

Maiara Maria Romanelli Silva

**Avaliação do Potencial Antiparasitário de um Alcaloide Indólico
isolado do Coral Marinho *Tubastraea tagusensis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientador: André Gustavo Tempone Cardoso

São Paulo

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Silva, Maiara Maria Romanelli

Avaliação do potencial antiparasitário de um alcaloide indólico isolado do coral marinho *Tubastraea tagusensis*. / Maiara Maria Romanelli Silva - 2022.

Tese (Doutorado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2022.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientação: Prof. Dr. André Gustavo Tempone

1. *Tubastraea tagusensis*. 2. Invertebrado marinho. 3. Doenças negligenciadas. 4. Terapia. 5. Leishmania. 6. Trypanosoma cruzi. 7. Mecanismo de ação.

SES/CCD/CD - 440/2022

Elaborada por Renan Matheus Predasoli CRB 8/9275

Agradecimento

Primeiramente, gostaria de agradecer ao Instituto Adolfo Lutz por toda estrutura e suporte para que esse trabalho tenha sido realizado, ao Programa de Pós-graduação da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo pela oportunidade e credibilidade conferidas a mim para que o realizasse, e à CAPES pelo auxílio financeiro durante o programa.

Agradeço ao meu orientador Prof^o. Dr^o. André Tempone por permitir que eu realizasse esse trabalho em seu laboratório. Muito obrigada por todo conhecimento compartilhado, apoio, confiança e auxílio do início ao fim do trabalho. Obrigada por sempre ter acreditado e depositado sua confiança em mim ao longo desses anos.

À técnica Matília, obrigada por todo o suporte prestado durante minha estada no laboratório.

As amigas do laboratório Thais, Erica, Viviane, Mariana, Dayana, Ingrid Siqueira, Alle, Valéria e Marta, obrigada pela paciência, companheirismo e pelos momentos de descontração, dentro e fora do laboratório.

Em especial, agradeço a minha amiga, Maiara Amaral, por todos os *helps*, pelos momentos de risadas e apoio nos momentos difíceis, imensa parceria e amizade, sem você esse trabalho não teria acontecido.

Aos meus pais, Leda e Laércio, e meus irmãos Liana, Telma e Tiago que me guiaram até aqui e acreditaram em mim, todo meu amor e gratidão. Obrigada por terem acreditado no meu sonho e tornado ele possível de ser alcançado, amo muito vocês.

Ao meu marido, Kelvin pelo incentivo, paciência e companheirismo durante a realização desse projeto.

Aos meus amigos pela paciência e apoio durante esse tempo em que estive ausente me dedicando ao trabalho.

Agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte desse trabalho.

Resumo

Diante da falta de uma terapia eficaz e segura para o tratamento da doença de Chagas (DC) e da leishmaniose visceral, a busca por novos fármacos continua imprescindível. O ambiente marinho é uma rica fonte de produtos naturais bioativos, com aplicações contra parasitas, bactérias e outros patógenos que possam afetar humanos e animais. Entre as diversas classes de produtos naturais, os alcaloides têm um importante papel em aplicações terapêuticas. Neste trabalho, colônias de coral *Tubastraea tagusensis* foram coletadas, e a extração de seus metabolitos secundários foi realizada utilizando o solvente orgânico. Após fracionamento cromatográfico por diferentes técnicas, um alcaloide indólico foi isolado e elucidado estruturalmente por meio de técnicas espectrométricas e espectroscópicas. O alcaloide 6-bromo-2'-de-N-metilaplisinopsina (**MR01**), demonstrou atividade contra tripomastigotas e amastigota intracelulares de *Trypanosoma cruzi*, com valores de Concentração Efetiva 50% de 62 μM e 5 μM , respectivamente, e não demonstrou citotoxicidade em fibroblastos murinos até 200 μM . Estudos em amastigotas de *Leishmania infantum* demonstraram ausência de atividade do composto. O mecanismo de ação anti-*T. cruzi* do **MR01** foi explorado, e após incubação com tripomastigotas, não foi observada alteração da permeabilidade da membrana plasmática. O **MR01** promoveu a despolarização do potencial de membrana mitocondrial, com redução nos níveis de ATP, porém, sem alterações nos níveis de espécies reativas de oxigênio. Os níveis de cálcio intracelular do parasita foram reduzidos após o tratamento, além de uma alteração do pH dos acidocalcisomas. Utilizando o MALDI-TOF/MS, foi observada a alteração do perfil proteico de forma distinta daquela observada com o benznidazol, sugerindo um mecanismo de ação diferente do fármaco padrão. Estudos *in silico* das propriedades farmacocinéticas/farmacodinâmicas no software SwissADME, sugeriu que o composto adere a muitas das características de fármacos aprovados (*druglikeness*). Em conclusão, este estudo mostrou pela primeira vez a atividade anti-*T. cruzi* deste alcaloide; sua potência e seletividade demonstram que pode ser explorado como um novo protótipo farmacêutico para DC.

Palavras chave: *Tubastraea tagusensis*; invertebrado marinho, doenças negligenciadas, terapia, *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi*; mecanismo de ação

Abstract

Considering the lack of effective and safe therapy for the treatment of Chagas disease (CD) and visceral leishmaniasis, the search for new chemotherapies remains indispensable. The marine environment is a well-known source of bioactive products, with applications against parasites, bacteria and other human / animal pathogenic microorganisms. Among different classes of natural products, alkaloids have a rich history of therapeutic applications. In this work, colonies of the coral *Tubastraea tagusensis* were collected and their secondary metabolites were extracted with ethyl acetate. Using different chromatographic techniques, an indole alkaloid was isolated and elucidated through spectroscopic and spectrometric techniques, resulting in the 6-bromo-2'-de-N-methylaplisinopsin (**MR01**). The compound **MR01** demonstrated activity against *Trypanosoma cruzi*, against both trypomastigote and amastigote forms, resulting in 50% Effective Concentration (EC₅₀) values of 62 µM and 5 µM, respectively. The studies with *Leishmania infantum* amastigotes showed lack of activity. No cytotoxicity was observed for NCTC cells, to the maximal concentration of 200 µM. The mechanism of action was also explored. After incubation with the trypomastigotes, no alteration was observed in the permeability of the plasma membrane. The compound reduced the ATP and induced mitochondrial depolarization with no alterations in the reactive oxygen species levels. The intracellular calcium levels were reduced after treatment with **MR01**, including the pH alterations of the acidocalcisomes. Using MALDI-TOF/MS, the protein profile of the parasite was altered to a different manner to that observed for the standard drug benznidazole, suggesting a distinct mechanism of action. *In silico* studies of the pharmacokinetic / pharmacodynamic properties (PKPD) and physicochemical properties using the SwissADME software, suggested a good drug-like. In conclusion, this study showed for the first time the anti-*T. cruzi* activity of the alkaloid **MR01**. In addition, considering the potency and selectiveness, our study can suggest this compound to be explored as a new prototype for CD.

Keywords: *Tubastraea tagusensis*; marine invertebrate, alkaloid, therapy, *Trypanosoma cruzi*; mechanism of action.

Lista de Abreviações

AcOEt – Acetato de Etila

ADMET – Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade

ara-c – citosina arabinosídeo

ATP – adenosina trifosfato

B – Macromolécula

BOD – Demanda Biológica de Oxigênio

BZN – Benznidazol

CCCP – Carbonil Cianeto m-Clorofenilhidrazona

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CE₅₀ – Concentração Efetiva 50%

CEBIMar – Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-HRMS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução

CO₂ – Dióxido de Carbono

DC – Doença de Chagas

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DND*i* – Drugs for Neglected Diseases Initiative

DTN – Doenças Tropicais Negligenciadas

ExMeOH – Extrato Bruto em Metanol

FDA – Food and Drug Administration

FrAcOEt – Fração em Acetato de Etila

FrBut – Fração em Butanol

FrHex – Fração em Hexano

H₂DCFDA – 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato

HBSS – Hank's Balanced Salt Solution

HCCA – ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico

HESI - eletrospray aquecido – fonte de ionização por eletro nebulização com aquecimento

IAL – Instituto Adolfo Lutz

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IF – Índice de Infecção

IS – Índice de Seletividade

JC-1 – 3,3'-tetraetilbenzimidazolil carbocianina

Log P – Lipofilicidade

Log S – Solubilidade aquosa

LV – Leishmaniose Visceral

LVA – Leishmaniose Visceral Americana

M 199 – Meio de Cultura 199

MALDI – TOF/MS – matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

MeOH – Metanol

min – Minuto

MR01 – 6-bromo-2'-de-*N*-metilaplisinopsina

MS – Ministério da Saúde

MTT – 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazólio

N – Produto Natural

NaHCO₃ – Bicarbonato de sódio

NB – Extrato Botânico

ND – Derivado de Produto Natural

NFX – Nifurtimox

°C – Celsius

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAIN – Pan-Assay Interference Compounds

PBS – Tampão Fosfato Salina

PCR – Proteína C Reativa

pH – Potencial Hidrogeniônico

Rf – Fator de retenção

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN de ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

S – Fármaco Sintético

S* – Fármaco Sintético com Farmacóforo de Produto Natural

S*/NM – Fármaco Sintético com Farmacóforo de Produto Natural Semelhante ao Produto Natural

S/NM – Fármaco Sintético Semelhante ao Produto Natural

Sb^v – antimonial pentavalente

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SFB – Soro Fetal Bovino

SPE – Extração em Fase Sólida

TFA – Ácido trifluoroacético

TPSA – Área de Superfície Polar Topológica

TX-100 – Triton X 100

UFABC – Universidade Federal do ABC

V – Vacina

v/v – Volume / Volume

WHO – World Health Organization

$\Delta\Psi_m$ – Potencial de Membrana Mitocondrial

Lista de Figuras

Figura 1: Mapa de distribuição de novos casos de leishmaniose visceral em 2019. Fonte: Adaptado de WHO (2021).....	21
Figura 2: Estrutura do fármaco antimoniato de N-metilglucamina. Fonte: DrugBank (2022).....	23
Figura 3: Estrutura do fármaco anfotericina B. Fonte: DrugBank (2022).....	24
Figura 4: Estrutura do fármaco paromomicina. Fonte: DrugBank (2022).	24
Figura 5: Estrutura do fármaco miltefosina. Fonte: DrugBank (2022)	25
Figura 6: Mapa de distribuição do número de casos de infecção por Trypanosoma cruzi em 2018. Fonte: Adaptado de WHO (2021).....	27
Figura 7: Estrutura do fármaco benznidazol. Fonte: DrugBank (2022).....	29
Figura 8: Estrutura do fármaco nifurtimox. Fonte: DrugBank (2022).....	30
Figura 9: Distribuição das fontes de 1881 fármacos desenvolvidos no período de 1981 a 2019 (em porcentagem). B – macromolécula biológica; N – produto natural; NB – extrato botânico; ND – derivado de produto natural (semissintético); S – fármaco sintético; S/NM – fármaco sintético semelhante ao produto natural; S* - fármaco sintético com farmacóforo de produto natural; S*/NM – fármaco sintético com farmacóforo de produto natural semelhante ao produto natural; V – vacina. Fonte: Adaptado de Newman e Cragg, 2020.....	31

Figura 10: Estruturas de fármacos aprovados, isolados de produtos naturais marinhos. Fonte: DrugBank (2022).	33
Figura 11: Colônias do coral <i>Tubastraea tagusensis</i> . Fonte: Alexandre Ornellas, ICMBio.	35
Figura 12: Exemplos da estrutura química de alcaloides. Fonte: Adaptado Liu et al., 2019.....	36
Figura 13: Classificação de alcaloides indólicos. Fonte: adaptado de Wibowo et al., 2022.....	37
Figura 14: Colônia do coral-sol (<i>Tubastraea tagusensis</i>). Fonte: Marcelo Visentini Kitahara - Cifonauta - Cebimar.	42
Figura 15: Mapa da região da Universidade de São Paulo, Centro de Biologia Marinha (seta azul - CEBIMAR), em São Sebastião, onde foram realizadas as coletas do coral <i>Tubastraea tagusensis</i> (seta vermelha- Farol do Moleque) Fonte: Google Maps.....	43
Figura 16: Esquema da partição líquido-líquido da <i>Tubastraea tagusensis</i>	44
Figura 17: Separação da FrAcOEt em coluna Sephadex LH-20 (2,4 x 70 cm). Foi realizada seis corridas, das quais foram recolhidas aproximadamente 90 frações por corrida.	59
Figura 18: Cromatografia de camada delgada (CCD) das 90 frações obtidas após a separação em coluna Sephadex LH-20. Como fase móvel foram utilizados os solventes metanol e acetato de etila (v/v). A revelação e	

visualização das bandas foi realizada em câmara com luz ultravioleta (254 nm) e utilização de sulfato cérico, seguido de aquecimento a 100°C. 59

Figura 19: Perfil cromatográfico da **FrAcOEt 5** obtivo por CLAE em coluna C18 (ACE, dimensões 250 x 4,6 mm, 5 µm). Foi utilizado fluxo de 1 mL/min. Como solvente A foi utilizado água e como solvente B foi utilizado MeOH. O cromatograma foi obtido utilizando o comprimento de onda de 220 e 254 nm. 61

Figura 20: Perfil cromatográfico da **FrAcOEt 5V** obtivo por CLAE em coluna C4 (ACE, 250x4,6 mm). Foi utilizado fluxo de 1 mL/min. Como solvente A foi utilizado água e como solvente B foi utilizado AcOEt. O cromatograma foi obtido utilizando o comprimento de onda de λ 220 e 254 nm. 62

Figura 21: Estrutura do composto isolado **MR01** (6-bromo-2'-de-N-metillaplisinopsina) da **FrAcOEt** da *Tubastraea tagusensis*. A elucidação estrutural foi determinada por RMN e espectrometria de massas de alta resolução..... 63

Figura 22: Fluxograma resumindo o processo de isolamento do alcaloide **MR01** (6-bromo-2'-de-N-metillaplisinopsina). : Extratos e frações ativas contra *Leishmania infantum*. : Extratos e frações ativas contra *Trypanosoma cruzi*. 64

Figura 23: Macrófagos infectados com amastigotas de *T. cruzi*. **A** – macrófagos infectados e não tratados. **B** – macrófagos infectados e tratados com o composto **MR01** na concentração de 7,5 µM. Os macrófagos foram infectados na concentração de 1:10 (macrófagos:amastigotas), por 48 horas. Após esse período, as células foram fixadas e coradas com Giemsa e observadas em microscópio óptico com objetiva de imersão (100x)..... 65

Figura 24: Radar de Biodisponibilidade do composto **MR01**. A área rosa representa a faixa ideal para cada propriedade. LIPO – lipofilicidade (-0,7 e +5,0); SIZE – tamanho (150 e 500 g/mol); POLAR – polaridade (20 e 130Å²); INSOLU – solubilidade (log S ≤ 6); INSATU – saturação (sp³ ≥ 0,25) FLEX – flexibilidade (≤ 9 ligações rotativas). 69

Figura 25: Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática em tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* após 2h de tratamento com **MR01** (130 µM), utilizando o fluoróforo Sytox Green (excitação 485 nm e emissão 535 nm). Parasitas não tratados e tratados com Triton X100 0,5% foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente. A fluorescência foi relatada como uma porcentagem para Triton X100 0,5% em 120 min (100%). *** p <0,0001 quando comparado ao controle não tratado..... 70

Figura 26: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial em tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* após 1 e 2 horas de tratamento com **MR01** (130 µM), utilizando o fluoróforo JC-1 (excitação 488 nm e emissão 530/574 nm). Parasitas não tratados e tratados com CCCP (100 µM) foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente. A fluorescência foi relatada como a razão entre BL-2 (574 nm) e BL-1 (530 nm). ** p <0,05 quando comparado ao controle não tratado. 71

Figura 27: Determinação dos níveis de ATP em tripomastigotas de *T. cruzi* após 1 e 2 horas de tratamento com **MR01** (130 µM), utilizando o Kit de Determinação de ATP. Parasitas não tratados e tratados com CCCP (100 µM) foram usados como controle negativo e positivo, respectivamente. *** p <0,0001 em relação ao controle não tratado. 72

Figura 28: Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio tripomastigotas de *T. cruzi* após 1 e 2 horas de tratamento com **MR01** (130 μ M), utilizando o fluoróforo H₂DCFDA (excitação 485 nm e emissão 535 nm). Os parasitas não tratados e os parasitas tratados com azida de sódio (10 mM) foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente. ** p <0,05 quando comparado ao controle não tratado. 73

Figura 29: Avaliação dos níveis de cálcio intracelular em tripomastigotas de *T. cruzi* em até 2h de tratamento com **MR01** (130 μ M), utilizando o fluoróforo Fluo-4 AM (excitação 485 nm e emissão 535 nm). Parasitas não tratados e 0,5% tratados com Triton X100 foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente. A fluorescência foi relatada como uma porcentagem de parasitas não tratados em 0 min (100%). *** p <0,0001 em relação ao controle. * p<0,05 em relação ao controle não tratado. 74

Figura 30: Avaliação da alcalinização de acidocalcisomas em tripomastigotas de *T. cruzi* após 2h de tratamento com **MR01** (130 μ M), utilizando o fluoróforo laranja de acridina (excitação 485 nm e emissão 535 nm). Parasitas não tratados e tratados com nigericina (4 μ M) foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente. A fluorescência foi relatada como uma porcentagem de nigericina em 10 minutos (100%). * p < 0,05 e *** p <0,0001 quando comparado ao controle não tratado..... 75

Figura 31: Avaliação do perfil protéico de tripomastigotas de *T. cruzi* na presença do composto **MR01**. Espectro de massas de tripomastigotas tratados com **MR01** (linhas vermelhas - 130 μ M), tratados com benznidazol (linhas azuis - 40 μ M) e não tratadas (linhas pretas). Os parasitas foram tratados por 18 horas, e após o

tratamento, as amostras foram analisadas em MALDI-TOF/MS Microflex (Bruker-Daltonics, Bremen, Alemanha). O perfil de proteína dos parasitas tratados foi comparado com o perfil proteico dos parasitas não tratados. 76

Lista de Tabela

- Tabela 1:** Determinação da atividade de concentração efetiva 50% (CE₅₀) contra promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e massas das frações obtidas após partição. 57
- Tabela 2:** Frações agrupadas, provenientes da cromatografia em coluna Sephadex LH-20 da **FrAcOEt**, com base na análise por cromatografia em camada delgada, juntamente com suas massas (mg). 60
- Tabela 3:** Atividade anti-*Trypanosoma cruzi* e citotóxica do composto **MR01**. 66
- Tabela 4:** Análise in silico dos parâmetros físico-químicos, farmacocinéticos e farmacodinâmicos do composto **MR01**, obtido no software SwissADME. 68

Índice

1. Introdução	19
1.1. Leishmanioses	19
1.2. Leishmaniose Visceral.....	20
1.2.1. Doença	20
1.2.2. Epidemiologia.....	20
1.2.3. Tratamento	22
1.3. <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
1.3.1. Doença	25
1.3.2. Epidemiologia.....	26
1.3.3. Tratamento	27
1.4. Produtos Naturais como Protótipos Farmacêuticos	30
1.4.1. Organismos Marinhos.....	31
1.4.2. <i>Tubastraea tagusensis</i>	33
1.4.3. Alcaloides Marinhos	35
1.5. Justificativa.....	38
2. Objetivos.....	39
2.1. Geral.....	39
2.2. Específicos.....	39
3. Material e Métodos.....	40
3.1. Reagentes.....	40
3.2. Animais de experimentação	40
3.3. <i>Leishmania (L.) infantum</i>	40
3.4. <i>Trypanosoma cruzi</i>	41
3.5. Células de mamífero.....	41
3.6. Coleta da <i>Tubastraea tagusensis</i>	42
3.7. Obtenção dos extratos orgânicos (metabólitos secundários).....	43
3.7.1. Obtenção de metabólitos secundários a partir da partição líquido-líquido 43	
3.7.2. Fracionamento cromatográfico utilizando Sephadex LH-20	44
3.7.3. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	45
3.7.4. Desrepliação através da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ..	45

3.7.5.	Pré-fracionamento em cartucho de extração em fase sólida (SPE) C18	46
3.7.6.	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	46
3.7.7.	Elucidação Estrutural	47
3.8.	Determinação <i>in vitro</i> da atividade antiparasitária e concentração efetiva 50% (CE ₅₀)	47
3.8.1.	Determinação <i>in vitro</i> da atividade parasitária e concentração efetiva 50% (CE ₅₀) contra formas promastigotas e amastigotas de <i>L. (L.) infantum</i>	48
3.8.2.	Determinação <i>in vitro</i> da atividade parasitária e concentração efetiva 50% (CE ₅₀) contra formas tripomastigotas e amastigotas de <i>T. cruzi</i>	49
3.9.	Determinação <i>in vitro</i> da Concentração Citotóxica 50% (CC ₅₀)	50
3.10.	Determinação do Índice de Seletividade (IS)	50
3.11.	Análise de parâmetros <i>in silico</i>	50
3.12.	Avaliação dos Mecanismos de Ação	51
3.12.1.	Alteração da Permeabilidade da Membrana Plasmática	51
3.12.2.	Alteração no Potencial da Membrana Mitocondrial ($\Delta\psi_m$)	52
3.12.3.	Alterações nos Níveis de Adenosina Trifosfato (ATP)	52
3.12.4.	Alterações nos Níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)	53
3.12.5.	Alteração dos Níveis de Cálcio Intracelular	53
3.12.6.	Alterações nos Acidocalcisomas	54
3.12.7.	Avaliação do Perfil Proteico de Tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	54
3.13.	Análise estatística	55
4.	Resultados	57
4.1.	Estudo biomonitorado e partição líquido-líquido	57
4.2.	Caracterização das frações obtidas na partição líquido-líquido	58
4.3.	Fracionamento da FrAcOEt em coluna Sephadex LH-20	58
4.4.	Desreplicação das sub-frações por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ⁶⁰	
4.5.	Pré-fracionamento da fração FrAcOEt 5 em cartucho de extração em fase sólida – SPE – C18	60
4.6.	Refracionamento da FrAcOEt 5 em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	61
4.7.	Desreplicação da FrAcOEt 5V por Ressonância Magnética Nuclear (¹ H-RMN) ⁶²	
4.8.	Purificação da FrAcOEt 5V em CLAE	62
4.9.	Elucidação estrutural	63

4.10.	Determinação <i>in vitro</i> da atividade antiparasitária e concentração efetiva 50% (CE ₅₀) do composto MR01	65
4.11.	Determinação de parâmetros físico-químicos <i>in silico</i>	66
4.12.	Determinação da concentração efetiva 50% para estudos de mecanismo de ação	69
4.13.	Alterações na permeabilidade da membrana plasmática de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	69
4.14.	Efeitos do potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	70
4.15.	Determinação dos Níveis de ATP.....	71
4.16.	Determinação de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	72
4.17.	Alteração dos Níveis de Cálcio Intracelular (Ca ²⁺)	73
4.18.	Avaliação dos acidocalcisomas.....	74
4.19.	Avaliação do Perfil de Proteína por Espectrometria de Massas	75
5.	Discussão.....	77
6.	Conclusões.....	88
7.	Referências.....	89

1. Introdução

As doenças tropicais negligenciadas (DTN) são um grupo de doenças parasitárias, virais e bacterianas que afetam mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo (Buscaglia *et al.*, 2015). Dentre as principais doenças negligenciadas, as doenças parasitárias, como a doença de Chagas e a leishmaniose, apresentam alta morbidade e mortalidade (Utzing *et al.*, 2012).

As doenças negligenciadas respondem por cerca de 12% dos agravos à saúde humana e geram um grande impacto social e econômico, principalmente em regiões da África, Ásia e Américas. Por serem especialmente endêmicas em populações de baixa renda, essas doenças não recebem a atenção necessária em termos de novas terapias, vacinas e diagnósticos (Mackey *et al.*, 2014; World Health Organization, 2017). Segundo Pedrique e colaboradores (2013), dos 850 novos produtos terapêuticos aprovados entre 2000 e 2011, apenas 4% foram indicados para essas doenças.

1.1. Leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças tropicais, causadas por protozoários intracelulares que afetam mais de 12 milhões de pessoas no mundo, e estão presentes na lista de Doenças Tropicais Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2020). Atualmente, são conhecidas mais de 20 espécies do gênero *Leishmania*, pertencentes à família Tripanosomatidae (ordem Kinetoplastida). As formas clínicas principais da doença são classificadas em cutânea, muco-cutânea e visceral (Torres-Guerrero *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2019).

No Brasil, existem três principais espécies causadoras da leishmaniose cutânea: (*L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) guyanensis*) e uma única causadora da leishmaniose visceral (*Leishmania (L.) infantum*). Juntas, as leishmanioses representam um grave problema para a saúde

pública no Brasil e no mundo. Atualmente, estão presentes em 98 países com aproximadamente 1,3 milhões de novos casos por ano e 350 milhões de pessoas em situação de risco de infecção (Bush *et al.*, 2017; Uliana *et al.*, 2017; Assolini *et al.*, 2022). Somente na América Latina, aproximadamente 60 mil novos casos ocorrem todo ano (World Health Organization, 2017; Torres-Guerrero *et al.*, 2017). Dentre as DTNs, as leishmanioses estão em quarto lugar no que se refere a morbidade e segundo em mortalidade (Lee *et al.*, 2019).

1.2. Leishmaniose Visceral

1.2.1. Doença

A leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave de seu complexo de doenças. A LV é uma antroponose causada pela *Leishmania (L.) donovani* na Ásia e na África, e uma antropozoonose causada pela *Leishmania (L.) infantum* nas Américas e no Mediterrâneo (Hailu *et al.*, 2016; Ibarra-Meneses *et al.*, 2020). É uma doença sistêmica que afeta células do sistema fagocítico mononuclear do fígado, baço, linfonodos e medula óssea. Seu período de incubação varia de 2 a 6 meses e é caracterizada por manifestações clínicas como febre, perda de peso, aumento dos gânglios linfáticos, pancitopenia (diminuição de células sanguíneas) e hepatoesplenomegalia (aumento do baço e fígado) (Burza *et al.*, 2018; van Griensven e Diro, 2019). Existem mais de 70 espécies de animais considerados reservatórios destes parasitas, dentre eles, no ambiente doméstico, o cão é relatado como principal e no ambiente silvestre, raposas e marsupiais (Ministério da Saúde, 2017; Sunter e Gull, 2017).

1.2.2. Epidemiologia

A LV é altamente endêmica no subcontinente Indiano e no leste da África. São estimados que 300 mil novos casos de LV ocorram no mundo todo anualmente. Mais de 90% desses novos casos ocorrem em países como

Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul (**Figura 1**) (Alvar *et al.*, 2012; OMS, 2014; DebRoy *et al.*, 2017). Mesmo com grande parte dos casos de leishmaniose visceral americana (LVA) subnotificados, o Brasil é responsável por cerca de 90% dos casos na América Latina. No Brasil, a ocorrência era limitada a pequenos locais urbanos e a áreas rurais, mas com o decorrer dos anos, a doença se expandiu e atualmente está distribuída em quase todo o território nacional, chegando a importantes centros econômicos. Atualmente, a LV se encontra em 23 estados brasileiros, com 44,5% dos casos na Região Nordeste (Ministério da Saúde, 2020; Burza *et al.*, 2018).

O número de mortes varia entre 20 a 50 mil pessoas por ano no mundo, uma vez que a doença é fatal dentro de dois anos se não tratada e mesmo quando há o tratamento, pode levar a taxas de mortalidade de 10 a 20% (Hailu *et al.*, 2016).

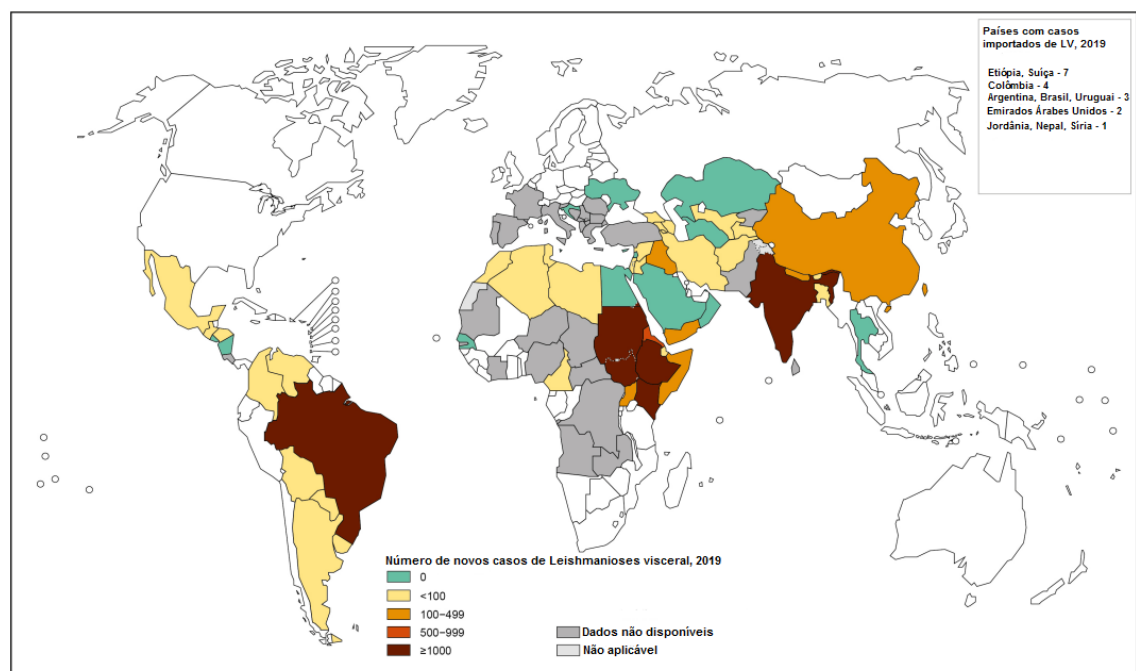


Figura 1: Mapa de distribuição de novos casos de leishmaniose visceral em 2019. Fonte: Adaptado de WHO (2021).

