



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

MILENA FERREIRA DE LIMA

Nanopartículas poliméricas revestidas com fucana contendo Oncocalixona A: avaliação da toxicidade e atividade *in silico/in vivo* sobre a via de sinalização NOTCH e da apoptose

Recife

2024

MILENA FERREIRA DE LIMA

Nanopartículas poliméricas revestidas com fucana contendo Oncocalixona a: toxicidade e atividade *in silico/in vivo* sobre a via de sinalização NOTCH e da apoptose

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Biologia Aplicada à Saúde. Área de concentração: Ciências biológicas

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Priscila Gubert

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Mariane Cajuba de Britto Lira Nogueira

Recife
2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Lima, Milena Ferreira de.

Nanopartículas poliméricas revestidas com fucana contendo Oncocalixona A: avaliação da toxicidade e atividade in silico/in vivo sobre a via de sinalização NOTCH e da apoptose / Milena Ferreira de Lima. - Recife, 2025.

79f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, 2025.

Orientação: Priscila Gubert.

Coorientação: Mariane Cajuba de Britto Lira Nogueira.

Inclui referências.

1. Nanopartículas poliméricas; 2. Oncocalixona A; 3. C. elegans; 4. Liberação controlada; 5. Sinalização celular. I. Gubert, Priscila. II. Nogueira, Mariane Cajuba de Britto Lira. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

AGRADECIMENTOS

Agradecer acima de tudo á Deus, por tamanha benção derramada sobre mim ao longo dos últimos anos. Sua Misericórdia, piedade e bondade nos momentos mais críticos dessa jornada, acalentaram meu coração e me fizeram descansar na sua Graça.

Dedico esse trabalho a toda minha família. Aos meus pais, Marcelo e Arleide, que depositam em mim tanto amor e confiança. Das inúmeras vezes que cheguei tão cansada em casa após um dia extenso, seja na universidade ou no trabalho, ter uma cama forrada, um bolo quente e um almoço feito com tanto carinho para o dia seguinte, me fizeram ter forças para encarar a vida. Ao meu irmão Marcelo, que é meu coração fora do peito, meu amigo e minha risada mais sincera em qualquer dia. Às minhas avós, Maria e Arlete, de quem eu posso desfrutar da companhia até os dias de hoje e que me regam com tanto cuidado que nenhuma palavra despreveria tamanho amor puro e genuíno. O que sou hoje é fruto das suas orações. Aos meus tios Ubiratan e Deise, que me apoiam, inspiram e ajudam incondicionalmente. Tenho sorte em ter uma família tão cheia de amor e sem eles, nada seria possível. Sou confiante em ganhar o mundo por saber que tenho um lar para onde voltar.

Às minhas amigas de infância Assucena, Ludmila, Maria Clara, Samara, Thaís e Victoria. Ao longo dos anos, fui várias versões de mim mesma e sei que fui e sou amada em cada uma delas. Pelos conselhos, risadas, encontros, doramas, noites do pijama. Nosso elo é uma das minhas inspirações a sempre buscar ser minha melhor versão.

Aos meus amigos de longa data, Eduardo, Lara e Heloísa, com quem divido desde 2016 jornadas tão diferentes mas que são meu ponto de apoio desde então. Á Azael, meu fiel escudeiro, com quem compartilho caminhos, planos, sonhos, lembranças e histórias de vida. Sei que meu nome é proferido com carinho e defendido por eles, obrigada pela torcida de sempre.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro através da bolsa de mestrado, que possibilitou a realização deste trabalho. Agradeço também ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Instituto Keizo Asami pela oportunidade e infraestrutura oferecidas.

Agradeço às minhas parceiras de mestrado Isabel e Ângela. Por todas as discussões, projetos juntas, desabafos, críticas construtivas e filosofias no banco do iLIKA às 8 da noite. À Clarice, minha eterna IC e filha acadêmica, com quem aprendi tantas coisas bonitas e posso dividir angústias e momentos de felicidade. Á Rayane, com quem pude compartilhar

momentos de tanta leveza. Das boas lembranças dessa fase tão bonita da minha vida, vocês são estrelas principais.

Aos funcionários Rafael Padilha, Edson, Moisés e Valeria, que muitas vezes foram as primeiras e as últimas pessoas que eu encontrava no Instituto. Pelos cafés, bolachas, orações, momentos de alegria, caronas e união. Carrego vocês no meu coração para sempre.

Aos grupos de pesquisa NanoBioCell e Neuroimunogenética, em especial às professoras Mariane e Priscila, por todo acolhimento e paciência desde o início deste trabalho.

À Ana Paula Santana, pelas orações e cuidados comigo desde a minha jornada no curso de farmácia e que perduram até os dias de hoje.

E por último, à Thomas de Paula Santana. Por ser meu amparo, acolhimento e porto seguro quando a tempestade se tornou tão forte, por tantas vezes. Seu olhar sobre mim me deu coragem para ir atrás daquilo que eu mal ousava desejar em voz alta e te dedico também a essa conquista tão importante da minha vida. Amo você em qualquer lugar do mundo.

Antes de chorar sobre os limites que possui, antes de reclamar de suas inadequações, e fadar o seu destino ao fim, aceita o desafio de pousar os olhos sobre este aparente estado de fraqueza, e ouse acreditar, que mesmo em estradas de pavimentações precárias, há sempre um destino que poderá nos levar ao local onde o sol se põe tão cheio de beleza.

(Fábio de Melo)

RESUMO

Oncocalixona A (OncoA), uma para-benzoquinona derivada da *Cordia oncocalyx*, apresenta destacadas propriedades anticancerígenas, mas sua aplicação terapêutica é limitada pelo risco de toxicidade. Utilizando *Caenorhabditis elegans* como modelo *in vivo*, este estudo teve como objetivo sintetizar e avaliar nanopartículas de PIBCA contendo OncoA revestidas com fucana (NpOnco), bem como nanopartículas não carregadas (NpFuc) e OncoA em sua forma livre (Onco), visando sua eficácia e toxicidade na modulação da via de sinalização NOTCH e indução de apoptose. As nanopartículas NpFuc apresentaram tamanho médio de 168,5 nm, potencial zeta de -57,6 mV e PDI de 0,029, enquanto as NpOnco exibiram tamanho de 221,3 nm, potencial zeta de -56,6 mV e PDI de 0,006, demonstrando estabilidade e potencial biocompatível. As nanopartículas foram diluídas para as concentrações de 6,25 e 50 μ M e nos ensaios de sobrevivência e desenvolvimento não evidenciaram toxicidade para os grupos testados. A triagem fenotípica com a cepa BS3164 mostrou que os grupos NpFuc e Onco na concentração de 6,25 μ M foram capazes de modular parcialmente a via de sinalização NOTCH, revertendo fenótipos mutantes. Além disso, os ensaios de apoptose utilizando a cepa MD701 revelaram um aumento nos eventos apoptóticos, com aumento significativo entre o grupo controle e o grupo NpFuc na maior concentração, com resultados de 4,3 e 7,4 respectivamente. Esses dados destacam, especialmente, o grupo NpFuc como promissor na indução de apoptose. Os resultados evidenciam o potencial terapêutico das nanopartículas de OncoA revestidas com fucana, ao combinar uma entrega direcionada com menor toxicidade. Assim, essas nanopartículas representam uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novos agentes anticancerígenos.

Palavras-chave: Nanopartículas poliméricas, Oncocalixona A, *C. elegans*, liberação controlada, sinalização celular.

ABSTRACT

Oncocalixone A (OncoA), a para-benzoquinone derived from *Cordia oncocalyx*, exhibits significant anticancer properties but faces therapeutic limitations due to its potential toxicity. Using *Caenorhabditis elegans* as an *in vivo* model, this study aimed to synthesize and evaluate PIBCA nanoparticles loaded with OncoA and coated with fucan (NpOnco), as well as unloaded nanoparticles (NpFuc) and free OncoA (Onco), focusing on their toxicity, efficacy, modulation of the NOTCH signaling pathway, and induction of apoptosis. NpFuc nanoparticles displayed an average size of 168.5 nm, a zeta potential of -57.6 mV, and a PDI of 0.029, while NpOnco nanoparticles exhibited an average size of 221.3 nm, a zeta potential of -56.6 mV, and a PDI of 0.006. Both systems demonstrated stability and biocompatibility, showing no toxicity in survival and developmental assays at concentrations of 6.25 and 50 μ M, including the Onco group. Phenotypic screening using the BS3164 strain indicated that the NpFuc6 and Onco6 groups partially modulated the NOTCH signaling pathway, reversing mutant phenotypes. Additionally, apoptosis assays using the MD701 strain revealed an increase in apoptotic events, with average apoptotic bodies of 4.3, 7.4, 6.5, and 5.7 for the control, NpFuc50, NpOnco50, and Onco50 groups, respectively. These findings highlight the NpFuc50 group as particularly promising in apoptosis induction. These results underscore the therapeutic potential of fucan-coated OncoA nanoparticles, combining targeted delivery with reduced toxicity. This approach suggests their relevance for future development as anticancer agents.

Keywords: Polymeric nanoparticles, oncocalixone A, *Caenorhabditis elegans*, NOTCH signaling pathway

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Tipos de nanopartículas carregadas com ativo	18
Figura 2 –	Nanopartículas poliméricas com e sem revestimento	20
Figura 3 –	Gráfico com a relação entre o ano e o quantitativo de artigos publicados, após utilização dos filtros de critério de inclusão	33
Figura 4 –	Gráfico com os tipos de nanopartículas identificados na revisão	34
Figura 5 –	Método de síntese das nanopartículas pelo método AEP	35
Figura 6 –	Esquema de produção dos tubos para sincronização	37
Figura 7 –	Método de sincronização por filtração	39
Figura 8 –	Método de síntese das nanopartículas pelo método AEP	40
Figura 9 –	Imagens das diluições de 50 μ M	41
Figura 10 –	Método de exposição dos vermes às nanopartículas	42
Figura 11	Gráfico da análise de tamanho, potencial zeta e PDI das nanopartículas	48
Figura 12	Gráfico do ensaio de sobrevivência em <i>C. elegans</i> após a exposição.	49
Figura 13	Gráfico do ensaio de desenvolvimento em <i>C. elegans</i> após a exposição.	50
Figura 14	Gráfico do comprimento corporal dos vermes em L4	51
Figura 15	Gráfico do tempo médio gasto por cada verme para completar um ciclo de defecação	52
Figura 16	Gráfico das médias de batimentos faríngeos por minuto	53
Figura 17	Gráfico das médias de ovos produzidos por verme	54
Figura 18	Imagens dos vermes tratados com a NpOnco 50 μ M e o grupo controle sob fluorescência	55
Figura 19	Gráfico do batimento faríngeo da cepa B3164 após exposição	57
Figura 20	Gráfico do ciclo de defecação da cepa B3164	58
Figura 21	Triagem fenotípica com a cepa BS3164 de <i>C. elegans</i> para descobrir drogas anticâncer, avaliando a reversão do fenótipo	59

mutante na via de sinalização NOTCH

Figura 22	Comparativo dos vermes da cepa BS3164 após tratamento de 72h	60
Figura 23	Cepa MD701 mostrando células germinativas em apoptose	61
Figura 24	Gráfico da contagem dos corpos apoptóticos na cepa MD701 após exposição.	62
Figura 25	Gráficos do resultado do docking molecular com a OncoA e a Fucana	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Estruturas e Propriedades Redox de Quinonas	21
Tabela 2 –	Overview de publicações relacionadas às análises <i>in vivo</i> de nanopartículas revestidas utilizando <i>C. elegans</i> como modelo <i>in vivo</i>	28

LISTA DE ABREVIATÖES

Polimerização em emulsão aniônica	AEP
Branched polyethyleneimine	BPEI
<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>C. elegans</i>
Diethylaminoethyl dextran (catiônico)	DEAE
Dextran (não iônico)	DEX
Sodium docusate	DOCU
Ácido dimercaptosuccínico	DMSA
Sodium deoxycholate	DS
Carboxymethyl dextran (aniônico)	CM
Chitosan	NCCS
Eudragit® RS 100	NCEUD
Polyethylene glycol	NCHPEG
Polysorbate 80	NCP80
Nanopartícula	NP
Nanopartículas revestidas com fucana	NpFuc
Nanopartículas contendo Oncocalixona A e revestidas com fucana	NpOnco
Oncocalixona A livre em solução	Onco
Poly-(ε-caprolactone)	PCL
Poly(ethylene glycol) ou Polyethylene glycol	PEG
Polyglycerol	PG
Poli (isobutilcianoacrilato)	PIBCA
Polidopamina	PDA
Polyvinyl pyrrolidone ou Polyvinylpyrrolidone	PVP

Nanopartículas de óxido de ferro
superparamagnéticas

SPIONS

SUMÁRIO

1. Introdução	15
2. Referencial teórico	18
2.1 Nanotecnologia e revestimento de nanopartículas	18
2.1.1 Uso de nanopartículas poliméricas revestidas	20
2.2 Produtos naturais como fonte de descoberta de novos fármacos	22
2.3 Derivados quinóides: definição, estrutura química, classificação e atividades biológicas.	23
2.4 Cordia oncocalyx allemão	24
2.5 Oncocalixona A	25
2.6 Caenorhabditis elegans	26
2.6.1 Uso do nematóide Caenorhabditis elegans como modelo in vivo	28
2.6.2 Overview de publicações relacionadas às análises in vivo de nanopartículas revestidas utilizando c. elegans	29
3. Objetivos	37
3.1 Geral	37
3.2 Específicos	37
4. Materiais e métodos	38
4.1 Reagentes	38
4.2 Preparo das nanopartículas	38
4.3 Caracterização das nanopartículas	39
4.3.1. Avaliação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta	39
4.4 Cultivo e manutenção das cepas	40
4.5 Método de sincronização por filtragem	40
4.6 Exposição dos vermes às nanopartículas	43
4.7 Ensaio toxicológicos	44
4.7.1 Sobrevivência e desenvolvimento	44
4.7.2 Ciclo de defecação	45
4.7.3 Batimento faríngeo	45
4.7.4 Produção de ovos	45
4.7.5 Comprimento de corpo	46
4.8 Análise da ingestão das nanopartículas	46
4.9 Teste de fenótipo - cepa BS3164	46

4.10 Docking molecular	48
5. Resultado e discussão	49
5.1 Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas.	49
5.2 Ensaio realizado com a cepa N2	50
5.2.1 Sobrevivência e desenvolvimento larval	50
5.2.2 Comprimento de corpo	51
5.2.3 Ciclo de defecação	52
5.2.4 Batimento faríngeo	53
5.2.5 Ovoprodução	54
5.2.6 Ingestão das nanopartículas	56
5.3 Ensaio realizado com a cepa BS3164	57
5.3.1 Batimento faríngeo - BS3164	57
5.3.2 Ciclo de defecação - BS3164	58
5.3.3 Teste de fenótipo - BS3164	59
5.4 Contagem de corpos apoptóticos na cepa MD701	61
5.5 Docking Molecular	63
4. Conclusão	65
5. Referências	66

1. Introdução

O câncer representa um desafio complexo e multifacetado no âmbito da saúde humana, caracterizado por uma miríade de alterações genômicas e moleculares que culminam em um crescimento e proliferação celular descontrolados. Essa replicação descontrolada leva ao rápido acúmulo de massa tecidual nas áreas afetadas do corpo. Normalmente, as células recebem sinais que desencadeiam a morte celular programada, sendo substituídas por novas e saudáveis (Ciriello *et al.*, 2024). No entanto, as células cancerosas subvertem esse processo, utilizando o suprimento de oxigênio e nutrientes do corpo para alimentar sua expansão, privando as células circundantes de recursos vitais e fatores de crescimento (Nejad *et al.*, 2021). Além disso, essas células malignas manipulam habilmente seu microambiente, escapando da detecção pelo sistema imunológico e explorando células vizinhas para atender às suas demandas metabólicas (Kim e Cho, 2022).

O conceito de quimioterapia, que utiliza compostos tóxicos e medicamentos para erradicar células cancerosas, remonta à descoberta da capacidade do gás mostarda de destruir tecidos linfáticos e medula óssea (Revita e Chu, 2008). A escolha de agentes quimioterápicos, seja de forma isolada ou em combinação, é predominantemente guiada pelo tipo e estágio específico do câncer. Esses medicamentos são projetados para atacar e eliminar células cancerosas, aliviando ao mesmo tempo o estresse fisiológico imposto pelo crescimento tumoral. Crucialmente, a dosagem e a duração do tratamento devem ser cuidadosamente calibradas para equilibrar a eficácia com a tolerabilidade. No entanto, as doses elevadas frequentemente necessárias podem induzir efeitos colaterais severos e prejudicar tecidos saudáveis, representando um desafio clínico significativo (Yang *et al.*, 2023).

Assim, há uma necessidade urgente de investir em novas linhas de pesquisa que explorem métodos de tratamento alternativos que sejam não apenas mais eficazes, mas também econômicos e que apresentem menos efeitos colaterais. Estudos populacionais e de laboratório estão acumulando evidências que demonstram as propriedades anticancerígenas e antimutagênicas significativas dos fitoquímicos. Investigações realizadas em linhas celulares e modelos animais têm revelado consistentemente a eficácia dos fitoquímicos tanto no tratamento quanto na prevenção do câncer, oferecendo caminhos promissores para o desenvolvimento terapêutico (Rudzinska *et al.*, 2023).

Por exemplo, pesquisadores destacam os efeitos inibitórios do alho sobre o crescimento da linha celular de carcinoma de laringe humano Hep-2, enfatizando seu potencial como

agente anticancerígeno natural (Greef *et al.*, 2021). Da mesma forma, estudos sobre o extrato de folhas de *Hibiscus sabdariffa* demonstraram sua capacidade de induzir morte celular autofágica em melanoma humano, inibir o crescimento de tumores em modelos de xenotransplante e induzir apoptose em várias linhas celulares de câncer (Millan *et al.*, 2020; Tsai *et al.*, 2023). Investigações utilizando um modelo de rato revelaram os significativos efeitos anticancerígenos de Shemamruthaa, atribuídos à sua capacidade de reduzir a peroxidação lipídica, prevenir danos à membrana e restaurar a integridade da membrana (Purushothaman *et al.*, 2016).

Além disso, estudos sobre *Viola tricolor* eludaram os potentes efeitos antitumorais de suas frações de acetato de etila e n-butanol contra células de neuroblastoma N2a, reforçando ainda mais o potencial terapêutico dos fitoquímicos no tratamento do câncer. Esses achados coletivamente ressaltam o imenso potencial terapêutico dos fitoquímicos derivados de plantas medicinais, oferecendo uma via promissora para o desenvolvimento de novos e eficazes tratamentos contra o câncer (Sadeghnia *et al.*, 2014).

Uma parte significativa dos dados empíricos associados à exploração de novos produtos farmacêuticos provém de investigações *in vitro* ou *in vivo*. Esses estudos abrangem processos intrincados, como absorção, metabolismo e interações complexas em nível celular, tecidual e de órgãos em modelos animais abrangentes. No entanto, essas abordagens às vezes apresentam limitações, como altos custos de manutenção e resultados a longo prazo. Para superar essas limitações e aprofundar o entendimento sobre os impactos biológicos, os cientistas frequentemente utilizam *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), um nematódeo com características únicas, como um corpo transparente e uma elevada correspondência genética com os humanos. Estudos de proteômica comparativa revelaram que 83% do proteoma desse organismo possui genes homólogos aos humanos. Além disso, apresenta vias biológicas fundamentais conservadas, semelhantes às de organismos superiores. Sua fácil cultivação em meio de ágar e ciclo de vida curto também favorecem sua aplicação em diversos ensaios biológicos realizados em períodos reduzidos (Henricson *et al.*, 2024; Das *et al.*, 2022).

Para modelar uma doença humana no nematódeo, a manipulação genética do genoma do verme torna-se imperativa. Essa manipulação pode envolver a interrupção da expressão do gene homólogo de *C. elegans* associado à doença humana para induzir um fenótipo mutante ou a amplificação da expressão do gene humano relacionado à doença, seja de forma ubíqua ou em tecidos específicos, para mimetizar características relacionadas à doença no verme. Assim, cepas como a BS3164, que exibem ganho de função e expressão da via de sinalização NOTCH e a cepa MD701, que apresenta fluorescência para corpos apoptóticos, foram

desenvolvidas. A disponibilidade dessas cepas, aliada a estudos *in silico* utilizando docking molecular, facilita uma investigação mais abrangente sobre a interação de novos medicamentos com vias de sinalização conservadas no verme, melhorando e acelerando a descoberta de novos tratamentos para o câncer (Markaki *et al.*, 2020).

Assim, o principal objetivo deste estudo foi sintetizar e avaliar a toxicidade de nanopartículas poliméricas contendo Oncocalixona A, uma molécula com potencial anticancerígeno. Para isso, foram utilizadas nanopartículas poliméricas biodegradáveis e não tóxicas, compostas por materiais já empregados na medicina. Além disso, o estudo investigou seu potencial anticancerígeno por meio da modulação das vias de sinalização NOTCH e apoptose em *C. elegans*.

2. Referencial teórico

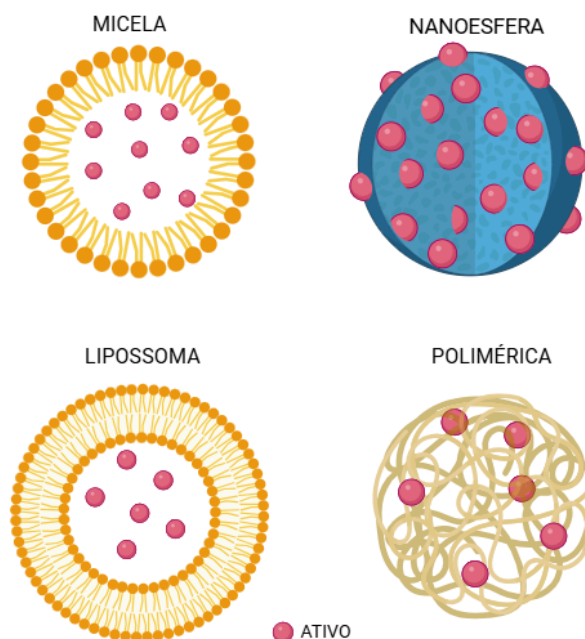
2.1 Nanotecnologia e revestimento de nanopartículas

Na indústria farmacêutica, a nanociência tem avançado significativamente na melhoria e otimização de métodos de liberação de medicamentos, diagnósticos, imagem, biossensores e mecanismos de liberação de fármacos. As propriedades únicas dos nanomateriais possibilitam aumentar a biodisponibilidade dos medicamentos, melhorar a permeabilidade através de barreiras biológicas e proteger contra a degradação quando encapsulados (Sultana *et al.*, 2020; Mazayen *et al.*, 2022; Gorain *et al.*, 2022).

