



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

DANIELLE ARAUJO AGARRAYUA DE SOUZA

**PROSPECÇÃO DE NANOCÁPSULAS PARA CARREAMENTO DE
CURCUMINA EM *Caenorhabditis elegans*: ESTRATÉGIA PARA MANEJO
DO PROCESSO INFLAMATÓRIO ASSOCIADO À COVID-19**

TESE DE DOUTORADO

URUGUAIANA

2023

DANIELLE ARAUJO AGARRAYUA DE SOUZA

**PROSPECÇÃO DE NANOCÁPSULAS PARA CARREAMENTO DE
CURCUMINA EM *Caenorhabditis elegans*: ESTRATÉGIA PARA MANEJO
DO PROCESSO INFLAMATÓRIO ASSOCIADO À COVID-19**

A Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Daiana Silva de Ávila

URUGUAIANA

2023

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

AA261pp Agarrayua, DANIELLE Araujo

PROSPECÇÃO DE NANOCÁPSULAS PARA CARREAMENTO DE CURCUMINA
EM *Caenorhabditis elegans*: ESTRATÉGIA PARA MANEJO DO PROCESSO
INFLAMATÓRIO ASSOCIADO À COVID-19 / DANIELLE Araujo Agarrayua.
121 p.

Tese (Doutorado)-- Universidade Federal do Pampa, DOUTORADO
EM BIOQUÍMICA, 2023.

"Orientação: Daiana Silva Ávila".

1. Nanotoxicidade. 2. Polímeros. 3. *C. elegans* . 4. COVID-
19. 5. Curcumina. I. Título.

DANIELLE ARAUJO AGARRAYUA DE SOUZA

**PROSPECÇÃO DE NANOCÁPSULAS PARA CARREAMENTO DE CURCUMINA
EM *Caenorhabditis elegans*: ESTRATÉGIA PARA MANEJO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO
ASSOCIADO À COVID-19**

Dissertação/Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Bioquímica.

Dissertação defendida e aprovada em: 21, julho de 2023.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Daiana Silva de Ávila

Orientador

UNIPAMPA

Prof. Dr. Marcel Henrique Marcondes Sari

UNICENTRO

Profa. Dra. Mariele Feiffer Charão

Feevale

Profa. Dra. Letícia Priscila Arantes

UEMG

Profa. Dra. Marina Prigol

UNIPAMPA



Assinado eletronicamente por DAIANA SILVA DE AVILA, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR, em 18/09/2023, às 20:05, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por MARINA PRIGOL, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR, em 18/09/2023, às 21:25, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por MARCEL HENRIQUE MARCONDES SARI, Usuário Externo, em 18/09/2023, às 22:40, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por LETICIA PRISCILLA ARANTES, Usuário Externo, em 19/09/2023, às 07:17, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por Mariele Feiffer Charão, Usuário Externo, em 19/09/2023, às 08:51, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1246305 e o código CRC 3188E9DF.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus pela minha família, pela minha vida e pelos meus sonhos.

Agradeço ao meu marido, Lucas Souza, por ser um pai incrível, por estar sempre ao meu lado, me incentivar e acreditar em mim.

Aos meus filhos, Pedro e Mariana, que são o meu sorriso constante e representam tudo para mim.

Aos meus pais, Juci e Raul, e irmãos pelo incentivo.

À Prof^a Dr^a Daiana Silva de Ávila, a qual tenho carinho e admiração, pela orientação, oportunidade, compreensão e paciência.

À Prof^a Dr^a Sandra Eliza Haas pela coorientação e por sempre ser muito atenciosa.

A todos os colegas do Grupo de Pesquisa em Bioquímica e Toxicologia em *Caernohabditis elegans* (GBToxCe), pela parceria, pelos momentos de risadas, cafés e principalmente por compartilhar conhecimento e ajuda para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a minha estagiária de iniciação científica, Paula Trevisan, pela amizade e ajuda na parte experimental deste trabalho.

Agradeço a Pós doutoranda Natalia Silva Jardim pela amizade e ajuda na parte experimental e estatística dos resultados.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos com a qual foi possível dedicação exclusiva.

À UNIPAMPA e ao programa de pós-graduação pela oportunidade.

Enfim, obrigada a todos que de alguma maneira auxiliaram na realização deste trabalho.

RESUMO

A pandemia COVID-19 resultou em um aumento sem precedentes de doenças, mortes, perturbações econômicas e distúrbios sociais em todo o mundo. Não haviam planos estratégicos prontos para serem aplicados a uma pandemia de coronavírus. Embora muitos medicamentos estejam aprovados, sua eficácia é frequentemente limitada pois essas drogas não são específicas para esse novo vírus. Nesse contexto, compostos naturais como a curcumina têm mostrado eficácia na progressão de doenças devido a seu potencial terapêutico. Apesar dos inúmeros efeitos benéficos da curcumina, ela apresenta baixa solubilidade e biodisponibilidade, instabilidade nos fluidos corporais e metabolismo rápido. Uma das estratégias promissoras para otimizar a eficácia de muitos agentes terapêuticos são os sistemas carreadores de fármacos nanoparticulados. No entanto, a segurança desses sistemas é um aspecto a ser entendido, principalmente em sistemas *in vivo*. Neste sentido, primeiramente investigamos a segurança de quatro diferentes sistemas nanoparticulados utilizando o *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) como modelo experimental. O objetivo do estudo foi avaliar desfechos toxicológicos, como sobrevivência, reprodução, desenvolvimento e danos oxidativos em *C. elegans* expostos de maneira aguda (30 minutos) ou crônica (48h) a nanocápsulas (NC) compostas por diferentes componentes: polisorbato 80 (P80), polietilenoglicol (PEG), Eudragit® (EUD) e quitosana (CS). Nossos resultados iniciais indicaram que estas formulações apresentam um grau de toxicidade neste organismo, uma vez que detectamos um aumento na mortalidade de vermes expostos de forma aguda a nanocápsulas compostas por PEG e CS nas concentrações mais altas e aumento na mortalidade de vermes expostos na forma crônica as nanocápsulas com os componentes P80, PEG e CS. Os níveis de expressão da enzima antioxidante superóxido dismutase foram determinados e nossos resultados mostraram um aumento da expressão apenas na nanocápsula com o componente P80 na maior concentração. Notavelmente, nossos resultados demonstraram que nanocápsulas com o componente EUD foram mais seguras e assim utilizadas para desenvolver nanocápsulas carregadas com curcumina (NCCM), a fim de avaliar seus efeitos toxicológicos, através dos parâmetros de

sobrevivência, reprodução e desenvolvimento, bem como seus efeitos protetores sobre a lesão inflamatória induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em *C. elegans*. As NCCM não apresentou toxicidade para os vermes e protegeu os animais da lesão induzida por LPS, resgatando fenótipos comportamentais, como os movimentos de reversão e ômega turn, e diminuindo a formação de corpos apoptóticos na linhagem germinativa. Essas nanoformulações mostraram-se seguras e promissoras, sugerindo que estas nanocápsulas podem se tornar adjuvantes promissores no tratamento de doenças inflamatórias como a tempestade de citocinas que ocorre na COVID-19.

Palavras-chave: Nanotoxicidade, Polímeros, *C. elegans*, COVID-19, curcumina

**PROSPECTION OF NANOCAPSULES FOR CARRYING CURCUMIN IN
Caenorhabditis elegans: A STRATEGY FOR MANAGING THE
INFLAMMATORY PROCESS ASSOCIATED WITH COVID-19**

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic has resulted in an unprecedented increase in illness, death, economic disruption and social unrest around the world. There were no strategic plans ready to apply to a coronavirus pandemic. Although many drugs are approved, their effectiveness is often limited because these drugs are not specific for this new virus. In this context, natural compounds such as curcumin have shown effectiveness in the progression of diseases due of their therapeutic potential. Despite the numerous beneficial effects of curcumin, it has low solubility and bioavailability, instability in body fluids and rapid metabolism. One of the promising strategies to optimize the effectiveness of many therapeutic agents are nanoparticulate drug delivery systems. However, the security of these systems is an aspect to be understood, especially *in vivo* systems. In this sense, we first investigated the safety of four different nanoparticulate systems using *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) as an alternative model. The objective of this study was to evaluate toxicological outcomes, such survival, reproduction, development and oxidative damage in *C. elegans* acutely (30 minutes) or chronically (48 h) exposed to nanocapsules (NC) composed of different components: polysorbate 80 (P80), polyethylene glycol (PEG), Eudragit® (EUD) and chitosan (CS). Our initial results indicated that these formulations present a degree of toxicity in this organism; we detected an increase in the mortality of worms exposed acutely to nanocapsules composed of PEG and CS at the highest concentrations and an increase in mortality of worms chronically exposed to P80, PEG and CS. The expression levels of antioxidant superoxide dismutase were determined and our results showed an increased expression only following NCP80 treatment at the highest concentration. Notably, our results demonstrated that nanocapsules with the EUD component were safer for *C. elegans* and thus, used to develop curcumin-loaded nanocapsules (NCCM) and to evaluate their toxicological effects, through the parameters of survival, reproduction and development, as well as their protective effects of lipopolysaccharide (LPS-

induced inflammatory injury in *C. elegans*. NCCM showed no toxicity to the worms and protected them from LPS-induced injury, rescuing behavioral phenotypes, such as reversal and omega turn movements, decreasing apoptotic effects. These nanoformulations have shown to be safe and promising, improving the bioavailability of curcumin and becoming promising adjuvants in the treatment of inflammatory diseases such as the cytokine storm in COVID-19.

Keywords: Nanotoxicity, Polymers, Drug repositioning, COVID-19, curcumin

LISTA DE FIGURAS

Revisão bibliográfica

- Figura 1: Características estruturais do coronavírus SARS-CoV-2 e suas principais proteínas estruturais (Fonte: <https://www.shutterstock.com/pt/image-vector/covid19-morphology-virus-structures-labels-spike-1682974321>). 21
- Figura 2: Entrada e replicação de SARS-CoV-2 em célula hospedeira (Fonte: (Kumar, Nyodu et al. 2020)). 23
- Figura 3: Estrutura química da curcumina. Fonte:<https://www.saberatualizado.com.br/2016/04/a-curcumina-possui-poder-medicinal.html> 29
- Figura 4: Inserção da nanoescala em comparação com as dimensões atômicas das moléculas pequenas como a da água, passando pelas macromoléculas biológicas como proteínas e estruturas virais até a escala micrométrica das células (Fonte: (Apolinário, Salata et al. 2)). 33
- Figura 5: Estrutura química de poli (ϵ -caprolactona) (Fonte: (Mazzarino 2013)). 38
- Figura 6: Estrutura química de Polisorbato 80 (Fonte: (Souza, Ferraz-Freitas et al. 2016)). 39
- Figura 7: Estrutura química de polietilenoglicol (Fonte: (Ribeiro, Siqueira et al.)). 43
- Figura 8: Estrutura química da unidade monomérica da quitosana (Fonte: (Santos, Moura et al. 2003)). 47
- Figura 9: Estrutura química de vários tipos de Eudragit® (Fonte: (Vandamme, Lenourry et al. 2002)). 52

Figura 10: Anatomia e morfologia de *Caenorhabditis elegans*: Na parte superior imagem em microscopia de um exemplar adulto hermafrodita com dois ovos postos. Abaixo, um esquema representativo da anatomia de *C. elegans* (Fonte: <https://www.wormatlas.org/>). 58

Artigo Científico I

Figure 1: Representative scheme of the nanocapsules with the different coatings.

Figure 2: Survival rate after exposure to different concentrations of nanoparticles with different polymers: A) NCP80; B) NCPEG, C) NCEUD and D) NCCS n=3. * indicates statistical significance in comparison with control group (untreated = 100%) *p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Figure 3: Brood size. A) NCP80; B) NCPEG, C) NCEUD and D) NCCS. The viability of the eggs was investigated and only worms exposed to the higher concentrations of nanoparticle with chitosan polymer showed a significant reduction in the brood size. n=3. * indicates statistical significance in comparison with control group (untreated = 100%) *p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Figure 4. Body length. A) NCP80; B) NCPEG, C) NCEUD and D) NCCS. n=3. * indicates statistical significance in comparison with control group (untreated = 100%) *p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

Figure 5: Survival rate after chronic exposure to different concentrations of nanoparticles with different polymers: A) NCP80; B) NCPEG, C) NCEUD and D) NCCS. n=3. * indicates statistical significance in comparison with control group (untreated = 100%) *p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Figure 6: Brood size. A) NCP80; B) NCPEG, C) NCEUD and D) NCCS. The viability of the eggs in chronic exposure was investigated and worms exposed to the higher concentrations of nanoparticle with chitosan polymer and Polyethylene Glycol showed a significant reduction in the brood size. n=3. * indicates statistical significance in comparison with control group (untreated = 100%) *p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Figure 7: Body length. A) NCP80; B) NCPEG, C) NCEUD and D) NCCS. Only worms exposed to nanoparticles with the chitosan polymer in chronic exposure

showed a reduction in body length. n=3. * indicates statistical significance in comparison with control group (untreated = 100%) *p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Figure 8: Superoxide dismutase (SOD-3) expression in the in vivo experimental model of *C. elegans* subjected to treatment with NCs. (A) Quantification of SOD-3:GFP in treated nematodes with NCP80; (B) Images representative of the expression of SOD-3:GFP in treated nematode with NCP8; (C) Quantification of SOD-3:GFP in treated nematodes with NCPEG; (D) Images representative of the expression of SOD-3:GFP in treated nematode with NCPEG; (E) Quantification of SOD-3:GFP in treated nematodes with NCEUD; (F) Images representative of the expression of SOD-3:GFP in treated nematode with NCEUD; (G) Quantification of SOD-3:GFP in treated nematodes with NCCS; (H) Images representative of the expression of SOD-3:GFP in treated nematode with NCCS.

Manuscrito Científico I

Figure 1. Survival rate after NCCM exposure in *C. elegans*. (A) Worms acute exposed to different concentrations of the NCCM and (B) worms chronic exposed to different concentrations of NCCN. There is no significant mortality with the NCCM n=3 independent experiments. Values are expressed as mean \pm S.E.M. Data were analyzed by one-way ANOVA.

Figure 2. Brood size after NCCM exposure in *C. elegans*. (A) Worms acute exposed to different concentrations of the NCCM and (B) worms chronic exposed to different concentrations of NCCN. There is no significant mortality with the NCCM n=3 independent experiments. Values are expressed as mean \pm S.E.M. Data were analyzed by one-way ANOVA.

Figure 3. Body length after NCCM exposure in *C. elegans*. (A) Worms acute exposed to different concentrations of the NCCM and (B) worms chronic exposed to different concentrations of NCCN. There is no significant mortality with the NCCM n=3 independent experiments. Values are expressed as mean \pm S.E.M. Data were analyzed by one-way ANOVA.

Figure 4. Effect of NCCM on (A) survival, (B) reversals and (C) omega turns behavior in *C. elegans* induced by LPS. Values are expressed as mean \pm S.E.M. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test. n=5 independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ denote the significance levels compared to control group. # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ denotes the significance levels compared to LPS-control group.

Figure 5. Effect of NCCM on number of apoptotic corpses in *C. elegans* induced by LPS. Values are expressed as mean \pm S.E.M. Data were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test. n=5 independent experiments. * $p < 0.05$ denotes the significance levels compared to control group. # $p < 0.05$ and ### $p < 0.001$ denote the significance levels compared to LPS-control group.

Figure S1. Survival rate following free curcumin exposure in *C. elegans*. worms chronically exposed to different concentrations of curcumin. There is no significant mortality with the curcumin n=3 independent experiments. Values are expressed as mean \pm S.E.M. Data were analyzed by one-way ANOVA.

LISTA DE TABELAS

Artigo científico I

Table 1: Relationship between volume and concentration of particles.mL⁻¹

Table 2. Physicochemical characterization of different NCs-coatings and stability

Manuscrito Científico I

Table S1. Physicochemical characterization of NCCM.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE 2: Enzima Conversora de Angiotensina 2

AP1: Proteína Ativadora 1

ATP: Adenosina Trifosfato

BDMC: Bisdimetoxicurcumina

COVID-19: Doença do Coronavírus 19

CS: Quitosana

DA: Doença de Alzheimer

DCS: Células Dendríticas

DMC: Dimetoxicurcumina

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

EUA: Estados Unidos da América

EUD: Eudragit®

FDA: Food and Drug Administration

GFP: Green Fluorescence Protein

IL: Interleucina

iNOS: Síntese de Óxido Nítrico

JAK/STAT: Janus quinase/transdutor de transcrição

LPS: Lipopolissacarídeo

MAPK: Proteína Quinase Ativada por Mitógeno

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NC: Nanocápsulas

NCCM: Nanocápsulas de Curcumina

NCCS: Nanocápsulas com Quitosana

NCEUD: Nanocápsulas com Eudragit®

NCPEG: Nanocápsulas com Polietilenoglicol

NCP80: Nanocápsulas com Polisorbato 80

NF-κB: Fator Nuclear Kappa Beta

NLRP3: Inflamassoma

NP: Nanopartículas

OMS: Organização Mundial da Saúde

P80: Polisorbato 80

PCL: Poli- ϵ -caprolactona

PCR: Proteína C Reativa

PEG: Polietilenoglicol

PGP: Glicoproteína G

RNA: Ácido Ribonucleico

REGIC: Reticulo Endoplasmático-Golgi

SARS-CoV-2: Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave

SOD-3: Superóxido Dismutase 3

TLRs: Receptores Toll-like

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral α

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	199
2.1 COVID-19	199
2.2 Estratégias para o tratamento da COVID-19	24
2.2.1 Reposicionamento de fármacos	24
2.2.2 Compostos naturais	27
2.2.3 Curcumina	28
2.3 Nanotecnologia	332
2.3.1 Polímeros	36
2.3.1.1 Poli (épsilon-caprolaona)	377
2.3.1.2 Polisorbato 80	39
2.3.1.3 Polietilenoglicol	42
2.3.1.4 Quitosana	46
2.3.1.5 Eudragit®	5151
2.3.1.6 Nanopartículas de curcumina	55
2.4 Caenorhabditis elegans	566
3 JUSTIFICATIVA	63
4 OBJETIVOS	644
4.1 Objetivo geral	644
4.2 Objetivos específicos	644
5 ARTIGO CIENTÍFICO 1	666
1. Introduction	Erro! Indicador não definido.
2. Materials and methods	67
3. Results and discussion	69
4. Conclusion	72
Declaration of competing interest	75
Data availability	75

Acknowledgments.....	75
References	75
6 MANUSCRITO CIENTÍFICO	77
1 Introduction.....	79
2 Materials and Methods.....	80
3 Results and Discussion.....	84
4 Conclusion.....	90
5 References	92
7 DISCUSSÃO GERAL	96
8 CONCLUSÃO.....	99
9 PERSPECTIVAS.....	100
10 REFERÊNCIAS.....	101

1 INTRODUÇÃO

Desde o início do atual surto de SARS-CoV-2, vírus causador da COVID-19, houve uma grande preocupação diante de uma doença que se espalhou rapidamente em várias regiões do mundo, com diferentes impactos. Não existiam planos estratégicos prontos para serem aplicados a uma pandemia de coronavírus. Recomendações da OMS, do Ministério da Saúde do Brasil (Organization 2020), do Centers for Disease Control and Prevention (CDC, Estados Unidos) (Cao, Li et al. 2020), e outras organizações nacionais e internacionais têm sugerido a aplicação de planos de contingência. Esses planos de contingência preveem ações diferentes de acordo com a gravidade da pandemia. Portanto, uma potencial estratégia seria o reposicionamento de medicamentos que foram aprovados, ou estão em desenvolvimento, para outras condições, o que pode ser beneficiado pelas informações detalhadas sobre a farmacologia e toxicologia humanas já conhecidas (Harrison 2020); no entanto, esses medicamentos não são específicos para o vírus da COVID-19. Além disso, a fisiopatologia da COVID-19 é altamente heterogênea e a maneira como o SARS-CoV-2 modula os diferentes sistemas no hospedeiro permanece não identificada, apesar das descobertas recentes. Essa resposta complexa e multifatorial requer uma abordagem terapêutica abrangente, permitindo a integração e o refinamento nas respostas terapêuticas de um determinado composto único com potenciais de ação (Rattis, Ramos et al. 2021).

Uma tendência recente é o consumo de fitoterápicos contendo certos compostos ativos que possuem atividades quimioterapêuticas, antimicrobianas, antivirais, e anti-inflamatória como a curcumina. Presume-se que compostos a base de plantas tenham a capacidade de modular a resposta imune e, portanto, acredita-se que tenham efeitos benéficos na prevenção ou tratamento da COVID-19 (Kocaadam and Şanlıer 2017, Soni, Mehta et al. 2020).

A curcumina, o ingrediente bioativo da *Curcuma longa* (açafrão) tem uma ampla gama de efeitos terapêuticos. De acordo com diferentes estudos, a curcumina pode afetar o sistema imunológico inibindo a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em macrófagos, regulando positivamente a

expressão de CD80 e CD86 em células dendríticas, modulando a proliferação de células T, regulando a secreção de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão e, finalmente, regulando o padrão de respostas imune (Bose, Panda et al. 2015). Considerando que a inflamação é o epicentro da etiopatogenia da COVID-19, hipotetiza-se que a curcumina pode ser candidata na terapia contra a doença por modular respostas inflamatórias, atenuando os sintomas da doença (Trivedi, Mondal et al. 2017, Afolayan, Erinwusi et al. 2018).

Apesar das notáveis atividades farmacológicas da curcumina, a sua baixa solubilidade aquosa, má absorção, baixa biodisponibilidade, causando concentrações muito baixas ou indetectáveis no sangue e nos tecidos extra intestinais, provavelmente devido à má absorção, metabolismo rápido, instabilidade química e rápida eliminação sistêmica têm dificultado a aplicação clínica da curcumina (Anand, Kunnumakkara et al. 2007, Toden and Goel 2017).

Nos últimos anos, o sistema de administração de drogas baseado em nanotecnologia melhorou efetivamente a biodisponibilidade da curcumina (Ipar, Dsouza et al. 2019). De acordo com a literatura, sistemas nanotecnológicos que empregam nanocarregadores como lipossomas, nanopartículas poliméricas e lipídicas, nanopartículas metálicas e micelas oferecem vantagens em comparação aos atuais sistemas terapêuticos convencionais, como por exemplo a liberação controlada de fármaco, área de superfície aprimorada, estabilização e liberação dos componentes ativos diretamente ao alvo (Saravanan, Mostafavi et al. 2021). Espera-se que o tratamento baseado nesses nanocarregadores, bem como o desenvolvimento de vacinas, melhorem a eficácia, as estratégias de imunização e a distribuição direcionada para promover respostas imunológicas para coronavírus (Tharayil, Rajakumari et al. 2021).

Apesar dos inúmeros benefícios ressaltados, a segurança dos sistemas nanoparticulados é um aspecto a ser compreendido. A redução do tamanho dos materiais leva ao surgimento de novas propriedades físicas e químicas. Associada a elevada área superficial das partículas na escala nano, esses sistemas podem apresentar interações significativas com os sistemas vivos, cujas repercussões devem ser avaliadas (Albrecht, Evans et al. 2006). Nesse contexto, surge a nanotoxicologia, com uma nova área que busca avaliar os efeitos de nanomateriais em organismos vivos. O nematoide *Caenorhabditis elegans* tem se mostrado um modelo bastante útil para avaliar a toxicidade de

drogas, surgindo como uma alternativa às metodologias envolvendo mamíferos. Outras vantagens de se utilizar *C. elegans* incluem a transparência do corpo, o reduzido tamanho (aproximadamente 1mm quando adulto), o curto tempo de vida (aproximadamente 28 dias), a alta reprodutibilidade (um hermafrodita é capaz de liberar até 300 ovos ao longo de sua vida), a alta homologia com o genoma humano (aproximadamente 70% dos genes são homólogos ao humano) e a fácil manipulação genética (Hunt 2017). Estudos recentes aplicam este modelo para a avaliação toxicológica de sistemas nanotecnológicos (Charão, Souto et al. 2015, Charão, Goethel et al. 2019). O desenvolvimento da nanotecnologia tem crescido de maneira significativa nos últimos anos, entretanto a avaliação da segurança desses sistemas ainda é muito incipiente (Piechulek and von Mikecz 2018). Por este motivo, a presente tese avaliou a segurança de diferentes nanoformulações poliméricas utilizando um modelo alternativo de alto rendimento a fim de escolher o melhor nanossistema para carrear a curcumina como uma proposta [segura e eficaz no tratamento de doenças inflamatórias como a COVID – 19](#).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A COVID-19

A doença por coronavírus 2019 (COVID-19) começou como uma epidemia em Wuhan, China, em 2019 e, desde então, se tornou responsável por muitas mortes em todo o mundo. Pesquisadores na China identificaram e sequenciaram o vírus responsável pela COVID-19, sendo denominado coronavírus de síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) (Asselah, Durantel et al. 2021, Bourguiba, Delplanque et al. 2021).

Após os estudos iniciais em 2020, foi descrito que a doença é mais do que uma patologia respiratória, mas sim uma endotelite, afetando assim diversos órgãos (Varga, Flammer et al. 2020). A infecção por SARS-CoV-2 resulta em febre, tosse seca, fadiga, dor muscular, dor de cabeça, diarreia, dispneia e hemoptise desenvolvida posteriormente à infecção (Park 2020). Os sintomas geralmente aparecem 5,2 dias após a infecção pelo vírus (Li, Guan et al. 2020). Embora 50-75 % dos pacientes com COVID-19 permaneçam assintomáticos, 14 % dos indivíduos infectados apresentam sintomas graves que requerem hospitalização e oxigenoterapia, enquanto 5 % requerem cuidados intensivos. A duração mediana do início dos sintomas até a admissão na unidade de terapia intensiva é de aproximadamente 10 dias, enquanto a duração entre o início dos sintomas e a morte varia de 2 a 8 semanas (Li, Guan et al. 2020, Zhou, Yu et al. 2020).

Os achados laboratoriais incluem níveis elevados de lactato desidrogenase, ferritina, D-dímero e proteína C-reativa, os quais indicam processo inflamatório e aumento na taxa de coagulação (Chilimuri, Sun et al. 2020, Lin, Bookman et al. 2020). Além disso, embora as contagens de leucócitos possam variar, a leucopenia e a linfopenia têm sido mais comumente observadas em indivíduos infectados por SARS-CoV-2 (Liu, Zhang et al. 2020). Os achados de radiografia de tórax e tomografia computadorizada são diversas e inespecíficas, comumente apresentando-se como múltiplas lesões de opacidade

em vidro fosco, sombreamento irregular bilateral ou sombreamento irregular local (Ippolito, Maino et al. 2020).

Os coronavírus são vírus de RNAs de fita simples positivos, envelopados, com o maior genoma de RNA viral já conhecido, variando de 26 a 32 quilobases de comprimento (Weiss and Leibowitz 2011, Velavan and Meyer 2020). São vírions esféricos com uma concha central e uma superfície que se assemelha a uma coroa solar com base em suas projeções de proteínas na superfície (Velavan and Meyer 2020). Existem quatro subfamílias principais; alfa, beta, gama e delta coronavírus. Alfa e beta – coronavírus se originam de mamíferos, principalmente morcegos, e acredita-se que causem doenças mais graves e fatais em humanos, enquanto os vírus gama e delta se originam principalmente de pássaros e porcos e parecem causar doenças assintomáticas ou leves em humanos (Ergoren, Tuncel et al. 2022) .

O SARS-CoV-2 pertence ao grupo dos beta-coronavírus, que também inclui o MERS-CoV e o SARS-CoV. Este último compartilha 75 – 80 % de seu genoma viral com o SARS-CoV-2 (Perlman 2020, Velavan and Meyer 2020). Os beta-coronavírus têm três proteínas de envelope importantes: proteína Spike (S), proteína de membrana (M) e proteína de envelope (E), que estão representadas na Figura 1. A proteína S medeia a ligação viral ao receptor da membrana celular, a fusão da membrana e, finalmente, a entrada do vírus na célula hospedeira. A proteína M, a proteína de membrana mais abundante, juntamente com a proteína E são responsáveis pela estrutura de membrana do coronavírus. Outro componente do beta-coronavírus é a proteína N, que é componente proteico do nucleocapsídeo helicoidal que inclui o RNA do genoma (Masters 2006).

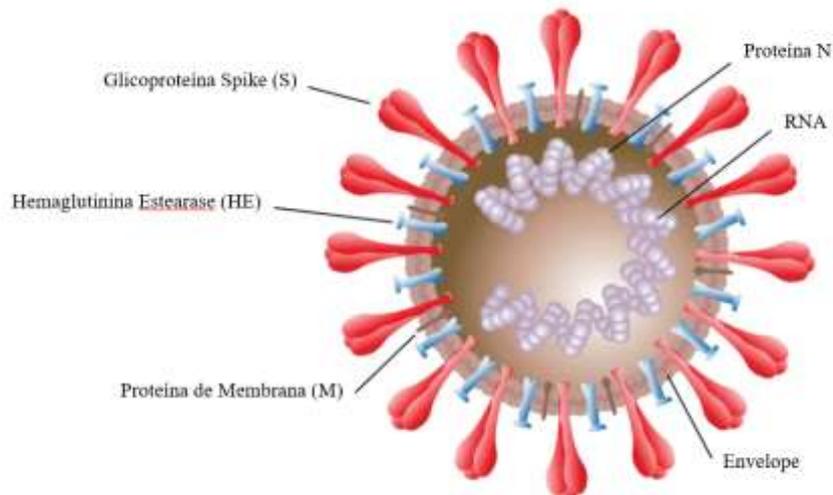


Figura 1: Características estruturais do coronavírus SARS-CoV-2 e suas principais proteínas estruturais (Fonte: <https://www.shutterstock.com/pt/image-vector/covid19-morphology-virus-structures-labels-spike-1682974321>).

De acordo com as evidências atuais, a Organização Mundial da Saúde (OMS) relata que a transmissão do SARS-CoV-2 ocorre por meio de gotículas respiratórias e vias de contato. A transmissão por gotículas ocorre por contato direto quando uma pessoa é exposta a gotículas respiratórias infecciosas ao estar a um metro ou menos de distância de alguém com sintomas respiratórios, incluindo tosse e espirros. Estar nesta distância coloca o indivíduo em risco de ter suas mucosas, incluindo boca, nariz e olhos, expostas às gotículas. O risco de transmissão por contato indireto é muito baixo, mas também pode ocorrer por meio de fômites em superfícies no ambiente próximo à pessoa infectada. A transmissão aérea pode ser possível quando procedimentos geradores de aerossol são realizados, incluindo intubação endotraqueal, ressuscitação cardiopulmonar, administração de tratamentos nebulizados e outros (Organization 2020).

O SARS-CoV-2 usa a proteína Spike (S), figura 2, e se liga aos receptores da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) que são encontrados na superfície de muitas células humanas, mais abundantemente expressa nas células alveolares do tipo II, enterócitos, células endoteliais, células musculares lisas, neurônios corticais e células gliais, permitindo assim a entrada do vírus. A proteína S do coronavírus é submetida a clivagens proteolíticas por proteases do hospedeiro (ou seja, tripsinas e furinas), em dois

locais localizados na fronteira S2 (sítio S2') para liberação do peptídeo de fusão. Este evento irá desencadear a ativação do mecanismo de fusão da membrana. A pesquisa de anticorpos pode encontrar suporte no direcionamento molecular que pode utilizar a informação estrutural (sequencia aa) da região de ligação que é encontrada no receptor da enzima de ACE2.

Desta forma, este protocolo poderia definir um tratamento para bloquear a entrada de vírus (Simmons, Gosalia et al. 2005, Kabbani and Olds 2020). O SARS-CoV-2 entra nas células hospedeiras alvo através de fusão ou endocitose (Li, Guan et al. 2020). A entrada do vírus na célula e a liberação do endossoma são seguidas pela remoção do vírus e liberação do RNA viral no citoplasma, onde é submetido à tradução. Os produtos de tradução incluem as poliproteínas replicase pp1a e pp1ab que sofrem clivagem adicional em proteínas menores, incluindo RNA polimerase dependente de RNA, helicase e proteínas não estruturais nsp3, nsp4 e nsp6. Durante a tradução, o deslocamento do quadro ribossômico gera frações genômicas e subgenômicas por transcrição descontínua. O complexo de replicação-transcrição do coronavírus é então ancorado à membrana intracelular do retículo endoplasmático por nsp3, nsp4 e nsp6 para formar vesículas de membrana dupla. A polimerase de RNA dependente de RNA e a helicase, então, conduzem a síntese de RNA subgenômico a partir do qual as proteínas estruturais e acessórias são produzidas, incluindo as proteínas S, M e E, que são inseridas no retículo endoplasmático e então transportadas para o compartimento intermediário do retículo endoplasmático-Golgi (REGIC). Em contraste, a proteína N se liga ao RNA genômico viral no citoplasma para formar o nucleocapsídeo. Os vírions são montados no REGIC e liberados em vesículas da célula por exocitose, de modo que podem infectar outras células. Com isso o estresse da produção viral no retículo endoplasmático acaba levando à morte celular (Masters 2006, Saxena 2020).

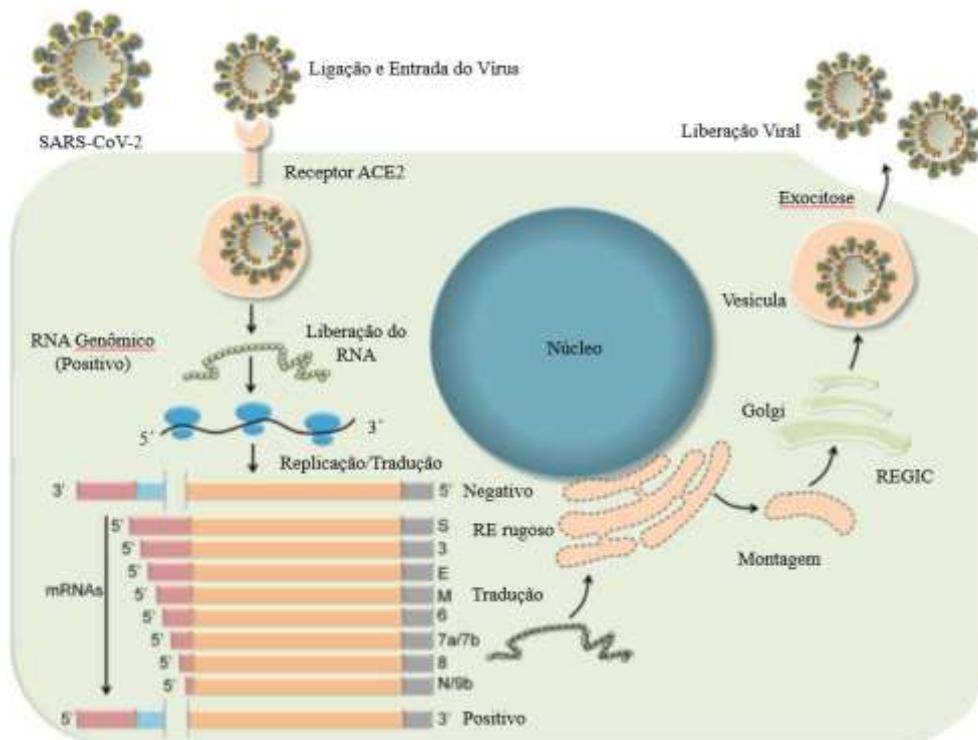


Figura 2: Entrada e replicação de SARS-CoV-2 em célula hospedeira (Fonte: (Kumar, Nyodu et al. 2020)).

Os mecanismos por trás da mortalidade de pacientes com COVID-19 ainda não são completamente compreendidos. A tempestade de citocinas inflamatórias e hipercoagulabilidade são dois importantes mecanismos fisiopatológicos relacionados aos principais desfechos da COVID-19. O fenômeno de tempestade de citocinas é observado em muitas doenças infecciosas e não infecciosas. Representa uma liberação excessiva de citocinas inflamatórias como fator de necrose tumoral- alfa, interleucina-1, interleucina-6 e interleucina-10, os quais são encontrados em pacientes com COVID-19 grave (Zhang, Zhao et al. 2020). Em particular, foi demonstrado que um nível elevado de interleucina-6 (IL-6) pode estar associado a prognóstico ruim em pacientes com COVID-19 (Shi, Wang et al. 2020). A IL-6 liga-se aos seus receptores transmembrana, o que resulta na ativação da resposta inflamatória potencialmente elevada. Os níveis de IL-6 mostram ser ~2,9 vezes maiores em pacientes com doença grave, principalmente aqueles que requerem internação em UTI, em comparação com aqueles com doenças leves, sendo níveis mais elevados associados a uma maior incidência de morte (Coomes and Haghbayan 2020, Zhang, Wu et al. 2020). Apesar da gravidade das complicações da doença

serem diferentes entre os indivíduos, não há ainda medicamento eficaz para o tratamento da infecção pelo SARS-CoV-2. Enquanto estudos de novas moléculas estão sendo realizados, algumas estratégias utilizadas são o reposicionamento de fármacos e o uso de compostos naturais, com amplo potencial terapêutico.

2.2 Estratégias para o tratamento da COVID -19

2.2.1 Reposicionamento de fármacos

Atualmente, o reposicionamento de medicamentos já aprovados para uso em humanos é uma ferramenta útil na busca de novas opções terapêuticas, principalmente na atual crise global (Baron, Devaux et al. 2020). Assim, esse método, também conhecido como redirecionamento, reaproveitamento e reperfilamento (Serafin and Hörner 2018, Foletto, Serafin et al. 2020), surge como uma possibilidade efetiva de geração de novos tratamentos contra COVID-19. O reposicionamento é definido como um novo uso de um medicamento, além de sua (s) indicação (ões) original (is), e é uma opção para a identificação rápida de novos agentes terapêuticos. A disponibilidade de informações relacionadas a medicamentos, como farmacocinética, farmacodinâmica e toxicidade é uma vantagem importante nos esforços de pesquisa para encontrar rapidamente um tratamento eficaz para o coronavírus (Zheng, Sun et al. 2018).

O reaproveitamento de medicamentos segue principalmente dois critérios. Um deles é que uma única droga interage com múltiplos alvos, o que abre caminho para a busca de novos locais de ação para o composto conhecido (Paolini, Shapland et al. 2006, Koch, Hamacher et al. 2014). O outro conceito é que os alvos associados a uma doença são frequentemente relevantes para uma série de processos biológicos de patogênese (Piro 2012, Hodos, Kidd et al. 2016), o que abre caminho para a designação de uma nova indicação para o alvo conhecido. Teoricamente, um medicamento que atua nesses elementos comuns pode, em princípio, ser útil para diversos transtornos.

Em termos gerais, existem três tipos de abordagens amplamente utilizadas no reposicionamento de medicamentos: abordagens computacionais, abordagens experimentais biológicas e abordagens mistas. Dados como expressão gênica, interação medicamentos-alvo, redes de proteína, registro eletrônico de saúde, relatórios de ensaios clínicos e relatórios de eventos

adversos de medicamentos tornaram-se acessíveis em formulários padronizados. O repositório de conhecimento e dados ômicos disponíveis na pesquisa farmacêutica leva ao surgimento de alguns métodos computacionais que são novos e estimulantes no campo do reposicionamento de medicamentos. Esses métodos computacionais são capazes de fazer uma integração de alto nível de todo o conhecimento e dados e ajudar na compreensão das novas vias de sinalização e gerar novos insights sobre os mecanismos de drogas, efeitos colaterais e interações que aceleram ainda mais a descoberta de drogas. Um estudo recente apresentou farmacologia de sistemas baseados em rede integrativa, metodologia que quantifica a interação entre o interatoma coronavírus-célula humana e os alvos de drogas na rede de interação proteína humana que ajudam na identificação rápida de drogas reutilizáveis contra SARS-CoV-2. Um estudo usando este tipo de abordagem foi capaz de identificar 30 potenciais drogas reposicionáveis contra COVID-19 (Zhou, Hou et al. 2020, Li, Yu et al. 2021).

Como exemplos de reposicionamento, dentre os medicamentos antivirais o remdesivir ganhou reconhecimento suficiente por sua capacidade de conter e gerenciar a carga viral e foi aprovado pelo FDA para o tratamento de pacientes com COVID-19 com pneumonia concomitante à falta de suprimento de oxigênio (Robinson 2021).