1.2.3. Tratamento

O tratamento da LV compreende apenas três fármacos, sendo que o antimonial foi descoberto há mais de cem anos. Dentre estes, são utilizados os antimoniais pentavalentes, anfotericina B e miltefosina; além da paromomicina que é utilizada predominantemente em combinações terapêuticas. Em geral, esses fármacos apresentam limitações como alta toxicidade, longos esquemas posológicos, administração parenteral, risco de resistência ao fármaco e alto custo de tratamento (Romero *et al.*, 2016; Akbari *et al.*, 2017). Além disso, nenhum fármaco disponível elimina completamente o parasita e, portanto, o desenvolvimento de novas quimioterapias para LV ainda se faz uma necessidade da era atual (Tiwari *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2019).

a) Antimoniais Pentavalentes

Os antimoniais (**Figura 2**) foram inicialmente utilizados para o tratamento da leishmaniose em 1911 na forma trivalente (tártaro emético) por Gaspar de Oliveira Vianna. Convertido à forma pentavalente (Sb^V), foram desenvolvidos em 1920 na Índia por Bramachari, e estão na clínica para leishmaniose cutânea e visceral há mais de 100 anos, sendo em muitos países, fármacos de primeira escolha para o tratamento de todas as formas de leishmanioses (Uliana *et al.*, 2017; Roatt *et al.*, 2020). Sua administração é pela via intravenosa ou intramuscular, e está disponível no mercado sob duas formulações: estibogluconato de sódio (Pentostam®) e antimoniato-N-metilglucamina (Glucantime®) (Neves *et al.*, 2016; Burza *et al.*, 2018).

Os efeitos adversos do Sb^V podem se manifestar como cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, pancreatite, insuficiência renal, anemia, náuseas, entre outros. Devido sua toxicidade, sua administração é realizada em ambiente hospitalar em um processo lento de infusão, na tentativa de diminuir seus efeitos adversos (Akbari *et al.*, 2017). A dose recomendada pela OMS é de 20 mg/kg/dia, com um período de administração extenso, de até 30 dias (Roatt *et al.*, 2020).

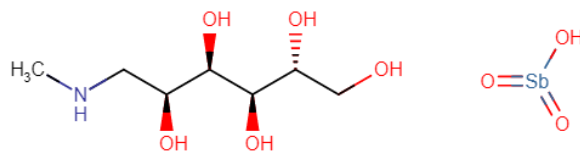


Figura 2: Estrutura do fármaco antimoniato de N-metilglucamina. Fonte: DrugBank (2022).

b) Desoxicolato de anfotericina B e sua formulação lipossomal

O desoxicolato de anfotericina B (**Figura 3**) é um antifúngico utilizado na terapia da LV, principalmente quando há pouca eficácia dos antimoniais pentavalentes, casos de comorbidades cardíacas e quando há resistência ao fármaco (Akbari *et al.*, 2017). Deve ser administrado pela via intravenosa, em doses de 1 mg/kg em 15 dias alternados, e devido à sua alta toxicidade, a infusão deve ser lenta (entre 4 – 6 horas), necessitando internação do paciente (Romero *et al.*, 2016; Uliana *et al.*, 2017). Seus efeitos adversos são: anemia, hipocalcemia, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, cardiotoxicidade, entre outros. Durante a infusão pode ocorrer náusea, febre, dores musculares e vômitos (Lindoso *et al.*, 2012; Akbari *et al.*, 2017).

A formulação lipossomal foi desenvolvida em uma tentativa de diminuir os efeitos adversos da anfotericina B, diminuindo a toxicidade e melhorando a biodisponibilidade. Essa formulação é captada pelo sistema fagocítico mononuclear, direcionando o fármaco para as células-alvo da doença. Sua desvantagem é o alto custo, dificultando a utilização em países em desenvolvimento (Akbari *et al.*, 2017; Uliana *et al.*, 2017). A administração da forma lipossomal deve ser realizada por via intravenosa por infusão lenta (4 – 6 horas) com dose de 3 mg/kg/dia por 7 dias (MS, 2006; Romero *et al.*, 2017). Os efeitos adversos são menores em relação a formulação livre, resultando em erupções cutâneas, urticárias ou ainda, insuficiência renal (Akbari *et al.*, 2017).

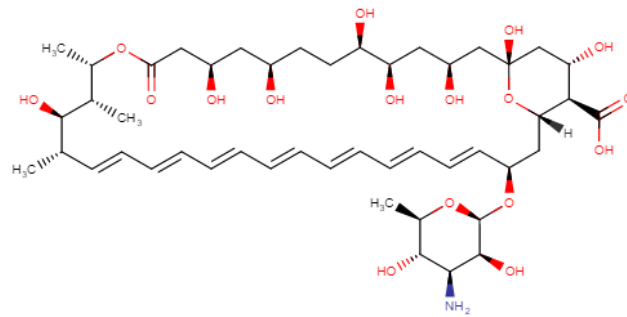


Figura 3: Estrutura do fármaco anfotericina B. Fonte: DrugBank (2022).

c) Paromomicina

A paromomicina (**Figura 4**) é um antigo antimicrobiano aminoglicosídeo, recentemente aprovado para uso no tratamento da leishmaniose. É utilizado para o tratamento tópico da leishmaniose cutânea e para tratamento sistêmico da LV em algumas regiões da Índia (Sundar and Chakravarty, 2008; Roatt *et al.*, 2020). A administração intramuscular ocorre com doses de 15 mg/kg/dia por 21 dias. Porém, o desenvolvimento de resistência a fármacos, bem como efeitos adversos como ototoxicidade, nefrotoxicidade e disfunção hepática, têm sido desvantagens comuns para o uso desse fármaco (Bekhit *et al.*, 2018).

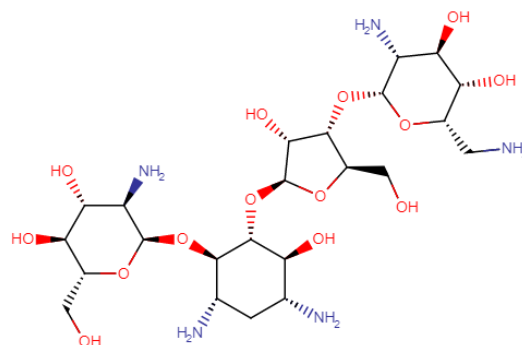


Figura 4: Estrutura do fármaco paromomicina. Fonte: DrugBank (2022).

d) Miltefosina

A miltefosina (**Figura 5**) foi inicialmente sintetizada como parte de um programa de anti-inflamatórios pela empresa inglesa Borroughs Wellcome em 1982 (Croft e Engel, 2006) e apresentou atividade contra leishmania

pela primeira vez na década de 1980 (Croft *et al.*, 1987; Sundar e Olliaro, 2007; Uliana *et al.*, 2017). Apesar de ainda não estar disponível no Brasil para o tratamento da LV, é o primeiro e único fármaco de administração oral aprovado na Índia, reduzindo a necessidade de internação para o tratamento e diminuindo custos hospitalares (Vacchina *et al.*, 2016; Akbari *et al.*, 2017; Uliana *et al.*, 2017). Por apresentar efeito teratogênico, não deve ser administrado em gestantes e lactantes. A dose recomendada é de 2,5 mg/kg/dia durante 28 dias (Bekhit *et al.*, 2018). Seus efeitos adversos são vômito, diarreia, toxicidade gastrointestinal, hepática e renal, mas são considerados gerenciáveis (Akbari *et al.*, 2017; Uliana *et al.*, 2017). Após uma década de uso, relatos de resistência à miltefosina foram observados, reduzindo a eficácia desse fármaco e aumentando a taxa de recidivas (Roatt *et al.*, 2020).

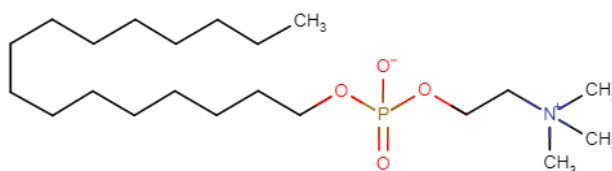


Figura 5: Estrutura do fármaco miltefosina. Fonte: DrugBank (2022)

1.3. *Trypanosoma cruzi*

1.3.1. Doença

A doença de Chagas é uma infecção parasitária causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) originalmente endêmico na América Latina e no sul dos Estados Unidos da América com aproximadamente 7 milhões de pessoas infectadas e 70 milhões em risco (Moretti *et al.*, 2019). Os movimentos migratórios da população contribuíram para sua disseminação e aumento de casos no mundo inteiro, levantando uma questão emergente de saúde pública global (Coura e Viñas, 2010). É transmitido por insetos triatomíneos ao homem por meio do contato com fezes ou urina do inseto no local da picada, os tripomastigotas metacíclicos liberados nas fezes durante a ingestão sanguínea entram no

hospedeiro mamífero através de feridas na pele ou pelas mucosas e invadem as células circundantes (Moretti *et al.*, 2019; Jansen *et al.*, 2018).

A doença tem uma fase aguda caracterizada por picos de parasitemia, mas geralmente é ausente ou oligossintomática, dificultando o diagnóstico. Os primeiros sinais visíveis de infecção podem ser uma lesão na pele e / ou um edema palpebral, conhecido como sinal de Romaña. A fase crônica se estabiliza quando a maioria dos parasitas se localiza dentro de células, principalmente cardíacas (cardiomiopatia), músculos digestivos (megacólon, megaesôfago), podendo causar inclusive, distúrbios neurológicos (Rassi e Rezende, 2012). A infecção pode levar à morte súbita, principalmente por arritmia cardíaca ou insuficiência cardíaca em estágios crônicos avançados (Rassi *et al.*, 2012; OMS, 2017).

1.3.2. Epidemiologia

Inicialmente, a doença de Chagas era restrita a áreas rurais desfavorecidas da América do Sul e Central, sendo endêmica na Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Uruguai e Venezuela. Com os recentes fluxos de imigrantes de países endêmicos para países desenvolvidos, a doença de Chagas se espalhou, fazendo com que se tornasse um importante problema de saúde nos EUA, Canadá, Europa e no oeste do Pacífico (**Figura 6**), onde um número crescente de indivíduos infectados foi identificado (Rassi *et al.*, 2010; WHO, 2017).

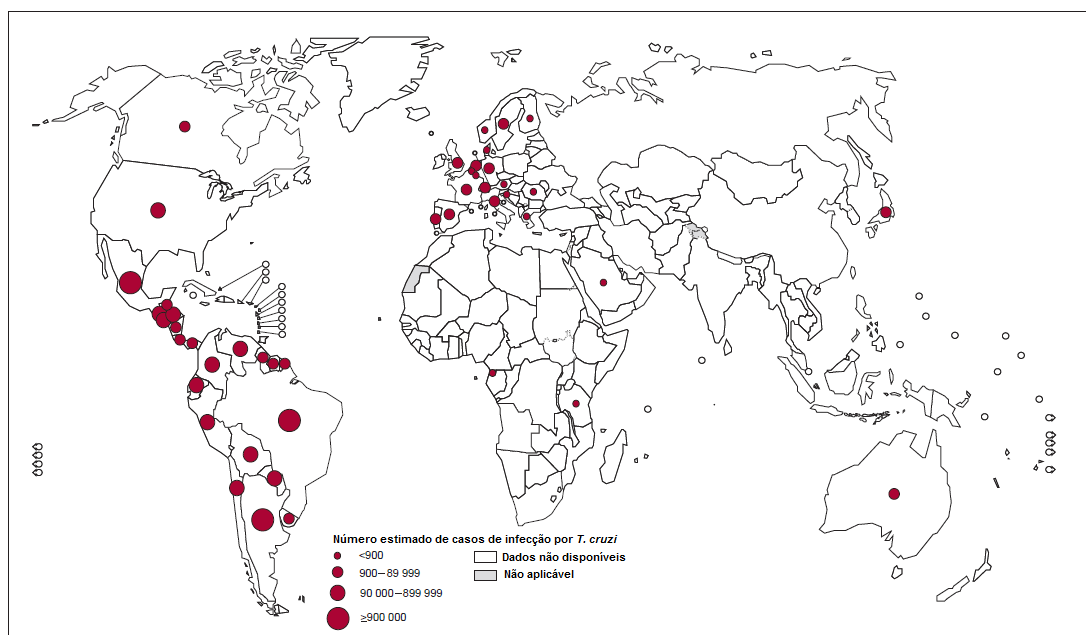


Figura 6: Mapa de distribuição do número de casos de infecção por *Trypanosoma cruzi* em 2018. Fonte: Adaptado de WHO (2021).

1.3.3. Tratamento

Os únicos fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas foram descobertos há mais de 50 anos atrás, benznidazol e nifurtimox, ambos tóxicos e com eficácia reduzida na fase crônica da doença (Brum-Soares *et al.*, 2016). Além disso, ambos os fármacos requerem tratamento de longo prazo, e apresentam diversos efeitos colaterais, podendo levar a descontinuidade do tratamento (Bermudez *et al.*, 2016).

Não existe vacina contra a doença de Chagas, dessa forma, o controle do vetor tem sido o método de prevenção mais eficaz na América Latina. A triagem de sangue como controle de qualidade laboratorial é necessária para prevenir a infecção por *T. cruzi* por meio de transfusão sanguínea e transplante de órgãos (Saez-Alquezar *et al.*, 2015; OMS, 2017).

a) Benznidazol (BZN)

Benznidazol (**Figura 7**) é um nitroimidazol, que foi introduzido para tratamento da doença de Chagas em humanos em 1971. No Brasil, é o

único medicamento disponível, com taxa de cura na fase aguda de 70–80% e apenas 10–20% na infecção crônica (Coura e Viñas, 2010, Izume *et al.*, 2011; Brum-Soares *et al.*, 2016; Urbina e Docampo, 2003). Em 2015 foi publicado o maior estudo clínico randomizado para avaliar o efeito do BZN na doença de Chagas, projeto este, conhecido como BENEFIT. O estudo concluiu que, apesar do fármaco reduzir a parasitemia, não preveniu os danos cardíacos (Morillo *et al.*, 2015), levando a entidade Drugs for Neglected Disease *initiative* (DNDi) a publicar uma nota para reforçar a gravidade da descoberta, solicitando urgentemente à comunidade científica e governos, novas terapias (Pecoul *et al.*, 2016).

O BZN atua como um pró-fármaco, sendo ativado dentro do parasita pela enzima nitroreductase tipo I, resultando na geração de um metabólito citotóxico glioxal que se liga com a guanosina e, assim, evita a formação de novas cadeias de DNA, promovendo a eliminação do parasita em hospedeiros infectados (Pérez-Molina *et al.*, 2020; García-Huertas e Cardona-Castro, 2021).

O BZN é absorvido pelo trato gastrointestinal, e sua eliminação é predominantemente renal. Apresenta biodisponibilidade oral de mais de 90%, com meia-vida plasmática terminal de 12 horas (Pérez-Molina *et al.*, 2020).

A administração recomendada é de 5 mg/kg/dia por 60 dias. Os efeitos adversos incluem anorexia, náusea, vômito, cefaleia, depressão, vertigem, convulsões, parestesia e dermatite (Pérez-Molina *et al.*, 2020; García-Huertas e Cardona-Castro, 2021).

Novos estudos estão sendo realizados na tentativa de coletar informações sobre segurança e eficácia em possíveis regimes de tratamento com menor duração ou menor dosagem de benznidazol. Alvarez e colaboradores, em 2020, publicaram um estudo mostrando que 82% dos pacientes tratados com um esquema de doses mais baixas de benznidazol se mantiveram com PCR negativo após 36 meses de acompanhamento. Ainda são

necessários mais estudos com regimes curtos de benznidazol para verificar se a eficácia será semelhante ao regime atual (Torrice *et al.*, 2021).

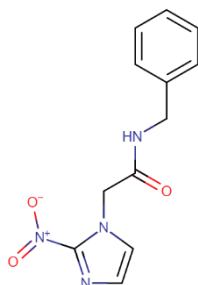


Figura 7: Estrutura do fármaco benznidazol. Fonte: DrugBank (2022).

b) Nifurtimox (NFX)

O nifurtimox (**Figura 8**) é um derivado do nitrofurano usado pela primeira vez em 1969. Também atua como pró-fármaco, sendo ativada dentro do parasita pela enzima nitroredutase que, na presença de oxigênio, produz radicais livres tóxicos para o *T. cruzi*. Assim como o benznidazol, essa enzima também bloqueia a síntese de DNA, acelerando sua degradação (Pérez-Molina *et al.*, 2020; García-Huertas e Cardona-Castro, 2021).

O NFX é absorvido pelo trato gastrointestinal, sendo metabolizado pelo fígado por meio do citocromo P-450. Possui meia vida plasmática terminal de 3 horas (Pérez-Molina *et al.*, 2020).

Efeitos adversos incluem anorexia, náusea, vômito, cefaleia, depressão, convulsão, vertigem, parestesia, dermatite, distúrbios digestivos e neurológicos, febre, ansiedade e insônia (Pérez-Molina *et al.*, 2020).

Devido sua toxicidade, seu uso foi descontinuado e sua comercialização suspensa no Brasil, Argentina, Chile e Uruguai no início dos anos 80. Porém, devido à falta de alternativas, sua indicação pode ser mantida como um tratamento de segunda linha na falha terapêutica do benznidazol (Pérez-Molina *et al.*, 2020; García-Huertas e Cardona-Castro, 2021).

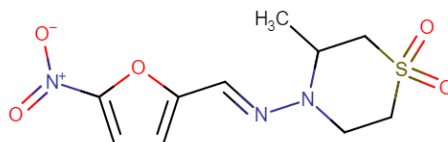


Figura 8: Estrutura do fármaco nifurtimox. Fonte: DrugBank (2022).

1.4. Produtos Naturais como Protótipos Farmacêuticos

Desde os primórdios da medicina, substâncias químicas derivadas de plantas, microrganismos, animais e organismos marinhos vêm sendo amplamente utilizadas para o tratamento de doenças (David *et al.*, 2015).

Aproximadamente 50% de todos os fármacos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) apresentam em suas estruturas protótipos naturais (**Figura 9**) (Newman e Cragg, 2020). Um dos exemplos mais clássicos é a penicilina, que foi isolada do fungo *Penicillium notatum*; muitos outros fármacos amplamente utilizados na clínica, também se basearam em produtos naturais, como: i) aciclovir, proveniente de espoja marinha; ii) artemisinina e a quinina com protótipos extraídos de plantas; e iii) anfotericina B e a paromomicina, isoladas de microrganismos, ambas utilizadas para o tratamento das leishmanioses (Bauer e Bronstrup, 2014; David *et al.*, 2015; Harvey *et al.*, 2015)

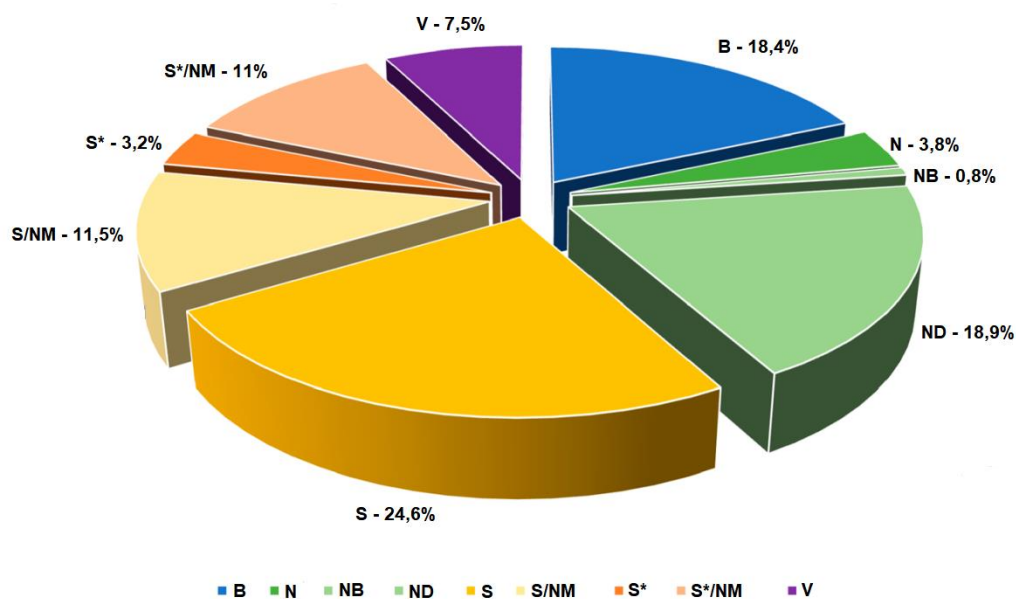


Figura 9: Distribuição das fontes de 1881 fármacos desenvolvidos no período de 1981 a 2019 (em porcentagem). **B** – macromolécula biológica; **N** – produto natural; **NB** – extrato botânico; **ND** – derivado de produto natural (semissintético); **S** – fármaco sintético; **S/NM** – fármaco sintético semelhante ao produto natural; **S*** - fármaco sintético com farmacóforo de produto natural; **S*/NM** – fármaco sintético com farmacóforo de produto natural semelhante ao produto natural; **V** – vacina. Fonte: Adaptado de Newman e Cragg, 2020.

1.4.1. Organismos Marinhos

A grande complexidade química dos produtos naturais marinhos pode ser explicada pelo fato de que a vida na Terra teve sua origem quase que inteiramente na água, juntamente com a evolução das formas de vida aquática (Netz e Opatz, 2015).

Estima-se que a biodiversidade global total inclua 5×10^8 espécies de organismos procarióticos e eucarióticos no mundo, sendo que os oceanos cobrem mais de 70% da Terra (Álvarez-Bardón *et al.*, 2020). Assim, o ambiente marinho é um reservatório de vida extremamente diverso, contendo cerca de 250.000 espécies conhecidas. Dessa forma, é considerado um lugar único para descoberta de novas fontes de protótipos de fármacos. No ambiente marinho, existe uma competição severa pela sobrevivência, bem como pressão ambiental. Dessa forma, se faz necessário a produção de metabólitos secundários para a

sobrevivência, principalmente em ambientes extremos com elevadas/baixas temperatura, salinidade, pressão e alta taxa de predação (Khalifa *et al.*, 2019).

Organismos marinhos vêm sendo utilizados para fins medicinais desde os tempos antigos em países como Índia e China, e também no Oriente Médio e Europa; ainda assim, somente 5% dos oceanos foram explorados (Ramirez-Llodra *et al.*, 2010; Sithranga & Kathiresan, 2010).

Devido a sua enorme quimiodiversidade, os produtos naturais marinhos têm atraído muita atenção da ciência. Compostos químicos isolados de produtos naturais marinhos vem apresentando potencial para diversas doenças, como câncer, doenças infecciosas, microrganismos multirresistentes, doenças cardiovasculares e esclerose múltipla. Compostos isolados de organismos marinhos apresentam características estruturais únicas e complexas, podendo ser usadas como protótipos na pesquisa de descoberta de fármacos (Wibowo *et al.*, 2021).

Dentre os organismos marinhos mais explorados para estudos de seus metabólitos bioativos encontram-se esponjas, tunicados, corais e moluscos. Microrganismos como actinomicetos, fungos, dinoflagelados, cianobactérias e bactérias marinhas, associados a organismos marinhos, também produzem diversos metabólitos bioativos. A esponja *Cryptotethya crypta* foi o primeiro organismo marinho a ser investigado quimicamente pelos pesquisadores Bergmann e Feeney, que em 1951, fizeram o isolamento e identificação da citosina arabinosídeo (ara-C), que hoje é utilizada no tratamento de leucemia (Khalifa *et al.*, 2019).

Dentre os diversos compostos provenientes de organismos marinhos já existentes, é possível encontrar fármacos com diversos usostratamento câncer, infecções virais, antioxidantes, entre outros. Medicamentos de origem marinha (**Figura 10**) para o tratamento de câncer incluem Adcetris® (Brentuximab vedotin), Halaven® (Eribulina), Yondelis® e Cytosar-u® (Citarabina). O principal componente do Adcetris® é um peptídeo, originalmente isolado do molusco marinho *Dolabella auricularia*.

O composto halicondrina B, isolado da esponja *Halichondria okadai*, originou o fármaco Halaven®, amplamente utilizado para o tratamento de mama. Yondelis®, um produto natural marinho isolado do tunicado *Ecteinascidia turbinata*. Cytosar-u®, desenvolvido para tratar diferentes formas de leucemia, foi isolado da esponja *Cryptotheca crypta* (Khalifa *et al.*, 2019; Álvarez-Bardón *et al.*, 2020).

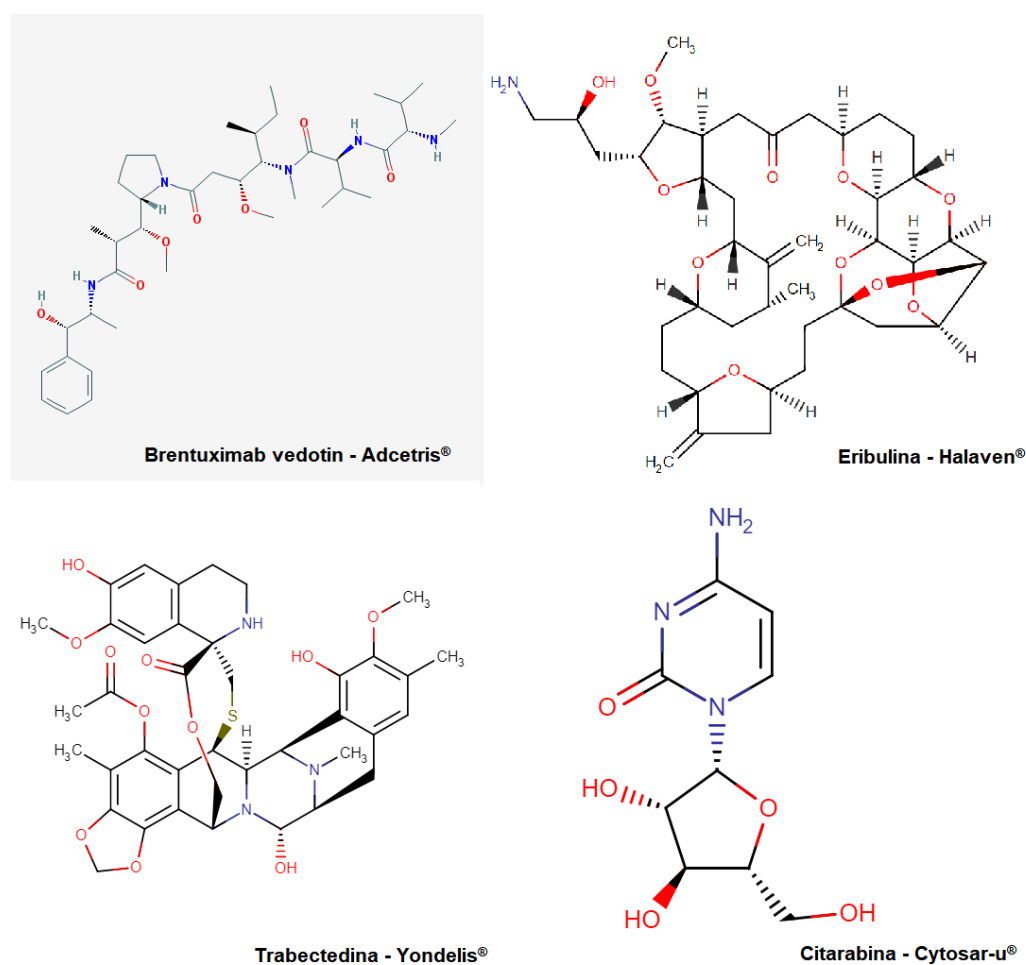


Figura 10: Estruturas de fármacos aprovados, isolados de produtos naturais marinhos. Fonte: DrugBank (2022).

1.4.2. *Tubastraea tagusensis*

Os invertebrados marinhos, entre eles os corais, são importantes fontes para descoberta de novos protótipos com potencial para fármacos.

Tubastraea tagusensis é um coral da ordem Scleractinia que secreta um esqueleto de carbonato de cálcio capaz de fornecer defesa contra

possíveis predadores (**Figura 11**). A introdução desses corais azooxantelados (Dendrophyllidae) ocorreu por meio de incrustações em plataformas de óleo e gás trazidas para a Bacia de Campos, na região norte do estado do Rio de Janeiro, na década de 1980. Atualmente, o coral está distribuído em mais de 3.500 km da costa brasileira, aderido em substratos naturais e artificiais (Zanotti *et al.*, 2020).

O sucesso de sua invasão e adaptação está relacionado à rápida taxa de crescimento, idade reprodutiva precoce, liberação de larvas clonais durante todo ano, alta capacidade regenerativa e falta de competidores / predadores nativos. Dessa forma, são uma ameaça à organismos endêmicos das regiões invadidas, dentre os organismos ameaçados, destaca-se o coral endêmico *Mussismilia hispida*, coral cérebro (Scleractinia, Mussidae), as interações entre essas espécies geram efeitos adversos, como necrose tecidual de *M. hispida* (Carpes *et al.*, 2020; Zanotti *et al.*, 2020).