O uso da nanotecnologia, com uma diversidade em métodos de síntese, funcionalização e modelos de nanossistemas tem se destacado como uma plataforma promissora que, ao longo das últimas duas décadas, evoluiu de tecnologias de ponta para aplicações práticas. As nanopartículas (NP), partículas de dimensões nanométricas, se mostram como ferramentas versáteis com amplas aplicações em áreas como liberação controlada de fármacos, diagnósticos, cosméticos, entre outras áreas biológicas (Najahi-Missaoui *et al.*, 2021).

Como ilustrado na figura 1, os nanossistemas podem ser desenvolvidos em diversas formas, como lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsões, micelas e nanopartículas de polímeros biodegradáveis, entre outras. Essas estruturas são projetadas para encapsular fármacos com propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas, garantindo uma liberação controlada e eficaz dos medicamentos. Os materiais utilizados na criação desses sistemas de liberação, como lipídios e polímeros, devem ser cuidadosamente escolhidos para garantir compatibilidade com o fármaco a ser encapsulado, além de serem biodegradáveis e biocompatíveis, assegurando segurança e eficácia no tratamento escolhido (Mei *et al.*, 2013; Alexander *et al.*, 2016).

Figura 1: Tipos de nanossistemas carregados com ativo.



Fonte: A autora (2024).

Entre os diversos tipos de nanossistemas existentes, os nanocarreadores, por sua vez, desempenham um papel crucial na proteção dos fármacos contra a degradação, permitindo, além disso, uma liberação sustentada e controlada dos mesmos (Dos Santos *et al.*, 2021; Vieira *et al.*, 2016). Esses sistemas também têm a capacidade de reduzir a eliminação rápida dos medicamentos pelo organismo e de melhorar sua acumulação em tecidos doentes, o que pode aumentar a eficácia terapêutica e diminuir os efeitos colaterais indesejados (Ferrari *et al.*, 2010).

As NP podem ser projetadas com propriedades físico-químicas específicas, como tamanho, carga superficial, hidrofobicidade/hidrofilicidade e geometria, dependendo de sua aplicação. Essas características são fundamentais para garantir uma entrega mais eficaz dos agentes terapêuticos nos locais de ação desejados. No entanto, apesar das inúmeras vantagens oferecidas pelas NP, é essencial avaliar cuidadosamente seu potencial tóxico e desenvolver testes de segurança capazes de prever com precisão os riscos associados ao seu uso (Barua *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2018; Rizvi e Saleh, 2018).

2.1.1 Uso de nanopartículas poliméricas revestidas

O uso de polímeros, especialmente os biodegradáveis, oferece várias vantagens. Estas incluem maior estabilidade para agentes farmacêuticos voláteis, custo-benefício e facilidade de produção em larga escala, resultando em maiores concentrações de medicamentos em locais específicos—tornando-os candidatos ideais para terapias, vacinas, contraceptivos, antibióticos e tratamentos mais específicos, devido à sua capacidade de modular a liberação e biodisponibilidade dos fármacos (Herdiana *et al.*, 2021; Satpathy *et al.*, 2023).

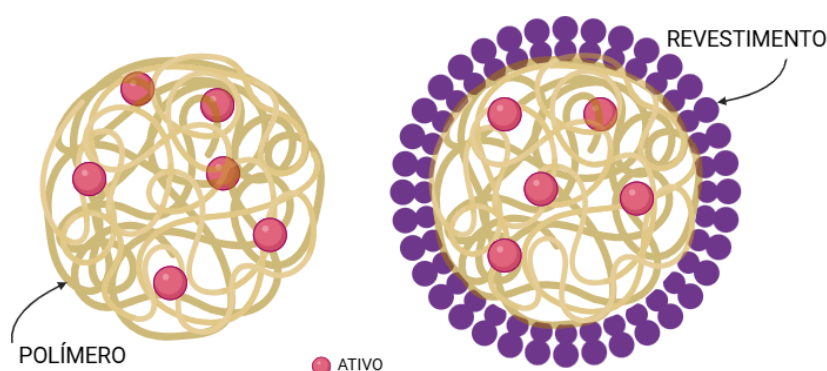
Um desses polímeros utilizados na síntese de NP's é o poli (isobutilcianoacrilato) (PIBCA), um polímero sintetizado a partir do monômero isobutilcianoacrilato (IBCA). O IBCA é amplamente utilizado na área médica com cola e adesivo no tratamento dos afinamentos e perfurações em cirurgias diversas (Leahey *et al.*, 1993). Este polímero tem se destacado na síntese de nanopartículas devido às suas propriedades de biodegradabilidade e biocompatibilidade. A síntese dessas nanopartículas geralmente ocorre por meio da polimerização em emulsão, o que permite um controle preciso do tamanho das partículas, além de garantir sua estabilidade ao longo do tempo (Covreur *et al.*, 1982; Reis *et al.*, 2006; Vandervoot e Ludwig, 2002)

Entre as principais vantagens do PIBCA, destaca-se sua capacidade de ser degradado de maneira eficiente no organismo, o que possibilita a liberação controlada de agentes terapêuticos. Além disso, sua alta compatibilidade biológica reduz o risco de reações imunológicas adversas. Outro aspecto relevante é a facilidade de funcionalização do polímero, o que permite a incorporação de uma ampla gama de fármacos, tanto hidrofílicos quanto hidrofóbicos, ampliando seu potencial de aplicação em diferentes tratamentos. A estabilidade das nanopartículas em circulação sanguínea também oferece uma proteção adicional aos fármacos encapsulados, prevenindo a degradação prematura e aumentando a eficácia terapêutica (Kučuk *et al.*, 2023)

O revestimento das NP's exerce uma função essencial na otimização de suas propriedades funcionais (figura 2). A aplicação de revestimentos permite a modificação da superfície das partículas, o que pode resultar em maior biocompatibilidade, estabilidade aprimorada e funcionalidade aumentada. No campo da biomedicina, por exemplo, o revestimento de nanopartículas pode potencializar a eficiência de sistemas de liberação de medicamentos, possibilitando um controle mais preciso sobre a liberação do fármaco e um direcionamento mais eficaz ao local desejado. Esse processo é viabilizado pela modificação da superfície das nanopartículas com agentes específicos que interagem seletivamente com

certos tipos de células ou tecidos, o que, consequentemente, aumenta a eficácia terapêutica e minimiza os efeitos colaterais. Além disso, o revestimento pode proteger o fármaco contra a degradação prematura ou a eliminação pelo organismo antes que ele atinja o alvo pretendido (Comanescu *et al.*, 2023; Yusuf *et al.*, 2023).

Figura 2: Nanopartículas poliméricas com e sem revestimento.



Fonte: A autora (2024).

Como um dos materiais utilizados como revestimento tem-se a fucana, um polissacarídeo sulfatado presente em algas marrons como *Fucus vesiculosus* e pepinos-do-mar, amplamente reconhecida por suas promissoras propriedades anticancerígenas. Com uma composição complexa, incluindo 44,1% de fucose, 26,3% de sulfato e 31,1% de cinzas, além de traços de aminoglicose, a fucana extraída de *F. vesiculosus* está comercialmente disponível. Estudos indicam que fucoidanos dessa espécie inibem fortemente a adesão de células de carcinoma mamário MDA-MB-231 a plaquetas, um efeito que pode ser crucial na prevenção de metástases tumorais (Cumashi *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008)

Além disso, a fucana demonstra variações estruturais significativas entre espécies, influenciando sua eficácia biológica. Pesquisas também destacam o desenvolvimento de nanopartículas à base de fucana para terapias direcionadas, ampliando suas aplicações no tratamento de câncer. A capacidade de interagir com moléculas como a P-selectina em células tumorais metastáticas reforça seu papel potencial na oncologia, especialmente como agente anti-metastático (Yu *et al.*, 2024; Xing *et al.*, 2023; Zhou *et al.*, 2024)

Ainda no campo da nanotecnologia, as NP's de PIBCA têm atraído atenção devido à sua eficiência na encapsulação de compostos bioativos. Além de melhorar parâmetros como solubilidade e distribuição, elas também reduzem os potenciais efeitos tóxicos por meio da liberação prolongada, protegendo-os de fatores ambientais, como umidade e calor. Além disso, o PIBCA é classificado como um polímero não tóxico e biodegradável, sendo considerado um biomaterial seguro (Machtakova *et al.*, 2022)

2.2 Produtos naturais como fonte de descoberta de novos fármacos

Historicamente, compostos naturais e seus análogos estruturais desempenham um papel importante na farmacoterapia, especialmente no tratamento de doenças infecciosas. Além das moléculas bioativas originadas de plantas que são utilizadas diretamente como medicamentos, outros compostos naturais se mostraram eficazes como "leads" ou modelos para a síntese ou semi síntese de novos fármacos (Balandrin *et al.*, 1993; Bahar *et al.*, 2007). Recentemente, avanços científicos e tecnológicos, têm superado desafios e criado novas oportunidades na pesquisa de medicamentos à base de plantas. Esses avanços se refletem na complexidade dos bioensaios utilizados no desenvolvimento de fármacos de origem vegetal, permitindo que informações sobre o mecanismo de ação em nível molecular sejam obtidas de forma rápida e precisa (Chaachouay and Zidane, 2023).

Pesquisadores de diversas áreas, como etnobotânica, farmacognosia, química medicinal, biologia molecular, microbiologia e ecologia vegetal, se empenham em descobrir novos componentes químicos oriundos de espécies vegetais (Jones *et al.*, 2006). A grande diversidade química de moléculas encontradas em plantas é uma característica notável, com uma variedade de metabólitos secundários, como alcalóides, flavonóides, terpenóides e compostos fenólicos, que têm inspirado o desenvolvimento de novos fármacos. Muitos desses compostos foram utilizados na medicina tradicional ao longo de séculos e agora estão sendo investigados por seu potencial terapêutico (Lautie *et al.*, 2020).

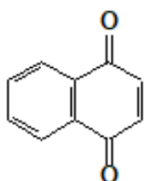
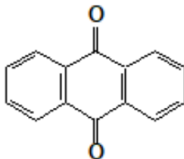
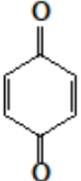
Vários produtos naturais de importância médica, anteriormente obtidos de fontes vegetais, agora são produzidos por síntese, como atropina, cocaína, efedrina, colchicina, cafeína, entre outros. A classe de medicamentos derivados de atropina, por exemplo, é uma das mais amplas, com muitos fármacos aprovados tendo como base essa substância natural. Outro exemplo é a artemisinina, que deu origem a derivados semissintéticos usados no tratamento da malária. Além disso, o ácido salicílico, precursor da aspirina, teve seu desenvolvimento facilitado por métodos de produção simples (Gryniewicz *et al.*, 2008).

Desta forma, a importância dos produtos naturais derivados de plantas na descoberta e desenvolvimento de medicamentos é inegável, devido à sua diversidade química, adaptações evolutivas e riqueza de conhecimento tradicional. Essas moléculas continuam a ser uma fonte vital de soluções inovadoras para uma ampla gama de problemas de saúde, demonstrando como a natureza e a ciência podem colaborar para o avanço da saúde humana.

2.3 Derivados quinóides: definição, estrutura química, classificação e atividades biológicas.

As quinonas são compostos orgânicos cíclicos que possuem duas carbonilas conjugadas em um sistema de anéis aromáticos. Essa estrutura única confere a elas propriedades redox, ou seja, a capacidade de ganhar ou perder elétrons, alternando entre as formas de quinona (oxidada) e quinol (reduzida). Como demonstrado na tabela 1, esses compostos podem ser classificados em três principais categorias: benzoquinonas, naftoquinonas e antraquinonas (Chan-Zapata *et al.*, 2023).

Tabela 1: Estruturas e Propriedades Redox de Quinonas

Classificação	Principais atividades	Estrutura	Referências
Naftoquinonas	Antitumoral, antimalárico, antibacteriano, antifúngico, anti-inflamatório		Alcides <i>et al.</i> , 2009 Pereyra <i>et al.</i> , 2019
Antraquinonas	Laxante, antibacteriano, antiviral, antifúngico		Choi <i>et al.</i> , 1990 Singh <i>et al.</i> , 2004 Breimer <i>et al.</i> , 2008
Benzoquinonas	Antioxidante, neuroprotetor		Dandawate <i>et al.</i> , 2010 Cores <i>et al.</i> , 2023

Fonte: A autora (2024)

As naftoquinonas são compostos orgânicos derivados da naftalina, caracterizados por um anel quinona ligado a um sistema bicíclico de anéis aromáticos. Sua estrutura básica inclui dois grupos cetona em posição orto (1,2) ou para (1,4) em relação ao anel naftaleno, o que confere propriedades químicas e biológicas importantes. Esses compostos atuam como agentes pró-oxidantes em sistemas biológicos, capazes de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), contribuindo para atividades biológicas, como efeitos antimicrobianos, anticancerígenos e anti-inflamatórios. Como exemplos, possuímos o Lapachol, com atividade antifúngica e anticâncer e a plumbagina (Pereyra *et al.*, 2019; Epifano *et al.*, 2014; Jamal *et al.*, 2014).

Já as antraquinonas, são compostos aromáticos com uma estrutura central formada por um anel de antraceno com dois grupos cetona nas posições 9 e 10. Essa estrutura confere a elas propriedades redox, tornando-as importantes em processos biológicos e sintéticos. Elas são encontradas em plantas, fungos e insetos, com papéis como pigmentos naturais ou metabólitos secundários. Suas propriedades incluem efeitos laxativos, antimicrobianos, anticancerígeno além de aplicações industriais, como corantes. Fazem parte deste grupo a Aloe-emodina, com ação laxativa e anticancerígena, e a Emodina, com propriedades antiinflamatórias e antivirais (Li *et al.*, 2020; Wang, 2021; Prateeksha *et al.*, 2019)

Por último, as benzoquinonas são compostos orgânicos cíclicos, derivados do benzeno. A estrutura é caracterizada por um anel benzeno com dois grupos cetona em posições orto ou para, tornando-as reativas em processos de oxidação-redução. Elas são conhecidas por sua capacidade de atuar como agentes oxidantes e por desempenharem papéis biológicos em sistemas celulares, incluindo a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Com esta classificação, possuímos a Ubiquinona (ou Coenzima Q10), com atividade amplamente conhecida no transporte de elétrons nas mitocôndrias, crucial para a produção de energia celular, e o Tocofersolan, que é uma versão sintética da vitamina E mais solúvel em água e com propriedades antioxidantes significativas (Palotti *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2010; Dandawate *et al.*, 2010)

2.4 *Cordia oncocalyx* allemão

O gênero *Cordia* pertence à família Boraginaceae e compreende mais de 300 espécies amplamente distribuídas em várias regiões tropicais do mundo. Dentre estas, 58 espécies ocorrem no Brasil, sendo 30 consideradas endêmicas (Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2024). Com base em levantamentos etnobotânicos, alguns representantes desse gênero, como *Cordia myxa* L., *Cordia platythyrsa* Bak., *Cordia dichotoma* G. Forst. e *Cordia africana*

Lam., são amplamente utilizados na medicina tradicional para o tratamento de inflamações e doenças infecciosas causadas por microrganismos patogênicos (Hosseini *et al.*, 2021; Wandji *et al.*, 2022; Hussain *et al.*, 2023; Dubale *et al.*, 2023).

A espécie *Cordia oncocalyx* Allemão (sinônimo: *Auxemma oncocalyx* Taub.), conhecida popularmente como "louro-branco", "pau-branco", "freijó" ou "pau-branco-preto" na região Nordeste do Brasil, tem suas partes aéreas utilizadas popularmente. Preparadas na forma de infusão ou decocção, essas partes são tradicionalmente utilizadas no tratamento de úlceras externas e na cicatrização de feridas (Agra *et al.*, 2018).

O pau-branco é uma espécie da família Boraginaceae, endêmica do Brasil, presente na vegetação da Caatinga nos estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte (Cordia *et al.*, 2018), e também registrada em Minas Gerais e Mato Grosso (Paiva *et al.*, 2002). Estudos anteriores relatam que produtos naturais obtidos de espécies do gênero *Cordia* apresentam um potencial farmacológico promissor, com destaque para suas atividades antifúngicas, antibacterianas e antiparasitárias (Andrade *et al.*, 2022).

2.5 Oncocalixona A

A oncocalixona A (OncoA) é uma para-benzoquinona isolada do caule da planta *Cordia oncocalyx* allemão, sendo o principal composto nos extratos etanólicos, correspondendo a cerca de 80% da fração hidrossolúvel (Ferreira *et al.*, 2023; Souza *et al.*, 2021). A OncoA possui diversos efeitos biológicos já documentados, incluindo atividades antioxidante, antiplaquetária, analgésica, anti-inflamatória e citotóxica contra certas linhagens de células cancerígenas (Cavalcanti *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2020). Sua estrutura química é semelhante à da doxorrubicina, um fármaco amplamente utilizado no tratamento do câncer, e foi relatada sua ação antiproliferativa contra câncer de pulmão, ovário, reto, glioblastoma, próstata, cólon, além de sarcomas e leucemias (Cavalcanti *et al.*, 2021; Sousa *et al.*, 2021).

A reatividade da OncoA em relação ao DNA se deve principalmente à presença de grupos carbonílicos eletrofílicos α,β -insaturados, que podem interagir com bases nucleofílicas e atuar como aceptores de Michael em meio prótico. Além disso, sua estrutura policíclica, com um anel aromático plano, permite que a OncoA funcione como agente intercalante de DNA, o que inibe o crescimento celular. Essa característica desperta grande interesse nas pesquisas para o tratamento do câncer (Cavalcanti *et al.*, 2021; Costa *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2023).

Com base na atividade antitumoral demonstrada e considerando o uso de *Cordia oncocalyx* na medicina popular, os efeitos genotóxicos da Onco A em comparação com sua

atividade citotóxica também foram analisados por meio de ensaios *in vitro* em linfócitos humanos (Pessoa *et al.*, 2003). As células foram tratadas com 0,5 µg/mL de OncoA nas fases G1, G1/S e S do ciclo celular. Os resultados, obtidos por meio da análise do índice mitótico (número de células em divisão), mostraram uma citotoxicidade semelhante ao controle utilizado, com um efeito tóxico leve na fase S. Com esses resultados, os autores sugeriram uma inibição da síntese de DNA, especialmente na fase de transição G1/S. Além disso, a OncoA não induziu aberrações cromossômicas significativas na linhagem celular testada, demonstrando ausência de genotoxicidade.

Entretanto, evidências recentes relatam toxicidade pulmonar, renal e cardíaca, atribuídas à Onco A (Silva *et al.*, 2021). Desta forma, o uso de nanossistemas para o transporte e liberação controlada de OncoA surge como uma rota promissora para tratamentos direcionados a diversas linhagens de câncer, além de superar algumas limitações relacionadas aos potenciais efeitos tóxicos que esse agente bioativo pode causar em órgãos como pulmões, rins e coração (Cavalcanti *et al.*, 2021; Sousa *et al.*, 2021).

Estudos recentes apontam a toxicidade de nanopartículas de PIBCA contendo OncoA e revestidas com fucana em linhagens celulares de câncer. A análise da migração celular da linhagem MDA-MB-231, exposta à OncoA livre e encapsulada nas nanopartículas em concentrações de 1,55 a 50 µM, revelou uma redução significativa na viabilidade celular a partir de 6,25 µM, atingindo seu pico na concentração de 50 µM (Cavalcanti *et al.*, 2021).

2.6 *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) é um nematoide terrestre pertencente ao filo Nematoda e à família Rhabditidae. Trata-se de um pequeno verme livre de parasitas, que mede aproximadamente 1 mm de comprimento, encontrado predominantemente em solos temperados ao redor do mundo (Ma, 2018). Este organismo foi o primeiro animal a ter seu genoma totalmente sequenciado e, em 1963, foi proposto por Sydney Brenner como modelo para estudos genéticos (García-Sancho *et al.*, 2012).

Entre as diversas vantagens que *C. elegans* oferece em relação a outros modelos animais, destaca-se seu tamanho reduzido e a transparência do corpo, que permite a visualização de diferentes tipos celulares em todas as fases de desenvolvimento. Além disso, sua capacidade de auto-fertilização possibilita a produção de aproximadamente 300 ovos, contribuindo para um ciclo de vida curto e uma rápida geração de descendentes (Shen *et al.*, 2018). Essas características tornam o *C. elegans* um modelo acessível e amplamente utilizado em pesquisas científicas (Zheng e Greenway, 2012).

Também, o nematoide apresenta duas formas sexuais: hermafroditas que se auto-fertilizam e machos. Os machos surgem em uma frequência bem menor na população total (Haque *et al.*, 2020) e são ligeiramente menores que os hermafroditas. Eles possuem dois ovários, ovidutos e uma cavidade para armazenar esperma chamada espermateca durante o estágio L4, além de útero (L'Hernault *et al.*, 2009). A presença de uma cauda distintiva nos machos, que abriga um aparelho copulatório, os diferencia dos hermafroditas.

Uma hermafrodita pode gerar cerca de 300 descendentes, com 99,9% sendo hermafroditas, enquanto os machos, ao copular, contribuem com 50% da prole, embora apenas 0,1 a 0,2% deles consigam fertilizar hermafroditas (Giles e Rankin, 2009). A estrutura corporal dos hermafroditas é composta por 959 células somáticas, enquanto os machos possuem 1.031 células somáticas. O sistema nervoso de *C. elegans* é simples, composto por 302 neurônios na fase adulta, cada um com uma posição específica (Kim *et al.*, 2016).

A expectativa de vida normal desse organismo é de cerca de três semanas, dependendo da temperatura e da concentração de alimentos (Klass *et al.*, 1977). Seu ciclo de vida inclui uma fase de embriogênese (aproximadamente 12 horas), quatro estágios larvais (L1-L4, cerca de três dias) e a fase adulta (15 a 20 dias) (Kimble e Crittenden, 2005; Ward e Carrel, 1979). Importante ressaltar que o *C. elegans* não possui sistema respiratório ou circulatório. Estudos mostram que 60 a 80% dos genes humanos possuem ortólogos no genoma de *C. elegans*, e 38% dos genes relacionados a doenças humanas também apresentam ortólogos neste modelo (Culetto e Sattelle, 2000). Além disso, muitos caminhos metabólicos e de sinalização celular essenciais são conservados entre *C. elegans* e mamíferos, incluindo as vias de sinalização da insulina, o que torna este organismo útil para estudos *in vivo* de doenças diversas (Shaye e Greenwald, 2011).

A exemplo da cepa BS3164, há a preservação da via de sinalização NOTCH, semelhante à humana. Esta via é um mecanismo crucial de comunicação entre células, responsável por regular o desenvolvimento e a diferenciação celular, tanto em *C. elegans* quanto em humanos. No nematoide, essa via envolve dois receptores principais, glp-1 e lin-12, que permitem às células vizinhas interagirem para determinar seu destino, como se devem se especializar ou permanecer em estado indiferenciado (Greenwald *et al.*, 2005; Priess *et al.*, 1987)..

