

Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan
Programa de Pós-graduação *Lato Sensu*
Biotecnologia para a saúde - Vacinas e Biofármacos

Veronica Oliveira Iglesias

Padronização de testes com compostos naturais utilizando *Caenorhabditis elegans* como modelo

São Paulo
2023

Veronica Oliveira Iglesias

Padronização de testes com compostos naturais utilizando *Caenorhabditis elegans* como modelo

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Biotecnologia para a saúde - Vacinas e Biofármacos do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Fernando Luiz Kamitani

São Paulo

2023

**Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Iglesias, Veronica Oliveira

Padronização de testes com compostos naturais utilizando *Caenorhabditis elegans* como modelo / Veronica Oliveira Iglesias ; orientador(a) Fernando Luiz Kamitani - São Paulo, 2023.

41 p. : il.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos.

1. *Caenorhabditis elegans* 2. Nematoda. 3. *Ilex paraguariensis*. 4. Compostos bioativos I. Kamitani, Fernando Luiz. II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos. IV. Título.

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Veronica Oliveira Iglesias, aluno (a) do Curso de Especialização em Biotecnologia para a saúde vacinas e biofármacos, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada à fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
 06 meses
 12 meses
 Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 11 de Janeiro de 2023

Veronica Oliveira Iglesias
aluno(a): Veronica Oliveira Iglesias

De acordo: 
Orientador(a): Dr. Fernando Luiz Kamitani

Dedico este trabalho a Deus por me guiar;

Aos meus pais - Ana Lúcia e Gilvan por me apoiar;

Aos meus irmãos - Davi, Ana Paula e Daniel por me alegrar.

AGRADECIMENTOS

Sou imensamente grata a Deus por sua infinita bondade e misericórdia em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais Ana Lúcia e Gilvan, por todo zelo e dedicação, por sempre acreditar no meu potencial, aos meus irmãos por todo apoio e compreensão, agradeço de coração por todo amor e carinho.

Ao meu orientador Dr. Fernando Luiz Kamitani, pela atenção, paciência e dedicação, por todo o conhecimento que me foi transmitido e por todas as conversas.

À Karina Villar, que estendeu a mão para me ajudar;

À Dr. Lenita de Freitas Tallarico que cedeu os extratos, assim sendo possível a realização deste trabalho.

À Dr. Maria da Graça Salomão por todo auxílio.

Ao Instituto Butantan pela oportunidade de realizar o meu trabalho

As amigadas que realizei durante a especialização, obrigada por tudo.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

A gratidão, todavia, é mais que um exercício mental, mais que uma formulação de palavras (...). Ser grato é reconhecer o amor de Deus em tudo que Ele nos deu — e Ele nos deu tudo!

Thomas Merton

Resumo

IGLESIAS, VERONICA. **Padronização de testes com compostos naturais utilizando *Caenorhabditis elegans* como modelo.** 2023. 41 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotecnologia) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Nematoides parasitas chegam a causar prejuízos de 35 bilhões ao ano à agropecuária, estima a Sociedade Brasileira de Nematologia (SBN), sendo utilizado para o seu controle na agricultura os métodos de rotação e remoção de culturas, além do uso de nematicidas para humanos e animais. *Caenorhabditis elegans* é um nematoide de vida livre, encontrado no solo e em matéria orgânica, possuindo 40% dos genes com ortólogos em doenças humanas e similaridade com nematoides parasitas. Devido às suas características vem sendo usado como modelo biológico em pesquisas de biologia molecular, neurociência e toxicologia. A fim de padronizar testes com o modelo biológico *C. elegans* foram utilizados extratos da erva mate *Ilex paraguariensis*, sendo avaliada a motilidade dos vermes de todos os estádios entre 1h, 2h, 4h, 6h e 24h, sendo observada a sobrevivência dos vermes após adição dos extratos. Novos compostos bioativos podem ser desenvolvidos a partir da extração de produtos secundários de plantas e outros organismos, auxiliando no desenvolvimento de nematicidas, podendo ser utilizado o nematoide *C. elegans* como biomonitor do solo e de meios aquáticos.

Palavras-chave: Nematoide. *Caenorhabditis elegans*. *Ilex paraguariensis*. Nematicida. Biomonitor.

ABSTRACT

IGLESIAS, VERONICA. **Standardization of tests with natural compounds using *Caenorhabditis elegans* as a model.** 2023. 41 p. Monograph (Specialist in biotechnology) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Parasitic nematodes can cause damages worth 35 billion a year to agriculture, as the Brazilian Society of Nematology (SBN) estimates. Nematode control in agriculture is made by employing methods of crop rotation and destruction of infested plants. Nematicides are used to control nematodes in humans and animals. *Caenorhabditis elegans* is a free-living nematode, found in organic matter present in the soil. It has 40% of the genes with orthologs for human diseases and similarity with parasitic nematodes. Due to its characteristics it has been used as a biological model in research in molecular biology, neuroscience and toxicology. In order to standardize tests with the biological model *C. elegans*, extracts of yerba mate *Ilex paraguariensis* were used. Worm motility in all life stages was evaluated in defined time periods: 1h, 2h, 4h, 6h and 24h. Individual survival of the worms after adding the extracts. New bioactive compounds can be developed from the extraction of secondary products from plants and other organisms, aiding in the development of nematicides, and *C. elegans* can be used as a biomonitor in soil and aquatic environments.

Keywords: Nematode. *Caenorhabditis elegans*. *Ilex paraguariensis*. Nematicide. Biomonitor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Filogenia do filo nematoda	14
Figura 2- Raízes de tomateiro infectado com nematoide das galhas.....	15
Gráfico 1: Controle de doenças e/ou parasitas	15
Figura 3- Estrutura dos medicamentos	16
Figura 4: Fases de desenvolvimento de <i>Caenorhabditis elegans</i>	17
Figura 5: Estrutura molecular de compostos bioativos.....	19
Figura 6: Definição região supercritica	24
Gráfico 2: Avaliação da motilidade dos vermes entre 1,2,4,6 e 24h (eixo x), sendo considerados mortos os vermes que não apresentaram motilidade (eixo y)	25
Gráfico 3: Avaliação da motilidade dos vermes entre 1,2, 4,6 e 24h (eixo x), sendo considerados mortos os vermes que não apresentaram motilidade (eixo y).....	26
Gráfico 4: Avaliação da motilidade dos vermes entre 1,2, 4,6 e 24h (eixo x), sendo considerados mortos os vermes que não apresentaram motilidade (eixo y).....	26
Gráfico 5:Avaliação da motilidade dos vermes entre 1,2, 4,6 e 24h (eixo x), sendo considerados mortos os vermes que não apresentaram motilidade (eixo y).....	27
Gráfico 6: Avaliação da motilidade dos vermes entre 1,2, 4,6 e 24h (eixo x), sendo considerados mortos os vermes que não apresentaram motilidade (eixo y).....	27
Gráfico 7: Avaliação da motilidade dos vermes entre 1,2, 4,6 e 24h (eixo x), sendo considerados mortos os vermes que não apresentaram motilidade (eixo y).....	28
Gráfico 8: Avaliação da motilidade dos vermes entre 1,2, 4,6 e 24h (eixo x), sendo considerados mortos os vermes que não apresentaram motilidade (eixo y).....	28
Gráfico 9: Avaliação da motilidade dos vermes entre 1,2, 4,6 e 24h (eixo x), sendo considerados mortos os vermes que não apresentaram motilidade (eixo y).....	29
Gráfico 10: Avaliação da motilidade dos vermes entre 1,2, 4,6 e 24h (eixo x), sendo considerados mortos os vermes que não apresentaram motilidade (eixo y).....	29
Gráfico 11:Avaliação da motilidade dos vermes entre 1,2, 4,6 e 24h (eixo x), sendo considerados mortos os vermes que não apresentaram motilidade (eixo y).....	30

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: O teste foi realizado com 100 vermes (Valor bruto) e 100 µL dos extratos 0 e 1 de *Ilex paraguariensis*, sendo o controle e os extratos adicionados a 7 poços e entre 1h, 2h, 4, 6h e 24h foi avaliada a motilidade, sendo considerados mortos os vermes sem movimentação. Ao final foi realizado a média da mortalidade.....31
- Tabela 2: O teste foi realizado com 445 vermes (Valor bruto) e 100 µL dos extratos 0 e 1 de *Ilex paraguariensis*, sendo o controle e os extratos adicionados a 7 poços e entre 1h, 2h, 4, 6h e 24h foi avaliada a motilidade, sendo considerados mortos os vermes sem movimentação. Ao final foi realizado a média da mortalidade.....32
- Tabela 3: O teste foi realizado com 313 vermes (Valor bruto) e 50 µL dos extratos 0 e 1 de *Ilex paraguariensis*, sendo o controle e os extratos adicionados a 7 poços e entre 1h, 2h, 4, 6h e 24h foi avaliada a motilidade, sendo considerados mortos os vermes sem movimentação. Ao final foi realizado a média da mortalidade.....32
- Tabela 4: O teste foi realizado com 200 vermes (Valor bruto) e 100 µL dos extratos 2 e 7 de *Ilex paraguariensis*, sendo o controle e os extratos adicionados a 7 poços e entre 1h, 2h, 4, 6h e 24h foi avaliada a motilidade, sendo considerados mortos os vermes sem movimentação. Ao final foi realizado a média da mortalidade.....33
- Tabela 5: O teste foi realizado com 313 vermes (Valor bruto) e 50 µL dos extratos 2 e 7 de *Ilex paraguariensis*, sendo o controle e os extratos adicionados a 7 poços e entre 1h, 2h, 4, 6h e 24h foi avaliada a motilidade, sendo considerados mortos os vermes sem movimentação. Ao final foi realizado a média da mortalidade.....33

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	13
1.2 <i>Nematoides</i>	14
1.3 <i>Tratamento das parasitoses</i>	16
1.4 <i>Caenorhabditis elegans</i>	16
1.5 <i>C. elegans como modelo para pesquisa em toxicologia</i>	18
2. OBJETIVOS	21
2.1 <i>Geral</i>	21
2.2 <i>Específicos</i>	21
3. METODOLOGIA	22
3.1 - <i>Cultivo bacteriano</i>	22
3.2- <i>Cultivo e Manutenção C. Elegans</i>	22
3.3 - <i>Avaliação da motilidade em C. Elegans</i>	23
3.4 - <i>Extratos de Erva mate Ilex paraguariensis</i>	24
4. RESULTADOS	25
5. CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37

1. INTRODUÇÃO

Os helmintos são popularmente conhecidos como vermes, sendo um grupo de espécies com variados hábitos alimentares. Dentre eles há parasitas de animais e plantas, além de animais de vida livre. Pertencem a três filos (Nematoda, Platyhelminthes e Acantocephala) que possuem a capacidade de infectar animais (vertebrados e invertebrados) e plantas; compõem um agrupamento taxonômico heterogêneo e artificial baseado em critérios tradicionais e médicos, que não compartilham um ancestral em comum (MCVEIGH, 2020, SCHOLTE et al., 2018).