A produção de metabólitos secundários contribui para essa estratégia, sendo responsável por baixas taxas de predação por peixes e evitando a incrustação de outros organismos marinhos na competição por espaço no substrato (Carpes *et al.*, 2020). Essas substâncias são de particular interesse, pois podem ter considerável potencial farmacológico (Sampaio *et al.*, 2012; Lages *et al.*, 2012; Carpes *et al.*, 2020). *Tubastraea* spp. são conhecidos por serem fontes de ácidos graxos, esteróis, macrolídeos polioxazol e alcaloides (Maia *et al.*, 2014; Carpes *et al.*, 2020).

Além disso, o IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) possui um plano nacional de prevenção, controle e monitoramento do Coral-sol (*Tubastraea* spp.) no Brasil, a fim de com o intuito de controlar o crescimento dessa espécie invasora, mitigando o impacto sobre a biodiversidade brasileira (IBAMA, 2018).



Figura 11: Colônias do coral *Tubastraea tagusensis*. Fonte: Alexandre Ornellas, ICMBio.

1.4.3. Alcaloides Marinhos

Os alcaloides constituem uma das maiores classes de produtos naturais, e são sintetizados por plantas, microrganismos, organismos marinhos, insetos e animais, compreendendo um extenso e importante grupo de metabólitos secundários (Tempone *et al.*, 2021). Essa classe de compostos evoluiu como um mecanismo de defesa química contra predadores, sendo frequentemente moléculas altamente potentes e tóxicas. Esses compostos, apresentam bases nitrogenadas e anel heterocíclico em sua estrutura (Kochanowska-Karamyan e Hamann, 2010; França *et al.*, 2014; Netz e Opatz, 2015; Tempone *et al.*, 2021).

Os alcaloides são amplamente distribuídos, principalmente, em plantas pertencentes às famílias *Apocynaceae*, *Loganiaceae*, *Rubiaceae* e *Nyssaceae*. No ambiente marinho, também já foram descritos em esponjas, algas e moluscos. Segundo a literatura, os alcaloides são conhecidos por apresentar atividade anti-hipertensiva (Sagi *et al.*, 2016), antitumoral (El-Sayed e Verpoorte, 2007), atividade contra doenças neurológicas (Kochanowska-Karamyan e Hamann, 2010) e atividade antiprotozoária (Tempone *et al.*, 2021). Considerando sua ampla

distribuição nos invertebrados marinhos e seu potencial farmacológico, os alcaloides podem ser utilizados como possíveis candidatos terapêuticos para doenças parasitárias tropicais. De acordo com a classificação da estrutura química (**Figura 12**), eles podem ser divididos em alcaloides piperidínicos, alcaloides quinolínicos, alcaloides isoquinolínicos, alcaloides indólicos, alcaloides esteroides, entre outros (Liu *et al.*, 2019).

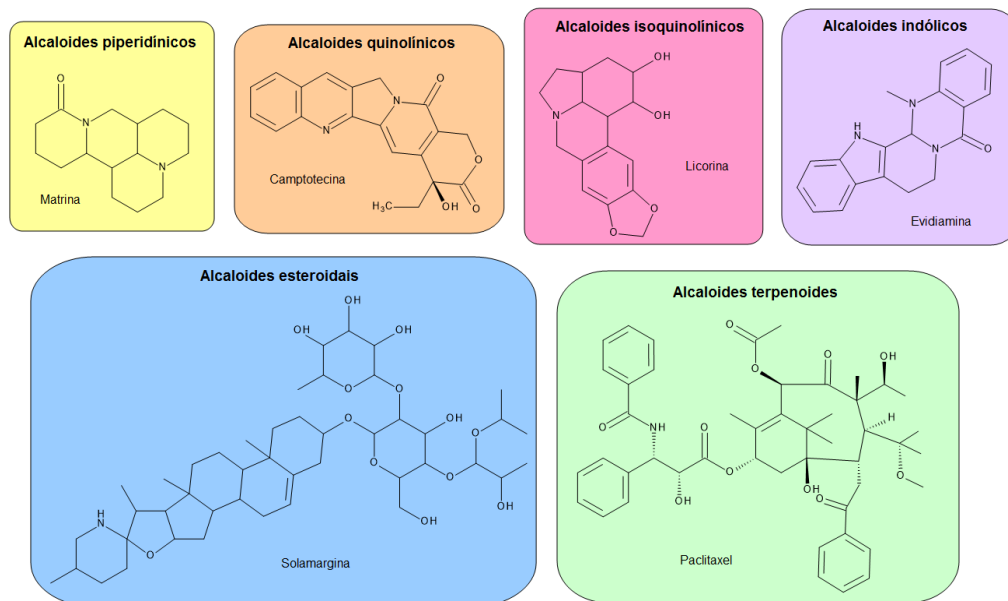


Figura 12: Exemplos da estrutura química de alcaloides. Fonte: Adaptado Liu *et al.*, 2019.

Os alcaloides derivados de organismos marinhos, especialmente os alcaloides indólicos, exibem uma infinidade de atividades biológicas, como atividades antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias, antiparasitária, antimalárica e antiviral (Wibowo *et al.*, 2014).

Os alcaloides indólicos são compostos orgânicos cíclicos contendo nitrogênio e um núcleo indol. Esse núcleo indol é um dos sistemas de anéis mais importantes da natureza, sendo considerado uma “estrutura privilegiada” quando se trata do desenvolvimento de fármacos (Wibowo *et al.*, 2021; Hu *et al.*, 2021).

Geralmente, os alcaloides indólicos podem ser classificados em quatro grupos: alcaloides indólicos simples, indol prenilados, bis/tris indol e indol anelados (**Figura 13**) (Wibowo *et al.*, 2022).

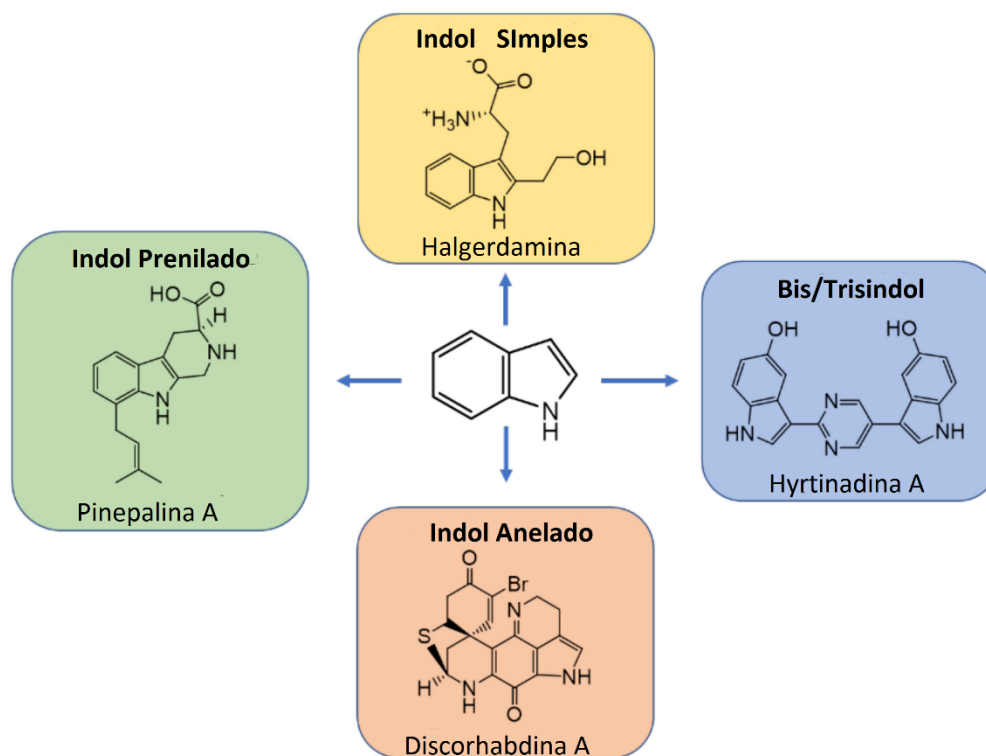


Figura 13: Classificação de alcaloides indólicos. Fonte: adaptado de Wibowo *et al.*, 2022.

Os alcaloides indólicos simples são derivados principalmente do aminoácido triptofano ou de seu precursor direto. Os alcaloides indólicos prenilados representam um grande subgrupo dos alcaloides indólicos e fornecem várias atividades biológicas potentes, possuindo ampla distribuição em organismos terrestres e marinhos. Os alcaloides bis e trisindol são derivados de dois ou três núcleos indol; essa classe apresenta diversas atividades biológicas, como atividades antivirais, antitumorais, antibacterianas e anti-inflamatórias, sendo protótipos promissores para o desenvolvimento de fármacos. Nos alcaloides indólicos anelados, um único núcleo indólico é fundido a outros sistemas de anéis (hetero)cíclicos que não são derivados de prenil (Netz e Opatz, 2015; Wibowo *et al.*, 2022).

1.5. Justificativa

A terapia em uso clínico para o tratamento da leishmaniose é a mesma desde o século passado, com alto custo, dificuldade de administração, esquemas posológicos longos, e com severos efeitos colaterais, resultando no abandono precoce do tratamento, incluindo o aparecimento de resistência aos fármacos. Já o tratamento da doença de Chagas apresenta um único fármaco no Brasil, com efeitos adversos significativos, tratamento longo e a baixa eficácia na fase crônica da doença. Dessa forma, a busca por alternativas terapêuticas menos tóxicas e mais eficazes, se faz essencial para o tratamento de pacientes com doenças causadas por esses protozoários.

2. Objetivos

2.1. Geral

Avaliar o potencial antiparasitário de metabólitos secundários isolados a partir de colônias do coral *Tubastraea tagusensis*.

2.2. Específicos

- a) Fracionar por estudo biomonitorado, metabólitos secundários de colônias do coral *Tubastraea tagusensis* para isolamento de compostos ativos contra *Leishmania (L.) infantum* e *Trypanosoma cruzi*.
- b) Isolar e purificar os compostos ativos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e caracterizar quimicamente o composto mais ativo, através de técnicas de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas.
- c) Avaliar, *in vitro*, a concentração efetiva 50% em formas amastigotas intracelulares e promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*, e tripomastigotas e amastigotas intracelulares de *Trypanosoma cruzi* do composto isolado.
- d) Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do composto ativo em células de mamífero NCTC clone L929, determinando os respectivos índices de seletividade.
- e) Realizar estudos de mecanismos de ação antiparasitário do composto ativo, avaliando: **i)** a permeabilidade da membrana plasmática, **ii)** o potencial elétrico da membrana mitocondrial, **iii)** níveis de cálcio, **iv)** níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS); **v)** níveis de ATP; **vi)** pH de acidocalcisomos; **vii)** perfil protéico.

3. Material e Métodos

3.1. Reagentes

Sytox® Green, 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazólio (MTT), 2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA), iodeto de 5,5', 6,6'-tetracloro-1,1', 3,3'-tetraetilbenzimidazolil carbocianina (JC-1), ATP Determination Kit e fluo-4 AM foram adquiridos da Molecular Probes® (Invitrogen™). Soro fetal bovino (SFB) foi obtido da Gibco e sulfato de gentamicina da Hipolabor Farmacêutica. Todos os outros reagentes não mencionados foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

3.2. Animais de experimentação

Hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) machos e camundongos BALB/c (*Mus musculus*) fêmeas foram obtidos do biotério do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (IAL). Os animais foram mantidos em caixas esterilizadas com material absorvente, em um ambiente com temperatura e umidade controladas, recebendo água e alimento *ad libitum*.

Para manutenção do parasita *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/LD), os hamsters foram infectados, pela via intraperitoneal, com 1×10^8 amastigotas/animal, extraídas e purificadas do baço de um hamster previamente infectado. Após 90 dias da infecção, os animais foram eutanasiados para obtenção e purificação de novos amastigotas. Camundongos BALB/c fêmeas foram utilizados para obtenção de macrófagos peritoneais.

Todos os procedimentos realizados com animais tiveram aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz/Instituto Pasteur (CEUA IAL 05/2018).

3.3. *Leishmania (L.) infantum*

As formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/LD) foram cultivadas em meio M-199 suplementado

com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado, 0,25% de hemina, sob a temperatura de 24°C em estufa BOD, livre da adição de antibióticos.

As formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum* foram obtidas a partir de centrifugação diferencial do baço de hamsteres previamente infectados. O número de parasitas foi determinado pelo método descrito por Stauber e colaboradores (1958), 60 a 70 dias pós-infecção.

3.4. *Trypanosoma cruzi*

Formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram cultivadas em células LLC-MK2 com meio RPMI-1640, suplementado com 2% de SFB a temperatura de 37° C em estufa com 5% CO₂ (Kesper *et al.*, 2000; Reimão *et al.*, 2008).

As formas intracelulares de *T. cruzi* foram obtidas através da infecção de tripomastigotas em macrófagos peritoneais em uma proporção de 10:1 (parasitas/macrófagos), incubadas por 2 horas (da Costa-Silva *et al.*, 2021).

3.5. Células de mamífero

Para a cultura de células de mamíferos foi utilizado meio RPMI-1640 suplementado com NaHCO₃ (24 mM) e sulfato de gentamicina (20 µg/mL), em pH 7,2.

Fibroblastos de tecido conjuntivo de camundongos(NCTC clone L929 - ATCC® CCL-1™; e células LLC-MK2), foram fornecidos pela Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz-SP e mantidos em meio RPMI-1640 com 10% de SFB em estufa a 37°C com 5% de CO₂ (Amaral *et al.*, 2019).

Macrófagos peritoneais foram coletados por meio da lavagem da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c fêmeas com meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB (Romanelli *et al.*, 2019).

3.6. Coleta da *Tubastraea tagusensis*

A coleta de colônias do coral-sol, *Tubastraea tagusensis* (**Figura 14**) foi realizada na região de Ilha Bela, juntamente com o Prof. Alvaro Migotto, do Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMar - USP), nos dias 04 e 05 de novembro de 2019 (**Figura 15**).

As colônias foram coletadas na região do Farol do Moleque (S 23°49'40,.7" W045°24'44.7").

Posteriormente, essas colônias foram separadas do substrato com o auxílio de uma talhadeira, identificadas e pesadas para dar início à extração dos metabólitos.



Figura 14: Colônia do coral-sol (*Tubastraea tagusensis*). Fonte: Marcelo Visentini Kitahara - Cifonauta - Cebimar.

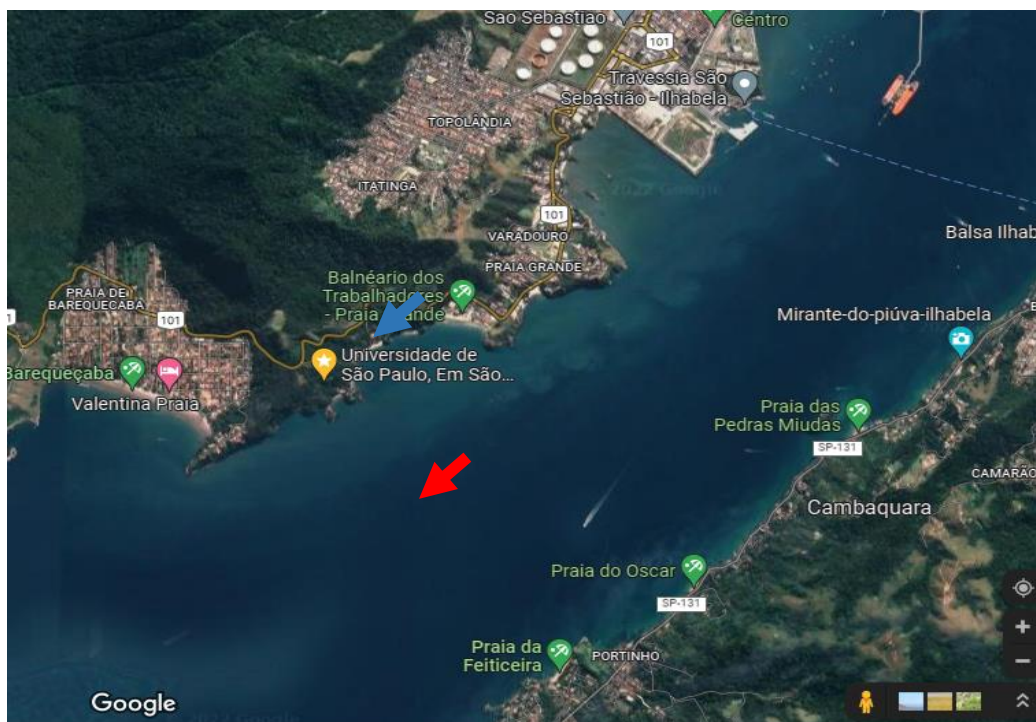


Figura 15: Mapa da região da Universidade de São Paulo, Centro de Biologia Marinha (seta azul - CEBIMAR), em São Sebastião, onde foram realizadas as coletas do coral *Tubastraea tagusensis* (seta vermelha- Farol do Moleque) Fonte: Google Maps.

3.7. Obtenção dos extratos orgânicos (metabólitos secundários)

No total, foram coletados, aproximadamente, 2 quilogramas de colônias isoladas da *T. tagusensis* que foram processadas em triturador juntamente com 8 litros de metanol. Essa mistura ficou identificada como extrato bruto em metanol (ExMeOH), e posteriormente foi reduzida à secura em evaporador rotativo e o material armazenado à -20°C.

3.7.1. Obtenção de metabólitos secundários a partir da partição líquido-líquido

Para a obtenção de metabólitos secundários ativos da *T. tagusensis*, foi adicionado água Mili-Q ao extrato bruto (ExMeOH) e esse foi submetido a partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente: n-hexano, acetato de etila e butanol (1:1, v/v). Essa partição resultou em três frações: fração em hexano (FrHex), fração em acetato etila (FrAcOEt) e fração em butanol (FrBut) como mostra na **Figura 16**.

Essas frações foram concentradas em evaporador rotativo, pesadas, dissolvidas em metanol, diluídas serialmente em meio de cultura M199 e RPMI 1640 e testadas contra os parasitas *L. (L.) infantum* e *Trypanosoma cruzi* na concentração de 200 µg/mL. Ao mesmo tempo, foi separado 1 mg de cada fração e enviado para o laboratório de Prof. João H.G. Lago, da Universidade Federal do ABC (UFABC), para que fossem feitas análises de Ressonância Magnética Nuclear.

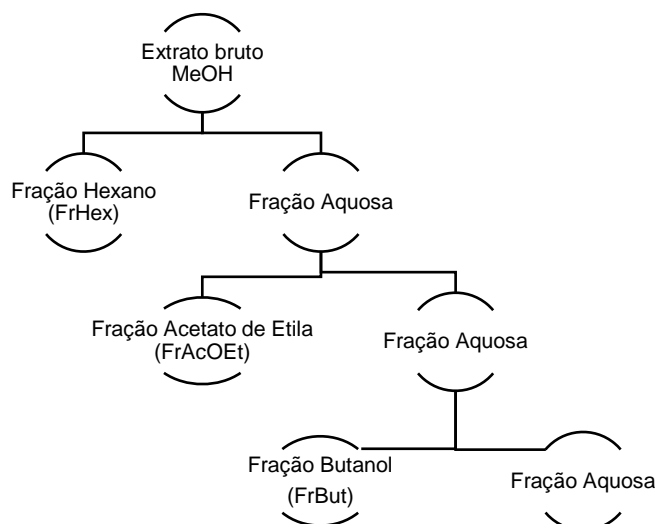


Figura 16: Esquema da partição líquido-líquido da *Tubastraea tagusensis*.

3.7.2. Fracionamento cromatográfico utilizando Sephadex LH-20

A partir do resultado do ensaio de bioatividade das frações e da análise de ressonância magnética nuclear, demos início ao isolamento e purificação da fração acetato de etila (FrAcOEt), fração esta, que apresentou a maior potência, como também que apresentava compostos de média polaridade

Este material foi submetido ao fracionamento cromatográfico utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionária em uma coluna de vidro de 2,4 x 70 cm, utilizando uma solução de MeOH e AcOEt (1:1 v/v) como fase móvel. Foi utilizado uma bomba peristáltica com um fluxo de 90 mL/h à

uma temperatura 21°C. As frações foram coletadas a um volume de 5 mL cada em tubos de vidro.

De cada fracionamento, foram obtidas 90 frações que, após evaporação dos solventes, foram reunidas por similaridade, a partir da técnica de cromatografia de camada delgada (CCD).

3.7.3. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As análises por CCD das frações coletadas pela Sephadex LH-20, foram efetuadas utilizando placas de sílica gel com indicadores de fluoresceína (Merck). Como fase móvel foram utilizados os solventes metanol e acetato de etila (1:1 v/v).

A revelação e visualização das bandas foi realizada em câmara com luz ultravioleta (254 nm) e utilização de sulfato cérico, seguido de aquecimento a 100°C para revelação. A partir dessa análise, as frações foram reunidas em 6 grupos.

3.7.4. Desrepliação através da Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Uma alíquota (1 mg) de todos os extratos, e de cada fração obtida, foram encaminhados para o laboratório do Professor João Lago, na Universidade Federal do ABC, e foram submetidas à análise por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H). Os espectros das RMN de ^1H da FrAcOEt sugeriram presença de compostos aromáticos e possivelmente, alcaloides.

Os espectros de RMN de ^1H foram registrados em espectrômetro Varian INOVA 500, operando a 500 e 125 MHz, na Central Experimental Multiusuário da UFABC – campus Santo André.

3.7.5. Pré-fracionamento em cartucho de extração em fase sólida (SPE) C18

Foi realizada a análise das frações por Ressonância Magnética Nuclear, visando a seleção de frações que apresentassem sinais correspondentes a anéis aromáticos.

Esse material foi submetido à separação em cartucho de extração em fase sólida Sep-Pak C18 (1 g) utilizando água/metanol em diferentes proporções (1:0; 1:1, 0:1 v/v). Os analitos foram coletados em frações de 10 mL cada, reduzidos em evaporador rotativo e posteriormente testados contra os parasitas conforme descrito.

3.7.6. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Após a passagem pelo cartucho de extração em fase sólida, foi realizada a CLAE da fração ativa. Para obtenção do melhor perfil de separação, colunas analíticas de diferentes fases, dentre estas, ciano, C4, C8, C18 e fenil, foram testadas em sistema CLAE com duas bombas AT e sistema de detecção por arranjo de diodos (Shimadzu Corporation-Japão). Foi selecionada a coluna C18 ACE (250 x 4,5 mm 5 µm). A **FrAcOEt 5** foi diluída em metanol (MeOH) e aplicada na coluna (100 µL). A eluição dessa fração foi acompanhada em uma faixa de 200-800 nm. O fluxo utilizado foi de 1 mL/min, em gradiente de MeOH (solvente B) em água (solvente A) utilizando variando de 50-100% em 30 minutos.

Foram coletadas 9 frações, posteriormente submetidas a análise em ¹H RMN pelo Prof. João Lago (UFABC). A fração **V**, com sinais característicos de composto aromático, foi refractionada em uma coluna C4 (ACE, dimensões 250 x 4,6 mm, 5 µm). A fração **V** foi diluído em MeOH e aplicado na coluna (20 µL). O fluxo utilizado foi de 1mL/min, em gradiente de AcOEt (solvente B) em água (solvente A) varaindo de 35 a 100% em 20 minutos. Dessa análise foram coletadas seis frações.

3.7.7. Elucidação Estrutural

A fração ativa, denominada **V'** foi analisada em cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas de alta resolução (CLAE-HRMS) no Instituto Adolfo Lutz. Foi aplicada uma solução de 1 µg/mL da fração **V'**, dissolvida em MeOH. Para o HRMS foi utilizado um fluxo de 5 µL/min, fonte de ionização HESI (electrospray aquecido – fonte de ionização por eletro nebulização com aquecimento), taxa de fluxo do gás foi de 5 unidades arbitrárias com temperatura de 50°C. A temperatura do capilar foi de 320°C, com voltagem de 4.50 kV.

Já as condições cromatográficas foram: solução aquosa de formiato de amônio 5mM e ácido fórmico 0,1% (v/v) (Fase A) e solução metanólica de formiato de amônio 5mM e ácido fórmico 0,1% (v/v) (Fase B). A coluna utilizada foi coluna Hypersil Gold aQ C18 (50 x 2.1 mm) com partícula de 1,9 µm, com gradiente do fluxo de 0,3 mL/min.

Também foi utilizada RMN de ¹³C, com a colaboração do Prof. Luiz Octavio Regasini, do Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos, da Universidade Estadual Paulista (Unesp) de São José do Rio Preto. Os espectros de ¹³C NMR, HSQC, HMQC, HMBC, DEPT-90, DEPT-135 e NOESY 2D foram analisados no aparelho Bruker Avance III 14.1 T, Bruker Avance III 9.4 T e Bruker Fourier 7.1 T espectômetros, utilizando metanol deuterado como solvente e TMS como controle interno. Os deslocamentos químicos (δ) e os constantes de acoplamento (J) foram expressos em ppm e Hz, respectivamente. Multiplicidades foram reportadas como singleto (s), duplete (d), duplete de duplete (dd), tripleto (t), quarteto (q), dopleto tripleto (dt) e multiplete (m).

3.8. Determinação *in vitro* da atividade antiparasitária e concentração efetiva 50% (CE₅₀)

O composto isolado foi dissolvido em DMSO na concentração de 30 mM. Após este procedimento, foi diluído em meio de cultura e incubado com

os parasitas em diferentes concentrações com o objetivo de se determinar as respectivas CE₅₀.

3.8.1. Determinação *in vitro* da atividade parasitária e concentração efetiva 50% (CE₅₀) contra formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) infantum*

Promastigotas de *L. (L.) infantum* em fase exponencial tardia foram adicionados a 1×10^6 parasitas/poço em placas de 96 poços e incubados a 24°C por 48h com o composto serialmente diluído em base 2 (150 - 1,2 µM) em meio 199, suplementado com 10% de SFB. Após o período de incubação, a viabilidade celular foi determinada pela adição de MTT (0,5 mg/mL/poço) e incubação por 2h. Para solubilizar a formazana no interior da mitocôndria, 80 µL de SDS (10% m/v) foi adicionado aos poços e após 24h, a leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro (FilterMax F5 MultiMode) com λ a 570 nm (Tada *et al.*, 1986). Parasitas não tratados foram utilizados como controle positivo (100% de viabilidade).

Amastigotas de *L. (L.) infantum*: Macrófagos peritoneais (1×10^5 células/poço) foram adicionados em placas NUNC (Thermo) de 16 poços e incubados a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por 24h. Após este procedimento, foi realizada a infecção com amastigotas de *L. (L.) infantum* na proporção 10:1 (amastigotas/macrófago) e as placas foram novamente incubadas por 24h. Em seguida, foi realizada uma lavagem para remoção de amastigotas não internalizados. Posteriormente, os macrófagos infectados foram tratados com os compostos serialmente diluídos em base 2 (100 - 0,78 µM) em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB, por 96 horas (Tempone *et al.*, 2007). Ao final do ensaio, as células foram fixadas com metanol, coradas com Giemsa e observadas em microscópio óptico com objetiva de imersão (100x). Para determinação da concentração efetiva 50%, foi utilizado o índice de infecção (IF), obtido através da contagem diferencial de 200 macrófagos/poço e calculado pela seguinte fórmula (Chang *et al.*, 1986):

$$IF = \frac{N^{\circ} \text{ Macrófagos infectados} \times N^{\circ} \text{ Amastigotas intracelulares}}{N^{\circ} \text{ Macrófagos Totais}}$$

Células infectadas e não tratadas foram utilizadas como controle positivo.

3.8.2. Determinação *in vitro* da atividade parasitária e concentração efetiva 50% (CE₅₀) contra formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*

Tripomastigotas: O composto, dissolvido em DMSO (100%), foi diluído em série (base 2) utilizando-se meio RPMI-1640, em placas de 96 poços e em seguida formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram adicionadas na concentração de 1x10⁶ parasitas/poço. As placas foram mantidas a temperatura de 37°C em estufa com 5% de CO₂ durante 24 horas. Após esse período, para a determinação da viabilidade dos parasitas, foi adicionado 20 µL de resazurina a 10% (v/v). As placas permaneceram incubadas por 20 horas sob as mesmas condições. Ao final do ensaio, a leitura foi realizada em espectrofotômetro de placas (Filtre Max F5 Multi-Mode Microplate Reader) à λ 570 nm (Gehrke *et al.*, 2013). Como controle positivo (100% de células vivas), foi utilizado células não tratadas. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

Amastigotas Intracelulares: Macrófagos peritoneais (1x10⁵ células/poço) foram adicionados em placas NUNC de 16 poços e incubados a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por 24h. Em seguida, as células foram infectadas (10:1 parasita/macrófago) com 1x10⁶ tripomastigotas/poço por 2 horas. Em seguida, adicionou-se o composto diluído seriadamente em base 2 (100 - 0,78 µM). As formas intracelulares do parasita permaneceram incubadas durante 48 horas para obtenção do CE₅₀. Ao final do ensaio, as células foram fixadas com metanol, coradas com Giemsa e observadas em microscópio óptico com objetiva de imersão (100x). Para determinação da concentração efetiva 50%, foi utilizado o índice de infecção (IF), obtido através da contagem diferencial de 200 macrófagos/poço e calculado pela fórmula acima (item 3.8.1) (Chang *et*

al., 1986). Macrófagos infectados e não tratados foram utilizados como controle positivo.

3.9. Determinação *in vitro* da Concentração Citotóxica 50% (CC₅₀)

Com o intuito de determinar a CC₅₀ em células de mamífero, fibroblastos de camundongo NCTC clone 929 foram adicionados (6x10⁴ células/poço) em placas de 96 poços e incubados a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por 48h com o composto serialmente diluído em base 2 (200 a 1,6 µM) em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB. Posteriormente, a viabilidade celular foi determinada pela adição de 20 µL de MTT e incubação por 2h. Ao final, 80 µL de SDS (10% m/v) foi acrescentado e após 24h a leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro (FilterMax F5 MultiMode) à λ 570 nm (Tada *et al.*, 1986). Células não tratadas foram utilizadas como controle positivo.