Além disso, foi relatado que certos medicamentos anti-HIV, como lopinavir e ritonavir, que visam vírus do RNA (retrovírus), melhoram os sintomas de pacientes com SARS (Chu, Cheng et al. 2004). Portanto, eles foram avaliados quanto ao seu potencial uso como agente terapêutico contra a COVID-19, porém, nenhum benefício foi observado com o tratamento com lopinavir-ritonavir além do tratamento padrão em pacientes adultos hospitalizados com COVID-19 grave (Cao, Wang et al. 2020)³⁶. Da mesma forma, a cloroquina, um medicamento cujos sais de sulfato foram comercializados como medicamentos antimaláricos, também se mostrou eficaz contra infecções por SARS-CoV-2, de acordo com alguns estudos *in vivo* (Inglot 1969, Rolain, Colson et al. 2007). No entanto, um estudo recente provou que a terapia com hidroxicloroquina não preveniu a infecção por SARS-CoV-2 em indivíduos saudáveis versus pacientes infectados (Mitja, Corbacho-Monné et al. 2021). Além disso, outros estudos também desacreditaram os inibidores de protease, como lopinavir, ritonavir e

cloroquina, para modular uma potente terapia anti-SARS-CoV-2 (Ma and Wang 2021, Ma, Tan et al. 2022). Recentemente, dois anticorpos monoclonais, tocilizumab e sarilumab, usados como anti-inflamatórios para artrite reumatoide (Investigators 2021), foram reaproveitados para uso contra SARS-CoV-2. Tocilizumab foi aprovado como medicamento de imunoterapia pelo FDA para o tratamento contra a liberação de citocinas, essa que é uma marca registrada de infecção por COVID-19 particularmente crítica (Robinson 2021, Soin, Kumar et al. 2021). Esses anticorpos monoclonais funcionam antagonizando os receptores de interleucina-6 solúveis e ligados à síndrome de liberação de citocinas (Zhang, Li et al. 2020). Ensaios clínicos mostraram que tocilizumab e sarilumab melhoraram a taxa de sobrevivência e reduziram a mortalidade em pacientes hospitalizados em 28 e 22,2%, respectivamente quando administrados dentro de 24 horas após a entrada em unidades de terapia intensivas (UTIs) (Investigators 2021, Robinson 2021, Fernandes, Inchakalody et al. 2022).

Novos medicamentos orais para coronavírus ainda estão sendo estudados. Paxlovid® é um candidato a medicamento antiviral oral para inibidores de protease SARS-CoV-2, recentemente lançado pela Pfizer. Trata-se de uma combinação de nirmatrelvir com o ritanavir, pois não funciona tão bem se for administrado isoladamente. Projetada para bloquear a atividade da protease SARS-CoV-2-3Cl, necessária para a replicação do coronavírus (Wen, Chen et al. 2022). Paxlovid® reduziu significativamente as internações hospitalares e as mortes entre pessoas com COVID-19 com alto risco de doença grave, quando comparadas com o placebo (Mahase 2021).

O reposicionamento de fármacos possui algumas limitações associadas à natureza de “tentativa e erro”, sobretudo, para doenças que envolvem novas vias bioquímicas e alvos moleculares (Ferreira and Andricopulo 2020). Os poucos modelos animais pré-clínicos reproduzíveis e medidas de desfecho clínico padrão ouro em estudos COVID-19 também podem resultar em algumas falhas em encontrar benefícios clínicos. Ferramentas e análises com maior sensibilidade também são necessárias para detectar diferenças entre os medicamentos e os placebos, especialmente porque os pacientes afetados de maneira mais leve com COVID-19 são incluídos nos ensaios. A presença de populações heterogêneas com diferentes origens genéticas também pode afetar os resultados clínicos. Os possíveis fatores que contribuem para ensaios clínicos

que devem ser levados em consideração em ensaios futuros incluem direcionar o uso de drogas que se engajam com o alvo pretendido (incluindo proteínas do vírus e vírus-hospedeiro e proteína-proteína); intervenção no estágio correto da doença, incluindo doenças precoces, leves, moderadas e graves; biomarcadores farmacodinâmicos e farmacocinéticos traduzíveis (melhor penetração pulmonar); escolhas de fármacos baseadas em atividades antivirais *in vitro* com eficácia preditiva e em estudos com modelos animais apropriados; abordar a rápida progressão da doença de COVID-19 em um curto período; e monitoramento com precisão sobre a complexidade das características clínicas e biológicas para a intervenção terapêutica (Zhou, Wang et al. 2020).

Na procura de novas estratégias terapêuticas, os compostos bioativos vem sendo cada vez mais estudados, uma vez que os produtos de origem natural possuem uma ampla atividade farmacológica e são geralmente menos tóxicos que os medicamentos convencionais.

2.2.2 Compostos Naturais

Os efeitos terapêuticos de fontes naturais, como é o caso de plantas, foram reconhecidos há muitos anos e desde então têm sido utilizadas no combate a várias doenças, uma vez que os compostos naturais apresentam atividades farmacológicas diversas, nomeadamente, atividade antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, antioxidante, antienvhecimento, entre outras (Chen, Wang et al. 2021). Assim, desde o surto de COVID-19, têm sido estudadas várias plantas medicinais com resultados promissores na inibição ou interrupção da proliferação deste agente infeccioso (Benarba and Pandiella 2020, Shah, Rasul et al. 2021).

Os compostos naturais podem ser uma alternativa aos medicamentos convencionais e também podem exercer atividade anti-SARS-CoV-2 atuando nas diferentes etapas do ciclo de vida do vírus e tendo em conta as diferentes proteínas virais e as do hospedeiro, como a PL^{pro}, 3CL^{pro}, RdRp, helicase, glicoproteína S, receptor ACE2 e TMPRSS2 (Benarba and Pandiella 2020, Chen, Wang et al. 2021). Para além disso, outra estratégia importante na prevenção e controle desta infecção consiste na estimulação do sistema imunológico. Assim, quando o vírus se encontra na fase de incubação, a resposta imune terá de ser

eficiente para eliminá-lo evitando a sua replicação nas células hospedeiras (Shah, Rasul et al. 2021).

Por fim, a atividade antioxidante e anti-inflamatória pode contribuir com a atenuação da tempestade de citocinas e impedir a progressão da doença para sintomas mais severos como a pneumonia (Jäger, Lowery et al. 2014).

Investigações farmacológicas modernas e ensaios clínicos revelaram inúmeras atividades farmacológicas para fitoquímicos selecionados. A curcumina, o ingrediente ativo da cúrcuma, é um bom exemplo de composto com modo de ação multi mecanicista. A curcumina já foi aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA e mais de 300 ensaios clínicos relataram os efeitos protetores benéficos da curcumina contra várias doenças (Jäger, Lowery et al. 2014).

2.2.3 Curcumina

A curcumina (CUR) é uma substância polifenólica amarela, quimicamente conhecida como 1,7-bis(4hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona e isolada de uma planta chamada “*cúrcuma longa*”. É uma molécula simétrica, com fórmula $C_{21}H_{20}O_6$, peso molecular de 368,38 g/mol (Gupta, Patchva et al. 2013) e estrutura lipofílica com propriedades polifenólicas. Possui três entidades químicas em sua estrutura: dois sistemas de anéis aromáticos contendo grupos o-metoxifenol ligados por um ligante de sete carbonos que consiste em uma porção β -dicetona α,β -insaturada (Figura 3). (Priyadarsini 2014, Jakubczyk, Drużga et al. 2020).

A curcumina representa cerca de 3-5% da composição química do açafrão. A maior parte dos extratos brutos feitos de açafrão, mesmo alguns materiais refinados de “curcumina”, possuem três compostos principais: curcumina (CUR), que geralmente compõe 60-70% do extrato bruto, dimetoxicurcumina (DMC) 20-27% e bisdismetoxicurcumina (BDMC) 10-15%, em conjunto com muitos metabólitos secundários, no entanto, em menor quantidade (Nelson, Dahlin et al. 2017). Esta planta, desde os tempos antigos até os dias atuais, tem sido utilizada para diferentes fins, por exemplo, em alimentos e para usos terapêuticos (Kunnumakkara, Bordoloi et al. 2017).

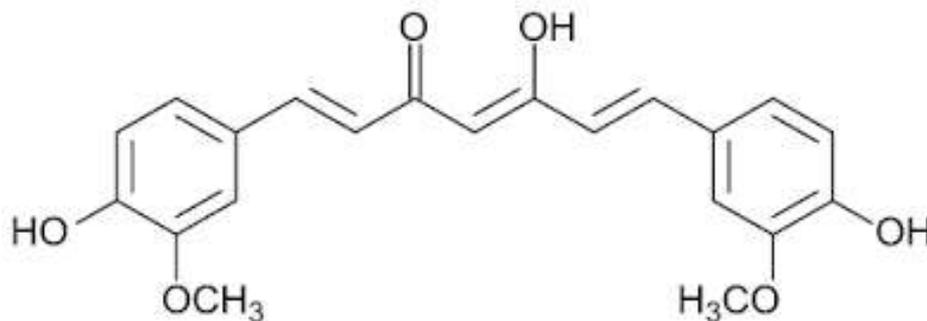


Figura 3: Estrutura química da curcumina. Fonte: <https://www.saberatualizado.com.br/2016/04/a-curcumina-possui-poder-medicinal.html>

No campo da medicina, a curcumina possui numerosos benefícios terapêuticos, destacando-se a ação antiespasmódica, antidiarreica, diurética, antiescorbútica, antiespasmódica, hepatoprotetora, antiparasitário, antiviral, antifúngica, antitumoral, anticonvulsivante, sedativo, antioxidante, neuroprotetora e antidislipidêmica (Marchi, Tedesco et al. 2016). Em particular, apresenta ações antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-artrite e anticancerígenas (Tang, Li et al. 2020).

A significativa atividade anti-inflamatória da CUR tem atraído o interesse de muitos pesquisadores e é considerada um dos compostos naturais com maior potencial no tratamento de doenças. A CUR exerce efeitos anti-inflamatórios regulando as vias de sinalização inflamatória e inibindo a produção de mediadores inflamatórios. Ela liga-se aos receptores Toll-like (TLRs) e regula o fator nuclear kappa-B (NF-κB), proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), proteína ativadora 1 e outras vias de sinalização (Rahimifard, Maqbool et al. 2017, Gao, Zhuang et al. 2019, Zhang, Zheng et al. 2019), desse modo regulando mediadores inflamatórios no tratamento de doenças inflamatórias. A curcumina pode regular negativamente o NF-κB através da ação no receptor gama ativado por proliferadores de peroxissoma (PPARγ) (Li, Sun et al. 2019, Zhu, Chen et al. 2019). A curcumina também pode desempenhar efeitos anti-inflamatórios ao regular a via de sinalização inflamatória Janus quinase/transdutor de sinal e ativador da transcrição (JAK/STAT) (Kahkhaie, Mirhosseini et al. 2019, Ashrafizadeh, Rafiei et al. 2020). Além disso, a curcumina pode restringir diretamente a montagem do inflamassoma NLRP3 ou

inibir a ativação do inflamassoma NLRP3 pela inibição da via NF- κ B, que pode ser um dos mecanismos da curcumina para o tratamento de doenças inflamatórias (Kahkhaie, Mirhosseini et al. 2019, Hasanzadeh, Read et al. 2020).

Nos estudos de células inflamatórias em mamíferos, a curcumina diminuiu os níveis de mediadores pró-inflamatórios, como Interleucina-1 (IL-1), IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17, IL-27, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), síntese de óxido nítrico induzível (iNOS), NO, fator expresso e secretado por células T normais), fator estimulador de colônias de granulócitos e proteína quimiotática de monócitos-1 (Meng, Yan et al. 2013, Zeng, Zhan et al. 2013, Fu, Gao et al. 2014, Alizadeh, Javadi et al. 2018, Chen, Liu et al. 2018, Sadeghi, Rostamirad et al. 2018). Ensaio clínico também mostrou que a curcumina pode reduzir os mediadores inflamatórios como proteína C-reativa (PCR) e TNF (Panahi, Hosseini et al. 2016, Alizadeh, Javadi et al. 2018).

A curcumina atua principalmente nas células dendríticas, célula T helper 17 e célula T reguladora. O linfócito Th17 é uma importante célula pró-inflamatória que produz IL-17, IL-22 e IL-23 e promove a resposta inflamatória. As células Treg inibem a resposta inflamatória (Atabaki, Shariati-Sarabi et al. 2020). Alterações no número e na função de Th17 e Treg podem causar uma resposta imune anormal, levando à inflamação. Portanto, a manutenção do equilíbrio Th17/Treg favorece a manutenção da homeostase imunológica e o tratamento de doenças inflamatórias (Zhang, Zheng et al. 2019). A curcumina inibe a diferenciação Th17 e regula o equilíbrio Treg/Th17 por meio da inibição da via IL-23/Th17 (Chang, Zhai et al. 2021, Zhang, Liu et al. 2021).

O estresse oxidativo está intimamente relacionado aos processos inflamatórios. O acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) leva ao estresse oxidativo, que aumenta a inflamação ativando fatores de transcrição associados à inflamação. A curcumina reduz a produção de EROs devido ao seu efeito na nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase e ao aumento da atividade de enzimas antioxidantes relacionadas à via Nrf2-Keap1 (Derochette, Franck et al. 2013, Lin, Bai et al. 2019, Yousefian, Shakour et al. 2019). Desta forma, a curcumina também pode reduzir a inflamação por meio de sua atividade antioxidante.

Além de sua segurança e tolerabilidade, o custo-efetividade é uma vantagem adicional desse composto. Devido às suas propriedades, a curcumina está sendo comercializada em vários países do mundo em várias formas (Prasad, Tyagi et al. 2014). Apesar de ter múltiplos benefícios medicinais, é uma droga hidrofóbica e, conseqüentemente, sua administração no corpo humano é dificultada pela baixa solubilidade aquosa e instabilidade físico-química (Sharma 1955, Wahlström and Blennow 1978, Couvreur 1988, Khurana and Ho 1988, Wang, Walden et al. 1997, Mahran, Hagrais et al. 2017). Estudos iniciais mostraram que a curcumina é sensível à exposição à luz, sendo 15 minutos de exposição suficientes para a detecção de seus produtos de degradação (Tønnesen, Karlsen et al. 1986, Khurana and Ho 1988). A curcumina também é suscetível a mudanças de pH, sendo muito mais instável em pHs neutros (e/ou fisiológicos) e alcalinos; 90% é degradado em 30 minutos em pH 7,2 ou superior (Wang, Walden et al. 1997). Embora a ingestão oral diária de curcumina seja tolerável até 12 g (Lao, Ruffin et al. 2006, Li, Sun et al. 2019), sua baixa solubilidade aquosa resulta em biodisponibilidade muito baixa (abaixo de 1%) (Yang, Lin et al. 2007) e conseqüente baixa farmacocinética.

Vários ensaios clínicos relataram que apenas quantidades insignificantes são absorvidas diretamente porque a curcumina é rapidamente convertida em seus metabólitos e facilmente excretada do corpo após a administração oral (Asher, Xie et al. 2017, Mahran, Hagrais et al. 2017, Kunati, Yang et al. 2018). Estudos anteriores mostraram que, quando ratos receberam curcumina na dose de 1g/kg, cerca de 75% da curcumina foi excretada nas fezes, enquanto quantidades insignificantes de curcumina apareceram na urina. Medições dos níveis de plasma sanguíneo e excreção biliar mostraram que a curcumina foi mal absorvida pelo intestino e a quantidade de curcumina que atingiu os tecidos fora do intestino foi farmacologicamente insignificante. Assim, para que a curcumina exiba seus efeitos terapêuticos no corpo humano, é necessário que uma pessoa ingira entre 12 a 20g de curcumina todos os dias; caso contrário, é improvável que concentrações substanciais dela ocorram no corpo após a ingestão (Wahlström and Blennow 1978).

Estudos com sistemas de entrega de fármacos baseadas em nanopartículas (Anand, Nair et al. 2010) ou nas quais a curcumina é encapsulada em lipossomas (Wang, Veena et al. 2008), micropartículas lipídicas sólidas,

como albumina de soro bovino (Gupta, Aseh et al. 2009) e quitosana (Das, Kasoju et al. 2010), ou complexado com fosfolipídios (Maiti, Mukherjee et al. 2007), e ciclodextrina (Yallapu, Jaggi et al. 2010), foram relatadas para superar os problemas de solubilidade e biodisponibilidade da CUR.

Apesar dos extraordinários esforços da comunidade científica em todo o mundo, o desenvolvimento de novos medicamentos é um processo complexo e os resultados levam tempo para aparecer. Entende-se que o desenvolvimento de tecnologia é essencial para que as perdas e danos à vida humana sejam minimizados ao máximo. Neste sentido, a nanotecnologia tem sido utilizada de maneira importante no que concerne ao combate do vírus SARS-Cov-2, por exemplo, na fabricação de kits de diagnóstico rápido (Cardoso, Moreira et al. 2020), na terapia, com medicamentos na escala nanométrica que podem inibir os efeitos da infecção viral (Jones, Monopoli et al. 2020, Medhi, Srinoi et al. 2020), na utilização de nanocápsulas que carregam um fármaco e o liberam dentro da célula, diminuindo os efeitos da inflamação aguda, que, em muitos casos, é responsável pelo agravamento da COVID -19 e no desenvolvimento de vacinas para ajudar o organismo a criar anticorpos contra o vírus (Cardoso, Moreira et al. 2020).

2.3 Nanotecnologia

A nanotecnologia fundamenta-se na habilidade de caracterizar, manipular e organizar materiais em escala nanométrica. Trata-se de um campo científico multidisciplinar que se aplica a praticamente todos os setores da pesquisa, da engenharia de materiais e processos (DURÁN and DE AZEVEDO 2004, Lee 2004). O princípio dessa nova ciência é que os materiais nesta escala nanométrica podem apresentar propriedades químicas, físico-químicas e comportamentais diferentes daquelas apresentadas em escalas maiores. Essas propriedades dos nanomateriais já estão sendo exploradas industrialmente com a fabricação de novos cosméticos, medicamentos, tintas, catalisadores, revestimentos, tecidos, etc. Seus alcances podem variar do desenvolvimento de um simples vidro à prova de arranhões até sistemas precisos de carregamento e liberação de fármacos (WORLD NANOTECHNOLOGY MARKET 2005).

Parte da dificuldade em lidarmos com os novos conceitos decorrentes do avanço da nanociência e nanotecnologia se deve à nossa pequena familiaridade

com o mundo do muito pequeno de escala atômica, ou seja, das dimensões manométricas, figura 4. Como a distância entre dois átomos vizinhos em uma molécula ou em uma amostra sólida é usualmente da ordem de décimos de nanômetros, um objeto com todas suas dimensões na escala nanométrica é constituído por um número relativamente pequeno de átomos; em contraste, deve ser lembrado que um pequeno grão de pó de giz, por exemplo, que é um objeto microscópico (e tem, portanto, dimensões típicas milhares de vezes maiores que um nanômetro), possui um número extremamente elevado (que pode ser estimado em cerca de 10^5) de átomos (Melo and Pimenta 2010).

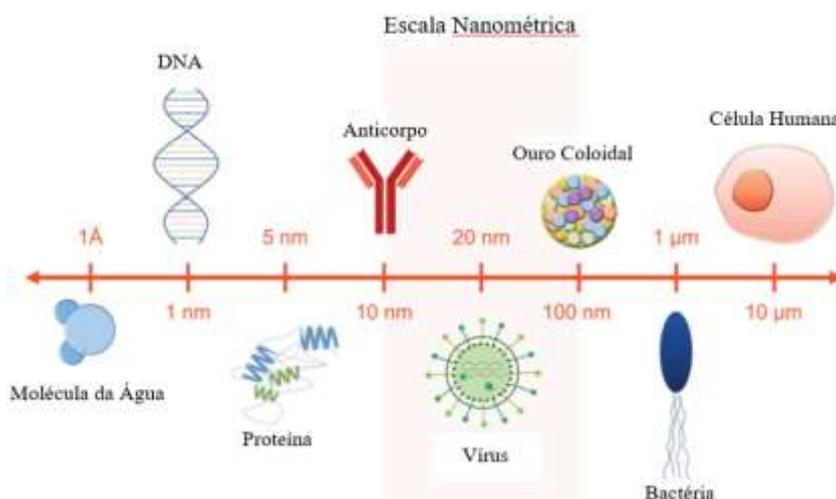


Figura 4: Inserção da nanoescala em comparação com as dimensões atômicas das moléculas pequenas como a da água, passando pelas macromoléculas biológicas como proteínas e estruturas virais até a escala micrométrica das células (Fonte: (Apolinário, Salata et al. 2)).

Em termos tecnológicos, uma primeira motivação para o desenvolvimento de objetos e artefatos na escala nanométrica, está associada à possibilidade de que um número cada vez maior deles venha a ser reunido em dispositivos de dimensões muito pequenas, aumentando assim a compactação e sua capacidade para o processamento de informações. No entanto, mais que na procura pelo simples benefício direto da redução de tamanho, a grande motivação para o desenvolvimento de objetos e dispositivos nanométricos reside no fato de que novas e incomuns propriedades físicas e químicas – ausentes para o mesmo material quando de tamanho microscópico ou macroscópico – são observadas nessa nova escala.

Na verdade, a alteração das propriedades de um material ao atingir a escala nanométrica se deve à combinação de dois fatores: enquanto, por um

lado, é em objetos com essas dimensões que os efeitos quânticos se manifestam de maneira mais evidente, por outro, observa-se que quanto menor for o tamanho da amostra, mais importante se tornam os efeitos de superfície, pelo aumento da proporção entre sua área e seu volume (Melo and Pimenta 2010). Assim, as nanotecnologias buscam se aproveitar das novas propriedades que surgem nos materiais quando em escala nanométrica para, através do controle do tamanho e da forma dos nano-objetos, conseguir a preparação de novos materiais tecnológicos com finalidades específicas.

Um dos setores da nanotecnologia com maior potencial de aplicação são os sistemas de carregamento e liberação de drogas (fármacos e vacinas) para melhorar a sua eficácia terapêutica (Shaffer 2005). O alto custo do desenvolvimento de novas moléculas ativas torna os sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos uma das áreas da indústria farmacêutica mais promissoras. Isso porque uma nova formulação em nanopartículas pode resgatar drogas promissoras que foram descartadas após vultuosos investimentos por causa da descoberta de potenciais efeitos colaterais ou baixa biodisponibilidade, além de gerar novas patentes.

O problema mais comum que costuma impedir a aprovação de fármacos potencialmente eficazes são sua rápida metabolização no organismo e os efeitos tóxicos decorrentes de sua baixa solubilidade plasmática e/ou sua ação indiscriminada sobre as células sadias. Idealmente, um fármaco de efeito sistêmico deve permanecer na circulação o tempo necessário para seu efeito terapêutico, dentro de uma faixa segura de alta eficácia combinada com a baixa toxidez, e um mínimo de doses repetitivas.

Além de protegê-los contra a degradação prematura e promover sua solubilização, o encapsulamento de fármacos em nanossistemas apropriados podem ajudar a direcioná-lo para o tecido ou célula-alvo. Os sistemas de liberação controlada de fármacos apresentam várias vantagens em relação aos sistemas convencionais, tais como: a) maior controle de liberação do princípio ativo, diminuindo o aparecimento de doses tóxicas subterapêuticas; b) utilização de menor quantidade de princípio ativo, resultando em menor custo; c) maior intervalo de administração; e) melhor aceitação do tratamento pelo paciente; f) possibilidade de direcionamento do princípio ativo para seu alvo específico. As desvantagens que devem ser monitoradas e contornadas no desenvolvimento

desses sistemas são: a) possível toxicidade dos materiais utilizados na produção e dos produtos da sua biodegradação, e b) custo mais elevado, dependendo do material e do processo utilizado. Este, no entanto, pode ser compensado pela redução das doses necessárias (Rossi-Bergmann 2008).

Vários tipos de nanopartículas e sistemas coloidais podem melhorar a cinética, biodistribuição e a liberação de drogas, seja ela um fármaco, vacina, proteínas recombinantes ou oligonucleotídeos. Dentre os principais nanocarreadores estudados no âmbito farmacêutico estão as nanoemulsões e as nanopartículas poliméricas (Guterres, Alves et al. 2007, Rossi-Bergmann 2008). As nanoemulsões são representadas por um sistema constituído por gotículas de óleo estabilizadas por tensoativos. As nanopartículas poliméricas, classificadas em nanoesferas e nanocápsulas, são definidas como partículas coloidais sólidas (Anton, Benoit et al. 2008, Pohlmann, Fonseca et al. 2013). As nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido. Já as nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo, geralmente oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (Charcosset and Fessi 2005, Mishra, Patel et al. 2010).

Esses nanocarreadores vem sendo estudados e desenvolvidos para a aplicação no tratamento de diversas doenças. A escolha do tipo de nanopartícula a ser utilizada como sistema de liberação controlada recairá, principalmente, sobre sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, compatibilidade física e química com a droga, e a via de administração a ser utilizada (Rossi-Bergmann 2008). Neste sentido, vários materiais presentes nestes nanossistemas vem sendo estudados, como a poli- ϵ -caprolactona (PCL), o polietilenoglicol (PEG), o eudragit e o polissorbato (tween).

Nanocápsulas poliméricas são um tipo específico de nanopartículas poliméricas utilizadas para melhoria dos efeitos biológicos de fármacos, aumentam a fotoestabilidade e a estabilidade química, modulam a interação com células e tecidos, reduzem efeitos adversos e aumentam a eficácia ou biodisponibilidade dos medicamentos (Frank, Contri et al. 2015). Em geral, as nanocápsulas poliméricas são compostas por fármaco, polímero, óleo, surfactante e água. São produzidas por diferentes métodos com distribuições de

tamanho estreitas, diâmetros menores que 1 μm . O tamanho submicron desses sistemas coloidais rendem um alta especificidades de área de superfície. Esta característica está fortemente correlacionada às suas respostas biológicas. Por esse motivo, nanocápsulas têm sido utilizadas para reações interfaciais por terem sua superfície modificada. Estas estratégias oferecem especificidade química para o reconhecimento molecular (Bender, Cavalcante et al. 2014) ou melhoram a estabilidade física em meios biológicos (Rodriguez-Emmenegger, Jäger et al. 2011). As nanocápsulas são geralmente produzidas em meio aquoso como uma solução coloidal turva. Esta solução opalescente pode ser usada como produzida (produto final) ou pode ser posteriormente incorporada em géis (Ourique, Melero et al. 2011, Frank, Sandri et al. 2014, Meng, Wang et al. 2018) ou convertidas em pós (Marchiori, Ourique et al. 2012) para aumentar a estabilidade física do produto.

2.3.1 Polímeros

Materiais poliméricos têm sido amplamente empregados como agentes de controle de liberação de fármacos, e estes apresentam diferentes abordagens na concepção da matriz polimérica. A primeira categoria de matrizes poliméricas são as matrizes insolúveis, também classificadas como matrizes formadas por sistemas plásticos. A segunda categoria é representada pelos materiais hidrofóbicos, insolúveis em água que apresentam capacidade de erosão. A terceira categoria inclui polímeros que formam matrizes hidrofílicas. Matrizes plásticas têm sido amplamente usadas em sistemas de liberação de fármacos, principalmente devido a sua natureza química inerte e a capacidade de associar substâncias ativas. Entretanto, a penetração de líquidos é um fator limitante do emprego destes materiais. As matrizes hidrofóbicas, por sua vez, controlam a liberação de substâncias e a penetração de através da difusão pelos poros e pela erosão do material. Matrizes hidrofílicas, quando expostas às soluções aquosas, não sofrem degradação, mas incorporam água e formam uma barreira viscosa superficial que controla a liberação de substâncias e a penetração de líquidos para o interior do sistema matricial (Reza, Quadir et al. 2003).

Polímeros biodegradáveis podem ter origem natural ou sintética, geralmente os sintéticos apresentam vantagens por permitirem modificações de suas propriedades durante o processo de síntese, diferentemente dos naturais.

Já os naturais tendem a ser mais biocompatíveis. O critério de seleção de um polímero biodegradável considera suas propriedades mecânicas e seu índice de degradação, propriedades dependentes das características físicas e químicas do material (Lu and Chen 2004). O estado físico do polímero e o do fármaco, por exemplo, cristalino, amorfo, vítreo, elástico ou dispersão molecular são de maior importância para descrever o mecanismo de liberação de fármacos. Por exemplo, o coeficiente difusional de um fármaco em polímero amorfo é superior quando o estado é cristalino (Hombreiro-Perez, Siepmann et al. 2003).

O emprego de polímeros biodegradáveis para o controle de liberação de fármacos baseia-se em propriedades de biodegradabilidade e biocompatibilidade. Homo- e co-polímeros derivados de poli (ácido lático), poli (ácido glicólico), poli (ácido lático-co-glicólico) e poli (ϵ -caprolactona) são amplamente empregados na preparação de carregadores de liberação controlada de diversos fármacos. Muitos trabalhos têm demonstrado a importância do emprego terapêutico destes materiais poliméricos no desenvolvimento de sistemas carregadores e fármacos micro e nanoparticulados (Lamprecht, Torres et al. 2000, Lu and Chen 2004, Sinha, Bansal et al. 2004).

2.3.1.1 Poli (épsilon-caprolactona)

A poli- ϵ -caprolactona (PCL), figura 5, é um polímero biodegradável, biocompatível e semicristalino com uma temperatura de transição vítrea muito baixa. Devido a sua degradação lenta, o PLC é ideal para entrega a longo prazo, estendendo-se por um período de mais de um ano. Isso levou à sua aplicação na preparação de diferentes sistemas de entrega (Sinha, Bansal et al. 2004). PCL é um poliéster alifático, semicristalino, com temperatura de transição vítrea de -60 °C e ponto de fusão entre 59 e 64 °C, dependendo da sua natureza cristalina. O peso molecular pode variar entre 10.000 a 80.000 g/mol. A PCL é solúvel em clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono, benzeno, tolueno, ciclohexano e 2-nitropropano à temperatura ambiente. Apresenta baixa solubilidade em acetona, 2-butanona, acetato de etila, dimetilformamida e acetonitrila, e é insolúvel em álcool, éter de petróleo e éter dietílico. O PCL quando empregado em sistemas de liberação de fármacos apresenta como propriedade a alta permeabilidade a substâncias, principalmente, de baixo peso molecular (Gibaud, Al Awwadi et al. 2004, Sinha, Bansal et al. 2004).

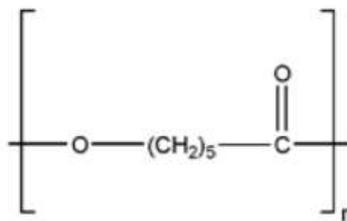


Figura 5: Estrutura química de poli (ϵ -caprolactona) (Fonte: (Mazzarino 2013)).

A degradação de PCL em ambiente aquoso é favorecida pelo meio alcalino e pelas altas temperaturas. A degradação ocorre por hidrólise química e/ou enzimática, principalmente da ligação éster. Durante a degradação a diminuição da massa molar é acompanhada por uma distribuição de massa molar e pelo desenvolvimento de picos e baixa massa molar (Eldsäter, Erlandsson et al. 2000).

Como resultado de sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, a PCL tem sido extensivamente estudada para aplicação controlada de fármacos e engenharia de tecidos em diversas formulações. Vários estudos relatam o uso de NCs preparadas com PCL apresentando resultados promissores na área de entrega de drogas, incluindo o anti-inflamatório indometacina (Bernardi, Zilberstein et al. 2009), a antimalárica quinina (Haas, Bettoni et al. 2009) e a antioxidante trans-resveratrol (Frezza, Bernardi et al. 2010). Além disso, existem algumas moléculas que foram incorporadas com sucesso em nanopartículas de PCL para aumentar seu valor terapêutico, incluindo tamoxifeno (Shenoy and Amiji 2005), saquinavir (Shah and Amiji 2006) e insulina (Damgé, Maincent et al. 2007). O PCL é adequado para administração controlada de fármacos devido à alta permeabilidade a muitos fármacos, excelente biocompatibilidade e sua capacidade de ser totalmente excretada do corpo uma vez biorreabsorvida. No entanto, a biodegradação do PCL é lenta, em comparação com outros polímeros (Woodruff and Hutmacher 2010).

A exposição a nanopartículas vem crescendo significativamente. Até o momento, pouco se sabe sobre a possível toxicidade e segurança das nanocápsulas poliméricas. Estudos toxicológicos padrão *in vitro* e *in vivo* não foram realizados em detalhes e os dados sobre sua toxicidade são escassos. (Huang, Gao et al. 2010) realizaram um estudo sobre os efeitos agudos e

genotóxicos da administração intravenosa de copolímeros e nanopartículas contendo PCL em ratos, que não apresentou nenhum efeito adverso. Em trabalho anterior, (Fang, Gong et al. 2009) concentrou-se principalmente na toxicidade aguda de órgão de camundongos BALB/c após injeção subcutânea de copolímero tribloco biodegradável contendo PCL, e a formulação foi considerada não tóxica. Os mecanismos de toxicidade das NPs não são completamente claros, e é possível que mais de um mecanismo esteja envolvido. Entretanto, nenhum estudo investigou a toxicidade de nanocápsulas produzidas com PCL, que apresentam diferentes propriedades físico-químicas que alteram seus possíveis mecanismos de toxicidade.

2.3.1.2 Polisorbato 80

O polisorbato 80 (P80), figura 6, também conhecido como Tween 80, é um surfactante não iônico sintético comumente usados em alimentos, cosméticos e formulações de medicamentos como solubilizante, estabilizante ou emulsificante (ten Tije, Verweij et al. 2003, Kerwin 2008). O P80 é composto de ésteres de ácido graxos de polioxietileno sorbitano (Kerwin 2008, Khan, Mahler et al. 2015). A composição de ácido graxo é principalmente ácido oleico, mas outros ácidos graxos, como ácido palmítico ou linoleico, podem ser incluídos. Portanto, o P80 está geralmente disponível como uma mistura quimicamente diversa de diferentes ésteres de ácidos graxos, com o ácido oleico compreendendo mais de 58% da mistura (Kerwin 2008). No entanto, o principal componente do P80 é o monooleato de polioxietileno-20-sorbitano, estruturalmente semelhante aos polietilenoglicóis. O polisorbato 80 tem um peso molecular de 1309,7 Da e uma densidade de 1,064g/ mL (ten Tije, Verweij et al. 2003).

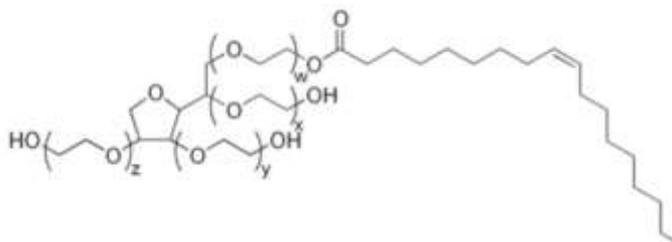


Figura 6: Estrutura química de Polisorbato 80 (Fonte: (Souza, Ferraz-Freitas et al. 2016)).

Por causa de sua dupla natureza hidrofóbica / hidrofílica, os surfactantes em solução aquosa tendem a orientar-se de modo que a exposição da porção hidrofóbica é minimizada (Randolph and Jones 2002). As porções hidrofóbicas conduzem uma interação com a interface ar-água ou uma interface sólido-água, essas porções também resultam na formação de micelas em concentrações acima da concentração crítica de micelas de 0,01 % (peso / volume) em solução aquosa sem proteína (ten Tije, Verweij et al. 2003, Kerwin 2008, Khan, Mahler et al. 2015). Esta formação de micela pode desempenhar um papel crítico no mecanismo de ação do polissorbato 80. Ensaio de imunoabsorção enzimática mostraram que o P80 pode ativar o sistema complemento, um mecanismo imune multiproteico. A ativação do sistema complemento pode levar a fagocitose, estimulação e recrutamento de leucócitos ou perfuração das membranas plasmáticas, possivelmente levando a efeitos colaterais imunológicos, como hipersensibilidade aguda e reações imunes sistêmicas (Weiszhar, Czucz et al. 2012). Esta possibilidade foi testada em um modelo de peixe-zebra, onde resíduos de ácidos graxos em amostras de P80 causaram reações anafilactóides nas concentrações mais altas testadas (Schellekens 2005).

As soluções aquosas de P80, assim como o líquido não diluído, sofrem auto-oxidação ao longo do tempo, com mudanças sendo catalisadas pela luz, pelo aumento da temperatura e pelo sulfato de cobre. A auto-oxidação leva a formação de uma variedade de hidroperóxidos, peróxidos e compostos de carbonila que podem degradar prontamente as proteínas. Durante os estágios iniciais de propagação, a formação do peróxido é geralmente mais rápida do que sua decomposição; eventualmente, as taxas de formação e decomposição se igualam, e então a decomposição ocorre mais rápido do que a formação. Parâmetros como a tensão superficial e as propriedades do ponto de nuvem podem ser usados para estabelecer a degradação nas cadeias hidrofílicas (Donbrow, Azaz et al. 1978).

Tanto em estudos com animais quanto em estudos clínicos, o P80 é rapidamente removido da circulação sistêmica (van Tellingen, Beijnen et al. 1999, Sparreboom, Zhao et al. 2002), e pode ter um efeito potencial na distribuição e eliminação de alguns medicamentos administrados por via intravenosa. Esse efeito pode levar ao aumento da exposição sistêmica e

diminuição da depuração da droga, e isso pode ocorrer pelo fato do P80 formar complexos micelares, de modo que a ligação da droga se torna saturada em locais únicos e a fração de fármaco aumenta (Loos, Baker et al. 2003, ten Tije, Verweij et al. 2003). Além disso, o P80 demonstrou várias propriedades farmacodinâmicas, incluindo alteração da fluidez e aumento da permeabilidade da membrana (Riehm and Biedler 1972, Anderberg, Nyström et al. 1992). Um estudo *in vitro* demonstrou que o P80 potencializa o efeito de antibióticos em linhas de células resistentes, o que se pensa ser devido ao seu efeito na permeabilidade da membrana celular.

Por outro lado, o P80 foi associado a uma série de eventos adversos. Nos alimentos, pequenas concentrações não digeridas podem aumentar a translocação bacteriana através do epitélio intestinal, uma explicação potencial para um aumento observado na incidência da doença de Crohn (Roberts, Rushworth et al. 2013). Em formulações de medicamentos, o P80 foi implicado em uma série de reações sistêmicas (por exemplo, hipersensibilidade, anafilaxia não alérgica, erupção cutânea) e eventos adversos no local de injeção e infusão (dor, eritema, tromboflebite) (Bergh, Magnusson et al. 1997, ten Tije, Verweij et al. 2003, Steele, Limaye et al. 2005). O P80 também foi implicado em casos de toxicidade renal e hepática. Estudos *in vitro* indicaram que este surfactante em concentrações clinicamente relevantes aumenta a citotoxicidade do peróxido de hidrogênio em timócitos de ratos aumentando a suscetibilidade ao estresse oxidativo, através da diminuição do conteúdo celular de glutatona (Tatsuishi, Oyama et al. 2005).

Nos últimos anos, a nanotecnologia incorporou um número considerável de novas ferramentas que aumentam significativamente a diversidade de mecanismos de administração de medicamentos (Luna-Herrera, Pérez-Martínez et al. 2021), sendo que os surfactantes não iônicos mais populares para estabilizar nanossistemas são os polisorbatos. Entre todos os tipos de polisorbatos, o P80 é o mais eficaz e mais amplamente utilizado (Wu, Huang et al. 1996, Akhtar, Rehman et al. 2011, Pandey, Mittal et al. 2014).

Gelperina et al (2002) desenvolveram NPs de poli(butil cianoacrilato) revestidas com P80 para o transporte do antibiótico antitumoral doxirrubicina através da barreira hematoencefálica para o cérebro após a administração intravenosa. O objetivo desse estudo foi avaliar a toxicidade dessas NPs

revestidas com P80 em ratos saudáveis. Pode-se observar que essas NPs carregadas com doxirrubucina demonstraram toxicidade semelhantes ou até menores do que a doxirrubucina livre, e a presença de P80 na formulação não foi associada a alterações de toxicidade (Gelperina, Khalansky et al. 2002). Um estudo com NPs de poli (lactídeo), revestidas de P80 e carregadas com resveratrol em um modelo de camundongo de doença de Parkinson, demonstraram neuroproteção significativa contra alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, provando ser uma ferramenta nanomédica promissora e terapia adjuvante para doença de Parkinson (da Rocha Lindner, Bonfanti Santos et al. 2015).

Lemke et al (2010) formularam nanossuspensões revestidas com P80 e colato de sódio carregadas com anfotericina B para entrega cerebral em NPs. A nanossuspensão foi testada quanto a atividade amebicida contra *Balamuthia mandrillaris*, um agente da encefalite letal. Os resultados deste estudo indicam que as nanossuspensões revestidas com P80 e colato de sódio aumentaram significativamente a liberação do fármaco no cérebro e inibiram o parasita *in vitro*, embora menos *in vivo* (Lemke, Kiderlen et al. 2010). Já Blasi et al (2013) avaliou a estabilidade a longo prazo e a segurança de NPs lipídicas de P80 e cetilpalmitato destinadas à entrega para o cérebro. As NPs mostraram estabilidade e ausência de toxicidade aguda, a qual foi avaliada em embriões de galinha por ensaio de membrana carioalantóide e em roedores por avaliação histológica do cérebro. Estudos demonstram a viabilidade da preparação de nanoformulações com modificações na superfície utilizando P80, resultando em sistemas de entrega promissores e com baixa toxicidade. (Blasi, Schoubben et al. 2013)

2.3.1.3 Polietilenoglicol

Os polietilenoglicóis (PEGs), figura 7, são produtos de óxido de etileno condensado e água que podem ter vários derivados e funções. São formados por compostos de poliéter com unidades de etilenoglicol repetidas, de acordo com o monômero constituinte ou molécula parental. A maioria dos PEGs estão comumente disponíveis comercialmente como misturas de diferentes tamanhos de oligômero em faixas de peso molecular amplamente ou estreitamente definidas. PEGs se referem principalmente a oligômeros e polímeros com

massas moleculares abaixo de 20.000 g/mol e são produzidos pela reação química entre óxido de etileno, água ou etilenoglicol (ou outros oligômeros de etilenoglicol), catalisados por ácidos ou básicos (Jang, Shin et al. 2015). O PEG se destaca devido à sua alta flexibilidade de estrutura, biocompatibilidade, propriedades anfífilas, isenção de quaisquer obstáculo estérico e alta capacidade de hidratação (Harris and Chess 2003). PEG 100 a PEG 600 são líquidos em temperatura ambiente, aqueles entre 1000 e 2000 são sólidos macios e PEGs com peso molecular maior que 2000 são sólidos cristalinos duros com pontos de fusão em torno de 63° C (Thomas, Müller et al. 2014). A alta polaridade do PEG aumenta a hidrofiliicidade e, portanto, aumenta solubilidade em água, uma característica marcante entre as semelhantes estruturas de polímeros. A alta solubilidade de PEG também é observada na maioria dos solventes orgânicos e inorgânicos, na qual formam uma monocamada na interface ar-água, assim desempenhando um papel importante na solubilização e permeação (Pasut and Veronese 2012). Já foi demonstrado que o revestimento de PEG diminui o ângulo de contato entre as superfícies, e isso significa que o PEG é hidrofílico e diminui o ângulo de contato de materiais hidrofóbicos significativamente. PEGs são eletricamente neutros em todos os pHs com terminais funcionais altamente ativos (XIAO, JIANG et al. 2013).