Há espécies que não possuem sistema digestivo, e se alimentam através da absorção dos nutrientes pelo tegumento, como por exemplo os parasitas (PINHEIRO, 2022; NCBI:txid 6157; NCBI:txid6231, NEVES et al., 2022).

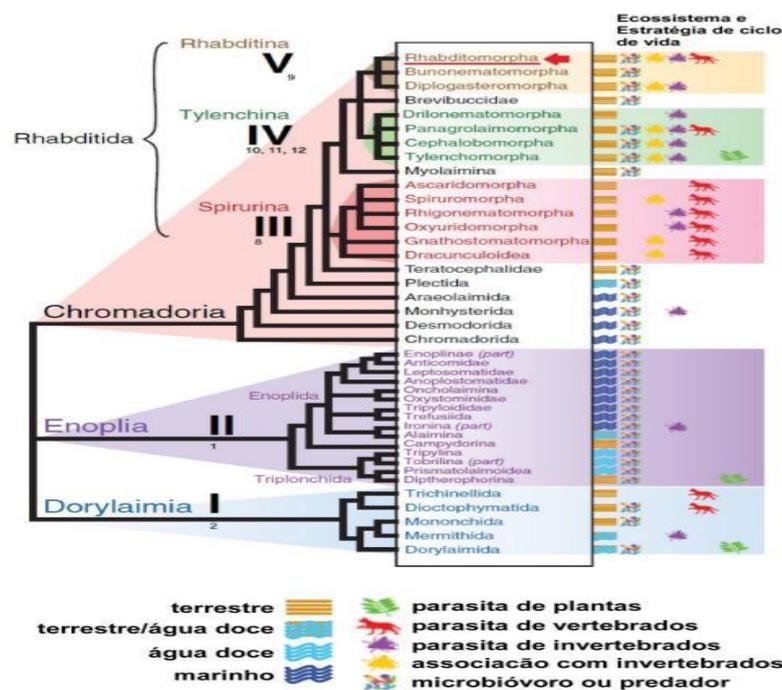
As espécies parasitas em contato com o hospedeiro definitivo podem se desenvolver a partir de ovos (forma resistente) para larvas (multiplicação), sua classificação varia conforme o órgão que parasitam, sendo intestinais, extra-intestinais e sanguíneos. A Organização Mundial de Saúde em 2018 estimava 820 milhões de pessoas infectadas por *Ascaris lumbricoides*, 460 milhões por *Trichuris trichiura* e 440 milhões por ancilostomídeos. A contaminação ocorre pelo contato com solo contaminado, ingestão de ovos ou penetração ativa da larva. No organismo do hospedeiro os vermes ingerem ou absorvem os nutrientes levando ao desequilíbrio homeostático (GOV.BR, 2022; OPAS, 2018; GAZZINELLI-GUIMARAES, 2018).

Essas doenças ocorrem onde há ausência de saneamento básico e água tratada, sendo um problema de saúde pública. A depender da parasitose, a pessoa infectada apresenta quadros específicos de desnutrição, obstrução intestinal, anemia ferropriva e hemorragias. Jovens e crianças em idade escolar são os mais acometidos por parasitoses, segundo a diretriz da Organização Pan - Americana de Saúde, em torno de 270 milhões de crianças em idade pré-escolar e outras 550 milhões em idade escolar vivem em áreas onde há alta incidência de transmissão (BVSMS, 2018; FAGUNDES, 2019; PAHO, 2022).

1.2 Nematoides

Os nematoides são compostos por vermes cilíndricos, sendo classificados como de vida livre e parasitas. Segundo análise realizada em 1998 por Blaxter e colaboradores, usando a sequência de RNA (SSU rRNA) da subunidade menor do ribossomo de 53 espécies, o filo é dividido entre as classes: Chromadorea, Enoplea e Dorylaimida (FIGURA 1), sendo composto por espécies marinhas de água doce e terrestre. A análise realizada não é aceita por toda classe de pesquisadores, por não ser equivalente em pontos filogenéticos e cronológicos (NEVES et al, 2022; ALMENARA, 2009; ROSSI, 2014 ; AHMED, 2021).

Figura 1- Filogenia do filo nematoda



Fonte: Rossi, 2014. Acesso em: 08 de Junho de 2022

Nematoides possuem a capacidade de parasitar plantas, sendo capaz de reciclar nutrientes ou impossibilitar a sua absorção, são classificados como endoparasitas e ectoparasitas e se alimentam interna ou externamente da raiz de plantas, deixando as mesmas murchas e amareladas (FIGURA 2), para realizar o plantio o solo deve ser analisado pré e posteriormente, devendo ser realizados métodos de rotação e remoção de culturas e utilização de plantas antagonistas (ÁVILA et al. 2022; PINHEIRO, 2022).

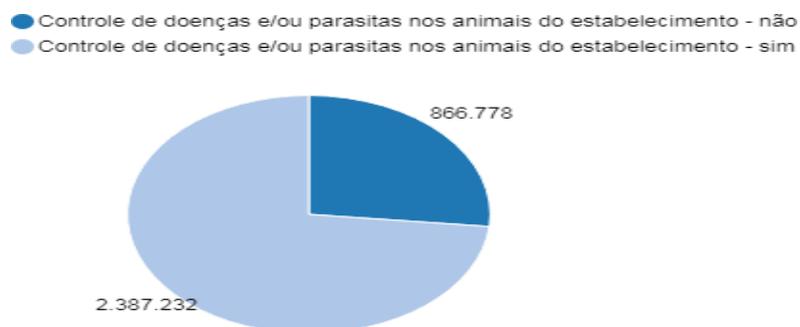
Figura 2- Raízes de tomateiro infectado com nematoide das galhas



Fonte: Sociedade Brasileira de Nematologia - Acesso em: 09 de Novembro de 2022

Além disso, nematoides são responsáveis por causar importantes infecções em animais, levando ao baixo crescimento e desenvolvimento reprodutivo do rebanho, pesquisa realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), demonstrou que a maior parte dos estabelecimentos de pecuária realiza o controle de doenças e/ou parasitas (Gráfico 1), mundialmente são administrados anti-helmínticos para tratamento do rebanho (CHARLIER *et al.*, 2020; IBGE, 2017).

Gráfico 1- Controle de doenças e/ou parasitas



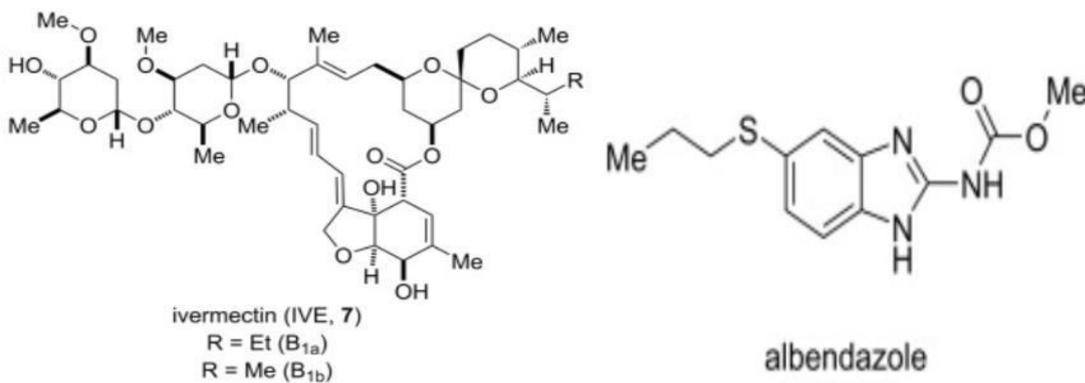
Fonte: IBGE - Censo Agropecuário

Fonte: IBGE Censo Agropecuário. Acesso em 13 de setembro de 2022.

1.3 Tratamento das parasitoses

Para o tratamento das parasitoses o SUS disponibiliza lactonas macrocíclicas que agem potencializando a ação do GABA e causando o aumento da permeabilidade da membrana do neurônio ao cloro, interferindo nas sinapses. Os benzimidazóis atuam na inibição da polimerização dos microtúbulos causando alteração da estrutura e perda da função celular do parasita (FIGURA 3) (RANG & DALE, 2016; CHAI, 2021, PAHO, 2022).

Figura 3- Estrutura dos medicamentos



Fonte: Adaptado de Partridge - Acesso em 09 de Novembro de 2022

A população afetada por essas parasitoses são tratadas através de quimioterapia preventiva, onde é avaliada a necessidade de administração em massa (MDA), ou apenas a uma parcela da população, sendo estabelecido pela faixa etária, sexo e área de maior endemia, esses medicamentos são disponibilizados em dose anual ou bianual. A quimioterapia preventiva não evita o ciclo de infecção e reinfecção, sendo necessária a administração frequente desses medicamentos (PAHO, 2022).