3.10. Determinação do Índice de Seletividade (IS)

O índice de seletividade dos compostos foi calculado por meio da fórmula:

$$IS = \frac{CC50 \text{ em célula de mamífero}}{CE50 \text{ em amastigota intracelular}}$$

3.11. Análise de parâmetros *in silico*

As propriedades *druglikeness* do composto **MR01** foram avaliadas *in silico* usando a plataforma online SwissADME (Daina *et al.*, 2017). Esta análise inclui diversos modelos para avaliar: **i)** propriedades físico-químicas - definidas como área de superfície polar topológica (TPSA) e número de ligações rotativas; **ii)** lipofilicidade (log P); **iii)** solubilidade aquosa (log S); **iv)** parâmetros farmacocinéticos (absorção gastrointestinal e inibição do CYP450); **v)** perfil drug-likeness utilizando filtros de Lipinski (Pfizer), Veber (GlaxoSmithKline) e Muegge (Bayer); **vi)** compostos interferentes

(PAINS). Além desses parâmetros, a plataforma também fornece um radar de biodisponibilidade, com faixas de seis propriedades: lipofilicidade, tamanho, polaridade, solubilidade, flexibilidade e saturação. Para o composto **MR01**, todas as previsões do ADMET foram avaliadas usando a plataforma SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) (Daina *et al.*, 2017).

3.12. Avaliação dos Mecanismos de Ação

Para determinação de parâmetros de tempo de incubação e concentração ideais para os estudos de mecanismo de ação, foi realizado um novo ensaio de concentração efetiva 50%. Desse modo, os parasitas (tripomastigotas de *T. cruzi*) foram incubadas na concentração de 2×10^6 células/poço em placas de 96 poços com o composto serialmente diluído em base 2 (200 a 1,6 μM) em meio HBSS suplementando com NaHCO_3 (4,2 mM) e D-glicose (10 mM), a 24°C por 1, 2, 3 e 4h. Após o período de incubação, a morfologia celular foi avaliada visualmente em microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100) e a viabilidade celular foi determinada utilizando o corante resazurina (Alamar Blue®). A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro (FilterMax F5Multi-Mode) à λ 570 nm (Amaral *et al.*, 2019).

3.12.1. Alteração da Permeabilidade da Membrana Plasmática

Para determinar possíveis alterações de permeabilidade da membrana plasmática celular, foi utilizado Sytox® Green, um marcador fluorescente de ácidos nucleicos, impermeável a células viáveis. Os parasitas (tripomastigotas de *T. cruzi*) foram adicionados em placas pretas (2×10^6 parasitas/poço) de 96 poços e incubados com Sytox® Green (1 μM) em meio HBSS suplementando com NaHCO_3 (4,2 mM) e D-glicose (10 mM), a 24°C por 15 min. Posteriormente, foi realizada uma leitura basal da placa, após essa leitura, o composto **MR01** (130 μM) foi adicionado e a fluorescência foi monitorada por 2 horas. As leituras foram realizadas no

espectrofluorímetro (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader) com filtros de excitação de 485 nm e emissão de 535 nm (Chicharro *et al.*, 2001). A permeabilização máxima foi obtida na presença de Triton X100 0,5% (v/v) e parasitas não tratados foram utilizados como controle negativo (100% viabilidade, membrana íntegra) (Kulkarni *et al.*, 2009).

3.12.2. Alteração no Potencial da Membrana Mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

Tripomastigotas de *T. cruzi* (2×10^6 parasitas/poço) foram incubados com o composto **MR01** (130 μM) em meio HBSS suplementando com NaHCO_3 (4,2 mM) e D-glicose (10 mM), em estufa a 37°C com 5% de CO_2 por 1 e 2 horas. Uma lavagem foi realizada e posteriormente JC-1 (10 μM) foi acrescentado. Após 20 minutos de incubação a 37°C, a fluorescência foi medida em citometria de fluxo (Attune NxT) com filtro de excitação 488 nm e emissão 530 (BL-1) e 574 nm (BL-2). O potencial de membrana mitocondrial foi determinado por meio da razão BL-2/BL-1 (vermelha/verde) (Mukherjee *et al.*, 2002).

A despolarização máxima foi obtida na presença de CCCP (100 μM) e parasitas não tratados foram utilizados como controle negativo (100% viabilidade, potencial basal).

3.12.3. Alterações nos Níveis de Adenosina Trifosfato (ATP)

Os níveis de ATP foram quantificados através do método de bioluminescência luciferina-luciferase, utilizando um kit de determinação de ATP.

Tripomastigotas de *T. cruzi* (2×10^6 parasitas/poço) foram incubados com o composto **MR01** (130 μM) em meio HBSS suplementando com NaHCO_3 (4,2 mM) e D-glicose (10 mM), em estufa a 37°C com 5% de CO_2 por 1 e 2 horas. Uma lavagem foi realizada, posteriormente os parasitas foram lisados com Triton X-100 (0,5%) e um tampão de reação padrão (DTT 1 mM, luciferina 0,5 mM e luciferase 1,25 $\mu\text{g/ml}$) foi acrescentado. Uma

curva de ATP (5000 a 1 nM) foi utilizada como padrão e a luminescência das amostras foi determinada pela leitura em luminômetro (FilterMax F5Multi-Mode) (Dolai *et al.*, 2009).

Níveis reduzidos de ATP foram obtidos na presença de CCCP (100 µM) e parasitas não tratados foram utilizados como controle negativo (100% viabilidade, nível basal).

3.12.4. Alterações nos Níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Tripomastigotas de *T. cruzi* (2×10^6 parasitas/poço) foram adicionados em placas pretas de 96 poços e incubados com o composto **MR01** (130 µM) em meio HBSS suplementando com NaHCO₃ (4,2 mM) e D-glicose (10 mM), em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 1 e 2 horas. Posteriormente, H₂DCFDA (5 µM) foi acrescentado, e após 15 min de incubação a fluorescência foi medida em espectrofluorímetro (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader) com filtros de excitação e emissão de 485 nm e 520 nm, respectivamente (Mukherjee *et al.*, 2002).

Níveis máximos de espécies reativas de oxigênio foram obtidos na presença de azida (10 mM) e parasitas não tratados foram utilizados como controle negativo (100% viabilidade, nível basal). Para verificar a possível ocorrência de interferências na fluorescência, controles contendo apenas o composto e o fluoróforo foram adicionados em todos os experimentos.

3.12.5. Alteração dos Níveis de Cálcio Intracelular.

Tripomastigotas de *T. cruzi* (2×10^6 parasitas/poço) foram pré-tratados com o fluoróforo Fluo-4 AM (5 µM) em PBS 1x, por 1h a 37°C. Posteriormente, os parasitas foram lavados e adicionados em placas pretas de 96 poços. Em seguida, uma leitura basal foi realizada e o composto **MR01** (130 µM) foi adicionado. A fluorescência foi monitorada a cada 20 min por 2h em

espectrofluorímetro com filtros de excitação e emissão de 485 e 535 nm, respectivamente (Corral *et al.*, 2016).

Níveis máximos de cálcio foram obtidos utilizando Triton X100 a 0,5% (v/v), utilizado como controle positivo, e parasitas não tratados foram usados como controle negativo (100% viabilidade, nível basal). Controles contendo apenas o composto e o fluoróforo foram adicionados em todos os experimentos para verificar a ocorrência de interferências na fluorescência.

3.12.6. Alterações nos Acidocalcisomas

Tripomastigotas de *T. cruzi* (2×10^6 parasitas/poço) foram pré-tratados com laranja de acridina ($4 \mu\text{M}$) em PBS 1x, por 5 min a 37°C . Os parasitas foram então lavados e adicionados em placas pretas de 96 poços. Em sequência, uma leitura basal foi realizada e o foram encubados com o composto **MR01** ($130 \mu\text{M}$). A fluorescência foi monitorada a cada 20 min por 2h em espectrofluorímetro com filtros de excitação e emissão de 485 e 535 nm, respectivamente (Serrano-Martín *et al.*, 2009).

Níveis máximos de alcalinização foram obtidos utilizando nigericina ($4 \mu\text{M}$) e parasitas não tratados foram empregados como controle negativo (100% viabilidade, nível basal) (Docampo *et al.*, 1995). Controles contendo apenas o composto e o fluoróforo foram adicionados em todos os experimentos para verificar a ocorrência de interferências na fluorescência.

3.12.7. Avaliação do Perfil Proteico de Tripomastigotas de *T. cruzi*

Tripomastigotas (1×10^7 /poço) foram tratados com **MR01** ($130 \mu\text{M}$) e benznidazol ($40 \mu\text{M}$) durante 18 horas em meio RPMI. Após este período, as suspensões de amostras das culturas expandidas foram centrifugadas, o sobrenadante removido e o precipitado foi lavado duas vezes em água

Mili-Q. O precipitado foi ressuspenso em 300 µL de água Mili-Q antes de adicionar 900 µL de etanol 70% (v/v). Após nova centrifugação, 20 µL de ácido fórmico a 70% e 20 µL de acetonitrila foram adicionados ao precipitado e a solução foi agitada em vórtex e centrifugada. Cada etapa de centrifugação foi realizada a 10.000 g por 10 min em temperatura ambiente. Parasitas não tratados foram usados como controle (Mouri *et al.*, 2014).

O sobrenadante foi distribuído (3 µL) em duplicatas em uma placa de 96 poços de aço para MALDI-TOF/MS (Bruker-Daltonics, Bremen, Alemanha) e seca em temperatura ambiente. A matriz, ácido α-ciano-4-hidroxi-cinâmico (HCCA) (Bruker-Daltonics), foi preparada a uma concentração de 50 mg/mL em 50% de acetonitrila e 50% de água com 2,5% de TFA, e foi adicionada (1 µL) na placa. Um extrato de proteína DH5-alfa de *Escherichia coli* (BrukerDaltonics) foi adicionada na placa para controle externo. As análises foram realizadas em um espectrômetro de massas Bruker Microflex MALDI-TOF/MS com um laser de nitrogênio (337 nm) operando em modo linear com extração retardada (260 ns) a 20 kV de voltagem de aceleração. Cada espectro foi coletado automaticamente no modo de íon positivo como uma média de 500 disparos de laser (50 disparos de laser em 10 posições de pontos diferentes). Uma faixa de massa entre 3.000 e 20.000 m/z (relação massa/carga) foi selecionada para coletar os sinais com a ferramenta Auto Xecute do software de aquisição FlexControl (Versão 2.4; Bruker-Daltonics). Apenas picos com relação sinal/ruído foram considerados (Mouri *et al.*, 2014).

3.13. Análise estatística

Os valores de concentrações efetivas e os valores de concentração citotóxica 50% foram calculados usando curvas sigmoidais dose-resposta utilizando o software GraphPad Prism 5.0. Os dados relatados são a média ± desvio padrão de pelo menos dois experimentos independentes realizados com amostras em duplicatas. ANOVA de variância unilateral

com Teste de Comparação Múltipla de Tukey foi usado para teste de significância (valor P).

4. Resultados

4.1. Estudo biomonitorado e partição líquido-líquido

A partir da partição líquido-líquido, foram originadas um extrato bruto e três frações orgânicas, sendo estas: ExMeOH (50,3 mg), FrHex (9,9 g), FrAcOEt (3,7 g) e FrBut (20,6 mg).

As frações foram testadas na concentração máxima de 200 µg/mL e foram diluídas serialmente em base 2 até a concentração de 1,56 µg/mL. Destas, a fração em acetato de etila (FrAcOEt) apresentou atividade contra formas promastigotas de *L. (L.) infantum*, com uma CE₅₀ de 11,8 µg/mL. A fração em butanol (FrBut) também apresentou atividade contra as formas promastigotas de *L. (L.) infantum* com uma CE₅₀ de 34,4 µg/mL (**Tabela 1**). O extrato bruto em metanol (ExMeOH) e a fração em hexano (FrHex) não apresentaram atividade contra as formas promastigotas de *L. (L.) infantum*.

Para as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, a fração mais ativa foi a fração FrAcOEt, com uma CE₅₀ de 4,5 µg/mL; a FrHex e FrBut apresentaram valores de CE₅₀ de 99,3 e 19,3 µg/mL, respectivamente. O extrato bruto ExMeOH não apresentou atividade contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi* (**Tabela 1**).

Tabela 1: Avaliação da concentração efetiva 50% (CE₅₀) contra promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e massas das frações obtidas após partição.

Fração	Massa (g)	Atividade anti-	Atividade anti-
		<i>Leishmania infantum</i> (CE ₅₀) µg/mL	<i>Trypanosoma cruzi</i> (CE ₅₀) µg/mL
Metanol	0,0503	N/A	N/A
Hexano	9,9	N/A	99,3
Acetato de etila	3,7	11,8	4,5
Butanol	0,0206	34,4	19,3

CE₅₀: Concentração efetiva 50%. N/A. não ativa

4.2. Caracterização das frações obtidas na partição líquido-líquido

Uma alíquota do extrato bruto e das três frações (ExMeOH, FrHex, FrAcOEt e FrBut) foram encaminhadas para o laboratório de Produtos Naturais do Prof. João Lago, na Universidade Federal do ABC, para análises de ressonância magnética nuclear. A fração em acetato de etila (**FrAcOEt**) apresentou sinais compatíveis com a presença de compostos aromáticos e um possível alcaloide, sendo escolhida para refraçãoamento (**Anexo 01**).

4.3. Fracionamento da FrAcOEt em coluna Sephadex LH-20

Considerando a atividade contra *L. (L.) infantum* e *T. cruzi*, e o estudo em RMN, a **FrAcOEt** foi submetida a um refraçãoamento cromatográfico utilizando uma coluna Sephadex LH-20 como fase estacionária (**Figura 17**). Um total de 90 frações foram coletadas e submetidas a análise de cromatografia de camada delgada (CCD). Após análise do fator de retenção (R_f), dado pela distância percorrida pela amostra/distância percorrida pelo solvente em centímetros (**Figura 18**), as frações foram reunidas por similaridade, resultando em 6 novas frações.



Figura 17: Separação da FrAcOEt em coluna Sephadex LH-20 (2,4 x 70 cm). Foi realizada seis corridas, das quais foram recolhidas aproximadamente 90 frações por corrida.

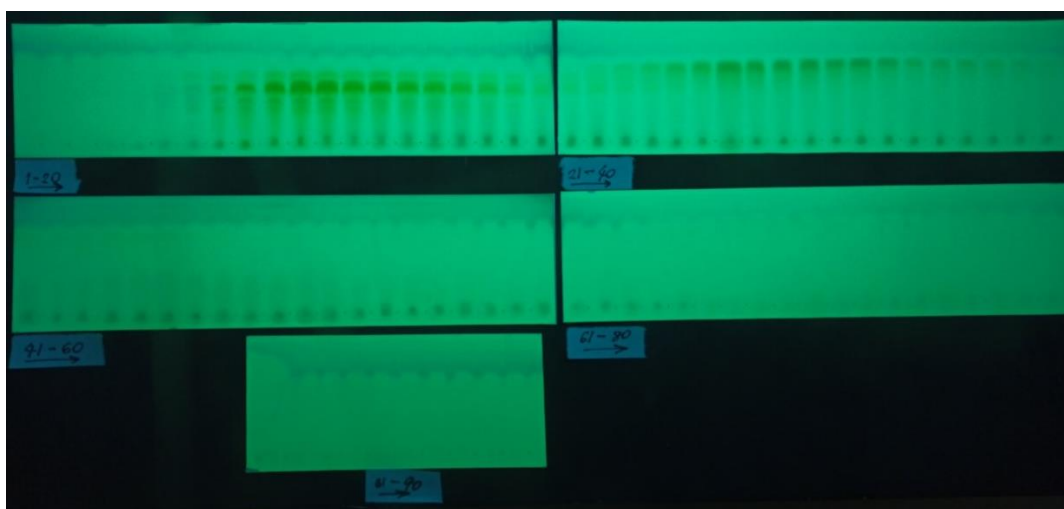


Figura 18: Cromatografia de camada delgada (CCD) das 90 frações obtidas após a separação em coluna Sephadex LH-20. Como fase móvel foram utilizados os solventes metanol e acetato de etila (v/v). A revelação e visualização das bandas foi realizada em câmara com luz ultravioleta (254 nm) e utilização de sulfato cérico, seguido de aquecimento a 100°C.

Na **Tabela 2**, é possível verificar quais frações foram agrupadas após a análise por CCD. Após o agrupamento por similaridade, as frações foram reduzidas em evaporador rotativo, secadas e o peso final foi determinado.

Tabela 2: Frações agrupadas, provenientes da cromatografia em coluna Sephadex LH-20 da **FrAcOEt**, com base na análise por cromatografia em camada delgada, juntamente com suas massas (mg).

Frações	Frações Sephadex	Rf	Massa (mg)
FrAcOEt 1	01-05	0	7,4
FrAcOEt 2	06-16	0,625	857,7
FrAcOEt 3	17-26	0,25	153
FrAcOEt 4	27-41	0,375	319,7
FrAcOEt 5	42-53	0,5	100
FrAcOEt 6	54-90	0	39,7

Rf.: Fator de retenção (distância percorrida pela amostra (cm)/distância percorrida pelo solvente (cm)).

4.4. Desreplicação das sub-frações por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Uma alíquota de cada fração (FrAcOEt 1, FrAcOEt 2, FrAcOEt 3, FrAcOEt 4, FrAcOEt 5 e FrAcOEt 6) foi encaminhada para análise em ¹H-RMN. A fração em acetato de etila 5 (**FrAcOEt 5**) apresentou sinais compatíveis com a presença de compostos aromáticos (alcaloide) (**Anexo 02**) e desta forma, foi escolhida para prosseguimento no isolamento cromatográfico.

4.5. Pré-fracionamento da fração FrAcOEt 5 em cartucho de extração em fase sólida – SPE – C18

A **FrAcOEt 5** (100 mg) obtida na coluna Sephadex LH20, foi refracionada em cartucho de fase sólida (SPE – C18). A amostra foi dissolvida em MeOH : água (1:9 v/v) e aplicada na coluna. Como eluente foi utilizado MeOH em diferentes proporções. Para fins de estudo biomonitorado, estas frações foram avaliadas quanto ao potencial anti-*T. cruzi* em formas tripomastigotas e anti-*Leishmania* em formas promastigotas, ambas a 200

$\mu\text{g/mL}$. A fração ativa, eluída com MeOH (90%) apresentou um rendimento de 32,6 mg de massa após a SPE – C18.

4.6. Refracionamento da FrAcOEt 5 em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A FrAcOEt 5 foi refractionada em cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa C18. A análise do cromatograma obtido em λ 220 e 254 nm, revelou a presença de nove picos, sendo os picos I, IV e V majoritários (Figura 19). Para fins de biomonitoramento, foram coletadas as diferentes frações e avaliadas quanto ao potencial antiparasitário. Apenas pico V apresentou atividade e somente contra o *Trypanosoma cruzi*, tendo sido escolhido para o estudo de desreplicação molecular.

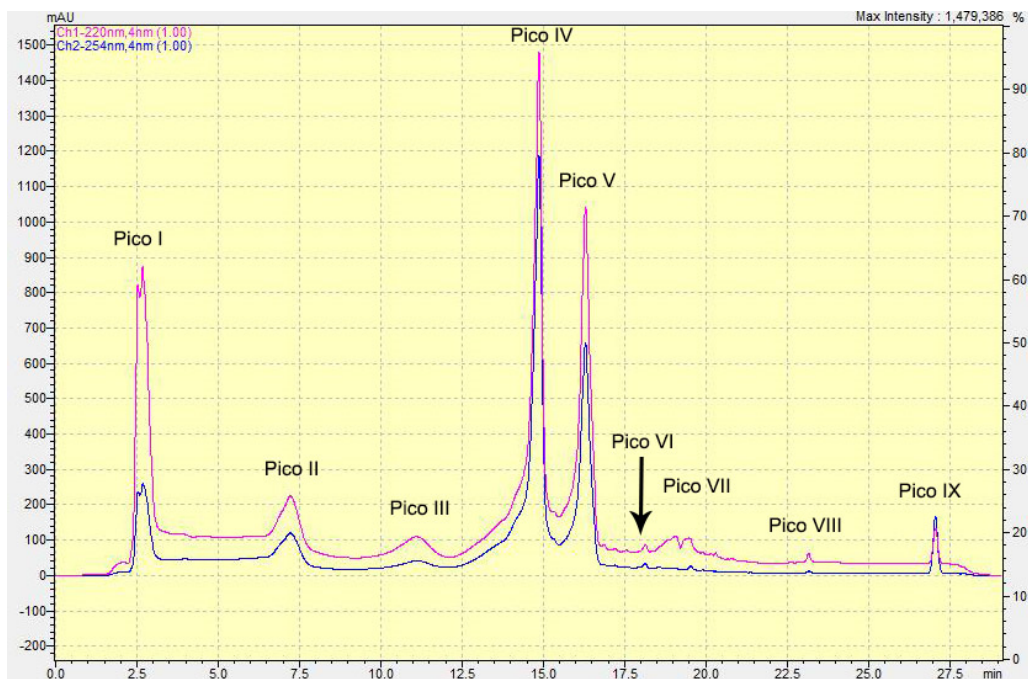


Figura 19: Perfil cromatográfico da FrAcOEt 5 obtivo por CLAE em coluna C18 (ACE, dimensões 250 x 4,6 mm, 5 μm). Foi utilizado fluxo de 1 mL/min. Como solvente A foi utilizado água e como solvente B foi utilizado MeOH. O cromatograma foi obtido utilizando o comprimento de onda de 220 e 254 nm.

4.7. Desrepliação da FrAcOEt 5V por Ressonância Magnética Nuclear (^1H -RMN)

A fração **FrAcOEt 5V**, a qual apresentou atividade anti-*Trypanosoma cruzi* foi submetida a análise em ^1H -RMN (**Anexo 03**). Esta fração apresentou sinais compatíveis com a presença de compostos aromáticos, porém, devido ao seu grau de pureza não ter atingido >95%, foi conduzida para refractionamento.

4.8. Purificação da FrAcOEt 5V em CLAE

A última etapa foi a purificação da fração **FrAcOEt 5V**, utilizando CLAE e uma coluna de fase reversa C4 (ACE, dimensões 250 x 4,6 mm, 5 μm). O cromatograma obtido em λ 220 e 254 nm revelou a presença de seis picos, sendo o pico **V'** majoritário e ativo apenas em *Trypanosoma cruzi* após biomonitoramento (**Figura 20**).

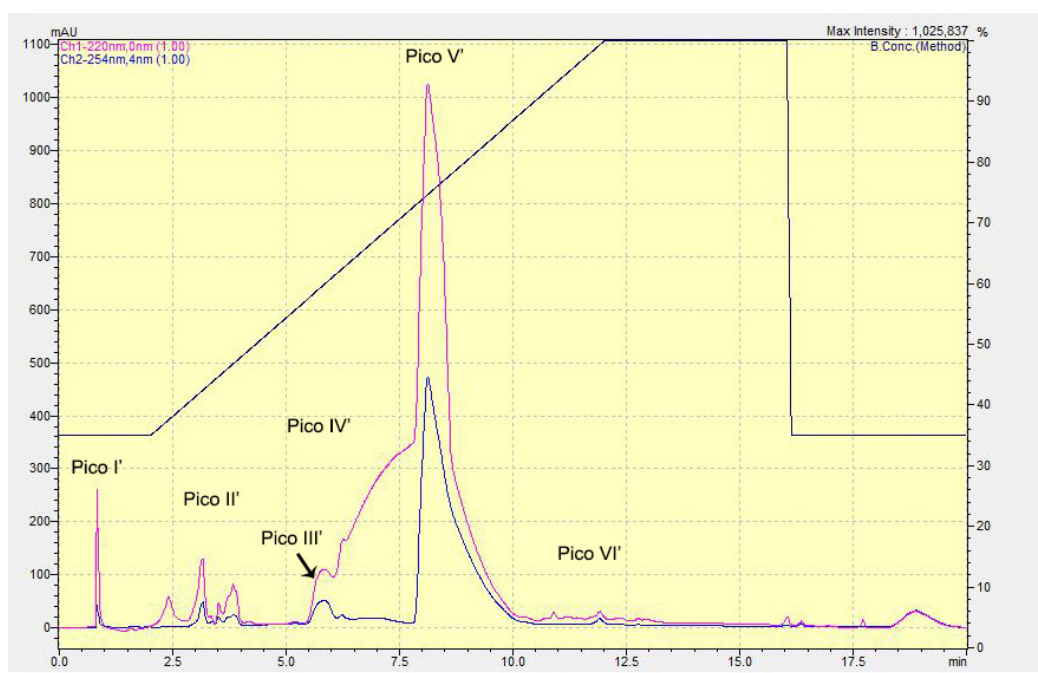


Figura 20: Perfil cromatográfico da **FrAcOEt 5V** obtivo por CLAE em coluna C4 (ACE, 250x4,6 mm). Foi utilizado fluxo de 1 mL/min. Como solvente A foi utilizado água e como solvente B foi utilizado AcOEt. O cromatograma foi obtido utilizando o comprimento de onda de λ 220 e 254 nm.

4.9. Elucidação estrutural

A estrutura da substância isolada da fração acetato de etila da *Tubastraea tagusensis*, até então identificada como **FrAcEt 5V-V'** foi definida através da análise dos respectivos espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN utilizando criosonda (**Anexo 04 - 07**), e CLAE acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução (HPLC-HRMS) (**Anexo 08**). A partir desses dados, foi possível realizar a elucidação estrutural de um alcaloide indólico simples, (**Figura 21**) chegando-se ao composto **6-bromo-2'-de-N-metilaplisinopsina**, sendo nomeado para fins de estudos antiparasitários de **MR01**. Ao total, foram obtidos 0,6 mg do composto **MR01**.

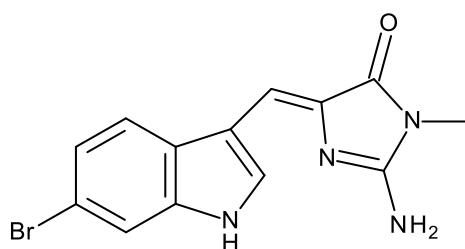


Figura 21: Estrutura do composto isolado **MR01** (6-bromo-2'-de-N-metilaplisinopsina) da **FrAcOEt** da *Tubastraea tagusensis*. A elucidação estrutural foi determinada por RMN e espectrometria de massas de alta resolução.

Um esquema foi elaborado na forma de fluxograma e apresentado abaixo (**Figura 22**) para resumir o processo de obtenção do alcaloide 6-bromo-2'-de-N-metilaplisinopsina.

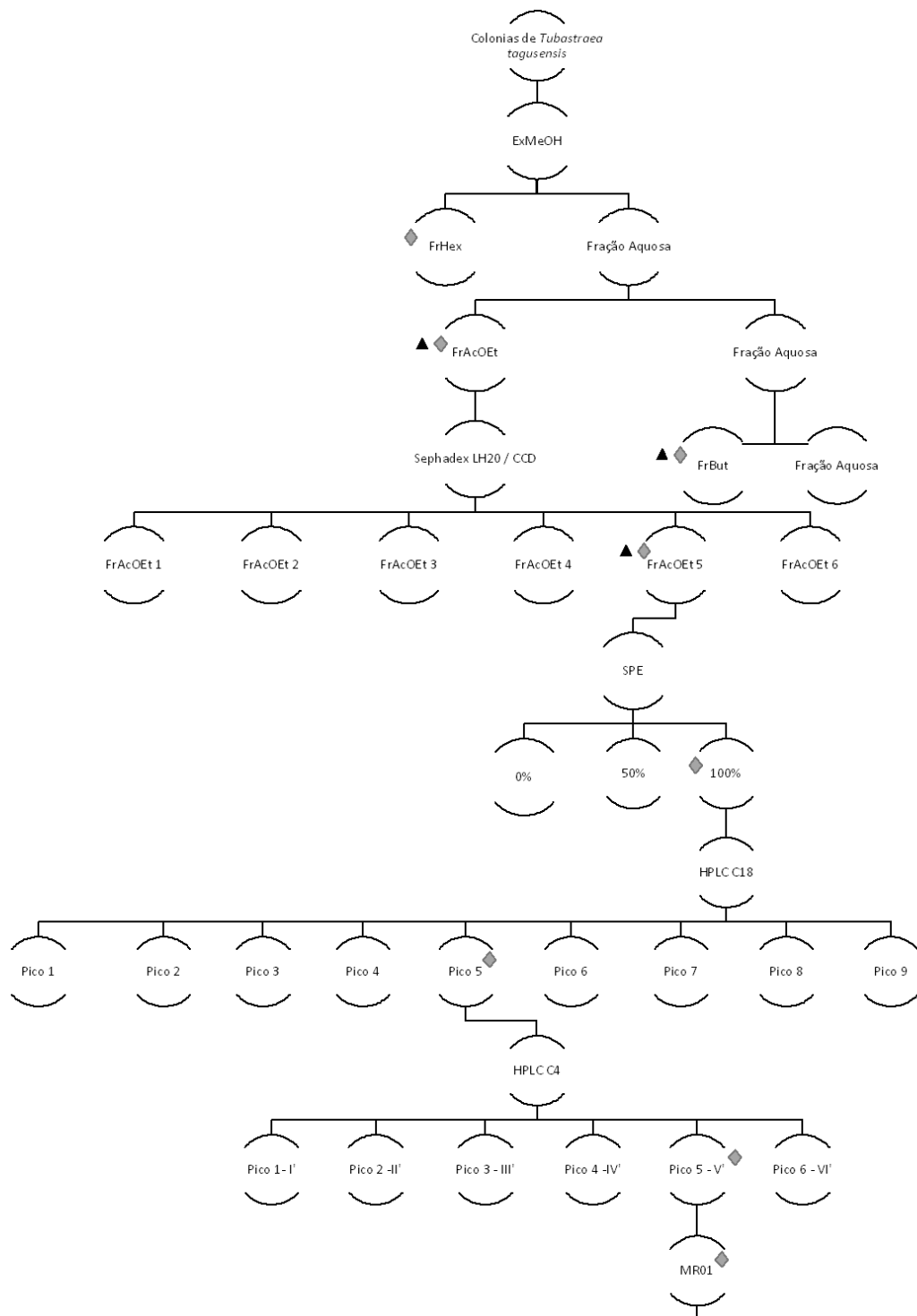


Figura 22: Fluxograma resumindo o processo de isolamento do alcaloide **MR01** (6-bromo-2'-de-N-metilaplisinopsina). ▲ : Extratos e frações ativas contra *Leishmania infantum*. ◆ : Extratos e frações ativas contra *Trypanosoma cruzi*.