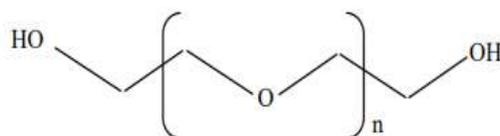


Figura 7: Estrutura química de polietilenoglicol (Fonte: (Ribeiro, Siqueira et al.)).

A bioconjugação é uma técnica usada pelos químicos para unir duas moléculas em que uma delas é uma biomolécula. Quando a outra molécula é poli (etilenoglicol), surge outro termo chamado PEGuilação. O PEG é conhecido por ser um polímero neutro e atualmente é um dos materiais poliméricos mais populares usados para alteração e controle da biodistribuição (Casettari, Vllasaliu et al. 2010). PEGs podem ser covalentemente ligados a drogas de via sistêmica para aumentar o seu peso molecular, prolongar o tempo de circulação e proteger o fármaco do sistema imunológico, reduzindo a sua interação com

componentes do sangue, principalmente a “opsonina” que é bem conhecida por aumentar a fagocitose (opsonização) e, subsequentemente, inibir sua absorção pelo sistema retículo endotelial (Knop, Hoogenboom et al. 2010, Shah, Vercellotti et al. 2012, Pozzi, Colapicchioni et al. 2014).

O sucesso da PEGuilação de proteínas como um método para produzir uma circulação mais prolongada e, portanto, terapias intravenosa mais eficazes, levou a investigações de PEGuilação de nanopartículas (NP) para a aplicação sistêmica no início dos anos 80 e 90 (Arturson, Laakso et al. 1983, Silva 2016). Reconhecidos como objetos estranhos, as NPs são facilmente eliminadas da circulação sistêmica, evitando o acúmulo nas células e tecidos alvo. No entanto, semelhante ao que foi observado com proteínas PEGuiladas, os revestimentos de PEG em NPs protegem a superfície da agregação, opsonização e fagocitose, prolongando assim o tempo de circulação (Ahmed, Lukyanov et al. 2005).

Além disso, a PEGuilação de NPs tem sido usada como uma abordagem para superar várias barreiras extracelulares associadas a outros modos de administração, que vai desde a absorção na mucosa até a entrega no tecido cerebral (Suk, Xu et al. 2016). O revestimento das nanopartículas com uma camada neutra de PEG pode estabilizar as nanopartículas em tais complexos e meios de alta força iônica. As nanopartículas PEGuiladas resultantes têm menos tendência para agregar devido à “nuvem conformacional”, causando estabilização estérica. Esta “nuvem conformacional” é responsável pela redução das interações com o sangue e os componentes dos tecido, resultando em macromoléculas PEGuiladas que oferecem menos imunogenicidade e antigenicidade (Torchilin and Papisov 1994, Knop, Hoogenboom et al. 2010). O sucesso do PEG foi impulsionado por suas propriedades imunomodulatórias e pela sua baixa toxicidade, exceto em doses muito altas. O PEG é geralmente considerado de baixa toxicidade por todas as vias de administração, não sendo irritante por via ocular ou mucosa, mas pode ser levemente irritante para a pele e têm toxicidade aguda e crônica extremamente baixa (Fruijtier-Pölloth 2005).

Por estes motivos, o PEG tem um futuro muito promissor para o desenvolvimento de aplicações terapêuticas e biomédicas atuais. Além disso, o grande número de moléculas com as quais o PEG pode se conjugar pode aumentar suas aplicações. Com isso, PEG é um dos polímeros mais frequentemente usados para revestir nanocarreadores, aumentando sua

biocompatibilidade, hidrofiliçidade, estabilidade e biodegradabilidade. Além disso, a farmacocinética e frequentemente a toxicidade das moléculas bioativas podem ser fortemente afetadas pela PEGuilação. Por exemplo, Casettari et al (2010) demonstrou que os conjugados de mPEG-g- quitosana exibiram toxicidade reduzida em células em comparação com as contrapartes de quitosana modificadas (Casettari, Villasaliu et al. 2010). Por outro lado, Hunt et al (2014) avaliaram os efeitos do revestimento de PEG em NPs de prata em *C. elegans*. As larvas expostas por 3 dias as NPs de Prata PEGuiladas demonstraram maior toxicidade comparados com outros revestimentos como polietilenoimina ramificada e polivinilpirrolidona (Hunt, Keltner et al. 2014). Já a conjugação da Naftalimida *N*-nitrosada hidrofóbica com uma cadeia de PEG hidrofílica para permitir a automontagem e formar nanopartículas biocompatíveis de liberação de óxido nítrico foi benéfica em *C. elegans*. As NPs foram preparadas com sucesso, e demonstraram que em doses baixas de liberação de óxido nítrico promove a longevidade de *C. elegans*, enquanto que altas doses é geralmente tóxica e resulta em apoptose das células germinativas, diminuição do tamanho de ninhada e declínio do tempo de vida (Jiang, Cheng et al. 2020).

Nanobastões de ouro foram sintetizados e estabilizados com PEG e modificados com dois tipos de peptídeos envolvidos na doença de Alzheimer (DA). Esses nanossistemas foram aplicados a um modelo de doença de Alzheimer em *Caenorhabditis elegans*, e demonstraram que os peptídeos A β agregados são diminuídos. Estes nanossistemas à base de nanopartículas metálicas podem contribuir para o desenvolvimento de terapias para DA (Morales-Zavala, Arriagada et al. 2017). Martínez-Lopez et al (2021) avaliaram a eficácia terapêutica de NPs de zeína conjugadas com PEG e carregadas com insulina em *C. elegans* cultivados em condições elevadas de glicose. Essas NPs induziram uma redução significativa na formação de espécies reativas de oxigênio e na gordura corporal acumulada, além de aumentar a vida útil dos vermes (Martínez-López, González-Navarro et al. 2021).

Sistemas micelares com base em poli vinil caprolactona (PCL) – PEG foram otimizados para a entrega de clorexidina em biofilmes estafilocócicos e avaliados quanto à toxicidade usando *C. elegans*. Os respectivos sistemas micelares de PEG-PCL promoveram propriedades furtivas e liberação enzimática responsivas de clorexidina dentro dos biofilmes em comparação a

clorexidina livre, melhorando a eficácia contra biofilmes de *Staphylococcus aureus*. A avaliação de toxicidade em *C. elegans* mostrou micelas sem efeitos letais, com alta taxa de sobrevivência.

Muitas nanopartículas sintetizadas carecem de estudos de farmacocinética e farmacodinâmica. Além disso, pesquisas obtidas nos últimos anos mostram que o PEG pode ter possíveis desvantagens, como interação com o sistema imunológico, provável degradação sob estresse e acúmulo no corpo se não for excretado de forma adequada. Mais estudos relacionados a nanossistemas e PEG ajudariam a desenvolver nanopartículas bem-sucedidas, com uniformidade, dose da droga e capacidade de liberação. Portanto é importante encontrar o polímero ideal com o menor número de efeitos colaterais para complementar os nanocarreadores de forma segura (Rahme and Dagher 2019).

2.3.1.4 Quitosana

A quitosana, figura 8, é um polissacarídeo linear natural catiônico e hidrofílico, obtido pela reação de desacetilação da quitina em meio alcalino. É um polímero biocompatível não tóxico que consiste em unidades de d-glucosamina ligada (desacetilada) e N-acetil-d-glucosamina (acetilada), distribuídas aleatoriamente (Dash, Chiellini et al. 2011). A quitosana é um dos derivados mais valiosos da quitina encontradas na casca de camarão ou caranguejo e na parede celular de fungos. A quitina é um polímero natural que possui uma estrutura cristalina altamente organizada, é insolúvel em meio aquoso e na maioria dos solventes orgânicos, e tem baixa reatividade química. A insolubilidade da quitina é o maior fator limitante da sua utilização (Muzzarelli and RAA 1973).

A quitosana é um biopolímero cujo grau de desacetilação, distribuição de massa molar e conteúdo de impurezas dependem das fontes naturais de matéria-prima e dos métodos de preparação. A massa molar média da quitina nativa é geralmente maior do que 1×10^6 Daltons, enquanto a quitosana comercial tem uma massa molar média na faixa de $1 \times 10^5 - 1,2 \times 10^6$ Daltons (Li, Dunn et al. 1992, Roberts 1992).

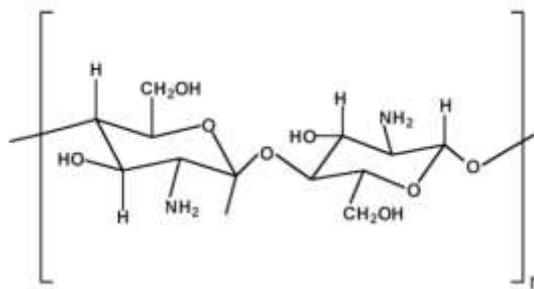


Figura 8: Estrutura química da unidade monomérica da quitosana (Fonte: (Santos, Moura et al. 2003).

Este biopolímero pode facilmente se dissolver em soluções de ácidos fracos diluídos, devido à protonação de seus grupos amino, sendo o ácido acético o solvente mais empregado. Agentes reticulantes, tais como glutaraldeído, etilenoglicol diglicidil éter, tripolifosfato, ácido sulfúrico e epiclorigrina, são usados para aumentar a sua estabilidade química e resistência mecânica (Monteiro Jr and Airoidi 1999, Cui, Xiang et al. 2008). A alta hidrofiliabilidade da quitosana, devido a abundância de hidroxilas (-OH) e grupos funcionais amino (-NH₂) presentes na cadeia polimérica, permite sua utilização como biomaterial na forma de micropartículas, gel e membrana em diversas aplicações, como veículo de liberação de fármacos, bandagens e géis injetáveis, membrana periodontais etc (Tonhi and Plepis 2002). A presença de uma alta porcentagem de grupos amino reativos distribuídos na matriz polimérica permite inúmeras modificações químicas, tais como imobilização de agentes quelantes, quartenização, carboxilação, acetilação, sulfonação, amidação, formação de complexo polieletrólito, por exemplo (Prashanth and Tharanathan 2007, Laranjeira and Fávere 2009). Portanto, a abundância de grupos amino e hidroxila na estrutura da quitosana representam porções alvo para modificações químicas para melhorar a solubilidade aquosa, bem como dotar a quitosana com novas funcionalidades, como entrega de drogas direcionadas sensíveis ao meio ambiente, melhorando os efeitos terapêuticos e redução dos efeitos colaterais (Sarmiento and das Neves 2012).

A quitosana não é apenas biocompatível e de baixa toxicidade; também é biodegradável por certas enzimas de oligossacarídeos, tornando-a apropriada para o uso clínico (Sorlier, Denuzière et al. 2001, Dash, Chiellini et al. 2011). Uma das propriedades mais essenciais da quitosana é a natureza catiônica,

que exerce vantagens como carreador de fármacos devido a adesão aprimorada por interações eletrostáticas à superfície da mucosa carregada negativamente, resultando na melhoria da internalização do fármaco em células-alvo (He, Davis et al. 1998). Estes materiais têm importantes propriedades estruturais e funcionais que os tornam atrativos para uma variedade de aplicações em muitos campos, tais como alimentação e nutrição, biomedicina, biotecnologia, agricultura, veterinária e proteção ambiental. Dentre os biomateriais citados, a quitosana é muito discutida em relação às aplicações biomédicas e de alimentos (Muzzarelli and RAA 1973, Mathur and Narang 1990, Roberts 1992, Prabakaran 2008). Devido a estas propriedades favoráveis, o interesse na quitosana e nos seus derivados em aplicações de liberação de fármacos tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Em tais aplicações é extremamente importante que a quitosana seja hidrossolúvel e carregada positivamente. Estas propriedades permitem que este biopolímero interaja com polímeros carregados negativamente, macromoléculas e poliânions em meio aquoso, favorecendo a difusão de fármacos no mecanismo de liberação. Portanto, a quitosana pode ser sugerida como um interessante excipiente para a administração de fármacos via oral (Prabakaran 2008).

Muitos trabalhos relacionados com o potencial de aplicações da quitosana e seus derivados podem ser encontrados na literatura. Por exemplo, tem sido mostrado que N-carboximetil quitosana, tem a característica especial de aderir a superfícies da mucosa, sendo útil para a liberação de fármacos na mucosa (Islam, Rahman et al. , Bersch, Nies et al. 1995, Prabakaran and Mano 2004).

Vários biopolímeros pertencentes à classe dos polissacarídeos têm algumas desvantagens inerentes, como força mecânica deficiente, absorção de água não controlada e contaminação microbiana. Para superar esses problemas, esforços foram feitos para desenvolver matrizes quimicamente modificadas combinando-as com monômeros sintéticos (Hamdi, Ponchel et al. 1998). Microesferas de quitosana enxertadas com poliacrilamida e reticuladas com glutaraldeído foram usadas para encapsular indometacina, um fármaco anti-inflamatório para artrite, e também para encapsular nifedipina, um fármaco anti-hipertensivo e assim superar essas desvantagens. (Kumbar, Soppimath et al. 2003). A matriz de N-lauril carboximetilquitosana contendo grupos hidrofóbicos e hidrofílicos foi estudada na liberação de taxol para tratamento de tumores

(Yoshioka, Nonaka et al. 1995). Outros exemplos estão relacionados à produção de vesículas poliméricas para encapsulação de compostos hidrofóbicos como bleomicina, aumentando sua capacidade de solubilização (Miwa, Ishibe et al. 1998).

Na área biomédica de nanomateriais à base de quitosana, os estudos revelaram grande sucesso como agentes antimicrobianos, bem como para separação de membrana, como transportadores para entrega de drogas, como materiais de detecção para monitoramento de biomoléculas e em engenharia de tecidos (Mohebbi, Nezhad et al. 2019). Além disso, derivados de quitosana e nanopartículas de quitosana representam um excelente desempenho em oftalmologia, odontologia, bioimagem, biosensoriamento e diagnóstico. Historicamente, a quitosana, seus derivados e nanopartículas de quitosana estão entre as classes mais extensivamente estudadas de materiais naturais de biopolímeros para aplicações biomédicas (Ramya, Venkatesan et al. 2012).

O objetivo das aplicações mais proeminentes de nanopartículas de quitosana na entrega de medicamentos são frequentemente reduzir os efeitos colaterais dos medicamentos, controlar a taxa de entrega dos medicamentos e garantir que apenas a área-alvo seja tratada (Teare, Spedding et al. 1995). Por exemplo, o metronidazol é um antibiótico com efeitos colaterais comuns de náuseas, vômito, dor epigástrica e secura da boca, provavelmente causadas pelas altas concentrações de metronidazol residual na saliva. Para proteger o metronidazol a droga foi carregada em nanopartículas de quitosana de 200-300 nm, mostrando uma liberação controlada da droga ao longo de 12 h e a dissolução do medicamento em 1 hora foi reduzida de 53% para 30-40% após o aprisionamento nas nanopartículas (Elzatahry and Eldin 2008, Loh, Yeoh et al. 2010).

Liu et al (2016) desenvolveram uma plataforma de nanopartículas para entrega oral de insulina, facilitando a permeação através da camada de muco e epitélio. A nanopartícula possui um núcleo composto de insulina e trimetilquitosana, e um revestimento hidrofílico dissociável “inerte ao muco” de derivado do copolímero N- (2-hidroxipropil) metacrilamida. As nanopartículas demonstraram possuir excelente permeabilidade através do muco e contato com eficiência a superfície da célula epitelial subjacente. Foram capazes de gerar

excelente resposta hipoglicêmica e aumentar a concentração sérica de insulina após administração oral em ratos diabéticos (Liu, Zhang et al. 2016).

As nanopartículas com quitosana demonstram resultados promissores para uso *in vivo* como veículo de entrega de drogas e materiais de diagnóstico. No, entanto, é essencial entender como as nanopartículas interagem com células e órgãos para garantir sua segurança em relação à exposição clínica ou ambiental. Por exemplo, o modelo de peixe-zebra (*Danio rerio*) foi usado para avaliar a toxicidade das nanopartículas em vários níveis, incluindo a taxa de mortalidade, efeito teratogênico, neurotoxicidade, hepatotoxicidade e genotoxicidade. Este modelo foi utilizado em diferentes estudos de nanotoxicologia (Hu, Qi et al. 2011, Wang, Zhou et al. 2016, Yuan, Li et al. 2016, Abou-Saleh, Younes et al. 2019, Younes, Pintus et al. 2019). Yuan et al (2016) mostraram que nanopartículas de quitosana modificadas com polissorbato 80 induzem toxicidade no desenvolvimento dos embriões, incluindo diminuição na taxa de eclosão, bem como aumento na mortalidade e na incidência de deformidades, de forma dose-dependente (Yuan, Li et al. 2016). Em *Caenorhabditis elegans* expostos por 48h a nanopartículas de quitosana estabilizadas com tripolifosfato, observou-se um aumento na mortalidade de forma dependente da dose (Jacques, Oliveira et al. 2017).

As nanopartículas de quitosana podem facilitar a entrega de drogas através das barreiras celulares e causar, transitoriamente, a abertura das junções estreitas entre as células epiteliais (Dodane, Khan et al. 1999). Portanto, existe a possibilidade de que as nanopartículas de quitosana possam se translocar do trato gastrointestinal, cavidade nasal ou sacos alveolares para a circulação sistêmica, causando toxicidade ao corpo humano. Vários estudos abordando a citotoxicidade de nanopartículas de quitosana foram relatados (Ma and Lim 2003, Qi, Xu et al. 2005). Foi demonstrado que as nanopartículas de quitosana com um tamanho de partícula de 40 nm provocam efeitos inibitórios dependentes da dose na proliferação de uma linha celular tumoral, sendo que as nanopartículas de quitosana apresentaram citotoxicidade muito maior do que a quitosana (Qi, Xu et al. 2005). Outros estudos indicaram que as nanopartículas de quitosana tinham perfis de citotoxicidade contra células A549 comparáveis aos dos materiais de quitosana dissolvidos correspondentes (Huang, Khor et al. 2004). Além disso, LOH et al (2010) relataram as interações biológicas entre

células do fígado e as nanopartículas de quitosana, na qual demonstraram que podem internalizar nas células, reduzindo a viabilidade e proliferação celular e comprometendo a integridade da membrana celular. Desta maneira, é importante que estudos adicionais sobre a toxicidade da nanopartículas de quitosana sejam realizados, especialmente em modelos *in vivo*, a fim de se determinar a segurança deste nanomaterial para o meio ambiente e para a saúde humana (Loh, Yeoh et al. 2010).

2.3.1.5 Eudragit®

Até a década de 1950, toda medicação oral, mesmo a mais moderna, tinha uma grande desvantagem: não era possível controlar o tempo ou o local de liberação das substâncias ativas. O desenvolvimento do Eudragit® pela Röhm & Haas GmbH em Darmstadt foi a solução para este problema. Quando os medicamentos chegaram ao mercado com um revestimento de Eudragit®, um novo capítulo na história farmacêutica havia começado. Os primeiros revestimentos de drogas desenvolvidos em 1953 eram solúveis, alcalinos e, assim, resistentes a ácidos estomacais. As substâncias ativas, portanto, não eram liberadas no estômago, mas no intestino, onde deveriam ser ativadas (Wade and Weller 1994).

Eudragit®, figura 9, são polímeros sintéticos obtidos por polimerização de ácido acrílico (pro-ácido 2-enóico; $\text{CH}_2=\text{CHCOOH}$) e ácidos metacrílicos ou seu éster butílico ou éster dimetilaminoetílico. Sendo polímeros sintéticos, os Eudragit® são fornecidos em formas amplamente reproduzíveis, em comparação com derivados celulósicos, cujas propriedades físico-químicas podem variar dependendo da fonte de matéria-prima. Copolímeros de metacrilato são sintetizados via polimerização de radical livre, em que vários derivados de acrilato e metacrilato são incorporados no polímero por reação de cadeia crescente (Elias 2009).

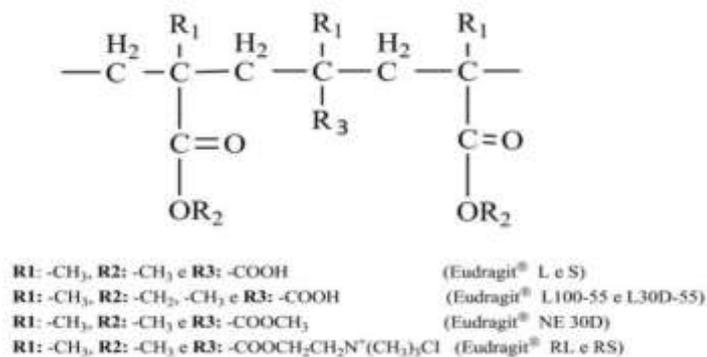


Figura 9 Estrutura química de vários tipos de Eudragit[®] (Fonte: (Vandamme, Lenourry et al. 2002).

Diferentes Eudragit[®] estão disponíveis comercialmente e são fornecidos em várias formas, tais como pó seco, grânulos, dispersão aquosa ou solução orgânica. A flexibilidade de combinar os diferentes polímeros permite que se alcance um perfil de liberação do medicamento desejado ao alvo certo no momento certo, e se necessário, durante um período de tempo desejado. Outras funções importantes são a proteção da umidade e mascaramento de sabor/odor. As propriedades físico-químicas do Eudragit[®] são determinadas pelos seus grupos funcionais (Rowe, Sheskey et al. 2009, Nikam, Kotade et al. 2011). O Eudragit[®] E catiônico (solúvel em pH abaixo de 5,5) tem aplicação no mascaramento de sabor; Eudragit[®] L e S aniônico (solúvel em pH acima de 6 e 7 respectivamente) são usados no direcionamento do revestimento cólon/entérico; tipos neutros de Eudragit[®] RL e RS (solúveis independentes do pH), bem como Eudragit[®] NE e NM (expansíveis e permeáveis) são usados na entrega de fármacos de liberação sustentada (Thakral, Thakral et al. 2013). Algumas propriedades exclusivas, como boa estabilidade, baixa toxicidade, capacidade de dilatação em meio aquoso e alta permeabilidade o tornam um candidato adequado para fins de transporte de fármacos. Essas características podem subsequentemente maximizar a absorção celular do complexo droga-polímero. Já foi descrito anteriormente que o Eudragit[®] aumenta a biodisponibilidade de vários fármacos (Payab, Jafari-Aghdam et al. 2014, Jafari-Aghdam, Adibkia et al. 2016, Garjani, Barzegar-Jalali et al. 2018). Ainda há vários desafios a serem suplantados pela indústria farmacêutica, principalmente na melhoria do perfil de dissolução, liberação, absorção e

principalmente no que se refere a sua baixa biodisponibilidade (Huang, Li et al. 2011). Neste contexto, o uso de copolímeros entéricos para a obtenção de micropartículas ou partículas, contendo fármaco de interesse, oferece vantagens potenciais na forma de liberação controlada que possa melhorar as características e biodisponibilidade dos fármacos (Huang, Wigent et al. 2008). Alotaibi et al (2019) formularam comprimidos de diclofenaco de sódio oralmente dispersíveis, revestidos com uma camada do polímero entérico de Eudragit® L100 e uma segunda camada de Eudragit® E100 para mascarar o sabor amargo e a irritação local para o estômago. Os comprimidos projetados foram seguros e não irritantes para o estômago, com liberação rápida de diclofenaco de sódio no intestino. Os comprimidos obtidos mostraram alta qualidade com propriedades exclusivas desejadas (Alotaibi, Elsamaligy et al. 2019).

Eudragit® RL100 e Eudragit® RS100 foram escolhidos como matriz para desenvolver filmes autoadesivos transdérmicos de piroxicam como um protótipo para substituir as formulações orais. A taxa de liberação da droga prolongada indicou que o filme autoadesivo transdérmico pode ser adequado para o tratamento a longo prazo da dor crônica, melhorando a adesão do paciente na terapia e reduzindo as reações adversas, por exemplo, gastrite e úlceras pépticas que poderiam ocorrer ao tomar a dosagem na forma oral (Chantasart, Tocanitchart et al. 2018).

O Eudragit® é um material polimérico não tóxico, facilmente absorvido por via oral e é amplamente utilizado em revestimento e formação de filmes. Nos últimos anos, tem sido usado para preparar microcápsulas e nanoformulações para melhorar a solubilidade de drogas pouco solúveis em água e sua biodisponibilidade. Neste sentido, Öztürk et al (2019) desenvolveram nanopartículas de cetoprofeno lisina com o polímero Eudragit® S100, para aplicação oral de analgésico, que demonstraram pela alta eficiência de encapsulação uma liberação sustentada em até 48 h e assim aumentando a eficácia terapêutica da formulação preparada (Öztürk, Çinar et al. 2019). AKHLAQ et al (2016) demonstraram que nanopartículas de dexibuprofeno – Eudragit podem melhorar a biodisponibilidade de dexibuprofeno, aumentando sua solubilidade e permeabilidade (AKHLAQ, BAKHSH et al. 2016). Na mesma linha, Selselehjonban e colaboradores (2019) produziram nanoformulações contendo carvedilol revestidas com Eudragit® de forma eficaz usando

eletrospraying como uma técnica econômica que pode ser efetivamente aplicada para melhorar as características físico-químicas e efeito farmacológico do carvedilol (Selselehjonban, Garjani et al. 2019).

Devido à estabilidade do Eudragit® na presença de enzimas digestivas e fluidos corporais, são então conhecidos como polímeros não biodegradáveis. Estudos detalhados de toxicidade cinética aguda e toxicidade oral subcrônica, genotoxicidade e toxicidade reprodutiva de Eudragit® E confirmam a ausência significativa de toxicidade pelas vias dérmicas e oral (Eisele, Haynes et al. 2013). Estudo de toxicidade não revelaram efeito tóxico evidente para nanopartículas brancas ou carregadas com silimarina utilizando Eudragit® RS100 e Eudragit® LS100 por via oral em ratos. Os resultados deste estudo sugeriram que essas nanopartículas são seguras e oferecem aprimoramento nas propriedades hepatoprotetoras da silimarina (El-Nahas, Allam et al. 2017). Safar et al (2015) comparou o efeito de nanopartículas de Eudragit® vazias e NPs carregadas com S-Nitrosoglutathione, na viabilidade e crescimento celular na linha de células monocíticas humanas THP-1. A ausência de qualquer alteração das estruturas celulares significa ausência de citotoxicidade, e isso está relacionado ao modo de absorção dessas NPs, que ocorre por endocitose. Este processo depende de pelo menos duas vias diferentes mediadas por clatrina e caveolinas. A nanoformulação de S-Nitrosoglutathione se mostrou uma promissora opção terapêutica para a entrega de óxido nítrico (Safar, Ronzani et al. 2015).

Suspensões de NPs poliméricas quando carregadas com fármacos para via ocular prolongam a liberação e melhoram a sua disponibilidade. Para verificar a ausência de toxicidade em estruturas oculares, nanopartículas de Eudragit® RS e RL brancas foram aplicadas nos olhos de coelhos. Após 24 horas da aplicação, nenhum efeito irritante na córnea, íris e conjuntiva foram observados, demonstrando que as NPs de Eudragit® podem ser um carreador inerte adequado para administração oftálmica de fármacos (Pignatello, Bucolo et al. 2002).

A avaliação da toxicidade de NPs brancas ou carregadas com naringina, utilizando o polímero Eudragit®, foi estudada em modelos alternativos por (Budel, da Silva et al. 2020). A toxicidade das formulações foi avaliada *in vitro* em fatias do hipocampo de rato e modelo *in vivo* com *C. elegans* e *Danio rerio* (peixe-zebra). Não houve indicativo de toxicidade pelas nanocápsulas nos

ensaios biológicos avaliados, o que demonstra como este polímero pode ser bastante promissor para novas nanopartículas contendo fármacos.

2.3.1.6 Nanopartículas de curcumina

Apesar de seus inúmeros efeitos benéficos, a curcumina apresenta algumas limitações, como baixa solubilidade em água (hidrofóbica), estrutura química instável, sendo rapidamente metabolizada, mas pouco absorvida pelo organismo, bem como sua utilização ou biodisponibilidades variando dependendo da espécie e sexo (Gupta, Aseh et al. 2009). Além disso, a curcumina é um substrato para a glicoproteína-P (Pgp), uma bomba de efluxo de droga transmembrana dependente de ATP que expelle a curcumina da membrana intestinal, limitando assim sua permeabilidade (John, Xie et al. 2013, Hu, Shi et al. 2015). Esses obstáculos da curcumina podem ser eliminados pela síntese de nanopartículas de curcumina, lipossomas, micelas e complexos fosfolipídicos que podem ser usados para fins de circulação mais longa, permeabilidade e maior resistência aos processos metabólicos (Mohanty, Das et al. 2012). Os produtos químicos modificados pela nanotecnologia provaram ser altamente eficazes para a administração de medicamentos e direcionar o tecido necessário (Goldberg, Langer et al. 2007).

A curcumina, na forma de nanopartícula, é uma forma amplamente estudada para aumentar a biodisponibilidade e a solubilidade da curcumina lipofílica (Ghalandarlaki, Alizadeh et al. 2014, Rahmani, Golian et al. 2017). Kurita et al (2013) assim como Hani et al (2014), relataram que a solubilidade e a taxa de absorção da nanocurcumina são maiores do que a forma normal de curcumina (Kurita and Makino 2013, Hani and Shivakumar 2014). Além disso, as nanopartículas de curcumina podem ser mais biodisponíveis e ter ampla distribuição nos tecidos em modelo de ratos Sprague-Dawley (Ma, Shayeganpour et al. 2007, Song, Feng et al. 2011). Nanossuspensões de curcumina sintetizadas pelo método de precipitação usando lauril sulfato de sódio e polivinilpirrolidona K-60 apresentaram solubilidade aquosa três vezes maior, maior estabilidade e melhor taxa de dissolução em comparação com a curcumina livre (Furrianca, Alvear et al. 2017). Shen e colaboradores (2019) mostraram que nanoemulsões aumentaram a bioacumulação de curcumina em *C. elegans* e confirmaram o efeito de redução de gordura corporal (Shen, Zhang

et al. 2019). NPs poliméricas são os nanossistemas mais estudados para o bioaprimoramento da curcumina. NPs com Eudragit® RLPO carregadas com curcumina apresentaram rápida liberação de curcumina com $91 \pm 5\%$ liberados em 1 h (Li, Lee et al. 2015). Boarescu et al, 2021, mostrou que a administração de nanopartículas de curcumina antes da indução de diabetes melitus tipo 1 protege as células beta, reduz os níveis séricos de glicose e oferece um nível mais alto de peptídeo C, um efeito melhor que do a curcumina convencional (Boarescu, Boarescu et al. 2021).

Entretanto, os estudos toxicológicos com os materiais que compõem as nanocápsulas para carrear fármacos ainda são muito incipientes. Muito se deve pelas questões bioéticas envolvidas nas avaliações com mamíferos. Para acelerar estes estudos importantes e ainda assim respeitar a política dos 3Rs (do inglês refine, replace, reduce), o uso de modelos alternativos como o *C. elegans* vem crescendo na nanotoxicologia.

2.4 *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) é um nematoide que se alimenta de fungos e bactérias do solo e de frutas em decomposição. Com pouco mais de 1 mm de comprimento, os adultos podem ser vistos a olho nu. Desde a caracterização inicial do modelo por Sydney Brenner na década de 1960, a pesquisa de *C. elegans* tem sido essencial na elucidação de vários aspectos básicos da biologia (White, Southgate et al. 1986). A capacidade de cultivar centenas de animais em uma única placa de Petri alimentando-se de bactéria, sua transparência, um ciclo de vida rápido (3 dias), uma vida útil curta (2-3 semanas) e crescimento fácil e barato no laboratório tornam estes vermes um modelo ideal para avaliação de efeitos biológicos (Riddle, Blumenthal et al. 1997). Avanços na genética e biologia molecular permitiram a identificação de todas as suas 959 células. O *C. elegans* foi o primeiro organismo multicelular com o genoma totalmente sequenciado (1998) (Shaye and Greenwald 2011). O tamanho do genoma é aproximadamente 100 milhões de pares de bases de comprimento e, embora seja notavelmente menor que o genoma humano, ambos os genomas têm um número semelhante de genes (vermes 20.000 genes; humanos 23.000). Há uma sobreposição substancial entre *C. elegans* e humanos com relação a genes e vias bioquímicas. As análises de bioinformática

sugerem que 60 – 80% dos genes do *C. elegans* são homólogos aos genes humanos (Hulme and Whitesides 2011). O número reduzido de células, junto com o número de células invariantes e o destino dentro dos tecidos somáticos, permitiram a identificação de cada célula (WB 1988).

C. elegans são predominantemente hermafroditas, e os machos surgem espontaneamente com uma frequência de aproximadamente 0,1%. Seu corpo é essencialmente um tubo, o trato digestivo dentro de outro tubo, a cutícula e a epiderme. Entre os dois tubos há uma cavidade cheia de fluídos, o pseudoceloma. A anatomia do *C. elegans*, figura 10, inclui os seguintes sistemas: um sistema digestivo, um sistema reprodutivo, sistema nervoso e sistema excretor, todos protegidos pela cutícula. A cutícula do verme, pode ser utilizada como modelo de pele, visto que sua função e composição são semelhantes as da pele humana (Chisholm and Hsiao 2012, Chisholm and Xu 2012). Digno de nota, o intestino de *C. elegans* apresenta uma arquitetura celular semelhante em comparação com animais superiores em termos de polaridade celular das células intestinais (enterócitos), incluindo a presença de domínios apicais e basolaterais, junções celulares e microvilosidades (Egberts, Koninx et al. 1984, Borgonie, Claeys et al. 1995, Bossinger and Hoffmann 2012).

Finalmente, os mecanismos de transporte de biomoléculas através das barreiras biológicas são altamente conservadas (Balla and Troemel 2013, Sato, Norris et al. 2014, Wang and Audhya 2014). O *C. elegans* não tem sistema circulatório e depende da difusão passiva no fluído pseudocelômico para o transporte de O₂, CO₂, nutrientes e moléculas exógenas (WB 1988).

O *C. elegans* tem um ciclo de vida rápido: a 25 °C, a embriogênese dura 14 horas e o desenvolvimento pós-embrionário para adulto dura 36 horas. O desenvolvimento pós-embrionário progride através de quatro estágios larvais – conhecidos como L1, L2, L3 e L4 – antes de se tornar adulto produtor de ovos. Os estoques de *C. elegans* podem ser mantidos melhor a 16-25 °C, normalmente a 20 °C. Mesmo com escassez de alimento, o verme pode se manter por meses, pois é capaz de entrar em um estágio larval alternativo, denominado dauer, que é adaptado para sobreviver em condições ambientais adversas. O sistema reprodutivo produz gametas maduros (gametogênese) e fornece a estrutura e o ambiente para fertilização e postura de ovos. A espermatogênese começa

durante o estágio larval L4 e se completa no adulto jovem logo após a muda (elegans Atlas).

Hermafroditas produzem ~ 300 embriões por autofecundação. Os ovos fertilizados no útero são expelidos através da vulva. A postura dos ovos é facilitada pela contração dos músculos sexuais, que são regulados pelo sistema nervoso (WB 1988). Vários parâmetros podem ser estudados em *C. elegans*, incluindo número de ovos ou progênie, efeitos no desenvolvimento da progênie ou efeitos na reprodução de diferentes gerações filiais. Assim, o *C. elegans* facilita a experimentação e permite resultados iniciais rápidos no campo da reprotoxicidade (Kim, Kwak et al. 2013).

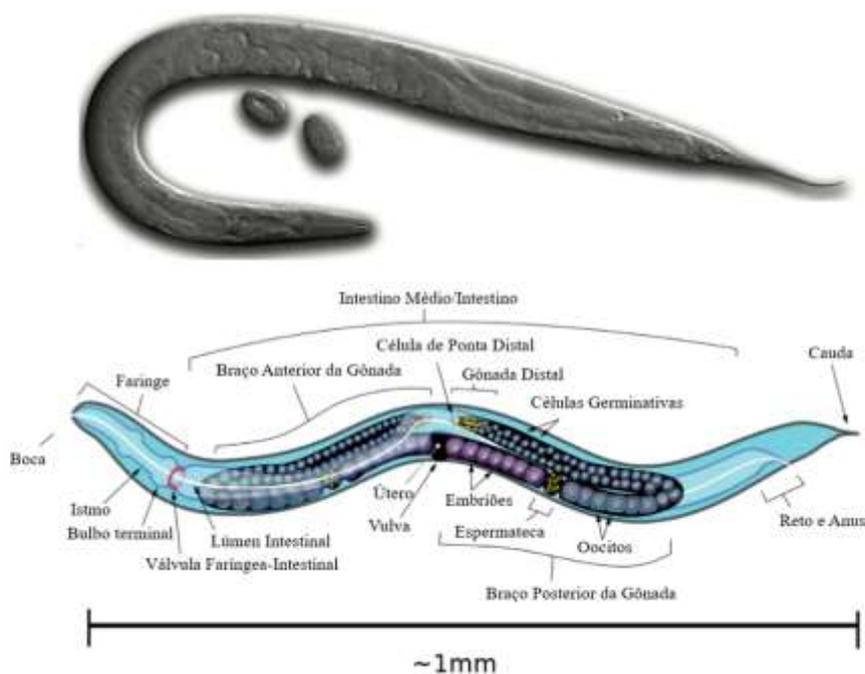


Figura 10: Anatomia e morfologia de *Caenorhabditis elegans*: Na parte superior imagem em microscopia de um exemplar adulto hermafrodita com dois ovos postos. Abaixo, um esquema representativo da anatomia de *C. elegans* (Fonte: <https://www.wormatlas.org/>).

O nematoide *C. elegans* depende de sua defesa imune inata para combater infecções. O sistema imunológico inato é um antigo sistema de defesa do hospedeiro contra patógenos microbianos presentes em uma ampla gama de espécies. Estudos genéticos da imunidade inata em *Drosophila* e mamíferos revelaram uma conservação evolutiva dos mecanismos de sinalização (Medzhitov 2000), o que foi corroborado em parte pelo estudo da imunidade inata

em *C. elegans*. Seu ambiente natural compreende uma comunidade complexa de micróbios como bactérias, fungos e vírus, incluindo muitas espécies de parasitas (Khan, Jain et al. 2018). A infecção pode ocorrer por uma das várias vias em *C. elegans*: cutícula e epiderme, útero, reto ou após a colonização do intestino.

De fato, o *C. elegans* tem um sofisticado sistema sensorial que lhe permite perceber e responder a muitos estímulos físicos e químicos diferentes, resultando em atração apropriada por substâncias nutritivas ou repulsão por fatores nocivos. Os vermes são capazes de distinguir entre diferentes bactérias alimentares (Andrew and Nicholas 1976) e, uma vez confrontando com patógenos, podem se afastar do alimento tóxico ou interromper sua ingestão (Schulenburg and Müller 2004). Por outro lado, o verme carece de muito dos receptores de superfície celular e intracelulares envolvidos na imunidade inata em outras espécies (Kurz and Ewbank 2003). Não existem, por exemplo, ortólogos de proteínas de reconhecimento de peptidoglicanos, ou de proteínas de ligação Gram-negativas, ou de receptores do tipo NOD. Um único gene TLR em *C. elegans* (*tol-1*) modula respostas comportamentais a bactérias patogênicas (Labrousse, Chauvet et al. 2000, Pradel, Zhang et al. 2007). Foi sugerido que, TOL -1 expresso em neurônios quimiossensoriais, pode contribuir para o reconhecimento de uma molécula associada a patógenos, o que, por sua vez, levar a uma mudança no comportamento do verme.

Embora *C. elegans* não tenha imunidade mediada por células, o trabalho de vários grupos revelou uma abordagem imunológica inata complexa para resistência a doenças, incluindo comportamentos de evitação (Pradel, Zhang et al. 2007) e barreiras físicas (Gravato-Nobre, Stroud et al. 2011). Para a imunidade sistêmica, acredita-se que o animal dependa puramente da secreção e ação de moléculas antimicrobianas, incluindo lectinas (Mallo, Kurz et al. 2002, O'Rourke, Baban et al. 2006, Wong, Bazopoulou et al. 2007, Schulenburg, Hoepfner et al. 2008), lisozimas (Mallo, Kurz et al. 2002, Murphy, McCarroll et al. 2003, Huffman, Abrami et al. 2004, O'Rourke, Baban et al. 2006, Shapira, Hamlin et al. 2006, Alper, McBride et al. 2007, Wong, Bazopoulou et al. 2007, Evans, Kawli et al. 2008, Marsh, van den Berg et al. 2011) e fatores antimicrobianos (Kato, Aizawa et al. 2002, Pukkila-Worley, Ausubel et al. 2011). Foi demonstrado que ambas as linhas de defesa são reguladas por várias vias

de sinalização, das quais a p38 e a quinase regulada por sinal extracelular (ERK) proteína quinase ativada por mitógeno (MAPKs), sinalização de insulina/DAF-1 e fator de crescimento transformador das vias β (TGF- β) / DBL-1 são as mais significativas.