1.4 *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) é um nematoide de vida livre da classe Chromadorea, que pertence à família Rhabditidae, descrita por Maupas em 1900,

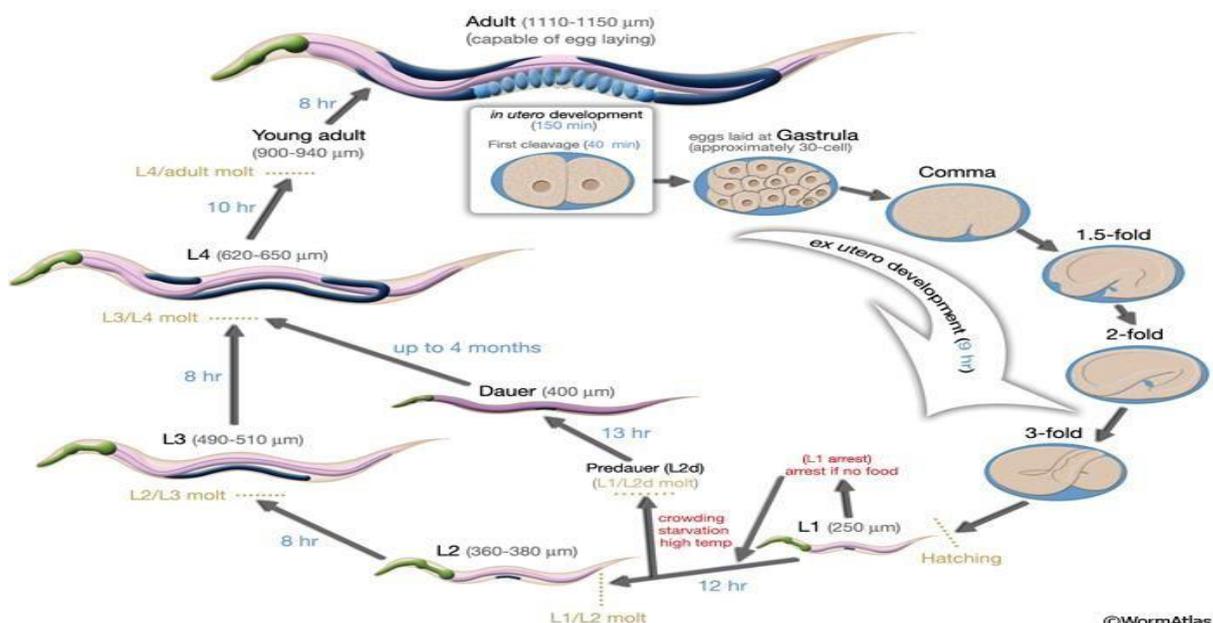
sendo inicialmente denominada *Rhabditis elegans* (NCBI: txid:6239; NIGON *et al*, 2018).

C. elegans são hermafroditas auto fecundantes, sendo machos apenas <0,2% da prole, quando atingem a fase adulta realizam a oviposição de até 300 ovos, podendo gerar nova prole através do acasalamento (CORSI *et al.*, 2015 ; HUNT, 2017).

Os vermes se desenvolvem entre a fase embrionária e quatro estágio larval (L1 - L4) (FIGURA 4), após a autofecundação é formada uma “casca de ovo” impermeável composta de quitina, onde os embriões são retidos no hermafrodita até a oviposição, os ovos passam pelas fases de proliferação, gastrulação, morfogênese, alongamento e incubação, posteriormente se desenvolvendo em larva L1, este estágio possui duração de 16 horas. Os seguintes, de aproximadamente 12 horas, anatomicamente são compostos por cutícula, hipoderme, tecido muscular, intestino, gônadas (verme adulto) e faringe (WORMATLAS, 2022; EWALD; LI, 2012).

Sua alimentação ocorre através da ingestão de fungos e bactérias encontradas no solo e em matéria orgânica. Após a ingestão o alimento passa pela faringe que filtra, concentra e tritura o alimento, transportando-o para o lúmen intestinal onde ocorre a absorção dos nutrientes (SILVA, 2020).

Figura 4: Fases de desenvolvimento de *Caenorhabditis elegans*



Fonte: Wormatlas. Acesso em: 08 de Junho de 2022

Quando não são encontradas condições favoráveis para o desenvolvimento, a larva entra em estágio de latência, possuindo dois mecanismos para posterior transformação em dauer, quando há alta densidade populacional e pouca alimentação o verme L1 se transforma em L2d ou quando a larva não encontra alimentação entra em diapausa (dauer). A larva dauer é constituída por uma cutícula espessa que fecha a cavidade bucal e cessa o bombeamento faríngeo, sendo utilizadas como fonte de energia as reservas lipídicas e hipodérmicas (WORMATLAS, 2022).

São resistentes a altas temperaturas, estresse oxidativo e anoxia, ficam imóveis por longos períodos e respondem rapidamente a estímulos (WORMATLAS, 2022).

Caenorhabditis elegans vêm sendo utilizado como modelo de pesquisa em biologia molecular, neurociência e genética molecular (PARK, 2017), possui 40% dos genes com ortólogos em doenças humanas (SILVA, 2020) e similaridade com nematoides parasitas (VINEY, 2017), este nematoide é um bom modelo por ser facilmente cultivado em condições laboratoriais e pela sua alta capacidade de reprodução (HUNT, 2017).

1.5 C. elegans como modelo para pesquisa em toxicologia

Parasitas são um grande problema para a agropecuária e a saúde pública, possuindo limitações para o tratamento, como o uso frequente de benzimidazóis e grandes perdas econômicas na agropecuária, respectivamente caracterizados por cepas resistentes e infestação de gado e plantações (Holden-Dye., Walker, 2022; PINHEIRO, 2022; BATISTA, 2016)

Novos métodos vêm sendo estudados para o tratamento das parasitoses, como produção de vacinas e uso de compostos naturais, sendo um grande desafio, devido à dificuldade de obter altas cargas parasitárias e manter o ciclo fora do hospedeiro (CLAEREBOUT, 2020). LIMA (2013), relata que “tem havido grande interesse em estudar compostos naturais que auxiliam na prevenção e/ou tratamento de uma vida saudável (“healthspan”)”.

A busca de produtos naturais para controle de organismos prejudiciais à cultura agrícola ou pecuária é importante, pois reduz o emprego de químicos perigosos e

com efeitos desconhecidos, uma vez liberados no meio ambiente (Holden-Dye., Walker, 2022).

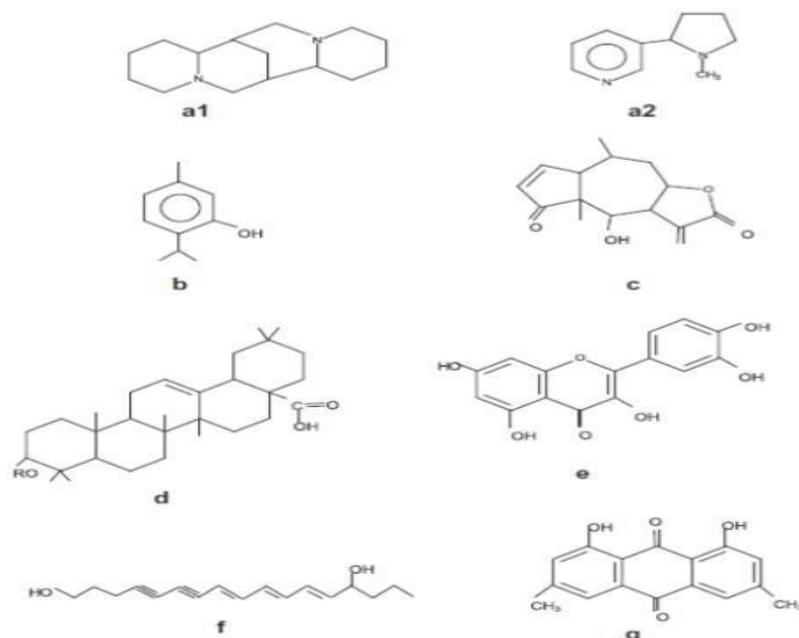
O uso do modelo biológico *C. elegans*, é importante para representar a nematofauna do solo, especialmente os animais bacterívoros e consumidores de matéria orgânica em decomposição (BOYD, WILLIAMS, 2003).

C. elegans pode ser adicionado ao solo para avaliação da toxicidade de nematicidas empregados na agricultura, além de auxiliar no desenvolvimento de novos nematicidas baseados na utilização de compostos bioativos, sendo utilizados como fontes terapêuticas alternativas. (GRAVES *et al.*, 2005, FUMAGALI *et al.*, 2008).

As plantas do gênero *Ilex* são conhecidas por sua ampla variedade de compostos bioativos, que desempenham papel essencial em seus benefícios à saúde (GAN, 2018). Nos frutos da espécie *Ilex paraguariensis*, são constatados compostos fenólicos, metilxantinas e saponinas (GAMBERRO., RIBEIRO; 2015; BRACESCO *et al.*, 2011).

Os compostos bioativos (FIGURA 5) em sua grande maioria são metabólitos secundários e possuem proteção e resistência a fatores bióticos e abióticos, sendo divididos em três categorias: terpenos, alcalóides e compostos fenólicos.

Figura 5: Estrutura molecular de compostos bioativos



Fonte: Favareto, 2016. Acesso em: 29 de Novembro.

A indústria farmacêutica vem investigando metabólitos secundários de plantas, para a produção de novos fármacos e medicamentos, sendo promissores os compostos bioativos como fonte terapêutica alternativa (SILVA *et al*, 2020; ROCHA, 2013).

Dessa forma, este trabalho tem por finalidade a padronização de testes com *Caenorhabditis elegans* com a utilização de extratos provenientes de erva mate *Ilex paraguariensis*.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Este trabalho tem como objetivo a padronização de testes com compostos naturais, adquiridos de frutos da erva mate *Ilex paraguariensis*, utilizando *Caenorhabditis elegans* como modelo.

2.2 Específicos

- a) Cultivo e manutenção dos vermes;
- b) Analisar a atividade de *Ilex paraguariensis* sobre vermes *C. elegans*.

3. METODOLOGIA

3.1 - Cultivo bacteriano

Uma colônia isolada da bactéria *Escherichia coli* linhagem NA22, foi inoculada em 3 ml do meio Luria Bertani (LB) (10 g Bacto-triptona, 5 g Bacto yeast, 5g NaCL, 15 g ágar base, 1l água destilada (tipo 3)), sendo o tubo acondicionado em incubadora agitadora com agitação vigorosa em 37°C overnight, para alimentação dos vermes as placas de Nematode Growth Medium (NGM) (3 g NaCL, 17 g ágar base, 2,5 peptona, 975 mL de água destilada) foram inoculadas com *E. coli* sendo novamente levadas à estufa para crescimento por 12h em 37° C overnight.

Imagem 1 e 2: Cultivo *E.coli*



Fonte: Próprio Autor, 2022.

