, 64-83.

Oliveira, A. L. de.(2006) Educação Ambiental: concepções e práticas de professores de Ciências do Ensino Fundamental. Dissertação de Mestrado. Maringá. 139 páginas. 2006. Disponível em < <http://www.sfipec.org.br/iel/bolsaderesiduos/Teses/Tese4.pdf>>.

PCN(2009): Parâmetros Curriculares Nacionais - tema transversal em saúde. Em: <http://portal.mec.gov.br/seb/arquivos/pdf/livro092.pdf>

PCN – Brasil (1997). Parâmetros curriculares nacionais : introdução aos parâmetros curriculares nacionais / Secretaria de Educação Fundamental. – Brasília : MEC/SEF.

Piaget, J. & Gréco, P. (1974). *Aprendizagem e conhecimento*. Rio de Janeiro: Freitas Bastos.

Rede Nacional de Educação e Ciência (Brasil). História: Novos Talentos da Rede Pública. Disponível em:

<[http://www.educacaoeciencia.net.br/site\\_on/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1&Itemid=107](http://www.educacaoeciencia.net.br/site_on/index.php?option=com_content&view=article&id=1&Itemid=107)>.

Silva, S.M. (1998). Condições sociais da constituição do desenho infantil. *Psicologia, USP*, v.9,n.2, SP.

Silva, J. B. (2007). A utilização da experimentação remota como suporte para ambientes colaborativos de aprendizagem. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Gestão do Conhecimento da Universidade Federal de Santa Catarina.

Sternberg, R.J. (2000). *Psicologia Cognitiva*. [trad.] Maria Regina Borges Osório. Porto Alegre: Artmed Editora SA.

The C. elegans Sequencing Consortium(1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282, 2012–2018

Vygotsky, L.S. (1997). *La imaginación y el arte en la infância*. México: Frontamara.

White, J.(1988). *The Nematode Caenorhabditis elegans*. Ed. Wood, W. B.) 81–122 (Cold Spring Harbor Laboratory, New York).

## 6 CONCLUSÕES

As conclusões da presente dissertação estão organizadas de acordo com os manuscritos científicos 1 e 2, que foram apresentados nos itens 5.1 e 5.2 respectivamente.

Diante dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

### **Manuscrito 1:**

Verificamos que os extratos de erva-mate testados não causaram mortalidade em *Caenorhabditis elegans* em nenhuma das nacionalidades testadas, do mesmo modo que não alteraram os parâmetros locomotores, avaliados pelo *head trashes*.

Além disso, quanto à reprodução, curiosamente, o primeiro e o último extrato da erva Uruguaia e o primeiro extrato da erva Argentina aumentaram a postura de ovos do nematoide após a exposição aguda, diferente do que a literatura relata com a relação a outros compostos naturais.

Ao utilizar o herbicida Paraquat, um conhecido gerador de superóxido, como agente causador de efeitos tóxicos ao *C. elegans*, os extratos da erva mate protegeram esse nematoide aumentando cerca de 20% à 50% a sobrevivência, reduzindo o nível de espécies reativas e revertendo a redução na progênie causada.

Ainda, dentre os efeitos encontrados, destacamos que o primeiro e o último extrato da erva mate Uruguaia, o último extrato da erva Brasileira e o primeiro extrato da erva Argentina aumentaram significativamente o tempo de vida médio do *C. elegans*.

Com a finalidade de elucidar os mecanismos envolvidos nos efeitos supracitados, verificamos se o fator de transcrição DAF-16, responsável por transcrever genes que regulam o tempo de vida, proteção ao estresse, entre outros em *C. elegans*, estava ativado pelos extratos. Verificamos que os mesmo extratos que aumentaram a longevidade, aumentaram também a translocação desse fator para o núcleo celular. Porém, não aumentaram a expressão das enzimas superóxido dismutase mitocondrial (SOD-3) e catalase.