Evidências adicionais para o possível envolvimento do sistema nervoso do verme na defesa surgiram recentemente a partir da descoberta de que mutações de perda de função na proteína daf-2, que codifica um receptor semelhante a insulina, e age-1 aumentam a resistência em vermes expostos a certas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Garsin, Villanueva et al. 2003). O gene *daf-2* de *C. elegans* era conhecido anteriormente por seu papel no aumento da longevidade e aumento da resistência a diversos fatores de estresse (Guarente and Kenyon 2000), e o controle dessa via depende criticamente de entradas do sistema nervoso (Wolkow, Kimura et al. 2000).

O nematoide tem sido usado como modelo hospedeiro, para estudos de infecção com patógeno oportunista humano *Pseudomonas aeruginosa*, para identificar mecanismos evolutivamente conservados da imunidade inata (Gravato-Nobre and Hodgkin 2005, Kim and Ausubel 2005).

O lipopolissacarídeo (LPS) é um dos principais constituintes do envelope externo de todas as bactérias Gram-negativas, o que é essencial para sua patogenicidade, atuando como uma potente molécula pró-inflamatória (Sivamaruthi, Prasanth et al. 2015). O LPS desempenha um papel importante no desenvolvimento da sepse por evocar a liberação de uma série de fatores inflamatórios, podendo levar a respostas imunes desreguladas, causando falência de múltiplos órgãos, desencadeando sepse e levando a morte (Ramachandran 2014, Rosadini and Kagan 2017).

Em um trabalho de Mallo et al. (2002) destinado a determinar se *C. elegans* responde ao ataque de patógenos com resposta imune inata foi usada uma análise de perfis transcricionais para identificar uma variedade de genes induzíveis por patógeno (Mallo, Kurz et al. 2002). Além disso, Kim e colaboradores (2002) realizaram uma triagem genética direta para mutantes de *C. elegans* com maior suscetibilidade a *Pseudomonas aeruginosa* e foram identificados dois genes que fazem parte da via de sinalização p38 MAPK. Em mamíferos, p38 MAPK está envolvida na mediação da resposta imune ao LPS bacteriano e *C. elegans* desempenha um papel semelhante (Kim, Feinbaum et

al. 2002). A via de sinalização p38 MAPK de mamíferos é conhecida por mediar respostas de estresse e é ativada por choque térmico, luz ultravioleta (UV), citocinas pró- inflamatórias IL-1 ou TNF- α , ou LPS bacteriano (Freshney, Rawlinson et al. 1994, Han, Lee et al. 1994, Rouse, Cohen et al. 1994).

Uma consequência da ativação de p38 em células mamíferas é a morte celular programada ou apoptose. Em *C. elegans*, a apoptose, apresenta altos níveis quando ativado por estresse ao se alimentar de *Salmonella* ou em resposta à irradiação (Gartner, Milstein et al. 2000, Aballay and Ausubel 2001). Ma e colaboradores (2020) demonstraram que a exposição ao LPS induziu a apoptose assim como danos oxidativos em *C. elegans* (Ma, Xu et al. 2020). Em outro estudo, efeitos do LPS em *C. elegans* alterou fenótipos comportamentais, causando reduções significativas nas frequências de reversões e voltas ômeegas (Ma, Wang et al. 2020).

Embora o *C. elegans* não tenha um sistema imunológico adaptativo como mamíferos, a exposição ao LPS pode desencadear uma resposta imune inata nesse organismo. Levando a mudanças no comportamento, aumento da expressão de genes relacionados à resposta imunológica e produção de moléculas efetoras.

Desta forma, este nematoide surgiu como uma ferramenta para a descoberta e medicamentos em diferentes modelos de doenças bem como para ensaios de segurança de novas moléculas, pois suas propriedades o tornam um excelente candidato para a triagem e alto rendimento baseada em todo o organismo. As principais vantagens do uso de *C. elegans* na triagem de alto rendimento incluem: 1) a capacidade de modelo de doenças humanas complexas que não podem ser facilmente reproduzidas *in vitro* ou em modelos unicelulares, 2) a capacidade de avaliar simultaneamente a eficácia e absorção da droga, distribuição, metabolismo, excreção ou características de toxicidade, 3) um grande repertório de fenótipos classificáveis, 4) a complexidade do sistema multicelular e de múltiplos órgãos existente em um organismo inteiro aumenta as chances de identificar drogas que serão mais eficazes em organismos multicelulares mais complexos, como humanos, 5) a disponibilidade de ferramentas genéticas e recursos genômicos (por exemplo RNAi) que simplificam a identificação de alvos de drogas (Kaletta and Hengartner 2006, Arya, Das et al. 2010, Giacomotto and Ségalat 2010).

Recentemente, há uma tendência crescente de uso de *C. elegans* na avaliação da biossegurança de nanopartículas. Pesquisadores conseguem investigar os efeitos biológicos de NPs em estágios iniciais. A caracterização *in vivo* imediata de NPs após a síntese abre oportunidades para a sua rápida otimização, eliminando a necessidade de ensaios demorados baseados em cultura de células e supera as dificuldades envolvidas no uso de modelos de mamíferos. É importante notar que o uso de *C. elegans* está em conformidade com os princípios ético amplamente aceitos, conhecidos como os 3 Rs, para experimentos com animais que são: Redução do uso de animais superiores, Refinamento das técnicas atuais e, por fim, substituição de animais por modelos alternativos (Gonzalez-Moragas, Roig et al. 2015).

3 JUSTIFICATIVA

A pandemia da COVID-19 tem se apresentado como um dos maiores desafios sanitários em escala global deste século. Diante do cenário mundial foi necessário que pesquisadores e autoridades de saúde rapidamente encontrassem respostas para tentar conter o número de infectados e, principalmente, de vítimas fatais da doença. Tendo em vista o tempo e custos para o desenvolvimento de um novo fármaco, estratégias têm sido usadas para o tratamento da COVID-19. Compostos naturais à base de plantas medicinais têm sido investigados e a Curcumina têm demonstrado efeitos benéficos na progressão de doenças inflamatórias devido aos seus inúmeros mecanismos de ação, o que a tornam um alvo promissor no tratamento adjuvante da COVID-19. A fim de facilitar a aplicação da curcumina e melhorar sua estabilidade e biodisponibilidade, foi desenvolvida nanocápsulas carregadas com curcumina com o polímero Eudragit.

Apesar do crescente e significativo uso da nanotecnologia, até o momento, pouco se sabe sobre sua possível toxicidade e segurança. Para tal, é necessário o uso de modelos alternativos que permitam este estudo de maneira rápida e eficiente e que respeitem a política dos 3Rs (do inglês *reduce, refine, replace*). Neste contexto, o presente estudo se justifica pela importância de se investigar a segurança de nanocápsulas que serão utilizadas para o carregamento de curcumina, e assim, tornarem-se adjuvantes no combate da doença causada pelo SARS-CoV-2.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

O objetivo do estudo foi avaliar desfechos toxicológicos em *C. elegans* expostos a nanocápsulas preparadas com diferentes revestimentos e, posteriormente, desenvolver e avaliar a segurança e atividade anti-inflamatória de nanocápsulas carregadas com curcumina, utilizando a nanoformulação mais segura e com potencial anti-inflamatório no nematoide.

4.2 Objetivos específicos

- Verificar se a exposição aguda e crônica às nanocápsulas com diferentes revestimentos alteram de maneira significativa parâmetros de toxicidade em *C. elegans*;
- Avaliar se as diferentes nanocápsulas induz estresse oxidativo ao *C. elegans*;
- Definir qual a nanocápsula mais segura utilizando *C. elegans*;
- Desenvolver nanocápsulas carregadas com o bioativo curcumina;
- Verificar se as exposição aguda e crônica às nanocápsulas de curcumina alteram de maneira significativa parâmetros de toxicidade em *C. elegans*;
- Avaliar o efeito protetor das nanocápsulas carregadas com curcumina na sobrevivência de *C. elegans* com inflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS).

A metodologia, resultados e discussão desta tese estão apresentados sob a forma de um Artigo Científico e um Manuscrito. O primeiro Artigo Científico foi publicado no ano de 2023 na revista “ *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* ”. O Manuscrito será submetido para avaliação e publicação em revistas especializada com Qualis CAPES.

Desta forma, este capítulo inclui na íntegra as produções que avaliaram *in vivo* as nanopartículas desenvolvidas e propõe, por meio do Manuscrito, finalizar o objetivo desta Tese.

5 ARTIGO CIENTÍFICO

Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 263 (2023) 109477



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Biochemistry and Physiology, Part C

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cbpc

Research article

Safety assessment of different unloaded polymeric nanocapsules in *Caenorhabditis elegans*Danielle Araujo Agarrayua^{a,b}, Ana Claudia Funguetto-Ribeiro^{b,c}, Paula Trevisan^a, Sandra Elisa Haas^{b,c}, Daiana Silva Ávila^{a,b,*}^a Grupo de Pesquisa em Bioquímica e Toxicologia em *Caenorhabditis elegans* (GBToxCe), Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, Uruguaiiana, Brazil^b Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA, CEP 97500-970 Uruguaiiana, RS, Brazil^c Laboratório de Nanobiotecnologia, Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, Uruguaiiana, Brazil

ARTICLE INFO

Edited by Martin Grosell

Keywords:

Polymers
Nanotoxicology
C. elegans
Unloaded nanocapsules

ABSTRACT

Nano-sized drug delivery systems have been the subject of intense research in recent years because polymeric materials allow the absorption and release of active substances in a controlled manner. Despite the benefits, the safety of nanoparticulate systems is an aspect to be understood, particularly in vivo systems. *Caenorhabditis elegans* is a very useful alternative model for nanotoxicology and has been recently applied in this field. The aim of this study was to evaluate toxicological endpoints in *C. elegans* exposed to nanocapsules (NC) prepared with different coatings: polysorbate 80 (NCP80); polyethylene glycol (NCPEG), Eudragit® RS 100 (NCEUD) and chitosan (NCCS). Nanocapsules were prepared by nanoprecipitation method and showed acceptable physico-chemical characterization. Polyethylene glycol nanocapsules and chitosan nanocapsules increased worms lethality in a dose-dependent manner in acute exposure; polysorbate 80 nanocapsules, polyethylene glycol nanocapsules and chitosan nanocapsules also increased lethality following chronic exposure. Chitosan nanocapsules were the most toxic in all exposures, demonstrating toxicity even at low concentrations. Reproduction and body length were not affected by any of the nanocapsules exposures. The expression of superoxide dismutase showed that polysorbate 80 nanocapsules at the highest concentration slightly increased SOD-3::GFP expression. On the other hand, chitosan nanocapsules exposure blunted SOD-3 expression. This work demonstrates the toxicological differences between nanocapsule produced with different coatings and indicates higher safety for the use of eudragit nanocapsule in new formulations for future drug delivery and targeting systems.

1. Introduction

Nanotechnology is an attractive platform that has grown over the past two decades and has transitioned from cutting-edge to applied technologies. Nanoscale-sized particles, or nanoparticles (NP), have emerged as promising tools with wide applications in drug delivery, diagnostics, cosmetics and several other biological and non-biological areas (Najahi-Missaoui et al., 2021). Nanocarriers can protect the drugs from degradation and enable sustained and controlled release (Dos Santos et al., 2021; Vieira et al., 2016). Furthermore, nanoparticles (NP) have the potential to decrease clearance and improve accumulation of the drugs in unhealthy tissue, thereby increasing therapeutic efficacy and reducing side effects (Ferrari, 2010). Nanoparticles can be engineered to have specific physicochemical properties, including size,

surface charge, hydrophobicity/hydrophilicity, and geometry, depending on their application (Barua et al., 2013; Hu et al., 2018; Rizvi and Saleh, 2018). These features allow for more effective delivery of therapeutic agents to the desired sites of action (de Oliveira Pacheco et al., 2022; Michels et al., 2019; Rizi et al., 2022; Vieira et al., 2016).

Despite the many advantages of these NP, it is imperative to assess their potential toxicity and to develop safety tests that can accurately predict their potential toxicity (Mukherjee et al., 2019). It is known that physicochemical properties such as surface charge or hydrophobicity are key parameters that define the nanocarrier toxicity (Farace et al., 2016).

Recently, there is an increasing trend of using various model organisms for the biosafety assessment of NPs and *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) is one among them (Pascoli et al., 2019; Velasques et al.,

* Corresponding author at: Grupo de Pesquisa em Bioquímica e Toxicologia em *Caenorhabditis elegans* (GBToxCe), Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, Uruguaiiana, Brazil.

E-mail address: daianaavila@unipampa.edu.br (D.S. Ávila).

<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109477>

Received 22 April 2022; Received in revised form 16 September 2022; Accepted 25 September 2022

Available online 28 September 2022

1532-0456/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

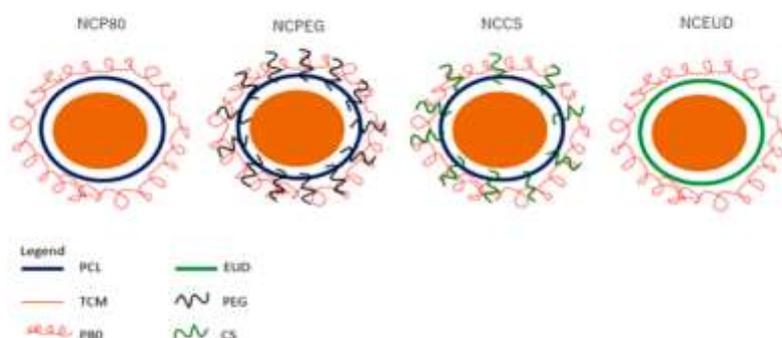


Fig. 1. Representative scheme of the nanocapsules with the different coatings. NCP80 (unloaded polysorbate-coated poly(E-caprolactone) nanocapsules); NCPEG (unloaded PEG-coated poly(E-caprolactone) nanocapsules); NCCS (unloaded chitosan-coated poly(E-caprolactone) nanocapsules); NCEUD (unloaded polysorbate-coated Eudragit® RS100 nanocapsules).

2018; Wu et al., 2019). *C. elegans* has systems that are similar to vertebrates, which allow the findings in *C. elegans* to be reliable and translatable to mammals (Huang et al., 1999; Hunt, 2017; Marsh and May, 2012). *C. elegans* studies with polymeric nanoparticles are incipient but promising, as it allows the assessment of nanotoxicity outcomes such as reductions in body length, progeny and locomotion behavior, in addition to their effects on survival and life expectancy (Gonzalez-Moragas et al., 2015; Li et al., 2012; Pascoli et al., 2019; Scharf et al., 2013; Velasques et al., 2018). Considering the limited assessments on the toxic effects of polymeric nanocarriers in *in vivo* systems, we aimed to investigate and compare the toxicological characteristics of different nanosystems (Fig. 1) with different quali-composition, highlighting: polysorbate 80 (P80), a non-ionic surfactant commonly used due to its low toxicity (Kaur and Mehta, 2017); polyethylene glycol (PEG) a hydrophilic, biodegradable and biocompatible polymer with low toxicity; Eudragit® RS 100 (EUD) a cationic polymer of methacrylic acid and methyl methacrylate, developed for drug delivery systems (Dos Santos et al., 2021; Gomes et al., 2018; Michels et al., 2019); and chitosan (CS), a natural, biodegradable and positively charged biopolymer with mucoadhesive properties (Arpagaus et al., 2018; Vieira et al., 2016; Wong et al., 2010). Our results demonstrated the biological differences between nanocarrier systems with different coatings, indicating greater safety of Eudragit-coated nanocapsules for future studies in *C. elegans* and other models.

2. Materials and methods

2.1. Chemical and reagents

Poly(ϵ -caprolactone) Molecular Weight 80.000 (PCL), Capric/

Caprylic Triglycerides (TCM), Lipoid® S45, Polysorbate 80 (P80), low molecular weight chitosan (CS), Eudragit® RS100, and polyethylene glycol 4000 (PEG) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Acetone was of pharmaceutical grade. Ultra-purified water was prepared using a Milli-Q Millipore system (Bedford, USA).

2.2. Preparation and characterization of unloaded nanocapsules

NC were prepared by interfacial deposition of preformed polymer (Venturini et al., 2011). Briefly, the organic phase of NCP80, NCPEG, and NCCS was composed by acetone, Lipoid S45, PCL, and TCM (0.07:0.1:0.33, w/w). The organic phase of NCEUD was prepared with acetone, TCM, and Eudragit RS100 in the same proportion. To all groups, this phase was maintained under magnetic stirrer, at 60 ± 1 °C (NCP80, NCPEG, and NCCS) or 40 ± 1 °C (NCEUD), and injected into an aqueous phase, composed of water, and P80; to NCPEG, this phase has been added by PEG 4000. The nanoparticles were concentrated by rotary evaporator until the final volume of 10 mL, except NCCS, which was evaporated to 9 mL, and subsequently adjusted to volume with 0.5 % chitosan solution.

The mean diameter and polydispersity index (PI) were analyzed by dynamic light scattering (DLS) technique (NanoBrook 90Plus, BrookHaven®), in a 1:1000 dilution with distilled water. The zeta potential was evaluated by electrophoretic migration (NanoBrook 90Plus, BrookHaven®), in a 1:1000 dilution, with filtered 1 mM sodium chloride solution. The samples were analyzed using a capillary cell (DTS 1060), and the data were expressed in millivolts (mV). The particles number determination was performed turbidimetry technique (Jäger et al.,

Table 1
Relationship between volume and concentration of particles.mL⁻¹.

Volume (μL)	NCP80	NCPEG	NCEUD	NCCS
5	0.02775×10^{10}	0.03795×10^{10}	0.0233×10^{10}	0.01555×10^{10}
10	0.0555×10^{10}	0.0759×10^{10}	0.0466×10^{10}	0.0311×10^{10}
50	0.2775×10^{10}	0.3795×10^{10}	0.233×10^{10}	0.1555×10^{10}
100	0.555×10^{10}	0.759×10^{10}	0.466×10^{10}	0.311×10^{10}
150	0.8325×10^{10}	1.1385×10^{10}	0.699×10^{10}	0.466×10^{10}

Table 2
Physicochemical characterization of different NCs-coatings and stability.

	pH	Particle size (nm)	PI	Zeta potential (mV)	N ($\times 10^{10}$ particles.mL ⁻¹)
NCP80	6 ± 1	185.82 ± 3.2	0.11 ± 0.02	-49 ± 2	5.55
NCPEG	5.5 ± 0.1	196.37 ± 2.14	0.12 ± 0.02	-48 ± 1	7.59
NCCS	4.0 ± 0.0	198.52 ± 2.23	0.20 ± 0.04	14 ± 0	3.11
NCEUD	5.0 ± 0.0	159.27 ± 2.93	0.08 ± 0.01	20 ± 2	4.66

Data are expressed as means \pm S.D of three measurements.

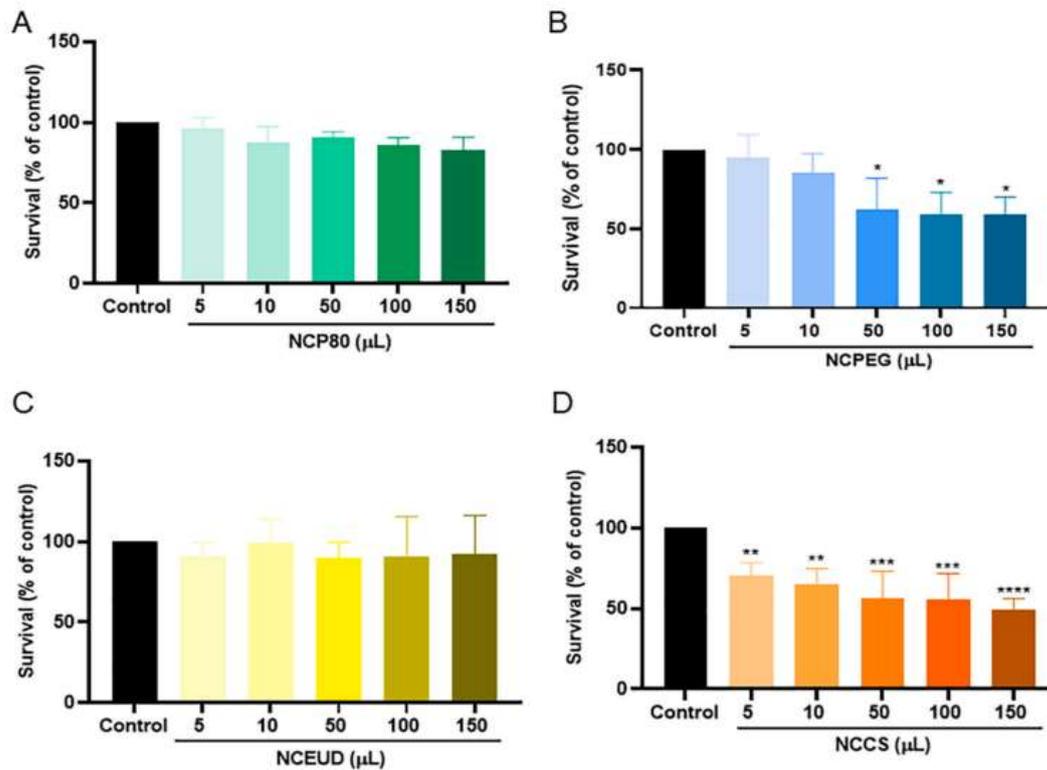


Fig. 2. Survival rate after acute exposure to different concentrations of nanoparticles with different coatings: A) NCP80; B) NCPEG, C) NCEUD and D) NCCS. Data were normalized to percentage of control and results are expressed as means \pm S.D. Data were analyzed by One-way ANOVA followed by Tukey post hoc test. * indicates statistical significance in comparison with control group (untreated = 100 %) $p < 0.05$. The results were acquired from three independent experiments.

2009). NCs were diluted (1:1000) and analyzed through the UV Shimadzu® spectrophotometer, at 395 nm. The results were expressed as number of particles. mL^{-1} (N). The pH of suspensions was analyzed using a previously calibrated potentiometer (Hanna Instruments, São Paulo, Brazil) ($n = 3$), at 25 °C.

2.3. Maintenance of the worms

C. elegans Bristol N2 strain (wild type) and CF1553 (muls84[Pad76 (*sod-3::GFP*)] were obtained from *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC) and maintained on NGM (nematode growth media) plates seeded with bacteria *Escherichia coli*-OP50 at 20 °C (Brenner, 1974). The worms at L1 stage, used in all exposures, were obtained by a synchronization process, which consists in exposing gravid worms to a lysis solution (0.45 N NaOH, 2 % HOCl w/v), in order to isolate eggs. After 14 h the eggs hatched and released the L1 larvae.

2.4. Acute exposure to blank nanoparticles

1500 worms at the first larval stage (L1) were exposed to different concentrations of the polymeric NC formulations for 30 min in liquid medium (0.5 % saline solution). We used same volumes for each treatment, which contained different NC concentration (see Table 1). Afterwards, treatments were removed by three washes with saline solution and then worms were transferred to NGM plates seeded with *E. coli* OP50

for recovery and further assays, 48 h after the end of exposure (Ávila et al., 2012).

2.5. Chronic exposure to polymeric nanoparticles

1500 worms at first larval stage (L1) were exposed to the treatments at different concentrations for 30 min in a liquid medium (0.5 % saline solution) and then directly transferred to petri dishes with NGM and live *Escherichia coli* OP50 with the treatments, for 48 h (Jacques et al., 2017). At the end of exposure, worms were analyzed.

2.6. LC_{50} determination

To determine the lethality of the NC, the surviving worms following treatments were scored. Worms were exposed to the treatment paradigms mentioned above and after 48 h a transparent grid was placed under the NGM plate and 25 quadrants were analyzed under a dissection stereomicroscope. In these quadrants live worms were differentiated from dead worms (motionless and with no reaction to a worm pick) and counted. Experiments were done in duplicates and repeated at least three times. Data were normalized to percentage of control from the day of the experiment. A sigmoidal dose response curve model, with a top constraint at 100 %, was used to draw the curves. Experiments were done in duplicates and repeated at least three times.

2.7. Reproduction assessment

The reproduction was evaluated by counting the brood size after the exposures. Worms from each treatment, as described above, were individually transferred to NGM plates with *E. coli* OP50 daily and worms were allowed to lay eggs. The hatched larvae were counted until the end of the reproductive period of each worm. Experiments were done in triplicates and repeated at least three times (Jacques et al., 2017).

2.8. Body length

Body size was evaluated by images acquired 48 h after of acute and chronic exposures by using inverted microscope Nikon eclipse 50i microscope (Tokyo, Japan). Image J software was used to measure the body lengths (from head to tail) of 5 worms per group, in each experiment. Experiments were repeated at least three times (Charao et al., 2015).

2.9. Expression of SOD-3::GFP

The transgenic strain CF1553 (muls84[Pad76(sod-3::GFP)]) was used to quantify the expression of the antioxidant mitochondrial enzyme superoxide dismutase (SOD-3). The nematodes were synchronized and

subjected to chronic treatment as described above. After 48 h, the treated nematodes were transferred to microscope slides (containing 1 mM levamisole as anesthetic), and the images were analyzed using an epifluorescence microscope (Nikon Eclipse 50i microscope (Tokyo, Japan) connected to a digital camera (SAMSUNG ST64). Image of 5 nematodes from each group were taken, and the relative fluorescence of the entire body was determined using ImageJ software. Three independent assays were performed (Motta et al., 2020).

2.10. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the software GraphPad Prism® version 7 (San Diego, CA, U.S.A.). Comparisons between groups were performed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey post hoc test. Results are expressed as means \pm S.D. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results and discussion

3.1. Physico-chemical characterization

Unloaded polymeric nanocapsules were successfully obtained by nanoprecipitation method (Fessi et al., 1989). PCL and EUD polymers

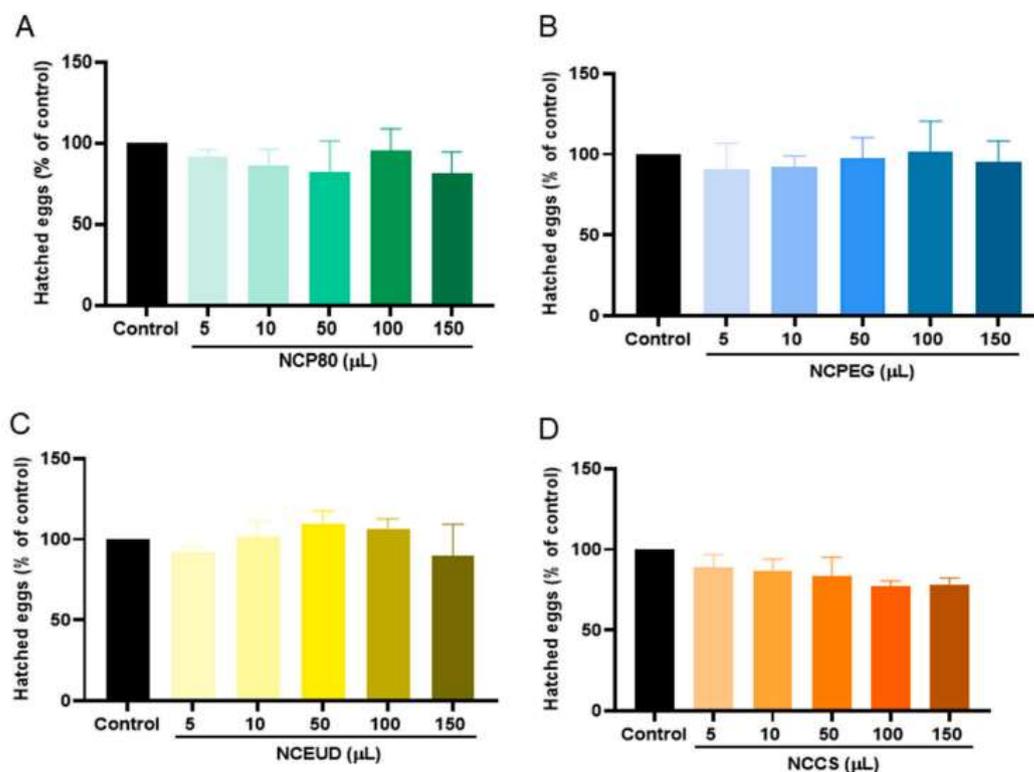


Fig. 3. Brood size after acute exposure. A) NCP80; B) NCPEG, C) NCEUD and D) NCCS. Data were normalized to percentage of control and results are expressed as means \pm S.D. Data were analyzed by One-way ANOVA followed by Tukey post hoc test. The results were acquired from three independent experiments.

were chosen due to their well-established biocompatible and biodegradable characteristics. The physical-chemical characterization (Table 2) demonstrated that the method used to prepare the NC is adequate and includes the values obtained for diameter (nm), PI, pH, zeta potential (mV), and particles number. Macroscopically, the samples presented a homogeneous appearance, opalescent white, characteristic of nanosuspensions, and known as Tyndall Effect.

The particle size obtained for formulations was from 159.27 to 198.52 nm and were very close to each other, corroborating with other nanoparticulate systems developed by our research group (Dos Santos et al., 2021; Pereira et al., 2019; Vieira et al., 2016). Also, the PI values obtained are considered satisfactory and serve as a way to assess the homogeneity of a colloidal system, where values ≤ 0.2 are characteristic of monodisperse systems.

The pH values were physiologically compatible and are normally related to the pH of the aqueous phase. The zeta potential of both formulations was in accordance with the nature of each coating, NCP80 and NCPEG as anionic, and NCCS and NCEUD as cationic. The zeta potential is an important measure that aims to assess the surface charge of nanoparticles and is directly linked to the repulsion or attraction of the particles, as well as the biological behavior of these nanosystems (Fornaguera and Solans, 2018).

3.2. In vivo safety evaluation in *C. elegans*

In this work we exposed *C. elegans* to four different NC in two

regimens: acute (30 min) and chronic (48 h) treatments and assessed physiological endpoints to compare their toxicological profile.

3.3. Acute exposure effects on physiological endpoints

The toxicity investigation started with the effects of the different NC on worm mortality. Fig. 2 shows that the acute exposure to the three highest concentrations of NCPEG (Fig. 2 B) and all concentrations of NCCS (Fig. 2 D) significantly reduced the survival rate when compared to the control. However, NCP80 (Fig. 2 A) and NCEUD (Fig. 2 C) did not change the survival rate of the nematodes at any of the tested concentrations. Our results are in agreement with a study that observed a dose-dependent mortality in worms exposed to PCL polymeric nanoparticles (Moraes et al., 2015) and with another study using chitosan/tripolyphosphate CS/TPP, which demonstrated the high toxicity of this nanosystem (Jacques et al., 2017; Moraes et al., 2015).

On the other hand, Dan et al. (2022) have demonstrated the safety efficacy of the polyethylene glycol-hydroxyapatite nanocomposites in wild type *Drosophila* larvae and adult flies after oral administration. This study showed that the nanocomposite did not affect the development of the larva rather it enhanced the behavioral and antioxidant activity (Dan et al., 2022). Calienni et al. (2019) have demonstrated that PEG functionalized silicon NPs did not alter the cytotoxicity of a tumor cell line (C6 cell lines) at low and high concentrations but caused greater in vivo toxicity in zebrafish larvae. It has been reported that PEG conjugates can form larger aggregates in aqueous solutions, possibly due to their

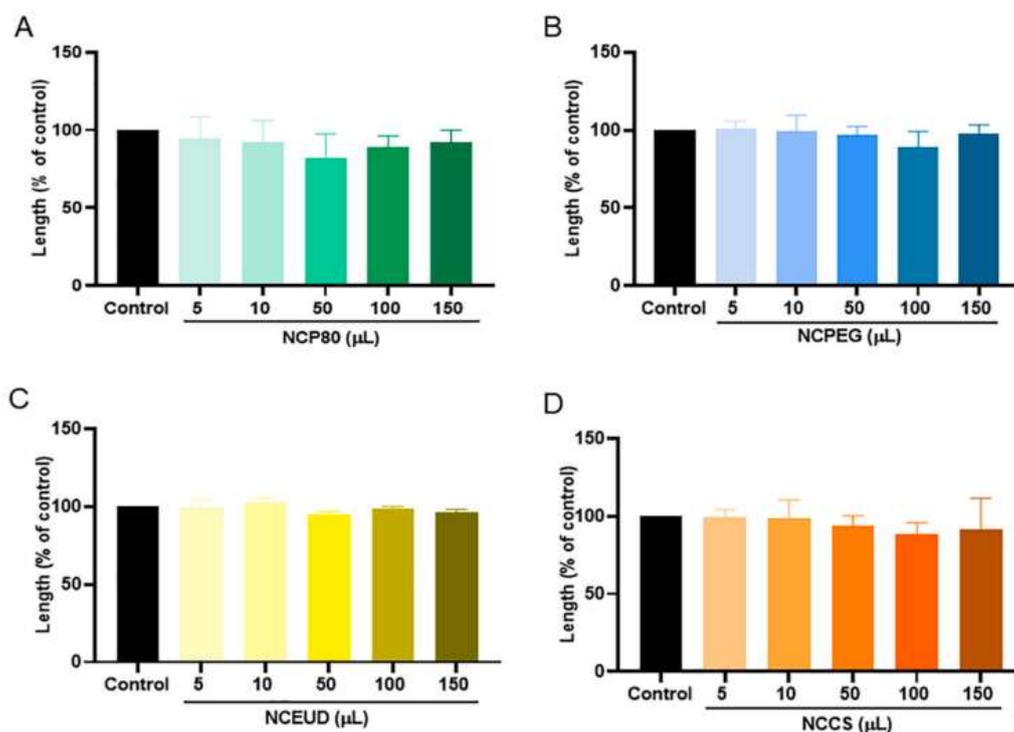


Fig. 4. Body length after acute exposure. A) NCP80; B) NCPEG, C) NCEUD and D) NCCS. Data were normalized to percentage of control and results are expressed as means \pm S.D. Data were analyzed by One-way ANOVA followed by Tukey post hoc test. * Indicates statistical significance in comparison with control group (untreated = 100 %) $p < 0.05$. The results were acquired from three independent experiments.

neutral charge (Calienni et al., 2019; Lillo et al., 2018). The differences in NPs size could interfere with the uptake mechanism involved and the subcellular locations for each NPs, changing the profile of internalization and death cascade triggered in vitro (Lu et al., 2009). Also, it is important to emphasize that the size and surface groups of materials may play a critical role in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of different species (Aillon et al., 2009).

Reproductive toxicity was assessed by estimating the brood size. No NC produced a significant alteration in the progeny number (Fig. 3). Regarding body length, we have found that their body size was not affected after acute treatment with different NC (Fig. 4), thus indicating no developmental impairment. Therefore, we can suggest that a short-term exposure affects survival rate, but surviving worms do not present other signs of exposure. Furthermore, our data indicate that NCCS was the most toxic nanosystem to the nematodes in this acute exposure.

3.4. Chronic exposure effects on physiological endpoints

Following chronic exposure, we observed that the higher concentrations of NCP80 (Fig. 5 A) and the two higher NCPEG (Fig. 5 B) significantly reduced the survival rate of the worms when compared to the control. The results clearly show the higher toxicity of NCCS (Fig. 5 D), which reduced the rate of surviving worms in about 54 % (p -value < 0.01) at 0.1555×10^{10} particles/mL after treatment compared with the control, while the NCEUD (Fig. 5 C) did not change the survival rate of the *C. elegans* at any concentration. Additionally, we did not observe

any toxicity in the brood size assay following chronic exposure with the different formulations at all tested concentrations (Fig. 6). Furthermore, Fig. 7 shows that NCs did not affect the body length of the worms, which indicate that no developmental delay occurred following exposure.

Safety assessment studies of chitosan nanoparticles containing the surfactant P80 in zebrafish embryos demonstrated developmental toxicity in the embryos, including a decrease in the hatching rate, as well as an increase in mortality and incidence of deformities, in a dose-dependent manner (Yuan et al., 2016). NCs may be internalized by cells and their polymer components may be found in different cellular localizations. In the liver, chitosan nanoparticles containing the surfactant P80 are absorbed and can activate formation of reactive oxygen species, leading to oxidative stress reactions in hepatocytes, or tissue inflammatory responses (Yuan et al., 2016). Bulcão et al. (2013) demonstrated that a chronic exposure to lipid-core nanocapsules containing PCL did not cause mortality to rats; however they caused hepatotoxicity and nephrotoxicity besides hematologic alterations in these rodents (Bulcão et al., 2013). Therefore, studies indicate that simpler organisms are more susceptible to these nanocapsules.

3.5. SOD-3::GFP expression

The expression levels of the antioxidant enzyme SOD-3 were determined using strain CF1553, which mostly expresses fluorescence around the head, tail and vulva, where this enzyme is highly expressed. In this study, only the higher concentration of NCP80 caused an increase in

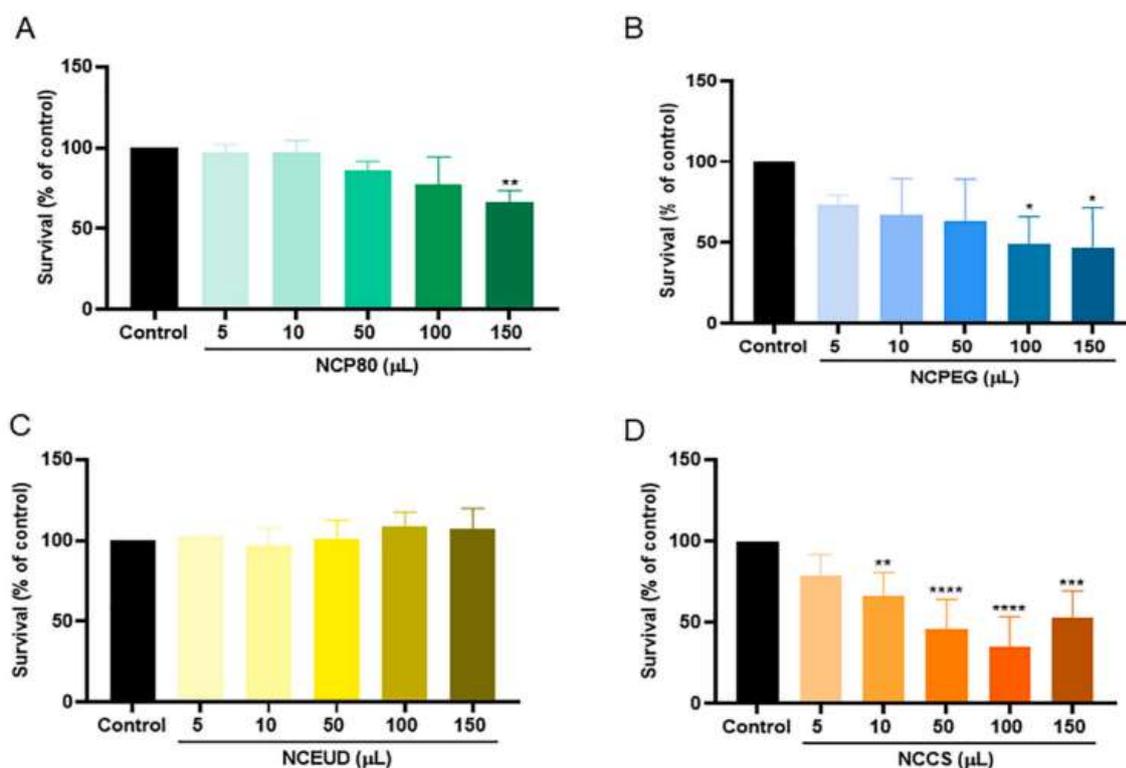


Fig. 5. Survival rate after chronic exposure to different concentrations of nanoparticles with different coating: A) NCP80; B) NCPEG, C) NCEUD and D) NCCS. Data were normalized to percentage of control and results are expressed as means \pm S.D. Data were analyzed by One-way ANOVA followed by Tukey post hoc test. * Indicates statistical significance in comparison with control group (untreated = 100 %) p <0.05. The results were acquired from three independent experiments.

SOD-3 expression (Fig. 8 A and B), therefore suggesting the involvement of oxidative stress in NCP80 induced toxicity, as the enzymes involved in the neutralization of reactive oxygen species (ROS) play an important role in ROS-related toxicity. Unfavorable changes due to environmental contaminants can lead to cellular oxidative stress, hampering the continuity of metabolic and/or bioenergetics processes. In responses to the harmful effects caused by reactive species, cellular defense mechanisms are activated, including the antioxidant system, which includes exogenous compounds such as vitamins, carotenoids, and flavonoids, and endogenous antioxidant enzymes such as SOD, catalase (CAT), and glutathione peroxidase. These antioxidants act by protecting or repairing macromolecules that are targets of these reactive species in cells (Poprac et al., 2017). In *C. elegans*, this cellular response also modifies and induces the expression of transcription factors and their targets, such as SOD. This action ensures a normal life course for the nematodes until stress generated by ROS exceeds and thus limits this adaptive protection of biological system (Wang and Wink, 2016).