3.2- Cultivo e Manutenção *C. Elegans*

Os vermes foram armazenados em estufa Demanda Bioquímica de Oxigênio (D.B.O), entre às temperaturas de 15°C (desenvolvimento retardado) e 22°C (desenvolvimento natural), a manutenção foi realizada considerando a fonte de alimentação e a densidade populacional, quando esgotadas foi feita a transferência dos vermes com a alça bacteriológica de 1 µL ou 10 µL para placas NGM de 3,6 ou 9 cm de diâmetro, com o objetivo de manter o crescimento populacional sem o desenvolvimento de dauer.

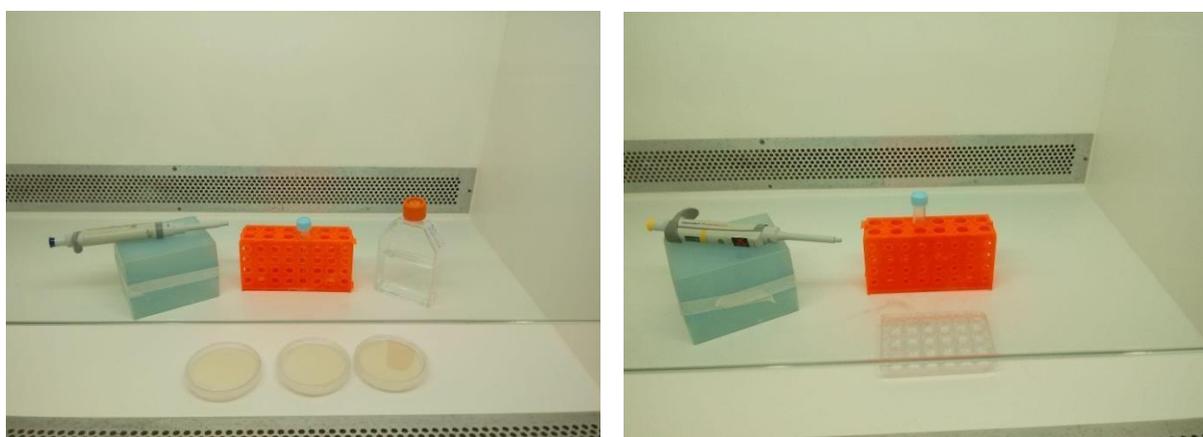
3.3 - Avaliação da motilidade em *C. Elegans*

Para a realização dos testes foi feita a transferência dos vermes com alça bacteriológica de 10 μL para três placas de NGM com 9 cm de diâmetro, anteriormente semeadas e crescidas com as bactérias *E.coli* linhagem NA22. As placas foram acondicionadas em estufa D.B.O com temperatura ajustada para 22°C e mantidas nesta temperatura por 72h, para permitir o desenvolvimento dos vermes. Posteriormente as três placas passaram por lavagem (IMAGEM 3) com 3 ml de tampão M9 (3g KH_2PO_4 , 6g Na_2HPO_4 , 5g NaCL, 1 ml de solução MgSO_4 a 1M, 1Lágua destilada), realizada até que a solução se apresentasse cristalina.

A solução de tampão M9 contendo os vermes retirados das placas foi acondicionada em tubos do tipo falcon de 15 ml e então foi permitido que os vermes em solução decantassem e se depositassem no fundo do tubo. Foi então feita uma contagem dos vermes em um volume definido, que permitiu estimar a quantidade de animais por volume dessa solução de vermes.

Alíquotas iguais desse sedimento composto por vermes, com quantidades estimadas também iguais de vermes, foram aplicadas nos poços de placas de cultura de tecido com 24 escavações (IMAGEM 4); e posteriormente a adição dos extratos da erva mate *Ilex paraguariensis*

Imagem 3 e 4: Teste de toxicidade *Ilex paraguariensis*



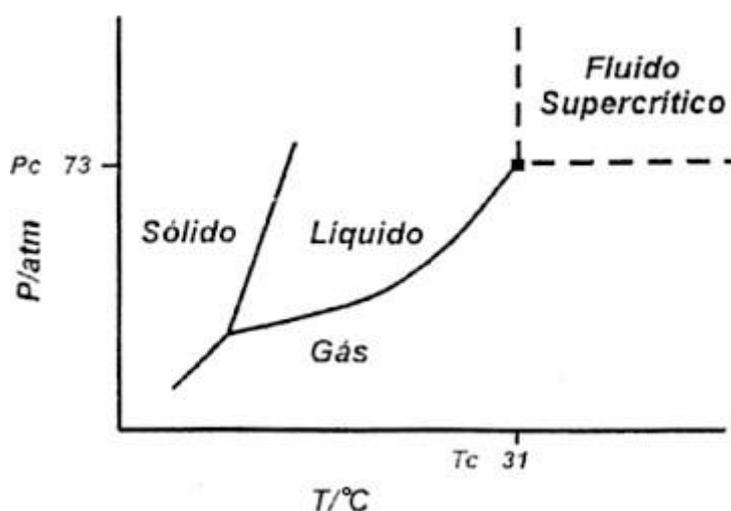
Fonte: Próprio autor, 2022.

3.4 - Extratos de Erva mate *Ilex paraguariensis*

O extrato foi cedido pelo Laboratório de Parasitologia (Malacologia), os frutos de erva mate *Ilex paraguariensis* foram extraídos através da técnica de fluido supercrítico.

O fluido supercrítico é considerado quando gás e líquido estão em equilíbrio entre si, sendo atingido o ponto supercrítico quando pressão e temperatura estão acima dos parâmetros críticos (RAD, 2020; CARRILHO, 2001).

Figura 6: Definição região supercritica



Fonte: Carrilho - Acesso em 03 de Novembro de 2022

3.5 - Análises dos resultados

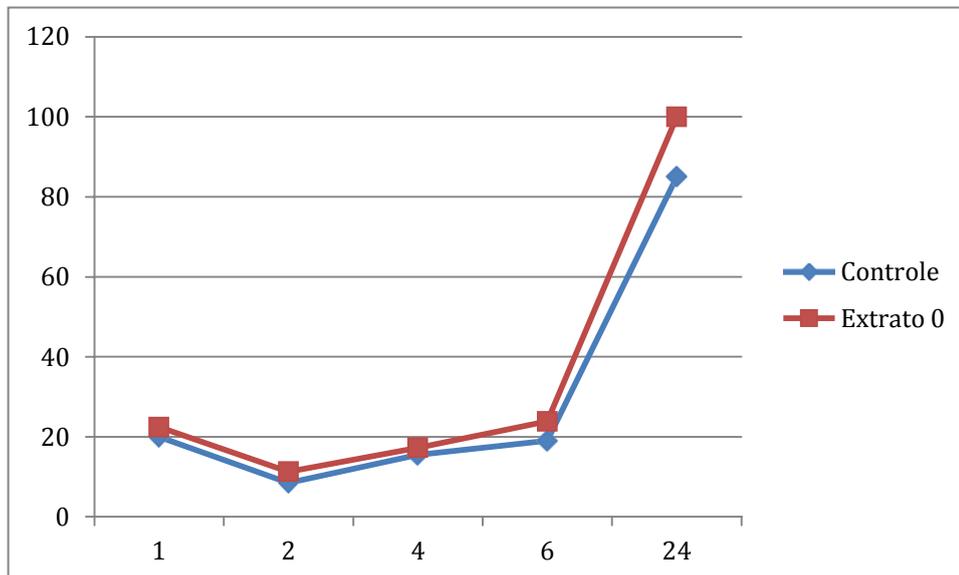
Para a padronização dos testes, a dose a ser considerada interferiu na motilidade dos vermes, sendo considerados mortos os vermes que não apresentaram movimentação.

4. RESULTADOS

Para avaliação da toxicidade da erva mate *Ilex paraguariensis*, os testes foram realizados em duplicatas, havendo adição de 100µL, 50µL e 25µL das alíquotas de vermes e 100µL, 75µL e 50µL do controle (M9) e dos extratos de *Ilex paraguariensis*, a motilidade dos vermes foi avaliada entre 1h, 2h, 4h, 6h e 24h.

Os testes 1 e 2 representam os experimentos empregando 100 µL das amostras e 50 µL da alíquota de vermes (contendo aproximadamente 100 vermes), sendo considerados mortos os vermes que não possuíam movimentação. Durante as primeiras 4 horas foi possível observar uma similaridade entre o controle e o extrato 0, mas após 6 horas o extrato 0 apresentou maior mortalidade (gráfico 2).

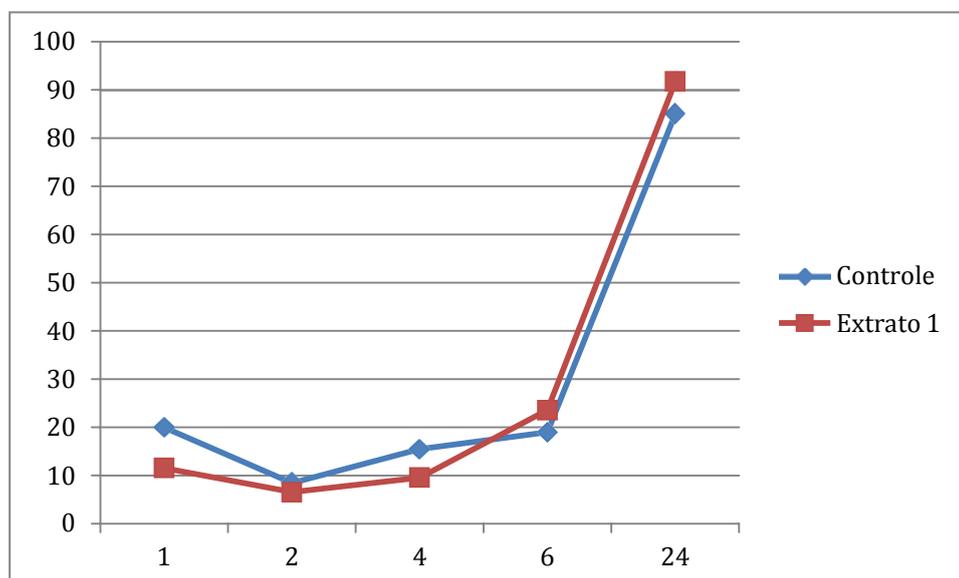
Gráfico 2: Avaliação da motilidade dos vermes entre 1, 2, 4, 6 e 24h (eixo x), sendo considerados mortos os vermes que não apresentaram motilidade (eixo y).