Por fim podemos sugerir que os extratos exercem atividade *per se* de proteção aos efeitos tóxicos induzidos pelo paraquat e no prolongamento da vida do *C. elegans*, porém, acreditamos em uma interação com vias

moleculares, como o DAF-16, por exemplo. No entanto, mais estudos precisam ser realizados para esclarecer os mecanismos dessa interação.

## **Manuscrito 2:**

O uso do *C. elegans* para experimentação científica e ensino de ciências na Escola Básica funcionou como um ótimo modelo alternativo, e tornou-se uma opção na busca de novas metodologias de ensino.

Foi possível observar, que a concepção dos alunos melhorou acerca do que é um verme, porém, restringiu-se ao que eles observaram durante as intervenções, apontando que futuramente deve ser realizada uma maior contextualização do tema.

Propostas diferenciadas para o Ensino de Ciências podem funcionar como adjuvantes no processo de ensino aprendizagem, despertando a curiosidade e o interesse dos alunos pelo conteúdo, favorecendo diretamente o aprendizado.

Essas metodologias contribuem ainda, de maneira direta para uma melhor capacitação dos professores em abordar os temas propostos, pois desvincula a mania de se prender somente ao livro didático como ferramenta de ensino.

Além do uso de metodologias inovadoras e da maior contextualização deve-se buscar a exploração de todos os ambientes “não tradicionais” da escola, como o laboratório de Ciências, por exemplo.

Enfim, acreditamos que métodos que aproximem o conhecimento científico produzido nas Universidades da realidade escolar devem propostos e que metodologias diferenciadas auxiliam positivamente esse processo, contribuindo não somente no campo dos conhecimentos específicos mas também para a formação integral do sujeito.

## **7 PERSPECTIVAS**

O presente trabalho é um passo inicial para elucidar os efeitos biológicos que podem ser causados pelos extratos de *Ilex paraguariensis*, obtidos

mimetizando o chimarrão, em *C. elegans*. Além disso, apresenta uma proposta de inovação para as práticas do Ensino de Ciências na Escola Básica, utilizando o mesmo modelo da pesquisa científica realizada na Universidade como ferramenta de ensino.

O fato de estudar em um organismo inteiro pode nortear estudos futuros que busquem os eventuais mecanismos de tais efeitos e torna possível o estudo dos extratos de forma isolada, além do mais, permite que professores da escola básica utilizem este modelo para explorar o ciclo de vida dos animais, especificamente microorganismos e correlacionar estes com a saúde humana.

A experiência de aproximação entre o Programa de Pós Graduação em Bioquímica e a Escola Básica foi satisfatória para ambas partes e futuramente pensamos em realizar novas intervenções de maneira paralela.

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, as perspectivas para trabalhos posteriores são:

- Verificar o papel do fator de transcrição DAF-16 no prolongamento do tempo de vida do nematoide;
- Analisar a expressão de outras vias de interesse envolvidas no tempo de vida como a SKN-1/NRF-2, por exemplo;
- Elucidar os mecanismos dos efeitos encontrados;
- Analisar os efeitos dos extratos em um organismo modelo mais complexo (ratos) e verificar seus efeitos no sistema cardiovascular;
- Prosseguir com a proposta de trabalhos interligados entre a Universidade e a Escola Básica, estimulando a implantação de novos métodos de ensino, principalmente para a Educação em Ciências e potencializando o processo de ensino aprendizagem, tornando o “ensinar” e o “aprender” mais interessantes e prazerosos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade, M. M. Introdução à metodologia do trabalho científico: elaboração de trabalhos na graduação. 5. ed. São Paulo: **Atlas**, 2001

Arcari, D. P., Bartchewsky, W., Dos Santos, T. W., Oliveira, K. A., Funck, A., Pedrazzoli, J. Antiobesity effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. **Obesity (Silver Spring)**, 17(12), 2127–2133, 2009

Arcari, D.P., Santos, J.C., Gambero, A., Ribeiro, M.L. The in vitro and in vivo effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on adipogenesis. **Food Chemistry**, 141 809–815, 2013