O receptor glp-1 é fundamental para a manutenção das células-tronco na linha germinativa e no desenvolvimento embrionário, enquanto lin-12 desempenha um papel importante na diferenciação de células durante o desenvolvimento de tecidos e do sistema nervoso. Após a ativação desses receptores, o fator de transcrição lag-1 é acionado, regulando

a expressão de genes que controlam o destino celular (Greenwald *et al.*, 2005; Priess *et al.*, 1987).

Em humanos, a via Notch opera de maneira semelhante, regulando a diferenciação e o desenvolvimento de diversos tecidos, como pele, vasos sanguíneos, sistema nervoso e células-tronco. Os receptores Notch humanos (NOTCH1, NOTCH2, entre outros) são essenciais para manter o equilíbrio entre a proliferação e a diferenciação das células. Alterações nessa via podem estar associadas a várias doenças, incluindo diferentes tipos de câncer, como leucemia e tumores sólidos (Koapan *et al.*, 2009).

A conservação da via Notch entre *C. elegans* e humanos permite que estudos realizados com esse nematoide sirvam de base para entender como as células se comunicam e decidem seus destinos em organismos mais complexos. Isso também facilita a investigação de doenças humanas e potenciais tratamentos, já que os processos biológicos fundamentais são semelhantes em ambos os sistemas (Siebel *et al.*, 2017).

A via de apoptose na cepa MD701 de *C. elegans* serve como um modelo de investigação da morte celular programada de maneira controlada. No verme, a proteína EGL-1 inicia a apoptose ao se ligar e inibir a CED-9, que desempenha um papel protetor ao evitar a morte celular (sendo equivalente à proteína Bcl-2 em humanos). Com a inativação de CED-9, as proteínas CED-4 são liberadas e ativam a caspase CED-3, responsável por executar a destruição controlada da célula. Nos humanos, o mecanismo é semelhante, com as proteínas da família Bcl-2 também regulando a ativação das caspases, que desencadeiam a apoptose, evidenciando a conservação desse processo entre espécies (Ellis e Horvitz, 1986; Takeda *et al.*, 2008; Riddle *et al.*, 1997)

A cepa MD701 sofreu modificações genéticas para expressar marcadores fluorescentes nas células que estão em processo de apoptose, o que permite acompanhar o fenômeno e analisar os fatores que influenciam esse processo.

2.6.1 Uso do nematóide *Caenorhabditis elegans* como modelo *in vivo*

A crescente demanda por estudos de novas moléculas para o tratamento de doenças emergentes e já existentes, assim como a investigação de seus efeitos adversos, tem se tornado cada vez mais evidente. Nos últimos anos, o *C. elegans* tem se destacado como um modelo eficaz, apresentando diversas vantagens, como sua facilidade de cultivo, ciclo de vida curto, tamanho reduzido, corpo transparente e genoma bem mapeado. Ensaio biológicos com o animal permitem a análise e avaliação de múltiplos efeitos tóxicos sobre esse

organismo-modelo, enquanto tecnologias emergentes proporcionam uma compreensão mais detalhada das alterações moleculares que resultam nos fenótipos observados (Long *et al.*, 2023).

Além de serem não patogênicos, quando adulto possui aproximadamente 1 mm de comprimento, sendo visíveis a olho nu. Os vermes podem ser manipulados em culturas líquidas ou sólidas e apesar de sua simplicidade, eles possuem tecidos especializados que funcionam de maneira semelhante aos órgãos dos vertebrados. Diversas vias envolvidas no desenvolvimento do organismo e na função neuronal são bem conservadas entre vermes e humanos (Hunt *et al.*, 2020).

Múltiplos estudos demonstraram uma correlação entre o ranking de toxicidade em *C. elegans* e mamíferos, indicando que esse modelo tem potencial para ser utilizado em avaliações preditivas de segurança de substâncias diversas. Em contraste com os sistemas celulares atuais, o animal possui um sistema digestivo metabolicamente ativo, trato reprodutivo bilateral, sinalização endócrina e um sistema neuronal completamente mapeado, que compartilha várias características com os mamíferos, podendo ser usado para avaliar efeitos tóxicos complexos em diferentes tecidos interconectados (Hunt *et al.*, 2020).

Na área da nanotecnologia, estudos de toxicidade demonstraram que a exposição a certas concentrações de nanopartículas (NPs) causa diversos efeitos adversos em diferentes sistemas biológicos, ativando múltiplas vias de toxicidade. Nesse contexto, *C. elegans* tornou-se um modelo biológico amplamente empregado para avaliar a toxicidade de nanomateriais e investigar seus possíveis mecanismos de ação (Gonzalez-Moragas *et al.*, 2017).

2.6.2 Overview de publicações relacionadas às análises *in vivo* de nanopartículas revestidas utilizando *c. elegans*

Uma revisão abrangente da literatura foi realizada em três bases de dados, utilizando os seguintes termos de busca: “Coated”, “Nanoparticles” e “*C. elegans*”. Essa busca resultou em um total de 108 artigos no ScienceDirect, 50 no Web of Science (WOS) e 50 no Medline/Pubmed. Os critérios de inclusão envolveram artigos de pesquisa que desenvolveram nanopartículas com revestimentos, demonstrando suas potenciais aplicações no campo da saúde, realizando testes *in vivo* com essas nanopartículas em *C. elegans*. Foram incluídos artigos experimentais com livre acesso, sem restrição de país, publicados até 1º de Setembro de 2024. Foram excluídos da revisão artigos categorizados como revisões, capítulos de livros,

enciclopédias, resumos de conferências, mini-revisões, comunicações curtas e aqueles que se desviaram do tema central do estudo.

Após a remoção de entradas duplicadas e a filtragem de estudos que não atendiam aos critérios de inclusão, um total de 49 artigos foram selecionados para fornecer uma revisão detalhada da literatura, conforme a tabela 2. Foram excluídos da revisão artigos categorizados como revisões, capítulos de livros, enciclopédias, resumos de conferências, mini-revisões, comunicações curtas e aqueles que se desviaram do tema central do estudo.

Tabela 2: Overview de publicações relacionadas às análises *in vivo* de nanopartículas revestidas utilizando *C. elegans* como modelo *in vivo*.

Autor	Nanopartícula/ Nanosistema	Revestimento	Testes realizados
Agararraya <i>et al.</i> , 2023	PCL	Variação de combinações de Polissorbato 80, PEG, EUD e CS	Letalidade Tamanho da ninhada Comprimento corporal Expressão da SOD-3::GFP
Agotegaray <i>et al.</i> , 2020	SPIONs	Beta-ciclodextrina	Biodistribuição Motilidade Tamanho da ninhada
Ahn <i>et al.</i> , 2014	Prata	PVP	Sobrevivência Estresse oxidativo Toxicidade mitocondrial Dano ao DNA
Amigoni <i>et al.</i> , 2021	SPIONs	Ácido polimaleico conjugado com dodecilamina	Sobrevivência Ingesta Bioacumulação Longevidade Produção de EROs Batimento faríngeo Tamanho da ninhada
Arndt <i>et al.</i> , 2017	Óxido de cério	Dietilaminoetil dextrano catiônico; Carboximetil dextrana aniônica; Dextrana não iônica	Mortalidade Tamanho de ninhada Expressão de proteínas Oxidação de proteínas
Ayech <i>et al.</i> , 2020	Prata	Acticoat Flex 3	Desenvolvimento Reprodução Fertilidade Produção de EROs
Bone <i>et al.</i> , 2015	Prata	Goma arábica; PVP	Comprimento corporal

Charan <i>et al.</i> , 2010	Prata	Nile red	Bioimagem
Chen <i>et al.</i> , 2015	QDs de dissulfeto de cobre e índio; QDs de dissulfeto de cobre e índio com sulfeto de zinco	O-carboximetil quitosana	Imagem confocal; Análise XANES
Collin <i>et al.</i> , 2014	Óxido de cério (IV)	Dextrana	Sobrevivência
Galdiero <i>et al.</i> , 2020.	Quantum dots	Peptídeo gH625	Produção de EROs Longevidade Tamanho da ninhada Atividade da CAT/SOD
Gonzalez-Moragas <i>et al.</i> , 2015	SPIONs	Albumina sérica bovina	Bioacumulação Sobrevivência Tamanho da ninhada
Gonzalez-Moragas <i>et al.</i> , 2017	SPIONs	Citrato; Albumina sérica bovina	qPCR Oxidação lipídica
Hanna <i>et al.</i> , 2018	Ouro	PVP; PEG; Citrato; Dendrímeros; bPEI	Comprimento corporal Sobrevivência
Hu <i>et al.</i> , 2018	Ouro	Ácido 11-mercaptoundecanóico	Bioimagem Locomoção Comprimento corporal Tamanho da ninhada Sobrevivência MTT Microarray de DNA
Hunt <i>et al.</i> , 2014	Prata	Citrato; PEG; PVP; BPEI	Desenvolvimento
Inchaurreaga <i>et al.</i> , 2020	Zein	Conjugado de poli(anidrido)-tiamina	Ingesta Teor de gordura
Kattel <i>et al.</i> , 2012	Óxido de európio	Ácido d-glicurônico	Marcação fluorescente
Kim <i>et al.</i> , 2012	Prata	Citrato	Sobrevivência Reprotoxicidade
Konnova <i>et al.</i> , 2015	Prata	Polieletrólito catiônico	Bioimagem
Kuo <i>et al.</i> , 2013	Diamante	Complexo Lipoproteico de Yolk	Microscopia de imagem de tempo de vida de fluorescência
Lay <i>et al.</i> , 2019	α -NaYF ₄ :Yb,Er@Na	Ácido oleico	Tamanho da ninhada

LuF4			Postura de ovos
Luo <i>et al.</i> , 2016	Prata	PVP	Tamanho da ninhada
			Tamanho da população
			Longevidade
			Morte de células germinativas
			Bioacumulação
Luo <i>et al.</i> , 2022	Prata	PVP	Bioacumulação
Maheswari <i>et al.</i> , 2023	Lipossomas carregadas com berberina	Ácido hialurônico e quitosana	Bioimagem
Martínez-López <i>et al.</i> , 2021 (a)	Zeína carregada com insulina	covalent binding of PEG 2000 to the anhydride groups of GantrezAN	Ingesta
			Quantificação dos níveis de glicose
			Quantificação dos níveis de SOD
			Teor de gordura
			Produção de EROs
Martínez-Lopez <i>et al.</i> , 2021 (b)	Zeína carregada com insulina	Conjugado de Gantrez® AN-PEG	Longevidade
			PCR
			Teor de gordura
			Batimento faríngeo
			Tamanho do corpo
Maurer <i>et al.</i> , 2016	Prata	Citrato	Desenvolvimento
Meyer <i>et al.</i> , 2010	Prata	PVP; Citrato	Ingesta
			Sobrevivência
			Comprimento corporal
			Desenvolvimento
			Ingesta
Moraes <i>et al.</i> , 2016	PCL carregada com clozapina	Polissorbato	Sobrevivência
Pangua <i>et al.</i> , 2024	Albumina carregada com Bevacizumab	PEG com DS ou DOCU	Postura de ovos
			Longevidade
			Integridade epitelial intestinal
			Sobrevivência
			Sobrevivência
Ramasamy <i>et al.</i> , 2017	Ouro	Silica	Sobrevivência
Reboredo <i>et al.</i> , 2021	Zeína carregada com insulina	PEG	Teor de gordura
Romano <i>et al.</i> , 2022	Silica carregada com SPIONs	PDA	Locomoção
			Estresse oxidativo
			Fertilidade
			Viabilidade embrionária
			Viabilidade embrionária
Schultz <i>et al.</i> , 2018.	Prata	PVP	Tamanho da ninhada
Tsyusko <i>et al.</i> , 2012	Ouro	Citrato	Expressão gênica (qRT-PCR)

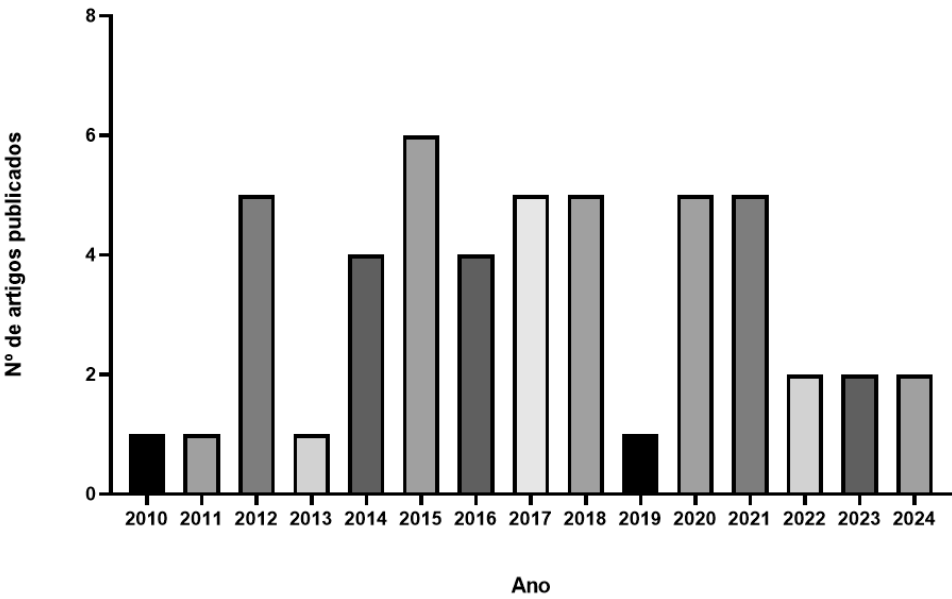
Velasques <i>et al.</i> , 2018	Policaprolactona carregada com curcumina e quinina	Polissorbato	Dose letal Sobrevivência Tamanho de ninhada Longevidade Ingesta Bioacumulação
Wang <i>et al.</i> , 2017	Materiais magnéticos diversos	Fosfatidilcolina	Degeneração oxidativa lipídica Cromatografia gasosa PCR
Wu <i>et al.</i> , 2012	Óxido de ferro (III)	DMSA	Letalidade Desenvolvimento Tamanho da ninhada Locomoção Batimento faríngeo Ciclo de Defecação Autofluorescência intestinal Produção de EROs
Wu <i>et al.</i> , 2020	Quantum dots de Telureto de cádmio	Sulfeto de Zinco	Longevidade Locomoção ROS Ingesta
Xu <i>et al.</i> , 2012	Gadolínio-óxido de európio	Ácido lactobiônico	Imagem por ressonância magnética fluorescente
Yang <i>et al.</i> , 2014	Prata	Citrato	Sobrevivência
Yang <i>et al.</i> , 2017	Prata	Citrato	Curvatura corporal Batimento da cabeça
Yu <i>et al.</i> , 2016	SPIONs	Albumina	Internalização das nanopartículas
Zhang <i>et al.</i> , 2021	Prata	PVP	Sobrevivência Longevidade Headthrash Curvatura corporal Batimento faríngeo Ciclo de defecação Quimiotaxia Termotaxia Análise de neurônios
Zhao <i>et al.</i> , 2015	Quantum dots de Telureto de cádmio	Sulfeto de zinco	Ensaio de comportamento de forrageamento Tamanho de ninhada Ciclo de defecação PCR
Zheng <i>et al.</i> , 2015	Sulfeto de bismuto	Silica	Estresse oxidativo Sobrevivência Comprimento corporal
Zou <i>et al.</i> , 2018.	Ouro	Grafeno	Bioimagem

Zou <i>et al.</i> , 2024	Óxido de Ferro	PG	Bioacumulação Desenvolvimento Tamanho da ninhada Longevidade
--------------------------	----------------	----	---

Fonte: A autora (2024)

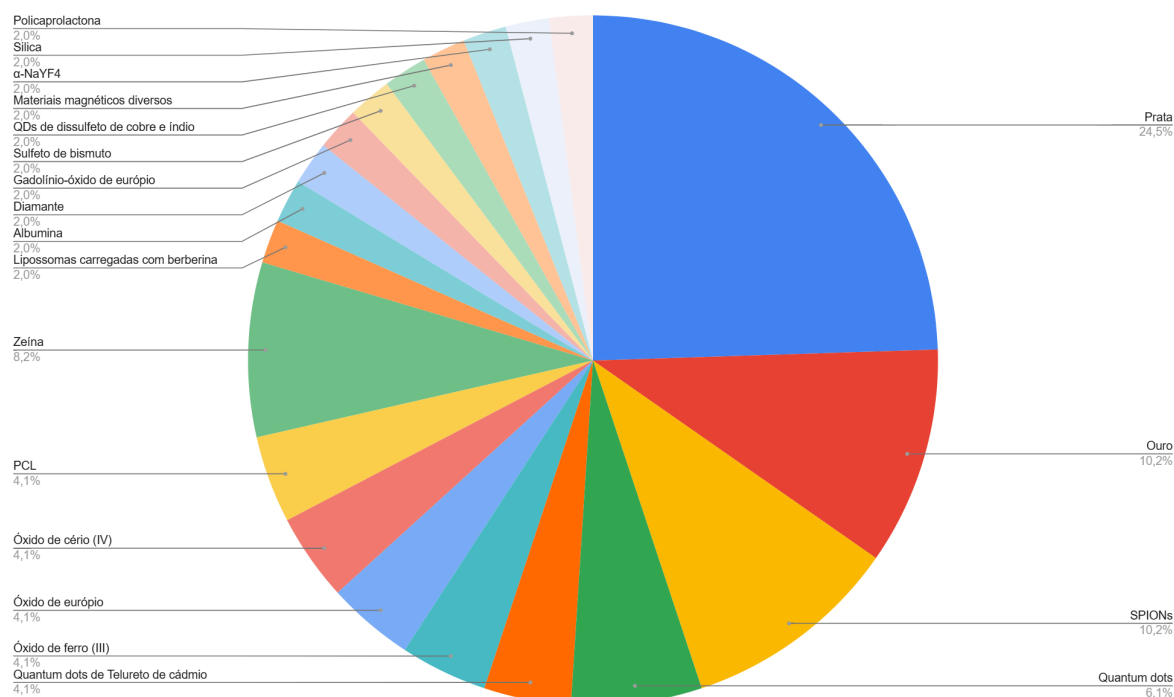
Conforme ilustrado na na figura 3, houve um aumento significativo nos últimos 10 anos de artigos publicados sobre o tema. Algumas razões para o aumento nas publicações, principalmente a partir do ano de 2014, incluem os avanços notáveis em tecnologia e metodologia, bem como o crescente interesse em materiais sustentáveis e utilização de modelos alternativos e mais baratos para testes *in vivo*.

Figura 3: Gráfico com o número de artigos publicados por ano sobre nanopartículas revestidas e ensaios em *C. elegans*, após aplicação dos critérios de inclusão.



Ao analisar as nanopartículas mais relatadas, observa-se a predominância das nanopartículas de prata, seguidas pelas de ouro, pelas nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs) e pelos quantum dots, como pode ser observado na figura 4. Essa preferência pelas nanopartículas metálicas pode ser atribuída ao amplo conhecimento disponível sobre seus métodos de síntese, que geralmente são rápidos, de baixo custo e relativamente simples. Além disso, a facilidade de acesso aos materiais necessários para sua produção reforça a sua popularidade no campo científico. Não foram identificados estudos com nanopartículas poliméricas de PIBCA com *C. elegans*.

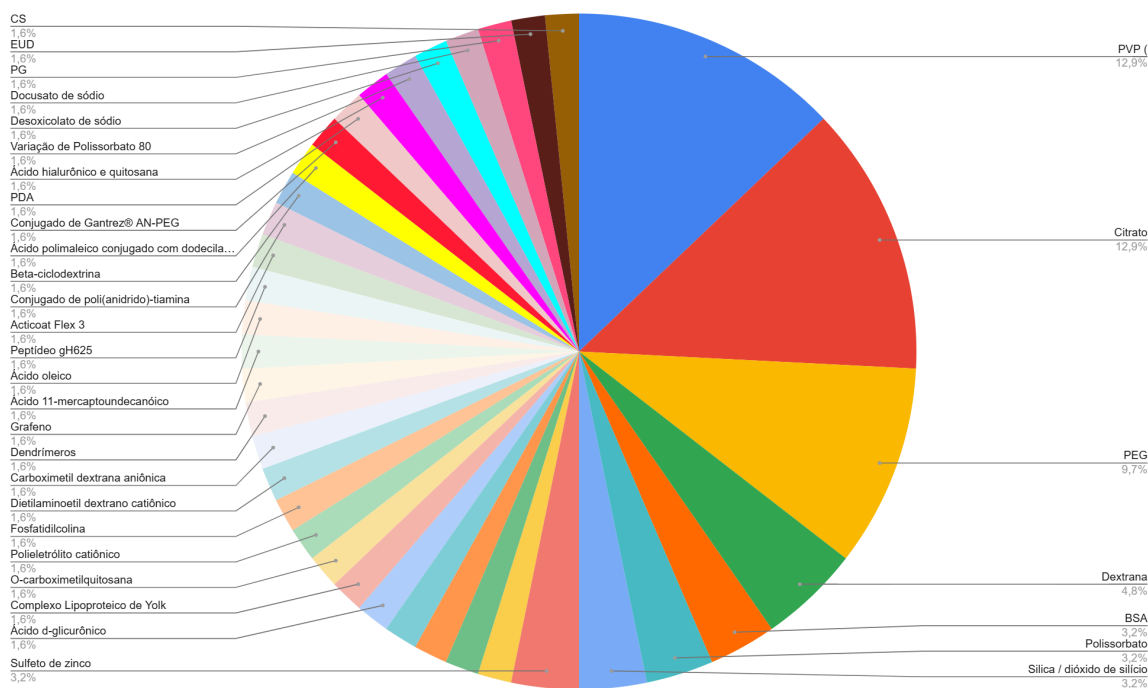
Figura 4: Gráfico com os tipos de nanopartículas identificados na revisão.



Fonte: A autora (2024)

Ao analisar os materiais de revestimento utilizados, observa-se que o PVP, seguido do citrato, PEG e dextrana, são os mais comuns, como ilustrado na figura 5. Esses materiais compartilham características semelhantes, como solubilidade em água e biocompatibilidade, o que os torna amplamente utilizados na estabilização de nanopartículas. Além disso, não foram encontrados relatos sobre o uso de fucana como revestimento em nanopartículas, especialmente em testes *in vivo* utilizando *C. elegans*.

Figura 5: Gráfico com os tipos de revestimentos utilizados identificados na revisão.



Fonte: A autora (2024)

Sendo assim, é evidente o crescimento e a diversidade de testes realizados com uma ampla gama de nanopartículas e revestimentos, utilizando *C. elegans* como modelo animal para diversas análises. Esse modelo tem se mostrado um excelente indicador para avaliar as possíveis atividades biológicas de nanomateriais, fornecendo informações valiosas sobre seus efeitos e potenciais aplicações.

3. Objetivos

3.1 Geral

Sintetizar nanopartículas poliméricas de poli-isobutilcianoacrilato (PIBCA) revestidas com fucana contendo Oncocalixona A encapsulada e avaliar toxicidade utilizando *Caenorhabditis elegans* como modelo *in vivo*.