Fonte: Próprio Autor, 2022.

No gráfico 3 observa-se que nas primeiras quatro horas houve maior mortalidade no controle em comparação com o extrato 1, mas após seis horas o extrato 1 apresentou maior mortalidade que o controle.

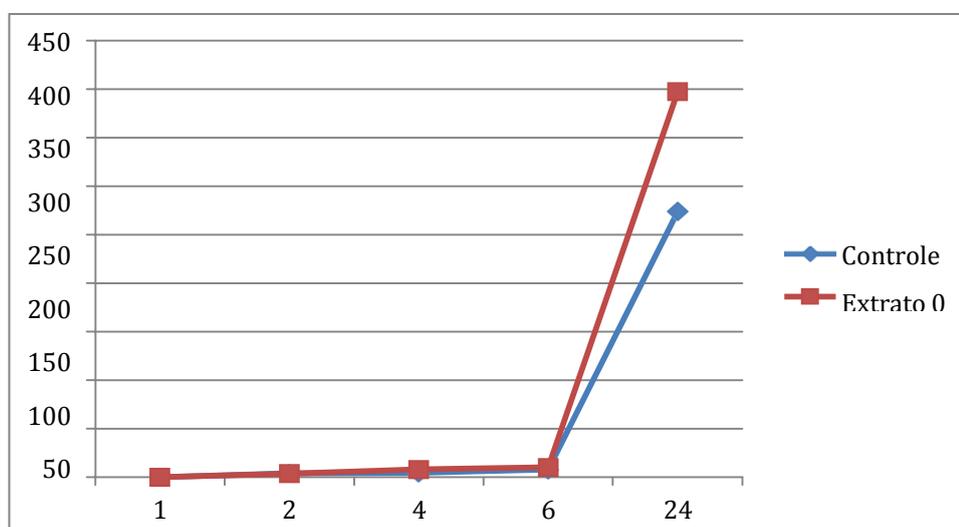
Gráfico 3: Avaliação da motilidade dos vermes entre 1,2, 4,6 e 24h (eixo x), sendo considerados mortos os vermes que não apresentaram motilidade (eixo y).



Fonte: Próprio Autor, 2022.

Foi utilizada a mesma concentração de extrato do teste anterior, sendo diferente a quantidade de animais por poço (aproximadamente 445 vermes), no gráfico 4 verifica-se similaridade com o experimento anterior até 6 horas, após esse período houve alta mortalidade nos poços contendo o extrato 0.

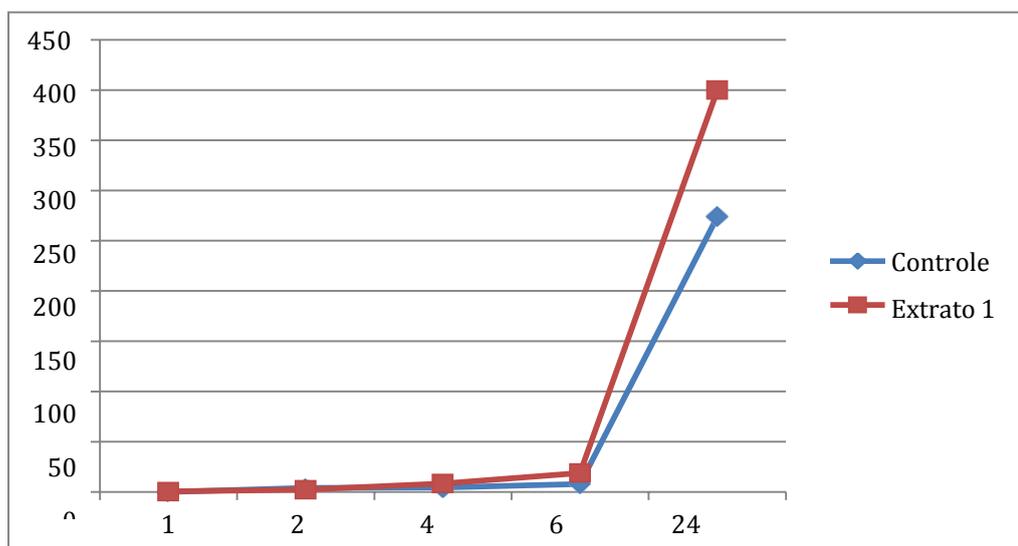
Gráfico 4: Avaliação da motilidade dos vermes entre 1,2, 4,6 e 24h (eixo x), sendo considerados mortos os vermes que não apresentaram motilidade (eixo y).



Fonte: Próprio Autor, 2022.

O controle e o extrato 0 apresentam o mesmo nível de mortalidade até às quatro horas, em seis horas o extrato 1 começou a expressar maior mortalidade (gráfico 5).

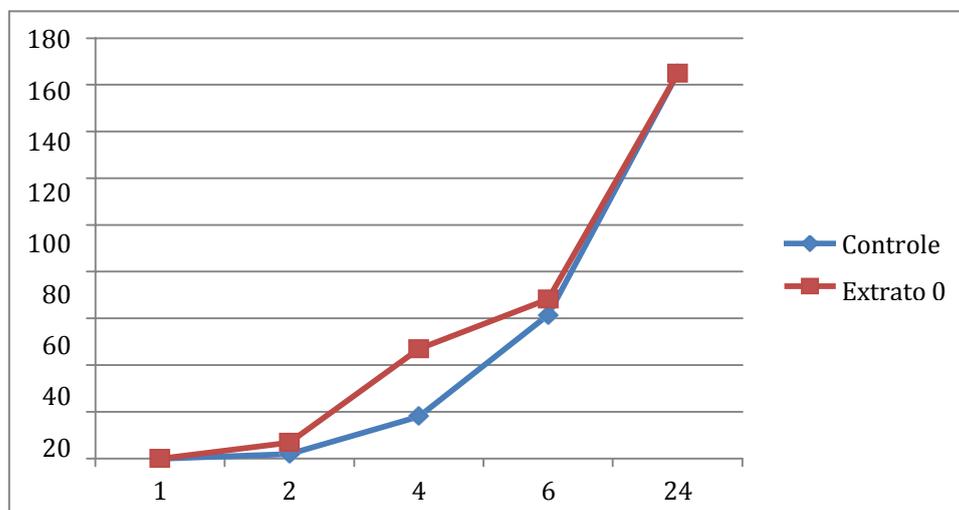
Gráfico 5: Avaliação da motilidade dos vermes entre 1,2, 4,6 e 24h (eixo x), sendo considerados mortos os vermes que não apresentaram motilidade (eixo y)



Fonte: Próprio Autor, 2022.

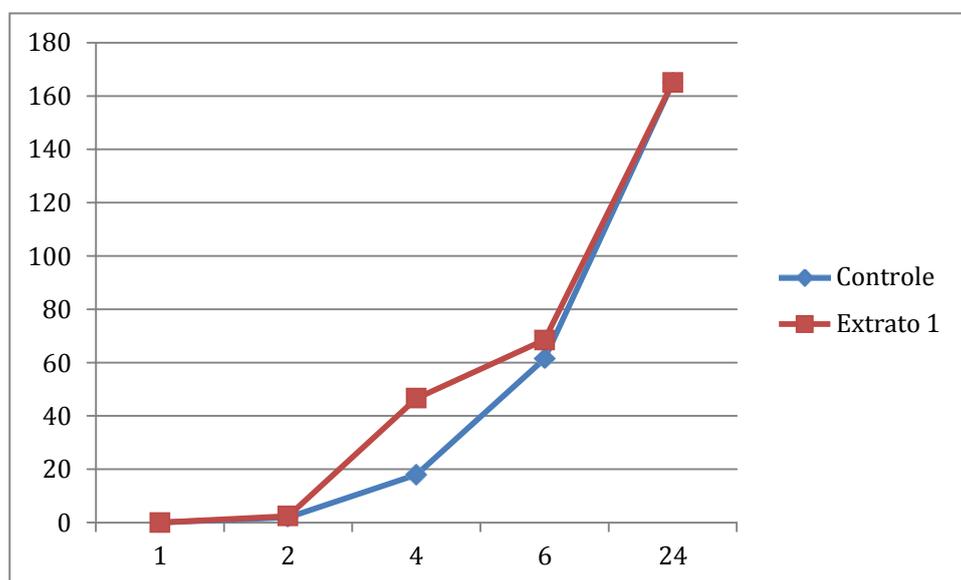
Os gráficos 6 e 7 representam os experimentos empregando 50 μ L da alíquota de vermes (aproximadamente 313 vermes) e 50 μ L do extrato 0. O referido extrato apresentou maior mortalidade que o controle e o extrato 1.

Gráfico 6: Avaliação da motilidade dos vermes entre 1,2, 4,6 e 24h (eixo x), sendo considerados mortos os vermes que não apresentaram motilidade (eixo y).



Fonte: Próprio Autor, 2022.

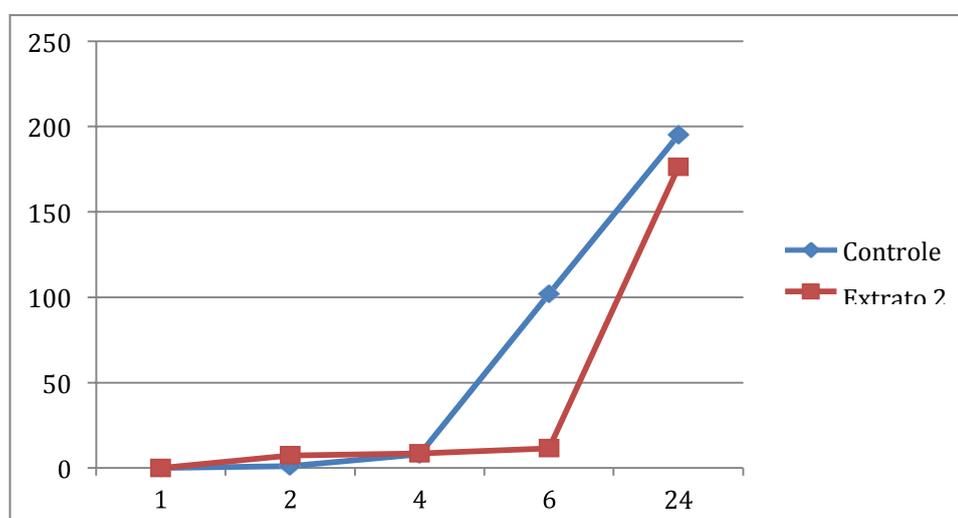
Gráfico 7: Avaliação da motilidade dos vermes entre 1,2, 4,6 e 24h (eixo x), sendo considerados mortos os vermes que não apresentaram motilidade (eixo y).