4.10. Determinação *in vitro* da atividade antiparasitária e concentração efetiva 50% (CE₅₀) do composto MR01

O composto **MR01** foi testado contra tripomastigotas e amastigotas intracelulares de *T. cruzi* e apresentou atividade com uma CE₅₀ de 63 e 6 μM , respectivamente. O benznidazol foi utilizado como fármaco padrão e apresentou uma CE₅₀ de 16 μM e 5 μM , respectivamente. A **figura 23** mostra os macrófagos infectados com amastigotas de *T. cruzi* não tratados (**A**) e tratados com o **MR01** na concentração de 7,5 μM (**B**). Para *Leishmania (L.) infantum*, o composto não apresentou atividade contra as formas amastigotas intracelulares até a concentração máxima de 100 μM , e desta forma, os estudos se mantiveram em *Trypanosoma cruzi*.

A citotoxicidade em células de mamífero foi analisada na linhagem de fibroblastos NCTC clone 929 e utilizado o método colorimétrico do MTT para avaliação da viabilidade celular. Os resultados mostraram que o composto **MR01** não apresentou citotoxicidade até a concentração máxima testada de 200 μM , conforme mostrado na **Tabela 3**.

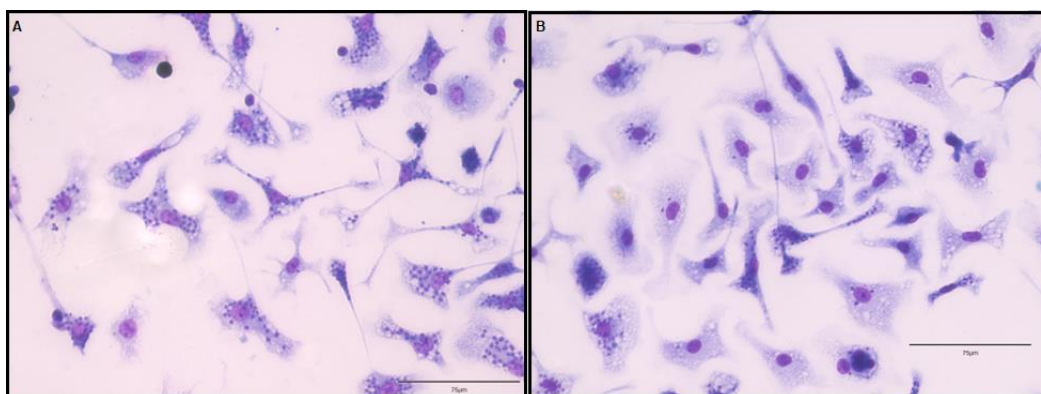


Figura 23: Macrófagos infectados com amastigotas de *T. cruzi*. **A** – macrófagos infectados e não tratados. **B** – macrófagos infectados e tratados com o composto **MR01** na concentração de 7,5 μM . Os macrófagos foram infectados na concentração de 1:10 (macrófagos:amastigotas), por 48 horas. Após esse período, as células foram fixadas e coradas com Giemsa e observadas em microscópio óptico com objetiva de imersão (100x).

Tabela 3: Atividade anti-*Trypanosoma cruzi* e citotóxica do composto **MR01**.

Composto	CE ₅₀ ±DP (µM)	CE ₅₀ ±DP (µM)	CC ₅₀ ±DP (µM)	IS
	Tripomastigotas	Amastigotas	NCTC	
MR01	62,7 ± 8,1	5,7 ± 2,2	>200	>35,1
benznidazol	16,2 ± 3,7	5,3 ± 0,3	> 200	>38,4

CC₅₀: Concentração Citotóxica 50% em células NCTC; CE₅₀: Concentração Efetiva 50% em tripomastigotas e amastigotas intracelulares de *Trypanosoma cruzi*; IS: Índice de Seletividade, dado pela razão entre CC₅₀ e CE₅₀; DP: Desvio Padrão.

4.11. Determinação de parâmetros físico-químicos *in silico*

Uma vez observada a atividade contra *T. cruzi*, o composto **MR01** foi analisado *in silico* quanto aos parâmetros físico-químicos, assim como farmacocinéticos e farmacodinâmicos, utilizando a plataforma online SwissADME. As análises foram realizadas com o objetivo de avaliar características do composto que se assemelham a fármacos aprovados, perfil este, conhecido como *drug-likeness*. Os resultados detalhados das propriedades ADMET estão dispostos na **Tabela 04**.

O composto **MR01** apresentou peso molecular de 391 g/mol com um valor de logP de 1,7, sendo considerado de moderada solubilidade em água. A solubilidade (Log S) resultou em um valor de -3,21 e o número de ligações rotativas foi de 1. A polaridade do **MR01** resultou em um valor de 74,48 Å, e a saturação, dada pela fração de carbonos sp³, apresentou um valor de 0,08.

Os parâmetros farmacocinéticos indicam que o composto apresenta uma alta absorção gastrointestinal e não é permeável à barreira hematoencefálica. Parâmetros farmacodinâmicos do **MR01** sugerem que o composto não é um substrato para a glicoproteína P, sendo um possível inibidor de duas enzimas do citocromo P450 (CYP1A2 e CYP2C9). A avaliação *in silico* também demonstrou que o composto passou pelos filtros para drug-likeness como Lipinski, Ghose, Egan e Muegge. Ele

também mostrou um alerta para compostos de interferência (PAINS) e um alerta no filtro Brenk.

Tabela 4: Análise *in silico* dos parâmetros físico-químicos, farmacocinéticos e farmacodinâmicos do composto **MR01**, obtido no software SwissADME.

Parâmetros	MR01
Fração de carbono sp ³	0,08
Nº de bandas rotativas	1
Nº de receptores de hidrogênio	2
Nº de doadores de hidrogênio	2
Área de superfície polar (Å ²)	74,48
Log P	1,73
Log S	-3,21
Absorção gastro-intestinal	elevada
Permeabilidade da barreira hemato-encefálica	x
Substrato de glicoproteína P	x
Inibidor CYP1A2	✓
Inibidor CYP2C19	✓
Inibidor CYP2C9	x
Inibidor CYP2D6	x
Inibidor CYP3A4	x
Lipinski	✓
Ghose	✓
Veber	✓
Egan	✓
Muegge	✓
PAINS	1 alerta
Brenk	1 alerta
Característica de líder	✓
Acessibilidade para síntese	2,95

PAINS: compostos de interferência; CYP: citocromo P450; P-gp: glicoproteína P; TPSA: área de superfície polar topológica. ✓ Sim, x Não.

Além disso, o radar de biodisponibilidade (**Figura 24**) gera uma avaliação rápida do composto **MR01** em relação à semelhança com fármacos aprovados. Seis propriedades físico-químicas são levadas em consideração: lipofilicidade, tamanho, polaridade, solubilidade, flexibilidade e saturação. A área rosa representa a faixa ideal para cada uma dessas propriedades.

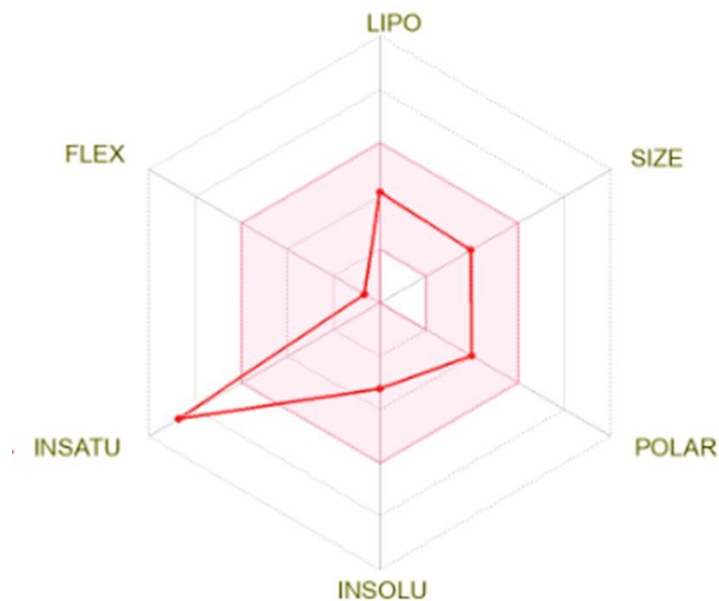


Figura 24: Radar de Biodisponibilidade do composto **MR01**. A área rosa representa a faixa ideal para cada propriedade. LIPO – lipofilicidade (-0,7 e +5,0); SIZE – tamanho (150 e 500 g/mol); POLAR – polaridade (20 e 130Å²); INSOLU – solubilidade (log S ≤ 6); INSATU – saturação (sp³ ≥ 0,25) FLEX – flexibilidade (≤ 9 ligações rotativas).

4.12. Determinação da concentração efetiva 50% para estudos de mecanismo de ação

Visando obter um valor aferido de CE₅₀ para períodos curtos de incubação, com fins de estudos de mecanismo de ação, tripomastigotas foram tratados com o composto **MR01** por até 4 horas. Os resultados mostraram que após 2h de tratamento, foi obtido um valor de CE₅₀ de 130 µM. Portanto, os estudos apresentados a seguir foram todos realizados nesta concentração de CE₅₀.

4.13. Alterações na permeabilidade da membrana plasmática de tripomastigotas de *T. cruzi*

O corante *Sytox Green* foi usado para avaliar danos à integridade da membrana plasmática de tripomastigotas de *T. cruzi*. O tratamento com **MR01** (130 µM) não mostrou alteração na permeabilidade da membrana

plasmática, com os níveis de fluorescência permanecendo semelhantes aos dos parasitas não tratados, mesmo após 2 horas de incubação (**Figura 25**). Triton X-100 foi usado como controle positivo, sendo estatisticamente significativo ($p < 0,005$) quando comparado ao grupo controle (não tratado).

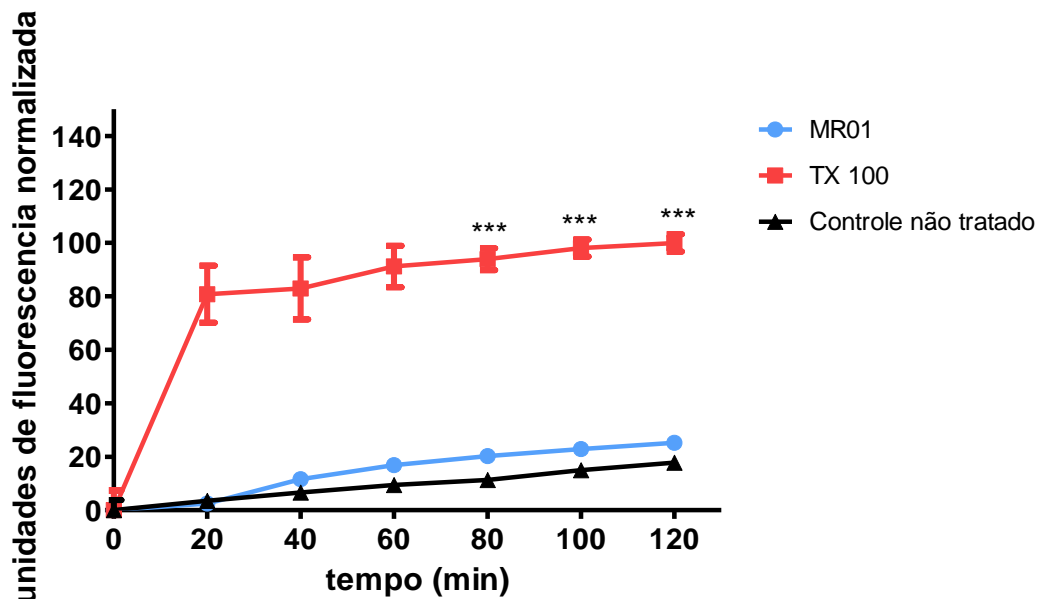


Figura 25: Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática em tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* após 2h de tratamento com **MR01** (130 μ M), utilizando o fluoróforo Sytox Green (excitação 485 nm e emissão 535 nm). Parasitas não tratados e tratados com Triton X100 0,5% foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente. A fluorescência foi relatada como uma porcentagem para Triton X100 0,5% em 120 min (100%). *** $p < 0,0001$ quando comparado ao controle não tratado.

4.14. Efeitos do potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em tripomastigotas de *T. cruzi*

Alterações do potencial da membrana mitocondrial de tripomastigotas foram verificadas por citometria de fluxo com o fluoróforo JC-1. Através dos níveis de fluorescência detectados, foi observado potencial de membrana mitocondrial basal no controle e despolarização máxima obtida com o controle positivo CCCP (**Figura 26**). O composto **MR01** induziu uma despolarização significativa do potencial de membrana mitocondrial

em tripomastigotas ($p < 0,05$) quando comparado aos parasitas não tratados em 1 e 2 horas de incubação.

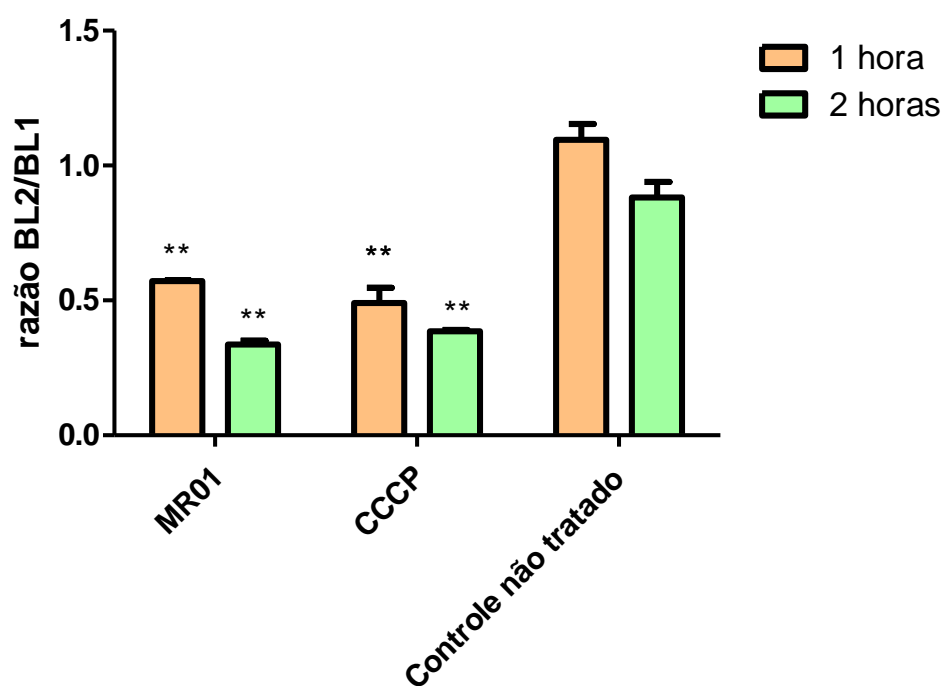


Figura 26: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial em tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* após 1 e 2 horas de tratamento com **MR01** (130 μM), utilizando o fluoróforo JC-1 (excitação 488 nm e emissão 530/574 nm). Parasitas não tratados e tratados com CCCP (100 μM) foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente. A fluorescência foi relatada como a razão entre BL-2 (574 nm) e BL-1 (530 nm). ** $p < 0,05$ quando comparado ao controle não tratado.

4.15. Determinação dos Níveis de ATP

Para a quantificação dos níveis de ATP de tripomastigotas de *T. cruzi* foi utilizado um kit de determinação de ATP. Quando os tripomastigotas foram tratados com o composto **MR01**, houve uma redução significativa na concentração de ATP ($p < 0,0001$) após 2 horas de tratamento quando comparado com parasitas não tratados. O controle positivo de CCCP (100 μM), um desacoplador de fosforilação oxidativa, foi usado para redução nos níveis de ATP (**Figura 27**).

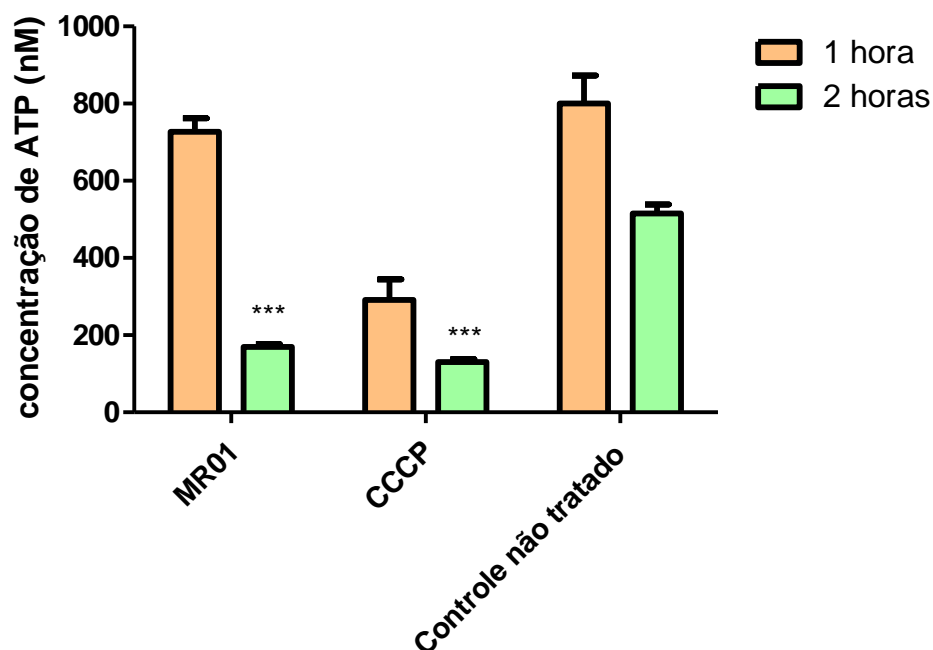


Figura 27: Determinação dos níveis de ATP em tripomastigotas de *T. cruzi* após 1 e 2 horas de tratamento com **MR01** (130 μM), utilizando o Kit de Determinação de ATP. Parasitas não tratados e tratados com CCCP (100 μM) foram usados como controle negativo e positivo, respectivamente. *** $p < 0,0001$ em relação ao controle não tratado.

4.16. Determinação de espécies reativas de oxigênio (ROS)

A análise dos níveis de ROS foi realizada com o fluoróforo H₂DCFDA. O composto **MR01** (130 μM) não apresentou alteração nos níveis de espécies reativas de oxigênio após 1 e 2 horas de tratamento, quando comparado aos parasitas não tratados. Em contraste, o controle positivo (azida sódica 10 mM) aumentou a produção de ROS (**Figura 28**).

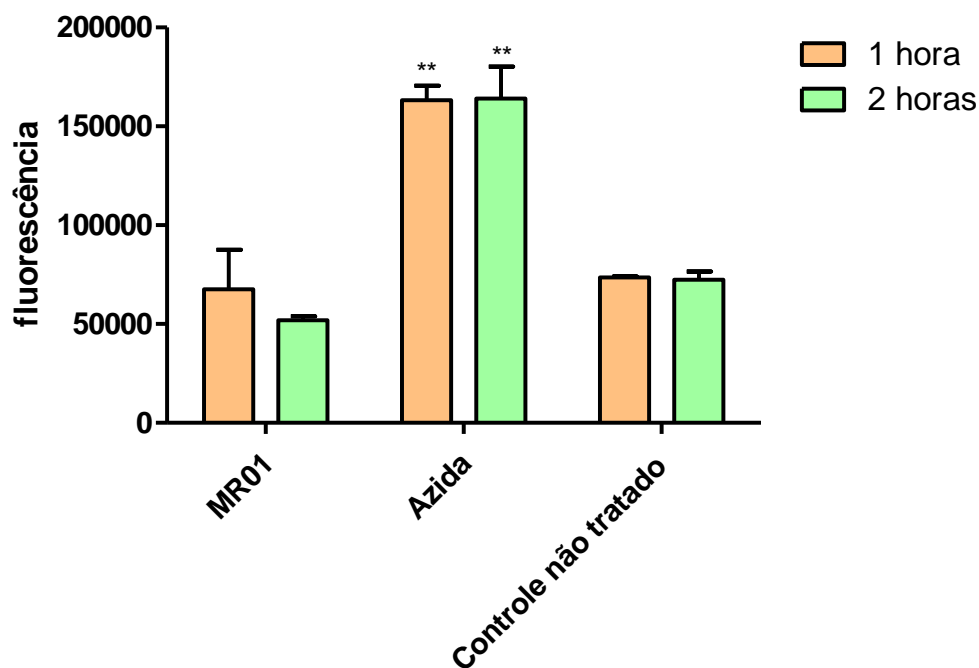


Figura 28: Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio tripomastigotas de *T. cruzi* após 1 e 2 horas de tratamento com **MR01** (130 μ M), utilizando o fluoróforo H₂DCFDA (excitação 485 nm e emissão 535 nm). Os parasitas não tratados e os parasitas tratados com azida de sódio (10 mM) foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente. ** p < 0,05 quando comparado ao controle não tratado.

4.17. Alteração dos Níveis de Cálcio Intracelular (Ca²⁺)

As concentrações citosólicas de Ca²⁺ foram medidas em tripomastigotas de *T. cruzi* usando o fluoróforo Fluo-4 AM. De acordo com os dados apresentados na **Figura 29**, o tratamento com o composto **MR01**, resultou na redução nos níveis de cálcio intracelular de tripomastigotas em até duas horas de tratamento quando comparado ao controle não tratado. A regulação positiva de Ca²⁺ foi observada no controle positivo, Triton X-100, em que houve um aumento significativo dos níveis de Ca²⁺.

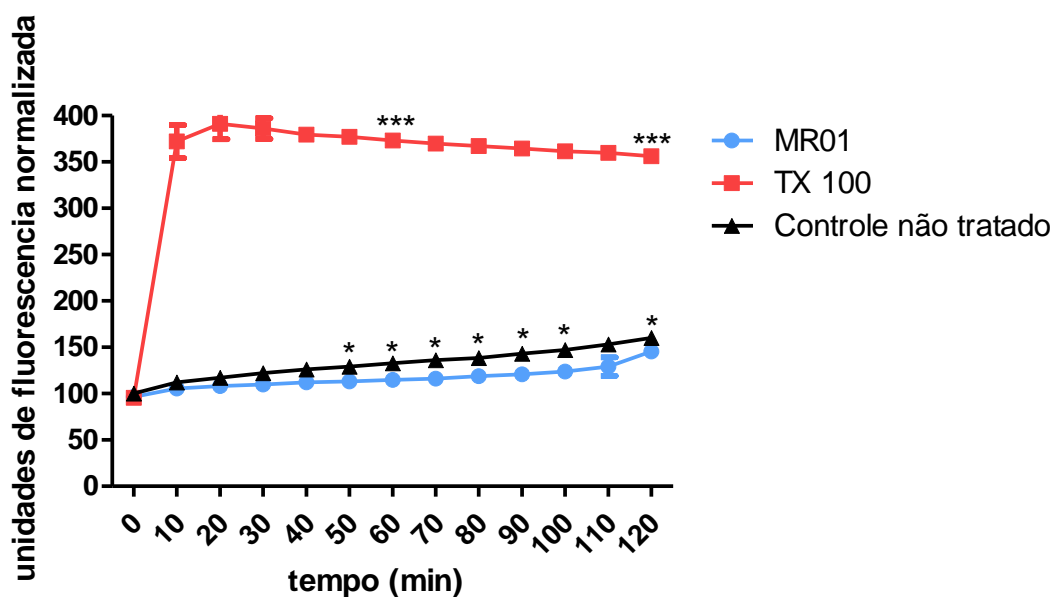


Figura 29: Avaliação dos níveis de cálcio intracelular em tripomastigotas de *T. cruzi* em até 2h de tratamento com **MR01** (130 μ M), utilizando o fluoróforo Fluo-4 AM (excitação 485 nm e emissão 535 nm). Parasitas não tratados e 0,5% tratados com Triton X100 foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente. A fluorescência foi relatada como uma porcentagem de parasitas não tratados em 0 min (100%). *** $p < 0,0001$ em relação ao controle. * $p < 0,05$ em relação ao controle não tratado.

4.18. Avaliação dos acidocalcisomas

Com o objetivo de investigar alterações no pH de acidocalcisomas de tripomastigotas de *T. cruzi*, foi utilizado o fluoróforo laranja de acridina. A distribuição desse fluoróforo na célula varia de acordo com o gradiente de pH, com maior acúmulo em ambientes ácidos. O composto **MR01** induziu uma intensificação da acidificação do pH dos acidocalcisomas após uma hora de tratamento, dado uma significativa ($p < 0.05$) redução dos níveis de fluorescência em relação ao grupo controle. Após duas horas, foi observado o reestabelecimento da homeostasia, com níveis de fluorescência similares ao grupo controle. A nigericina foi utilizada como controle positivo, onde foi observado aumento da fluorescência nos primeiros minutos de incubação (**Figura 30**), confirmando a alcalinização da organela.

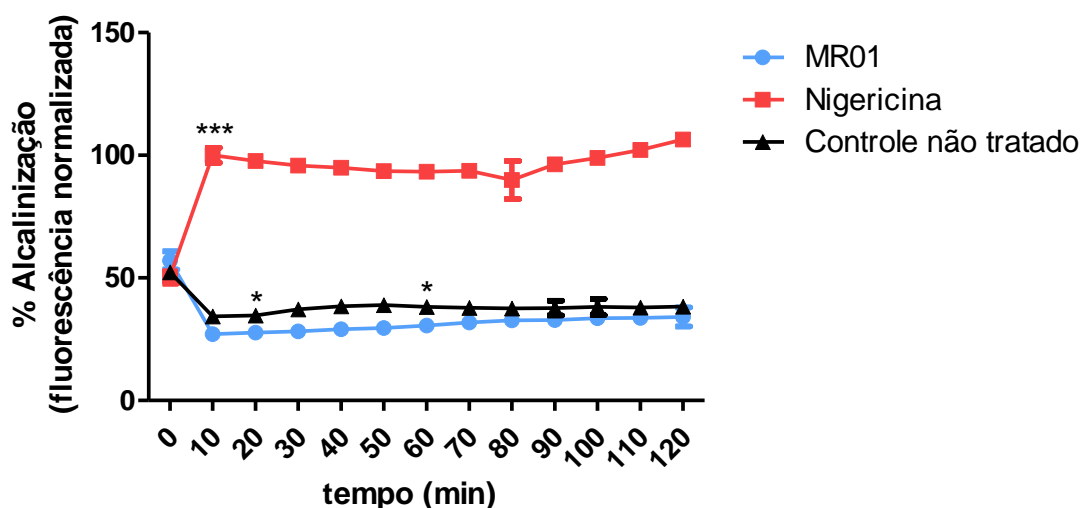


Figura 30: Avaliação da alcalinização de aciodocalcisosomas em tripomastigotas de *T. cruzi* após 2h de tratamento com **MR01** (130 μ M), utilizando o fluoróforo laranja de acridina (excitação 485 nm e emissão 535 nm). Parasitas não tratados e tratados com nigericina (4 μ M) foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente. A fluorescência foi relatada como uma porcentagem de nigericina em 10 minutos (100%). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,0001$ quando comparado ao controle não tratado.

4.19. Avaliação do Perfil de Proteína por Espectrometria de Massas

Por meio de espectrometria de massas MALDI-TOF/MS, o perfil espectral de proteínas dos tripomastigotas foi avaliado na presença do composto **MR01**. Assim, tripomastigotas (1×10^7 /poço) foram incubadas por 18 horas, incluindo-se controles não tratados, como o fármaco padrão benznidazol (40 μ M). Com base no espectro de massas, foi possível confirmar uma alteração no perfil proteico dos grupos tratados (**MR01** - vermelho; BZN - azul) quando comparados aos tripomastigotas não tratados (**Figura 31**). Alterações espectrais significativas foram observadas nos picos 4.590,997 m/z, 5.484,94 m/z; 6.130,859, com diminuição das intensidades em relação ao controle não tratado, assim como aumento da intensidade de outros picos (por exemplo 7.125,520 m/z). O fármaco benznidazol também foi analisado, demonstrando um perfil diferente de alterações espectrais ao composto **MR01**, podendo indicar um mecanismo de ação diferente.