On the other hand, we did not observe altered expression in worms exposed to NCPEG (Fig. 8 C and D) and NCEUD (Fig. 8 E and F). Surprisingly, our results showed that worms exposed to NCCS did not present any fluorescence, except at the lowest concentration. Studies have shown that chitosan can interact with microbial DNA, which leads to inhibition of DNA transcription and mRNA synthesis, a phenomena that could have occurred here and interfering with SOD-3 or GFP expression in this transgenic *C. elegans* (MORAIS et al., 2010). In addition, Li et al. (2018) evaluated the lethality of wild-type (N2) and SOD-3::GFP when exposed to a mixture of chemical components after 12 and 24 h (Li et al.,

2018). Notably, a significant difference was found between the two strains: greater toxicity in the transgenic nematodes than in the wild-type. These findings demonstrate that genetically modified factors should also be considered in the toxicological evaluation of nanomaterials and this should be further addressed.

4. Conclusion

This study aimed to evaluate the toxicological effects of polymeric NC with different coatings and charges (NCP80, NCPEG, NCEUD and NCCS) in *C. elegans* after acute and chronic exposure. Acute treatment did not result in any alterations in the evaluated endpoints, but interestingly, we detected an increased mortality of worms exposed to NCPEG and NCCS at the higher concentrations. Chronic exposure to NCP80, NCPEG and NCCS led to a significant decrease in nematode survival, while the other parameters were not changed. These results indicate that these formulations present some degree of toxicity in this organism, whereas NCEUD was the safest.

In response to the harmful effects caused by reactive species, cellular defense mechanisms are activated including the antioxidant system. These antioxidants act by protecting or repairing macromolecules that are targets of the action of these reactive species in cells (Poprac et al., 2017). Our results show that there was no alteration in the expression of the antioxidant enzyme SOD-3 in nematodes treated with all the NCs tested, suggesting that they did not cause an increase in reactive species. Remarkably, NCCS blunted the reporter expression and this effect should be further investigated.

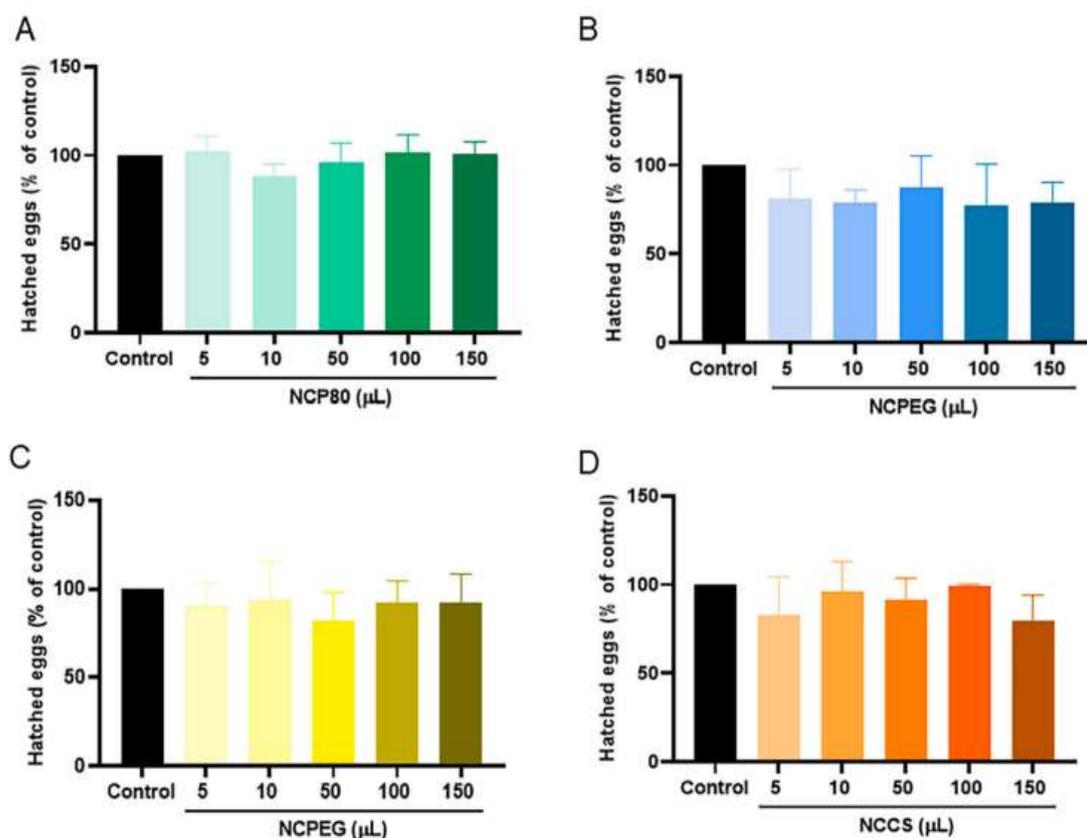


Fig. 6. Brood size after chronic exposure. A) NCP80; B) NCPEG, C) NCEUD and D) NCCS. Data were normalized to percentage of control and results are expressed as means \pm S.D. Data were analyzed by One-way ANOVA followed by Tukey post hoc test. The results were acquired from three independent experiments.

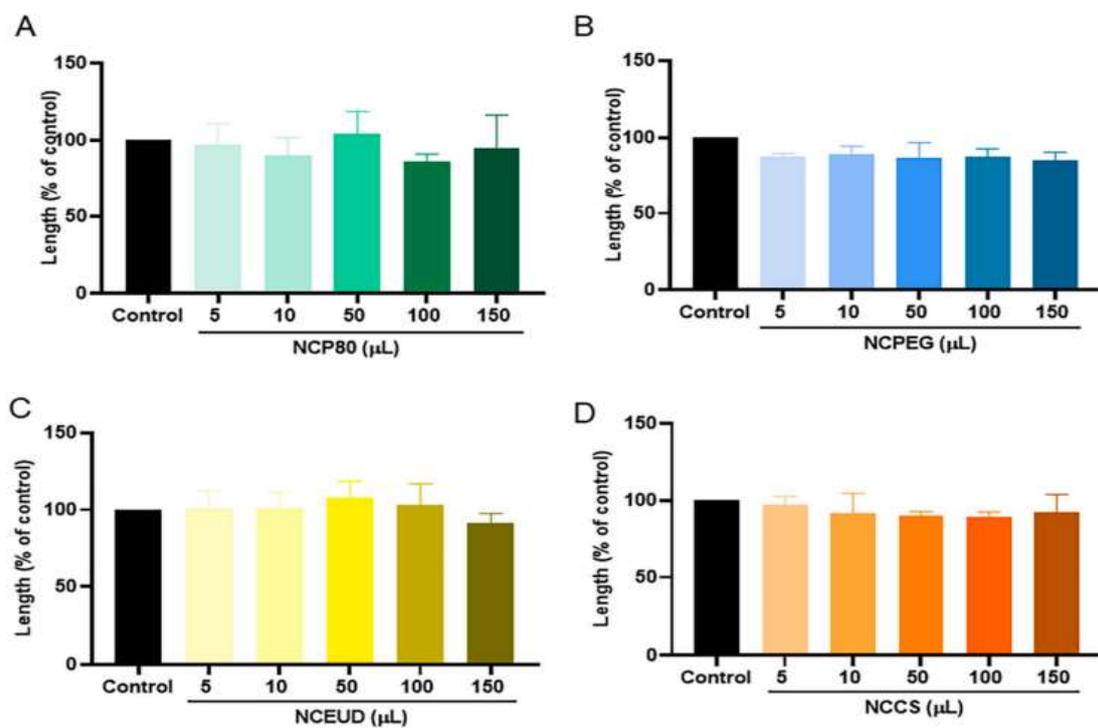
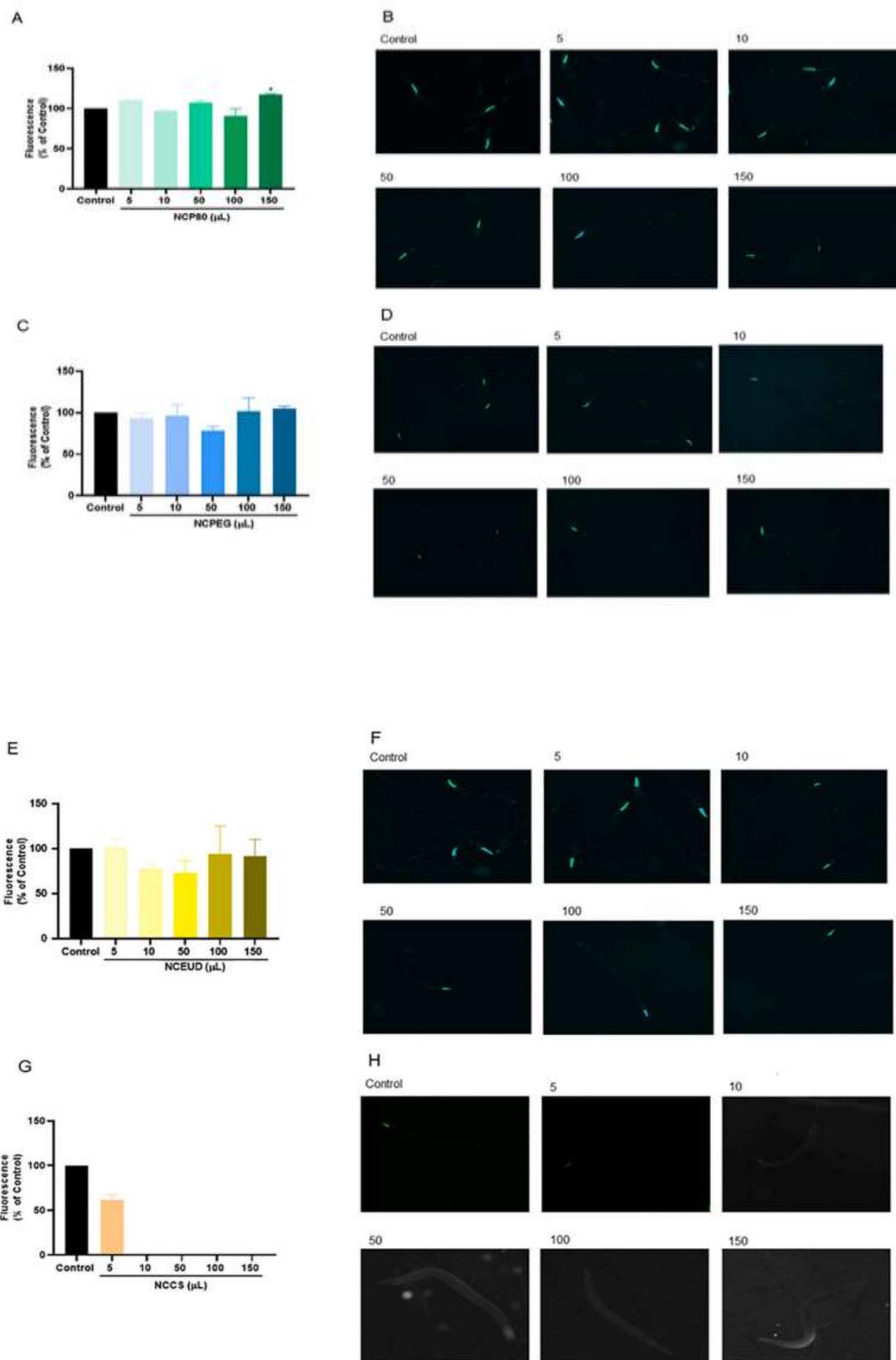


Fig. 7. Body length after chronic exposure. A) NCP80; B) NCPEG, C) NCEUD and D) NCCS. Data were normalized to percentage of control and results are expressed as means \pm S.D. Data were analyzed by One-way ANOVA followed by Tukey post hoc test. The results were acquired from three independent experiments.



(caption on next page)

Fig. 8. Superoxide dismutase (SOD-3) expression in the in vivo experimental model of *C. elegans* subjected to treatment with NCs. (A) Quantification of SOD-3::GFP in treated nematodes with NCP80; (B) Representative images of the expression of SOD-3::GFP in treated nematodes with NCP80; (C) Quantification of SOD-3::GFP in treated nematodes with NCPEG; (D) Representative images of the expression of SOD-3::GFP in treated nematodes with NCPEG; (E) Quantification of SOD-3::GFP in treated nematodes with; (F) Representative images of the expression of SOD-3::GFP in treated nematodes with NCEUD; (G) Quantification of SOD-3::GFP in treated nematodes with NCCS; (H) Representative images of the expression of SOD-3::GFP in treated nematodes with NCCS. Data from quantification were normalized to percentage of control and results are expressed as means \pm S.D. Data were analyzed by One-way ANOVA followed by Tukey post hoc test. The results were acquired from three independent experiments with five animals per experiment.

This study indicates that toxicity depends on the formulation composition, and on not the surface charge. Notably NCEUD, which demonstrated to be the most promising to be used in our future studies. Furthermore, it demonstrates that *C. elegans* is an excellent model for pre-clinical toxicity studies. It is worth mentioning that further studies for the future development of polymeric nanoparticles for drug delivery and targeting are needed.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

The authors are thankful to Universidade Federal do Pampa (UNI-PAMPA) and Programa de Pós-graduação em Bioquímica, for providing financial assistance. This study was supported by CAPES (Epidemic Combat Program) 88887.506651/2020-00 and 88881.506652/2020-01. DSA and SHE are recipients of CNPq researcher scholarship. DAAS and ACFG are recipients of scholarships from CAPES - Finance Code 001.

Ávila, D.S., Somlyai, G., Somlyai, L., Aschner, M., 2012. Anti-aging effects of deuterium depletion on Mn-induced toxicity in a *C. elegans* model. *Toxicol. Lett.* 211, 319–324.

Barua, S., Yoo, J.-W., Kolhar, P., Wakankar, A., Gokarn, Y.R., Mitragotri, S., 2013. Particle shape enhances specificity of antibody-displaying nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 3270–3275.

Brenner, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71–94. <https://doi.org/10.1093/genetics/77.1.71>. In press.

Bulcão, R.P., Freitas, F.A., Venturini, C.G., Dallegrave, E., Durgante, J., Goethel, G., Cerski, C.T.S., Zielinsky, P., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., 2013. Acute and subchronic toxicity evaluation of poly (ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules in rats. *Toxicol. Sci.* 132, 162–176.

Callienni, M.N., Lillo, C.R., Prieto, M.J., Gorojod, R.M., SD, V.A., Kotler, M.L., Gonzalez, M.C., Montanari, J., 2019. Comparative toxicity of PEG and folate-derived blue-emitting silicon nanoparticles: in vitro and in vivo studies. *Nanomedicine* 14, 375–385 (Lond).

Charao, M.F., Souto, C., Brucker, N., Barth, A., Jormada, D.S., Fagundes, D., Avila, D.S., Eifler-Lima, V.L., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R., 2015. *Caenorhabditis elegans* as an alternative in vivo model to determine oral uptake, nanotoxicity, and efficacy of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat damage. *Int. J. Nanomedicine* 10, 5093.

Dan, P., Senthilkumar, S., Gopinath, D.V., Mohideen, S.S., 2022. Safety studies of polyethylene glycol-hydroxyapatite nanocomposites on *Drosophila melanogaster*: an in vivo model. *Appl. Nanosci.* 12, 225–236.

Dos Santos, R.B., Nakama, K.A., Pacheco, C.O., de Gomes, M.G., de Souza, J.F., de Souza Pinto, A.C., de Oliveira, F.A., da Fonseca, A.L., Varotti, F., Fajardo, A.R., 2021. Farace, C., Sánchez-Moreno, P., Orecchioni, M., Manetti, R., Sgarrella, F., Asara, Y., Peula-García, J.M., Marchal, J.A., Madeddu, R., Delogu, L.G., 2016. Immune cell impact of three differently coated lipid nanocapsules: pluronic, chitosan and polyethylene glycol. *Sci. Rep.* 6, 1–14.

Ferrari, M., 2010. Frontiers in cancer nanomedicine: directing mass transport through biological barriers. *Trends Biotechnol.* 28, 181–188.

Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.P., Ammoury, N., Benita, S., 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* 55, R1–R4.

Fornaguera, C., Solans, C., 2018. Characterization of polymeric nanoparticle dispersions for biomedical applications: size, surface charge and stability. *Pharm. Nanotechnol.* 6, 147–164.

Gomes, G.S., Maciel, T.R., Piegas, E.M., Michels, L.R., Colomé, L.M., Freddo, R.J., Avila, D.S.d., Gundel, A., Haas, S.E., 2018. Optimization of curcuma oil/quinine-loaded nanocapsules for malaria treatment. *AAPS PharmSciTech* 19, 551–564.

Gonzalez-Moragas, L., Roig, A., Laromaine, A., 2015. *C. elegans* as a tool for in vivo nanoparticle assessment. *Adv. Colloid Interf. Sci.* 219, 10–26.

Hu, J., Sheng, Y., Shi, J., Yu, B., Yu, Z., Liao, G., 2018. Long circulating polymeric nanoparticles for gene/drug delivery. *Curr. Drug Metab.* 19, 723–738.

Huang, Y.-Y., Chung, T.-W., Tzeng, T.-W., 1999. A method using biodegradable polylactides/polyethylene glycol for drug release with reduced initial burst. *Int. J. Pharm.* 182, 93–100.

Hunt, P.R., 2017. The *C. elegans* model in toxicity testing. *J. Appl. Toxicol.* 37, 50–59.

Jacques, M.T., Oliveira, J.L., Campos, E.V., Fraceto, L.F., Avila, D.S., 2017. Safety assessment of nanopesticides using the roundworm *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 139, 245–253.

Jäger, C., Hulsken, F., Mutschke, H., Jansa, I.L., Henning, T., 2009. Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons and carbonaceous solids in gas-phase condensation experiments. *Astrophys. J.* 696, 706.

Kaur, G., Mehta, S., 2017. Developments of polysorbate (Tween) based microemulsions: preclinical drug delivery, toxicity and antimicrobial applications. *Int. J. Pharm.* 529, 134–160.

Li, Y., Wang, W., Wu, Q., Li, Y., Tang, M., Ye, B., Wang, D., 2012. Molecular control of TiO₂-NPs toxicity formation at predicted environmental relevant concentrations by Mn-SODs proteins.

Li, K., Xu, Y.-Q., Feng, L., Liu, S.-S., 2018. Assessing the influence of the genetically modified factor on mixture toxicological interactions in *Caenorhabditis elegans*: comparison between wild type and a SOD type. *Environ. Pollut.* 242, 872–879.

Lillo, C.R., Natalia Callienni, M., Gorojod, R.M., Rivas Aiello, M.B., Rodríguez Sartori, D., Prieto, M.J., Alonso, S.d.V., Kotler, M.L., Gonzalez, M.C., Montanari, J., 2018. Toward biomedical application of amino-functionalized silicon nanoparticles. *Nanomedicine* 14, 10165.

Moraes, B.K.S., Vieira, S.M., Salgueiro, W.G., Michels, L.R., Colomé, L.M., Avila, D.S., Haas, S.E., 2015. Clozapine-loaded polysorbate-coated polymeric nanocapsules: physico-chemical characterization and toxicity evaluation in *Caenorhabditis elegans* model. *Nanosci. Nanotechnol.* 15, 1–8.

Morais, S.d.B., Goy, R.C., Assis, O.B.G., 2010. Avaliação da atividade bactericida por zona de inibição em gel e filmes de derivados quaternários de quitosana, Embrapa Instrumentação-Resumo em anais de congresso (ALICE). In: JORNADA CIENTÍFICA-EMBRAPA SÃO CARLOS, 2, 2010, São Carlos, SP. Anais.

Motta, H.S., Roos, D., Tabarelli, G., Rodrigues, O.E., Avila, D., Quines, C.B., 2020. Activation of SOD-3 is involved in the antioxidant effect of a new class of β -aryl-chalcogenium azide compounds in *Caenorhabditis elegans*. In: *An. Acad. Bras. Cienc.* An. Acad. Bras. Cienc., 92.

Mukherjee, A., Waters, A.K., Kalyan, P., Achrol, A.S., Kesari, S., Yenugonda, V.M., 2019. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a next-generation drug delivery platform: state of the art, emerging technologies, and perspectives. *Int. J. Nanomedicine* 14, 1937.

Najahi-Missaoui, W., Arnold, R.D., Cummings, B.S., 2021. Safe nanoparticles: are we there yet? *Int. J. Mol. Sci.* 22, 385.

de Oliveira Pacheco, C., de Gomes, M.G., da Silva Neto, M.R., Parisotto, A.J.M., Dos Santos, R.B., Maciel, T.R., Ribeiro, A.C.F., Giacomeli, R., Haas, S.E., 2022. Surface-functionalized curcumin-loaded polymeric nanocapsules could block apomorphine-induced behavioral changes in rats. *Pharmacol. Rep.* 74, 135–147.

Pascoli, M., Jacques, M.T., Agarrayua, D.A., Avila, D.S., Lima, R., Fraceto, L.F., 2019. Neem oil based nanopesticide as an environmentally-friendly formulation for Pereira, M.P., de Gomes, M.G., Izoton, J.C., Nakama, K.A., Dos Santos, R.B., Savall, A.S. P., Ramalho, J.B., Roman, S.S., Luchese, C., Cibin, F.W., 2019. Cationic and anionic unloaded polymeric nanocapsules: toxicological evaluation in rats shows low toxicity. *Biomed. Pharmacother.* 116, 109014.

- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C.J., Valko, M., 2017. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* 38, 592–607.
- Rizi, H.A.Y., Shin, D.H., Rizi, S.Y., 2022. Polymeric nanoparticles in cancer chemotherapy: a narrative review. *Iran. J. Public Health* 51, 226–239.
- Rizvi, S.A., Saleh, A.M., 2018. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharm.J.* 26, 64–70.
- Scharf, A., Piechulek, A., von Milkecz, A., 2013. Effect of nanoparticles on the biochemical and behavioral aging phenotype of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *ACS Nano* 7, 10695–10703.
- Velasques, K., Maciel, T.R., Dal Forno, A.H.d.C., Telxira, F.E.G., da Fonseca, A.L., de Pilla Varotti, F., Fajardo, A.R., de Ávila, D.S., Haas, S.E., 2018. Co-nanoencapsulation of antimalarial drugs increases their in vitro efficacy against *Plasmodium falciparum* and decreases their toxicity to *Caenorhabditis elegans*. *Eur. J. Pharm.Sci.* 118, 1–12.
- Venturini, C.G., Jäger, E., Oliveira, C.P., Bernardi, A., Battastini, A.M., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R., 2011. Formulation of lipid core nanocapsules. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 375, 200–208.
- Vieira, S.M., Michels, L.R., Roversi, K., Metz, V.G., Moraes, B.K., Piegas, E.M., Freddo, R. J., Gundel, A., Dalla Costa, T., Burger, M.E., 2016. A surface modification of clozapine-loaded nanocapsules improves their efficacy: a study of formulation development and biological assessment. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 145, 748–756.
- Wang, E., Wink, M., 2016. Chlorophyll enhances oxidative stress tolerance in *Caenorhabditis elegans* and extends its lifespan. *PeerJ* 4, e1879.
- Wong, H.L., Chattopadhyay, N., Wu, X.Y., Bendayan, R., 2010. Nanotechnology applications for improved delivery of antiretroviral drugs to the brain. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62, 503–517.
- Wu, T., Xu, H., Liang, X., Tang, M., 2019. *Caenorhabditis elegans* as a complete model organism for biosafety assessments of nanoparticles. *Chemosphere* 221, 708–726.
- Yuan, Z., Li, Y., Hu, Y., You, J., Higashisaka, K., Nagano, K., Tsutsumi, Y., Gao, J., 2016. Chitosan nanoparticles and their Tween 80 modified counterparts disrupt the developmental profile of zebrafish embryos. *Int. J. Pharm.* 515, 644–656.

6 MANUSCRITO CIENTÍFICO

**Safety Evaluation and Protective Effect of Curcumin
Nanocapsules on LPS-Induced Inflammation in *Caenorhabditis
elegans***

Danielle Araujo Agarrayua de Souza^{1,2}; Natalia Silva Jardim^{1,2}; Ana Claudia Funguetto-
Ribeiro^{2,3} Andrielli Rodrigues; Sandra Elisa Haas^{2,3}, Daiana Silva Ávila^{1,2*}

¹ Grupo de Pesquisa em Bioquímica e Toxicologia em *Caenorhabditis elegans* (GBToxCe),
Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, Uruguaiiana, Brazil.

² Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA,
CEP 97500-970, Uruguaiiana, RS, Brazil.

³ Laboratório de Nanobiotecnologia, Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, Uruguaiiana,
Brazil.

***Corresponding author:** Daiana Silva de Ávila - e-mail:

daianaavila@unipampa.edu.br, Phone:(+55 55 34134321/ FAX:(+55 55

34134321;

Abstract

The pathophysiology of COVID-19 is highly heterogeneous and the manner by which SARS-CoV-2 modulates the different systems in the host remains unidentified despite recent discoveries. Cytokine storm has been reported to be associated with the deterioration of many infectious diseases, in COVID-19 it is suggested that cytokine storm is associated with disease severity. Natural compounds such as Curcumin (CUR) have shown beneficial effects on the progression of inflammatory diseases due to their numerous mechanisms of action. Despite the numerous beneficial effects of CUR on human health, it has limitations, such as poor absorption, extremely low solubility in aqueous buffer, instability in body fluids and rapid metabolism. Nano-delivery systems have shown excellent potential to improve the solubility, biocompatibility and therapeutic effect of this compound. In this study, CUR loaded Eudragit nanocapsules were developed, toxicological parameters were evaluated as well as its protective effects on the inflammatory damage induced by lipopolysaccharide (LPS) in *Caenorhabditis elegans*. *C. elegans* individuals were stimulated for 24h with LPS (100 μ g/mL), with or without NCCM and free CUR. The survival rates and behaviors were determined. NCCM at a concentration of 0,6 mg.mL⁻¹, were prepared by nanoprecipitation method and showed acceptable physico-chemical characterization. NCCM showed no toxicity to worms in acute (30 minutes) as well as chronic (48h) exposure in the parameters of survival, reproduction and development. NCCM improved the survival of *C. elegans* exposed to LPS, rescued behavioral phenotypes and the apoptotic effects caused by LPS were diminished compared to free curcumin. These nanoformulations have been shown to be stable and safe, in addition to protecting against LPS injury. Becoming a promising adjuvant in the treatment of inflammatory diseases such as COVID-19.

Keywords: Covid-19, alternative model, nanoparticles, lipopolysaccharide

1 Introduction

Coronavirus Disease 2019 (COVID – 19) is a rapidly spread disease, leading to high mortality rates. This disease created a public health emergency of global concern, being caused by a coronavirus belonging to the coronaviridae family (Godeau, Petit et al. 2021, Guha and Chakraborty 2022). Some evidences show that, during the COVID-19 epidemic, the severe deterioration of some patients has been closely related to the cytokine storm in their bodies. (Conti, Ronconi et al. 2020), being identified as a significant factor in the negative consequences of COVID-19 infection (Bahrami, Kamalinejad et al. 2020).

To counteract this scenario, naturally occurring bioactive compounds have been considered as adjuvants in therapeutic practice since they are usually low-cost, have few side effects, and are of simple use. For example, since ancient times, turmeric (*Curcuma longa*) has been used to treat inflammatory and auto-immune conditions. Curcumin (CUR) is its primary phenolic bioactive compound and exhibits promising anti-inflammatory and auto-immune preventive potential in clinical and pre-clinical human studies (Akaberi, Sahebkar et al. 2021, Marton, Barbalho et al. 2022). In addition, other medicinal properties include antioxidant, anticancer, antibacterial, antiviral, neuroprotective and antidiabetic properties (Iranshahi, Sahebkar et al. 2010, Parsamanesh, Moossavi et al. 2018, Babaei, Nassiri-Asl et al. 2020, Alikiaii, Bagherniya et al. 2021, Khayatan, Razavi et al. 2022). Besides the potent anti-inflammatory and auto-immune protective effects of CUR, this molecule shows hydrophobicity, rapid clearance, photosensitivity and low stability, which limits its usability in daily clinical practice (Yavarpour-Bali, Ghasemi-Kasman et al. 2019, Lakshmanan, Jindal et al. 2021). Nano-delivery systems have shown excellent potential to improve the solubility, biocompatibility and therapeutic effect of CUR (Chen, Wu et al. 2020). It has been shown that encapsulation of CUR in nanoparticles considerably improves its chemical stability and prevents its enzymatic and pH degradation. Additionally, the encapsulation of CUR into nanoparticles increases its circulation inside the body (Anand, Kunnumakkara et al. 2007, Szymusiak, Hu et al. 2016, Maiti and Dunbar 2018). Accordingly, over the last decades numerous nanoformulation-based strategies have been undertaken to improve CUR properties *in vitro*, *in vivo* and pre-clinical settings. Nanoformulation-based strategies involve the use of

adjuvants, stabilizers, conjugates/polymer conjugates, lipid/liposomes, hydro/micro/nano gels, micelles, and nanoparticles (Ghalandaraki, Alizadeh et al. 2014, Naksuriya, Okonogi et al. 2014). Although these nanoformulations enhance the therapeutic effects of CUR, studies on the toxicological profile of these systems remain debatable and need to be further studied. Recently, there is an increasing trend of using various model organisms for nanoparticles (NPs) biosafety assessment and *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) is one among these (Handy, Cornelis et al. 2012).

Notably, *C. elegans* possess several innate immune components that are evolutionarily conserved with vertebrates, including a single toll-like receptor and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), which mediate responses to infection (Battisti, Watson et al. 2017). Bacterial endotoxin or lipopolysaccharide (LPS) plays an important role in the development of sepsis by evoking the release of a series of inflammatory factors. LPS may lead to deregulated immune responses, triggering sepsis and consequently resulting in multiple organ failure in various species, including worms thus being a model for studying inflammation (Seeley and Ghosh 2017, Cavaillon 2018, Dickson and Lehmann 2019).

In a previous study, we have demonstrated that Eudragit NPs presented low toxicity to *C. elegans* and that this system could optimize the drugs absorption and distribution in this nematode (Agarrayua, Funguetto-Ribeiro et al. 2023). In the present study, we nanoencapsulated CUR into Eudragit nanocapsules and assessed its safety and anti-inflammatory effect on LPS-induced injury in *C. elegans*.

2 Materials and Methods

Chemical and Reagents:

Poly-(ϵ -caprolactone) (PCL), capric/caprylic triglycerides (TCM), Lipoid[®] S45, Tween[®] 80 (P80), Eudragit[®] RS100 and Curcumin were purchased from Sigma-Aldrich (Brazil). Acetone was of pharmaceutical grade. Ultra-purified water was prepared using a Milli-Q Millipore system (Bedford, USA). All other reagents were of analytical grade and obtained from local suppliers.

Preparation of Nanocapsules

The nanocapsules were prepared by interfacial deposition of preformed polymer (Venturini, Jäger et al. 2011) by nanoprecipitation technique (Fessi, Puisieux et al. 1989). Briefly, the organic phase of nanocapsules with curcumin (NCCM) was composed of CUR, Eudragit® RS 100 (0.78% w/v) and MCT dissolved in acetone at $40 \pm 2^\circ\text{C}$ was poured into the aqueous phase containing distilled water and polissorbate 80. The final concentration of CUR in formulation was 0.6 mg.mL^{-1} .

The particles number determination was performed by turbidimetry technique (Jäger, Huisken et al. 2009). NC were diluted (1:1000) and analyzed through the UV Shimadzu® spectrophotometer, at 395 nm. The results were expressed as number of particles.mL⁻¹.

Physicochemical characterization and stability study of the formulations

Particle size, Zeta potential and pH

The mean diameter and polydispersity index (PI) were analyzed by dynamic light scattering (DLS) technique (NanoBrook 90Plus, BrookHaven®), in a 1:1000 dilution with distilled water. The zeta potential was evaluated by electrophoretic migration (NanoBrook 90Plus, BrookHaven®), in a 1:1000 dilution, with filtered 1 mM sodium chloride solution. The samples were analyzed using a capillary cell (DTS 1060), and the data were expressed in millivolts (mV).

The pH of suspensions was analyzed using a previously calibrated potentiometer (Hanna Instruments, São Paulo, Brazil) (n=3), at 25°C .

The stability of the nanoparticles was evaluated by repeating the analyzes on predetermined days (1, 7, 30, 60, 90 and 180 days), at room temperature (25°C). All analyzes were performed in triplicate, and the results were expressed as means \pm S.E.M.

C. elegans Maintenance

The strains used in this work were wild type N2 Bristol and MD701 (bcls39 [*lim-7p::ced-1::GFP* + *lin-15(+)*]) which were obtained from *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC University of Minnesota, MN, USA) and maintained on NGM (nematode growth media) plates seeded with bacteria *E. coli* OP50 at 20°C (Brenner, 1974). The worms at L1 stage, were obtained by a synchronization

process, which consists in exposing gravid worms to a lysis solution (0.45 N NaOH, 2% HOCl w/v), in order to isolate eggs. The eggs were washed three times with M9 buffer (5 g/L NaCl, 3 g/L KH₂PO₄, 6 g/L Na₂HPO₄, 0,25 g/L MgSO₄·7H₂O, vehicle). After 14 h the eggs hatched and released the L1 larvae.

Acute Exposure to Curcumin Nanoparticles

1,500 worms at the first larval stage (L1) were exposed to different concentrations of the polymeric NCs formulations or M9 (control) for 30 min in liquid medium. The concentrations used were 9, 18, 36 and 54 µg.mL⁻¹. Afterwards, treatments were removed by three washes with M9 buffer and then worms were transferred to NGM plates seeded with *E. Coli OP50* for recovery and further assays, 48h after the end of exposure.

Chronic Exposure to Curcumin Nanoparticles

1,500 worms at the first larval stage (L1) were exposed to the treatments with NCCM at different concentrations (9, 18, 36 and 54 µg.mL⁻¹) or M9 (Control) for 30 min in a liquid medium and then directly transferred to petri dishes with NGM and live *E. coli OP50* with the treatments, for 48h. At the end of exposure, worms were analyzed, as described below.

Survival assay

To verify whether the nanoparticles demonstrate potential toxicity, we evaluated the worms after the treatment and scored the live worms. Three experiments were performed individually in duplicates using 1500 worms. The data are expressed as the total number of worms in the plates and the concentrations are represented as log of concentration.

Reproduction Assessment

The reproduction was evaluated by counting the brood size after the exposures. Worms from each treatment, as described above, were individually transferred to NGM plates with *E. coli OP50* daily and worms were allowed to lay eggs. The hatched larvae were counted until the end of the reproductive period of each worm. Experiments were done in triplicates and repeated at least three times.

Body length

Body size was evaluated by images acquired 48 h after of acute and chronic exposures by transferring worms to slides containing levamisole (1 mM) and using inverted microscope Nikon eclipse 50i microscope (Tokyo, Japan). Image J software was used to measure the body lengths (from head to tail) of 5 worms per group, in each experiment. Experiments were repeated at least three times.

LPS – induced injury in C. elegans

C. elegans at the L4 larval stage were exposed to CUR and NCCM (both at a concentration of 54 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) or M9 buffer 30 min before LPS (serotype 055:B5; Sigma, Brazil) treatment. The worms were then exposed to M9 buffer or LPS (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h, while curcumin or NCCM were left in the NGM plates as a co-treatment with LPS. After 24 h, *C. elegans* individuals were washed with M9 buffer and transferred to NGM agar plates. They were then allowed to acclimate for 30 min before performing survival assays. Data were obtained from three independent experiments.

Nose touch

For nose touching, the worms were individually transferred to a petry dish with NGM medium without food, where they remained for 1 minute to acclimatize. Each animal was submitted to a maximum of five soft touches, with an eyelash hair glued to a toothpick, at 30 second intervals between touches. The responses were recorded as reversals if the worm moved backward, and the omega curves were visually identified when the worm's head almost touches the tail generating a sharp curve in which the worm's body resembles the Greek letter Ω . Five worms from each experiment were used and each worm was touched on the nose five times.

Number of apoptotic cells

To measure apoptosis, MD701 (bcls39 [*lim-7p::ced-1::gfp* + *lin-15(+)*])V strain with a CED-1 protein marked with green fluorescent protein (GFP) was used. CED-1 is a caspase protein that binds the surface of germline cells that

becomes detached and degraded throughout apoptosis. Treated worms (10 for each group) were fixed on microscope slides (with levamisole 1 mM). The circular bright GFP, characterizing apoptotic corpses of germline cells, was scored in a fluorescence microscopy (EVOS FLoid Cell Imaging Station) (Chalfie, Tu et al. 1994, Gartner, Boag et al. 2018). At least three independent assays were done.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the software GraphPad Prism® version 8 (San Diego, CA, U.S.A.). The Shapiro-Wilk normality test was used to test a Gaussian distribution. Comparisons between groups were performed by one way or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post hoc test. Results are expressed as means \pm S.E.M. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

3 Results and Discussion

Physico-chemical characterization

Polymeric nanocapsules were successfully obtained by the preformed polymer nanoprecipitation method (Fessi, Puisieux et al. 1989). The Eudragith® polymer was chosen because of its well-established biocompatible and biodegradable characteristics. The parameters were in agreement with a colloidal system. The particle diameter ranged from 241.13 to 251.56 nm, with adequate polydispersity. Zeta potential was in accordance with the nature of coating Eudragit, and pH was in the neutrality range (6.44 ± 0.201). The curcumin content was close to 100% in the formulations, indicating minimal losses throughout the process. The table with the physical-chemical characterization of the nanoformulation is in the supplementary material and demonstrated that the method used to prepare the NCCM is adequate and includes the values obtained for diameter (nm), PI, pH, zeta potential (mV) and number of particles.

In vivo safety evaluation in C. elegans

The safety, tolerance and low toxicity of curcumin are well established in human clinical trials, therefore being used in various therapeutic applications. However, its application in nanoparticles requires additional safety information. In these experiments, the *in vivo* safety of NCCM was verified using the alternative model *C. elegans*.

Our previous studies showed that nanocapsules- based delivery systems with different coatings showed low or no toxicity to *C. elegans*, being the Eudragit® NC the most promising (Agarrayua, Funguetto-Ribeiro et al. 2023). Therefore, curcumin-loaded nanocapsules with Eudragit polymer were prepared and the worms exposed to NCCM and free curcumin at a concentration of 54 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for comparison purposes. Toxicity parameters such as survival, reproduction and body size were analyzed. The Figure 1A and Figure 1B show that both acute and chronic exposure, at all NCCM concentrations tested, did not significantly alter the survival rate of the nematodes in relation to the control (M9 vehicle). These results are in agreement with a study by Vaz et. al., (2022), which developed, characterized, compared and optimized three different omega-3 fatty acids nanoemulsions loaded with curcumin and quercetin that were not toxic for *C. elegans* (Vaz, Carrasco et al. 2022). Guzman et al., (2022), developed curcumin nanoparticles using human serum albumin as a nanocarrier, toxicity effects were ruled out once the worms were still alive throughout their expected average lifespan (de Guzman, Razzak et al. 2022).

In addition, our group has previously demonstrated that nanocapsules loaded with co-encapsulated quinine and curcumin showed greater survival and longevity compared to the free compounds (Velasques, Maciel et al. 2018). Studies have explored the safety of curcumin. According to these studies, standardized powder curcumin were safe for human use even at high doses (Soleimani, Sahebkar et al. 2018). We tested the safety of free curcumin in *C. elegans*, through the survival parameter and, as already predicted, at the tested concentration we did not observe toxicity. Data shown in the supplementary material.

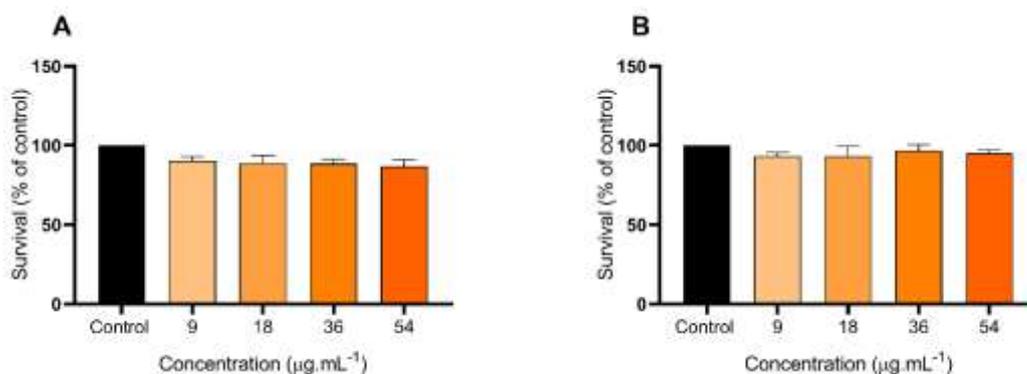


Figure 1. Survival rate following NCCM exposure in *C. elegans*. (A) Worms acutely exposed to different concentrations of the NCCM and (B) worms chronically exposed to different concentrations of NCCM. There is no significant mortality with the NCCM $n=3$ independent experiments. Values are expressed as mean \pm S.E.M. Data were analyzed by one-way ANOVA.