Fonte: Próprio Autor, 2022.

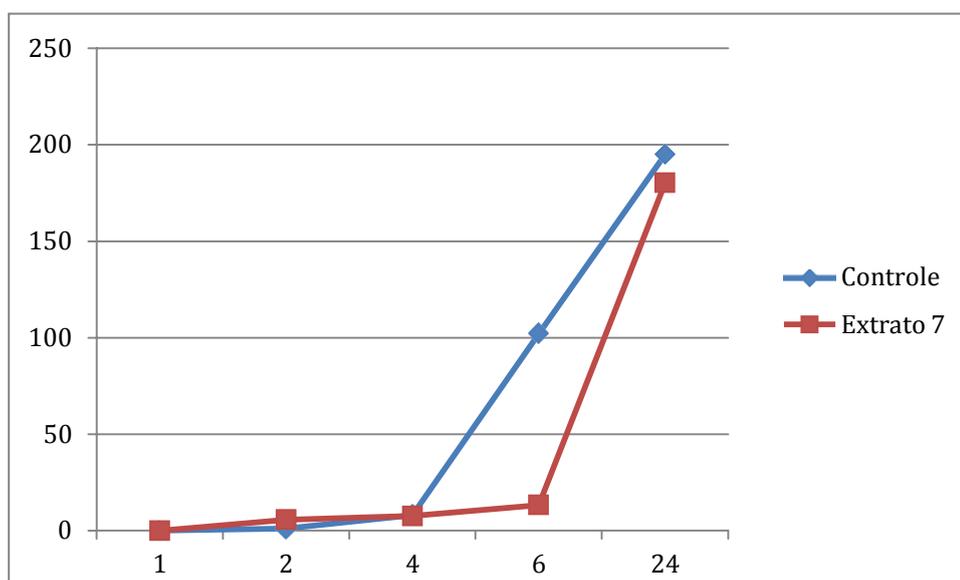
Os gráficos 8 e 9 representam os experimentos empregando 75 μL dos extratos 2 e 7 e a adição de 100 μL de vermes (200 por poço aproximadamente), nas duas amostras foi possível observar que houve maior mortalidade no controle.

Gráfico 8: Avaliação da motilidade dos vermes entre 1,2, 4,6 e 24h (eixo x), sendo considerados mortos os vermes que não apresentaram motilidade (eixo y).



Fonte: Próprio Autor, 2022.

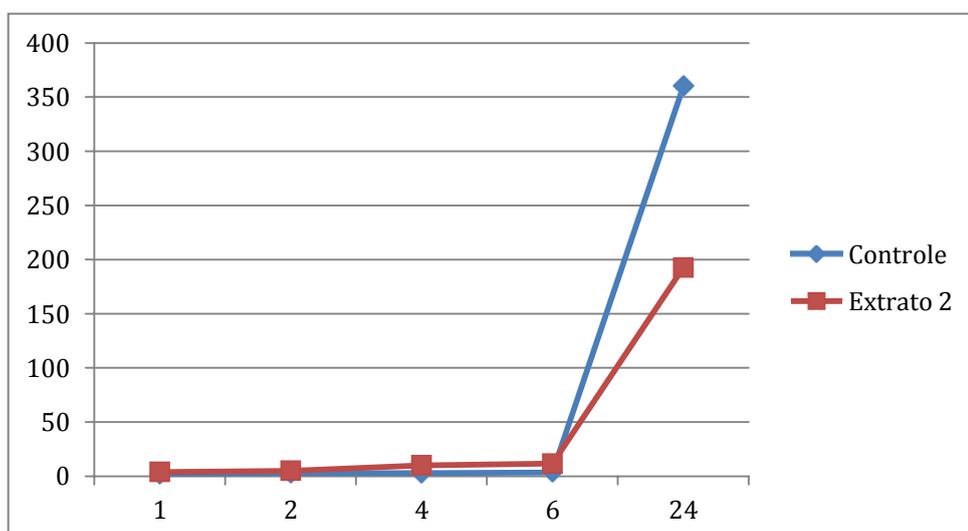
Gráfico 9: Avaliação da motilidade dos vermes entre 1,2, 4,6 e 24h (eixo x), sendo considerados mortos os vermes que não apresentaram motilidade (eixo y)



Fonte: Próprio Autor, 2022.

Os gráficos 10 e 11 representam os experimentos empregando 100 μ L dos extratos 2 e 7 e adição 250 μ L de vermes (aproximadamente 304 vermes). No gráfico 9 observa-se nas primeiras seis horas o controle e a amostra com o mesmo nível de mortalidade, mas logo após seis horas os animais do controle apresentaram maior mortalidade.

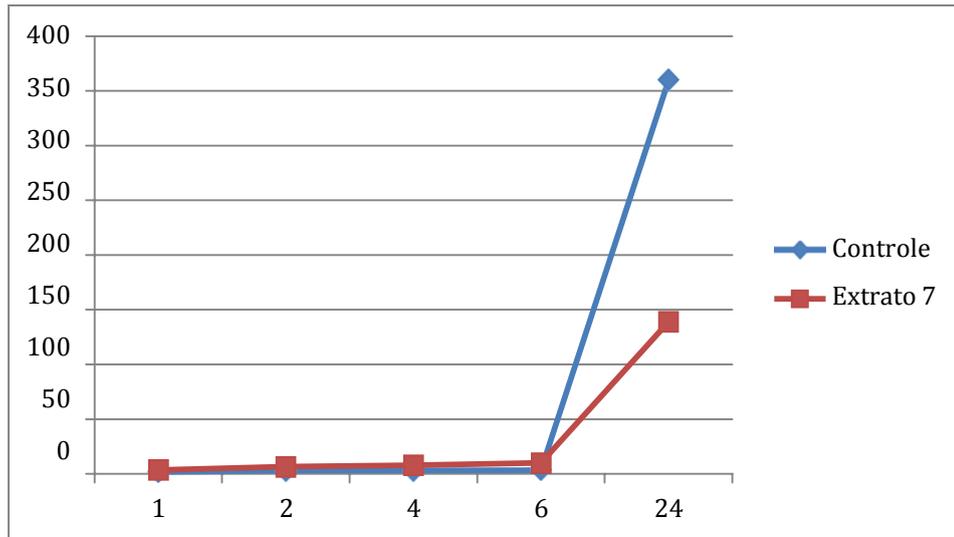
Gráfico 10: Avaliação da motilidade dos vermes entre 1,2, 4,6 e 24h (eixo x), sendo considerados mortos os vermes que não apresentaram motilidade (eixo y).



Fonte: Próprio Autor, 2022.

Até às 6 horas do teste (gráfico 11) pode-se observar o mesmo nível do controle e na amostra 7, mas semelhante a amostra 2 o controle apresenta alta mortalidade.

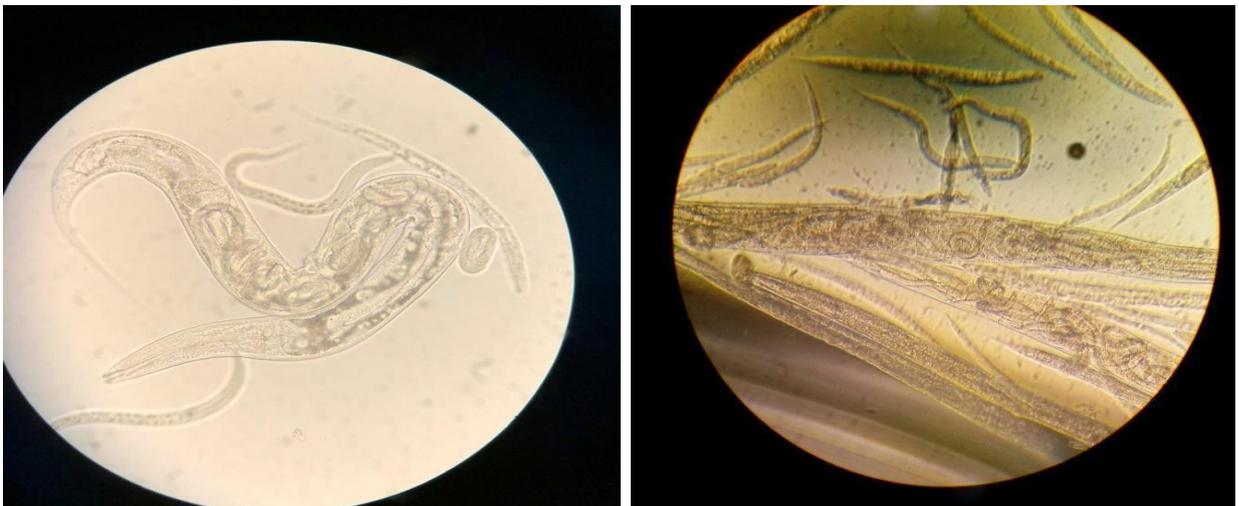
Gráfico 11: Avaliação da motilidade dos vermes entre 1,2, 4,6 e 24h (eixo x), Sendo considerados mortos os vermes que não apresentaram motilidade (eixo y).



Fonte: Próprio Autor, 2022.

Em todos os testes realizados foi constatado após as 24h o fenômeno chamado de Endotokia Matricida (Imagem 5), onde verifica-se larvas L1 eclodidas dentro do hermafrodita morto, após o rompimento da cutícula.

Imagem 6: Hermafrodita grávida (Esquerda), Endotokia Matricida (Direita).



Fontes: Maria Gabriela da Costa Ferrari (Esquerda), Próprio Autor (Direita), 2022.

Nos testes realizados com as amostras 0 e 1 houve maior mortalidade em comparação ao controle, ocorrendo o contrário nas amostras 2 e 7 onde o controle apresentou maior nível de mortalidade que nos experimentos anteriores.

As tabelas 1, 2 e 3 apresentam os vermes sem motilidade adicionados à placa de 24 escavações com adição dos extratos 0 e 1. Cada tabela contém concentrações diferentes dos extratos, sendo realizada a contagem do referido em tempos espaçados.