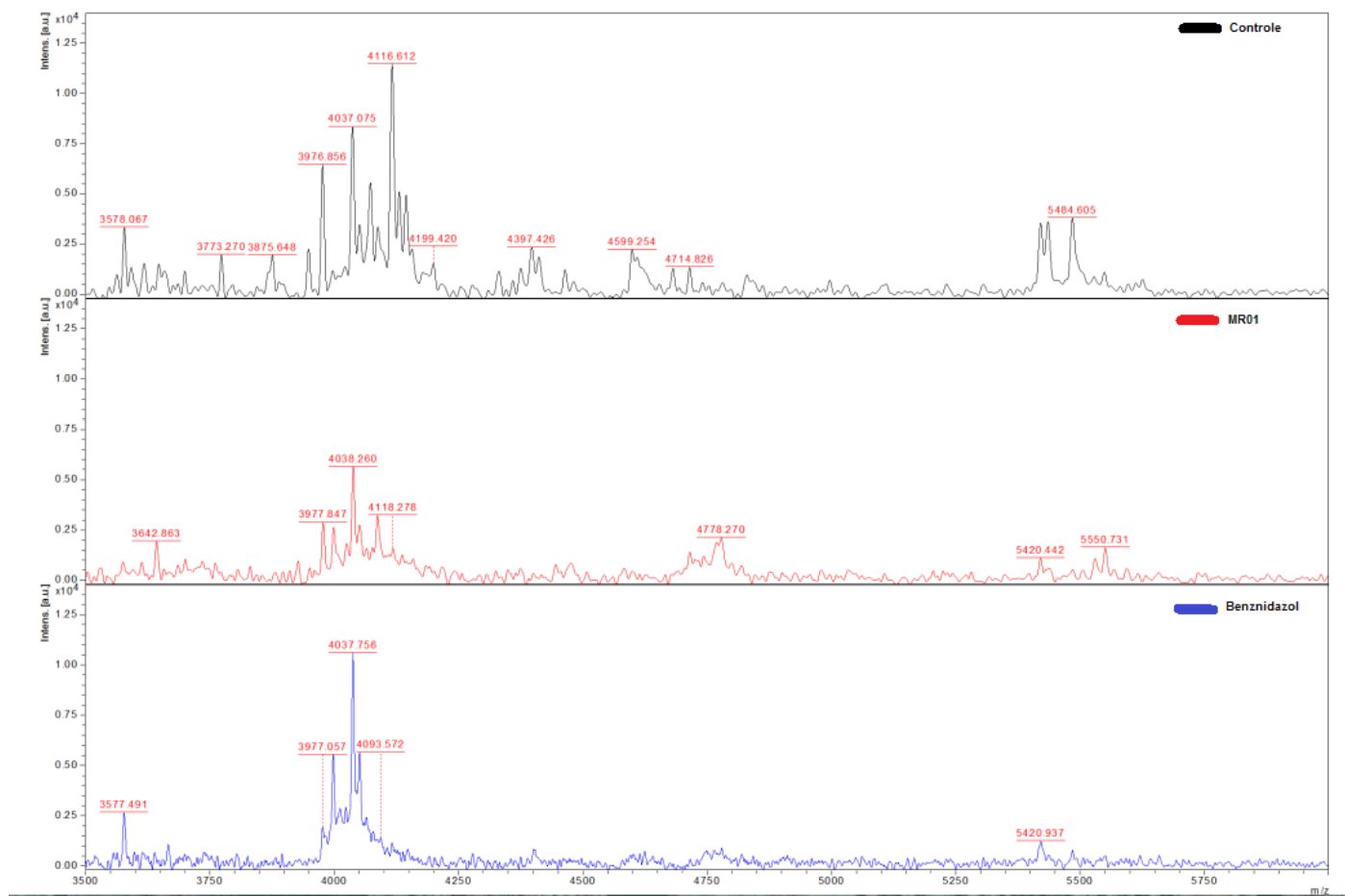


Figura 31: Avaliação do perfil proteico de tripomastigotas de *T. cruzi* na presença do composto **MR01**. Espectro de massas de tripomastigotas tratados com **MR01** (linhas vermelhas - 130 μ M), tratados com benznidazol (linhas azuis - 40 μ M) e não tratadas (linhas pretas). Os parasitas foram tratados por 18 horas, e após o tratamento, as amostras foram analisadas em MALDI-TOF/MS Microflex (Bruker-Daltonics, Bremen, Alemanha). O perfil de proteína dos parasitas tratados foi comparado com o perfil proteico dos parasitas não tratados.

5. Discussão

A doença de Chagas é um grave problema de saúde pública que afeta mais de 7 milhões de pessoas, dispondo de apenas um fármaco aprovado no Brasil para seu tratamento. Porém, o benznidazol apresenta elevada toxicidade e uma eficácia bastante reduzida, principalmente durante a fase crônica da doença, contribuindo para a descontinuidade do tratamento. Em 2021, foi publicado um estudo (BENDITA), organizado pelo *DNDi*, que teve como objetivo, avaliar a eficácia de doses menores em tempos reduzidos de tratamento com o benznidazol. Atualmente, o esquema posológico, para adultos, preconiza a dose de 5 mg/kg/dia por 60 dias (CONITEC, 2018). Como resultado, o estudo apresentou uma eficácia de 89% na redução da parasitemia em até seis meses de acompanhamento, quando administrado doses de 300 mg diários por duas semanas. Dessa forma, os efeitos adversos poderiam ser reduzidos, melhorando a aderência dos pacientes ao tratamento (Torrico *et al.*, 2021). Ainda que satisfatórios, estes resultados ainda não foram aplicados na clínica médica do Brasil.

A pesquisa por novos fármacos para a doença de Chagas continua uma necessidade urgente. Segundo Newman e Cragg (2020), no período entre 1980 a 2019, apenas 20 novos antiparasitários foram aprovados, e nenhum para a doença de Chagas. Dentre as fontes para a descoberta de novos fármacos, pode-se destacar a busca em produtos naturais. Compostos presentes em plantas, animais, organismos marinhos, microrganismos de vida livre e simbiontes, têm se mostrado uma fonte promissora para a descoberta de novas moléculas terapêuticas, com diversas propriedades biológicas, incluindo antibacteriana, antiprotozoária, antimicobacteriana, antitumoral e antiviral (Martins *et al.*, 2016; Lazarin-Bidoia *et al.*, 2022).

Em nosso trabalho, foi isolado do coral marinho, *Tubastraea tagusensis*, um alcaloide indólico (**MR01**) e investigou-se sua atividade contra *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi*. O ambiente marinho é um

local único para a busca de novas moléculas, principalmente pelo fato de existir uma forte competição pela sobrevivência e disputa por espaço. Esse ambiente hostil, faz com que os organismos marinhos utilizem metabólitos exclusivos para defesa, ataque e sinalização. Esses metabólitos, apresentam um grande potencial para novos protótipos farmacêuticos (Bedi *et al.*, 2022). Na clínica, os fármacos aprovados com protótipos de origem marinha, incluem fármacos para o tratamento de câncer, tratamento de dor neuropática e hipertrigliceridemia, e fármacos antivirais porém, nenhum ainda aprovado para o tratamento de DTNs (Torres *et al.*, 2014).

Os corais da ordem Scleractina, em destaque os da espécie *Tubastraea*, são conhecidos por possuir metabólitos envolvidos na defesa química (Carpes *et al.*, 2020). É conhecido que esses corais utilizem essas estratégias para a disputa de espaço e colonização, principalmente contra espécies endêmicas de corais, como *Mussismilia hispida* e *Siderastrea stellata*, causando danos nos tecidos e, conseqüentemente aumentando a mortalidade dessas espécies nativas (Silva *et al.*, 2022). Esses metabólitos também são eficazes na defesa contra predação por peixes. A produção de metabólitos, usados para a defesa química, é comum a muitos invertebrados marinhos sésseis sendo uma resposta evolutiva às desvantagens ecológicas de predadores (Lages *et al.*, 2010; Carpes *et al.*, 2020; Guilherme da Silva *et al.*, 2022).

No presente estudo, o composto alcaloide **MR01** demonstrou seletividade contra formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, sendo esta última, a forma intracelular de altíssima relevância clínica. A capacidade de eliminar ambas as formas do parasita envolvidas na infecção humana, é de extrema importância, uma vez que compostos com alvo apenas em amastigotas intracelulares podem deixar os tripomastigotas infectantes na circulação mantendo a infecção mesmo após o tratamento (Chatelain, 2015).

Diferentes classes de compostos químicos naturais de organismos marinhos têm apresentado atividade antiprotozoária, como diterpenos,

acetogeninas, polifenóis, esteróis, terpenos, além de alcaloides. Muitos exemplos de alcaloides indólicos, isolados de organismos marinhos e terrestres, com atividade contra tripanosomatídeos, vêm sendo descritos na literatura (Cockram e Smith, 2018; Tempone *et al.*, 2021). Os alcaloides indólicos são uma classe de produtos naturais que possuem um núcleo indol, esse núcleo é a chave de diversas moléculas bioativas (Cockram e Smith, 2018). Dentre eles, o composto iotrochamida A, isolado da esponja *Iotrochota* sp., mostrou uma potente atividade tripanocida com um valor de CE₅₀ de 4,7 µM contra *T. brucei* (Feng *et al.*, 2015). Um alcaloide denominado β-carbolina, fascaplisina, isolado da esponja marinha *Hyrtios*, demonstrou atividade contra *T. b. rhodesiense* com valores de CE₅₀ de 0,63 µM (Kirsch *et al.*, 2000). Do fracionamento do extrato de acetato de etila da bactéria marinha *Bacillus pumilus*, três alcaloides indólicos foram isolados, apresentando valores de CE₅₀ de 19 – 26 µM em amastigotas de *T. cruzi* (Martínez-Luis *et al.*, 2012). Desta forma, confirma-se que organismos marinhos são uma fonte extremamente promissora de metabólitos que podem servir de inspiração para síntese de novos fármacos (Shilabin *et al.*, 2008; Tchokouaha Yamthe *et al.*, 2017; Alvarez-Bardon *et al.*, 2020).

Em *Drug Discovery*, para que um composto seja considerado promissor, deve apresentar seletividade, isto é, eliminar o patógeno em concentrações distintas daquelas que causam danos às células de mamíferos. O composto **MR01** não apresentou citotoxicidade para fibroblastos NCTC até a maior concentração testada. É importante mencionar que a toxicidade em células de mamíferos tem sido um fator limitante entre os compostos com atividade anti-*T. cruzi* isolados de produtos naturais; novos protótipos devem apresentar baixa citotoxicidade, uma vez que os fármacos utilizados na clínica apresentam um número significativo de efeitos adversos, podendo levar a descontinuidade do tratamento (Wright *et al.*, 2002; Kossuga *et al.*, 2008; Regalado *et al.*, 2010; Gambino e Otero, 2022).

Uma vez que a atividade contra o *T. cruzi* foi detectada, foram realizados estudos *in silico* para avaliar parâmetros farmacocinéticos, farmacodinâmicos e físico-químicos. Esses estudos devem ser realizados no início da pesquisa, uma vez que os principais motivos para a falha de candidatos em ensaios clínicos, relacionam-se à pouca aderência aos perfis de fármacos aprovados (Tuntland *et al.*, 2014).

Considerando o potencial do composto **MR01** contra o *T. cruzi*, investigamos sua aderência aos parâmetros de *drug-likeness* utilizando a plataforma online SwissADME. As análises sugeriram que o **MR01** apresenta elevada absorção gastrointestinal e boa biodisponibilidade oral. Esse parâmetro pode indicar se a administração do composto pode ocorrer pela via oral, via esta, preferencial para novos fármacos, devido a sua facilidade de administração e melhor adesão do paciente (Katsuno *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2021).

A análise físico-química como Log P, que é definida pela relação entre a concentração do composto na fase orgânica e na fase aquosa, demonstrou valores ideais para Log P (1,73), além de outros parâmetros associados à atividade como a polaridade (TPSA), massa molecular (tamanho) e flexibilidade. Os valores ideais para Log P variam de -0,7 a 5,0, e valores mais altos impactam na baixa solubilidade em água. O composto **MR01** apresentou baixo peso molecular de 319 g/mol, valor inserido na faixa ótima entre 150 e 500 g/mol (Rodrigues *et al.*, 2021).

Para o parâmetro de flexibilidade, os compostos não devem exceder mais de nove ligações rotativas (Daina *et al.*, 2017) e o valor previsto para **MR01** de 1, sendo um valor adequado para este modelo, segundo a literatura. A polaridade do **MR01** resultou em 74,48 Å, valor inserido na faixa ótima entre 20 e 130 Å. A solubilidade (Log S) resultou em um valor de -3,21; de acordo com o modelo *ESOL* o valor ótimo não deve ser superior a 6. A saturação, que representa a fração de carbonos sp³ apresentou um valor de 0,08, porém este valor não estava de acordo com o valor ótimo ($\geq 0,25$) descrito na literatura (Daina *et al.*, 2017).

Além disso, **MR01** não é permeável através da barreira hematoencefálica; essa capacidade é um parâmetro importante, uma vez que uma concentração sistêmica do composto poderia resultar em efeitos adversos e toxicidade ao sistema nervoso central (Monteiro-Neto *et al.*, 2020). No entanto, os compostos que atuam como substratos da glicoproteína P (P-gp) são impedidos de entrar no cérebro. A P-gp é uma proteína de superfície, presente na membrana citoplasmática, e é capaz de modular o fluxo de xenobióticos através das barreiras celulares, contribuindo para a expulsão de fármacos dos hepatócitos e túbulos renais para o espaço luminal (Alavijeh *et al.*, 2005; Szakács *et al.*, 2008).

Outro parâmetro importante a ser avaliado é a interação das moléculas com o citocromo P450 (CYP). Essa superfamília de isoenzimas é um elemento-chave na eliminação de compostos químicos por meio da biotransformação metabólica. O CYP possui cinco isoformas principais (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4) que, quando inibidas, podem induzir efeitos adversos e toxicidade devido ao maior acúmulo do composto e seus metabólitos nas células (Szakács *et al.*, 2008; Daina *et al.*, 2017). A predição *in silico* sugere que **MR01** não é um substrato da glicoproteína P, porém, que seja um possível inibidor de duas enzimas do citocromo P450.

A plataforma SwissADME também avalia a aderência a cinco diferentes filtros de grandes empresas farmacêuticas, e tem como objetivo, a seleção de candidatos a fármacos com melhores perfis de segurança. Um dos filtros mais conhecidos é de Lipinski, conhecido como “regra dos cinco”, amplamente usado para selecionar compostos líderes (Lipinski *et al.*, 2001; Don e Ioset, 2013). O composto **MR01** foi aprovado em 100% destes filtros (Lipinski - Pfizer, The Ghose - Amgen, Veber - GSK, Egan - Pharmacia e Muegge - Bayer). Segundo os critérios do DNDi para a seleção de novos compostos líderes, o sucesso nos estudos *in silico* permitem uma melhor avaliação durante a seleção de novos candidatos terapêuticos em *Drug Discovery* (Don e Ioset, 2013). No entanto, **MR01** mostrou um alerta para compostos de interferência, conhecido como *pan-*

assay interference compounds (PAINS) e um alerta para o filtro de Brenk. Cerca de 5% dos produtos naturais e fármacos sintéticos aprovados pelo FDA contêm subestruturas *PAINS*. Compostos *PAINS* podem reagir com ensaios biológicos podendo interferir nas análises, gerando resultados falso-positivos (Baell, 2016). Porém, muitos destes compostos que apresentam estas características de *PAINS*, são avaliados apenas em estudos enzimáticos (*target-based*), sendo reprovados assim que iniciam os estudos fenotípicos. Segundo Gilbert (2013), os estudos fenotípicos para seleção de novos fármacos em protozoários são considerados os mais promissores até o momento. Por já se apresentarem como um filtro de elevada dificuldade para a nova molécula, os estudos fenotípicos, e principalmente os modelos intracelulares como do *T. cruzi* (amastigotas), reduzem imensamente o número de possíveis candidatos, selecionando apenas os mais promissores.

O entendimento do mecanismo de ação (*MoA*) é crucial para o desenvolvimento de novos fármacos, podendo gerar informações para melhoria na potência, e também possibilitando a exclusão de possíveis estruturas que possam gerar toxicidade (Davis, 2020). O mecanismo de ação do composto **MR01** foi avaliado contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

A membrana celular é essencial para a sobrevivência celular, conferindo forma e sendo responsável pelo transporte de nutrientes e íons entre o ambiente extracelular e intracelular (Chen *et al.*, 2007; Mucci *et al.*, 2017). A membrana celular do *T. cruzi* é formada por duas camadas de mucinas glicosiladas e com glicoinositolfosfolipídios, glicoconjugados que costumam estar ausentes em mamíferos, fazendo com que a membrana celular do parasita seja um alvo promissor (Tiwari *et al.*, 2018). No estudo para avaliar de alterações da permeabilidade da membrana, foi utilizado um marcador fluorescente, quando essa membrana plasmática é comprometida, o fluoróforo a penetra facilmente, sendo assim, o aumento da fluorescência está ligado à quantidade de fluoróforo que se liga aos ácidos nucleicos, estando diretamente relacionada ao aumento da

permeabilidade celular (Johnson e Spence, 2010). A ação do **MR01** na membrana plasmática dos tripomastigotas foi avaliada e o composto não alterou a permeabilidade da membrana do parasita. Desta forma, foi dado continuidade a novos estudos para investigação de organelas-alvo.

Uma organela importante a ser investigada é a mitocôndria, por ser responsável pela produção de energia da célula, envolvida no crescimento, diferenciação, homeostase de cálcio, resposta ao estresse, assim como na morte celular. Além de apresentar um papel crucial na sobrevivência do parasita, a mitocôndria é um interessante alvo visto que está presente como uma organela única em tripanosomatídeos, diferenciando, assim, dos mamíferos que possuem milhares de mitocôndrias em suas células (Menna-Barreto e de Castro, 2014). Neste contexto, a busca por compostos que tenham como alvo terapêutico essa organela vem sendo abordado como uma estratégia promissora para os tripanosomatídeos (Menna-Barreto e Castro, 2014; Sundar e Singh, 2018, Brindha *et al.*, 2021).

Como um primeiro experimento para analisar possíveis danos à mitocôndria, foi avaliado o potencial elétrico dessa organela. Para isso, foi utilizado um marcador de potencial (JC-1) que se acumula na mitocôndria. Em baixas concentrações, existe na forma de monômeros, emitindo uma fluorescência verde, quando esse marcador está em altas concentrações, se comporta na forma de agregados, emitindo uma fluorescência vermelha. Dessa forma, quando a formação de agregados aumenta juntamente com o potencial da membrana mitocondrial, a despolarização pode ser analisada pela diminuição da razão de fluorescência vermelha/verde (Cossarizza *et al.*, 1993; Johnson e Spence, 2010). Neste trabalho, o composto **MR01** induziu uma despolarização significativa do potencial da membrana mitocondrial.

Uma alteração do potencial elétrico da membrana mitocondrial, em tripanosomatídeos, pode resultar na morte celular (Smirlis *et al.*, 2010). A mitocôndria também está envolvida na síntese de ATP através da fosforilação oxidativa, e dessa forma, sua despolarização pode resultar

em colapso da cadeia respiratória, alterando os níveis de ATP (Manzano *et al.*, 2011). O ATP é um mediador do sistema bioenergético, considerado a fonte de energia mais importante para as células (Manzano *et al.*, 2011; Menna-Barreto e de Castro, 2014). Usando um ensaio de luminescência com luciferina, investigamos os níveis de ATP em tripomastigotas de *T. cruzi*. Uma diminuição significativa desses níveis foi detectada após o tratamento com **MR01**. Essas alterações podem ser atribuídas aos danos mitocondriais, uma vez que variações no potencial de membrana dessa organela podem alterar a permeabilidade dos prótons, levando a falhas na fosforilação oxidativa e consequentes danos ao metabolismo levando a deficiência de energia e morte do parasita (Rajendran *et al.*, 2016).

Durante a síntese de ATP na mitocôndria, as células produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) em baixas concentrações. Caso não sejam eliminadas, as ROS podem causar danos ao DNA, proteínas, lipídios e levando à morte celular. Essas espécies reativas de oxigênio geradas pela mitocôndria devem ser controladas, porém, em níveis basais, são responsáveis pela regulação da autofagia, imunidade, crescimento e diferenciação celular (Reczek e Chandel, 2015; Mittera *et al.*, 2016). Considerando o desbalanceamento mitocondrial e as variações de ATP observados no presente estudo, foram analisados os níveis de ROS em tripomastigotas tratados com o composto **MR01**, porém, nenhuma alteração foi observada quando comparados ao grupo controle não tratado. Níveis alterados de ROS podem resultar em estresse oxidativo, levando o parasita a morte (Vázquez *et al.*, 2017). Os dados do presente estudo, sugerem que o sistema de detoxificação celular pode ter sido suficiente para controlar um possível aumento destes radicais, evitando danos celulares.

Além do papel no metabolismo energético, as mitocôndrias também participam da sinalização e da reserva de cálcio (Ca^{2+}). O Ca^{2+} intracelular é essencial para a mobilidade celular, invasão e saída da célula hospedeira, diferenciação do parasita, osmorregulação, manutenção do citoesqueleto e regulação da morte celular programada. (Ramakrishnan e

DoCampo, 2018; Scarpelli *et al.*, 2020). Diversos canais de Ca^{2+} na membrana plasmática, acidocalcisomas e canais de influxo e efluxo presentes nas mitocôndrias são descritos em *Trypanosoma* spp.. O Ca^{2+} também é encontrado em proteínas de ligação presentes na membrana do flagelo (Docampo *et al.*, 2015; Scarpelli *et al.*, 2020). No presente estudo, **MR01** levou a uma redução dos níveis de Ca^{2+} em tripomastigotas. Essa diminuição pode resultar em uma queda na infectividade do *T. cruzi* e, também interferir na osmorregulação e manutenção do parasita, levando à morte celular. Organelas ácidas, como endolisossomos e acidocalcisomas, também contribuem para as oscilações dos níveis Ca^{2+} (Scarpelli *et al.*, 2020).

Em especial, acidocalcissomas são organelas eletrodensas, delimitadas por uma membrana e estão presentes em todas as espécies. Esses compartimentos acídicos são o principal local de armazenamento de fósforo (poli P), cálcio e outros cátions. Os acidocalcissomas também são responsáveis pela osmorregulação e manutenção do pH intracelular, sendo mantidos por duas bombas de prótons, pirofosfatase e ATPase (Docampo e Moreno, 2011; Lander *et al.*, 2016, Docampo, 2016). Em nossos estudos, foi possível observar uma intensificação da acidificação dessas organelas após o tratamento com **MR01**, o que pode estar relacionado à diminuição do cálcio no citosol, possivelmente sequestrado pelos acidocalcissomas.

Alterações proteômicas têm sido observadas em *Trypanosoma cruzi* após tratamento com compostos químicos candidatos a fármacos (de Castro *et al.*, 2021). As proteínas são macromoléculas biológicas constituídas por uma ou mais cadeias de aminoácidos, estão presentes em todos os seres vivos e participam de todos os processos celulares, desempenhando diversas funções nas células. Em tripanosomatídeos, diversas proteínas são distribuídas ao longo do corpo celular, flagelo e bolsa flagelar do parasita (Ferragut *et al.*, 2021). As proteínas são necessárias para o mecanismo de replicação, evasão e virulência, modulando a invasão do hospedeiro. Além disso, proteínas mitocondriais são necessárias para as

vias respiratórias, oxidativas e biossintéticas (Maldonado *et al.*, 2021; de Castro Neto *et al.*, 2021). No presente trabalho, investigamos o perfil protéico de tripomastigotas tratados com **MR01**, utilizando uma ferramenta espectrométrica como o MALDI-TOF/MS. Estudos denominados *machine learning* tem sido aplicados a tecnologia de espectrometria de massas para avaliação do mecanismo de ação de fármacos (van Oosten e Klein, 2020).

Comparando com o grupo não tratado (controle), foi possível observar que a incubação com **MR01**, resultou em alterações significativas do perfil espectral das proteínas do *Trypanosoma cruzi* após 18 horas. Estas alterações resultaram em significativas reduções da intensidade de diferentes proteínas. Os dados também indicaram que as alterações no grupo tratado com **MR01** foram bastante diferentes daquelas observadas nos parasitas tratados com o fármaco benznidazol. Segundo van Oosten e Klein (2020), estas diferenças entre os espectros de massas, podem sugerir mecanismos de ação distintos entre os compostos estudados, sendo esta, uma característica importante para a descoberta de novos candidatos a fármacos com ações letais diferenciadas em relação ao fármaco em uso clínico (benznidazol).

Os produtos naturais marinhos são opções promissoras na busca por novos candidatos para a descoberta de novas moléculas, oferecendo novos protótipos químicos para uma variedade de doenças humanas. No presente estudo, a bioatividade do extrato AcOEt das colônias de *Tubastraea tagusensis* proporcionou o isolamento de um alcaloide indólico (**MR01**). O alcaloide isolado apresentou não somente potência, mas acima de tudo, uma elevada seletividade para o parasita, tendo atividade anti-*Trypanosoma cruzi* contra ambas as formas. Os estudos de mecanismo de ação demonstraram que o **MR01** induziu ação letal irreversível, gerando um distúrbio bioenergético. Por fim, os estudos *in silico* sugeriram que o **MR01** é um composto promissor, aderindo a diversas características *drug-likeness* desejadas de fármacos já aprovados. Dessa forma, podemos afirmar que o alcaloide **MR01** é um

candidato promissor, podendo ser utilizado em futuros estudos de otimização como protótipo para síntese de novos derivados contra o *Trypanosoma cruzi*.

6. Conclusões

- 1- Foi observada a atividade antiparasitária inédita do extrato AcOEt das colônias do coral *Tubastraea tagusensis*.
- 2- O fracionamento biomonitorado do extrato AcOEt resultou no isolamento de um alcaloide indólico (**MR01**), o qual foi quimicamente elucidado por técnicas espectrométricas e espectroscópicas.
- 3- O composto apresentou atividade inédita contra o *Trypanosoma cruzi*, sendo tripanocida para ambas as formas do parasita.
- 4- O alcaloide isolado **MR01** não apresentou citotoxicidade contra uma linhagem celular de mamífero na concentração máxima testada.
- 5- O mecanismo de ação do composto **MR1** em *Trypanosoma cruzi* resulta na despolarização do potencial de membrana mitocondrial, com redução dos níveis de ATP, levando o parasita à morte.
- 6- Foi observada ainda uma acidificação dos acidocalcisomas, com diminuição dos níveis de Ca^{2+} citosólicos.
- 7- O tratamento dos tripomatigotas com **MR01** resultou em alterações do espectro de massas de proteínas do parasita, sendo estas, distintas daquelas observadas no tratamento com o fármaco benznidazol, sugerindo um mecanismo de ação diferenciado.
- 8- Os estudos *in silico*, sugeriram que o **MR01** é um composto promissor, aderindo à várias características denominadas “*drug-likeness*”, podendo ser utilizado em futuros estudos de otimização molecular para o desenvolvimento de novos fármacos contra o *T. cruzi*.

7. Referências

Akbari M, Oryan A, Hatam G. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. *Acta Trop.* 2017 Aug;172:86-90. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.04.029.

Alavijeh MS, Chishty M, Qaiser MZ, Palmer AM. Drug metabolism and pharmacokinetics, the blood-brain barrier, and central nervous system drug discovery. *NeuroRx.* 2005;2(4):554-571. doi:10.1602/neurorx.2.4.554

Álvarez MG, Ramírez JC, Bertocchi G, Fernández M, Hernández Y, Lococo B, Lopez-Albizu C, Schijman A, Cura C, Abril M, Laucella S, Tarleton RL, Natale MA, Castro Eiro M, Sosa-Estani S, Viotti R. New Scheme of Intermittent Benznidazole Administration in Patients Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi*: Clinical, Parasitological, and Serological Assessment after Three Years of Follow-Up. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020 Aug 20;64(9):e00439-20. doi: 10.1128/AAC.00439-20.

Álvarez-Bardón M, Pérez-Pertejo Y, Ordóñez C, Sepúlveda-Crespo D, Carballeira NM, Tekwani BL, Murugesan S, Martínez-Valladares M, García-Estrada C, Reguera RM, Balaña-Fouce R. Screening Marine Natural Products for New Drug Leads against Trypanosomatids and Malaria. *Mar Drugs.* 2020 Mar 31;18(4):187. doi: 10.3390/md18040187.

Amaral M, de Sousa FS, Silva TAC, Junior AJG, Taniwaki NN, Johns DM, Lago JHG, Anderson EA, Tempone AG. A semi-synthetic neolignan derivative from dihydrodieugenol B selectively affects the bioenergetic system of *Leishmania infantum* and inhibits cell division. *Sci Rep.* 2019 Apr 16;9(1):6114. doi: 10.1038/s41598-019-42273-z.

Assolini JP, Carloto ACM, Bortoleti BTDS, Gonçalves MD, Tomiotto Pellissier F, Feuser PE, Cordeiro AP, Hermes de Araújo PH, Sayer C, Miranda Sapla MM, Pavanelli WR. Nanomedicine in leishmaniasis: A promising tool for diagnosis, treatment and prevention of disease - An

update overview. *Eur J Pharmacol.* 2022 May 15;923:174934. doi: 10.1016/j.ejphar.2022.174934.

Baell JB. Feeling Nature's PAINS: Natural Products, Natural Product Drugs, and Pan Assay Interference Compounds (PAINS). *J Nat Prod.* 2016 Mar 25;79(3):616-28. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b00947.

Bauer A, Brönstrup M. Industrial natural product chemistry for drug discovery and development. *Nat Prod Rep.* 2014 Jan;31(1):35-60. doi: 10.1039/c3np70058e.

Bedi N, Srivastava DK, Srivastava A, Mahapatra S, Dkhar DS, Chandra P, Srivastava A. Marine biological macromolecules as matrix material for biosensor fabrication. *Biotechnol Bioeng.* 2022 Apr 25. doi: 10.1002/bit.28122.

Bekhit AA, El-Agroudy E, Helmy A, Ibrahim TM, Shavandi A, Bekhit AEA. Leishmania treatment and prevention: Natural and synthesized drugs. *Eur J Med Chem.* 2018 Dec 5;160:229-244. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.10.022.