It is well-known that fertility assessment is a significant toxicological parameter for evaluating xenobiotics toxicity in *C. elegans* (Rogers, Rice et al. 2015). Reproductive toxicity was assessed by estimating the brood size. Notably, NCCM treatments did not cause a decrease in brood size at both acute and chronic exposures (Figure 2A and 2B, respectively). These results are in line with the studies by Giacomeli et al (2020) who demonstrated that nanocapsules of lipid nucleus loaded with curcumin did not cause toxicity in the reproduction of pregnant Wistar rats and their descendants, treated during the period of organogenesis (Giacomeli, Guerra Teixeira et al. 2020).

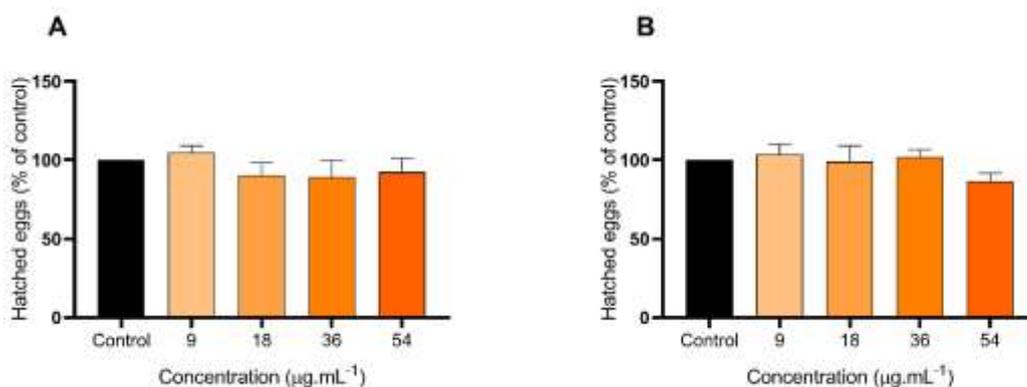


Figure 2. Brood size after NCCM exposure in *C. elegans*. (A) Worms acute exposed to different concentrations of the NCCM and (B) worms chronic exposed to different concentrations of NCCM.

There is no significant mortality with the NCCM n=3 independent experiments. Values are expressed as mean \pm S.E.M. Data were analyzed by one-way ANOVA.

Regarding body length, we have found that *C. elegans* body size was not affected after acute and chronic treatment with NCCM (Figure 3A and 3B, respectively), which is an indication that there was no developmental impairment. The results from our study demonstrate that the NCCM do not cause developmental toxicity in *C. elegans* when exposed to acute or chronic treatments.

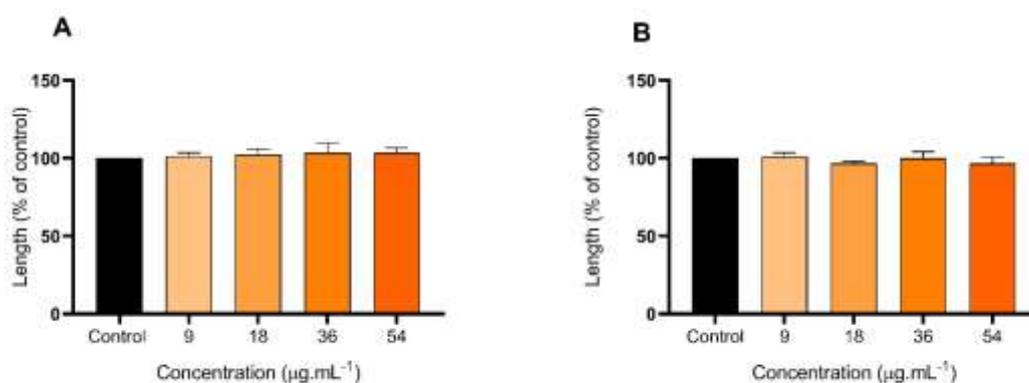


Figure 3. Body length after NCCM exposure in *C. elegans*. (A) Worms acute exposed to different concentrations of the NCCM and (B) worms chronic exposed to different concentrations of NCCM. There is no significant mortality with the NCCM n=3 independent experiments. Values are expressed as mean \pm S.E.M. Data were analyzed by one-way ANOVA.

Effect of NCCM on C. elegans survival in the presence of LPS

The *C. elegans* innate immune system shares many features with mammals, including the p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), β -catenin, and FOXO pathways (ref). Despite the evolutionary distance between *C. elegans* and human, host-pathogen interactions are strikingly similar (Pukkila-Worley, 2012).

Exposure to LPS (100 $\mu\text{g/mL}$) significantly decreased the survival (58%) of untreated worms (control group) and worms pretreated (63.6%) with free curcumin. NCCM significantly increased survival (94.6%) when worms were pretreated at concentration of 54 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ compared with the control group and

free curcumin at the same concentration (Figure 4A). Curcumin is a highly hydrophobic nutraceutical and is prone to precipitation when dispersed in an aqueous medium. This phenomenon can lead to low and variable bioaccumulation of curcumin in *C. elegans*, which explains the fact that free curcumin does not protect *C. elegans* from LPS-induced injury. Studies show that nanoemulsion-based delivery systems can be used to enhance the bioaccumulation of curcumin in *C. elegans* which may further influence its absorption and biological effects (Shen, Zhang et al. 2019). This justifies a greater protective effect of NCCM on pretreated worms compared to free curcumin.

Effect of NCCM on the behavioral phenotypes of C. elegans induced by LPS

LPS is an endotoxin, component of the outer cell wall of Gram-negative bacteria (Raetz and Whitfield 2002). The mechanism of action of LPS is through the increase of pro-inflammatory cytokines (Dantzer, O'connor et al. 2008, Dantzer 2009). This activation of the immune system leads to neurochemical and behavioral changes (Kelley, Bluthé et al. 2003, Rana, Sharma et al. 2016).

LPS exposure caused a significant reduction in the frequency of reversals (Figure 4B) and omega turns (Figure 4C). However, NCCM pre-treatments significantly elevated the frequency of this behavior when compared with LPS treatment. Communication between the immune system and the brain is important for the host organism to engage in temporary and specific defense behaviors (Dantzer 2004, Sylvia and Demas 2018). Studies with the objective of evaluating the pre-treatment with curcumin prevented the behavioral alteration and fever induced by LPS in wistar rats (Reis, Oliveira et al. 2022).

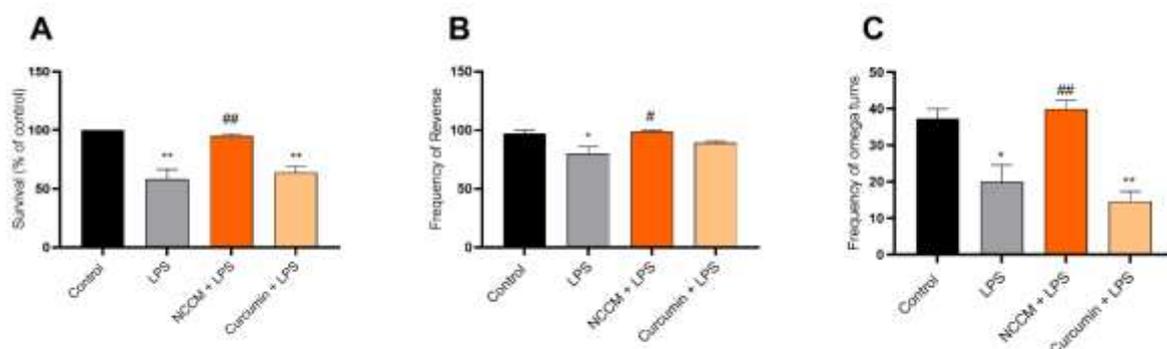


Figure 4. Effect of NCCM on (A) survival, (B) reversals and (C) omega turns behavior in *C. elegans* induced by LPS. Values are expressed as mean ± S.E.M. Data were analyzed by one-

way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test. $n=5$ independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ denote the significance levels compared to control group. # $p < 0.05$ and ### $p < 0.01$ denotes the significance levels compared to LPS-control group.

NCCM inhibited apoptosis induced by LPS in C. elegans

The MD701 strain allows the visualization of apoptotic corpses of germ cells. Approximately 50 % of germ cells are typically undergoing physiological apoptosis regardless of DNA damage in *C. elegans* (Gumienny, Lambie et al. 1999). However, stress, UV irradiation, genotoxic agents and bacterial LPS induce apoptosis of germ cells (Han, Lee et al. 1994, Gartner, Milstein et al. 2000, Xiao, Yan et al. 2017, Gartner, Boag et al. 2018). It was possible to notice a significant increase in the number of apoptotic cells in the LPS treated group and a decrease in the group pretreated with NCCM (Figure 5). Which is in agreement with Zhu et. Al., (2020), who showed that curcumin reduced cell rate apoptosis in LPS-induced inflammation, in mice (Zhu, Wang et al. 2020). Siddique, et.al., (2014) demonstrated that curcumin, in *Drosophila melanogaster*, reduced oxidative stress and apoptosis (Siddique, Naz et al. 2014).

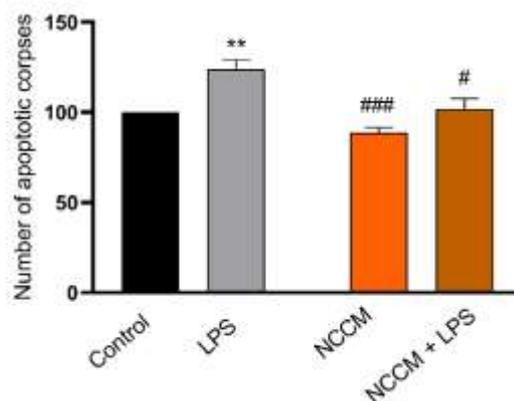


Figure 5. Effect of NCCM on number of apoptotic corpses in *C. elegans* induced by LPS. Values are expressed as mean \pm S.E.M. Data were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test. $n=5$ independent experiments. * $p < 0.05$ denotes the significance levels compared to control group. # $p < 0.05$ and ### $p < 0.001$ denote the significance levels compared to LPS-control group.

In mammals, p38 MAPK is involved in mediating the immune response to bacterial LPS and play a similar role in *C. elegans*. One consequence of p38

activation in mammalian cells is programmed cell death. In a previous study Aballay et al (2003) showed important features of innate immunity signaling pathways of *C. elegans*, in which apoptosis occurs due to the activation of the p38 MAPK signaling cascade when exposed to LPS (Aballay, Drenkard et al. 2003). We show in this study that LPS induced apoptosis of gonadal cells in *C. elegans*, and NCCM had an anti-apoptotic function. Showing that LPS-induced apoptosis can be rescued by curcumin-loaded nanoparticles.

Curcumin is an important biochemical antioxidant that modulates cellular immune responses and has anti-inflammatory effects. Xu et al (2023) revealed through RNA-seq results that the underlying mechanism of curcumin in *C. elegans* is related to the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway (Xu, Du et al. 2023).

4 Conclusion

In this study nanocapsules with curcumin were evaluated in different toxicological parameters in *C. elegans* demonstrating to be safe for the model. Furthermore, our investigation showed that the nanoformulation can improve the bioavailability of curcumin making it more effective, revealing protective effect in LPS induced *C. elegans* model. In the worms exposed to LPS and pretreated with the nanocapsules there was no mortality compared to the control and free curcumin. A reversal in behavioral phenotypes and inhibition of apoptosis was observed. This study suggests a potential adjuvant therapy in several inflammatory and immune-mediated diseases, such as COVID-19.

Supplementary Material

Table S1. Physicochemical characterization of NC-coating Eudragit loaded curcumin.

pH	Particle size (nm)	PI	Zeta potential (mV)	Absolute drug content
6.44±0.201	241.13 to 251.56	0.103±0.034	22.27±5.60	100%

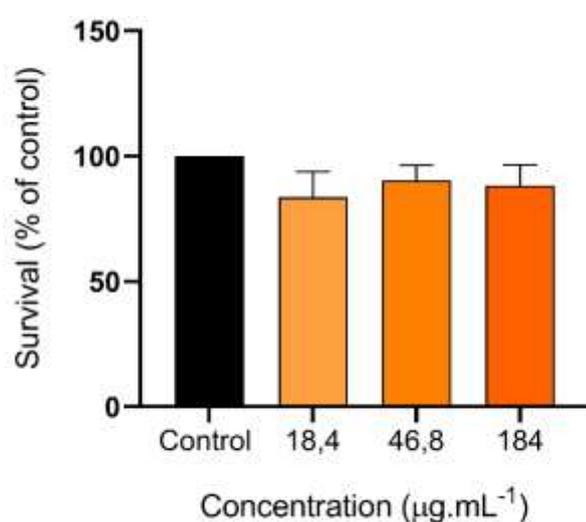


Figure S1. Survival rate following free curcumin exposure in *C. elegans* worms chronically exposed to different concentrations of curcumin. There is no significant mortality with the curcumin $n=3$ independent experiments. Values are expressed as mean \pm S.E.M. Data were analyzed by one-way ANOVA.

5 References

- Aballay, A., E. Drenkard, L. R. Hilbun and F. M. Ausubel (2003). "Caenorhabditis elegans Innate Immune Response Triggered by Salmonella enterica Requires Intact LPS and Is Mediated by a MAPK Signaling Pathway." Current Biology **13**(1): 47-52.
- Agarrayua, D. A., A. C. Funguetto-Ribeiro, P. Trevisan, S. E. Haas and D. S. Ávila (2023). "Safety assessment of different unloaded polymeric nanocapsules in Caenorhabditis elegans." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **263**: 109477.
- Alikiaii, B., M. Bagherniya, G. Askari, T. Sathyapalan and A. Sahebkar (2021). "Evaluation of the effect of curcumin on pneumonia: A systematic review of preclinical studies." Phytotherapy Research **35**(4): 1939-1952.
- Akaberi, M., A. Sahebkar and S. A. Emami (2021). "Turmeric and curcumin: from traditional to modern medicine." Studies on Biomarkers and New Targets in Aging Research in Iran: Focus on Turmeric and Curcumin: 15-39.
- Anand, P., A. B. Kunnumakkara, R. A. Newman and B. B. Aggarwal (2007). "Bioavailability of curcumin: problems and promises." Mol Pharm **4**(6): 807-818.
- Babaei, F., M. Nassiri-Asl and H. Hosseinzadeh (2020). "Curcumin (a constituent of turmeric): New treatment option against COVID-19." Food science & nutrition **8**(10): 5215-5227.
- Bahrami, M., M. Kamalinejad, S. A. Latifi, F. Seif and M. Dadmehr (2020). "Cytokine storm in COVID-19 and parthenolide: Preclinical evidence." Phytother Res **34**(10): 2429-2430.
- Battisti, J. M., L. A. Watson, M. T. Naung, A. M. Drobish, E. Voronina and M. F. Minnick (2017). "Analysis of the Caenorhabditis elegans innate immune response to Coxiella burnetii." Innate immunity **23**(2): 111-127.
- Cavaillon, J. M. (2018). "Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines." Toxicon **149**: 45-53.
- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward and D. C. Prasher (1994). "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." Science **263**(5148): 802-805.
- Chen, G., D. Wu, W. Guo, Y. Cao, D. Huang, H. Wang, T. Wang, X. Zhang, H. Chen, H. Yu, X. Zhang, M. Zhang, S. Wu, J. Song, T. Chen, M. Han, S. Li, X. Luo, J. Zhao and Q. Ning (2020). "Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019." J Clin Invest **130**(5): 2620-2629.
- Colaneri, M., P. Sacchi, V. Zuccaro, S. Biscarini, M. Sachs, S. Roda, T. C. Pieri, P. Valsecchi, A. Piralla, E. Seminari, A. Di Matteo, S. Novati, L. Maiocchi, L. Pagnucco, M. Tirani, F. Baldanti, F. Mojoli, S. Perlini and R. Bruno (2020). "Clinical characteristics of coronavirus disease (COVID-19) early findings from a teaching hospital in Pavia, North Italy, 21 to 28 February 2020." Euro Surveill **25**(16).
- Conti, P., G. Ronconi, A. Caraffa, C. E. Gallenga, R. Ross, I. Frydas and S. K. Kritas (2020). "Induction of pro-inflammatory cytokines (IL-1 and IL-6) and lung inflammation by Coronavirus-19 (COVI-19 or SARS-CoV-2): anti-inflammatory strategies." J Biol Regul Homeost Agents **34**(2): 327-331.
- Dantzer, R. (2004). "Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity." European Journal of Pharmacology **500**(1): 399-411.
- Dantzer, R. (2009). "Cytokine, sickness behavior, and depression." Immunology and Allergy Clinics **29**(2): 247-264.
- Dantzer, R., J. C. O'connor, G. G. Freund, R. W. Johnson and K. W. Kelley (2008). "From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain." Nature reviews neuroscience **9**(1): 46-56.
- Dickson, K. and C. Lehmann (2019). "Inflammatory Response to Different Toxins in Experimental Sepsis Models." Int J Mol Sci **20**(18).
- Fessi, H., F. Puisieux, J. P. Devissaguet, N. Ammoury and S. Benita (1989). "Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement." International journal of pharmaceuticals **55**(1): R1-R4.

- Gartner, A., P. R. Boag and T. K. Blackwell (2018). "Germline survival and apoptosis." WormBook: The Online Review of C. elegans Biology [Internet].
- Gartner, A., S. Milstein, S. Ahmed, J. Hodgkin and M. O. Hengartner (2000). "A conserved checkpoint pathway mediates DNA damage–induced apoptosis and cell cycle arrest in *C. elegans*." Molecular cell **5**(3): 435-443.
- Giacomeli, R., F. E. Guerra Teixeira, F. B. Carvalho, C. O. Pacheco, A. J. Martins Parisotto, A. C. Funguetto Ribeiro, M. Gomes de Gomes and S. E. Haas (2020). "Curcumin-loaded poly(ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules: Evaluation of fetal and maternal toxicity." Food and Chemical Toxicology **144**: 111625.
- Godeau, D., A. Petit, I. Richard, Y. Roquelaure and A. Descatha (2021). "Return-to-work, disabilities and occupational health in the age of COVID-19." Scandinavian journal of work, environment & health **47**(5): 408.
- Guha, S. and A. Chakraborty (2022). "Coronavirus management and control: Nutrition and alternative medicines." Nutrition and Health **28**(4): 635-645.
- Gumienny, T. L., E. Lambie, E. Hartweg, H. R. Horvitz and M. O. Hengartner (1999). "Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline." Development **126**(5): 1011-1022.
- Han, J., J.-D. Lee, L. Bibbs and R. Ulevitch (1994). "A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells." Science **265**(5173): 808-811.
- Handy, R. D., G. Cornelis, T. Fernandes, O. Tsyusko, A. Decho, T. Sabo-At
Handy, R. D., G. Cornelis, T. Fernandes, O. Tsyusko, A. Decho, T. Sabo-Attwood, C. Metcalfe, J. A. Steevens, S. J. Klaine, A. A. Koelmans and N. Horne (2012). "Ecotoxicity test methods for engineered nanomaterials: practical experiences and recommendations from the bench." Environ Toxicol Chem **31**(1): 15-31.
- Iranshahi, M., A. Sahebkar, S. T. Hosseini, M. Takasaki, T. Konoshima and H. Tokuda (2010). "Cancer chemopreventive activity of diversin from *Ferula diversivittata* in vitro and in vivo." Phytomedicine **17**(3-4): 269-273.
- Jäger, C., F. Huisken, H. Mutschke, I. L. Jansa and T. Henning (2009). "Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons and carbonaceous solids in gas-phase condensation experiments." The Astrophysical Journal **696**(1): 706.
- Kelley, K. W., R.-M. Bluthé, R. Dantzer, J.-H. Zhou, W.-H. Shen, R. W. Johnson and S. R. Broussard (2003). "Cytokine-induced sickness behavior." Brain, behavior, and immunity **17**(1): 112-118.
- Khayatan, D., S. M. Razavi, Z. N. Arab, A. H. Niknejad, K. Nouri, S. Momtaz, E. Gumprich, T. Jamialahmadi, A. H. Abdolghaffari, G. E. Barreto and A. Sahebkar (2022). "Protective effects of curcumin against traumatic brain injury." Biomed Pharmacother **154**: 113621.
- Lakshmanan, V. K., S. Jindal, G. Packirisamy, S. Ojha, S. Lian, A. Kaushik, A. Alzarooni, Y. A. F. Metwally, S. P. Thyagarajan, Y. Do Jung and S. Chouaib (2021). "Nanomedicine-based cancer immunotherapy: recent trends and future perspectives." Cancer Gene Ther **28**(9): 911-923.
- Li, Q., X. Guan, P. Wu, X. Wang, L. Zhou, Y. Tong, R. Ren, K. S. Leung, E. H. Lau and J. Y. Wong (2020). "Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus–infected pneumonia." New England journal of medicine.
- Maiti, P. and G. L. Dunbar (2018). "Use of Curcumin, a Natural Polyphenol for Targeting Molecular Pathways in Treating Age-Related Neurodegenerative Diseases." Int J Mol Sci **19**(6).
- Marton, L. T., S. M. Barbalho, K. P. Sloan, L. A. Sloan, R. d. A. Goulart, A. C. Araújo and M. D. Bechara (2022). "Curcumin, autoimmune and inflammatory diseases: going beyond conventional therapy—a systematic review." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **62**(8): 2140-2157.
- Naksuriya, O., S. Okonogi, R. M. Schiffelers and W. E. Hennink (2014). "Curcumin nanoformulations: a review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment." Biomaterials **35**(10): 3365-3383.

- Parsamanesh, N., M. Moossavi, A. Bahrami, A. E. Butler and A. Sahebkar (2018). "Therapeutic potential of curcumin in diabetic complications." Pharmacol Res **136**: 181-193.
- Rana, P., A. K. Sharma, S. Jain, P. Deshmukh, S. Bhattacharya, B. Banerjee and P. K. Mediratta (2016). "Comparison of fluoxetine and 1-methyl-L-tryptophan in treatment of depression-like illness in *Bacillus Calmette-Guerin*-induced inflammatory model of depression in mice." Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology **27**(6): 569-576.
- Reis, L., M. K. Oliveira, V. C. T. Rojas, T. H. Batista, E. S. Estevam, F. Vitor-Vieira, F. C. Vilela and A. Giusti-Paiva (2022). "Curcumin attenuates LPS-induced sickness behavior and fever in rats by modulating Nrf2 activity." Neuroscience Letters **781**: 136680.
- Reis, L., M. K. Oliveira, V. C. T. Rojas, T. H. Batista, E. S. Estevam, F. Vitor-Vieira, F. C. Vilela and A. Giusti-Paiva (2022). "Curcumin attenuates LPS-induced sickness behavior and fever in rats by modulating Nrf2 activity." Neuroscience Letters **781**: 136680.
- Seeley, J. J. and S. Ghosh (2017). "Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS." J Leukoc Biol **101**(1): 107-119.
- Shen, P., R. Zhang, D. J. McClements and Y. Park (2019). "Nanoemulsion-based delivery systems for testing nutraceutical efficacy using *Caenorhabditis elegans*: Demonstration of curcumin bioaccumulation and body-fat reduction." Food Research International **120**: 157-166.
- Siddique, Y. H., F. Naz and S. Jyoti (2014). "Effect of curcumin on lifespan, activity pattern, oxidative stress, and apoptosis in the brains of transgenic *Drosophila* model of Parkinson's disease." Biomed research international **2014**.
- Soleimani, V., A. Sahebkar and H. Hosseinzadeh (2018). "Turmeric (*Curcuma longa*) and its major constituent (curcumin) as nontoxic and safe substances." Phytotherapy Research **32**(6): 985-995.
- Sylvia, K. E. and G. E. Demas (2018). "A gut feeling: Microbiome-brain-immune interactions modulate social and affective behaviors." Hormones and Behavior **99**: 41-49.
- Szymusiak, M., X. Hu, P. A. Leon Plata, P. Ciupinski, Z. J. Wang and Y. Liu (2016). "Bioavailability of curcumin and curcumin glucuronide in the central nervous system of mice after oral delivery of nano-curcumin." Int J Pharm **511**(1): 415-423.
- Vaz, G. R., M. C. F. Carrasco, M. M. Batista, P. A. B. Barros, M. d. C. Oliveira, A. L. Muccillo-Baisch, V. C. Yurgel, F. Buttini, F. A. A. Soares and L. M. Cordeiro (2022). "Curcumin and quercetin-loaded lipid nanocarriers: Development of omega-3 mucoadhesive nanoemulsions for intranasal administration." Nanomaterials **12**(7): 1073.
- Velasques, K., T. R. Maciel, A. H. d. C. Dal Forno, F. E. G. Teixeira, A. L. da Fonseca, F. de Pilla Varotti, A. R. Fajardo, D. S. de Ávila and S. E. Haas (2018). "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 **118**: 1-12.
- Venturini, C. G., E. Jäger, C. P. Oliveira, A. Bernardi, A. M. Battastini, S. S. Guterres and A. R. Pohlmann (2011). "Formulation of lipid core nanocapsules." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **375**(1-3): 200-208.
- Wen, W., W. Su, H. Tang, W. Le, X. Zhang, Y. Zheng, X. Liu, L. Xie, J. Li and J. Ye (2020). "Immune cell profiling of COVID-19 patients in the recovery stage by single-cell sequencing." Cell discovery **6**(1): 31.
- Xiao, Y.-T., W.-H. Yan, Y. Cao, J.-K. Yan and W. Cai (2017). "P38 MAPK pharmacological inhibitor SB203580 alleviates total parenteral nutrition-induced loss of intestinal barrier function but promotes hepatocyte lipoapoptosis." Cellular Physiology and Biochemistry **41**(2): 623-634.

Xu, J., P. Du, X. Liu, X. Xu, Y. Ge and C. Zhang (2023). "Curcumin supplementation increases longevity and antioxidant capacity in *Caenorhabditis elegans*." Frontiers in Pharmacology **14**: 1195490.

Yavarpour-Bali, H., M. Ghasemi-Kasman and M. Pirzadeh (2019). "Curcumin-loaded nanoparticles: A novel therapeutic strategy in treatment of central nervous system disorders." International journal of nanomedicine: 4449-4460.

Zhu, H., X. Wang, X. Wang, B. Liu, Y. Yuan and X. Zuo (2020). "Curcumin attenuates inflammation and cell apoptosis through regulating NF- κ B and JAK2/STAT3 signaling pathway against acute kidney injury." Cell Cycle **19**(15): 1941-1951.

7 DISCUSSÃO GERAL

O propósito deste estudo foi investigar o perfil toxicológico de nanocápsulas compostas por diferentes revestimentos: polisorbato 80 (P80), polietilenoglicol (PEG), Eudragit (EUD) e quitosana (CS), *in vivo* (**Artigo 1**). De acordo com os resultados escolher a nanoformulação mais segura e assim utilizá-la para desenvolver nanocápsulas carregadas com curcumina e avaliar seus efeitos toxicológicos, bem como seus efeitos protetores sobre a lesão inflamatória induzida por lipopolissacarídeo (LPS) *in vivo* (**Manuscrito I**).

A fim de alcançar estes objetivos utilizou-se o modelo alternativo *Caenorhabditis elegans* que tem se mostrado útil para avaliar a toxicidade e efetividade de nanomateriais, surgindo como uma alternativa às metodologias envolvendo mamíferos (Hunt 2017).

Apesar das muitas vantagens das nanopartículas poliméricas, é imperativo avaliar a sua potencial toxicidade, pois sabe-se que propriedade físico-químicas, como carga de superfície ou hidrofobicidade são parâmetros-chave que definem a toxicidade do nanocarreador (Farace, Sánchez-Moreno et al. 2016, Mukherjee, Waters et al. 2019).

Os resultados iniciais indicaram que estas formulações apresentaram algum grau de toxicidade neste organismo nos parâmetros toxicológicos testados. Os estudos com nanopartículas poliméricas em *C. elegans* são incipientes, mas promissores, pois permitem a avaliação de resultados de nanotoxicidade, como reduções no comprimento do corpo, progênie e comportamento de locomoção, além de seus efeitos na sobrevivência e na expectativa de vida (Pluskota, Horzowski et al. 2009, Mohan, Chen et al. 2010, Li, Wang et al. 2012, Scharf, Piechulek et al. 2013, Gonzalez-Moragas, Roig et al. 2015). Detectamos um aumento na mortalidade de vermes expostos de forma aguda a NCEUD e NCCS nas concentrações mais altas e aumento da mortalidade de vermes expostos na forma crônica a NCP80, NCEUD e NCCS. Não havendo mortalidade dos vermes expostos a NCEUD.

Em resposta a efeitos nocivos causados por espécies reativas, mecanismos de defesa são ativados, incluindo o sistema antioxidante. Esses antioxidantes agem protegendo ou reparando macromoléculas que são alvos da ação de espécies reativas nas células (Poprac, Jomova et al. 2017). Níveis de expressão da enzima antioxidante SOD-3 foram determinados e nossos

resultados mostraram, que não houve aumento na expressão da enzima SOD-3, portanto essas NCs não causaram aumento de espécies reativas.

Notavelmente, nossos resultados demonstraram que as nanocápsulas com o revestimento Eudragit® foram as mais seguras para *C. elegans* em todos os parâmetros testados (Artigo I). O Eudragit® é um polímero sintético com boa estabilidade, baixa toxicidade, capacidade de dilatação em meio aquoso e alta permeabilidade que o tornam um candidato adequado para fins de carreamento de fármacos. Já foi descrito anteriormente que Eudragit® aumenta a biodisponibilidade de vários compostos, portanto este polímero pode ser bastante promissor para novas nanopartículas contendo fármacos (Payab, Jafari-Aghdam et al. 2014, Jafari-Aghdam, Adibkia et al. 2016, Garjani, Barzegar-Jalali et al. 2018).

Baseados nos dados do Artigo I, a NCEUD foi a nanoformulação de escolha para desenvolver nanocápsulas carregadas com curcumina (NCCM) (Manuscrito I). A curcumina têm efeitos benéficos na progressão de doenças inflamatórias devido a seus vários efeitos potenciais: antiviral, anti-inflamatório, anticoagulante, antiplaquetário e citoprotetor. Esses e muitos outros efeitos da curcumina a tornam um composto favorável no tratamento adjuvante da COVID-19 (Jäger, Lowery et al. 2014). Apesar dos múltiplos benefícios medicinais, a curcumina possui baixa solubilidade e biodisponibilidade, instabilidade nos fluidos corporais e metabolismo rápido (Sharma 1955, Wahlström and Blennow 1978, Couvreur 1988, Khurana and Ho 1988, Wang, Walden et al. 1997, Mahran, Hagraas et al. 2017). Sendo assim, nanoformulações como as NCEUD são estratégias promissoras para otimizar a eficácia e biodisponibilidade da curcumina.

Desta forma, os efeitos toxicológicos das NCCM, bem como seus efeitos protetores sobre a lesão inflamatória induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em *C. elegans*, foram avaliados (Manuscrito I). Os resultados mostram que NCCM não apresentam toxicidade para os vermes. Isso está de acordo com muitos estudos que já mostraram a segurança da curcumina, mesmo em altas concentrações ou doses, dependendo da espécie avaliada (Soleimani, Sahebkar et al. 2018).

A significativa atividade anti-inflamatória da curcumina tem atraído o interesse de muitos pesquisadores, sendo considerada um dos compostos

naturais com maior potencial no tratamento de doenças. Neste trabalho induzimos uma inflamação em *C. elegans* com o lipopolissacarídeo (LPS) (Manuscrito I), uma endotoxina presente na membrana externa de bactérias Gram-negativas. Os resultados mostraram que as NCCM protegeram os vermes da lesão induzida pelo LPS, mantendo os fenótipos comportamentais e diminuindo a apoptose, conforme observado na cepa transgênica marcando a caspase CED-3. Cabe ressaltar que a curcumina livre não apresentou estes efeitos.

Em suma, com base nos resultados, observamos que as NCCM possuem baixa toxicidade em *C. elegans* e promoveram efeitos anti-inflamatórios em um modelo de infecção com LPS no nematódeo, sendo mais eficazes do que a curcumina livre. Esses achados sugerem que a NCCM poderá ser um adjuvante promissor no tratamento de doenças inflamatórias como a tempestade de citocinas na COVID-19.

8 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados nesta tese pode-se confirmar a importância da avaliação da segurança das nanoformulações.

Os diferentes revestimentos e cargas das nanocápsulas tiveram influência significativas na segurança em *C. elegans* após a exposição aguda e crônica.

A exposição crônica a NCP80, NCPEG e NCCS levou a uma diminuição significativa na sobrevivência dos nematóides. Esses resultados indicam que essas formulações apresentam algum grau de toxicidade nesse organismo.

Em resposta aos efeitos nocivos causados por espécies reativas, nossos resultados mostram que não houve alteração na expressão da enzima antioxidante SOD-3 nos nematóides tratados com todas as NCs testadas, sugerindo que não causaram aumento de espécies reativas.

Notavelmente a NCEUD demonstrou ser a NC mais segura em todos os parâmetros toxicológicos testados, sendo a formulação de escolha para encapsular a curcumina, um bioativo com numerosos benefícios terapêuticos, porém com baixa solubilidade, biodisponibilidade e instabilidade.

A estratégia de otimizar a eficácia de agentes terapêuticos como a curcumina, utilizando sistemas nanoparticulados, foi muito promissor. As nanocápsulas carregadas com curcumina demonstraram ser seguras e protegeram *C. elegans* da lesão induzida pelo lipopolissacarídeo (LPS) de forma mais eficiente que a curcumina livre.

9 PERSPECTIVAS

- Avaliar os efeitos das NCCM em *C. elegans*, após indução por LPS, na via de sinalização p38-MAPK, através da expressão transcricional dos genes pmk-1 e sek-1;
- Avaliar os efeitos das NCCM em *C. elegans*, após indução por LPS, na via de sinalização TLR;
- Avaliar os efeitos das NCCM nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, TNF- γ , IL-6 e IL-1, em *C. elegans*, após indução por LPS, através de imunoenaios enzimáticos;
- Avaliar os efeitos das NCCM nos níveis de estresse oxidativo, através do antioxidante SOD-3, em *C. elegans*, após indução por LPS;

10 REFERÊNCIAS

- Aballay, A. and F. M. Ausubel (2001). "Programmed cell death mediated by ced-3 and ced-4 protects *Caenorhabditis elegans* from *Salmonella typhimurium*-mediated killing." Proceedings of the National Academy of Sciences **98**(5): 2735-2739.
- Aballay, A., E. Drenkard, L. R. Hilburn and F. M. Ausubel (2003). "Caenorhabditis elegans Innate Immune Response Triggered by *Salmonella enterica* Requires Intact LPS and Is Mediated by a MAPK Signaling Pathway." Current Biology **13**(1): 47-52.
- Abou-Saleh, H., N. Younes, K. Rasool, M. H. Younis, R. M. Prieto, H. M. Yassine, K. A. Mahmoud, G. Pintus and G. K. Nasrallah (2019). "Impaired liver size and compromised neurobehavioral activity are elicited by chitosan nanoparticles in the zebrafish embryo model." Nanomaterials **9**(1): 122.
- Afolayan, F. I., B. Erinwusi and O. T. Oyeyemi (2018). "Immunomodulatory activity of curcumin-entrapped poly d, l-lactic-co-glycolic acid nanoparticles in mice." Integrative medicine research **7**(2): 168-175.
- Agarrayua, D. A., A. C. Funguetto-Ribeiro, P. Trevisan, S. E. Haas and D. S. Ávila (2023). "Safety assessment of different unloaded polymeric nanocapsules in *Caenorhabditis elegans*." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **263**: 109477.
- Ahmed, M., A. N. Lukyanov, V. Torchilin, H. Tournier, A. N. Schneider and S. N. Goldberg (2005). "Combined radiofrequency ablation and adjuvant liposomal chemotherapy: effect of chemotherapeutic agent, nanoparticle size, and circulation time." Journal of vascular and interventional radiology **16**(10): 1365-1371.
- Akaberi, M., A. Sahebkar and S. A. Emami (2021). "Turmeric and curcumin: from traditional to modern medicine." Studies on Biomarkers and New Targets in Aging Research in Iran: Focus on Turmeric and Curcumin: 15-39.
- AKHLAQ, M., S. BAKHSH, M. SAFDAR, S. ALAM, M. TARIQ and Z. ANWER (2016). "Synthesis, characterization and in vivo assessment of dexibuprofen-eudragit solid dispersion nanoparticles with supercritical antisolvent technique." Latin American Journal of Pharmacy **35**: 6.
- Akhtar, N., M. Rehman, H. Khan, F. Rasool, T. Saeed and G. Murtaz (2011). "Penetration enhancing effect of polysorbate 20 and 80 on the in vitro percutaneous absorption of lascorbic acid." Tropical Journal of Pharmaceutical Research **10**(3).
- Albrecht, M. A., C. W. Evans and C. L. Raston (2006). "Green chemistry and the health implications of nanoparticles." Green chemistry **8**(5): 417-432.
- Alikiaii, B., M. Bagherniya, G. Askari, T. Sathyapalan and A. Sahebkar (2021). "Evaluation of the effect of curcumin on pneumonia: A systematic review of preclinical studies." Phytotherapy Research **35**(4): 1939-1952.
- Alizadeh, F., M. Javadi, A. A. Karami, F. Gholaminejad, M. Kavianpour and H. K. Haghigian (2018). "Curcumin nanomicelle improves semen parameters, oxidative stress, inflammatory biomarkers, and reproductive hormones in infertile men: A randomized clinical trial." Phytother Res **32**(3): 514-521.
- Alotaibi, H. F., S. Elsamaligy, G. M. Mahrous, M. A. Bayomi and H. A. Mahmoud (2019). "Design of taste masked enteric orodispersible tablets of diclofenac sodium by applying fluid bed coating technology." Saudi Pharmaceutical Journal **27**(3): 354-362.
- Alper, S., S. J. McBride, B. Lackford, J. H. Freedman and D. A. Schwartz (2007). "Specificity and complexity of the *Caenorhabditis elegans* innate immune response." Mol Cell Biol **27**(15): 5544-5553.
- Anand, P., A. B. Kunnumakkara, R. A. Newman and B. B. Aggarwal (2007). "Bioavailability of curcumin: problems and promises." Molecular pharmaceutics **4**(6): 807-818.
- Anand, P., A. B. Kunnumakkara, R. A. Newman and B. B. Aggarwal (2007). "Bioavailability of curcumin: problems and promises." Mol Pharm **4**(6): 807-818.
- Anand, P., H. B. Nair, B. Sung, A. B. Kunnumakkara, V. R. Yadav, R. R. Tekmal and B. B. Aggarwal (2010). "Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with

- enhanced cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability in vivo." Biochem Pharmacol **79**(3): 330-338.
- Anderberg, E. K., C. Nyström and P. Artursson (1992). "Epithelial transport of drugs in cell culture. VII: Effects of pharmaceutical surfactant excipients and bile acids on transepithelial permeability in monolayers of human intestinal epithelial (Caco-2) cells." Journal of pharmaceutical sciences **81**(9): 879-887.
- Andrew, P. A. and W. Nicholas (1976). "Effect of bacteria on dispersal of *Caenorhabditis elegans* (Rhabditidae)." Nematologica **22**(4): 451-461.
- Anton, N., J.-P. Benoit and P. Saulnier (2008). "Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—a review." Journal of controlled release **128**(3): 185-199.
- Arturson, P., T. Laakso and P. Edman (1983). "Acrylic microspheres in vivo IX: Blood elimination kinetics and organ distribution of microparticles with different surface characteristics." Journal of pharmaceutical sciences **72**(12): 1415-1420.
- Arya, U., C. K. Das and J. R. Subramaniam (2010). "*Caenorhabditis elegans* for preclinical drug discovery." Current Science: 1669-1680.
- Asher, G. N., Y. Xie, R. Moaddel, M. Sanghvi, K. S. Dossou, A. D. Kashuba, R. S. Sandler and R. L. Hawke (2017). "Randomized Pharmacokinetic Crossover Study Comparing 2 Curcumin Preparations in Plasma and Rectal Tissue of Healthy Human Volunteers." J Clin Pharmacol **57**(2): 185-193.
- Ashrafizadeh, M., H. Rafiei, R. Mohammadinejad, E. G. Afshar, T. Farkhondeh and S. Samarghandian (2020). "Potential therapeutic effects of curcumin mediated by JAK/STAT signaling pathway: A review." Phytother Res **34**(8): 1745-1760.
- Asselah, T., D. Durantel, E. Pasmant, G. Lau and R. F. Schinazi (2021). "COVID-19: Discovery, diagnostics and drug development." Journal of hepatology **74**(1): 168-184.
- Atabaki, M., Z. Shariati-Sarabi, J. Tavakkol-Afshari and M. Mohammadi (2020). "Significant immunomodulatory properties of curcumin in patients with osteoarthritis; a successful clinical trial in Iran." Int Immunopharmacol **85**: 106607.
- Babaei, F., M. Nassiri-Asl and H. Hosseinzadeh (2020). "Curcumin (a constituent of turmeric): New treatment option against COVID-19." Food science & nutrition **8**(10): 5215-5227.
- Bahrami, M., M. Kamalinejad, S. A. Latifi, F. Seif and M. Dadmehr (2020). "Cytokine storm in COVID-19 and parthenolide: Preclinical evidence." Phytother Res **34**(10): 2429-2430.
- Balla, K. M. and E. R. Troemel (2013). "*Caenorhabditis elegans* as a model for intracellular pathogen infection." Cellular microbiology **15**(8): 1313-1322.
- Baron, S. A., C. Devaux, P. Colson, D. Raoult and J.-M. Rolain (2020). Teicoplanin: an alternative drug for the treatment of COVID-19?, Elsevier.
- Battisti, J. M., L. A. Watson, M. T. Naung, A. M. Drobish, E. Voronina and M. F. Minnick (2017). "Analysis of the *Caenorhabditis elegans* innate immune response to *Coxiella burnetii*." Innate immunity **23**(2): 111-127.
- Benarba, B. and A. Pandiella (2020). "Medicinal plants as sources of active molecules against COVID-19." Frontiers in pharmacology: 1189.
- Bender, E. A., M. F. Cavalcante, M. D. Adorne, L. M. Colomé, S. S. Guterres, D. S. Abdalla and A. R. Pohlmann (2014). "New strategy to surface functionalization of polymeric nanoparticles: one-pot synthesis of scFv anti-LDL (-)-functionalized nanocapsules." Pharmaceutical research **31**(11): 2975-2987.
- Bergh, M., K. Magnusson, J. L. G. Nilsson and A. T. Karlberg (1997). "Contact allergenic activity of Tween® 80 before and after air exposure." Contact dermatitis **37**(1): 9-18.
- Bernardi, A., A. Zilberstein, E. Jäger, M. Campos, F. Morrone, J. Calixto, A. Pohlmann, S. Guterres and A. Battastini (2009). "Effects of indomethacin-loaded nanocapsules in experimental models of inflammation in rats." British journal of pharmacology **158**(4): 1104-1111.
- Bersch, P., B. Nies and A. Liebendorfer (1995). "Evaluation of the biological properties of different wound dressing materials." J. Mater. Sci. Mater. Med **6**: 231-240.