Tabela 1: O teste foi realizado com 100 vermes (Valor bruto) e 100 μ L dos extratos 0 e 1 de *Ilex paraguariensis*, sendo o controle e os extratos adicionados a 7 poços e entre 1h, 2h, 4, 6h e 24h foi avaliada a motilidade, sendo considerados mortos os vermes sem movimentação. Ao final foi realizado a média da mortalidade.

	Animais por poço	Horas	1	2	3	4	5	6	7	Média de mortalidade
	Extrato0	100 Vermes	1	16	15	10	27	40	21	28
2			16	12	6	15	17	10	3	11,28
4			16	16	14	18	25	12	20	17,2
6			20	20	21	27	29	26	24	23,8
24			24	100	100	100	100	100	100	100
Extrato 1	100 Vermes	1	5	4	9	22	17	11	13	11,57
		2	5	8	7	5	7	7	7	6,57
		4	12	10	9	9	9	7	11	9,57
		6	17	10	9	22	18	75	14	23,5
		24	100	100	100	94	100	100	48	91,7

Fonte: Próprio Autor, 2022

Tabela 2: O teste foi realizado com 445 vermes (Valor bruto) e 100 µL dos extratos 0 e 1 de *Ilex paraguariensis*, sendo o controle e os extratos adicionados a 7 poços e entre 1h, 2h, 4, 6h e 24h foi avaliada a motilidade, sendo considerados mortos os vermes sem movimentação. Ao final foi realizado a média da mortalidade

Extrato	Animais por poço	Horas	1	2	3	4	5	6	7	Média de mortalidade
		0	445 Vermes	1	0	0	0	0	0	0
2	1			3	2	3	4	5	8	3,71
4	3			4	9	5	12	12	12	8,14
6	8			14	6	7	10	15	15	422
24	422			333	311	422	436	436	436	397,4
1	445 Vermes	1	4	0	0	0	0	0	0	0,57
		2	0	2	3	2	4	4	2	2,42
		4	4	13	8	7	8	10	10	8,57
		6	5	10	17	14	21	31	35	19
		24	400	400	400	400	400	400	400	400

Fonte: Próprio Autor, 2022.

Tabela 3: O teste foi realizado com 313 vermes (Valor bruto) e 50 µL dos extratos 0 e 1 de *Ilex paraguariensis*, sendo o controle e os extratos adicionados a 7 poços e entre 1h, 2h, 4, 6h e 24h foi avaliada a motilidade, sendo considerados mortos os vermes sem movimentação. Ao final foi realizado a média da mortalidade

Extrato	Animais por poço	Horas	1	2	3	4	5	6	7	Média da mortalidade
		0	313 Vermes	1	0	0	0	0	0	0
2	1			4	5	3	4	5	26	6,85
4	33			57	65	31	30	60	53	47
6	65			86	90	42	100	40	55	68,2
24	165			165	165	165	165	165	165	165
1	313 Vermes	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	3	5	7	15	2,5
		4	7	7	23	75	93	75	280	46,6
		6	51	24	73	75	93	95	411	68,5
		24	165	165	165	165	165	165	900	165

Fonte: Próprio Autor, 2022.

As tabelas 4 e 5 apresentam os vermes sem motilidade adicionados à

placa de 24 escavações com adição dos extratos 2 e 7, sendo realizado o mesmo procedimento relatado anteriormente.

Tabela 4: O teste foi realizado com 200 vermes (Valor bruto) e 100 µL dos extratos 2 e 7 de *Ilex paraguariensis*, sendo o controle e os extratos adicionados a 7 poços e entre 1h, 2h, 4, 6h e 24h foi avaliada a motilidade, sendo considerados mortos os vermes sem movimentação. Ao final foi realizado a média da mortalidade.

	Animais por poço	Horas								Média de mortalidade	
			1	2	3	4	5	6	7		
Extrato 2	200 Vermes	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	7	3	0	13	10	14	5	7,42	
		4	8	3	2	9	14	14	10	8,57	
		6	7	9	4	18	20	14	9	11,5	
		24	200	200	200	200	200	200	35	176,4	

Extrato 7	200 Vermes	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	4	6	7	4	7	7	5	5,71
		4	8	3	2	12	8	10	10	7,57
		6	7	17	16	12	12	12	17	13,2
		24	185	163	154	160	200	200	200	180,2

Fonte: Próprio Autor, 2022.

Tabela 5: O teste foi realizado com 313 vermes (Valor bruto) e 50 µL dos extratos 2 e 7 de *Ilex paraguariensis*, sendo o controle e os extratos adicionados a 7 poços e entre 1h, 2h, 4, 6h e 24h foi avaliada a motilidade, sendo considerados mortos os vermes sem movimentação. Ao final foi realizado a média da mortalidade.

	Animais por poço	Horas								Média de mortalidade
			1	2	3	4	5	6	7	
Extrato 2	304 Vermes	1	4	3	3	7	3	3	4	3,85
		2	5	3	4	7	6	5	5	5
		4	13	7	4	5	17	12	12	10
		6	13	6	4	12	14	19	13	11,5
		24	32	141	360	59	83	313	360	192,5

Extrato 7	304 Vermes	1	3	4	3	2	5	4	3	3,4
		2	6	9	5	7	9	5	4	6,4
		4	8	8	7	8	10	8	5	7,71
		6	7	2	6	16	16	11	10	9,71
		24	25	73	241	360	122	55	97	139

Fonte: Próprio Autor, 2022.

DISCUSSÃO

GRAVES *et al* (2005) descreve que “bioensaios do solo são ferramentas importantes para avaliar os efeitos toxicológicos no ambiente terrestre”, podendo *Caenorhabditis elegans* ser utilizado como biomonitor. Os testes podem partir de aplicações de pequenas quantidades de vermes em amostras do solo, para quantificar a toxicidade de metais, pesticidas entre outros agentes, onde são avaliados parâmetros como alimentação, morfologia e locomoção do verme, assim possibilitando a avaliação de resistência e hipersensibilidade a certas substâncias tóxicas, contribuindo para avaliação da toxicidade ambiental (BOYD, WILLIAMS, 2003, GRAVES *et al*, 2005, LEUNG *et al.*, 2008, MOTA-FILHO *et al.*, 2005).

Conforme FUMAGALI *et al.*, 2008 Produtos secundários aumentam a probabilidade de sobrevivência da espécie, pois são responsáveis por diversas atividades biológicas, podendo atuar como antibióticos, antifúngicos e antivirais, protegendo a planta de patógenos. (GRAVES *et al.*, 2005)

Nos testes realizados observa-se proteção aos animais que estão expostos aos extratos 2 e 7, mas em contrapartida os extratos 0 e 1 apresentaram maior mortalidade em relação ao controle.

Para a padronização dos testes foram utilizados vermes em todos os estádios. Sendo que todos foram expostos somente aos extratos de *Ilex paraguariensis* e ao controle (M9), sem adição de bactérias (para alimentação do verme) a fim de evitar interferências adicionais.

C. elegans pode ser usado como modelo em pesquisas, auxiliando no desenvolvimento de nematicidas baseados na extração de compostos bioativos de plantas, promovendo a proteção de cultivos, diminuição da toxicidade ambiental e lixiviação do solo, além disso, contribuindo para o desenvolvimento de anti - helmínticos, devido à similaridade com nematoides parasitas (HOLDEN- DYE, WALKER, 2022, VINEY, 2017).

Novos estudos devem ser realizados utilizando populações sincronizadas com adição de bactérias mortas por calor (10 min a 70°C), assim evitando a metabolização dos compostos bioativos.

Os estudos adicionais possibilitariam a conclusão de que os métodos de extração produzem extratos distintos entre si a ponto de terem atividades opostas.

5. CONCLUSÃO

Caenorhabditis elegans é um excelente modelo para o desenvolvimento de pesquisas em toxicologia, possuindo algumas limitações como à falta de alguns órgãos, mas o seu uso em pesquisas, pode reduzir o custo, tempo e a quantidade de animais complexos utilizados nos experimentos.

Com a realização deste trabalho foi possível obter elementos que indicam atividades distintas dos extratos da erva mate *Ilex paraguariensis*. Dois extratos (2 e 7) apresentaram resultados que podem aumentar a sobrevivência dos vermes. O que embasa tal possibilidade é o fato de que nos poços sem adição dos extratos houve mortalidade mais alta dos animais, que nos seus similares que receberam os extratos.

Em contrapartida, os extratos 0 e 1 apresentaram o resultado oposto, apresentando uma fraca atividade nematicida, por aumentar a mortalidade dos vermes em relação ao experimento controle.

A ocorrência de resultados contraditórios indica necessidade de testes adicionais para dirimir qualquer dúvida em relação à ocorrência de problemas experimentais que possam ter ocorrido.

REFERÊNCIAS¹

AHMED, Mohammed; HOLOVACHOV, Oleksandr. **Twenty Years after De Ley and Blaxter—How Far Did We Progress in Understanding the Phylogeny of the Phylum Nematoda?**. ANIMALS. 2021. Disponível em:

<https://www.mdpi.com/2076-2615/11/12/3479/htm>. Acesso em: 8 set. 2022.

ALMENARA, Daniela Peres. **Estudo das vitelinas VT1 e YP170B dos nematoides rhabditídeos *Oscheius tipulae* e *Caenorhabditis elegans*: aspectos estruturais e funcionais**. São Paulo. 59 p Tese (Ciências Biomédicas) - Universidade de São Paulo, 2009. Disponível em:

<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42135/tde-03112009-104538/en.php>. Acesso em: 25 mai. 2022.

ÁVILA, Antônio Carlos de Ávila *et al.* Doenças causadas por nematoides. **EMBRAPA**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/hortalicas/tomate-de-mesa/doencas-causadas-por-nematoides>. Acesso em: 2 dez. 2022.

BATISTA, Emanuelle Karine Frota; NEVES, Camila Arrivabene; MENDONÇA, Ivete Lopes de. RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA EM OVINOS E CAPRINOS — UMA REVISÃO. **REVISTA CIENTÍFICA DE MEDICINA VETERINÁRIA**, 2016.

Biomphalaria glabrata SAY, 1818 (GASTROPODA, PLANORBIDAE). **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, p. 230-239.