Azam S., Hadi N., Khan N.U., Hadi S.M. Antioxidant and pro oxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. **Med Sci Monit.** v: 9: 325-30, 2003

Barbosa, K.B.F.; Costa, N.M.B.; Alfenas, R.C.G.; De Paula, S.O.; Minin, V.P.R.; Bressan, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, Campinas, 23(4):629-643, jul./ago., 2010

Bastos, D. H. M.; Torres, E. A. F. S. Bebidas a base de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e saúde pública. **Nutrire: revista da Sociedade Brasileira de Alimentos**, v. 26, p. 77-89, 2003

Bastos, D. H. M.; Saldanha, L. A.; Catharino, R. R.; Sawaya, A. C. H. F.; Cunha, I. B. S.; Carvalho, P. O.; Eberlin, M. N. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba-maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camélia sinensis*) extracts. **Molecules**, v. 12, p. 423 – 432, 2007

Barreiros, A.L.S.B.; David, J.M.; Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 1, 113-123, 2006

Berté, K.A.; Beux, M.R.; Spada, P.K.; Salvador, M.; Hoffmann-Ribani, R. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Yerba-Mate(*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., Aquifoliaceae) Extract as Obtained by Spray Drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v: 59, 5523–5527, 2011

Bianchi, M.L.P.; Antunes, L.M.O. 1999.Free radicals and the main dietary antioxidantes.**Rev Nutrição**. 12(2):123-130.

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 a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life Sciences**, v. 77, p. 345-358, 2005

Block, G. A. A role for antioxidants in reducing cancer risk. *Nutr ver*, v.50, pag.207-213, 1992

Santos, B.S., Filho, N.A. A Universidade no Século XXI: Para uma Universidade Nova. **Coimbra**, 2008

Boaventura, B. C., Di Pietro, P. F., Stefanuto, A., Klein, G. A., De Moraes, E. C., De Andrade, F. Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. **Nutrition**, 28(6), 657–664, 2012

Boyd, W.A., Williams, P.L. Availability of metals to the nematode *Caenorhabditis elegans*: toxicity based on total concentrations in soil and extracted fractions. **Environ. Toxicol. Chem.** 22, 1100–1106, 2003

Bracesco, N.; Dell, M.; Rocha, A.; Behtash, S.; Menini, T.; Gugliucci, A.; NUNES, E. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*, prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces Cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**. v. 9:378-387, 2003

Bracesco N., Sanchez A.G., Contreras V., Menini T., Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**., doi:10.1016/j.jep.2010.06.032, 2011

Burtnik, O. J. **Yerba Mate: Manual de Producción**. INTA, AER Santo Tomé, Corrientes, Argentina. 52 pág. 2006

Büchter, C.; Ackermann, D.; Havermann, S.; Honnen, S.; Chovolou, Y.; Fritz, G.; Kampkötter, A.; Wätjen, W. Myricetin-Mediated Lifespan Extension in *Caenorhabditis elegans* Is Modulated by DAF-16. **Int. J. Mol. Sci**, 2013

Carter, C. S., Ramsey, M. M. & Sonntag, W. E. A critical analysis of the role of growth hormone and IGF-1 in aging and lifespan. **Trends Genet** 18(6): 295-301, 2002

Chalife, N.; Tu, Y.; Euskirchen, G, Ward, W.W.; Prasher, D.C. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. **Science** 263 (5148): 802–805, 1994

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

Coutinho, R.X. A Influência da Produção Científica nas Práticas de Professores de Educação Física, Ciências e Matemática em Escolas Públicas Municipais de Uruguaiana– RS. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-graduação em Educação em Ciências: Química da Vida e Saúde. UFSM, Santa Maria, RS, 2010

Demczuk, O. M.; Sepel, L. M. N.; Loreto, E. L. S. Investigação das concepções espontâneas referentes a ciclo de vida e suas implicações para o ensino nas séries iniciais. **Revista Electrónica de Enseñanza de las Ciencias** Vol. 6 N° 1, 2007

Donald, D. L. (Ed.). *C. elegans* II. New York, NY: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1997

Dutra, F.L.G; Hoffmann-Ribani, R.; Ribani, M. Determinação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência isocrática durante estacionamento da erva-mate. **Química Nova**, v.33, p.119-123, 2010

Felippi, R. Efeito do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) na reatividade vascular: enfoque na aterosclerose experimental. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina- Programa de Pós Graduação em Farmácia, 2005.