- Blasi, P., A. Schoubben, G. Traina, G. Manfroni, L. Barberini, P. F. Alberti, C. Cirotto and M. Ricci (2013). "Lipid nanoparticles for brain targeting III. Long-term stability and in vivo toxicity." International journal of pharmaceutics **454**(1): 316-323.
- Boarescu, P.-M., I. Boarescu, A. E. Bulboacă, I. C. Bocşan, R. M. Pop, D. Gheban, R.-M. Râjnoveanu, A. Râjnoveanu, Ş. H. Roşian and A. D. Buzoianu (2021). "Multi-organ protective effects of curcumin nanoparticles on drug-induced acute myocardial infarction in rats with type 1 Diabetes Mellitus." Applied Sciences **11**(12): 5497.
- Borgonie, G., M. Claeys, J. Vanfleteren, D. De Waele and A. Coomans (1995). "Presence of peritrophic-like membranes in the intestine of three bacteriophagous nematodes (Nematoda: Rhabditida)." Fundamental and applied nematology **18**(3): 227-233.
- Bose, S., A. K. Panda, S. Mukherjee and G. Sa (2015). "Curcumin and tumor immune-editing: resurrecting the immune system." Cell division **10**(1): 1-13.
- Bossinger, O. and M. Hoffmann (2012). "Development and Cell Polarity of the C. elegans Intestine." Current Frontiers and Perspectives in Cell Biology: 335-360.
- Bourguiba, R., M. Delplanque, C. Vinit, F. Ackermann, L. Savey, G. Grateau, V. Hentgen and S. Georgin-Lavialle (2021). "Clinical course of COVID-19 in a cohort of 342 familial Mediterranean fever patients with a long-term treatment by colchicine in a French endemic area." Annals of the Rheumatic Diseases **80**(4): 539-540.
- Budel, R. G., D. A. da Silva, M. P. Moreira, A. J. F. Dalcin, A. F. da Silva, L. R. Nazario, J. H. Majolo, L. Q. S. Lopes, R. C. V. Santos and F. A. A. Soares (2020). "Toxicological evaluation of naringin-loaded nanocapsules in vitro and in vivo." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **188**: 110754.
- Cao, B., Y. Wang, D. Wen, W. Liu, J. Wang, G. Fan, L. Ruan, B. Song, Y. Cai and M. Wei (2020). "A trial of lopinavir–ritonavir in adults hospitalized with severe Covid-19." New England journal of medicine.
- Cao, Y., Q. Li, J. Chen, X. Guo, C. Miao, H. Yang, Z. Chen, C. Li and L. Li (2020). "Hospital emergency management plan during the COVID-19 epidemic." Academic Emergency Medicine **27**(4): 309-311.
- Cardoso, V. M. d. O., B. J. Moreira, E. J. Comparetti, I. Sampaio, L. M. B. Ferreira, P. M. P. Lins and V. Zucolotto (2020). "Is Nanotechnology Helping in the Fight Against COVID-19?" Frontiers in Nanotechnology **2**: 4.
- Casettari, L., D. Vllasaliu, G. Mantovani, S. M. Howdle, S. Stolnik and L. Illum (2010). "Effect of PEGylation on the toxicity and permeability enhancement of chitosan." Biomacromolecules **11**(11): 2854-2865.
- Cavaillon, J. M. (2018). "Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines." Toxicon **149**: 45-53.
- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward and D. C. Prasher (1994). "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." Science **263**(5148): 802-805.
- Chang, Y., L. Zhai, J. Peng, H. Wu, Z. Bian and H. Xiao (2021). "Phytochemicals as regulators of Th17/Treg balance in inflammatory bowel diseases." Biomed Pharmacother **141**: 111931.
- Chantasart, D., P. Tocanitchart, A. Wongrakpanich, V. Teeranachaideekul and V. B. Junyaprasert (2018). "Fabrication and evaluation of Eudragit® polymeric films for transdermal delivery of piroxicam." Pharmaceutical development and technology **23**(8): 771-779.
- Charão, M. F., G. Goethel, N. Brucker, K. Paese, V. L. Eifler-Lima, A. R. Pohlmann, S. S. Guterres and S. C. Garcia (2019). "Melatonin-loaded lipid-core nanocapsules protect against lipid peroxidation caused by paraquat through increased SOD expression in Caenorhabditis elegans." BMC Pharmacol Toxicol **20**(Suppl 1): 80.
- Charão, M. F., C. Souto, N. Brucker, A. Barth, D. S. Jornada, D. Fagundes, D. S. Ávila, V. L. Eifler-Lima, S. S. Guterres, A. R. Pohlmann and S. C. Garcia (2015). "Caenorhabditis elegans as an alternative in vivo model to determine oral uptake, nanotoxicity, and efficacy of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat damage." Int J Nanomedicine **10**: 5093-5106.

- Charcosset, C. and H. Fessi (2005). "Preparation of nanoparticles with a membrane contactor." Journal of Membrane Science **266**(1-2): 115-120.
- Chen, G., S. Liu, R. Pan, G. Li, H. Tang, M. Jiang, Y. Xing, F. Jin, L. Lin and J. Dong (2018). "Curcumin Attenuates gp120-Induced Microglial Inflammation by Inhibiting Autophagy via the PI3K Pathway." Cell Mol Neurobiol **38**(8): 1465-1477.
- Chen, G., D. Wu, W. Guo, Y. Cao, D. Huang, H. Wang, T. Wang, X. Zhang, H. Chen, H. Yu, X. Zhang, M. Zhang, S. Wu, J. Song, T. Chen, M. Han, S. Li, X. Luo, J. Zhao and Q. Ning (2020). "Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019." J Clin Invest **130**(5): 2620-2629.
- Chen, W., Z. Wang, Y. Wang and Y. Li (2021). "Natural bioactive molecules as potential agents against SARS-CoV-2." Frontiers in Pharmacology **12**: 702472.
- Chilimuri, S., H. Sun, A. Alemam, N. Mantri, E. Shehi, J. Tejada, A. Yugay and S. K. Nayudu (2020). "Predictors of mortality in adults admitted with COVID-19: retrospective cohort study from New York City." Western Journal of Emergency Medicine **21**(4): 779.
- Chisholm, A. D. and T. I. Hsiao (2012). "The *Caenorhabditis elegans* epidermis as a model skin. I: development, patterning, and growth." Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology **1**(6): 861-878.
- Chisholm, A. D. and S. Xu (2012). "The *Caenorhabditis elegans* epidermis as a model skin. II: differentiation and physiological roles." Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology **1**(6): 879-902.
- Chu, C., V. Cheng, I. Hung, M. Wong, K. Chan, K. Chan, R. Kao, L. Poon, C. Wong and Y. Guan (2004). "Role of lopinavir/ritonavir in the treatment of SARS: initial virological and clinical findings." Thorax **59**(3): 252-256.
- Colaneri, M., P. Sacchi, V. Zuccaro, S. Biscarini, M. Sachs, S. Roda, T. C. Pieri, P. Valsecchi, A. Piralla, E. Seminari, A. Di Matteo, S. Novati, L. Maiocchi, L. Pagnucco, M. Tirani, F. Baldanti, F. Mojoli, S. Perlini and R. Bruno (2020). "Clinical characteristics of coronavirus disease (COVID-19) early findings from a teaching hospital in Pavia, North Italy, 21 to 28 February 2020." Euro Surveill **25**(16).
- Conti, P., G. Ronconi, A. Caraffa, C. E. Gallenga, R. Ross, I. Frydas and S. K. Kritas (2020). "Induction of pro-inflammatory cytokines (IL-1 and IL-6) and lung inflammation by Coronavirus-19 (COVI-19 or SARS-CoV-2): anti-inflammatory strategies." J Biol Regul Homeost Agents **34**(2): 327-331.
- Coomes, E. A. and H. Haghbayan (2020). "Interleukin-6 in COVID-19: a systematic review and meta-analysis." Reviews in medical virology **30**(6): 1-9.
- Couvreur, P. (1988). Use of biodegradable colloidal vehicles (nanoparticles) for targeting anti-cancer drugs and antibiotics. Therapie, JOHN LIBBEY & CO LTD 13 SMITHS YARD SUMMERLEY ST, LONDON, ENGLAND SW18 4HR.
- Cui, Z., Y. Xiang, J. Si, M. Yang, Q. Zhang and T. Zhang (2008). "Ionic interactions between sulfuric acid and chitosan membranes." Carbohydrate Polymers **73**(1): 111-116.
- da Rocha Lindner, G., D. Bonfanti Santos, D. Colle, E. L. Gasnhar Moreira, R. Daniel Prediger, M. Farina, N. M. Khalil and R. Mara Mainardes (2015). "Improved neuroprotective effects of resveratrol-loaded polysorbate 80-coated poly (lactide) nanoparticles in MPTP-induced Parkinsonism." Nanomedicine **10**(7): 1127-1138.
- Damgé, C., P. Maincent and N. Ubrich (2007). "Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats." Journal of controlled release **117**(2): 163-170.
- Dantzer, R. (2004). "Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity." European Journal of Pharmacology **500**(1): 399-411.
- Dantzer, R. (2009). "Cytokine, sickness behavior, and depression." Immunology and Allergy Clinics **29**(2): 247-264.
- Dantzer, R., J. C. O'connor, G. G. Freund, R. W. Johnson and K. W. Kelley (2008). "From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain." Nature reviews neuroscience **9**(1): 46-56.

- Das, R. K., N. Kasoju and U. Bora (2010). "Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells." Nanomedicine **6**(1): 153-160.
- Dash, M., F. Chiellini, R. M. Ottenbrite and E. Chiellini (2011). "Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications." Progress in polymer science **36**(8): 981-1014.
- de Guzman, A. C. V., M. A. Razzak, J. H. Cho, J. Y. Kim and S. S. Choi (2022). "Curcumin-Loaded Human Serum Albumin Nanoparticles Prevent Parkinson's Disease-like Symptoms in *C. elegans*." Nanomaterials **12**(5): 758.
- Derochette, S., T. Franck, A. Mouithys-Mickalad, J. Ceusters, G. Deby-Dupont, J. P. Lejeune, P. Neven and D. Serteyn (2013). "Curcumin and resveratrol act by different ways on NADPH oxidase activity and reactive oxygen species produced by equine neutrophils." Chem Biol Interact **206**(2): 186-193.
- Dickson, K. and C. Lehmann (2019). "Inflammatory Response to Different Toxins in Experimental Sepsis Models." Int J Mol Sci **20**(18).
- Dodane, V., M. A. Khan and J. R. Merwin (1999). "Effect of chitosan on epithelial permeability and structure." International journal of pharmaceutics **182**(1): 21-32.
- Donbrow, M., E. Azaz and A. Pillersdorf (1978). "Autoxidation of polysorbates." Journal of pharmaceutical sciences **67**(12): 1676-1681.
- DURÁN, N. and M. DE AZEVEDO (2004). "O que é nanobiotecnologia." Atualidades e perspectivas. Instituto de Química, Laboratório de Química Biológica, Unicamp, Campinas.
- Egberts, H., J. Koninkx, J. Van Dijk and J. Mouwen (1984). "Biological and pathobiological aspects of the glycocalyx of the small intestinal epithelium. A review." Veterinary Quarterly **6**(4): 186-199.
- Eisele, J., G. Haynes, K. Kreuzer and T. Rosamilia (2013). "Characterisation and toxicological assessment of Neutral Methacrylate Copolymer for GRAS evaluation." Regulatory Toxicology and Pharmacology **67**(3): 392-408.
- El-Nahas, A. E., A. N. Allam, D. A. Abdelmonsif and A. H. El-Kamel (2017). "Silymarin-loaded eudragit nanoparticles: formulation, characterization, and hepatoprotective and toxicity evaluation." Aaps Pharmscitech **18**(8): 3076-3086.
- Eldsäter, C., B. Erlandsson, R. Renstad, A.-C. Albertsson and S. Karlsson (2000). "The biodegradation of amorphous and crystalline regions in film-blown poly (ϵ -caprolactone)." Polymer **41**(4): 1297-1304.
- elegans* Atlas, C. "Spring Harbor Laboratory Press. 2008. 348 pages. ISBN 978-087969715-0. Price \$125 (concealed wire binding). ISBN 978-087969794-5. Price \$175 (hard-back)."
- Elias, H.-G. (2009). Chemische Struktur und Synthesen, Wiley-VCH.
- Elzatahry, A. and M. M. Eldin (2008). "Preparation and characterization of metronidazole-loaded chitosan nanoparticles for drug delivery application." Polymers for Advanced Technologies **19**(12): 1787-1791.
- Ergoren, M. C., G. Tuncel, C. S. Ozverel and T. Sanlidag (2022). "Designing In-House SARS-CoV-2 RT-qPCR Assay for Variant of Concerns." Glob Med Genet **9**(3): 252-257.
- Evans, E. A., T. Kawli and M. W. Tan (2008). "Pseudomonas aeruginosa suppresses host immunity by activating the DAF-2 insulin-like signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*." PLoS Pathog **4**(10): e1000175.
- Fang, F., C. Y. Gong, P. W. Dong, S. Z. Fu, Y. C. Gu, G. Guo, X. Zhao, Y. Q. Wei and Z. Y. Qian (2009). "Acute toxicity evaluation of in situ gel-forming controlled drug delivery system based on biodegradable poly (ϵ -caprolactone)-poly (ethylene glycol)-poly (ϵ -caprolactone) copolymer." Biomedical Materials **4**(2): 025002.
- Farace, C., P. Sánchez-Moreno, M. Orecchioni, R. Manetti, F. Sgarrella, Y. Asara, J. M. Peula-García, J. A. Marchal, R. Madeddu and L. G. Delogu (2016). "Immune cell impact of three differently coated lipid nanocapsules: pluronic, chitosan and polyethylene glycol." Sci Rep **6**: 18423.

- Fernandes, Q., V. P. Inchakalody, M. Merhi, S. Mestiri, N. Taib, D. Moustafa Abo El-Ella, T. Bedhiafi, A. Raza, L. Al-Zaidan and M. O. Mohsen (2022). "Emerging COVID-19 variants and their impact on SARS-CoV-2 diagnosis, therapeutics and vaccines." Annals of medicine **54**(1): 524-540.
- Ferreira, L. L. and A. D. Andricopulo (2020). "Medicamentos e tratamentos para a Covid-19." Estudos Avançados **34**: 7-27.
- Fessi, H., F. Puisieux, J. P. Devissaguet, N. Ammoury and S. Benita (1989). "Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement." International journal of pharmaceuticals **55**(1): R1-R4.
- Foletto, V. S., M. B. Serafin, A. Bottega, T. F. da Rosa, C. d. S. Machado, S. S. Coelho and R. Hörner (2020). "Repositioning of fluoxetine and paroxetine: study of potential antibacterial activity and its combination with ciprofloxacin." Medicinal Chemistry Research **29**(3): 556-563.
- Frank, L. A., R. V. Contri, R. C. Beck, A. R. Pohlmann and S. S. Guterres (2015). "Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules." Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology **7**(5): 623-639.
- Frank, L. A., G. Sandri, F. D'Autilia, R. V. Contri, M. C. Bonferoni, C. Caramella, A. G. Frank, A. R. Pohlmann and S. S. Guterres (2014). "Chitosan gel containing polymeric nanocapsules: a new formulation for vaginal drug delivery." International journal of nanomedicine **9**: 3151.
- Freshney, N. W., L. Rawlinson, F. Guesdon, E. Jones, S. Cowley, J. Hsuan and J. Saklatvala (1994). "Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27." Cell **78**(6): 1039-1049.
- Frozza, R. L., A. Bernardi, K. Paese, J. B. Hoppe, T. d. Silva, A. M. Battastini, A. R. Pohlmann, S. S. Guterres and C. Salbego (2010). "Characterization of trans-resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules and tissue distribution studies in rats." Journal of biomedical nanotechnology **6**(6): 694-703.
- Fruijtjer-Pölloth, C. (2005). "Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products." Toxicology **214**(1-2): 1-38.
- Fu, Y., R. Gao, Y. Cao, M. Guo, Z. Wei, E. Zhou, Y. Li, M. Yao, Z. Yang and N. Zhang (2014). "Curcumin attenuates inflammatory responses by suppressing TLR4-mediated NF- κ B signaling pathway in lipopolysaccharide-induced mastitis in mice." Int Immunopharmacol **20**(1): 54-58.
- Furrianca, M. C., M. Alvear, T. Zambrano, V. Fajardo and L. A. Salazar (2017). "Phytochemical constituents of the root of *Berberis microphylla*." Asian J. Pharm. Clin. Res **10**: 225-227.
- Gao, Y., Z. Zhuang, Y. Lu, T. Tao, Y. Zhou, G. Liu, H. Wang, D. Zhang, L. Wu, H. Dai, W. Li and C. Hang (2019). "Curcumin Mitigates Neuro-Inflammation by Modulating Microglia Polarization Through Inhibiting TLR4 Axis Signaling Pathway Following Experimental Subarachnoid Hemorrhage." Front Neurosci **13**: 1223.
- Garjani, A., M. Barzegar-Jalali, K. Osouli-Bostanabad, H. Ranjbar and K. Adibkia (2018). "Morphological and physicochemical evaluation of the propranolol HCl–Eudragit® RS100 electrospayed nanoformulations." Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology **46**(4): 749-756.
- Garsin, D. A., J. M. Villanueva, J. Begun, D. H. Kim, C. D. Sifri, S. B. Calderwood, G. Ruvkun and F. M. Ausubel (2003). "Long-lived *C. elegans* daf-2 mutants are resistant to bacterial pathogens." Science **300**(5627): 1921-1921.
- Gartner, A., P. R. Boag and T. K. Blackwell (2018). "Germline survival and apoptosis." WormBook: The Online Review of *C. elegans* Biology [Internet].
- Gartner, A., S. Milstein, S. Ahmed, J. Hodgkin and M. O. Hengartner (2000). "A conserved checkpoint pathway mediates DNA damage–induced apoptosis and cell cycle arrest in *C. elegans*." Molecular cell **5**(3): 435-443.
- Gelperina, S., A. Khalansky, I. Skidan, Z. Smirnova, A. Bobruskin, S. Severin, B. Turowski, F. Zanella and J. Kreuter (2002). "Toxicological studies of doxorubicin bound

- to polysorbate 80-coated poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles in healthy rats and rats with intracranial glioblastoma." Toxicology Letters **126**(2): 131-141.
- Ghalandaraki, N., A. M. Alizadeh and S. Ashkani-Esfahani (2014). "Nanotechnology-applied curcumin for different diseases therapy." BioMed research international **2014**.
- Ghalandaraki, N., A. M. Alizadeh and S. Ashkani-Esfahani (2014). "Nanotechnology-applied curcumin for different diseases therapy." Biomed Res Int **2014**: 394264.
- Giacomeli, R., F. E. Guerra Teixeira, F. B. Carvalho, C. O. Pacheco, A. J. Martins Parisotto, A. C. Funguetto Ribeiro, M. Gomes de Gomes and S. E. Haas (2020). "Curcumin-loaded poly(ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules: Evaluation of fetal and maternal toxicity." Food and Chemical Toxicology **144**: 111625.
- Giacomotto, J. and L. Ségalat (2010). "High-throughput screening and small animal models, where are we?" British journal of pharmacology **160**(2): 204-216.
- Gibaud, S., N. J. Al Awwadi, C. Ducki and A. Astier (2004). "Poly (ϵ -caprolactone) and Eudragit® microparticles containing fludrocortisone acetate." International journal of pharmaceutics **269**(2): 491-508.
- Godeau, D., A. Petit, I. Richard, Y. Roquelaure and A. Descatha (2021). "Return-to-work, disabilities and occupational health in the age of COVID-19." Scandinavian journal of work, environment & health **47**(5): 408.
- Goldberg, M., R. Langer and X. Jia (2007). "Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering." Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition **18**(3): 241-268.
- Gonzalez-Moragas, L., A. Roig and A. Laromaine (2015). "C. elegans as a tool for in vivo nanoparticle assessment." Adv Colloid Interface Sci **219**: 10-26.
- Gonzalez-Moragas, L., A. Roig and A. Laromaine (2015). "C. elegans as a tool for in vivo nanoparticle assessment." Advances in colloid and interface science **219**: 10-26.
- Gravato-Nobre, M. J., D. Stroud, D. O'Rourke, C. Darby and J. Hodgkin (2011). "Glycosylation genes expressed in seam cells determine complex surface properties and bacterial adhesion to the cuticle of *Caenorhabditis elegans*." Genetics **187**(1): 141-155.
- Gravato-Nobre, M. J. and J. Hodgkin (2005). "Caenorhabditis elegans as a model for innate immunity to pathogens." Cellular microbiology **7**(6): 741-751.
- Guarente, L. and C. Kenyon (2000). "Genetic pathways that regulate ageing in model organisms." Nature **408**(6809): 255-262.
- Guha, S. and A. Chakraborty (2022). "Coronavirus management and control: Nutrition and alternative medicines." Nutrition and Health **28**(4): 635-645.
- Gumienny, T. L., E. Lambie, E. Hartweg, H. R. Horvitz and M. O. Hengartner (1999). "Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline." Development **126**(5): 1011-1022.
- Gupta, S. C., S. Patchva and B. B. Aggarwal (2013). "Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials." The AAPS journal **15**: 195-218.
- Gupta, V., A. Aseh, C. N. Rios, B. B. Aggarwal and A. B. Mathur (2009). "Fabrication and characterization of silk fibroin-derived curcumin nanoparticles for cancer therapy." Int J Nanomedicine **4**: 115-122.
- Guterres, S. S., M. P. Alves and A. R. Pohlmann (2007). "Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications." Drug target insights **2**: 117739280700200002.
- Haas, S. E., C. C. Bettoni, L. K. de Oliveira, S. S. Guterres and T. Dalla Costa (2009). "Nanoencapsulation increases quinine antimalarial efficacy against *Plasmodium berghei* in vivo." International journal of antimicrobial agents **34**(2): 156-161.
- Hamdi, G., G. Ponchel and D. Duchene (1998). "An original method for studying in vitro the enzymatic degradation of cross-linked starch microspheres." Journal of controlled release **55**(2-3): 193-201.
- Han, J., J.-D. Lee, L. Bibbs and R. Ulevitch (1994). "A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells." Science **265**(5173): 808-811.
- Handy, R. D., G. Cornelis, T. Fernandes, O. Tsyusko, A. Decho, T. Sabo-Attwood, C. Metcalfe, J. A. Steevens, S. J. Klaine, A. A. Koelmans and N. Horne (2012). "Ecotoxicity

- test methods for engineered nanomaterials: practical experiences and recommendations from the bench." Environ Toxicol Chem **31**(1): 15-31.
- Hani, U. and H. Shivakumar (2014). "Solubility enhancement and delivery systems of curcumin a herbal medicine: a review." Current drug delivery **11**(6): 792-804.
- Harris, J. M. and R. B. Chess (2003). "Effect of pegylation on pharmaceuticals." Nature reviews Drug discovery **2**(3): 214-221.
- Harrison, C. (2020). "Coronavirus puts drug repurposing on the fast track." Nature biotechnology **38**(4): 379-381.
- Hasanzadeh, S., M. I. Read, A. R. Bland, M. Majeed, T. Jamialahmadi and A. Sahebkar (2020). "Curcumin: an inflammasome silencer." Pharmacol Res **159**: 104921.
- He, P., S. S. Davis and L. Illum (1998). "In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres." International journal of pharmaceutics **166**(1): 75-88.
- Hodos, R. A., B. A. Kidd, K. Shameer, B. P. Readhead and J. T. Dudley (2016). "In silico methods for drug repurposing and pharmacology." Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine **8**(3): 186-210.
- Hombreiro-Perez, M., J. Siepmann, C. Zinutti, A. Lamprecht, N. Ubrich, M. Hoffman, R. Bodmeier and P. Maincent (2003). "Non-degradable microparticles containing a hydrophilic and/or a lipophilic drug: preparation, characterization and drug release modeling." Journal of Controlled Release **88**(3): 413-428.
- Hu, L., Y. Shi, J. H. Li, N. Gao, J. Ji, F. Niu, Q. Chen, X. Yang and S. Wang (2015). "Enhancement of oral bioavailability of curcumin by a novel solid dispersion system." Aaps Pharmscitech **16**: 1327-1334.
- Hu, Y.-L., W. Qi, F. Han, J.-Z. Shao and J.-Q. Gao (2011). "Toxicity evaluation of biodegradable chitosan nanoparticles using a zebrafish embryo model." International journal of nanomedicine **6**: 3351.
- Huang, J., Y. Li, R. J. Wigent, W. A. Malick, H. K. Sandhu, D. Singhal and N. H. Shah (2011). "Interplay of formulation and process methodology on the extent of nifedipine molecular dispersion in polymers." International journal of pharmaceutics **420**(1): 59-67.
- Huang, J., R. J. Wigent and J. B. Schwartz (2008). "Drug-polymer interaction and its significance on the physical stability of nifedipine amorphous dispersion in microparticles of an ammonio methacrylate copolymer and ethylcellulose binary blend." Journal of pharmaceutical sciences **97**(1): 251-262.
- Huang, M., E. Khor and L.-Y. Lim (2004). "Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation." Pharmaceutical research **21**(2): 344-353.
- Huang, Y., H. Gao, M. Gou, H. Ye, Y. Liu, Y. Gao, F. Peng, Z. Qian, X. Cen and Y. Zhao (2010). "Acute toxicity and genotoxicity studies on poly (ϵ -caprolactone)-poly (ethylene glycol)-poly (ϵ -caprolactone) nanomaterials." Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis **696**(2): 101-106.
- Huffman, D. L., L. Abrami, R. Sasik, J. Corbeil, F. G. van der Goot and R. V. Aroian (2004). "Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial pore-forming toxins." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(30): 10995-11000.
- Hulme, S. E. and G. M. Whitesides (2011). "Chemistry and the worm: *Caenorhabditis elegans* as a platform for integrating chemical and biological research." Angewandte Chemie International Edition **50**(21): 4774-4807.
- Hunt, P. R. (2017). "The *C. elegans* model in toxicity testing." Journal of Applied Toxicology **37**(1): 50-59.
- Hunt, P. R., Z. Keltner, X. Gao, S. J. Oldenburg, P. Bushana, N. Olejnik and R. L. Sprando (2014). "Bioactivity of nanosilver in *Caenorhabditis elegans*: Effects of size, coat, and shape." Toxicology reports **1**: 923-944.
- Inglot, A. D. (1969). "Comparison of the antiviral activity in vitro of some non-steroidal anti-inflammatory drugs." Journal of General Virology **4**(2): 203-214.
- Investigators, R.-C. (2021). "Interleukin-6 receptor antagonists in critically ill patients with Covid-19." New England Journal of Medicine **384**(16): 1491-1502.

- Ipar, V. S., A. Dsouza and P. V. Devarajan (2019). "Enhancing Curcumin Oral Bioavailability Through Nanoformulations." Eur J Drug Metab Pharmacokinet **44**(4): 459-480.
- Ippolito, D., C. Maino, A. Pecorelli, P. Allegranza, C. Cangiotti, C. Capodaglio, I. Mariani, T. Giandola, D. Gandola and I. Bianco (2020). "Chest X-ray features of SARS-CoV-2 in the emergency department: a multicenter experience from northern Italian hospitals." Respiratory medicine **170**: 106036.
- Iranshahi, M., A. Sahebkar, S. T. Hosseini, M. Takasaki, T. Konoshima and H. Tokuda (2010). "Cancer chemopreventive activity of diversin from *Ferula diversivittata* in vitro and in vivo." Phytomedicine **17**(3-4): 269-273.
- Islam, J. M., M. F. Rahman, M. S. Rahaman and M. A. Khan "1. Development of oligo-chitosan by ionizing radiation and its application on agricultural sector."
- Jacques, M. T., J. L. Oliveira, E. V. Campos, L. F. Fraceto and D. S. Ávila (2017). "Safety assessment of nanopesticides using the roundworm *Caenorhabditis elegans*." Ecotoxicology and environmental safety **139**: 245-253.
- Jafari-Aghdam, N., K. Adibkia, S. Payab, M. Barzegar-Jalali, A. Parvizpur, G. Mohammadi and A. Sabzevari (2016). "Methylprednisolone acetate–Eudragit® RS100 electrospun: Preparation and physicochemical characterization." Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology **44**(2): 497-503.
- Jäger, C., F. Huisken, H. Mutschke, I. L. Jansa and T. Henning (2009). "Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons and carbonaceous solids in gas-phase condensation experiments." The Astrophysical Journal **696**(1): 706.
- Jäger, R., R. P. Lowery, A. V. Calvanese, J. M. Joy, M. Purpura and J. M. Wilson (2014). "Comparative absorption of curcumin formulations." Nutrition journal **13**(1): 1-8.
- Jakubczyk, K., A. Drużga, J. Katarzyna and K. Skonieczna-Żydecka (2020). "Antioxidant potential of curcumin—A meta-analysis of randomized clinical trials." Antioxidants **9**(11): 1092.
- Jang, H.-J., C. Y. Shin and K.-B. Kim (2015). "Safety evaluation of polyethylene glycol (PEG) compounds for cosmetic use." Toxicological research **31**(2): 105-136.
- Jiang, D., L. Cheng, Y. Xue, C. Chen, C. Wang, G. Yang, A. Xu, Y. Yang, Y. Gao and W. Zhang (2020). "Modulation of the lifespan of *C. elegans* by the controlled release of nitric oxide." Chemical science **11**(33): 8785-8792.
- John, M. K., H. Xie, E. C. Bell and D. Liang (2013). "Development and pharmacokinetic evaluation of a curcumin co-solvent formulation." Anticancer Research **33**(10): 4285-4291.
- Jones, G. W., M. P. Monopoli, L. Campagnolo, A. Pietroiusti, L. Tran and B. Fadeel (2020). "No small matter: a perspective on nanotechnology-enabled solutions to fight COVID-19." Nanomedicine **15**(24): 2411-2427.
- Kabbani, N. and J. L. Olds (2020). "Does COVID19 infect the brain? If so, smokers might be at a higher risk." Molecular pharmacology **97**(5): 351-353.
- Kahkhaie, K. R., A. Mirhosseini, A. Aliabadi, A. Mohammadi, M. J. Mousavi, S. M. Haftcheshmeh, T. Sathyapalan and A. Sahebkar (2019). "Curcumin: a modulator of inflammatory signaling pathways in the immune system." Inflammopharmacology **27**(5): 885-900.
- Kaletta, T. and M. O. Hengartner (2006). "Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism." Nature reviews Drug discovery **5**(5): 387-399.
- Kato, Y., T. Aizawa, H. Hoshino, K. Kawano, K. Nitta and H. Zhang (2002). "abf-1 and abf-2, ASABF-type antimicrobial peptide genes in *Caenorhabditis elegans*." Biochem J **361**(Pt 2): 221-230.
- Kelley, K. W., R.-M. Bluthé, R. Dantzer, J.-H. Zhou, W.-H. Shen, R. W. Johnson and S. R. Broussard (2003). "Cytokine-induced sickness behavior." Brain, behavior, and immunity **17**(1): 112-118.
- Kerwin, B. A. (2008). "Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: structure and degradation pathways." Journal of pharmaceutical sciences **97**(8): 2924-2935.

- Khan, F., S. Jain and S. F. Oloketuyi (2018). "Bacteria and bacterial products: Foe and friends to *Caenorhabditis elegans*." Microbiological research **215**: 102-113.
- Khan, T. A., H.-C. Mahler and R. S. Kishore (2015). "Key interactions of surfactants in therapeutic protein formulations: a review." European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics **97**: 60-67.
- Khayatan, D., S. M. Razavi, Z. N. Arab, A. H. Niknejad, K. Nouri, S. Momtaz, E. Gumpricht, T. Jamialahmadi, A. H. Abdolghaffari, G. E. Barreto and A. Sahebkar (2022). "Protective effects of curcumin against traumatic brain injury." Biomed Pharmacother **154**: 113621.
- Khurana, A. and C.-T. Ho (1988). "High performance liquid chromatographic analysis of curcuminoids and their photo-oxidative decomposition compounds in *Curcuma longa* L." Journal of liquid chromatography **11**(11): 2295-2304.
- Kim, D. H. and F. M. Ausubel (2005). "Evolutionary perspectives on innate immunity from the study of *Caenorhabditis elegans*." Current opinion in immunology **17**(1): 4-10.
- Kim, D. H., R. Feinbaum, G. Alloing, F. E. Emerson, D. A. Garsin, H. Inoue, M. Tanaka-Hino, N. Hisamoto, K. Matsumoto, M. W. Tan and F. M. Ausubel (2002). "A conserved p38 MAP kinase pathway in *Caenorhabditis elegans* innate immunity." Science **297**(5581): 623-626.
- Kim, S. W., J. I. Kwak and Y.-J. An (2013). "Multigenerational study of gold nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*: transgenerational effect of maternal exposure." Environmental science & technology **47**(10): 5393-5399.
- Knop, K., R. Hoogenboom, D. Fischer and U. S. Schubert (2010). "Poly (ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives." Angewandte chemie international edition **49**(36): 6288-6308.
- Kocaadam, B. and N. Şanlıer (2017). "Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health." Critical reviews in food science and nutrition **57**(13): 2889-2895.
- Koch, U., M. Hamacher and P. Nussbaumer (2014). "Cheminformatics at the interface of medicinal chemistry and proteomics." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics **1844**(1): 156-161.
- Kumbar, S. G., K. S. Soppimath and T. M. Aminabhavi (2003). "Synthesis and characterization of polyacrylamide-grafted chitosan hydrogel microspheres for the controlled release of indomethacin." Journal of Applied Polymer Science **87**(9): 1525-1536.
- Kunati, S. R., S. Yang, B. M. William and Y. Xu (2018). "An LC-MS/MS method for simultaneous determination of curcumin, curcumin glucuronide and curcumin sulfate in a phase II clinical trial." J Pharm Biomed Anal **156**: 189-198.
- Kunnumakkara, A. B., D. Bordoloi, G. Padmavathi, J. Monisha, N. K. Roy, S. Prasad and B. B. Aggarwal (2017). "Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases." Br J Pharmacol **174**(11): 1325-1348.
- Kurita, T. and Y. Makino (2013). "Novel curcumin oral delivery systems." Anticancer research **33**(7): 2807-2821.
- Kurz, C. L. and J. J. Ewbank (2003). "*Caenorhabditis elegans*: an emerging genetic model for the study of innate immunity." Nature Reviews Genetics **4**(5): 380-390.
- Labrousse, A., S. Chauvet, C. Couillault, C. L. Kurz and J. J. Ewbank (2000). "*Caenorhabditis elegans* is a model host for *Salmonella typhimurium*." Current biology **10**(23): 1543-1545.
- Lakshmanan, V. K., S. Jindal, G. Packirisamy, S. Ojha, S. Lian, A. Kaushik, A. Alzarooni, Y. A. F. Metwally, S. P. Thyagarajan, Y. Do Jung and S. Chouaib (2021). "Nanomedicine-based cancer immunotherapy: recent trends and future perspectives." Cancer Gene Ther **28**(9): 911-923.
- Lamprecht, A., H. R. Torres, U. Schäfer and C.-M. Lehr (2000). "Biodegradable microparticles as a two-drug controlled release formulation: a potential treatment of inflammatory bowel disease." Journal of Controlled Release **69**(3): 445-454.

- Lao, C., M. Ruffin, D. Normolle, D. Heath, S. Murray, J. Bailey, M. Boggs, J. Crowell, C. Rock and D. Brenner (2006). "BMC Complementary Altern." Med **6**: 1-4.
- Laranjeira, M. and V. T. d. Fávère (2009). "Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico." Química Nova **32**(3): 672-678.
- Lee, V. H. (2004). "Nanotechnology: challenging the limit of creativity in targeted drug delivery." Advanced Drug Delivery Reviews **11**(56): 1527-1528.
- Lemke, A., A. F. Kiderlen, B. Petri and O. Kayser (2010). "Delivery of amphotericin B nanosuspensions to the brain and determination of activity against *Balamuthia mandrillaris* amebas." Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine **6**(4): 597-603.
- Li, J., I. W. Lee, G. H. Shin, X. Chen and H. J. Park (2015). "Curcumin-Eudragit® E PO solid dispersion: a simple and potent method to solve the problems of curcumin." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **94**: 322-332.
- Li, Q., E. Dunn, E. Grandmaison and M. F. Goosen (1992). "Applications and properties of chitosan." Journal of bioactive and compatible polymers **7**(4): 370-397.
- Li, Q., X. Guan, P. Wu, X. Wang, L. Zhou, Y. Tong, R. Ren, K. S. Leung, E. H. Lau and J. Y. Wong (2020). "Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia." New England journal of medicine.
- Li, Q., J. Sun, N. Mohammadtursun, J. Wu, J. Dong and L. Li (2019). "Curcumin inhibits cigarette smoke-induced inflammation via modulating the PPAR γ -NF- κ B signaling pathway." Food Funct **10**(12): 7983-7994.
- Li, X., J. Yu, Z. Zhang, J. Ren, A. E. Peluffo, W. Zhang, Y. Zhao, J. Wu, K. Yan and D. Cohen (2021). "Network bioinformatics analysis provides insight into drug repurposing for COVID-19." Medicine in Drug Discovery **10**: 100090.
- Li, Y., W. Wang, Q. Wu, Y. Li, M. Tang, B. Ye and D. Wang (2012). "Molecular control of TiO₂-NPs toxicity formation at predicted environmental relevant concentrations by Mn-SODs proteins." PLoS One **7**(9): e44688.
- Lin, C.-T., K. Bookman, A. Sieja, K. Markley, R. L. Altman, J. Sippel, K. Perica, L. Reece, C. Davis and E. Horowitz (2020). "Clinical informatics accelerates health system adaptation to the COVID-19 pandemic: examples from Colorado." Journal of the American Medical Informatics Association **27**(12): 1955-1963.
- Lin, X., D. Bai, Z. Wei, Y. Zhang, Y. Huang, H. Deng and X. Huang (2019). "Curcumin attenuates oxidative stress in RAW264.7 cells by increasing the activity of antioxidant enzymes and activating the Nrf2-Keap1 pathway." PLoS One **14**(5): e0216711.
- Liu, M., J. Zhang, X. Zhu, W. Shan, L. Li, J. Zhong, Z. Zhang and Y. Huang (2016). "Efficient mucus permeation and tight junction opening by dissociable "mucus-inert" agent coated trimethyl chitosan nanoparticles for oral insulin delivery." Journal of controlled release **222**: 67-77.
- Liu, X., R. Zhang and G. He (2020). "Hematological findings in coronavirus disease 2019: indications of progression of disease." Annals of hematology **99**: 1421-1428.
- Loh, J. W., G. Yeoh, M. Saunders and L.-Y. Lim (2010). "Uptake and cytotoxicity of chitosan nanoparticles in human liver cells." Toxicology and applied pharmacology **249**(2): 148-157.
- Loos, W. J., S. D. Baker, J. Verweij, J. G. Boonstra and A. Sparreboom (2003). "Clinical pharmacokinetics of unbound docetaxel: role of polysorbate 80 and serum proteins." Clinical Pharmacology & Therapeutics **74**(4): 364-371.
- Lu, Y. and S. Chen (2004). "Micro and nano-fabrication of biodegradable polymers for drug delivery." Advanced drug delivery reviews **56**(11): 1621-1633.
- Luna-Herrera, J., D. E. Pérez-Martínez, V. M. Barradas-Hernández and R. Zenteno-Cuevas (2021). "Nanoparticles as drug transporters: a promising tool against tuberculosis." Revista peruana de medicina experimental y salud pública **38**(1): 143-152.
- Ma, C., H. Tan, J. Choza, Y. Wang and J. Wang (2022). "Validation and invalidation of SARS-CoV-2 main protease inhibitors using the Flip-GFP and Protease-Glo luciferase assays." Acta Pharmaceutica Sinica B **12**(4): 1636-1651.