BOYD, Windy A; L WILLIAMS, Phillip. Comparison of the sensitivity of three nematode species to copper and their utility in aquatic and soil toxicity tests.. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 22, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14587920/>. Acesso em: 16 dez. 2022.

Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 36. 26 p, set 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjce/a/Kw4JLYyvb5ZX8Xh8XJjmTx/?lang=en>. Acesso em: 12 dez. 2022.

BRIEFINGS in functional genomics, Jan, ano 2017, 3 mai. 2017, p. 8-14. Disponível em: <https://academic.oup.com/bfg/article/17/1/8/3793349>. Acesso em: 19 dez. 2022.

CAENORHABDITIS elegans . Taxonomia NCBI: uma atualização abrangente sobre curadoria, recursos e ferramentas. Banco de dados . 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6239>. Acesso em: 1 dez. 2022.

CARRILHO, Emanuel *et al.* Fluidos supercríticos em química analítica. I. Cromatografia com fluido supercrítico: conceitos termodinâmicos. **Química Nova** 24, 2001. Disponível em:

¹ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

<https://www.scielo.br/j/qn/a/P9r85nmZsJ3jkGrnTv4V9Wx/?lang=pt#>. Acesso em: 12 dez. 2022

CHAI, Jong- Yil; JUNG, Bong-Kwang; HONG, Sung-Jong. Albendazole and Mebendazole as Anti-Parasitic and Anti-Cancer Agents: an Update. **The Korean Journal of Parasitology**, Jun 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8255490/#!po=47.3333>. Acesso em: 1 dez. 2022.

CHARLIER, Johannes *et al.* Biology and Epidemiology of Gastrointestinal Nematodes in Cattle. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v.36,1, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32029177/>. Acesso em: 16 dez. 2022.

CLAEREBOUT, Edwin; GELDHOF, Peter . **Helminth Vaccines in Ruminants: From Development to Application**. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749072019300477?via%3Di> hub. Acesso em: 1 dez. 2022.

CORSI, Ann K; WIGHTMAN, Bruce ; CHALFIE, Martin. **A Transparent Window into Biology: A Primer on Caenorhabditis elegans**. GENETICS. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4492366/>. Acesso em: 1 dez. 2022. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/pimenta/producao/doencas-e-pragas/doencas/nematoides>. Acesso em: 20 nov. 2022.

EWALD, COLLIN Y; LI, Chris. **Caenorhabditis elegans as a model organism to study APP function**. SPRINGERLINK . 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00221-011-2905-7>. Acesso em: 1 dez. 2022.

FAGUNDES, Noele Borges Magalhães . **Avaliação do efeito anti-helmíntico do extrato bruto e metabólito elatol obtidos da alga Laurencia dendroidea no modelo experimental Caenorhabditis elegans**. Macaé, 2019 Dissertação - Universidade Federal do Rio de Janeiro

FAVARETO, Rogério. **EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS UTILIZANDO CO2 SUPERCRÍTICO DE ESPÉCIES DO CERRADO**. 72 p Tese (Ciências Agrárias) - Instituto Federal Goiano, 2016.

FUMAGALI, Elisângela *et al.* Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros Tabernaemontana e Aspidosperma. **Revista Brasileira de Farmacognisia**, 2008.

GAN, Ren-You ; ZHANG, Dan; CORKE, Harold . Health Benefits of Bioactive Compounds from the Genus Ilex, a Source of Traditional Caffeinated Beverages. **NUTRIENTS**, 2018.

GAZZINELLI-GUIMARAES, PEDRO H ; NUTMAN, Thomas B. **Helminth parasites and immune regulation**. F1000 RESEARCH. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6206608/>. Acesso em: 1 dez.2022.

GOV.BR. **Tratamento das Helmintíases**. Gov.br. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/servicos-estaduais/tratamento-de-helmintiasis-1>. Acesso em: 1 dez. 2022.

GRAVES, Amber L. ; BOYD, Windy A; WILLIAMS, Phillip L. Using Transgenic *Caenorhabditis elegans* in Soil Toxicity Testing. **Springerlink**, Mar 2005. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00244-004-0031-2#citeas>. Acesso em: 10 jan. 2023.

HOLDEN-DYE, Lindy; WALKER, Robert J.. **Anthelmintic drugs and nematocides: studies in *Caenorhabditis elegans****. WormBook. 29 p. Disponível em: http://www.wormbook.org/chapters/www_anthelminticdrugs.2/anthelminticdrugs.2.pdf. Acesso em: 2 dez. 2022.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=6157&vl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>. Acesso em: 20 nov. 2022.

HUNT , PIPER REID. **The *C. elegans* model in toxicity testing**. NATIONAL LIBRARYOFMEDICINE.2017.Disponível em:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27443595/>. Acesso em: 1 dez. 2022

IBGE- CENSO AGROPECUÁRIO . Sidra. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6906#resultado>. Acesso em: 13 de Setembro de 2022.

LEUNG, Maxwell C K *et al.* *Caenorhabditis elegans*: An Emerging Model in Biomedical and Environmental Toxicology. **Toxicological Sciences**, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2563142/>. Acesso em: 10 jan. 2023.

LIMA, Maria Eduarda de . ***Caenorhabditis elegans*: um modelo experimental para a análise dos efeitos agudos de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e uma ferramenta para a potencialização do Ensino de Ciências na Escola Básica**. Uruguaiiana , f. 91, 2013 Dissertação (Bioquímica) - Fundação Universidade Federal do Pampa - Unipampa. Disponível em: <https://dspace.unipampa.edu.br/handle/rii/309>. Acesso em: 19 dez. 2022.

MCVEIGH, PAUL. Post-genomic progress in helminth parasitology. **PARASITOLOGY** 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7284816/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

MOTA-FILHO, Fernando O *et al.* **Líquens: Bioindicadores ou Biomonitorios?**. 2005 Tese (Gestão e Políticas ambientais) - Universidade Federal de Pernambuco .

NEMATODA. NCBI TAXONOMY. Disponível em: PLATYHELMINTHES. NCBI TAXONOMY. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=6157&vl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>. Acesso em: 20 nov. 2022.. Acesso em: 20 nov. 2022.

NEVES, DAVID PEREIRA *et al.* **PARASITOLOGIA HUMANA**. 14 ed. ATHENEU, 2022. 616 p.

NIGON, Victor Marc; FÉLIX, Marie-Anne. **History of research on C. elegans and other free-living nematodes as model organisms***. WORMBOOK. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453431/>. Acesso em: 1 dez. 2022.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Quimioterapia preventiva para o controle de infecções por helmintos transmitidos pelo contato com o solo em grupos de risco**..2018. Disponível em: PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION.Quimioterapia preventiva para o controle de infecções por helmintos transmitidos pelo contato com o solo em grupos de risco.. 2018. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/49072>. Acesso em: 20 nov. 2022.. Acesso em: 1 dez. 2022.

PARK, Hae-Eun H; JUNG, Yoonji; LEE, Seung-Jae V. Survival assays using *Caenorhabditis elegans*. **Molecules and cells**, 2017.
PINHEIRO, Jadir Borges. Nematóides. Embrapa. 2022.

PARTRIDGE, FREDERICK A ; RUTH, FORMAN. **Anthelmintic drug discovery: target identification, screening methods and the role of open science**. 2022. 22 p. Disponível em: https://www.beilstein-journals.org/bjoc/articles/16/105?utm_source=researcher_app&utm_medium=referral&utm_campaign=RESR_MRKT_Researcher_inbound. Acesso em: 09 de Novembro de 2022.

PLATYHELMINTHES.NCBITAXONOMY.Disponível em:
RAD, Hadi Behjati *et al.* STUDY OF SOLUBILITY IN SUPERCRITICAL FLUIDS: THERMODYNAMIC CONCEPTS AND MEASUREMENT METHODS - A REVIEW.

RANG, Humprey *et al.* **FARMACOLOGIA** . 8 ed. GEN Guanabara Koogan, 2016.2053 p.

ROCHA, Thiago José Matos *et al.* ESTUDO DO EFEITO MOLUSCICIDA DE ESPÉCIES VEGETAIS EM EMBRIÕES E CARAMUJOS ADULTOS DE *Biomphalaria glabrata* SAY, 1818 (GASTROPODA, PLANORBIDAE). **Revista de**

Patologia Tropical , v. 42, p. 230-239.

ROSSI, CAROLINA. **AS PROTEÍNAS DO VITelo DO NEMATÓIDE ENTOMOPATOGÊNICO *Heterorhabditis baujardi* LPP7**. SÃO PAULO, 2014. 28 p Dissertação (BIOLOGIA DA RELAÇÃO PATÓGENO HOSPEDEIRO) Universidade de São Paulo. Disponível em: . Acesso em: 08 Jun. 2022.

SCHOLTE, Larissa. Helminths and Cancers From the Evolutionary Perspective. **Frontiers in medicine**, v. 5:90, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5911458/>. Acesso em: 4 nov. 2022

SILVA, Santino Aleandro da. Raízes de tomateiro com galhas causadas por *Meloidogyne enterolobii*. **Sociedade Brasileira de Nematologia**. Acesso em: 09 Nov 2022.

SILVA, RENAN DE SOUZA FRUCTUOSO. **Interação de *Streptococcus agalactiae* com o nematódeo *Caenorhabditis elegans***. Rio de Janeiro, f. 89, 2020 Dissertação (A Acessibilidade e a atuação do Ministério Público) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Disponível em: . Acesso em: 1 dez. 2022.

SILVA, FRANCISCA CRISLÂNDIA OLIVEIRA *et al.* Bioatividades de Triterpenos isolados de plantas: Uma breve revisão. **Revista Virtual de Química**. 14 p, 2020.

INTRODUCTION TO *C. elegans* ANATOMY. Disponível em: <https://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/Introframeset.html>. Acesso em: 10 jan. 2023.

WORMATLAS. **INTRODUCTION TO *C. elegans* EMBRYO ANATOMY**.

WORMATLAS. **INTRODUCTION TO THE DAUER LARVA - OVERVIEW**. Disponível em: <https://www.wormatlas.org/dauer/introduction/DIntroframeset.html>. Acesso em: 08 Jun . 2022.

WORMATLAS. Disponível em: <https://www.wormatlas.org/embryo/introduction/EIntroframeset.html>. Acesso em: 1 dez. 2022.