Berlinck RG, Trindade-Silva AE, Santos MF. The chemistry and biology of organic guanidine derivatives. *Nat Prod Rep.* 2012 Dec;29(12):1382-406. doi: 10.1039/c2np20071f.

Bermudez J, Davies C, Simonazzi A, Real JP, Palma S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Trop.* 2016 Apr;156:1-16. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.12.017.

Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, Munro MH, Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep.* 2016 Mar;33(3):382-431. doi: 10.1039/c5np00156k.

Brum-Soares L, Cubides JC, Burgos I, Monroy C, Castillo L, González S, Viñas PA, Urrutia PP. High seroconversion rates in *Trypanosoma cruzi* chronic infection treated with benznidazole in people under 16 years in Guatemala. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2016 Nov-Dec;49(6):721-727. doi:

10.1590/0037-8682-0415-2016. PMID: 28001219. Trypanosoma cruzi: Gene Expression Surveyed by

Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. Lancet. 2018 Sep 15;392(10151):951-970. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31204-2.

Bush JT, Wasunna M, Alves F, Alvar J, Olliaro PL, Otieno M, Sibley CH, Strub Wourgaft N, Guerin PJ. Systematic review of clinical trials assessing the therapeutic efficacy of visceral leishmaniasis treatments: A first step to assess the feasibility of establishing an individual patient data sharing platform. PLoS Negl Trop Dis. 2017 Sep 5;11(9):e0005781. doi: 10.1371/journal.pntd.0005781.

Carpes RM, Corrêa Fernandes D, Coelho MGP, Creed JC, Fleury BG, Garden SJ, Felzenszwalb I. Anti-inflammatory potential of invasive sun corals (Scleractinia: Tubastraea spp.) from Brazil: alternative use for management? J Pharm Pharmacol. 2020 Apr;72(4):633-647. doi: 10.1111/jphp.13232.

Castro CB, Pires DO. Brazilian coral reefs: what we already know and what is still missing. Bull Mar Sci 2001; 69:357–371.

Chatelain E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. J Biomol Screen. 2015 Jan;20(1):22-35. doi: 10.1177/1087057114550585.

Chávez S, Urbaniak MD, Benz C, Smircich P, Garat B, Sotelo-Silveira JR, Duhagon MA. Extensive Translational Regulation through the Proliferative Transition of Trypanosoma cruzi Revealed by Multi-Omics. mSphere. 2021 Sep 1:e0036621. doi: 10.1128/mSphere.00366-21.

Chen RR. Permeability issues in whole-cell bioprocesses and cellular membrane engineering. Appl Microbiol Biotechnol. 2007 Mar;74(4):730-8. doi: 10.1007/s00253-006-0811-x.

Chicharro C, Granata C, Lozano R, Andreu D, Rivas L. N-terminal fatty acid substitution increases the leishmanicidal activity of CA(1-7)M(2-9), a

cecropin-melittin hybrid peptide. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Sep;45(9):2441-9. doi: 10.1128/AAC.45.9.2441-2449.2001..

Cockram PE, Smith TK. Active Natural Product Scaffolds against Trypanosomatid Parasites: A Review. *J Nat Prod.* 2018 Sep 28;81(9):2138-2154. doi: 10.1021/acs.jnatprod.8b00159.

CONITEC, Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença de Chagas. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS, 2018. Disponível em http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2018/Recomendacao/Relatorio_P_CDT_Doenca_de_Chagas.pdf .

Corral MJ, Benito-Peña E, Jiménez-Antón MD, Cuevas L, Moreno-Bondi MC, Alunda JM. Allicin Induces Calcium and Mitochondrial Dysregulation Causing Necrotic Death in Leishmania. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; doi: 10:e0004525.

Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature.* 2010 Jun 24;465(7301):S6-7. doi: 10.1038/nature09221.

Creed, J.C. Two invasive alien azooxanthellate corals, *Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis*, dominate the native zooxanthellate *Mussismilia hispida* in Brazil. *Coral Reefs* 25, 350 (2006). <https://doi.org/10.1007/s00338-006-0105-x>.

Croft SL, Engel J. Miltefosine--discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006 Dec;100 Suppl 1:S4-8. doi: 10.1016/j.trstmh.2006.03.009.

Croft SL, Neal RA, Pendergast W, Chan JH. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochem Pharmacol.* 1987 Aug 15;36(16):2633-6. doi: 10.1016/0006-2952(87)90543-0.

da Costa-Silva TA, Silva ML, Antar GM, Tempone AG, Lago JHG. Ent-kaurane diterpenes isolated from n-hexane extract of *Baccharis*

sphenophylla by bioactivity-guided fractionation target the acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. *Phytomedicine*. 2021 Dec;93:153748. doi: 10.1016/j.phymed.2021.153748.

Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep*. 2017 Mar 3;7:42717. doi: 10.1038/srep42717.

David, B., Wolfender, JL. & Dias, D.A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. *Phytochem Rev* 14, 299–315 (2015). <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9367-z>.

Davis RL. Mechanism of Action and Target Identification: A Matter of Timing in Drug Discovery. *iScience*. 2020 Aug 21;23(9):101487. doi: 10.1016/j.isci.2020.101487.

de Castro Neto AL, da Silveira JF, Mortara RA. Comparative Analysis of Virulence Mechanisms of Trypanosomatids Pathogenic to Humans. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Apr 16;11:669079. doi: 10.3389/fcimb.2021.669079.

ocampo R, Huang G. Calcium signaling in trypanosomatid parasites. *Cell Calcium*. 2015 Mar;57(3):194-202. doi: 10.1016/j.ceca.2014.10.015.

Docampo R, Moreno SN. Acidocalcisomes. *Cell Calcium*. 2011 Aug;50(2):113-9. doi: 10.1016/j.ceca.2011.05.012.

Docampo R, Scott DA, Vercesi AE, Moreno SN. Intracellular Ca²⁺ storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J*. 1995 Sep 15;310 (Pt 3)(Pt 3):1005-12. doi: 10.1042/bj3101005.

Docampo R. The origin and evolution of the acidocalcisome and its interactions with other organelles. *Mol Biochem Parasitol*. 2016 Sep-Oct;209(1-2):3-9. doi: 10.1016/j.molbiopara.2015.10.003.

Dolai S, Yadav RK, Pal S, Adak S. Overexpression of mitochondrial *Leishmania major* ascorbate peroxidase enhances tolerance to oxidative

stress-induced programmed cell death and protein damage. *Eukaryot Cell*. 2009 Nov;8(11):1721-31. doi: 10.1128/EC.00198-09.

Don R, Ioset JR. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. *Parasitology*. 2014 Jan;141(1):140-6. doi: 10.1017/S003118201300142X.

El-Sayed M and Verpoorte R. (2007). *Catharanthus* terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation. *Phytochem. Rev.* 6, 277–305. doi: 10.1007/s11101-006-9047-8

Faulkner DJ, Harper MK, Haygood MG, Salomon CE, Schmidt EW. Symbiotic bacteria in sponges: Sources of bioactive substances. In *Drugs from the Sea*; Fusetani, N., Ed.; Karger: Basel, Switzerland, 2000; pp. 107–119. doi: 10.1159/000062486.

Feng Y, Davis RA, Sykes ML, Avery VM, Quinn RJ. Iotrochamides A and B, antitrypanosomal compounds from the Australian marine sponge *Iotrochota* sp. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012 Jul 15;22(14):4873-6. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.05.029.

Ferragut F, Acevedo GR, Gómez KA. T Cell Specificity: A Great Challenge in Chagas Disease. *Front Immunol*. 2021 Jun 29;12:674078. doi: 10.3389/fimmu.2021.674078.

Gilbert IH. Drug discovery for neglected diseases: molecular target-based and phenotypic approaches. *J Med Chem*. 2013 Oct 24;56(20):7719-26. doi: 10.1021/jm400362b.

Guilherme da Silva A, Carlos-Júnior LA, Sasada Sato CY, Lages BG, Neres-Lima V, Sá de Oliveira FM, Maia LF, Cappa de Oliveira LF, Fleury BG. Living with an enemy: Invasive sun-coral (*Tubastraea* spp.) competing against sponges *Desmapsamma anchorata* in southeastern Brazil. *Mar Environ Res*. 2022 Feb;174:105559. doi: 10.1016/j.marenvres.2022.105559.

Hailu T, Yimer M, Mulu W, Abera B. Challenges in visceral leishmaniasis control and elimination in the developing countries: A review. *J Vector Borne Dis.* 2016 Jul-Sep;53(3):193-8. PMID: 27681541.

Harvey AL, Edrada-Ebel R, Quinn RJ. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat Rev Drug Discov.* 2015 Feb;14(2):111-29. doi: 10.1038/nrd4510.

Hu Y, Chen S, Yang F, Dong S. Marine Indole Alkaloids-Isolation, Structure and Bioactivities. *Mar Drugs.* 2021 Nov 24;19(12):658. doi: 10.3390/md19120658.

IBAMA. Plano Nacional De Prevenção, Controle e Monitoramento do Coral-Sol (*Tubastraea* Spp.) no Brasil. Ministério do Meio Ambiente. 2018.

Ibarra-Meneses AV, Moreno J, Carrillo E. New Strategies and Biomarkers for the Control of Visceral Leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 2020 Jan;36(1):29-38. doi: 10.1016/j.pt.2019.10.005.

ICMBio. Nossos moradores. Acesso 08 de outubro de 2021. Disponível em <https://www.icmbio.gov.br/eseectamoios/destaques/61-nossos-moradores.html>

Izumi E, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Veiga Júnior VF, Nakamura CV. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. *Nat Prod Rep.* 2011 Apr;28(4):809-23. doi: 10.1039/c0np00069h.

Jansen AM, Xavier SCC, Roque AL. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. *Parasites and Vectors.* 2018. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3067-2>

Jones AJ, Grkovic T, Sykes ML, Avery M. Trypanocidal Activity of Marine Natural Products. *Marine Drugs.* 2013. doi:10.3390/md11104058

Katsuno K, Burrows JN, Duncan K, Hooft van Huijsduijnen R, Kaneko T, Kita K, Mowbray CE, Schmatz D, Warner P, Slingsby BT. Hit and lead

criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nat Rev Drug Discov.* 2015 Nov;14(11):751-8. doi: 10.1038/nrd4683.

Khalifa SAM, Elias N, Farag MA, Chen L, Saeed A, Hegazy MF, Moustafa MS, Abd El-Wahed A, Al-Mousawi SM, Musharraf SG, Chang FR, Iwasaki A, Suenaga K, Alajlani M, Göransson U, El-Seedi HR. Marine Natural Products: A Source of Novel Anticancer Drugs. *Mar Drugs.* 2019 Aug 23;17(9):491. doi: 10.3390/md17090491.

Kirsch G, Köng GM, Wright AD, Kaminsky R. A new bioactive sesterterpene and antiplasmodial alkaloids from the marine sponge *hyrtios cf. erecta*. *J Nat Prod.* 2000 Jun;63(6):825-9. doi: 10.1021/np990555b.

Kochanowska-Karamyan AJ, Hamann MT. Marine indole alkaloids: potential new drug leads for the control of depression and anxiety. *Chem Rev.* 2010 Aug 11;110(8):4489-97. doi: 10.1021/cr900211p.

Kossuga MH, Nascimento AM, Reimão JQ, Tempone AG, Taniwaki NN, Veloso K, Ferreira AG, Cavalcanti BC, Pessoa C, Moraes MO, Mayer AM, Hajdu E, Berlinck RG. Antiparasitic, antineuroinflammatory, and cytotoxic polyketides from the marine sponge *Plakortis angulospiculatus* collected in Brazil. *J Nat Prod.* 2008 Mar;71(3):334-9. doi: 10.1021/np0705256.

Lages, B.G., Fleury, B.G., Hovell, A.M.C. et al. Proximity to competitors changes secondary metabolites of non-indigenous cup corals, *Tubastraea* spp., in the southwest Atlantic. *Mar Biol* 159, 1551–1559 (2012). <https://doi.org/10.1007/s00227-012-1941-6>

Lages BG, Fleury BG, Pinto AC, Creed JC. Chemical defenses against generalist fish predators and fouling organisms in two invasive ahermatypic corals in the genus *Tubastraea*. *Marine Ecology.* 31. 473-482. 2010. doi:10.1111/j.1439-0485.2010.00376.x.

Lander N, Cordeiro C, Huang G, Docampo R. Polyphosphate and acidocalcisomes. *Biochem Soc Trans.* 2016 Feb;44(1):1-6. doi: 10.1042/BST20150193.

Larghi EL, Bracca AB, Arroyo Aguilar AA, Heredia DA, Pergomet JL, Simonetti SO, Kaufman TS. Neocryptolepine: A Promising Indolisoquinoline Alkaloid with Interesting Biological Activity. Evaluation of the Drug and its Most Relevant Analogs. *Curr Top Med Chem*. 2015;15(17):1683-707. doi: 10.2174/1568026615666150427113937.

Lazarin-Bidóia D, Garcia FP, Ueda-Nakamura T, Silva SO, Nakamura CV. Natural compounds based chemotherapeutic against Chagas disease and leishmaniasis: mitochondrion as a strategic target. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2022 Mar 30;117:e220396. doi: 10.1590/0074-02760220396.

Lee SM, Kim MS, Hayat F, Shin D. Recent Advances in the Discovery of Novel Antiprotozoal Agents. *Molecules*. 2019 Oct 28;24(21):3886. doi: 10.3390/molecules24213886.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001 Mar 1;46(1-3):3-26. doi: 10.1016/s0169-409x(00)00129-0.

Liu C, Yang S, Wang K, Bao X, Liu Y, Zhou S, Liu H, Qiu Y, Wang T, Yu H. Alkaloids from Traditional Chinese Medicine against hepatocellular carcinoma. *Biomed Pharmacother*. 2019 Dec;120:109543. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109543.

Machin A, Telleria J, Brizard JP, Demette E, Séveno M, Ayala FJ, Tibayrenc M. Trypanosoma cruzi: gene expression surveyed by proteomic analysis reveals interaction between different genotypes in mixed in vitro cultures. *PLoS One*. 2014 Apr 18;9(4):e95442. doi: 10.1371/journal.pone.0095442.

Maia LF, Ferreira GR, Costa RC, Lucas NC, Teixeira RI, Fleury BG, Edwards HG, de Oliveira LF. Raman spectroscopic study of antioxidant pigments from cup corals *Tubastraea* spp. *J Phys Chem A*. 2014 May 15;118(19):3429-37. doi: 10.1021/jp501278w.

Maldonado E, Rojas DA, Urbina F, Solari A. The Use of Antioxidants as Potential Co-Adjuvants to Treat Chronic Chagas Disease. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Jun 25;10(7):1022. doi: 10.3390/antiox10071022.

Manzano JI, Carvalho L, Pérez-Victoria JM, Castanys S, Gamarro F. Increased glycolytic ATP synthesis is associated with tafenoquine resistance in *Leishmania major*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Mar;55(3):1045-52. doi: 10.1128/AAC.01545-10.

Martínez-Luis S, Gómez JF, Spadafora C, Guzmán HM, Gutiérrez M. Antitrypanosomal alkaloids from the marine bacterium *Bacillus pumilus*. *Molecules*. 2012 Sep 18;17(9):11146-55. doi: 10.3390/molecules170911146.

Martins LF, Mesquita JT, Pinto EG, Costa-Silva TA, Borborema SE, Galisteo Junior AJ, Neves BJ, Andrade CH, Shuhaib ZA, Bennett EL, Black GP, Harper PM, Evans DM, Fituri HS, Leyland JP, Martin C, Roberts TD, Thornhill AJ, Vale SA, Howard-Jones A, Thomas DA, Williams HL, Overman LE, Berlinck RG, Murphy PJ, Tempone AG. Analogues of Marine Guanidine Alkaloids Are in Vitro Effective against *Trypanosoma cruzi* and Selectively Eliminate *Leishmania (L.) infantum* Intracellular Amastigotes. *J Nat Prod*. 2016 Sep 23;79(9):2202-10. doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b00256.

Mattiazzi M, Vijayvergiya C, Gajewski CD, DeVivo DC, Lenaz G, Wiedmann M, Manfredi G. The mtDNA T8993G (NARP) mutation results in an impairment of oxidative phosphorylation that can be improved by antioxidants. *Hum Mol Genet*. 2004 Apr 15;13(8):869-79. doi: 10.1093/hmg/ddh103..

Menna-Barreto RF, de Castro SL. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. *Biomed Res Int*. 2014;2014:614014. doi: 10.1155/2014/614014.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde: volume 3. Brasília; 2017

Mitra B, Laranjeira-Silva MF, Perrone Bezerra de Menezes J, Jensen J, Michailowsky V, Andrews NW. A Trypanosomatid Iron Transporter that Regulates Mitochondrial Function Is Required for *Leishmania amazonensis* Virulence. *PLoS Pathog.* 2016 Jan 7;12(1):e1005340. doi: 10.1371/journal.ppat.1005340.

Monteiro-Neto V, de Souza CD, Gonzaga LF, da Silveira BC, Sousa NCF, Pontes JP, Santos DM, Martins WC, Pessoa JFV, Carvalho Júnior AR, Almeida VSS, de Oliveira NMT, de Araújo TS, Maria-Ferreira D, Mendes SJF, Ferro TAF, Fernandes ES. Cuminaldehyde potentiates the antimicrobial actions of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *PLoS One.* 2020 May 14;15(5):e0232987. doi: 10.1371/journal.pone.0232987.

Moretti NS, Mortara RA, Schenkman S. *Trypanosoma cruzi*. *Trends Parasitol.* 2020 Apr;36(4):404-405. doi: 10.1016/j.pt.2019.10.002.

Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A Jr, Rosas F, Villena E, Quiroz R, Bonilla R, Britto C, Guhl F, Velazquez E, Bonilla L, Meeks B, Rao-Melacini P, Pogue J, Mattos A, Lazdins J, Rassi A, Connolly SJ, Yusuf S; BENEFIT Investigators. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2015 Oct;373(14):1295-306. doi: 10.1056/NEJMoa1507574.

Mouri O, Morizot G, Van der Auwera G, et al. Easy identification of leishmania species by mass spectrometry. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(6):e2841. Published 2014 Jun 5. doi:10.1371/journal.pntd.0002841

Mucci J, Lantos AB, Buscaglia CA, Leguizamón MS, Campetella O. The *Trypanosoma cruzi* Surface, a Nanoscale Patchwork Quilt. *Trends Parasitol.* 2017 Feb;33(2):102-112. doi: 10.1016/j.pt.2016.10.004.

Mukherjee SB, Das M, Sudhandiran G, Shaha C. Increase in cytosolic Ca²⁺ levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Biol Chem*. 2002 Jul 5;277(27):24717-27. doi: 10.1074/jbc.M201961200.

Netz N, Opatz T. Marine Indole Alkaloids. *Mar Drugs*. 2015 Aug 6;13(8):4814-914. doi: 10.3390/md13084814.

Neves DP, et al. *Parasitologia humana*. 13^o ed. São Paulo: Atheneu; 2016.

Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod*. 2020 Mar 27;83(3):770-803. doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.

Nweze JA, Mbaaji FN, Li YM, Yang LY, Huang SS, Chigor VN, Eze EA, Pan LX, Zhang T, Yang DF. Potentials of marine natural products against malaria, leishmaniasis, and trypanosomiasis parasites: a review of recent articles. *Infect Dis Poverty*. 2021 Jan 22;10(1):9. doi: 10.1186/s40249-021-00796-6.

Pecoul B, Batista C, Stobbaerts E, Ribeiro I, Vilasanjuan R, Gascon J, Pinazo MJ, Moriana S, Gold S, Pereiro A, Navarro M, Torrico F, Bottazzi ME, Hotez PJ. The BENEFIT Trial: Where Do We Go from Here? *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Feb 25;10(2):e0004343. doi: 10.1371/journal.pntd.0004343.

Pereira RB, Evdokimov NM, Lefranc F, Valentão P, Kornienko A, Pereira DM, Andrade PB, Gomes NGM. Marine-Derived Anticancer Agents: Clinical Benefits, Innovative Mechanisms, and New Targets. *Mar Drugs*. 2019 Jun 2;17(6):329. doi: 10.3390/md17060329.

Rajendran M, Dane E, Conley J, Tantama M. Imaging Adenosine Triphosphate (ATP). *Biol Bull*. 2016 Aug;231(1):73-84. doi: 10.1086/689592.

Ramakrishnan S, Docampo R. Membrane Proteins in Trypanosomatids Involved in Ca²⁺ Homeostasis and Signaling. *Genes (Basel)*. 2018 Jun 19;9(6):304. doi: 10.3390/genes9060304.

Ramirez-Llodra, E.; Brandt, A.; Danovaro, R.; De Mol, B.; Escobar, E.; German, C.; Levin, L.; Arbizu, P.; Menot, L.; Buhl-Mortensen, P. Deep, diverse and definitely different: Unique attributes of the world's largest ecosystem. *Biogeosciences* 2010, 7, 2851–2899. doi: 10.5194/bg-7-2851-2010

Rassi A Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am*. 2012;26:275–91. doi:10.1016/j.idc.2012.03.002.

Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010 Apr 17;375(9723):1388-402. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X.

Reczek CR, Chandel NS. ROS-dependent signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*. 2015; 33:8–13. doi: 10.1016/j.ceb.2014.09.010

Regalado EL, Tasdemir D, Kaiser M, Cachet N, Amade P, Thomas OP. Antiprotozoal steroidal saponins from the marine sponge *Pandaros acanthifolium*. *J Nat Prod*. 2010 Aug 27;73(8):1404-10. doi: 10.1021/np100348x.

Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Sep;13(9):566-78. doi: 10.1038/nrm3412.

Roatt BM, de Oliveira Cardoso JM, De Brito RCF, Coura-Vital W, de Oliveira Aguiar-Soares RD, Reis AB. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020 Nov;104(21):8965-8977. doi: 10.1007/s00253-020-10856-w.

Rodrigues GS, Avelino JA, Siqueira ALN, Ramos LFP, Santos GB. O uso de softwares livres em aula prática sobre filtros moleculares de biodisponibilidade oral de fármacos. *Química Nova*. 2021, 44, doi: 10.21577/0100-4042.20170739.

Romanelli MM, da Costa-Silva TA, Cunha-Junior E, Dias Ferreira D, Guerra JM, Galisteo AJ Jr, Pinto EG, Barbosa LRS, Torres-Santos EC, Tempone AG. Sertraline Delivered in Phosphatidylserine Liposomes Is Effective in an Experimental Model of Visceral Leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019 Oct 29;9:353. doi: 10.3389/fcimb.2019.00353.

Romero GAS, Costa DL, Costa CHN, de Almeida RP, de Melo EV, de Carvalho SFG, Rabello A, de Carvalho AL, Sousa AQ, Leite RD, Lima SS, Amaral TA, Alves FP, Rode J; Collaborative LVBrasil Group. Efficacy and safety of available treatments for visceral leishmaniasis in Brazil: A multicenter, randomized, open label trial. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017 Jun 29;11(6):e0005706. doi: 10.1371/journal.pntd.0005706.

Roth BL, Poot M, Yue ST, Millard PJ. Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain. *Appl Environ Microbiol.* 1997 Jun;63(6):2421-31. doi: 10.1128/aem.63.6.2421-2431.1997.

Sáez-Alquezar A, Albajar-Viñas P, Valpassos Guimarães A, Abol Corrêa J. Quality control in screening for infectious diseases at blood banks: rationale and methodology. *EJIFCC.* 2015;26:278–85. PMID: PMC4975364.

Sagi S, Avula B, Wang YH, Khan IA. (2016). Quantification and characterization of alkaloids from roots of *Rauwolfia serpentine* using ultra-high performance liquid chromatography-photo diode array-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 177–190. doi: 10.1007/s00216-015-9093-4

Sampaio CL et al. New occurrences of the nonindigenous orange cup corals *Tubastraea coccinea* and *T. tagusensis* (Scleractinia: Dendrophylliidae) in Southwestern Atlantic. *Check List.* 2012; 8: 528–530. doi: 10.15560/8.3.528

Scarpelli PH, Pecenin MF, Garcia CRS. Intracellular Ca²⁺ Signaling in Protozoan Parasites: An Overview with a Focus on Mitochondria. *Int J Mol Sci.* 2021 Jan 5;22(1):469. doi: 10.3390/ijms22010469.

Scott LJ. Brentuximab Vedotin: A Review in CD30-Positive Hodgkin Lymphoma. *Drugs.* 2017 Mar;77(4):435-445. doi: 10.1007/s40265-017-0705-5

Sen N, Das BB, Ganguly A, Mukherjee T, Bandyopadhyay S, Majumder HK. Camptothecin-induced imbalance in intracellular cation homeostasis regulates programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *J Biol Chem.* 2004 Dec 10;279(50):52366-75. doi: 10.1074/jbc.M406705200.

Serrano-Martín X, García-Marchan Y, Fernandez A, Rodriguez N, Rojas H, Visbal G, Benaim G. Amiodarone destabilizes intracellular Ca²⁺ homeostasis and biosynthesis of sterols in *Leishmania mexicana*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Apr;53(4):1403-10. doi: 10.1128/AAC.01215-08.

Shilabin AG, Kasanah N, Tekwani BL, Hamann MT. Kinetic studies and bioactivity of potential manzamine prodrugs. *J Nat Prod.* 2008 Jul;71(7):1218-21. doi: 10.1021/np800163u.

Sithranga Boopathy N, Kathiresan K. Anticancer drugs from marine flora: an overview. *J Oncol.* 2010;2010:214186. doi: 10.1155/2010/214186.

Smirlis D, Duszenko M, Ruiz AJ, Scoulica E, Bastien P, Fasel N, Soteriadou K. Targeting essential pathways in trypanosomatids gives insights into protozoan mechanisms of cell death. *Parasit Vectors.* 2010 Nov 17;3:107. doi: 10.1186/1756-3305-3-107.

Sundar S, Chakravarty J (2008) Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. *Expert Opin Investig Drugs* 17(5):787–794. doi: 10.1517/13543784.17.5.787

Sundar S, Olliaro PL. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. *Ther Clin Risk Manag.* 2007 Oct;3(5):733-40. PMID: 18472998; PMCID: PMC2376078.

Sunter J, Gull K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biol.* 2017 Sep;7(9):170165. doi: 10.1098/rsob.170165.

Szakács G, Váradi A, Ozvegy-Laczka C, Sarkadi B. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today.* 2008 May;13(9-10):379-93. doi: 10.1016/j.drudis.2007.12.010.

Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods.* 1986 Nov 6;93(2):157-65. doi: 10.1016/0022-1759(86)90183-3.

Tchokouaha Yamthe LR, Appiah-Opong R, Tsouh Fokou PV, Tsabang N, Fekam Boyom F, Nyarko AK, Wilson MD. Marine Algae as Source of Novel Antileishmanial Drugs: A Review. *Mar Drugs.* 2017 Oct 29;15(11):323. doi: 10.3390/md15110323.

Tempone AG, Borborema SE, de Andrade HF Jr, de Amorim Gualda NC, Yogi A, Carvalho CS, Bachiega D, Lupo FN, Bonotto SV, Fischer DC. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. *Phytomedicine.* 2005 May;12(5):382-90. doi: 10.1016/j.phymed.2003.10.007.

Tempone, A. G., Pieper, P., Borborema, S. E. T., Thevenard, F., Lago, J. H. G., Croft, S. L., & Anderson, E. A. (2021). Marine alkaloids as bioactive agents against protozoal neglected tropical diseases and malaria. *Natural Product Reports.* doi:10.1039/d0np00078g.

Tiwari N, Gedda MR, Tiwari VK, Singh SP, Singh RK. Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis. *Mini Rev Med Chem.* 2018;18(1):26-41. doi: 10.2174/1389557517666170425105129.

Torres FAE, Passalacqua TG, Velásquez AMA, de Souza RA, Colepicolo P, Graminha MAS. New drugs with antiprotozoal activity from marine algae: A review. *Rev. Bras. Farmacol.* 2014, 24, 265–276. doi: 10.1016/j.bjp.2014.07.001.

Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. *F1000Res.* 2017 May 26;6:750. doi: 10.12688/f1000research.11120.1.

Torrice F, Gascón J, Barreira F, Blum B, Almeida IC, Alonso-Vega C, Barboza T, Bilbe G, Correia E, Garcia W, Ortiz L, Parrado R, Ramirez JC, Ribeiro I, Strub-Wourgaft N, Vaillant M, Sosa-Estani S; BENDITA study group. New regimens of benznidazole monotherapy and in combination with fosravuconazole for treatment of Chagas disease (BENDITA): a phase 2, double-blind, randomised trial. *Lancet Infect Dis.* 2021 Aug;21(8):1129-1140. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30844-6.

Tuntland T, Ethell B, Kosaka T, Blasco F, Zang RX, Jain M, Gould T, Hoffmaster K. Implementation of pharmacokinetic and pharmacodynamic strategies in early research phases of drug discovery and development at Novartis Institute of Biomedical Research. *Front Pharmacol.* 2014 doi: 10.3389/fphar.2014.00174.

Uliana SRB, Trinconi CT, Coelho AC. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. *Parasitology.* 2018 Apr;145(4):464-480. doi: 10.1017/S0031182016002523.

Urbina JA, Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.* 2003 Nov;19(11):495-501. doi: 10.1016/j.pt.2003.09.001.