Fernandes, E. S., Machado M. O., Becker A. M., Andrade, F., Maraschin, M. Silva, E. L. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) enhances the gene modulation and activity of paraoxonase-2: In vitro and in vivo studies. **Nutrition**, 28, 1157–1164, 2012

Ferreira, F.; Vásquez, A.; Günter, C.; Moyna, P. Inhibition of the passive diffusion of cholic acid by *Ilex paraguariensis* St. Hil. saponins. **Phytot. Res.**, v. 11, p. 79-81, 1997.

Ferreira A.L.A.; Matsubara .LS.; Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**; 43(1): 61-8, 1997b

Filip, R.; Davicino, R.; Anesini, C. Antifungal Activity of the Aqueous Extract of *Ilex paraguariensis* Against *Malassezia furfur*. **Phytotherapy research**. v. 24: 715-719, 2010

Garcia, F. L. Introdução crítica ao conhecimento. Campinas-SP: **Papirus**, 1988

Galey, H.F. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. **British Journal of Anaesthesia**. v:107(1):57-64, 2011

Gil, A. C.. Métodos e técnicas de pesquisa social. 5. ed. São Paulo: **Atlas**, 1999

Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol** 186: 1-85, 1990

- Halliwell, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual review of nutrition**, Palo Alto, v.16, p.33-50. 1996
- Halliwell, B.; Rafter, J.; Jenner, A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols and other phenols. Direct or indirect effects? Antioxidant or not? **Am. J. Clin. Nutr**, 2004
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. New York, (capítulos 3, 4, 5), 2007
- Halliwell, B.; Lee, C.Y.J.; Using Isoprostanes as Biomarkers of Oxidative Stress: Some Rarely Considered Issues. **Antioxidants & Redox signaling**; Volume 13, Number 2, 2010
- Heck, C.I.; Mejia, E.G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **Journal of food science**. v: 72:138-151, 2007
- Heinrichs, R.; Malavolta, E. Composição mineral do produto comercial da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil). **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 781-785, 2001
- Y. Honda; S. Honda; The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*, **FASEB journal**: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 13: 1385-1393, 1999
- Hope, I.A. Background on *Caenorhabditis elegans* in *C. elegans*: A Practical Approach, **Oxford University Press**, New York pp. 1–15, 1999
- Houthoofd, K. & Vanfleteren, J. R. Public and private mechanisms of life extension in *Caenorhabditis elegans*. **Molecular Genetics and Genomics** 277(6):601-617, 2007
- Isolabela, S., Cogoi, L., López P., Anesini C., Ferraro G., Filip R. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry**. v:122 : 695–699, 2010
- Jacques, R.A., Arruda, E.J., De Oliveira, L.C.S., Oliveira, A.P., Dariva, C., Oliveira, J.V., Caramarão, E.B. Influence of Agronomic Variables on the Macronutrient and Micronutrient Contents and Thermal Behavior of Mate Tea Leaves (*Ilex paraguariensis*). **Jornal of Agricultural and Food Chemistry**. v: 55: 7510-7516, 2007
- Kaletta, T.; Hengartner, M. O. Finding function in novel targets: *C-elegans* as a model organism. **Nature Reviews Drug Discovery** 5(5): 387-398, 2006
- Landis, J. N.; Murphy, C. T. Integration of diverse inputs in the regulation of *Caenorhabditis elegans* DAF-16/FOXO. **Dev Dyn** 239(5): 1405-1412, 2010