3.2 Específicos

- Caracterizar as nanopartículas, avaliando seu tamanho, carga de superfície e índice de polidispersão;
- Realizar estudos de docking molecular da Oncocalixona A e da fucana, visando identificar seus receptores em vias cancerígenas;
- Avaliar a toxicidade das nanopartículas e da OncoA livre utilizando a cepa selvagem N2;
- Verificar a ingestão das nanopartículas por meio de microscopia de fluorescência;
- Avaliar a capacidade de reversão fenotípica em resposta à cepa BS 3164, relacionada à via de sinalização NOTCH;
- Examinar a capacidade antiapoptótica das nanopartículas na cepa MD701.

4. Materiais e métodos

4.1 Reagentes

A Oncocalixona A foi isolada do cerne da *Cordia oncocalyx*, conforme relatado anteriormente por Pessoa (1995) onde a sua coleta e purificação foi realizada no laboratório da Profa. Dra. Otilia Pessoa da Universidade Federal do Ceará. A fucana proveniente da alga marinha *Fucus vesiculosus* foi obtida da Sigma-Aldrich EUA (F8190-500mg). O cianoacrilato de isobutila foi adquirido da Henkel Biomedical (Dublin, Irlanda), e o solvente HCl foi comprado da Sigma-Aldrich (EUA).

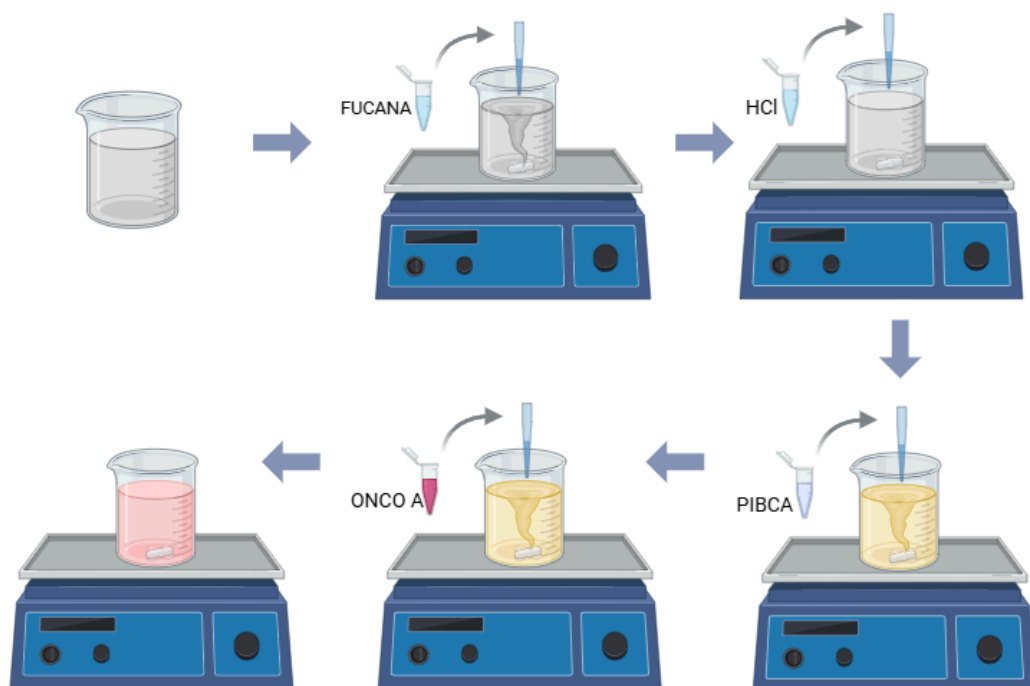
4.2 Preparo das nanopartículas

O esquema de preparo está devidamente ilustrado na figura 8. Brevemente, as nanopartículas utilizadas foram obtidas por meio do método de polimerização em emulsão aniônica (AEP), previamente descrito por Cavalcanti *et al.*, 2021. Resumidamente, para preparar as nanopartículas revestidas com fucana (NpFuc), uma solução de 50mg de fucana diluída em 5 mL de água ultrapura (Milli Q®) teve seu pH corrigido para 2,5 com uma solução de HCl 1 molar.

Sob agitação vigorosa, 50 microlitros de IBCA foram adicionados à solução e mantidos sob agitação vigorosa por três horas. Para preparar as nanopartículas contendo Oncocalixona A e revestidas com fucana (NpOnco), cinco minutos após a adição de IBCA, 500 µL de uma solução de Oncocalixona A em acetonitrila foi incorporada, na proporção de 1:1 v/v, em uma concentração de 5 mg/mL. A agitação foi mantida por 3 horas à temperatura ambiente, sem vedação, para evaporar a acetonitrila. A Oncocalixona em sua forma livre (Onco) foi obtida pela adição do composto em água ultrapura e sonicação até a diluição completa, utilizando o banho ultrassônico 7Lab, modelo SSBu 3,8L, por 20 minutos.

Após o processo obteve-se então uma solução na concentração de 3,3112 mmol. L⁻¹. Essa solução foi armazenada em eppendorfs, na geladeira, cobertos com papel alumínio até o momento da diluição. Em seguida, para a exposição dos grupos nas placas, as partículas foram diluídas com água ultrapura para obtenção das concentrações de 50 e 6,5 µM.

Figura 8: Método de síntese das nanopartículas pelo método AEP.



Fonte: A autora (2024).

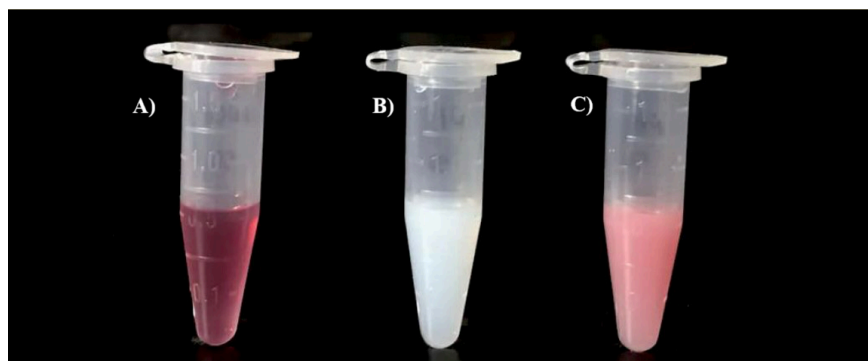
4.3 Caracterização das nanopartículas

4.3.1. Avaliação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta

O diâmetro médio das nanopartículas, bem como seu índice de polidispersidade foram avaliados a 25 °C com ângulo fixo de 90° utilizando a técnica de espalhamento de luz no equipamento Zetasizer ZS90 (Malvern Instrument, EUA). As formulações foram diluídas (1:20) em água ultrapura (Milli Q®, Millipore, EUA). O índice de polidispersão (PDI) foi avaliado para verificar a homogeneidade das nanopartículas dispersas, onde valores próximos de zero indicam uma dispersão homogênea. O potencial zeta foi medido utilizando o Zetasizer ZS90 (Malvern Instrument, EUA) e para esta análise as nanopartículas foram diluídas (1:20) com NaCl 1 mM.

Figura 9: Imagens das diluições de 50 µM dos grupos A) Onco; B) NpFuc e C)

NpOnco



Fonte: A autora (2024).

4.4 Cultivo e manutenção das cepas

Os nematoides selvagens (N2, variante Bristol) e as cepas BS3164 (*unc-31(e189) glp-1(ar202)III*) e MD701(*bcIs39[Plim-7::ced-1::GFP; lin-15(+)]V*) foram adquiridas no Centro de Genética de Caenorhabditis (CGC - Universidade de Minnesota). Os vermes foram mantidos em meio de crescimento para nematóides (NGM: 3 g.L⁻¹ de NaCl; 17 g.L⁻¹ de ágar; 2,5 g.L⁻¹ de peptona; 1 mM de CaCl₂; 5 mg.L⁻¹ de colesterol; 1 mM de MgSO₄; 25 mM de KPO₄²⁻), em uma incubadora de demanda bioquímica de oxigênio na temperatura adequada e alimentados com *Escherichia coli* OP50.

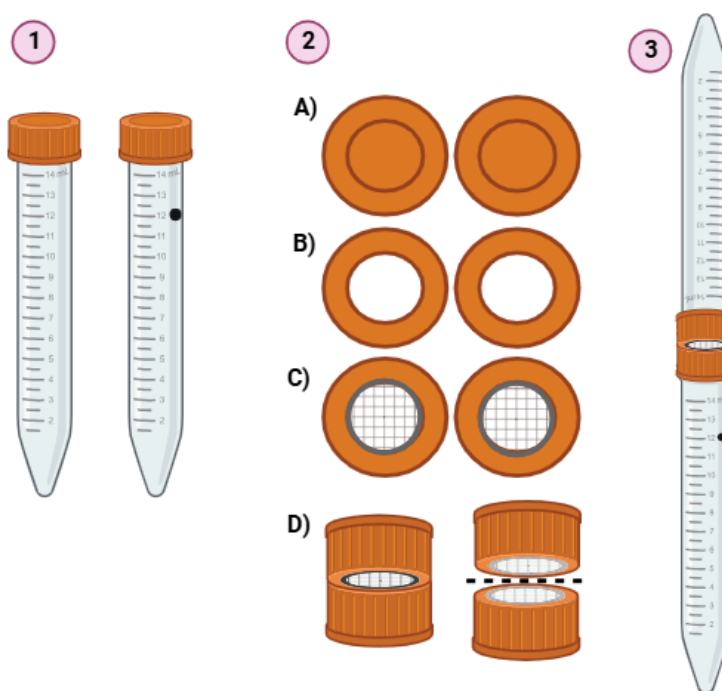
4.5 Método de sincronização por filtração

O método de sincronização por filtração representa uma abordagem rápida, simples e prática para obter larvas L1 de *C. elegans*. Os métodos convencionais de sincronização com hipoclorito em meio alcalino, apesar da lavagem rigorosa, podem reter resíduos de hipoclorito de sódio, já que o parâmetro de avaliação depende da percepção olfativa, que é subjetiva e varia entre indivíduos. Além disso, esse tipo de sincronização pode resultar em eclosão tardia de ovos nas placas, o que afeta as análises devido à presença de vermes em diferentes estágios larvais. Consequentemente, foi utilizado o método de sincronização por filtração, que envolve a lavagem das placas e a filtração, visando especificamente os vermes L1. Esse processo utilizou dois tubos cônicos, duas tampas perfuradas, adesivo de cianoacrilato, cola quente, malha de filtração, uma bomba de vácuo e ponteiros de pipeta.

Como demonstrado na figura 6, para preparar o aparelho de filtração, as tampas de dois tubos Falcon foram perfuradas e um pequeno orifício foi feito na lateral do tubo 1, na marca de 12 mL. Em seguida, dois pedaços da malha foram cortados no tamanho de 4x2 e

fixados na superfície externa de cada tampa. As partes externas de ambas as tampas foram então coladas com cola quente para garantir um sistema de vedação.

Figura 6: Esquema de produção dos tubos para sincronização. 1- Utilizado dois tubos de ensaio para o procedimento, sendo um dos tubos furado no volume 12; 2- Retirar as duas tampas dos tubos (A) e retirar a parte interna (B) para colar a malha (C) e posterior vedação com cola quente (D); 3- Acoplar os tubos nas tampas.



Fonte: A autora (2024).

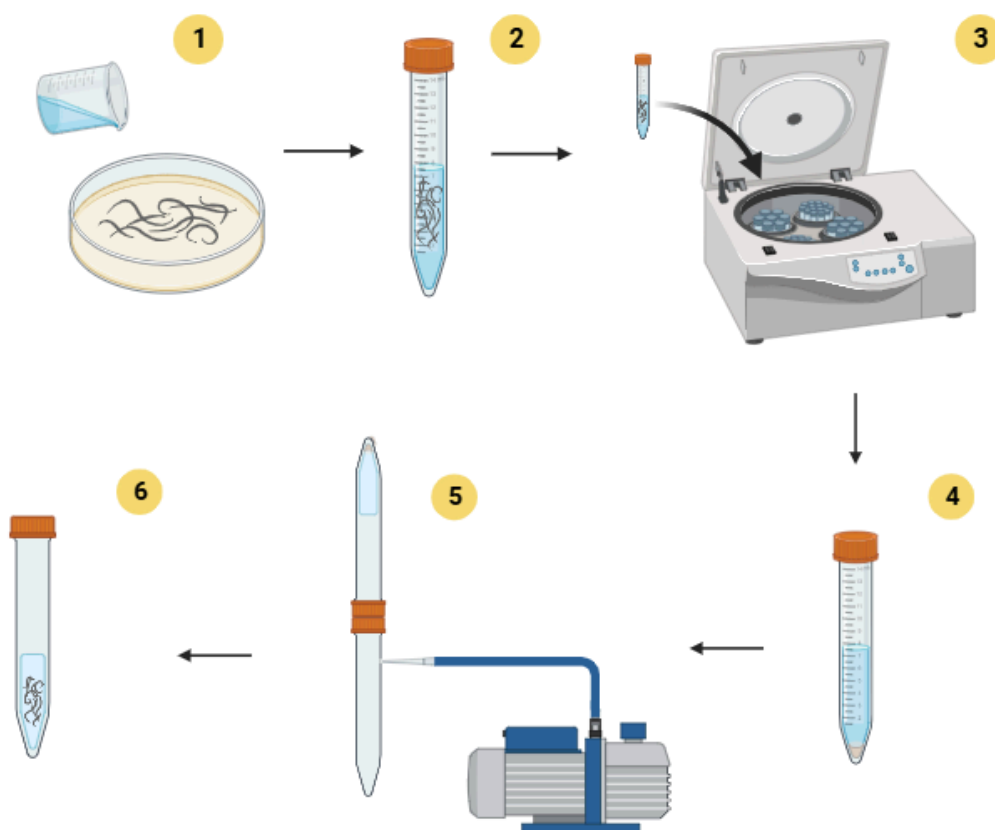
Conforme ilustrado na figura 7, o primeiro passo envolveu a lavagem de placas com grande concentração de vermes L1 com água destilada, transferindo o líquido para o tubo Falcon sem o orifício lateral (tubo 2). Em seguida, foi realizada a centrifugação por 3 minutos a 3500 RPM (ou 1000 g), e o sobrenadante foi aspirado até 4 mL, com cuidado para não perturbar o sedimento. O tubo foi preenchido novamente com água destilada e centrifugado por mais 3 minutos na mesma velocidade, por mais duas vezes, para remover excesso de ágar. Na última lavagem, foi removido o sobrenadante até 5 mL e evitando perturbar o sedimento.

O passo seguinte envolveu a remoção da tampa do tubo 2, a fixação do aparato montado com as tampas perfuradas e a malha, e a colocação no tubo contendo o líquido. Posteriormente, o tubo 1 foi fixado à parte superior, e, com cuidado para não perturbar o sedimento, o líquido do tubo 2 foi suavemente vertido. Em seguida, a ponta da bomba de

vácuo foi conectada, e a sucção foi aplicada gradualmente, removendo e recolocando a ponta intermitentemente para evitar pressão excessiva e a passagem de vermes de outros estágios larvais.

Após a filtração, os vermes foram transferidos para outro tubo Falcon e centrifugados por mais 3 minutos na velocidade mencionada, utilizando água destilada autoclavada. O sobrenadante foi removido até 2 mL, e a contagem dos vermes foi realizada utilizando 3 gotas de 2 μ L de líquido para obter a média do número de vermes obtidos.

Figura 7: Método de sincronização por filtração. 1) Selecione uma placa com alta concentração de vermes L1 e lave-a com água destilada; 2) Transfira o material de lavagem para um tubo de ensaio; 3) Centrifugar o tubo por 3 minutos; 4) Descarte o sobrenadante e realize mais duas etapas de lavagem, repetindo o processo; 5) Sem perturbar o sedimento, acople uma tampa previamente preparada ao tubo contendo os vermes e a outro tubo furado, vertendo o conteúdo cuidadosamente; 6) Conecte uma ponteira a uma bomba a vácuo e aspire lentamente o material a ser filtrado.

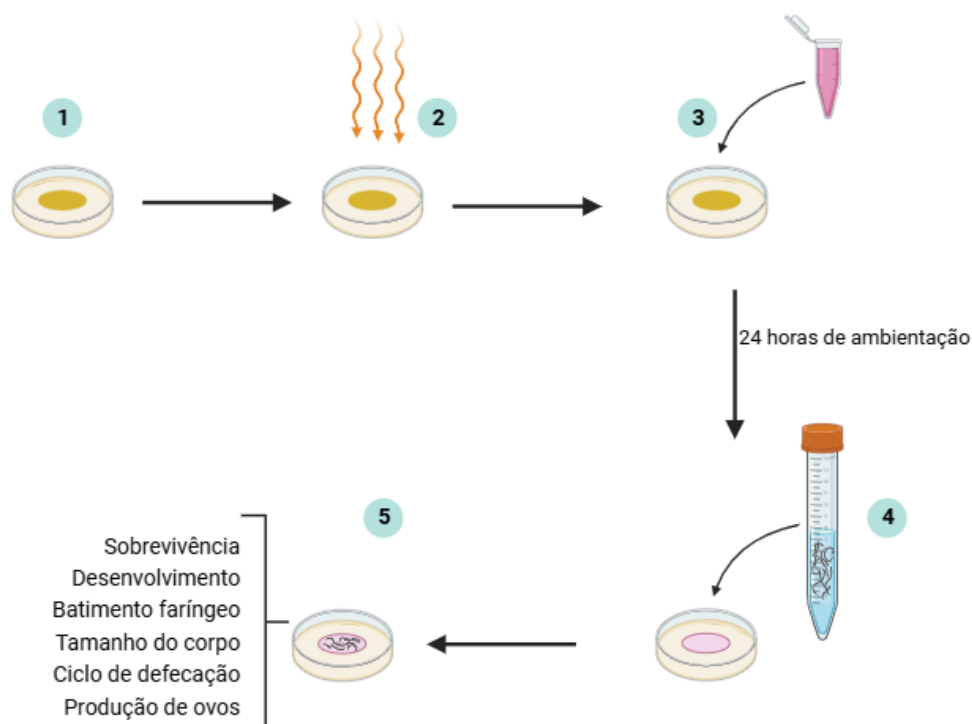


Fonte: A autora (2024).

4.6 Exposição dos vermes às nanopartículas

Um esquema do método de exposição é mostrado na figura 10. Resumidamente, utilizando placas de 35 mm contendo 3 mL de meio NGM, 150 uL de bactérias OP50 foram adicionados centralmente e deixados na estufa a 37 °C overnight para promover um crescimento bacteriano mais significativo. Após esse período, as bactérias foram inativadas por exposição à luz UV por 15 minutos, com o objetivo de eliminar qualquer interação entre a Oncocalixona A e a OP50, evitando possíveis alterações no comportamento do verme. Após a síntese, as nanopartículas, inicialmente a uma concentração de $3,3112 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, foram imediatamente diluídas em água Milli-Q para obter concentrações finais de 6,25 e 50 μM na placa. Em seguida, 150 μL da solução de cada concentração foi pipetada em cada placa. Após a secagem as placas foram mantidas na geladeira por 24 horas para permitir a adaptação do composto ao meio. Após o tempo estabelecido e verificado que não houveram quaisquer alterações na cor, odor e aspecto das placas, foram adicionados 20-30 vermes no estágio L1 e, no caso da cepa N2 e MD701, as placas foram mantidas na temperatura de manutenção de 20 °C, e a 15°C com a cepa BS3164.

Figura 10: Método de exposição dos vermes às nanopartículas. 1) Preparar uma placa de 35 mm com a bactéria OP50; 2) Inativar a bactéria usando luz UV; 3) Adicionar 150 μL da diluição na placa, ajustando a concentração conforme o grupo experimental desejado, e deixar incubado por 24 horas; 4) Expor os vermes no estágio L1 ao tratamento; 5) Realizar os ensaios após a exposição.



Fonte: A autora (2024).

4.7 Ensaios toxicológicos

Os ensaios de toxicidade foram realizados exclusivamente com a cepa N2 para analisar eventuais efeitos desencadeados pelas nanopartículas no organismo *C. elegans*. Para tanto, foram realizados estudos de sobrevivência, desenvolvimento e comportamento. Cada experimento foi realizado em triplicata, com três placas por grupo, e repetido duas vezes, garantindo duplicata experimental em dias diferentes, à 22°C.

4.7.1 Sobrevivência e desenvolvimento

Após a sincronização, na fase larval L1, elas foram colocadas na placa para exposição às partículas, para avaliar a sobrevivência após a exposição às nanopartículas e solução de OncoA, vermes selvagens da cepa N2 foram colocados em placas de 35 mm com NGM, inoculadas com *E. coli* OP50 inativada por UV. Diferentes concentrações dos grupos foram adicionadas, e as placas incubadas por 24 horas. O grupo controle recebeu água Milli-Q, sendo observando a presença de vermes mortos intervalo de tempos 0, 24, 44 e 72 horas, verificando a sobrevivência dos vermes através da presença de movimento ou batimento faríngeo (Amrit *et al.*, 2014) Posteriormente, o progresso dos estágios larvais foi registrado

diariamente até o período de 72 horas após a exposição às nanopartículas (Gubert *et al.*, 2013).

4.7.2 Ciclo de defecação

Momentos antes de defecar, o verme promove uma contração do seu intestino, correspondendo a um ciclo completo. A contração da cauda foi utilizada como referência para definir o término de um ciclo e o início de outro. Com base nisso, foram medidos os intervalos entre essas contrações na região posterior do verme. Foram utilizados vermes em L4, com aproximadamente 44h de exposição. Utilizando um microscópio binocular com uma objetiva de 40x (Nikon SMZ800), o tempo de três ciclos de defecação foi registrado durante os intervalos entre as contrações intestinais, cronometrado manualmente. Cada intervalo representou um ciclo de defecação, e a média de três ciclos foi calculada como resultado. Contando três ciclos por verme e observando oito vermes por grupo, obteve-se uma média, em segundos, do tempo necessário para um ciclo completo de defecação (Gubert *et al.*, 2013).

4.7.3 Batimento faríngeo

Quando os vermes atingiram o estágio larval L4, com aproximadamente 44 h para cepa N2 e 48 h para a cepa BS3164, o teste foi realizado contando os batimentos da faringe do verme durante 10 segundos três vezes, utilizando observação visual com um microscópio óptico binocular (Nikon SMZ800; 40x). Os vermes nos estágios de L1 a L4 foram mantidos na temperatura de manutenção e expostos aos grupos nas concentrações de 6,25 e 50 μM . A atividade faríngea foi registrada manualmente, contando uma média de batimentos por minuto por verme ao final, utilizando oito vermes por grupo (Calahorro *et al.*, 2021).

Com a cepa BS3164, os vermes foram mantidos na temperatura de manutenção de 15°C até 44 h e depois, feito a troca para 25°C. As análises foram feitas com vermes L4 adultos com 48 h de exposição.