- Ma, C. and J. Wang (2021). "Dipyridamole, chloroquine, montelukast sodium, candesartan, oxytetracycline, and atazanavir are not SARS-CoV-2 main protease inhibitors." Proceedings of the National Academy of Sciences **118**(8): e2024420118.
- Ma, J., R. Wang, H. Yan, R. Xu, A. Xu and J. Zhang (2020). "Protective Effects of Baicalin on Lipopolysaccharide-Induced Injury in *Caenorhabditis elegans*." Pharmacology **105**(1-2): 109-117.
- Ma, J., X. Xu, R. Wang, H. Yan, H. Yao, H. Zhang, S. Jiang and A. Xu (2020). "Lipopolysaccharide exposure induces oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*: protective effects of carnosine." BMC Pharmacol Toxicol **21**(1): 85.
- Ma, Z. and L.-Y. Lim (2003). "Uptake of chitosan and associated insulin in Caco-2 cell monolayers: a comparison between chitosan molecules and chitosan nanoparticles." Pharmaceutical research **20**(11): 1812-1819.
- Ma, Z., A. Shayeganpour, D. R. Brocks, A. Lavasanifar and J. Samuel (2007). "High-performance liquid chromatography analysis of curcumin in rat plasma: application to pharmacokinetics of polymeric micellar formulation of curcumin." Biomedical Chromatography **21**(5): 546-552.
- Mahase, E. (2021). "Covid-19: Pfizer's paxlovid is 89% effective in patients at risk of serious illness, company reports." Bmj **375**: n2713.
- Mahran, R. I., M. M. Hagra, D. Sun and D. E. Brenner (2017). "Bringing Curcumin to the Clinic in Cancer Prevention: a Review of Strategies to Enhance Bioavailability and Efficacy." Aaps j **19**(1): 54-81.
- Maiti, K., K. Mukherjee, A. Gantait, B. P. Saha and P. K. Mukherjee (2007). "Curcumin-phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats." Int J Pharm **330**(1-2): 155-163.
- Maiti, P. and G. L. Dunbar (2018). "Use of Curcumin, a Natural Polyphenol for Targeting Molecular Pathways in Treating Age-Related Neurodegenerative Diseases." Int J Mol Sci **19**(6).
- Mallo, G. V., C. L. Kurz, C. Couillault, N. Pujol, S. Granjeaud, Y. Kohara and J. J. Ewbank (2002). "Inducible antibacterial defense system in *C. elegans*." Current Biology **12**(14): 1209-1214.
- Marchi, J. P., L. Tedesco, A. da Cruz Melo, A. C. Frasson, V. F. França, S. W. Sato and E. C. Wietzikoski (2016). "Curcuma longa L., o açafrão da terra, e seus benefícios medicinais." Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR **20**(3).
- Marchiori, M., A. Ourique, C. d. B. Silva, R. Raffin, A. Pohlmann, S. Guterres and R. Beck (2012). "Spray-dried powders containing tretinoin-loaded engineered lipid-core nanocapsules: development and photostability study." Journal of nanoscience and nanotechnology **12**(3): 2059-2067.
- Marsh, E. K., M. C. van den Berg and R. C. May (2011). "A two-gene balance regulates *Salmonella typhimurium* tolerance in the nematode *Caenorhabditis elegans*." PLoS One **6**(3): e16839.
- Martínez-López, A. L., C. J. González-Navarro, P. Aranaz, J. L. Vizmanos and J. M. Irache (2021). "In vivo testing of mucus-permeating nanoparticles for oral insulin delivery using *Caenorhabditis elegans* as a model under hyperglycemic conditions." Acta Pharmaceutica Sinica B **11**(4): 989-1002.
- Marton, L. T., S. M. Barbalho, K. P. Sloan, L. A. Sloan, R. d. A. Goulart, A. C. Araújo and M. D. Bechara (2022). "Curcumin, autoimmune and inflammatory diseases: going beyond conventional therapy—a systematic review." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **62**(8): 2140-2157.
- Masters, P. S. (2006). "The molecular biology of coronaviruses." Advances in virus research **66**: 193-292.
- Mathur, N. K. and C. K. Narang (1990). "Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals." Journal of Chemical Education **67**(11): 938.
- Medhi, R., P. Srinoi, N. Ngo, H.-V. Tran and T. R. Lee (2020). "Nanoparticle-based strategies to combat COVID-19." ACS Applied Nano Materials **3**(9): 8557-8580.

- Medzhitov, R. (2000). "J. Janeway C., ." Advances in immunology: innate immunity, The New England Journal of Medicine **343**(5): 338-344.
- Melo, C. P. d. and M. Pimenta (2010). "Nanociências e nanotecnologia." Parcerias estratégicas **9**(18): 09-22.
- Meng, Q., A. Wang, H. Hua, Y. Jiang, Y. Wang, H. Mu, Z. Wu and K. Sun (2018). "Intranasal delivery of Huperzine A to the brain using lactoferrin-conjugated N-trimethylated chitosan surface-modified PLGA nanoparticles for treatment of Alzheimer's disease." International journal of nanomedicine **13**: 705.
- Meng, Z., C. Yan, Q. Deng, D. F. Gao and X. L. Niu (2013). "Curcumin inhibits LPS-induced inflammation in rat vascular smooth muscle cells in vitro via ROS-relative TLR4-MAPK/NF- κ B pathways." Acta Pharmacol Sin **34**(7): 901-911.
- Mishra, B., B. B. Patel and S. Tiwari (2010). "Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery." Nanomedicine: Nanotechnology, biology and medicine **6**(1): 9-24.
- Mitja, O., M. Corbacho-Monné, M. Ubals, A. Alemany, C. Suner, C. Tebe, A. Tobias, J. Peñafiel, E. Ballana and C. A. Perez (2021). "A cluster-randomized trial of hydroxychloroquine for prevention of Covid-19." New England Journal of Medicine **384**(5): 417-427.
- Miwa, A., A. Ishibe, M. Nakano, T. Yamahira, S. Itai, S. Jinno and H. Kawahara (1998). "Development of novel chitosan derivatives as micellar carriers of taxol." Pharmaceutical research **15**(12): 1844-1850.
- Mohan, N., C. S. Chen, H. H. Hsieh, Y. C. Wu and H. C. Chang (2010). "In vivo imaging and toxicity assessments of fluorescent nanodiamonds in *Caenorhabditis elegans*." Nano Lett **10**(9): 3692-3699.
- Mohanty, C., M. Das and S. K. Sahoo (2012). "Emerging role of nanocarriers to increase the solubility and bioavailability of curcumin." Expert opinion on drug delivery **9**(11): 1347-1364.
- Mohebbi, S., M. N. Nezhad, P. Zarrintaj, S. H. Jafari, S. S. Gholizadeh, M. R. Saeb and M. Mozafari (2019). "Chitosan in biomedical engineering: a critical review." Current stem cell research & therapy **14**(2): 93-116.
- Monteiro Jr, O. A. and C. Airoidi (1999). "Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system." International Journal of Biological Macromolecules **26**(2-3): 119-128.
- Morales-Zavala, F., H. Arriagada, N. Hassan, C. Velasco, A. Riveros, A. R. Álvarez, A. N. Minniti, X. Rojas-Silva, L. L. Muñoz and R. Vasquez (2017). "Peptide multifunctionalized gold nanorods decrease toxicity of β -amyloid peptide in a *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease." Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine **13**(7): 2341-2350.
- Mukherjee, A., A. K. Waters, P. Kalyan, A. S. Achrol, S. Kesari and V. M. Yenugonda (2019). "Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a next-generation drug delivery platform: state of the art, emerging technologies, and perspectives." Int J Nanomedicine **14**: 1937-1952.
- Murphy, C. T., S. A. McCarroll, C. I. Bargmann, A. Fraser, R. S. Kamath, J. Ahringer, H. Li and C. Kenyon (2003). "Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*." Nature **424**(6946): 277-283.
- Muzzarelli, R. A. and M. RAA (1973). "Natural chelating polymers. Alginic acid, chitin and chitosan."
- Naksuriya, O., S. Okonogi, R. M. Schiffelers and W. E. Hennink (2014). "Curcumin nanoformulations: a review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment." Biomaterials **35**(10): 3365-3383.
- Nelson, K. M., J. L. Dahlin, J. Bisson, J. Graham, G. F. Pauli and M. A. Walters (2017). "The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin." J Med Chem **60**(5): 1620-1637.
- Nikam, V. K., K. Kotade, V. Gaware, R. Dolas, K. Dhamak, S. Somwanshi, A. Khadse and V. Kashid (2011). "Eudragit a versatile polymer: a review." Pharmacologyonline **1**(5): 152-164.

- O'Rourke, D., D. Baban, M. Demidova, R. Mott and J. Hodgkin (2006). "Genomic clusters, putative pathogen recognition molecules, and antimicrobial genes are induced by infection of *C. elegans* with *M. nematophilum*." Genome Res **16**(8): 1005-1016.
- Organization, W. H. (2020). Modes of transmission of virus causing COVID-19: implications for IPC precaution recommendations: scientific brief, 29 March 2020, World Health Organization.
- Ourique, A. F., A. Melero, C. d. B. da Silva, U. F. Schaefer, A. R. Pohlmann, S. S. Guterres, C.-M. Lehr, K.-H. Kostka and R. C. R. Beck (2011). "Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: development of a semisolid nanomedicine." European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics **79**(1): 95-101.
- Öztürk, A. A., N. İ. Çinar and E. Yenilmez (2019). "Development of nano-sized ketoprofen lysine incorporated Eudragit® S100 nanomedicine by double emulsion solvent evaporation and in vitro characterization." J. Pharm. Pharmacogn. Res **7**(1): 47-58.
- Panahi, Y., M. S. Hosseini, N. Khalili, E. Naimi, L. E. Simental-Mendía, M. Majeed and A. Sahebkar (2016). "Effects of curcumin on serum cytokine concentrations in subjects with metabolic syndrome: A post-hoc analysis of a randomized controlled trial." Biomed Pharmacother **82**: 578-582.
- Pandey, A., A. Mittal, N. Chauhan and S. Alam (2014). "Role of surfactants as penetration enhancer in transdermal drug delivery system." J Mol Pharm Org Process Res **2**(113): 2-7.
- Paolini, G. V., R. H. Shapland, W. P. van Hoorn, J. S. Mason and A. L. Hopkins (2006). "Global mapping of pharmacological space." Nature biotechnology **24**(7): 805-815.
- Park, S. E. (2020). "Epidemiology, virology, and clinical features of severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 (SARS-CoV-2; Coronavirus Disease-19)." Clinical and experimental pediatrics **63**(4): 119.
- Parsamanesh, N., M. Moossavi, A. Bahrami, A. E. Butler and A. Sahebkar (2018). "Therapeutic potential of curcumin in diabetic complications." Pharmacol Res **136**: 181-193.
- Pasut, G. and F. M. Veronese (2012). "State of the art in PEGylation: the great versatility achieved after forty years of research." Journal of controlled release **161**(2): 461-472.
- Payab, S., N. Jafari-Aghdam, M. Barzegar-Jalali, G. Mohammadi, F. Lotfipour, T. Gholikhani and K. Adibkia (2014). "Preparation and physicochemical characterization of the azithromycin-Eudragit RS100 nanobeads and nanofibers using electrospinning method." Journal of Drug Delivery Science and Technology **24**(6): 585-590.
- Perlman, S. (2020). Another decade, another coronavirus, Mass Medical Soc. **382**: 760-762.
- Piechulek, A. and A. von Mikecz (2018). "Life span-resolved nanotoxicology enables identification of age-associated neuromuscular vulnerabilities in the nematode *Caenorhabditis elegans*." Environmental pollution **233**: 1095-1103.
- Pignatello, R., C. Bucolo and G. Puglisi (2002). "Ocular tolerability of Eudragit RS100® and RL100® nanosuspensions as carriers for ophthalmic controlled drug delivery." Journal of pharmaceutical sciences **91**(12): 2636-2641.
- Piro, R. M. (2012). "Network medicine: linking disorders." Human genetics **131**(12): 1811-1820.
- Pluskota, A., E. Horzowski, O. Bossinger and A. von Mikecz (2009). "In *Caenorhabditis elegans* nanoparticle-bio-interactions become transparent: silica-nanoparticles induce reproductive senescence." PLoS One **4**(8): e6622.
- Pohlmann, A. R., F. N. Fonseca, K. Paese, C. B. Detoni, K. Coradini, R. C. Beck and S. S. Guterres (2013). "Poly (ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery." Expert opinion on drug delivery **10**(5): 623-638.
- Poprac, P., K. Jomova, M. Simunkova, V. Kollar, C. J. Rhodes and M. Valko (2017). "Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases." Trends Pharmacol Sci **38**(7): 592-607.
- Pozzi, D., V. Colapicchioni, G. Caracciolo, S. Piovesana, A. L. Capriotti, S. Palchetti, S. De Grossi, A. Riccioli, H. Amenitsch and A. Laganà (2014). "Effect of polyethyleneglycol

- (PEG) chain length on the bio–nano-interactions between PEGylated lipid nanoparticles and biological fluids: from nanostructure to uptake in cancer cells." Nanoscale **6**(5): 2782-2792.
- Prabaharan, M. (2008). "Chitosan derivatives as promising materials for controlled drug delivery." Journal of biomaterials applications **23**(1): 5-36.
- Prabaharan, M. and J. Mano (2004). "Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems." Drug delivery **12**(1): 41-57.
- Pradel, E., Y. Zhang, N. Pujol, T. Matsuyama, C. I. Bargmann and J. J. Ewbank (2007). "Detection and avoidance of a natural product from the pathogenic bacterium *Serratia marcescens* by *Caenorhabditis elegans*." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(7): 2295-2300.
- Prasad, S., A. K. Tyagi and B. B. Aggarwal (2014). "Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice." Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association **46**(1): 2-18.
- Prashanth, K. H. and R. Tharanathan (2007). "Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview." Trends in food science & technology **18**(3): 117-131.
- Priyadarsini, K. I. (2014). "The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent." Molecules **19**(12): 20091-20112.
- Pukkila-Worley, R., F. M. Ausubel and E. Mylonakis (2011). "Candida albicans infection of *Caenorhabditis elegans* induces antifungal immune defenses." PLoS Pathog **7**(6): e1002074.
- Qi, L., Z. Xu, X. Jiang, Y. Li and M. Wang (2005). "Cytotoxic activities of chitosan nanoparticles and copper-loaded nanoparticles." Bioorganic & medicinal chemistry letters **15**(5): 1397-1399.
- Raetz, C. R. and C. Whitfield (2002). "Lipopolysaccharide endotoxins." Annual review of biochemistry **71**(1): 635-700.
- Rahimifard, M., F. Maqbool, S. Moeini-Nodeh, K. Niaz, M. Abdollahi, N. Braidy, S. M. Nabavi and S. F. Nabavi (2017). "Targeting the TLR4 signaling pathway by polyphenols: A novel therapeutic strategy for neuroinflammation." Ageing Res Rev **36**: 11-19.
- Rahmani, M., A. Golian, H. Kermanshahi and M. R. Bassami (2017). "Effects of curcumin and nanocurcumin on growth performance, blood gas indices and ascites mortalities of broiler chickens reared under normal and cold stress conditions." Italian Journal of Animal Science **16**(3): 438-446.
- Rahme, K. and N. Dagher (2019). "Chemistry routes for copolymer synthesis containing PEG for targeting, imaging, and drug delivery purposes." Pharmaceutics **11**(7): 327.
- Ramachandran, G. (2014). "Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis: a brief review." Virulence **5**(1): 213-218.
- Ramya, R., J. Venkatesan, S. K. Kim and P. Sudha (2012). "Biomedical applications of chitosan: an overview." Journal of Biomaterials and Tissue Engineering **2**(2): 100-111.
- Rana, P., A. K. Sharma, S. Jain, P. Deshmukh, S. Bhattacharya, B. Banerjee and P. K. Mediratta (2016). "Comparison of fluoxetine and 1-methyl-L-tryptophan in treatment of depression-like illness in *Bacillus Calmette-Guerin*-induced inflammatory model of depression in mice." Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology **27**(6): 569-576.
- Randolph, T. W. and L. S. Jones (2002). "Surfactant-protein interactions." Rational design of stable protein formulations: 159-175.
- Rattis, B. A. C., S. G. Ramos and M. R. N. Celes (2021). "Curcumin as a Potential Treatment for COVID-19." Front Pharmacol **12**: 675287.
- Reis, L., M. K. Oliveira, V. C. T. Rojas, T. H. Batista, E. S. Estevam, F. Vitor-Vieira, F. C. Vilela and A. Giusti-Paiva (2022). "Curcumin attenuates LPS-induced sickness behavior and fever in rats by modulating Nrf2 activity." Neuroscience Letters **781**: 136680.

- Reza, M. S., M. A. Quadir and S. S. Haider (2003). "Comparative evaluation of plastic, hydrophobic and hydrophilic polymers as matrices for controlled-release drug delivery." J Pharm Pharm Sci **6**(2): 282-291.
- Riddle, D. L., T. Blumenthal, B. J. Meyer and J. R. Priess (1997). "C. Elegans li."
- Riehm, H. and J. L. Biedler (1972). "Potentiation of drug effect by Tween 80 in Chinese hamster cells resistant to actinomycin D and daunomycin." Cancer research **32**(6): 1195-1200.
- Roberts, C. L., S. L. Rushworth, E. Richman and J. M. Rhodes (2013). "Hypothesis: Increased consumption of emulsifiers as an explanation for the rising incidence of Crohn's disease." Journal of Crohn's and Colitis **7**(4): 338-341.
- Roberts, G. A. (1992). Chitin chemistry, Macmillan International Higher Education.
- Robinson, J. (2021). "Everything you need to know about the COVID-19 therapy trials." Pharm. J.
- Rodriguez-Emmenegger, C., A. Jäger, E. Jäger, P. Stepanek, A. B. Alles, S. Guterres, A. Pohlmann and E. Brynda (2011). "Polymeric nanocapsules ultra stable in complex biological media." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **83**(2): 376-381.
- Rogers, S., K. M. Rice, N. D. Manne, T. Shokuhfar, K. He, V. Selvaraj and E. R. Blough (2015). "Cerium oxide nanoparticle aggregates affect stress response and function in *Caenorhabditis elegans*." SAGE Open Medicine **3**: 2050312115575387.
- Rolain, J.-M., P. Colson and D. Raoult (2007). "Recycling of chloroquine and its hydroxyl analogue to face bacterial, fungal and viral infections in the 21st century." International journal of antimicrobial agents **30**(4): 297-308.
- Rosadini, C. V. and J. C. Kagan (2017). "Early innate immune responses to bacterial LPS." Curr Opin Immunol **44**: 14-19.
- Rossi-Bergmann, B. (2008). "A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico." Ciência e Cultura **60**(2): 54-57.
- Rouse, J., P. Cohen, S. Trigon, M. Morange, A. Alonso-Llamazares, D. Zamanillo, T. Hunt and A. R. Nebreda (1994). "A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins." Cell **78**(6): 1027-1037.
- Rowe, R. C., P. Sheskey and M. Quinn (2009). Handbook of pharmaceutical excipients, Libros Digitales-Pharmaceutical Press.
- Sadeghi, A., A. Rostamirad, S. Seyyedebrahimi and R. Meshkani (2018). "Curcumin ameliorates palmitate-induced inflammation in skeletal muscle cells by regulating JNK/NF- κ B pathway and ROS production." Inflammopharmacology **26**(5): 1265-1272.
- Safar, R., C. Ronzani, R. Diab, J. r. m. Chevrier, D. Bensoussan, S. p. Grandemange, A. Le Faou, B. H. Rihn and O. Joubert (2015). "Human monocyte response to S-nitrosoglutathione-loaded nanoparticles: uptake, viability, and transcriptome." Molecular pharmaceutics **12**(2): 554-561.
- Saravanan, M., E. Mostafavi, S. Vincent, H. Negash, R. Andavar, V. Perumal, N. Chandra, S. Narayanasamy, K. Kalimuthu and H. Barabadi (2021). "Nanotechnology-based approaches for emerging and re-emerging viruses: special emphasis on COVID-19." Microbial pathogenesis **156**: 104908.
- Sarmiento, B. and J. das Neves (2012). Chitosan-based systems for biopharmaceuticals: delivery, targeting and polymer therapeutics, John Wiley & Sons.
- Sato, K., A. Norris, M. Sato and B. Grant (2014). C. elegans as a model for membrane traffic (April 25, 2014), WormBook, ed. The C. elegans Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.77.2.
- Saxena, S. K. (2020). Coronavirus disease 2019 (COVID-19): epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and therapeutics, Springer nature.
- Scharf, A., A. Piechulek and A. von Mikecz (2013). "Effect of nanoparticles on the biochemical and behavioral aging phenotype of the nematode *Caenorhabditis elegans*." ACS Nano **7**(12): 10695-10703.
- Schellekens, H. (2005). "Factors influencing the immunogenicity of therapeutic proteins." Nephrology Dialysis Transplantation **20**(suppl_6): vi3-vi9.

- Schulenburg, H., M. P. Hoepfner, J. Weiner, 3rd and E. Bornberg-Bauer (2008). "Specificity of the innate immune system and diversity of C-type lectin domain (CTLD) proteins in the nematode *Caenorhabditis elegans*." *Immunobiology* **213**(3-4): 237-250.
- Schulenburg, H. and S. Müller (2004). "Natural variation in the response of *Caenorhabditis elegans* towards *Bacillus thuringiensis*." *Parasitology* **128**(4): 433-443.
- Seeley, J. J. and S. Ghosh (2017). "Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS." *J Leukoc Biol* **101**(1): 107-119.
- Selselehjonban, S., A. Garjani, K. Osouli-Bostanabad, A. Tanhaei, S. Emami, K. Adibkia and M. Barzegar-Jalali (2019). "Physicochemical and pharmacological evaluation of carvedilol-eudragit® RS100 electrosprayed nanostructures." *Iranian journal of basic medical sciences* **22**(5): 547.
- Serafin, M. B. and R. Hörner (2018). "Drug repositioning, a new alternative in infectious diseases." *Brazilian Journal of Infectious Diseases* **22**: 252-256.
- Shaffer, C. (2005). "Nanomedicine transforms drug delivery." *Drug discovery today* **10**(23-24): 1581-1582.
- Shah, L. K. and M. M. Amiji (2006). "Intracellular delivery of saquinavir in biodegradable polymeric nanoparticles for HIV/AIDS." *Pharmaceutical research* **23**(11): 2638-2645.
- Shah, M. A., A. Rasul, R. Yousaf, M. Haris, H. I. Faheem, A. Hamid, H. Khan, A. H. Khan, M. Aschner and G. E. S. Batiha (2021). "Combination of natural antivirals and potent immune invigorators: A natural remedy to combat COVID-19." *Phytotherapy Research* **35**(12): 6530-6551.
- Shah, N. B., G. M. Vercellotti, J. G. White, A. Fegan, C. R. Wagner and J. C. Bischof (2012). "Blood–nanoparticle interactions and in vivo biodistribution: impact of surface PEG and ligand properties." *Molecular pharmaceutics* **9**(8): 2146-2155.
- Shapira, M., B. J. Hamlin, J. Rong, K. Chen, M. Ronen and M. W. Tan (2006). "A conserved role for a GATA transcription factor in regulating epithelial innate immune responses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(38): 14086-14091.
- Sharma, R. (1955). "G escher AJ, S toward WP. 2 005. C urcumin: the story so far." *Eur. J. Cancer* **41**: 1955-1968.
- Shaye, D. D. and I. Greenwald (2011). "OrthoList: a compendium of *C. elegans* genes with human orthologs." *PloS one* **6**(5): e20085.
- Shen, P., R. Zhang, D. J. McClements and Y. Park (2019). "Nanoemulsion-based delivery systems for testing nutraceutical efficacy using *Caenorhabditis elegans*: Demonstration of curcumin bioaccumulation and body-fat reduction." *Food Research International* **120**: 157-166.
- Shenoy, D. B. and M. M. Amiji (2005). "Poly (ethylene oxide)-modified poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer." *International journal of pharmaceutics* **293**(1-2): 261-270.
- Shi, Y., Y. Wang, C. Shao, J. Huang, J. Gan, X. Huang, E. Bucci, M. Piacentini, G. Ippolito and G. Melino (2020). COVID-19 infection: the perspectives on immune responses, Nature Publishing Group.
- Siddique, Y. H., F. Naz and S. Jyoti (2014). "Effect of curcumin on lifespan, activity pattern, oxidative stress, and apoptosis in the brains of transgenic *Drosophila* model of Parkinson's disease." *Biomed research international* **2014**.
- Silva, A. M. F. d. (2016). *Estudo do direcionamento ativo de nanossistemas lipídicos com antagonista G para células de cancro de pulmão.*
- Simmons, G., D. N. Gosalia, A. J. Rennekamp, J. D. Reeves, S. L. Diamond and P. Bates (2005). "Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**(33): 11876-11881.
- Sinha, V., K. Bansal, R. Kaushik, R. Kumria and A. Trehan (2004). "Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview." *International journal of pharmaceutics* **278**(1): 1-23.

- Sivamaruthi, B. S., M. I. Prasanth and K. Balamurugan (2015). "Alterations in *Caenorhabditis elegans* and *Cronobacter sakazakii* lipopolysaccharide during interaction." *Arch Microbiol* **197**(2): 327-337.
- Soin, A. S., K. Kumar, N. S. Choudhary, P. Sharma, Y. Mehta, S. Kataria, D. Govil, V. Deswal, D. Chaudhry and P. K. Singh (2021). "Tocilizumab plus standard care versus standard care in patients in India with moderate to severe COVID-19-associated cytokine release syndrome (COVINTOC): an open-label, multicentre, randomised, controlled, phase 3 trial." *The Lancet Respiratory Medicine* **9**(5): 511-521.
- Soleimani, V., A. Sahebkar and H. Hosseinzadeh (2018). "Turmeric (*Curcuma longa*) and its major constituent (curcumin) as nontoxic and safe substances." *Phytotherapy Research* **32**(6): 985-995.
- Song, Z., R. Feng, M. Sun, C. Guo, Y. Gao, L. Li and G. Zhai (2011). "Curcumin-loaded PLGA-PEG-PLGA triblock copolymeric micelles: Preparation, pharmacokinetics and distribution in vivo." *Journal of colloid and interface science* **354**(1): 116-123.
- Soni, V. K., A. Mehta, Y. K. Ratre, A. K. Tiwari, A. Amit, R. P. Singh, S. C. Sonkar, N. Chaturvedi, D. Shukla and N. K. Vishvakarma (2020). "Curcumin, a traditional spice component, can hold the promise against COVID-19?" *European Journal of Pharmacology* **886**: 173551.
- Sorlier, P., A. Denuzière, C. Viton and A. Domard (2001). "Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan." *Biomacromolecules* **2**(3): 765-772.
- Sparreboom, A., M. Zhao, J. R. Brahmer, J. Verweij and S. D. Baker (2002). "Determination of the docetaxel vehicle, polysorbate 80, in patient samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry." *Journal of Chromatography B* **773**(2): 183-190.
- Steele, R. H., S. Limaye, B. Cleland, J. Chow and M. G. Suranyi (2005). "Hypersensitivity reactions to the polysorbate contained in recombinant erythropoietin and darbepoietin (Case Report)." *Nephrology* **10**(3): 317-320.
- Suk, J. S., Q. Xu, N. Kim, J. Hanes and L. M. Ensign (2016). "PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery." *Advanced drug delivery reviews* **99**: 28-51.
- Sylvia, K. E. and G. E. Demas (2018). "A gut feeling: Microbiome-brain-immune interactions modulate social and affective behaviors." *Hormones and Behavior* **99**: 41-49.
- Szymusiak, M., X. Hu, P. A. Leon Plata, P. Ciupinski, Z. J. Wang and Y. Liu (2016). "Bioavailability of curcumin and curcumin glucuronide in the central nervous system of mice after oral delivery of nano-curcumin." *Int J Pharm* **511**(1): 415-423.
- Tang, C., L. Li, J. Shi, D. Wu, M. Wang, Y. Wu and X. Yuan (2020). "Curcumin in age-related diseases." *Pharmazie* **75**(11): 534-539.
- Tatsuishi, T., Y. Oyama, K. Iwase, J.-y. Yamaguchi, M. Kobayashi, Y. Nishimura, A. Kanada and S. Hirama (2005). "Polysorbate 80 increases the susceptibility to oxidative stress in rat thymocytes." *Toxicology* **207**(1): 7-14.
- Teare, J., C. Spedding, M. Whitehead, S. Greenfield, S. Challacombe and R. Thompson (1995). "Omeprazole and dry mouth." *Scandinavian journal of gastroenterology* **30**(3): 216-218.
- ten Tije, A. J., J. Verweij, W. J. Loos and A. Sparreboom (2003). "Pharmacological effects of formulation vehicles: implications for cancer chemotherapy." *Clin Pharmacokinet* **42**(7): 665-685.
- Thakral, S., N. K. Thakral and D. K. Majumdar (2013). "Eudragit®: a technology evaluation." *Expert opinion on drug delivery* **10**(1): 131-149.
- Tharayil, A., R. Rajakumari, M. Mozetic, G. Primc and S. Thomas (2021). "Contact transmission of SARS-CoV-2 on fomite surfaces: surface survival and risk reduction." *Interface Focus* **12**(1): 20210042.

- Thomas, A., S. S. Müller and H. Frey (2014). "Beyond poly (ethylene glycol): linear polyglycerol as a multifunctional polyether for biomedical and pharmaceutical applications." Biomacromolecules **15**(6): 1935-1954.
- Toden, S. and A. Goel (2017). "The holy grail of curcumin and its efficacy in various diseases: is bioavailability truly a big concern?" Journal of restorative medicine **6**(1): 27.
- Tonhi, E. and A. M. d. G. Plepis (2002). "Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana." Química Nova **25**(6A): 943-948.
- Tønnesen, H. H., J. Karlsen and G. B. van Henegouwen (1986). "Studies on curcumin and curcuminoids. VIII. Photochemical stability of curcumin." Z Lebensm Unters Forsch **183**(2): 116-122.
- Torchilin, V. and M. Papisov (1994). "Why do polyethylene glycol-coated liposomes circulate so long?: Molecular mechanism of liposome steric protection with polyethylene glycol: Role of polymer chain flexibility." Journal of liposome research **4**(1): 725-739.
- Trivedi, M. K., S. C. Mondal, M. Gangwar and S. Jana (2017). "Immunomodulatory potential of nanocurcumin-based formulation." Inflammopharmacology **25**: 609-619.
- van Tellingen, O., J. H. Beijnen, J. Verweij, E. J. Scherrenburg, W. J. Nooijen and A. Sparreboom (1999). "Rapid esterase-sensitive breakdown of polysorbate 80 and its impact on the plasma pharmacokinetics of docetaxel and metabolites in mice." Clinical Cancer Research **5**(10): 2918-2924.
- Varga, Z., A. J. Flammer, P. Steiger, M. Haberecker, R. Andermatt, A. S. Zinkernagel, M. R. Mehra, R. A. Schuepbach, F. Ruschitzka and H. Moch (2020). "Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19." The Lancet **395**(10234): 1417-1418.
- Vaz, G. R., M. C. F. Carrasco, M. M. Batista, P. A. B. Barros, M. d. C. Oliveira, A. L. Muccillo-Baisch, V. C. Yurgel, F. Buttini, F. A. A. Soares and L. M. Cordeiro (2022). "Curcumin and quercetin-loaded lipid nanocarriers: Development of omega-3 mucoadhesive nanoemulsions for intranasal administration." Nanomaterials **12**(7): 1073.
- Velasques, K., T. R. Maciel, A. H. d. C. Dal Forno, F. E. G. Teixeira, A. L. da Fonseca, F. de Pilla Varotti, A. R. Fajardo, D. S. de Ávila and S. E. Haas (2018). "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 **118**: 1-12.
- Velavan, T. P. and C. G. Meyer (2020). "The COVID-19 epidemic." Tropical medicine & international health **25**(3): 278.
- Venturini, C. G., E. Jäger, C. P. Oliveira, A. Bernardi, A. M. Battastini, S. S. Guterres and A. R. Pohlmann (2011). "Formulation of lipid core nanocapsules." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **375**(1-3): 200-208.
- Wade, A. and P. J. Weller (1994). Handbook of pharmaceutical excipients, Pharmaceutical Press.
- Wahlström, B. and G. Blennow (1978). "A study on the fate of curcumin in the rat." Acta pharmacologica et toxicologica **43**(2): 86-92.
- Wang, D., M. S. Veena, K. Stevenson, C. Tang, B. Ho, J. D. Suh, V. M. Duarte, K. F. Faull, K. Mehta, E. S. Srivatsan and M. B. Wang (2008). "Liposome-encapsulated curcumin suppresses growth of head and neck squamous cell carcinoma in vitro and in xenografts through the inhibition of nuclear factor kappaB by an AKT-independent pathway." Clin Cancer Res **14**(19): 6228-6236.
- Wang, L. and A. Audhya (2014). "In vivo imaging of C. elegans endocytosis." Methods **68**(3): 518-528.
- Wang, T., S. Walden and R. Egan (1997). "Development and validation of a general non-digestive method for the determination of palladium in bulk pharmaceutical chemicals and their synthetic intermediates by graphite furnace atomic absorption spectroscopy." Journal of pharmaceutical and biomedical analysis **15**(5): 593-599.
- Wang, Y., J. Zhou, L. Liu, C. Huang, D. Zhou and L. Fu (2016). "Characterization and toxicology evaluation of chitosan nanoparticles on the embryonic development of zebrafish, Danio rerio." Carbohydrate polymers **141**: 204-210.

- WB, B. S. W. (1988). "The nematode *Caenorhabditis elegans*." Cold Spring Harbor Laboratory **1**(988): 1091-1105.
- Weiss, S. R. and J. L. Leibowitz (2011). "Coronavirus pathogenesis." Advances in virus research **81**: 85-164.
- Weiszhar, Z., J. Czucz, C. Révész, L. Rosivall, J. Szebeni and Z. Rozsnyay (2012). "Complement activation by polyethoxylated pharmaceutical surfactants: Cremophor-EL, Tween-80 and Tween-20." European Journal of Pharmaceutical Sciences **45**(4): 492-498.
- Wen, W., C. Chen, J. Tang, C. Wang, M. Zhou, Y. Cheng, X. Zhou, Q. Wu, X. Zhang and Z. Feng (2022). "Efficacy and safety of three new oral antiviral treatment (molnupiravir, fluvoxamine and Paxlovid) for COVID-19 : a meta-analysis." Annals of medicine **54**(1): 516-523.
- Wen, W., W. Su, H. Tang, W. Le, X. Zhang, Y. Zheng, X. Liu, L. Xie, J. Li and J. Ye (2020). "Immune cell profiling of COVID-19 patients in the recovery stage by single-cell sequencing." Cell discovery **6**(1): 31.
- White, J. G., E. Southgate, J. N. Thomson and S. Brenner (1986). "The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **314**(1165): 1-340.
- Wolkow, C. A., K. D. Kimura, M.-S. Lee and G. Ruvkun (2000). "Regulation of *C. elegans* life-span by insulinlike signaling in the nervous system." Science **290**(5489): 147-150.
- Wong, D., D. Bazopoulou, N. Pujol, N. Tavernarakis and J. J. Ewbank (2007). "Genome-wide investigation reveals pathogen-specific and shared signatures in the response of *Caenorhabditis elegans* to infection." Genome Biol **8**(9): R194.
- Woodruff, M. A. and D. W. Hutmacher (2010). "The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century." Progress in polymer science **35**(10): 1217-1256.
- Wu, P.-C., Y.-B. Huang, H.-H. Lin and Y.-H. Tsai (1996). "In vitro percutaneous absorption of captopril through excised rabbit skin." International journal of pharmaceutics **143**(1): 119-123.
- XIAO, X.-F., X.-Q. JIANG and L.-J. ZHOU (2013). "Surface modification of poly ethylene glycol to resist nonspecific adsorption of proteins." Chinese Journal of Analytical Chemistry **3**(41): 445-453.
- Xiao, Y.-T., W.-H. Yan, Y. Cao, J.-K. Yan and W. Cai (2017). "P38 MAPK pharmacological inhibitor SB203580 alleviates total parenteral nutrition-induced loss of intestinal barrier function but promotes hepatocyte lipoapoptosis." Cellular Physiology and Biochemistry **41**(2): 623-634.
- Xu, J., P. Du, X. Liu, X. Xu, Y. Ge and C. Zhang (2023). "Curcumin supplementation increases longevity and antioxidant capacity in *Caenorhabditis elegans*." Frontiers in Pharmacology **14**: 1195490.
- Yallapu, M. M., M. Jaggi and S. C. Chauhan (2010). " β -Cyclodextrin-curcumin self-assembly enhances curcumin delivery in prostate cancer cells." Colloids and surfaces B: Biointerfaces **79**(1): 113-125.
- Yang, K. Y., L. C. Lin, T. Y. Tseng, S. C. Wang and T. H. Tsai (2007). "Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **853**(1-2): 183-189.
- Yavarpour-Bali, H., M. Ghasemi-Kasman and M. Pirzadeh (2019). "Curcumin-loaded nanoparticles: A novel therapeutic strategy in treatment of central nervous system disorders." International journal of nanomedicine: 4449-4460.
- Yoshioka, H., K.-i. Nonaka, K. Fukuda and S. Kazama (1995). "Chitosan-derived polymer-surfactants and their micellar properties." Bioscience, biotechnology, and biochemistry **59**(10): 1901-1904.
- Younes, N., G. Pintus, M. Al-Asmakh, K. Rasool, S. Younes, S. Calzolari, K. A. Mahmoud and G. K. Nasrallah (2019). "'Safe' chitosan/zinc oxide nanocomposite has minimal organ-specific toxicity in early stages of zebrafish development." ACS Biomaterials Science & Engineering **6**(1): 38-47.

- Yousefian, M., N. Shakour, H. Hosseinzadeh, A. W. Hayes, F. Hadizadeh and G. Karimi (2019). "The natural phenolic compounds as modulators of NADPH oxidases in hypertension." Phytomedicine **55**: 200-213.
- Yuan, Z., Y. Li, Y. Hu, J. You, K. Higashisaka, K. Nagano, Y. Tsutsumi and J. Gao (2016). "Chitosan nanoparticles and their Tween 80 modified counterparts disrupt the developmental profile of zebrafish embryos." International journal of pharmaceutics **515**(1-2): 644-656.
- Zeng, Z., L. Zhan, H. Liao, L. Chen and X. Lv (2013). "Curcumin improves TNBS-induced colitis in rats by inhibiting IL-27 expression via the TLR4/NF- κ B signaling pathway." Planta Med **79**(2): 102-109.
- Zhang, C., Z. Wu, J.-W. Li, H. Zhao and G.-Q. Wang (2020). "Cytokine release syndrome in severe COVID-19: interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab may be the key to reduce mortality." International journal of antimicrobial agents **55**(5): 105954.
- Zhang, J., Y. Zheng, Y. Luo, Y. Du, X. Zhang and J. Fu (2019). "Curcumin inhibits LPS-induced neuroinflammation by promoting microglial M2 polarization via TREM2/ TLR4/ NF- κ B pathways in BV2 cells." Mol Immunol **116**: 29-37.
- Zhang, S., L. Li, A. Shen, Y. Chen and Z. Qi (2020). "Rational use of tocilizumab in the treatment of novel coronavirus pneumonia." Clinical drug investigation **40**: 511-518.
- Zhang, W., X. Liu, Y. Zhu, X. Liu, Y. Gu, X. Dai and B. Li (2021). "Transcriptional and posttranslational regulation of Th17/Treg balance in health and disease." Eur J Immunol **51**(9): 2137-2150.
- Zhang, W., Y. Zhao, F. Zhang, Q. Wang, T. Li, Z. Liu, J. Wang, Y. Qin, X. Zhang and X. Yan (2020). "The use of anti-inflammatory drugs in the treatment of people with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): The Perspectives of clinical immunologists from China." Clinical immunology **214**: 108393.
- Zheng, W., W. Sun and A. Simeonov (2018). "Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases." British journal of pharmacology **175**(2): 181-191.
- Zhou, F., T. Yu, R. Du, G. Fan, Y. Liu, Z. Liu, J. Xiang, Y. Wang, B. Song and X. Gu (2020). "Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study." The lancet **395**(10229): 1054-1062.
- Zhou, Y., Y. Hou, J. Shen, Y. Huang, W. Martin and F. Cheng (2020). "Network-based drug repurposing for novel coronavirus 2019-nCoV/SARS-CoV-2." Cell discovery **6**(1): 1-18.
- Zhou, Y., F. Wang, J. Tang, R. Nussinov and F. Cheng (2020). "Artificial intelligence in COVID-19 drug repurposing." The Lancet Digital Health.
- Zhu, H., X. Wang, X. Wang, B. Liu, Y. Yuan and X. Zuo (2020). "Curcumin attenuates inflammation and cell apoptosis through regulating NF- κ B and JAK2/STAT3 signaling pathway against acute kidney injury." Cell Cycle **19**(15): 1941-1951.
- Zhu, T., Z. Chen, G. Chen, D. Wang, S. Tang, H. Deng, J. Wang, S. Li, J. Lan, J. Tong, H. Li, X. Deng, W. Zhang, J. Sun, Y. Tu, W. Luo and C. Li (2019). "Curcumin Attenuates Asthmatic Airway Inflammation and Mucus Hypersecretion Involving a PPAR γ -Dependent NF- κ B Signaling Pathway In Vivo and In Vitro." Mediators Inflamm **2019**: 4927430.