Lanzetti M, Bezerra F.S., Romana B. S., Brando A.C., Koatz V.L.G., Porto L.C.. Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. **Nutrition**, 24:375–81. 2008

Lee, J. M., Calkins, M. J., Chan, K., Kan, Y. W. & Johnson, J. A. Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. **Journal of Biological Chemistry** 278(14): 12029-12038, 2003

Matsumoto, R.L.; Bastos, D.H.; Mendonça, S.; Nunes, V.S.; Bartchewsky, W.; Ribeiro, M.L.; De Oliveira, P.C. Effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and total antioxidants status in healthy young women. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v:57: 1775–1780, 2009

Mazuchowski, J.Z.; Rucker, N.G.A. Diagnóstico e Alternativas para a Erva-Mate *Ilex paraguariensis*. **Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento**. Curitiba, 1993

Meinhart A.D., Bizzotto C.S., Ballus C.A., Poloni RYBKA A.C., Sobrinho 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**. 24;58(4), 2188-2193, 2010

Mejia, E.G; Heck, C.I. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **Journal of food science**. v: 72:138-151, 2007

Miranda, D. D., Arcari, D. P., Pedrazzoli, J., JR., Carvalho P.D.E, Cerutti, S. M., Bastos, D. H. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage and DNA repair in mice. **Mutagenesis**, 23(4), 261–265, 2008

Mosimann, A. L., Wilhelm, D., Da Silva, E. L. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **BioFactors**, 26(1), 59–70, 2006

Mota, M.M.; Diogo, A. *Caenorhabditis elegans*: modelo biológico para o século XXI. Laboratório de nematologia/ICAM. Departamento de Biologia- Universidade de Évora, 2001

Murphy, C. T.; McCarroll, S. A.; Bargmann, C. I.; Fraser, A.; Kamath, R.S.; Ahringer, J., Li, H.; Kenyon, C. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. **Nature** 424(6946): 277-283, 2003

Muschiol, D.; Schroeder, F.; Traunspurger, W. Life cycle and population growth rate of *Caenorhabditis elegans* studied by a new method. **BMC Ecology** 9:14, 2009

Nayak, S., J. Goree & T. Schedl, S; Goree, J; Schedl, T. "Fog-2 and the Evolution of Self-Fertile Hermaphroditism in *Caenorhabditis*". PLoS Biology 3 (1): e6, Jan. 2004

Paganini, F. L., Schmidt, B., Furlong, E. B., Souza, L. A., Soares, M. C., Vaz, M. R. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. **Biological Research Nursing**, 7(2), 146–156, 2005

Pagliosa, C.M., Vieira, M.A., Podestá, R., Maraschin, M., Zeni, A.L.B., Amante, E.R., Amboni, R.D. Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **Food Chemistry**, 122, 173–178, 2010

Pereira, D.F.; Kappela, V.D.; Cazarolli, L.H.; Boligon, A.A.; Athayde, M.C.; Guessera, S.M.; Silva, E.L.; Silva, F.R.M.B. Influence of the traditional Brazilian drink *Ilex paraguariensis* tea on glucose homeostasis. **Phytomedicine**. v: 19: 868– 877, 2012

Pimentel, G. D., Lira, F. S., Rosa, J. C., Caris, A. V., Pinheiro, F., Ribeiro, E. B. Yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) attenuates both central and peripheral inflammatory effects of diet-induced obesity in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 24(5), 809–818, 2012

Pio Corrêa, M. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. **Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal**. Rio de Janeiro, p.138-143, 1984

Pomilio, A. B., Trajtemberg, S., Vitale, A. A. High-performance capillary electrophoresis analysis of mate infusions prepared from stems and leaves of *Ilex paraguariensis* using automated micellar electrokinetic capillary chromatography. *Phytochemical Analysis*, 13(4), 235–241, 2002

Pompella, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research* Bern, v.67,n.5, p.289-297, 1997