4.7.4 Produção de ovos

Após 72 horas de exposição, foi realizada a análise da quantidade de ovos produzidos pelos vermes. Para isso, 5 μL da solução de bleaching (NaClO 2% + NaOH 10 mol.L^{-1} + Água destilada autoclavada) foram pipetados para uma tampa da placa de Petri. O verme foi pescado da placa de exposição e inserido na gota até que sua cutícula estivesse totalmente rompida, e os ovos foram liberados no meio para posterior processamento. Contagem usando

um microscópio com ampliação de 15X. Foram analisados dez vermes por grupo de exposição.

4.7.5 Comprimento de corpo

Uma camada de 2% de agarose foi preparada em lâminas de vidro, onde foram adicionados 10 vermes no estágio larval L4, com 48 horas de exposição. Em seguida, 10 µL de azida de sódio a 1 M foi aplicado para promover a paralisia dos animais, e uma lamínula foi colocada sobre a lâmina. As fotos foram tiradas com o microscópio Zeiss Axio (Imager.M2m, objetiva de 20×, N.A.=0,80), e as análises foram realizadas utilizando o programa ImageJ.

4.8 Análise da ingestão das nanopartículas

Como relatado por Cavalcanti (2022), a *Oncocalixona A* possui fluorescência intrínseca. Os métodos adotados para a análise, foram semelhantes aos realizados pelo autor.

Brevemente, os vermes tratados do grupo NpOnco na sua maior concentração (50 µM) foram analisados. Inicialmente, preparou-se uma lâmina com agarose a 2%. Os vermes, após 72 horas de tratamento, foram lavados com M9 para soltura, transferidos para microtubos identificados e decantados por 20 minutos, com remoção do sobrenadante, repetindo-se o processo três vezes para eliminar bactérias e progênie. O volume final nos microtubos foi ajustado para cerca de 250 µL.

Para aplicação na lâmina, foram pipetados 10 µL de vermes e 10 µL de azida sódica (0,1 M), seguido do posicionamento da lamínula. Após 10 minutos de paralisção, os vermes foram analisados no microscópio de fluorescência Carl Zeiss (Axio Imager M2m) com câmera AxioCam HRc.

Os vermes foram analisados sob fluorescência verde Alexa488 (excitação de 470/40 nm e emissão de 525/50 nm).

4.9 Teste de fenótipo - cepa BS3164

Para realizar o teste de fenótipo com a cepa BS3164, foram utilizadas duas BODs, uma a 15°C (temperatura de manutenção) e outra a 25°C (temperatura de expressão do fenótipo). Foi utilizado o método descrito por Medina (2021), com algumas modificações. Brevemente, após o cultivo em placas de NGM a 15°C, os vermes foram sincronizados utilizando o método de filtração. Cerca de 30 vermes foram transferidos para uma placa de 35 mm contendo a bactéria *E. coli* OP50 inativada por luz UV e mantidos a 15°C até atingirem o

estágio larval L4, com aproximadamente 44 horas. Em seguida, foram transferidos para uma BOD a 25°C até chegarem ao estágio adulto, quando foi analisada a produção de ovos (Medina *et al.*, 2021).

4.10 Teste de apoptose - cepa MD701

A visualização da apoptose usando ferramentas fluorescentes é bastante direta em *C. elegans*. A cepa MD701 possui marcador CED-1::GFP sendo uma ferramenta para quantificar a apoptose, marcando a borda das células da linhagem germinativa em apoptose.

Desta forma, de início foi preparado a lâmina com tapete de agarose 2%. As placas de tratamento com vermes expostos por 72h foram lavados com M9 para soltura dos vermes, que foram posteriormente transferidos para microtubos, previamente identificados com os nomes de cada grupo e/ou concentrações.

Após a lavagem das placas e a transferência para os microtubos, os vermes foram deixados em repouso por aproximadamente 10 minutos para decantarem no fundo dos tubos. Em seguida, o sobrenadante foi removido, e uma nova alíquota de solução M9 foi adicionada. Esse procedimento foi repetido três vezes para garantir a remoção completa das bactérias e de vermes em outros estágios larvais. Após as lavagens, foi reduzido o volume dos microtubos para aproximadamente 250µL.

Para a inserção dos vermes na lâmina previamente preparada, foram pipetados 10µL de vermes e 10µL da solução de azida sódica (0,1 M), e a lamínula foi posicionada em seguida. Foi esperado o tempo de 10 minutos para que houvesse total paralisação dos vermes. Logo em seguida, com utilizando o microscópio de fluorescência Carl Zeiss (Axio Imager M2m), equipado com a câmera AxioCam HRc (Zeiss, Oberkochen, Alemanha), foi observado e quantificado o número de corpos apoptóticos formados na linhagem germinativa do verme, em cada gônada utilizando a fluorescência de cor verde.

De início, foi utilizado a lente de aumento de 10x para identificar o verme na lâmina. Em seguida, após focar no verme desejado, a lente foi aumentada para 40× e focada na linhagem germinativa. Para uma melhor visualização, foi fechado a fonte de luz fluorescente entre as imagens para minimizar o fotobranqueamento. Manusear o foco do microscópio para visualização de todos os corpos apoptóticos. Foi utilizado 7 vermes por grupo, com contagem de corpos apoptóticos individualmente, apenas do grupo de maior concentração (50 µM) (Zhang *et al.*, 2021)

4.10 Docking molecular

Com o objetivo de analisar o potencial de ligação e as interações da Oncocalixona A com receptores de diferentes cepas, de forma a apoiar experimentos subsequentes, foi realizada a técnica de docking molecular dos receptores GLP-1, LAG-1 E LIN-12. Esses receptores estão associados a diversas funcionalidades em *C. elegans*.

As estruturas proteicas utilizadas para o docking foram primeiramente pesquisadas no Banco de Dados de Proteínas (PDB) (<https://www.rcsb.org/>), de onde foi adquirida a estrutura de lag-1 (PDB: 3brd). A ferramenta CASTp 3.0 (<http://sts.bioe.uic.edu/castp/calculation.html>) foi empregada para selecionar os sítios de ligação das proteínas modeladas (Tian et al., 2018). A preparação dessas proteínas foi realizada através do ProteinPrepare PlayMolecule, onde o estado de protonação de todos os resíduos foi ajustado.

Utilizando o software GOLD, o docking molecular da Oncocalixona A e Fucana foi realizado para glp-1, lin-12, sel-12 e lag-1, empregando ChemPLP como função de pontuação de ligação e ASP para reavaliação dos escores (Jones et al., 1997). Caso não houvesse cristalizações disponíveis dessas proteínas, elas seriam construídas utilizando o AlphaFold 2.

4.11 Análise estatística

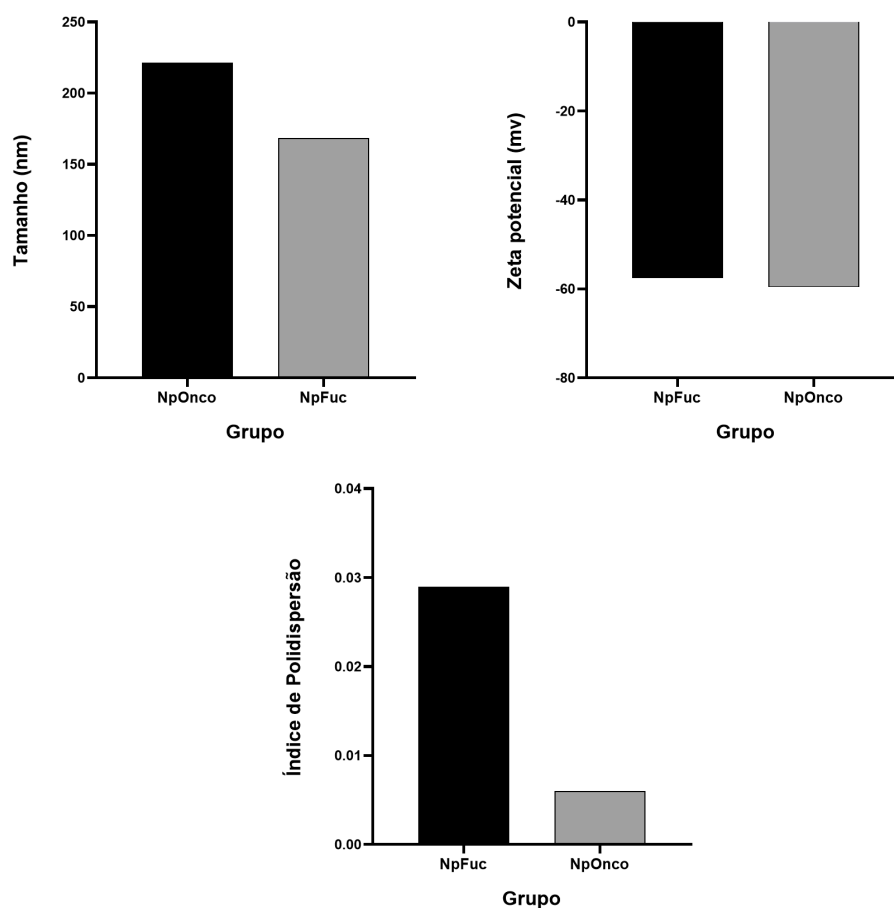
Os dados referentes aos ensaios de batimento faríngeo, ciclo de defecação, ovoprodução e tamanho corporal foram analisados quanto à normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Para variáveis paramétricas, as análises estatísticas foram conduzidas pelo teste ANOVA *one-way* e pós teste de Dunnett. Para variáveis não paramétricas, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós teste de Dunn, utilizando o software GraphPad Prism 8. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM) e a significância estatística foi atribuída a valores de p de *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 e ****p < 0,0001, baseando-se em experimentos independentes conduzidos em triplicata.

5. Resultado e discussão

5.1 Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas.

Foi constatado que as nanopartículas obtidas eram semelhantes às descritas por Cavalcanti et al. (2021). As nanopartículas do grupo NpFuc apresentaram um tamanho de $168,5 \pm 1,19$ nm, potencial zeta de $-57,6 \pm 0,2$ mV e um índice de polidispersão (PDI) de $0,029 \pm 0,01$. As nanopartículas do grupo NpOnco tinham um tamanho de $221,3 \pm 2,05$ nm, potencial zeta de $-56,6 \pm 1,02$ mV e PDI de $0,006 \pm 0,012$, conforme analisado na figura 11. Após as análises, que mostraram valores indicativos de boa estabilidade das formulações nas escalas de tamanho desejadas, os nanomateriais foram testados *in vivo* em *C. elegans*.

Figura 11 : Gráfico da análise de tamanho, potencial zeta e PDI das nanopartículas vazias (NpFuc) e contendo Onco A (NpOnco).



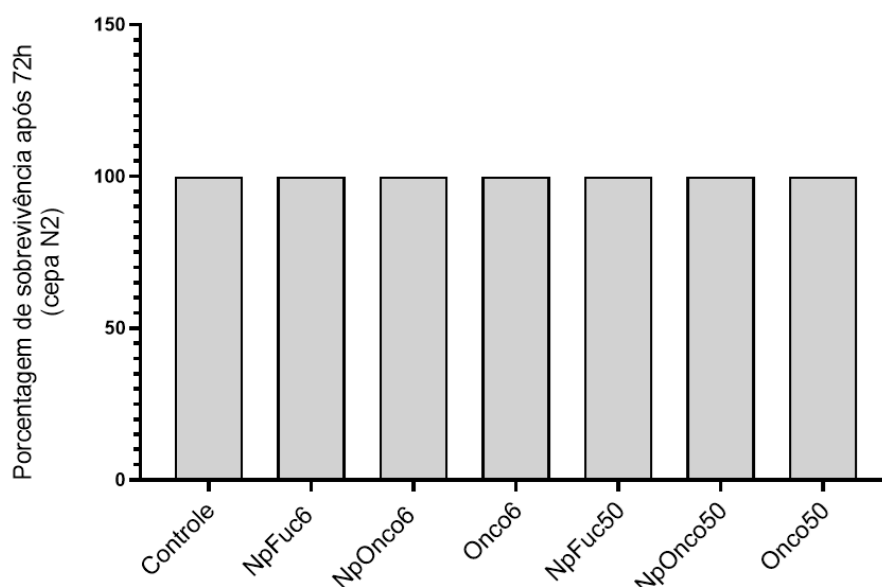
Fonte: A autora (2024).

5.2 Ensaios realizados com a cepa N2

5.2.1 Sobrevivência e desenvolvimento larval

Na cepa N2, a taxa de sobrevivência dos animais expostos foi avaliada nos períodos de 24, 48 e 72 horas. Durante esse período, foi realizada a contagem de vermes vivos e mortos em todas as concentrações testadas. Observou-se que não houve nenhum animal morto até o tempo de 72 horas, resultando em uma taxa de sobrevivência de 100% em todos os grupos analisados (figura 12). Esses resultados sugerem que as condições experimentais e as concentrações utilizadas não exerceram efeitos letais sobre os animais.

Figura 12: Gráfico do ensaio de sobrevivência em *C. elegans* após a exposição.



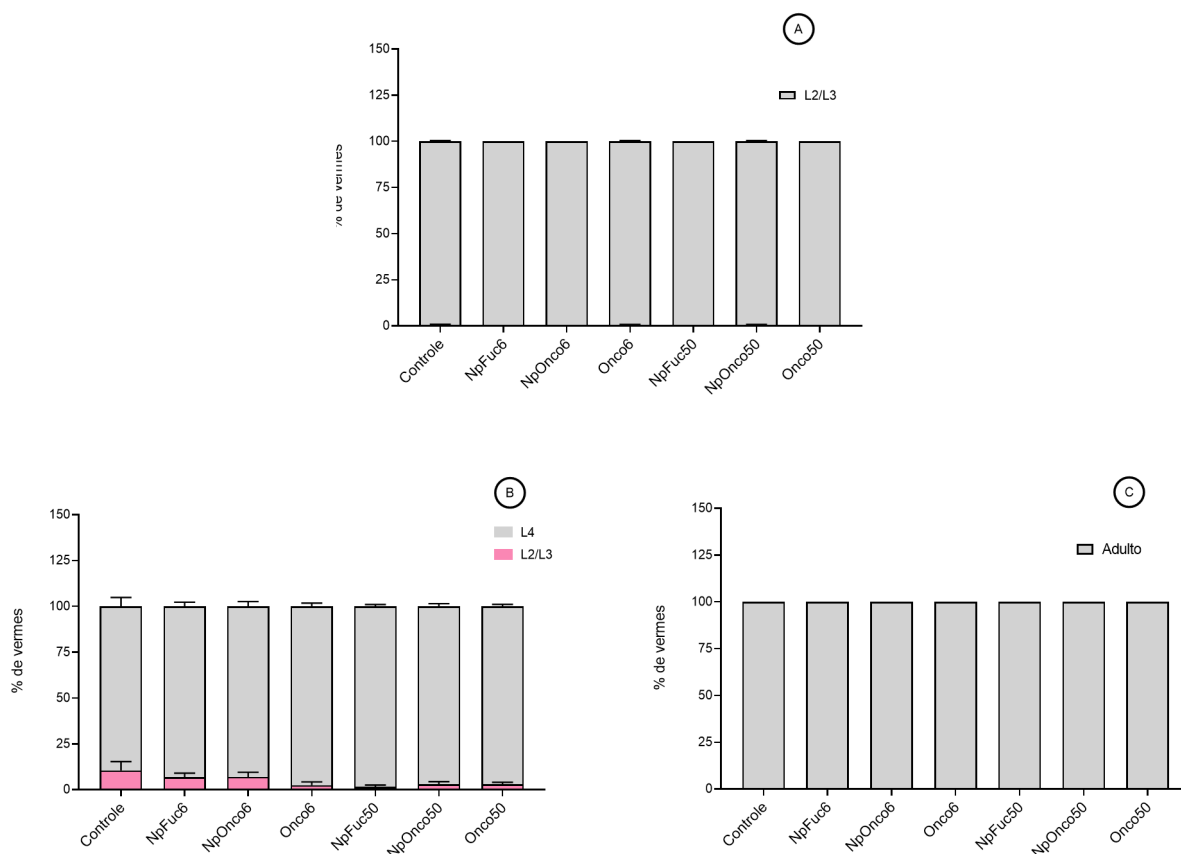
Fonte: A autora (2024).

O estudo do desenvolvimento foi conduzido com o auxílio de microscópio, considerando critérios morfológicos característicos dos estágios larvais e adultos. O estágio L4 foi identificado pela presença da vulva em desenvolvimento, enquanto o estágio adulto foi determinado pela presença de ovos. A análise visual indicou que a exposição às nanopartículas não causou efeitos tóxicos perceptíveis capazes de alterar o desenvolvimento dos animais.

Todos os vermes avaliados apresentaram estruturas internas típicas de seus respectivos estágios, sem discrepâncias notáveis entre os grupos tratados e o controle. Esses resultados, como ilustrado na figura 13, sugerem que as nanopartículas não interferem no ciclo de vida de

C. elegans, não provocando atrasos nem acelerações, e reforçam a segurança das formulações testadas.

Figura 13: Gráfico do ensaio de desenvolvimento em *C. elegans* após a exposição. A) Porcentagem de vermes no estágio L2/L3 após 24h de exposição; B) Porcentagem de vermes no estágio L4 após 44h de exposição; C) Porcentagem de vermes no adulto após 72h de exposição.



5.2.2 Comprimento de corpo

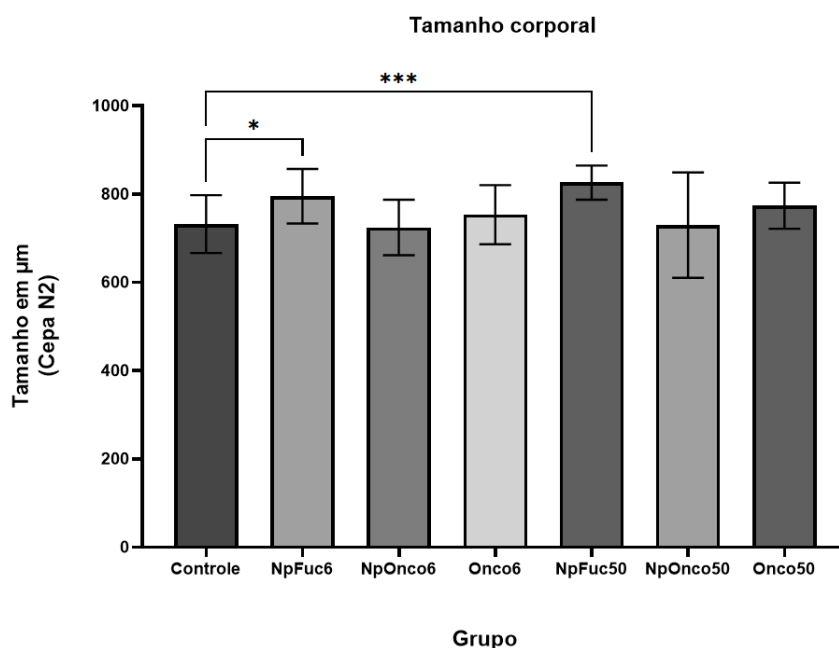
Para avaliar possíveis impactos no desenvolvimento dos vermes, o comprimento corporal foi utilizado como parâmetro adicional. Os resultados revelaram uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos NpFuc6 e NpFuc50, cujos comprimentos médios foram de 795 μm e 826 μm , respectivamente, em comparação ao grupo controle, que apresentou uma média de 700 μm (Figura 14).

Apesar dessa diferença, todos os vermes permaneceram dentro da faixa de normalidade, considerando que, no estágio larval L4, os animais apresentam comprimentos entre 700 e 800

μm , com estruturas internas bem definidas e ausência de ovos em seu interior (Byerly *et al.*, 1976). Dessa forma, conclui-se que a exposição não interferiu no desenvolvimento dos organismos, não promovendo aceleração nem retardamento no progresso larval, reforçando a ausência de efeitos adversos nas condições avaliadas (Zhang *et al.*, 2021).

Figura 14: Gráfico do comprimento corporal dos vermes em L4 após exposição ao tratamento, nas concentrações de 50 e 6,5 μM . Análise feita pelo método ANOVA *one-way*. *Valor de

$p < 0.0282$ e ***Valor de $p < 0.0003$



Fonte: A autora (2024)

5.2.3 Ciclo de defecação

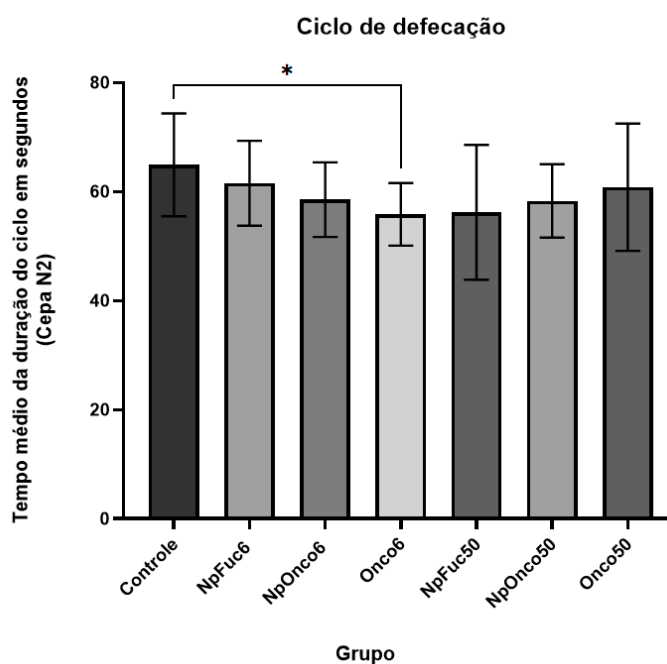
Em *C. elegans*, a expulsão do conteúdo intestinal é controlada por um programa motor cíclico e estereotipado que sincroniza as atividades do intestino, dos músculos e dos neurônios. Alterações no ciclo de defecação após exposição crônica indicam toxicidade no sistema digestivo, disfunção metabólica no animal e variações nos níveis de cálcio no intestino (Dal Santo *et al.*, 1999).

Na cepa N2, o grupo controle apresentou um tempo médio de 64,95 segundos para completar um ciclo, um valor semelhante ao da maioria dos grupos, sem diferença significativa (Figura 15). No entanto, o grupo Onco6 demonstrou uma redução significativa, com um tempo médio de 55,88 segundos, resultando em uma diminuição de 9,07 segundos.

Valores como esses não são incomuns, e todos os grupos apresentaram resultados próximos da normalidade (Liu, 1994). Isso indica a segurança do sistema polimérico e da Oncocalixona A em baixas concentrações.

Figura 15: Gráfico do tempo médio gasto por cada verme para completar um ciclo de defecação após 44 horas de tratamento. Análise feita pelo método Kruskal-Wallis.

*Valor de $p < 0.0243$.



Fonte: A autora (2024)

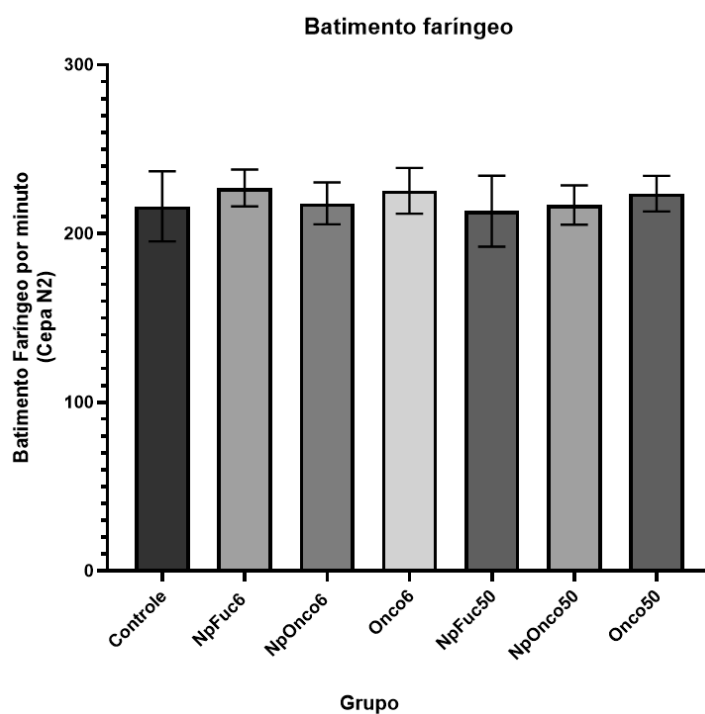
5.2.4 Batimento faríngeo

No experimento de batimento faríngeos por minuto, obteve-se uma média de 216.125 batimentos no grupo controle. Os grupos NpOnco6, NpOnco50 e NpFuc50 apresentaram médias de 217.875, 216.875 e 213.25, respectivamente, não muito diferentes do grupo controle. Os grupos NpFuc6, Onco6 e Onco50 promoveram um leve aumento no batimento, com valores médios de 227, 225.375 e 223.625 batimentos por minuto (figura 16).

Quando comparados, não há diferença estatística relevante entre os grupos que suportem teorias de toxicidade das partículas no comportamento alimentar do verme. Esses

resultados indicam que não houve alteração no processo de alimentação, visto que a alimentação ocorre por meio de contrações rítmicas da faringe.

Figura 16: Gráfico das médias de batimentos faríngeos por minuto após 44 horas de tratamento da cepa N2. Análise feita pelo método ANOVA *one-way*.



Fonte: A autora (2024)

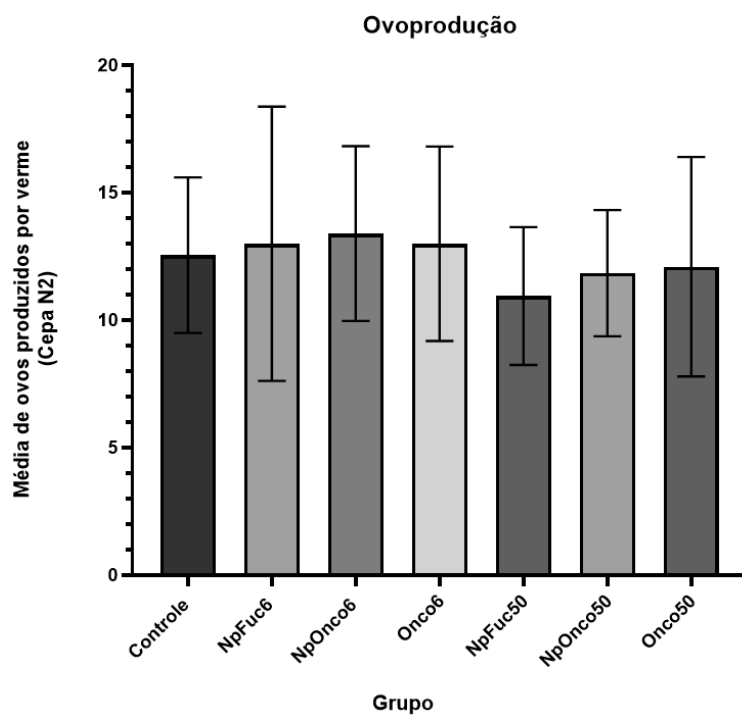
5.2.5 Ovoprodução

Para avaliar a segurança reprodutiva de novos candidatos a medicamentos, é realizado um estudo de produção de ovos, que demonstra se um medicamento pode causar danos ou alterações no comportamento reprodutivo do animal. Neste estudo, a capacidade de gerar ovos foi avaliada de acordo com a exposição a cada grupo.

Na cepa N2, não houve mudanças significativas na produção de ovos do animal em comparação ao controle, que apresentou uma produção média de 12,55 ovos. Os grupos NpFuc6, NpOnco6 e Onco6 promoveram um leve aumento no número de ovos, com valores médios de 13, 13,4 e 13, respectivamente. Os grupos NpFuc50, NpOnco50 e Onco50 causaram uma redução não significativa, com valores médios de 10,95, 11,85 e 12,1 ovos, respectivamente (figura 17).

Esses resultados indicam uma normalidade no comportamento reprodutivo do animal, uma vez que um verme hermafrodita pode armazenar em seu útero, no seu primeiro dia de vida adulta, cerca de 10 a 15 ovos de uma só vez (Eisenmann, 2005).

Figura 17: Gráfico das médias de ovos produzidos por verme após 72 horas de tratamento. Análise feita pelo método ANOVA *one-way*.



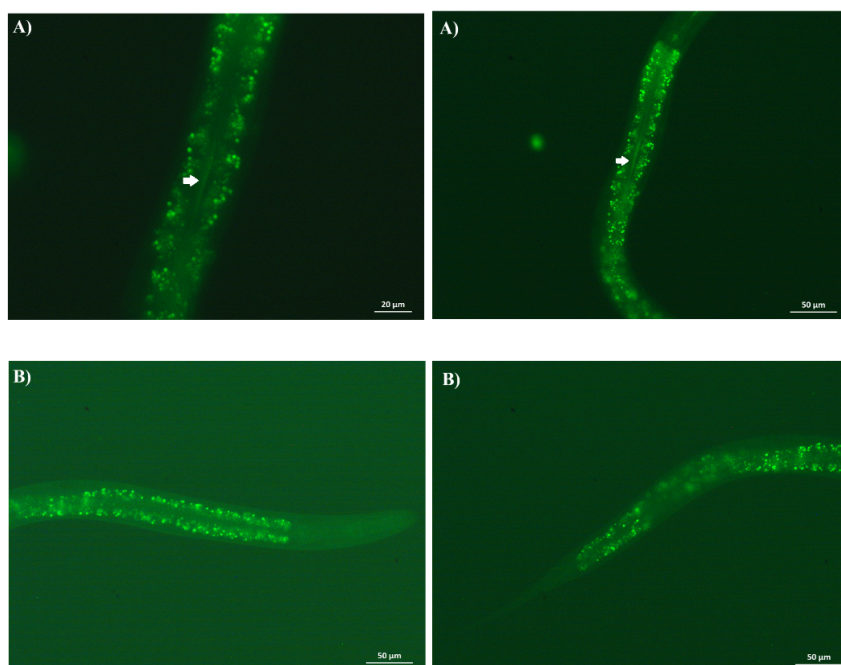
Fonte: A autora (2024)

5.2.6 Ingestão das nanopartículas

Para verificar a ingestão de nanopartículas pelo verme, foram obtidas imagens microscópicas sob fluorescência verde Alexa488 (excitação de 470/40 nm e emissão de 525/50 nm). Como indicado pelas setas, houve ingestão de material fluorescente pelo verme.

As imagens de fluorescência de nanopartículas com Oncocalixona A (NpOnco), na concentração de 50 μ M. A seta indica um conteúdo fluorescente ingerido, indicando a ingestão bem-sucedida do material, quando comparadas ao grupo controle (B), onde a mesma banda fluorescente na região faríngea não é visível (figura 18).

Figura 18: Imagens dos vermes tratados com a NpOnco 50 μ M (A) e o grupo controle (B) sob fluorescência



Fonte: A autora (2024).

5.3 Ensaios realizados com a cepa BS3164

Após a verificação da baixa toxicidade das nanopartículas na cepa N2, partiu-se então para os experimentos com a cepa BS3164. Foram escolhidos os testes de batimento faríngeo e ciclo de defecação para verificar quaisquer anomalias comportamentais relacionadas à cepa, visto que não há informações o suficiente na literatura sobre esses comportamentos da mesma.

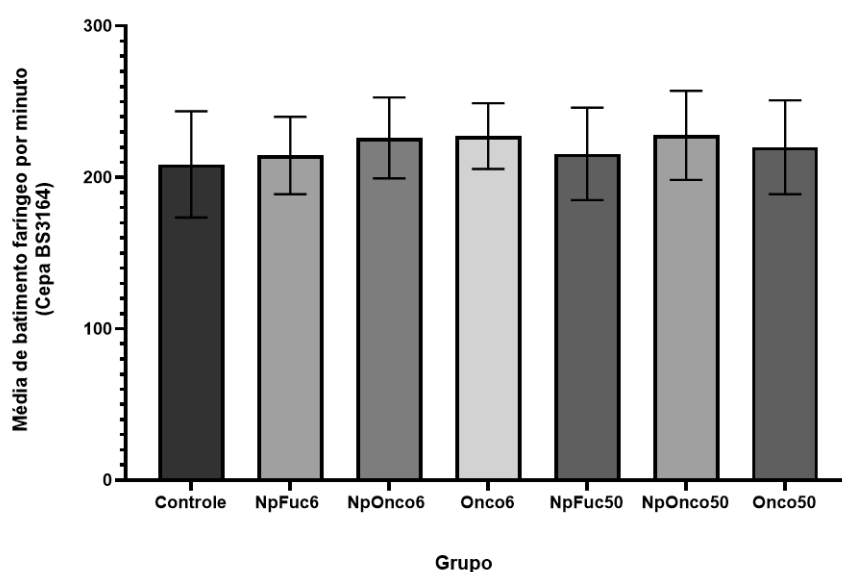
Nesta cepa, os vermes foram inicialmente mantidos a uma temperatura de 15°C até atingirem o estágio larval L4, aproximadamente 44 horas após o início do experimento. Após esse período, a temperatura foi elevada para 25°C, onde permaneceram até completar 72 horas de exposição apenas para análise da expressão do fenótipo.

5.3.1 Batimento faríngeo - BS3164

No período de 48 horas, foi realizado um estudo sobre o comportamento alimentar do verme através da contagem do seu batimento faríngeo. Observou-se que o grupo controle apresentou uma taxa de batimentos de 208.5 por minuto, similar aos grupos NpFuc6, NPFuc50 e Onco50, que registraram valores de 214.4, 215.5 e 219.87, respectivamente. O valor mais elevado obtido nesse teste foi o do grupo Onco6, com 227,25 batimentos por minuto, seguido pelo grupo NpOnco6, com 226,125, e pelo grupo NpOnco50, com 227.75 batimentos por minuto (figura 19).

Ao comparar com o grupo N2, observa-se que o grupo Onco6 promove um aumento nos batimentos por minuto, embora esse aumento não seja estatisticamente significativo entre as duas cepas. Os valores mantiveram-se semelhantes entre as cepas, não sendo possível identificar diferenças comportamentais nessa análise, tanto no grupo controle quanto nos grupos em tratamento.

Figura 19: Gráfico do batimento faríngeo da cepa B3164 após exposição. Análise feita pelo método Kruskal-Wallis.



Fonte: A autora (2024)

5.3.2 Ciclo de defecação - BS3164

A via Notch, presente na cepa BS3164, é fundamental para os processos digestivos e as contrações intestinais, influenciando o ciclo de defecação do verme. Neste presente trabalho, observou-se que a cepa apresenta irregularidades nesse ciclo, com variações marcantes nos intervalos e contrações intensas do intestino posterior, ao contrário do comportamento mais previsível da cepa N2. Essas contrações irregulares podem indicar um efeito sistêmico das alterações na via Notch, sugerindo uma desregulação que poderia facilitar o desenvolvimento de tumores em tecidos gastrointestinais em humanos.

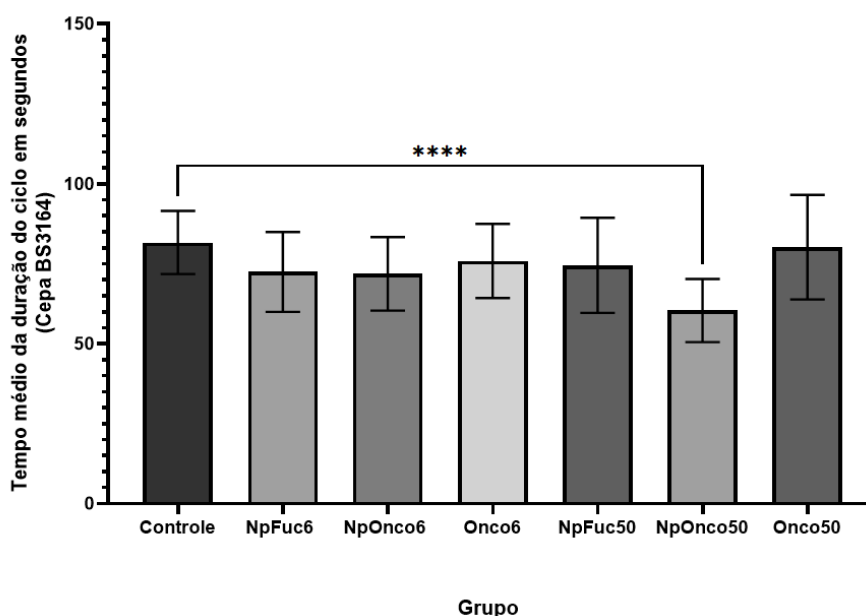
Nesse contexto, o grupo controle apresentou um tempo médio de 81,66 segundos para completar um ciclo, valor próximo ao do grupo Onco50, com média de 80,20 segundos. Nos demais grupos, embora os tempos médios tenham sido ligeiramente menores, os valores mantiveram-se semelhantes entre si. Especificamente, o grupo NpFuc6 completou o ciclo em 72,47 segundos, o grupo NpOnco6 em 71,85 segundos e o grupo Onco6 em 75,87 segundos. O grupo NpFuc50 registrou um tempo médio de 74,52 segundos, enquanto o menor valor foi observado no grupo NpOnco50, com uma média de 60,41 segundos (figura 20).

Esses resultados sugerem que, apesar das variações no tempo do ciclo de defecação entre os grupos, a introdução das nanopartículas pode impactar a duração desse processo, especialmente no grupo NpOnco50, que apresentou um tempo consideravelmente reduzido em comparação aos demais.

A redução significativa no tempo de ciclo do grupo NpOnco50, semelhante ao observado no grupo controle N2, sugere que as nanopartículas de Oncocalixona A na concentração de 50 μ M podem influenciar a fisiologia intestinal, alterando a dinâmica do ciclo de defecação. Essa resposta pode indicar adaptações nas vias de sinalização celular que impactam diretamente o funcionamento do intestino e, potencialmente, estão relacionadas ao desenvolvimento de patologias, como o câncer, em humanos, especialmente em conexão com a via de sinalização NOTCH.

A variação nos tempos de ciclo entre os diferentes grupos reforça a hipótese de que as nanopartículas podem ter um efeito modulador sobre a atividade intestinal, merecendo investigação adicional para elucidar os mecanismos envolvidos.

Figura 20: Gráfico do ciclo de defecação da cepa B3164. Análise feita pelo método Kruskal-Wallis. ***Valor de $p < 0.0001$



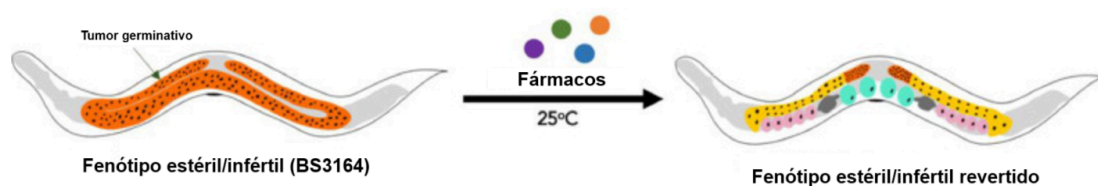
Fonte: A autora (2024)

5.3.3 Teste de fenótipo - BS3164

A cepa BS3164 de *C. elegans* tem uma mutação na via de sinalização NOTCH, o que faz com que ela expresse um fenótipo específico. Quando essa via está ativada, a linha germinativa dos vermes desenvolve um tipo de tumor, o que acaba deixando os vermes estéreis e inférteis. Esse fenótipo só se manifesta quando a temperatura é ajustada para 25°C, o que mostra como a temperatura pode influenciar a expressão dessa mutação e o desenvolvimento da esterilidade nos vermes, conforme mostrado na figura 21 (Medina, 2020).

No teste fenotípico, os vermes foram expostos a 25°C após 44 horas de exposição. Observou-se que, ao serem submetidos à temperatura que ativa a via NOTCH, a cutícula dos vermes apresentaram um leve enrugamento, resultando em um aspecto diferente do observado na cepa N2. Esse enrugamento pode ser causado por estresse térmico, uma vez que a temperatura de 25°C é 10°C superior à temperatura de manutenção dos vermes.

Figura 21: Triagem fenotípica com a cepa BS3164 de *C. elegans* para descobrir drogas anticâncer, avaliando a reversão do fenótipo mutante na via de sinalização NOTCH.



Fonte: Adaptado de Medina (2020)

Após 72 horas, não foram observados ovos ou vermes no estágio L1 na placa. Todos os vermes que estavam no estágio larval adulto permaneceram estéreis e inférteis, e não foi possível reverter completamente o fenótipo observado. Isso sugere que o fator que causou a esterilidade persistiu durante o período de observação, mesmo após a exposição aos grupos.

Entretanto, foi observado diferenças nas estruturais internas entre os grupos (figura 22). Nos grupos NpFuc6 e Onco6, quando comparado com os vermes do controle, foi observado que os vermes estavam maiores, com suas estruturas internas mais desenvolvidas e com a redução do tumor da linha germinativa visível.

Embora o fenótipo não tenha sido totalmente revertido, os resultados indicam um possível caminho para o estudo mais aprofundado dos efeitos das partículas em concentrações diferentes. Nas menores concentrações, tanto da nanopartícula isolada quanto da Oncocalixona A em sua forma livre, os resultados são interessantes. Eles sugerem que a nanopartícula de fucana com PIBCA, mesmo sem fármacos carregados, têm eficácia na via de sinalização relacionada à cepa, provavelmente devido à presença da fucana. Além disso, é possível observar a mesma ação da Oncocalixona A na via, mesmo em concentrações pequenas.

Para otimizar os resultados, seriam necessários estudos adicionais e curvas de concentração diversas para determinar qual concentração ideal, entre 50 e 6,5 μM , seria mais eficaz para promover o carregamento efetivo das partículas e maximizar os efeitos na via de sinalização.

Figura 22: Comparativo dos vermes da cepa BS3164 após tratamento de 72h.



Fonte: A autora (2024).

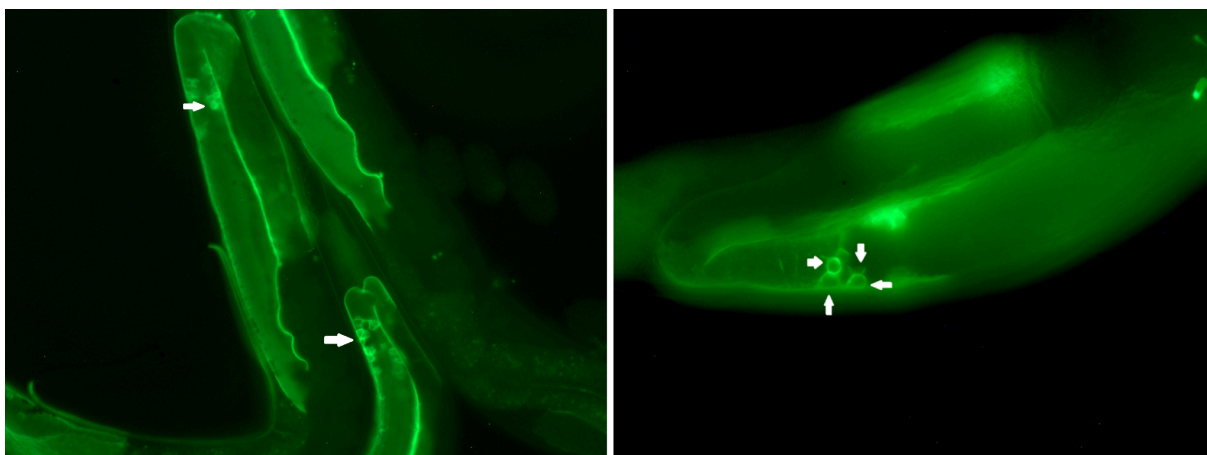
5.4 Contagem de corpos apoptóticos na cepa MD701

As células germinativas, fundamentais para a reprodução, podem sofrer apoptose, um processo de morte celular programada. Esse mecanismo é regulado por proteínas conhecidas como caspases e pode ser desencadeado por duas vias principais. A primeira depende de CEP-1/EGL-1, proteínas semelhantes à p53, que desempenham um papel crucial no reparo de danos ao DNA. A segunda é independente de CEP-1, mas ambas convergem para a ativação de outras proteínas (CED-9, CED-4 e CED-3), responsáveis pela execução da apoptose (Gartner et al., 2008; Lettre and Hengartner, 2006)

Danos ao DNA nas células germinativas podem ativar a apoptose pela via dependente de CEP-1. Assim, agentes que prejudicam o DNA, como a radiação, podem aumentar a taxa de morte celular (Gartner et al., 2000). Pesquisas já demonstraram que a radiação gama eleva significativamente a apoptose em vermes, tornando essas mortes um indicador confiável de danos ao DNA (Lans and Vermeulen, 2015).

A cepa MD701 (bcIs39) de *C. elegans* é uma linhagem transgênica equipada com um marcador fluorescente, o que possibilita a visualização das células germinativas durante o processo de apoptose. Esta cepa foi geneticamente modificada para expressar uma proteína fluorescente, como a GFP, associada a uma via de apoptose específica nas células germinativas. Como mostrado na figura 23, quando essas células passam por apoptose, elas emitem fluorescência, permitindo o monitoramento em tempo real da morte celular programada.

Figura 23: Cepa MD701 mostrando células germinativas em apoptose (setas).