Puangpraphant, S., Berhow, M. A., Vermillion, K., Potts, G., & Gonzalez DE Mejia, E. Dicafeoylquinic acids in Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) inhibit NF-kappaB nucleus translocation in macrophages and induce apoptosis by activating caspases-8 and -3 in human colon cancer cells. **Molecular Nutrition and Food Research**, 5 (10), 1509–1522, 2011

Rocha Júnior, W. F., Análise do agronegócio da erva-mate com o enfoque da nova economia institucional e o uso da matriz estrutural prospectiva. **Tese**

**(Doutorado Engenharia de Produção)– Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina.** Florianópolis, 2001

Rover, Jr.; Hoer, N.F.; Vellasco, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quimica Nova.** V: 24: 112-119; 2001

Schinella, G. R.; Troiani, G.; Dávila, V.; Buschiazzo, P. M.;Tournier, H. A. Antioxidant Effects of an Aqueous Extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, p. 357-360, 2000

Shami, N.; Moreira, E. Licopeno como agente antioxidante. **Rev. Nutr.**, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004

Sies, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.215, n.2, p.213-219, 1993

Sies, H., Stahl, W. Vitamins E and C,  $\beta$ -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.62, n.6, p.1315-1321, 1995

Schierenberg, E.; Wood, W. B. Control of cell-cycle timing in early embryos of *Caenorhabditis elegans*. **Dev Biol** 107(2): 337-354, 1985

Stevenson, D.E.E,Hurst R.D. Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more? **Cell. Mol. Life Sci.** v: 64: 2900 – 2916, 2007

Soto-Vaca A., Gutierrez A., Losso J.N., XU Z., Finley J.W. Evolution of Phenolic Compounds from Color and Flavor Problems to Health Benefits. **J. Agric. Food Chem.** V: 60: 6658–6677, 2012

Sugimoto S., Nakamura S., Yamamoto S., Yamashita C., Oda Y., Matsuda H., Yoshikawa M. Brazilian natural medicines.III. structures of triterpene oligoglycosides and lipase inhibitors from mate leaves of *Ilex paraguariensis*. **Chemical &Pharmaceutical Bulletin.** v: 57: 257–261; 2009

The C. elegans Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. **Science** 282, 2012–2018,1998

Vieira M.A., Maraschin M., Pagliosa C.M., Podestá R., DE Simas K.N., Rockenbach I.I., Amboni R.D., Amante E.R. Phenolic acids and methylxanthines composition and antioxidant properties of mate (*Ilex paraguariensis*) Residue. **Journal of food science.** v: 75: 283- 285, 2010

Wen, H., Fu-Lan, H., Jui-Tung, Vivian H. L. The ameliorative and toxic effects of selenite on *Caenorhabditis elegans*. **Food and Chemical Toxicology** 49 - 812–819, 2011

Wen, H.; Quin, J. Analysis of *Caenorhabditis elegans* in microfluidic devices. **Science China Chemistry.** v: 55:484-493,2012

Wiegant, F.; Surinova, S.; Ytsma, E.; Langelaar-Makkinje, M.; Wikman, G.; Post, J. A. Plant adaptogens increase lifespan and stress resistance in *C. elegans*. **Biogerontology**. v: 10: 27-42, 2009

Willett, W. C. Diet and health: what should we eat. **Science**, 264, 532–537, 1994

Wilson, M.A.; Shukitt-Hale, B.; Kalt, W.; Ingram, D.K.; Joseph, J.A.; Wolkow, C.A. Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 5 pp59–68, 2006

Yanase S.; Yasuda K.; Ishii N. Adaptive responses to oxidative damage in three mutants of *Caenorhabditis elegans* (*age-1*, *mev-1* and *daf-16*) that affect life span. **Mech Ageing Dev.** Nov;123(12):1579-87, 2002

Zarse, K.; Jabin, S.; Ristow, M. L-Theanine extends lifespan of adult *Caenorhabditis elegans*. **Europe Jornal Nutricion**, 2012