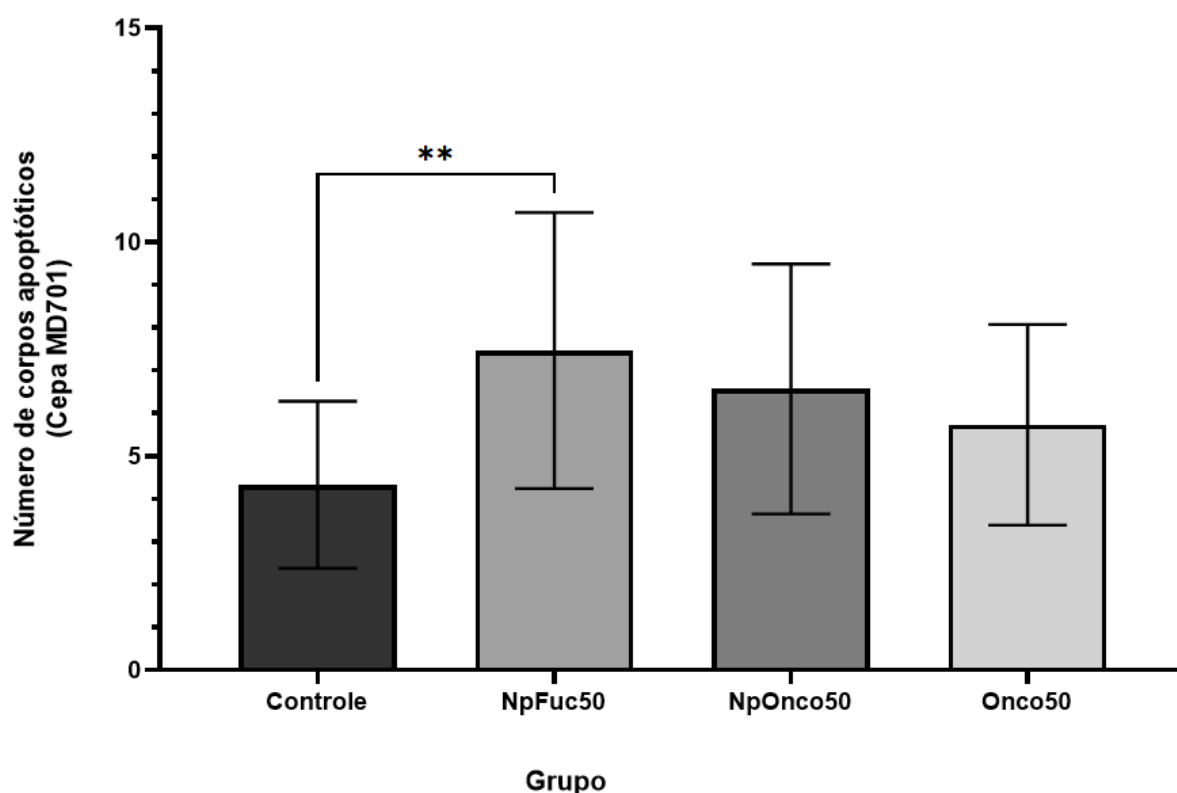
Fonte: A autora (2024).

Como resultado, foi observado que todos os grupos, quando comparados com o controle, obtiveram resultado superior. Os valores apresentados foram de 4.3, 7.4, 6.5 e 5.7 para os grupos controle, NpFuc50, NpOnco50 e Onco 50 respectivamente (figura 24).

O maior número de corpos apoptóticos foi observado no grupo NpFuc50. Curiosamente, esse mesmo grupo promoveu uma redução no número de ovos produzidos pela cepa N2. Também, os demais grupos NpOnco50 e Onco50, mesmo não muito drásticos, promoveram uma queda na taxa de postura de ovos do *C.elegans*.

Os resultados em *C. elegans* sugerem que as partículas NpFuc promove apoptose e danos ao DNA em concentrações mais altas. No entanto, estudos mais detalhados são necessários para esclarecer sua atuação específica nas vias de sinalização.

Figura 24: Gráfico da contagem dos corpos apoptóticos na cepa MD701 após exposição.



Fonte: A autora (2024)

5.5 Docking Molecular

Teoriza-se que os mecanismos anticancerígenos da Oncocalixona A e da fucana em *C. elegans* tenham como alvo os componentes da via de sinalização NOTCH. O receptor transmembrana GLP-1, quando ativado, é catalisado pela proteína SEL-12, que libera sua porção intramembrana. Esta porção se liga ao regulador transcricional LAG-1, ativando a expressão de vários genes relacionados à via NOTCH, que está associada a diversas doenças, como leucemias, linfomas e cânceres de mama, pâncreas, pulmão e ovário (Grant e Greenwald, 1996; Lobry, 2014).

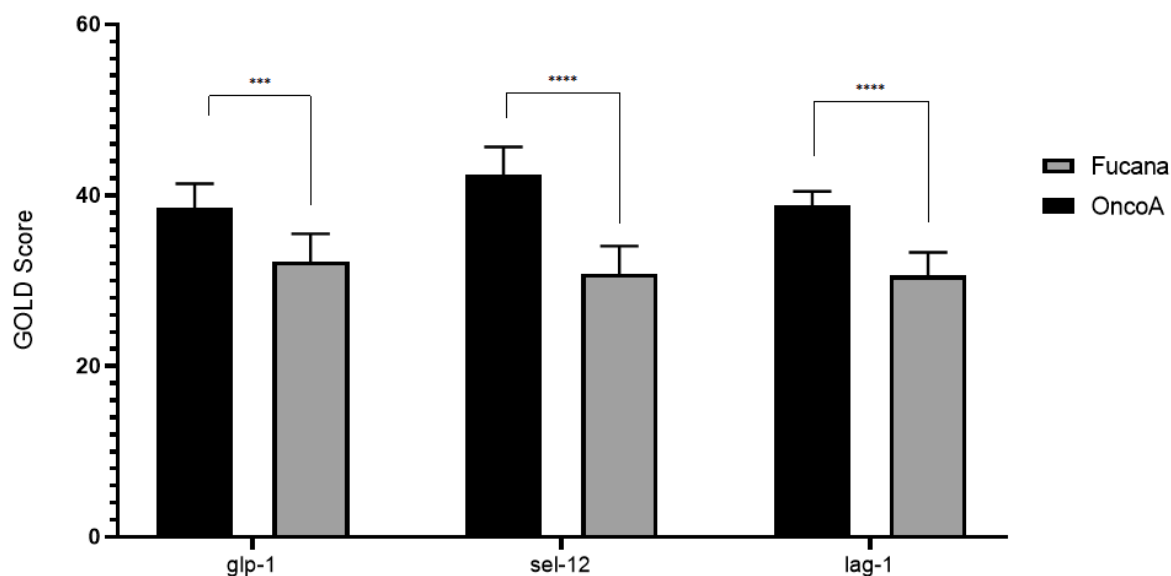
C. elegans possui dois receptores redundantes do tipo NOTCH, chamados LIN-12 e GLP-1, identificados como homólogos de NOTCH em 1988 e 1989, e aparentemente envolvidos no desenvolvimento desse organismo (Zhou, 2022).

Portanto, componentes da via de sinalização NOTCH foram testados por meio de docking molecular para analisar se OncoA e a fucana são capazes de se ligar a eles e possivelmente promover quaisquer alterações na via.

A análise do docking molecular revela que a OncoA tem maior afinidade por todos os componentes da via de sinalização NOTCH quando comparada à fucana. Os valores do Gold score da OncoA são: $38,47 \pm 2,89$ para GLP-1, $42,37 \pm 3,30$ para SEL-12 e $38,76 \pm 1,70$ para LAG-1. Os valores do Gold score da fucana são: $32,267 \pm 3,06$ para GLP-1, $30,817 \pm 3,07$ para SEL-12 e $30,653 \pm 2,526$ para GLP-1 (figura 25).

A OncoA apresentou uma afinidade superior por todos os componentes da via de sinalização NOTCH, incluindo os receptores GLP-1, SEL-12 e LAG-1, quando comparada à fucana. Embora a fucana também interaja com esses componentes, ela demonstrou uma afinidade menor, o que sugere que, embora tenha efeitos na via, sua eficácia possa ser inferior à da OncoA. Esses resultados destacam o potencial da OncoA como uma molécula promissora para o desenvolvimento de terapias direcionadas à modulação da via NOTCH, especialmente em doenças como leucemias e outros tipos de câncer associados a disfunções dessa via.

Figura 25: Gráficos do resultado do docking molecular com a OncoA e a Fucana.



Fonte: A autora (2024)

4. Conclusão

O estudo demonstrou que as nanopartículas poliméricas de PIBCA revestidas com fucana e carregadas com Oncocalixona A apresentaram propriedades físico-químicas adequadas para estabilidade e biocompatibilidade. Nos ensaios com *C. elegans*, as nanopartículas preservaram a viabilidade e o desenvolvimento do modelo, além de serem eficientemente ingeridas pelos nematoides.

Houve indícios da capacidade das nanopartículas de modular a via de sinalização NOTCH mesmo em concentrações baixas, enquanto os testes com a cepa MD701 evidenciaram um aumento na apoptose, reforçando seu potencial anticancerígeno. A validação das interações moleculares por docking corroborou a eficácia direcionada do sistema nanoparticulado.

Esses resultados destacam as nanopartículas de OncoA revestidas com fucana como uma abordagem promissora para o desenvolvimento de terapias anticancerígenas mais seguras e eficazes. Sua especificidade para receptores associados à doença e o direcionamento preciso sugerem um potencial significativo para aplicações futuras, especialmente em formulações orais, proporcionando um tratamento mais acessível e com menos efeitos adversos.

5. Referências

1. A Conserved Checkpoint Pathway Mediates DNA Damage–Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest in *C. elegans*. **Molecular Cell**, [s.d.]. v. 5, n. 3, p. 435–443.
2. AGARRAYUA, D. A. *et al.* Safety assessment of different unloaded polymeric nanocapsules in *Caenorhabditis elegans*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, Jan. 2023. v. 263, p. 109477. . Acesso em: 24 nov. 2024.
3. AGOTEGARAY, M. *et al.* β -cyclodextrin coating: improving biocompatibility of magnetic nanocomposites for biomedical applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 30 Jan. 2020. v. 31, n. 2. . Acesso em: 24 nov. 2024.
4. AGRA, M. De F. *et al.* Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Sep. 2008. v. 18, n. 3, p. 472–508. . Acesso em: 13 oct. 2024.
5. AHN, J.-M. *et al.* Comparative toxicity of silver nanoparticles on oxidative stress and DNA damage in the nematode, *Caenorhabditis elegans*. **Chemosphere**, Aug. 2014. v. 108, p. 343–352. . Acesso em: 24 nov. 2024.
6. AMIGONI, L. *et al.* Impact of Tuning the Surface Charge Distribution on Colloidal Iron Oxide Nanoparticle Toxicity Investigated in *Caenorhabditis elegans*. **Nanomaterials**, 11 Jun. 2021. v. 11, n. 6, p. 1551. . Acesso em: 24 nov. 2024.
7. AMRIT, F. R. G. *et al.* The *C. elegans* lifespan assay toolkit. **Methods**, Aug. 2014. v. 68, n. 3, p. 465–475. . Acesso em: 13 oct. 2024.
8. ARNDT, D. A. *et al.* The role of charge in the toxicity of polymer-coated cerium oxide nanomaterials to *Caenorhabditis elegans*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, Oct. 2017. v. 201, p. 1–10. . Acesso em: 24 nov. 2024.
9. AYECH, A. *et al.* Toxicity evaluation of nanocrystalline silver-impregnated coated dressing on the life cycle of worm *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Jul. 2020. v. 197, p. 110570. . Acesso em: 24 nov. 2024.
10. BALANDRIN, M. F.; KINGHORN, A. D.; FARNSWORTH, N. R. Plant-Derived Natural Products in Drug Discovery and Development. **ACS Symposium Series**. Washington, DC: American Chemical Society, 1993, p. 2–12.
11. BARUA, S. *et al.* Particle shape enhances specificity of antibody-displaying

- nanoparticles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 11 Feb. 2013. v. 110, n. 9, p. 3270–3275. . Acesso em: 13 oct. 2024.
12. BONE, A. J. *et al.* Silver nanoparticle toxicity to Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) and *Caenorhabditis elegans*: A comparison of mesocosm, microcosm, and conventional laboratory studies. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 27 Jan. 2015. v. 34, n. 2, p. 275–282. . Acesso em: 24 nov. 2024.
 13. BREIMER, D. D.; BAARS, A. J. Pharmacokinetics and Metabolism of Anthraquinone Laxatives. **Pharmacology**, 1976. v. 14, n. 1, p. 30–47. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 14. CALAHORRO, F.; HOLDEN-DYE, L.; O’CONNOR, V. Impact of drug solvents on *C. elegans* pharyngeal pumping. **Toxicology Reports**, 2021. v. 8, p. 1240–1247. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 15. CAVALCANTI, I. D. L. *et al.* Fucoidan-coated PIBCA nanoparticles containing oncocalyxone A: Activity against metastatic breast cancer cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Oct. 2021. v. 65, p. 102698. . Acesso em: 24 nov. 2024.
 16. CAVALCANTI, I. D. L. *et al.* Does Oncocalyxone A (oncoA) have intrinsic fluorescence? **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Sep. 2022. v. 39, p. 102869. . Acesso em: 29 oct. 2024.
 17. CHAACHOUAY, N.; ZIDANE, L. Plant-Derived Natural Products: A Source for Drug Discovery and Development. **Drugs and Drug Candidates**, 19 Feb. 2024. v. 3, n. 1, p. 184–207. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 18. CHAN-ZAPATA, I.; BORGES-ARGÁEZ, R.; AYORA-TALAVERA, G. Quinones as Promising Compounds against Respiratory Viruses: A Review. **Molecules**, 20 Feb. 2023. v. 28, n. 4, p. 1981. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 19. CHARAN, S. *et al.* Development of Lipid Targeting Raman Probes for In Vivo Imaging of *Caenorhabditis elegans*. **Chemistry – A European Journal**, 15 Mar. 2011. v. 17, n. 18, p. 5165–5170. . Acesso em: 24 nov. 2024.
 20. CHEN, C.-W. *et al.* Evaluations of the Chemical Stability and Cytotoxicity of CuInS₂ and CuInS₂/ZnS Core/Shell Quantum Dots. **The Journal of Physical Chemistry C**, 27 Jan. 2015. v. 119, n. 5, p. 2852–2860. . Acesso em: 24 nov. 2024.
 21. CIRIELLO, G. *et al.* Cancer Evolution: A Multifaceted Affair. **Cancer Discovery**, 6 Dec. 2023. v. 14, n. 1, p. 36–48. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 22. COLLIN, B. *et al.* Influence of Natural Organic Matter and Surface Charge on the Toxicity and Bioaccumulation of Functionalized Ceria Nanoparticles in

- Caenorhabditis elegans*. **Environmental Science & Technology**, 8 Jan. 2014. v. 48, n. 2, p. 1280–1289. . Acesso em: 24 nov. 2024.
23. COMANESCU, C. Recent Advances in Surface Functionalization of Magnetic Nanoparticles. **Coatings**, 15 Oct. 2023. v. 13, n. 10, p. 1772. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 24. CORES, Á. *et al.* Quinones as Neuroprotective Agents. **Antioxidants**, 20 Jul. 2023. v. 12, n. 7, p. 1464. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 25. CULETTO, E. A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. **Human Molecular Genetics**, 1 Apr. 2000. v. 9, n. 6, p. 869–877. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 26. CUMASHI, A. *et al.* A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. **Glycobiology**, 12 Feb. 2007. v. 17, n. 5, p. 541–552. . Acesso em: 24 nov. 2024.
 27. DAL SANTO, P. *et al.* The Inositol Trisphosphate Receptor Regulates a 50-Second Behavioral Rhythm in *C. elegans*. **Cell**, Sep. 1999. v. 98, n. 6, p. 757–767. . Acesso em: 24 nov. 2024.
 28. DANDAWATE, P. R. *et al.* Perspectives on Medicinal Properties of Benzoquinone Compounds. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, 1 May. 2010. v. 10, n. 5, p. 436–454. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 29. DAS, S. S. *et al.* Food-Grade Quercetin-Loaded Nanoemulsion Ameliorates Effects Associated with Parkinson’s Disease and Cancer: Studies Employing a Transgenic *C. elegans* Model and Human Cancer Cell Lines. **Antioxidants**, 15 Jul. 2022. v. 11, n. 7, p. 1378. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 30. DE GREEF, D. *et al.* Anticancer potential of garlic and its bioactive constituents: A systematic and comprehensive review. **Seminars in Cancer Biology**, Aug. 2021. v. 73, p. 219–264. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 31. DEVITA, V. T., Jr.; CHU, E. A History of Cancer Chemotherapy. **Cancer Research**, 30 Oct. 2008. v. 68, n. 21, p. 8643–8653. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 32. DUBALE, S. *et al.* Ethnomedicinal plants and associated indigenous knowledge for the treatment of different infectious diseases in Ethiopia. **Journal of Herbal Medicine**, Aug. 2023. v. 40, p. 100669. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 33. ELLIS, H. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. **Cell**, 28 Mar. 1986. v. 44, n. 6, p. 817–829. . Acesso em: 13 oct. 2024.

34. EMAMI NEJAD, A. *et al.* The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell: a novel approach to developing treatment. **Cancer Cell International**, 20 Jan. 2021. v. 21, n. 1. . Acesso em: 13 oct. 2024.
35. EPIFANO, F. *et al.* Lapachol and its congeners as anticancer agents: a review. **Phytochemistry Reviews**, 13 Apr. 2013. v. 13, n. 1, p. 37–49. . Acesso em: 13 oct. 2024.
36. FERRARI, M. Frontiers in cancer nanomedicine: directing mass transport through biological barriers. **Trends in Biotechnology**, Apr. 2010. v. 28, n. 4, p. 181–188. . Acesso em: 13 oct. 2024.
37. GALDIERO, E. *et al.* Quantum dots functionalized with gH625 attenuate QDs oxidative stress and lethality in *Caenorhabditis elegans*: a model system. **Ecotoxicology**, 11 Jan. 2020. v. 29, n. 2, p. 156–162. . Acesso em: 24 nov. 2024.
38. GARCÍA-SANCHO, M. From the genetic to the computer program: the historicity of ‘data’ and ‘computation’ in the investigations on the nematode worm *C. elegans* (1963–1998). **Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences**, Mar. 2012. v. 43, n. 1, p. 16–28. . Acesso em: 13 oct. 2024.
39. GILES, A. C.; RANKIN, C. H. Behavioral and genetic characterization of habituation using *Caenorhabditis elegans*. **Neurobiology of Learning and Memory**, Sep. 2009. v. 92, n. 2, p. 139–146. . Acesso em: 13 oct. 2024.
40. GONZALEZ-MORAGAS, L. *et al.* Protective Effects of Bovine Serum Albumin on Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Evaluated in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, 8 Oct. 2015. v. 1, n. 11, p. 1129–1138. . Acesso em: 24 nov. 2024.
41. GONZALEZ-MORAGA, L. *et al.* Materials and toxicological approaches to study metal and metal-oxide nanoparticles in the model organism *Caenorhabditis elegans*. **Materials Horizons**, 2017. v. 4, n. 5, p. 719–746. . Acesso em: 13 oct. 2024.
42. GONZALEZ-MORAGA, L. *et al.* Toxicogenomics of iron oxide nanoparticles in the nematode *C. elegans*. **Nanotoxicology**, 28 May. 2017. v. 11, n. 5, p. 647–657. . Acesso em: 24 nov. 2024.
43. GORAIN, B. *et al.* Advanced drug delivery systems containing herbal components for wound healing. **International Journal of Pharmaceutics**, Apr. 2022. v. 617, p. 121617. . Acesso em: 13 oct. 2024.
44. GRANT, B.; GREENWALD, I. The *Caenorhabditis elegans* sel-1 Gene, a Negative

- Regulator of *lin-12* and *glp-1*, Encodes a Predicted Extracellular Protein. **Genetics**, 1 May. 1996. v. 143, n. 1, p. 237–247. . Acesso em: 24 nov. 2024.
45. GREENWALD, I. LIN-12/Notch signaling in *C. elegans*. **WormBook**, 2005. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 46. GIRARD, L.R *et al.* WormBook: The Online Review of *C. elegans* Biology . **WormBook**, 2018.
 47. GUBERT, P. *et al.* Metabolic effects of manganese in the nematode *Caenorhabditis elegans* through DAergic pathway and transcription factors activation. **NeuroToxicology**, Jul. 2018. v. 67, p. 65–72. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 48. HANNA, S. K. *et al.* Agglomeration of *Escherichia coli* with Positively Charged Nanoparticles Can Lead to Artifacts in a Standard *Caenorhabditis elegans* Toxicity Assay. **Environmental Science & Technology**, 19 Apr. 2018. v. 52, n. 10, p. 5968–5978. . Acesso em: 24 nov. 2024.
 49. HAQUE, R. *et al.* Human insulin modulates α -synuclein aggregation via DAF-2/DAF-16 signalling pathway by antagonising DAF-2 receptor in *C. elegans* model of Parkinson's disease. **Oncotarget**, 11 Feb. 2020. v. 11, n. 6, p. 634–649. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 50. HENRICSON, A. *et al.* Functional characterization in *Caenorhabditis elegans* of transmembrane worm-human orthologs. **BMC Genomics**, 8 Nov. 2004. v. 5, n. 1. . Acesso em: 12 dec. 2024.
 51. HOSSEINI, S. H. *et al.* Ethnobotany of the medicinal plants used by the ethnic communities of Kerman province, Southeast Iran. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, 28 Apr. 2021. v. 17, n. 1. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 52. HU, C.-C. *et al.* Toxic Effects of Size-tunable Gold Nanoparticles on *Caenorhabditis elegans* Development and Gene Regulation. **Scientific Reports**, 15 Oct. 2018. v. 8, n. 1. . Acesso em: 24 nov. 2024.
 53. HU, J. *et al.* Long Circulating Polymeric Nanoparticles for Gene/Drug Delivery. **Current Drug Metabolism**, 29 Aug. 2018. v. 19, n. 9, p. 723–738. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 54. HUNT, P. R. *et al.* Bioactivity of nanosilver in *Caenorhabditis elegans* : Effects of size, coat, and shape. **Toxicology Reports**, 2014. v. 1, p. 923–944. . Acesso em: 24 nov. 2024.
 55. HUNT, P.R *et al.* *Caenorhabditis elegans* for predictive toxicology. **Current Opinion in Toxicology**, Oct. 2020. v. 23–24, p. 23–28. . Acesso em: 13 oct. 2024.

56. INCHAURRAGA, L. *et al.* Zein-based nanoparticles for the oral delivery of insulin. **Drug Delivery and Translational Research**, 8 Jun. 2020. v. 10, n. 6, p. 1601–1611. . Acesso em: 24 nov. 2024.
57. JAMAL, M. S. *et al.* Anticancer Compound Plumbagin and Its Molecular Targets: A Structural Insight into the Inhibitory Mechanisms Using Computational Approaches. **PLoS ONE**, 27 Feb. 2014. v. 9, n. 2, p. e87309. . Acesso em: 13 oct. 2024.
58. JONES, W.; CHIN, Y.-W.; KINGHORN, A. The Role of Pharmacognosy in Modern Medicine and Pharmacy. **Current Drug Targets**, 1 Mar. 2006. v. 7, n. 3, p. 247–264. . Acesso em: 13 oct. 2024.
59. KANTE, B. *et al.* Toxicity of Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles I: Free Nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Jul. 1982. v. 71, n. 7, p. 786–790. . Acesso em: 13 oct. 2024.
60. KATTEL, K. *et al.* Water-soluble ultrasmall Eu₂O₃ nanoparticles as a fluorescent imaging agent: *In vitro* and *in vivo* studies. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Jan. 2012. v. 394, p. 85–91. . Acesso em: 24 nov. 2024.
61. KIM, S. K.; CHO, S. W. The Evasion Mechanisms of Cancer Immunity and Drug Intervention in the Tumor Microenvironment. **Frontiers in Pharmacology**, 24 May. 2022. v. 13. . Acesso em: 13 oct. 2024.
62. KIM, S. W.; NAM, S.-H.; AN, Y.-J. Interaction of Silver Nanoparticles with Biological Surfaces of *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Mar. 2012. v. 77, p. 64–70. . Acesso em: 24 nov. 2024.
63. KIMBLE, J. Germline proliferation and its control. **WormBook**, 2005. . Acesso em: 13 oct. 2024.
64. KLASS, M. R. Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*: Major biological and environmental factors influencing life span. **Mechanisms of Ageing and Development**, Jan. 1977. v. 6, p. 413–429. . Acesso em: 13 oct. 2024.
65. KONNOVA, S. A. *et al.* Silver nanoparticle-coated “cyborg” microorganisms: rapid assembly of polymer-stabilised nanoparticles on microbial cells. **RSC Advances**, 2015. v. 5, n. 18, p. 13530–13537. . Acesso em: 24 nov. 2024.
66. KOPAN, R.; ILAGAN, Ma. X. G. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. **Cell**, Apr. 2009. v. 137, n. 2, p. 216–233. . Acesso em: 13 oct. 2024.
67. KUČUK, N. *et al.* Sustainable Biodegradable Biopolymer-Based Nanoparticles for

- Healthcare Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, 6 Feb. 2023. v. 24, n. 4, p. 3188. . Acesso em: 20 oct. 2024.
68. KUO, Y. *et al.* Fluorescent nanodiamond as a probe for the intercellular transport of proteins in vivo. **Biomaterials**, Nov. 2013. v. 34, n. 33, p. 8352–8360. . Acesso em: 24 nov. 2024.
69. LANS, H.; VERMEULEN, W. Tissue specific response to DNA damage: *C. elegans* as role model. **DNA Repair**, Aug. 2015. v. 32, p. 141–148. . Acesso em: 24 nov. 2024.
70. LAY, A. *et al.* Optically Robust and Biocompatible Mechanosensitive Upconverting Nanoparticles. **ACS Central Science**, 9 Jul. 2019. v. 5, n. 7, p. 1211–1222. . Acesso em: 24 nov. 2024.
71. LEAHEY, A. B.; GOTTSCH, J. D.; STARK, W. J. Clinical Experience with N-butyl Cyanoacrylate (Nexacryl) Tissue Adhesive. **Ophthalmology**, Feb. 1993. v. 100, n. 2, p. 173–180. . Acesso em: 23 feb. 2025.
72. LETTRE, G.; HENGARTNER, M. O. Developmental apoptosis in *C. elegans*: a complex CEDnario. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Feb. 2006. v. 7, n. 2, p. 97–108. . Acesso em: 24 nov. 2024.
73. L'HERNAULT, S. W. The genetics and cell biology of spermatogenesis in the nematode *C. elegans*. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 10 Jul. 2009. v. 306, n. 1–2, p. 59–65. . Acesso em: 13 oct. 2024.
74. LI, B. *et al.* Fucoidan: Structure and Bioactivity. **Molecules**, 12 Aug. 2008. v. 13, n. 8, p. 1671–1695. . Acesso em: 24 nov. 2024.
75. LI, Qianqian *et al.* Molecular Mechanisms of Action of Emodin: As an Anti-Cardiovascular Disease Drug. **Frontiers in Pharmacology**, 27 Aug. 2020. v. 11. . Acesso em: 13 oct. 2024.
76. LIU, D.; THOMAS, J. Regulation of a periodic motor program in *C. elegans*. **The Journal of Neuroscience**, 1 Apr. 1994. v. 14, n. 4, p. 1953–1962. . Acesso em: 24 nov. 2024.
77. LOBRY, C. *et al.* Notch signaling: switching an oncogene to a tumor suppressor. **Blood**, 17 Apr. 2014. v. 123, n. 16, p. 2451–2459. . Acesso em: 24 nov. 2024.
78. LONG, N. P.; KANG, J. S.; KIM, H. M. *Caenorhabditis elegans*: a model organism in the toxicity assessment of environmental pollutants. **Environmental Science and Pollution Research**, 6 Feb. 2023. v. 30, n. 14, p. 39273–39287. . Acesso em: 13 oct. 2024.
79. LUO, X. *et al.* Insights into the Ecotoxicity of Silver Nanoparticles Transferred from

- Escherichia coli* to *Caenorhabditis elegans*. **Scientific Reports**, 4 Nov. 2016. v. 6, n. 1. . Acesso em: 24 nov. 2024.
80. LUO, X *et al.* Effects of environmental factor fulvic acid on AgNPs food chain delivery and bioavailability. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, Aug. 2022. v. 258, p. 109369. . Acesso em: 24 nov. 2024.
 81. MA, L. *et al.* *Caenorhabditis elegans* as a model system for target identification and drug screening against neurodegenerative diseases. **European Journal of Pharmacology**, Jan. 2018. v. 819, p. 169–180. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 82. MACHTAKOVA, M.; THÉRIEN-AUBIN, H.; LANDFESTER, K. Polymer nano-systems for the encapsulation and delivery of active biomacromolecular therapeutic agents. **Chemical Society Reviews**, 2022a. v. 51, n. 1, p. 128–152. . Acesso em: 20 oct. 2024.
 83. MARKAKI, M.; TAVERNARAKIS, N. *Caenorhabditis elegans* as a model system for human diseases. **Current Opinion in Biotechnology**, Jun. 2020. v. 63, p. 118–125. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 84. MARTÍNEZ-LÓPEZ, A. L. *et al.* Zein-based nanocarriers for the oral delivery of insulin. In vivo evaluation in *Caenorhabditis elegans*. **Drug Delivery and Translational Research**, 29 Jan. 2021. v. 11, n. 2, p. 647–658. . Acesso em: 24 nov. 2024.
 85. MARTÍNEZ-LOPEZ, A. L. *et al.* In vivo testing of mucus-permeating nanoparticles for oral insulin delivery using *Caenorhabditis elegans* as a model under hyperglycemic conditions. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, Apr. 2021. v. 11, n. 4, p. 989–1002. . Acesso em: 24 nov. 2024.
 86. MAURER, L. L. *et al.* Intracellular trafficking pathways in silver nanoparticle uptake and toxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Nanotoxicology**, 11 Nov. 2015. v. 10, n. 7, p. 831–835. . Acesso em: 24 nov. 2024.
 87. MAZAYEN, Z. M. *et al.* Pharmaceutical nanotechnology: from the bench to the market. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, 15 Jan. 2022. v. 8, n. 1. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 88. MEYER, J. N. *et al.* Intracellular uptake and associated toxicity of silver nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. **Aquatic Toxicology**, Oct. 2010. v. 100, n. 2, p. 140–150. . Acesso em: 24 nov. 2024.
 89. MILLAN, Z. E. *et al.* Lyophilized Extract of *Hibiscus sabdariffa* L. Induces

- Cytotoxicity in Breast Cancer Cell Lines. Basel Switzerland: MDPI, 2020. V. 58, p. 22. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/iecn2020-07002>>. Acesso em: 13 oct. 2024.
90. NAJAH-MISSAOUI, W.; ARNOLD, R. D.; CUMMINGS, B. S. Safe Nanoparticles: Are We There Yet? **International Journal of Molecular Sciences**, 31 Dec. 2020. v. 22, n. 1, p. 385. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 91. PALLOTTI, F. *et al.* The Roles of Coenzyme Q in Disease: Direct and Indirect Involvement in Cellular Functions. **International Journal of Molecular Sciences**, 23 Dec. 2021. v. 23, n. 1, p. 128. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 92. PANGUA, C. *et al.* Mucus-penetrating and permeation enhancer albumin-based nanoparticles for oral delivery of macromolecules: Application to bevacizumab. **Drug Delivery and Translational Research**, 26 Oct. 2023. v. 14, n. 5, p. 1189–1205. . Acesso em: 24 nov. 2024.
 93. PEREYRA, C. E. *et al.* The diverse mechanisms and anticancer potential of naphthoquinones. **Cancer Cell International**, 2 Aug. 2019a. v. 19, n. 1. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 94. PESSOA, O. Cordiachromes from *Auxemma oncocalyx*. **Phytochemistry**, Dec. 1995. v. 40, n. 6, p. 1777–1786. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 95. PINTO REIS, C. *et al.* Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, Mar. 2006. v. 2, n. 1, p. 8–21. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 96. P.R. DANDAWATE *et al.* Perspectives on Medicinal Properties of Benzoquinone Compounds. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, 1 May. 2010. v. 10, n. 5, p. 436–454. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 97. PRATEEKSHA *et al.* Chrysophanol: A Natural Anthraquinone with Multifaceted Biotherapeutic Potential. **Biomolecules**, 18 Feb. 2019. v. 9, n. 2, p. 68. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 98. PRIESS, J. R.; SCHNABEL, H.; SCHNABEL, R. The glp-1 locus and cellular interactions in early *C. elegans* embryos. **Cell**, Nov. 1987. v. 51, n. 4, p. 601–611. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 99. PURUSHOTHAMAN, A. *et al.* Shemamruthaa, a Herbal Formulation Induces Apoptosis in Breast Cancer Cells and Inhibits Tumor Progression in Rats. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**, 8 Jul. 2016. v. 21, n. 4, p. NP1–NP10. . Acesso em: 13 oct. 2024.

100. RAMASAMY, M.; LEE, J.-H.; LEE, J. Development of gold nanoparticles coated with silica containing the antibiofilm drug cinnamaldehyde and their effects on pathogenic bacteria. **International Journal of Nanomedicine**, Apr. 2017. v. Volume 12, p. 2813–2828. . Acesso em: 24 nov. 2024.
101. REBOREDO, C. *et al.* Zein-Based Nanoparticles as Oral Carriers for Insulin Delivery. **Pharmaceutics**, 24 Dec. 2021. v. 14, n. 1, p. 39. . Acesso em: 24 nov. 2024.
102. RIZVI, S. A. A.; SALEH, A. M. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. **Saudi Pharmaceutical Journal**, Jan. 2018. v. 26, n. 1, p. 64–70. . Acesso em: 13 oct. 2024.
103. ROMANO, M. *et al.* Synthesis and Characterization of a Biocompatible Nanoplatfrom Based on Silica-Embedded SPIONs Functionalized with Polydopamine. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, 9 Dec. 2022. v. 9, n. 1, p. 303–317. . Acesso em: 24 nov. 2024.
104. RUDZIŃSKA, A. *et al.* Phytochemicals in Cancer Treatment and Cancer Prevention—Review on Epidemiological Data and Clinical Trials. **Nutrients**, 14 Apr. 2023. v. 15, n. 8, p. 1896. . Acesso em: 13 oct. 2024.
105. SADEGHNIA, H. R. *et al.* Viola tricolorInduces Apoptosis in Cancer Cells and Exhibits Antiangiogenic Activity on Chicken Chorioallantoic Membrane. **BioMed Research International**, 2014. v. 2014, p. 1–8. . Acesso em: 13 oct. 2024.
106. SANCHES MORAES, B. K. *et al.* Clozapine-Loaded Polysorbate-Coated Polymeric Nanocapsules: Physico-Chemical Characterization and Toxicity Evaluation in Caenorhabditis elegans Model. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 1 Feb. 2016. v. 16, n. 2, p. 1257–1264. . Acesso em: 24 nov. 2024.
107. SANTOS, O. A. L. DOS *et al.* Review—Perovskite/Spinel Based Graphene Derivatives Electrochemical and Biosensors. **Journal of The Electrochemical Society**, 1 Jun. 2021. v. 168, n. 6, p. 067506. . Acesso em: 13 oct. 2024.
108. SATPATHY, J.; VARMA, A.; SUDHAKAR, K. Nanoengineered protein-based biomaterials for nano drug delivery for cancer. [S.l.]: AIP Publishing, 2023. V. 2804, p. 020174. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1063/5.0164749>>. Acesso em: 13 oct. 2024.
109. SCHULTZ, C. L. *et al.* Influence of soil porewater properties on the fate and toxicity of silver nanoparticles toCaenorhabditis elegans. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 6 Aug. 2018. v. 37, n. 10, p. 2609–2618. . Acesso em: 24 nov. 2024.
110. SHAYE, D. D.; GREENWALD, I. OrthoList: A Compendium of C. elegans Genes

- with Human Orthologs. **PLoS ONE**, 25 May. 2011. v. 6, n. 5, p. e20085. . Acesso em: 13 oct. 2024.
111. SHEN, P. *et al.* Caenorhabditis elegans: A Convenient In Vivo Model for Assessing the Impact of Food Bioactive Compounds on Obesity, Aging, and Alzheimer's Disease. **Annual Review of Food Science and Technology**, 25 Mar. 2018. v. 9, n. 1, p. 1–22. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 112. SIEBEL, C.; LENDAHL, U. Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease. **Physiological Reviews**, 1 Oct. 2017. v. 97, n. 4, p. 1235–1294. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 113. SILVA, A. J. M. Da *et al.* Antitumoral, antileishmanial and antimalarial activity of pentacyclic 1,4-naphthoquinone derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2009. v. 20, n. 1, p. 176–182. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 114. SINGH, R.; GEETANJALI; CHAUHAN, S. M. S. 9,10-Anthraquinones and Other Biologically Active Compounds from the Genus Rubia. **Chemistry & Biodiversity**, Sep. 2004. v. 1, n. 9, p. 1241–1264. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 115. SULTANA, S. *et al.* Stability issues and approaches to stabilised nanoparticles based drug delivery system. **Journal of Drug Targeting**, 19 Mar. 2020. v. 28, n. 5, p. 468–486. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 116. TAKEDA, K. *et al.* Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 in Stress and Immune Response. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 1 Feb. 2008. v. 48, n. 1, p. 199–225. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 117. TSAI, M.-C. *et al.* Hibiscus Anthocyanins Extracts Induce Apoptosis by Activating AMP-Activated Protein Kinase in Human Colorectal Cancer Cells. **Nutrients**, 14 Sep. 2023. v. 15, n. 18, p. 3972. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 118. TSYUSKO, O. V. *et al.* Toxicogenomic Responses of the Model Organism Caenorhabditis elegans to Gold Nanoparticles. **Environmental Science & Technology**, 13 Mar. 2012. v. 46, n. 7, p. 4115–4124. . Acesso em: 24 nov. 2024.
 119. UMA MAHESWARI, R. T. *et al.* CD44 tagged hyaluronic acid - chitosan liposome carrier for the delivery of berberine and doxorubicin into lung cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, Dec. 2023. v. 253, p. 126599. . Acesso em: 24 nov. 2024.
 120. VANDERVOORT, J.; LUDWIG, A. Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study. **International Journal of Pharmaceutics**, May. 2002. v. 238, n. 1–2, p. 77–92. . Acesso em: 13 oct. 2024.

121. VELASQUES, K. *et al.* Co-nanoencapsulation of antimalarial drugs increases their in vitro efficacy against *Plasmodium falciparum* and decreases their toxicity to *Caenorhabditis elegans*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Jun. 2018. v. 118, p. 1–12. . Acesso em: 24 nov. 2024.
122. VIEIRA, Simone M. *et al.* A surface modification of clozapine-loaded nanocapsules improves their efficacy: A study of formulation development and biological assessment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Sep. 2016. v. 145, p. 748–756. . Acesso em: 13 oct. 2024.
123. WANDJI, Y. F. *et al.* Ethnobotanical survey on plants used in the treatment of infectious diseases in the Bamboutos division (Cameroon). **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, 1 Jan. 2022. v. 11, n. 1, p. 51–66. . Acesso em: 13 oct. 2024.
124. WANG, Dongpeng *et al.* Pharmacokinetics of Anthraquinones from Medicinal Plants. **Frontiers in Pharmacology**, 15 Apr. 2021. v. 12. . Acesso em: 13 oct. 2024.
125. WANG, Lei *et al.* Lipid Metabolism was Interfered by Phosphatidylcholine-Coated Magnetic Nanoparticles in *C. elegans* Exposed to 0.5 T Static Magnetic Field. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 1 May. 2017. v. 17, n. 5, p. 3172–3180. . Acesso em: 24 nov. 2024.
126. WANG, Yijun *et al.* The electrochemical reduction of 1,4-benzoquinone in 1-ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethane-sulfonyl)-imide, [C2mim][NTf2]: A voltammetric study of the comproportionation between benzoquinone and the benzoquinone dianion. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Oct. 2010. v. 648, n. 2, p. 134–142. . Acesso em: 13 oct. 2024.
127. WormBook. [s.d.] . Acesso em: 24 nov. 2024.
128. WU, Q. *et al.* Evaluation of Environmental Safety Concentrations of DMSA Coated Fe₂O₃-NPs Using Different Assay Systems in Nematode *Caenorhabditis elegans*. **PLoS ONE**, 17 Aug. 2012. v. 7, n. 8, p. e43729. . Acesso em: 24 nov. 2024.
129. WU, T. *et al.* <p>The NLRP3-Mediated Neuroinflammatory Responses to CdTe Quantum Dots and the Protection of ZnS Shell</p> **International Journal of Nanomedicine**, May. 2020. v. Volume 15, p. 3217–3233. . Acesso em: 24 nov. 2024.
130. XING, M. *et al.* Fucoidan from *Fucus vesiculosus* prevents the loss of dopaminergic neurons by alleviating mitochondrial dysfunction through targeting ATP5F1a. **Carbohydrate Polymers**, Mar. 2023. v. 303, p. 120470. . Acesso em: 24

- nov. 2024.
131. XU, W. *et al.* A T1, T2 magnetic resonance imaging (MRI)-fluorescent imaging (FI) by using ultrasmall mixed gadolinium–europium oxide nanoparticles. **New Journal of Chemistry**, 2012. v. 36, n. 11, p. 2361. . Acesso em: 24 nov. 2024.
 132. YANG, C.-Y. *et al.* Reinforcement learning strategies in cancer chemotherapy treatments: A review. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, Feb. 2023. v. 229, p. 107280. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 133. YANG, Xinyu *et al.* Silver Nanoparticle Behavior, Uptake, and Toxicity in *Caenorhabditis elegans*: Effects of Natural Organic Matter. **Environmental Science & Technology**, 10 Mar. 2014. v. 48, n. 6, p. 3486–3495. . Acesso em: 24 nov. 2024.
 134. YANG, Y.-F.; CHENG, Y.-H.; LIAO, C.-M. Nematode-based biomarkers as critical risk indicators on assessing the impact of silver nanoparticles on soil ecosystems. **Ecological Indicators**, Apr. 2017. v. 75, p. 340–351. . Acesso em: 24 nov. 2024.
 135. YU, H. *et al.* Opportunities and challenges of fucoidan for tumors therapy. **Carbohydrate Polymers**, Jan. 2024. v. 324, p. 121555. . Acesso em: 24 nov. 2024.
 136. YU, S.-M. *et al.* Bio-identity and fate of albumin-coated SPIONs evaluated in cells and by the *C. elegans* model. **Acta Biomaterialia**, Oct. 2016. v. 43, p. 348–357. . Acesso em: 24 nov. 2024.
 137. YUN-CHOI, H. S.; KIM, J. H.; TAKIDO, M. Potential Inhibitors of Platelet Aggregation from Plant Sources, V. Anthraquinones from Seeds of *Cassia obtusifolia* and Related Compounds. **Journal of Natural Products**, May. 1990. v. 53, n. 3, p. 630–633. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 138. YUSUF, A. *et al.* Nanoparticles as Drug Delivery Systems: A Review of the Implication of Nanoparticles' Physicochemical Properties on Responses in Biological Systems. **Polymers**, 23 Mar. 2023. v. 15, n. 7, p. 1596. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 139. ZHANG, J. *et al.* Fluorescence-based sorting of *Caenorhabditis elegans* via acoustofluidics. **Lab on a Chip**, 2020. v. 20, n. 10, p. 1729–1739. . Acesso em: 25 oct. 2024.
 140. ZHANG, Tao *et al.* Isoflurane impairs oogenesis through germ cell apoptosis in *C. elegans*. **Scientific Reports**, 14 Jul. 2021. v. 11, n. 1. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 141. ZHANG, W. *et al.* Neurobehavior and neuron damage following prolonged exposure of silver nanoparticles with/without polyvinylpyrrolidone coating in

- Caenorhabditis elegans. **Journal of Applied Toxicology**, 16 May. 2021. v. 41, n. 12, p. 2055–2067. . Acesso em: 24 nov. 2024.
142. ZHAO, Yunli *et al.* Translocation and neurotoxicity of CdTe quantum dots in RMEs motor neurons in nematode Caenorhabditis elegans. **Journal of Hazardous Materials**, Feb. 2015. v. 283, p. 480–489. . Acesso em: 24 nov. 2024.
 143. ZHENG, J; GREENWAY, F. L. Caenorhabditis elegans as a model for obesity research. **International Journal of Obesity**, 10 May. 2011. v. 36, n. 2, p. 186–194. . Acesso em: 13 oct. 2024.
 144. ZHENG, X. *et al.* Silica-coated bismuth sulfide nanorods as multimodal contrast agents for a non-invasive visualization of the gastrointestinal tract. **Nanoscale**, 2015. v. 7, n. 29, p. 12581–12591. . Acesso em: 24 nov. 2024.
 145. ZHOU, B. *et al.* Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, 24 Mar. 2022. v. 7, n. 1. . Acesso em: 24 nov. 2024.
 146. ZHOU, Y. *et al.* Fabrication of polymeric sorafenib coated chitosan and fucoidan nanoparticles: Investigation of anticancer activity and apoptosis in colorectal cancer cells. **Heliyon**, Jul. 2024. v. 10, n. 14, p. e34316. . Acesso em: 24 nov. 2024.
 147. ZOU, Yajuan *et al.* Size, polyglycerol grafting, and net surface charge of iron oxide nanoparticles determine their interaction and toxicity in Caenorhabditis elegans. **Chemosphere**, Jun. 2024a. v. 358, p. 142060. . Acesso em: 24 nov. 2024.
 148. ZOU, Yuxiu *et al.* Isotopic graphene–isolated-Au-nanocrystals with cellular Raman-silent signals for cancer cell pattern recognition. **Chemical Science**, 2018. v. 9, n. 10, p. 2842–2849. . Acesso em: 24 nov. 2024.