Vacchina P, Norris-Mullins B, Carlson ES, Morales MA. A mitochondrial HSP70 (HSPA9B) is linked to miltefosine resistance and stress response in *Leishmania donovani*. *Parasit Vectors.* 2016 Dec 1;9(1):621. doi: 10.1186/s13071-016-1904-8.

van de Waterbeemd H, Gifford E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? *Nat Rev Drug Discov.* 2003 Mar;2(3):192-204. doi: 10.1038/nrd1032.

van Griensven J, Diro E. Visceral leishmaniasis: Recent advances in diagnostics and treatment regimens. *Infect Dis Clin North Am.* 2019; 33:79-99.

van Oosten LN, Klein CD. Machine Learning in Mass Spectrometry: A MALDI-TOF MS Approach to Phenotypic Antibacterial Screening. *J Med Chem.* 2020. doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c00040.

Varela MT, Romaneli MM, Lima ML, Borborema SET, Tempone AG, Fernandes JPS. Antiparasitic activity of new gibbilimbol analogues and SAR analysis through efficiency and statistical methods. *Eur J Pharm Sci.* 2018 Sep 15;122:31-41. doi: 10.1016/j.ejps.2018.06.023.

Vázquez K, Paulino M, Salas CO, Zarate-Ramos JJ, Vera B, Rivera G. Trypanothione Reductase: A Target for the Development of Anti-Trypanosoma cruzi Drugs. *Mini Rev Med Chem.* 2017. doi: 10.2174/1389557517666170315145410.

WHO. Fourth WHO report on neglected tropical disease – INTEGRATING NEGLECTED TROPICAL DISEASES INTO GLOBAL HEALTH AND DEVELOPMENT - Progress made towards achieving the NTD Roadmap targets. 2017.

WHO. World Health Organization, Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases. Geneva (2017).

WHO. World Health Organization. World: status of endemicity of visceral leishmaniasis, 2018. Acesso em 29 de setembro de 2021. Disponível em: https://www.who.int/leishmaniasis/burden/GHO_VL_2018.pdf.

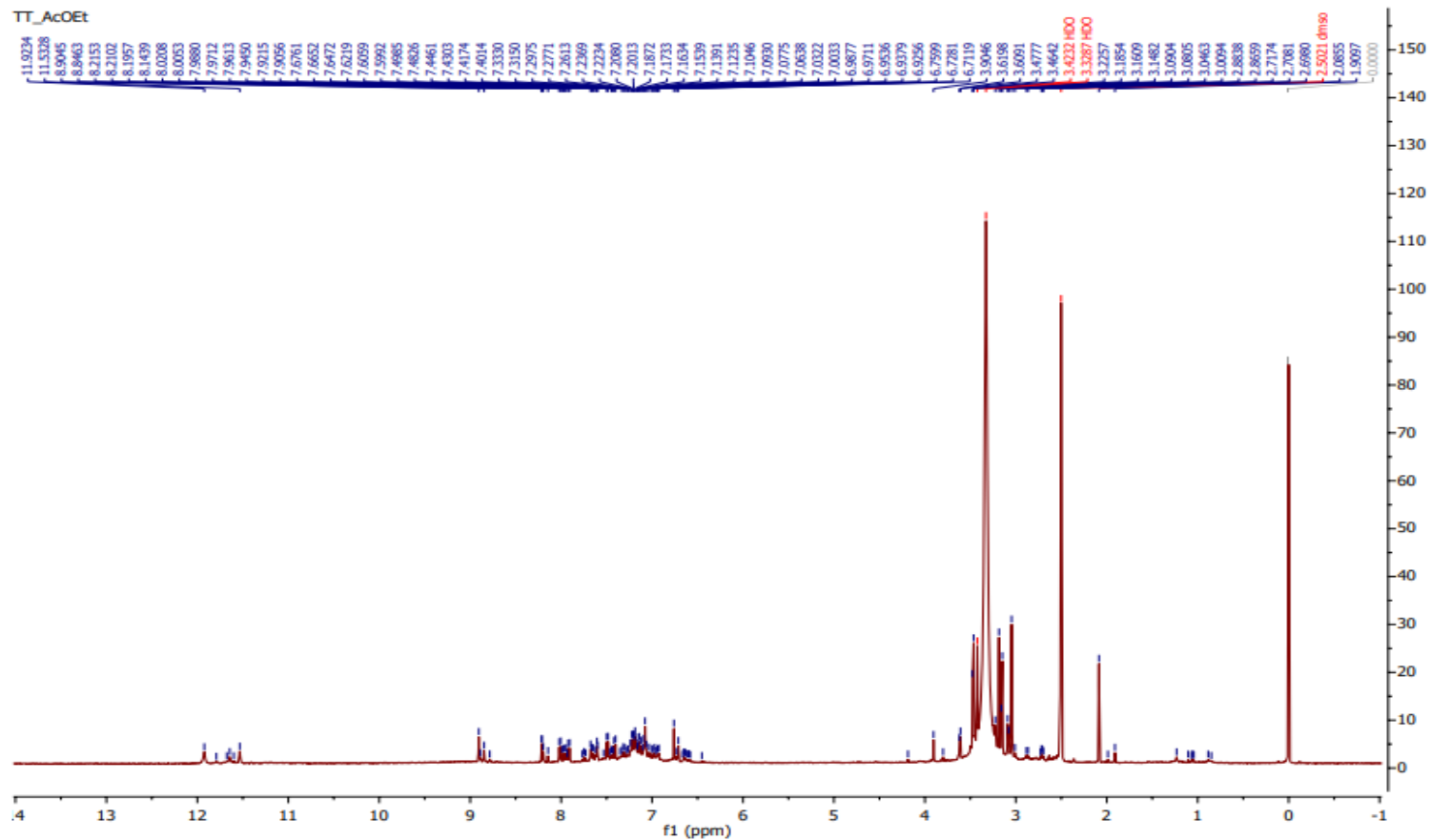
Wibowo JT, Ahmadi P, Rahmawati SI, Bayu A, Putra MY, Kijjoa A. Marine-Derived Indole Alkaloids and Their Biological and Pharmacological Activities. *Mar Drugs.* 2021 Dec 21;20(1):3. doi: 10.3390/md20010003

Wright AD, Goclik E, König GM, Kaminsky R. Lepadins D-F: antiplasmodial and antitrypanosomal decahydroquinoline derivatives from the tropical marine tunicate *Didemnum* sp. *J Med Chem.* 2002 Jul 4;45(14):3067-72. doi: 10.1021/jm0110892.

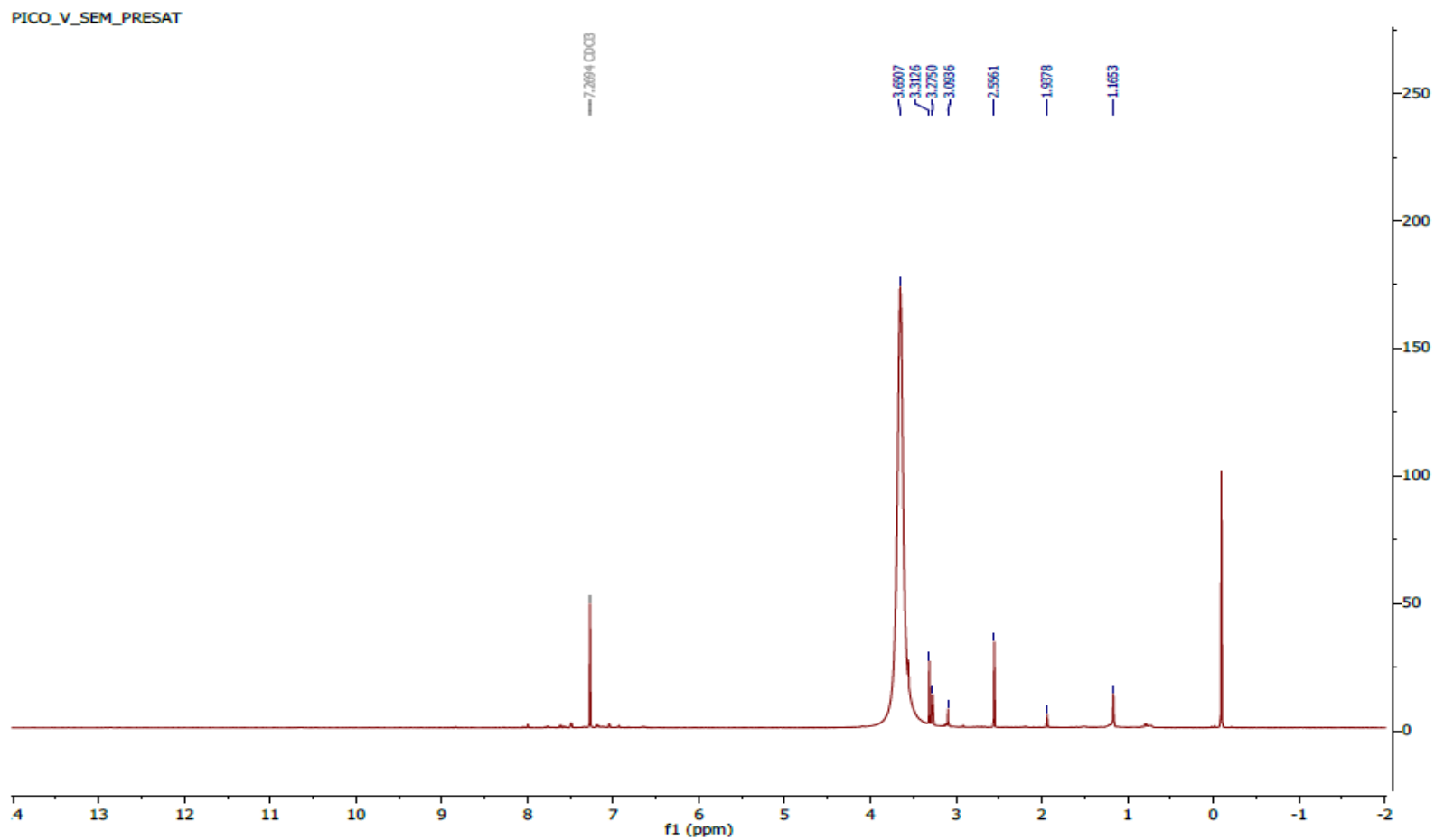
Zanotti AA, Gregoracci GB, Capel KCC, Kitahara MV. Microbiome of the Southwestern Atlantic invasive scleractinian coral, *Tubastraea tagusensis*. *Anim Microbiome.* 2020 Aug 11;2(1):29. doi: 10.1186/s42523-020-00047-3.

Zulfiqar B, Jones AJ, Sykes ML, Shelper TB, Davis RA, Avery VM. Screening a Natural Product-Based Library against Kinetoplastid Parasites. *Molecules.* 2017 Oct 12;22(10):1715. doi: 10.3390/molecules22101715.

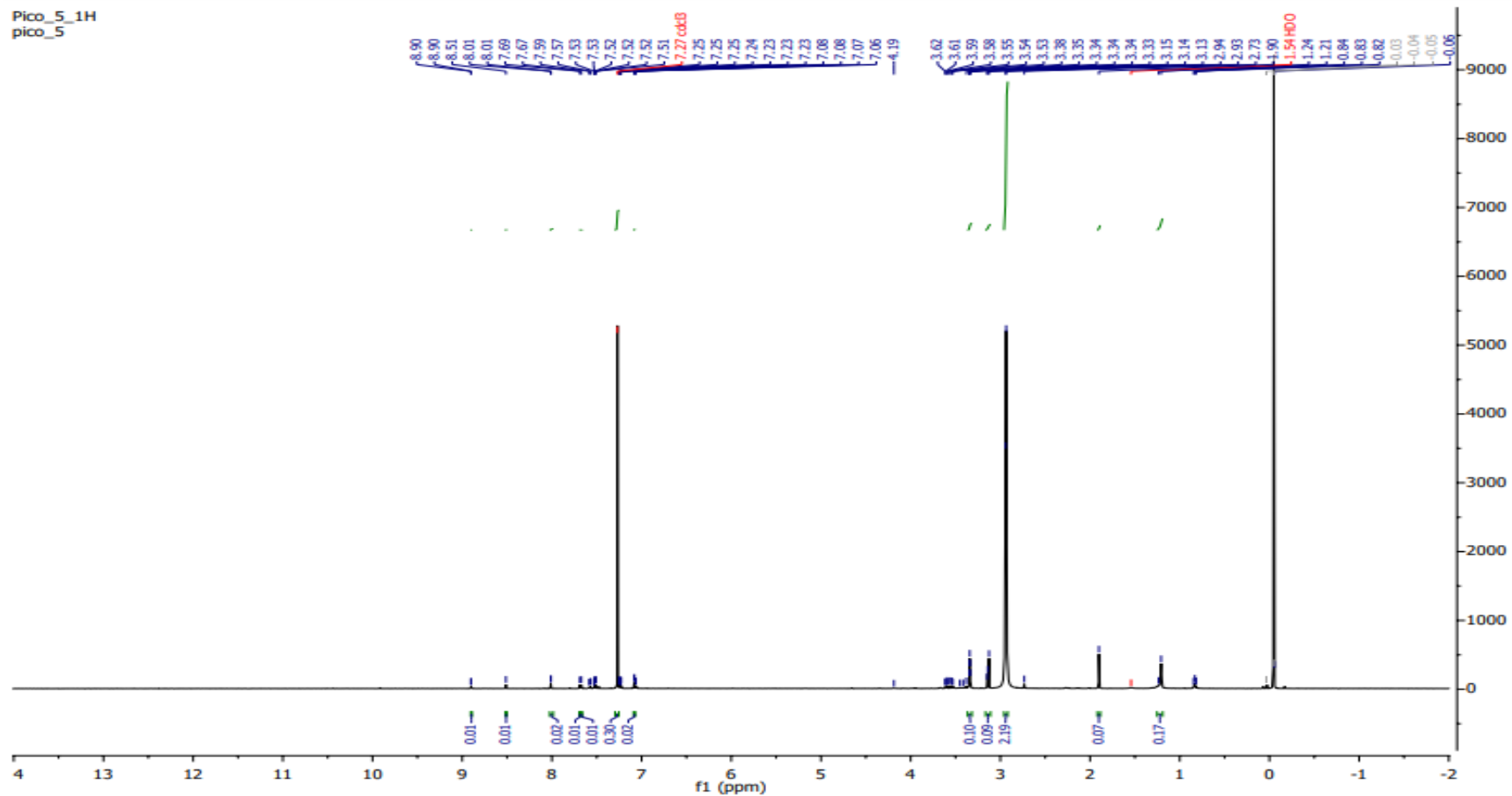
Anexo 01



Anexo 01: Espectro de ressonância magnética nuclear (^1H RMN) da FrAcOEt operado a 500 e 125 MHz no equipamento Varian INOVA 500. A alíquota foi dissolvida em metanol deuterado.



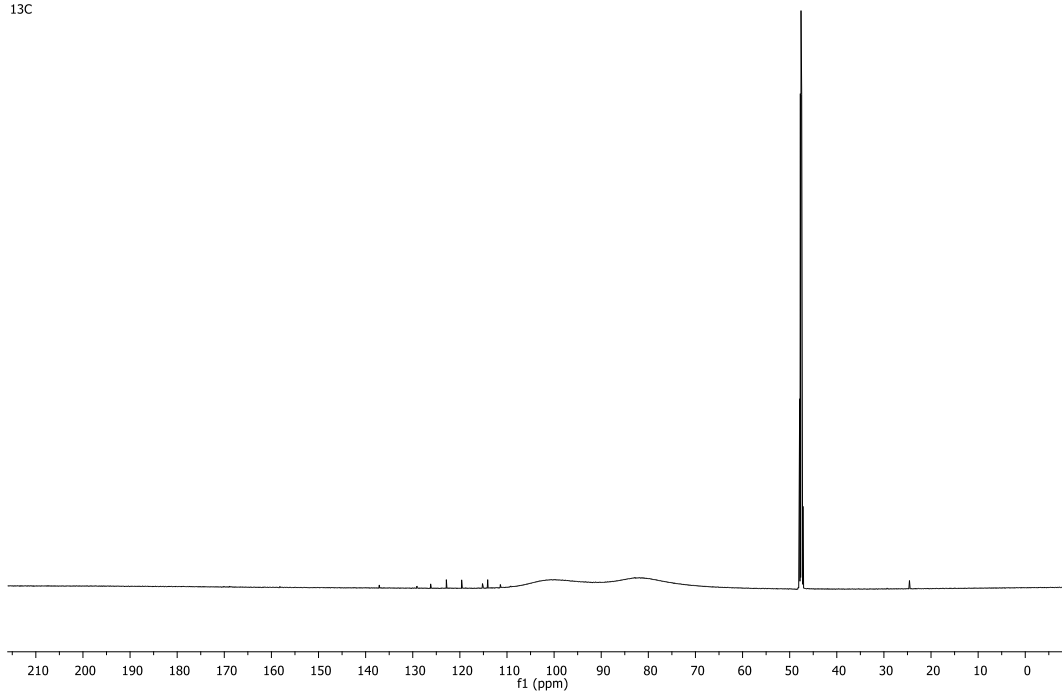
Anexo 02: Espectro de ressonância magnética nuclear (^1H RMN) da FrAcOEt operado a 500 e 125 MHz no equipamento Varian INOVA 500. A alíquota foi dissolvida em metanol deuterado.



Anexo 03: Espectro de ressonância magnética nuclear ^1H da FrAcOEt 5V. Operado a 500 e 125 MHz no equipamento Varian INOVA 500. A alíquota foi dissolvida em metanol deuterado.

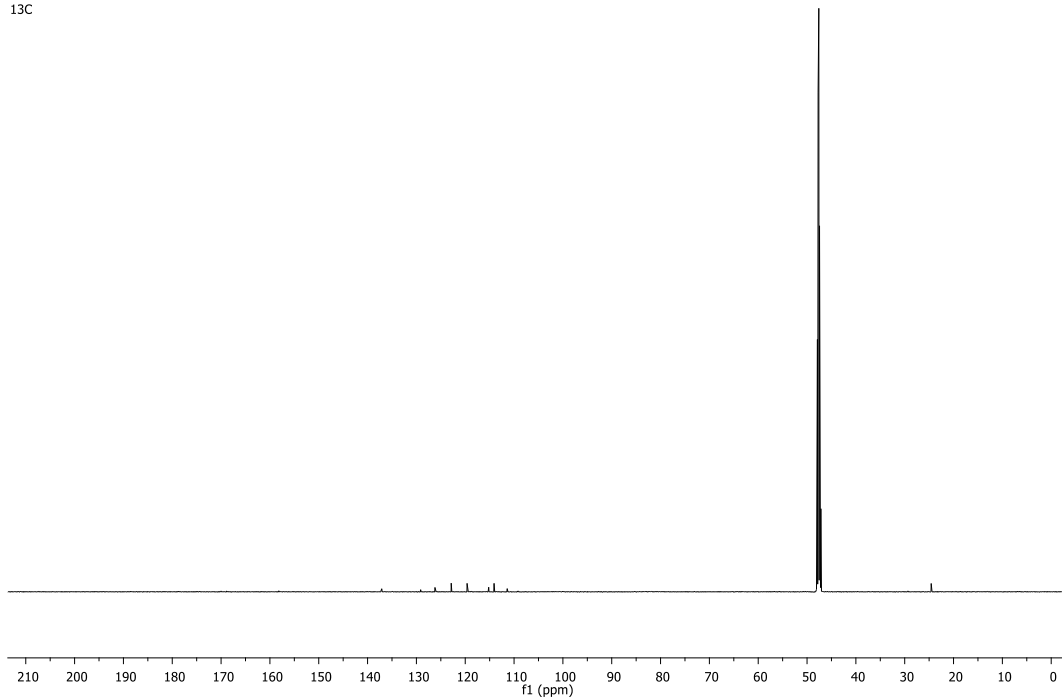
RMN 13C

André Tempone
Prof. Luis Octavio, amostra Reinaldo Theodoro, Coral pico V5' (1 mg) em metanol-d4
25.0 C
13C

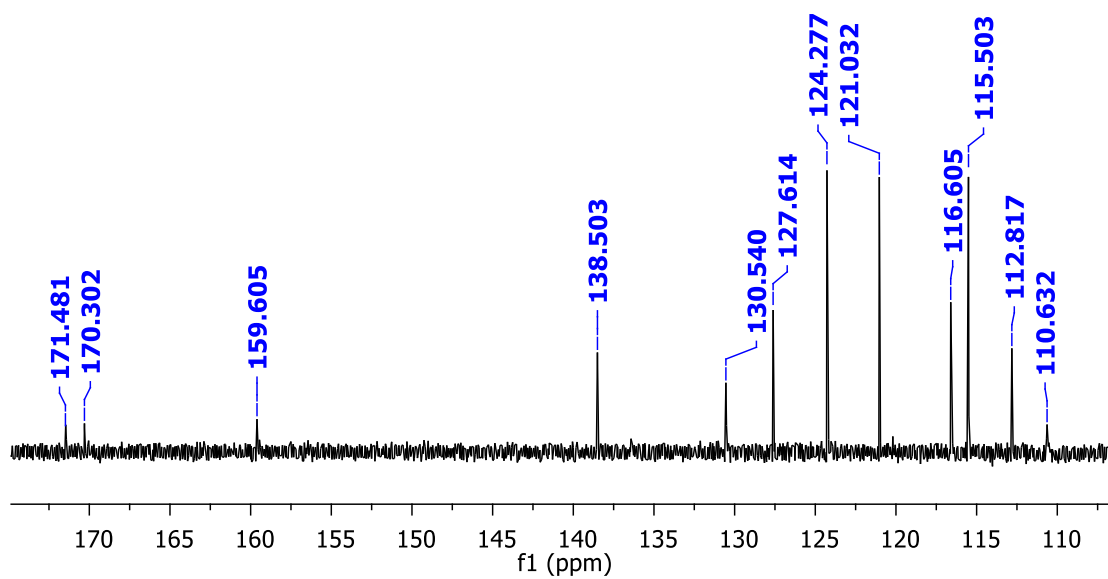
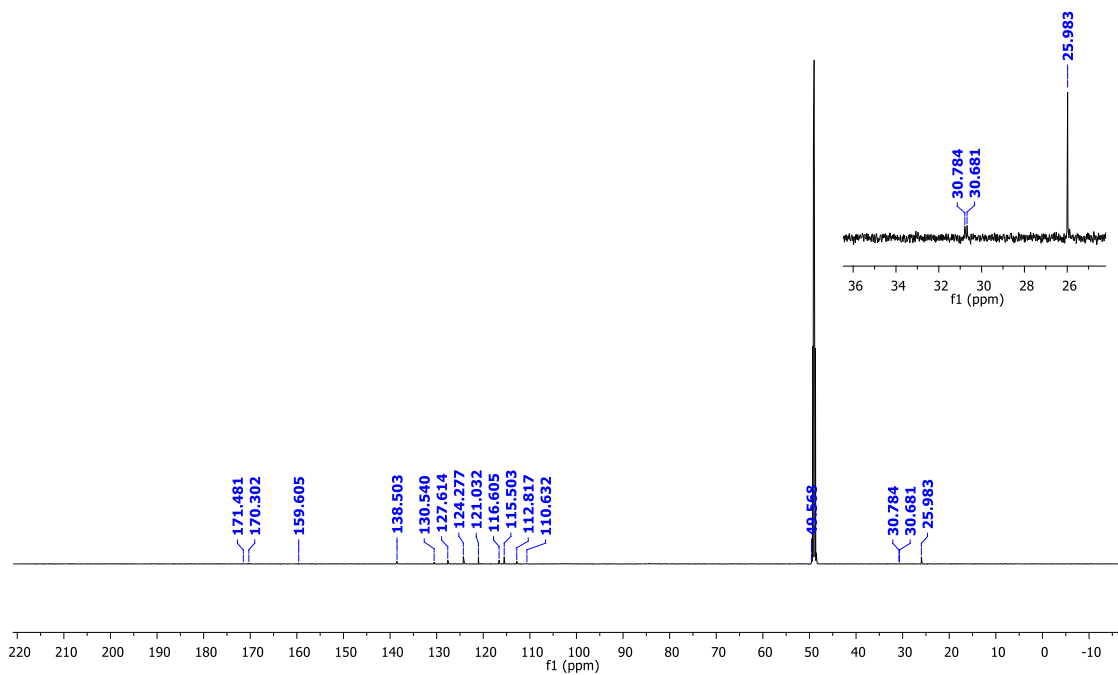


RMN 13C – Ajustado

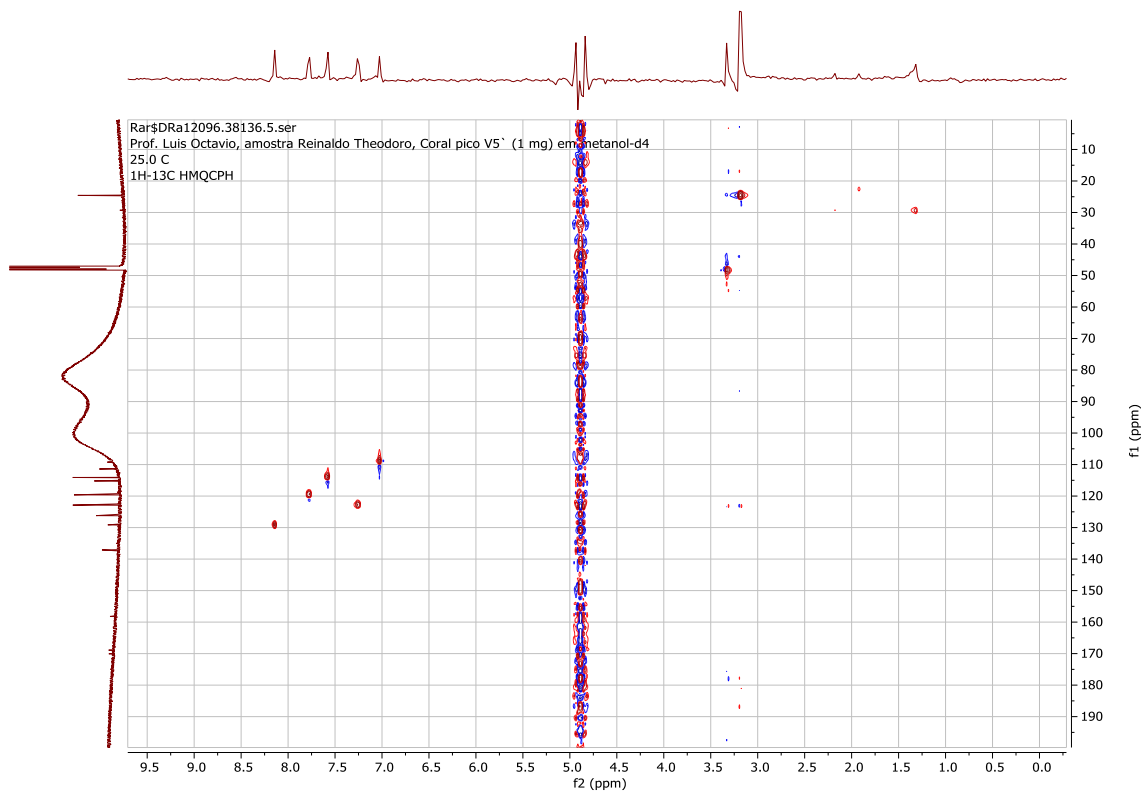
Rar\$DRa16332.48888
Prof. Luis Octavio, amostra Reinaldo Theodoro, Coral pico V5' (1 mg) em metanol-d4
25.0 C
13C



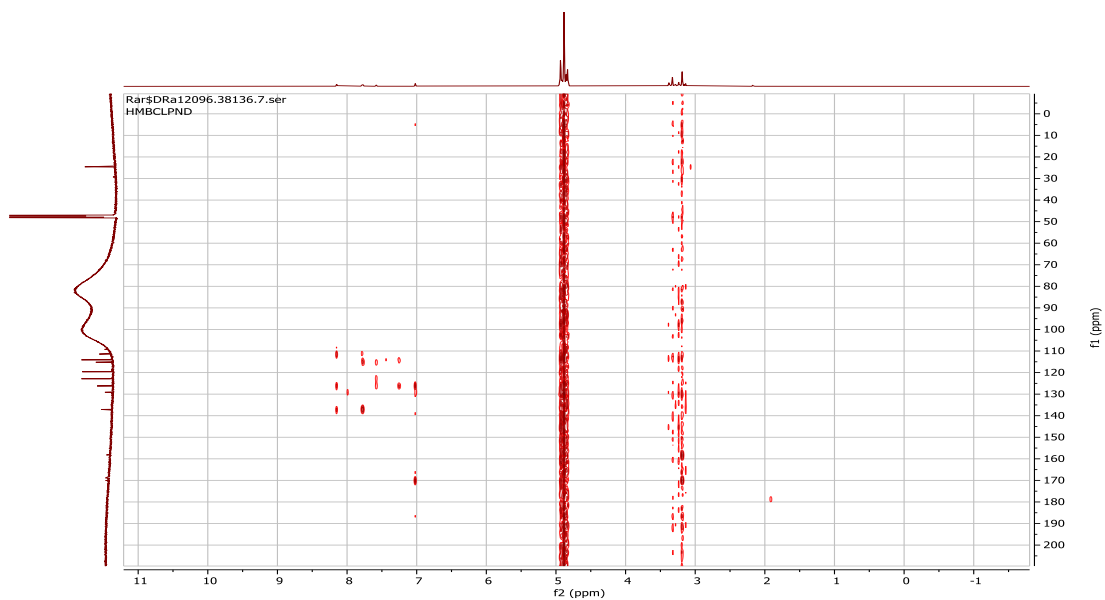
Anexo 04: Espectro de ressonância magnética nuclear ¹³C da FrAcOEt 5V.



Anexo 05: Espectro de ^{13}C NMR (espectro completo acima e ampliado abaixo) do 6-bromo-2'-de-N-metilaplisinopsina- **MR01** (δ , CD_3OD , 150 MHz).

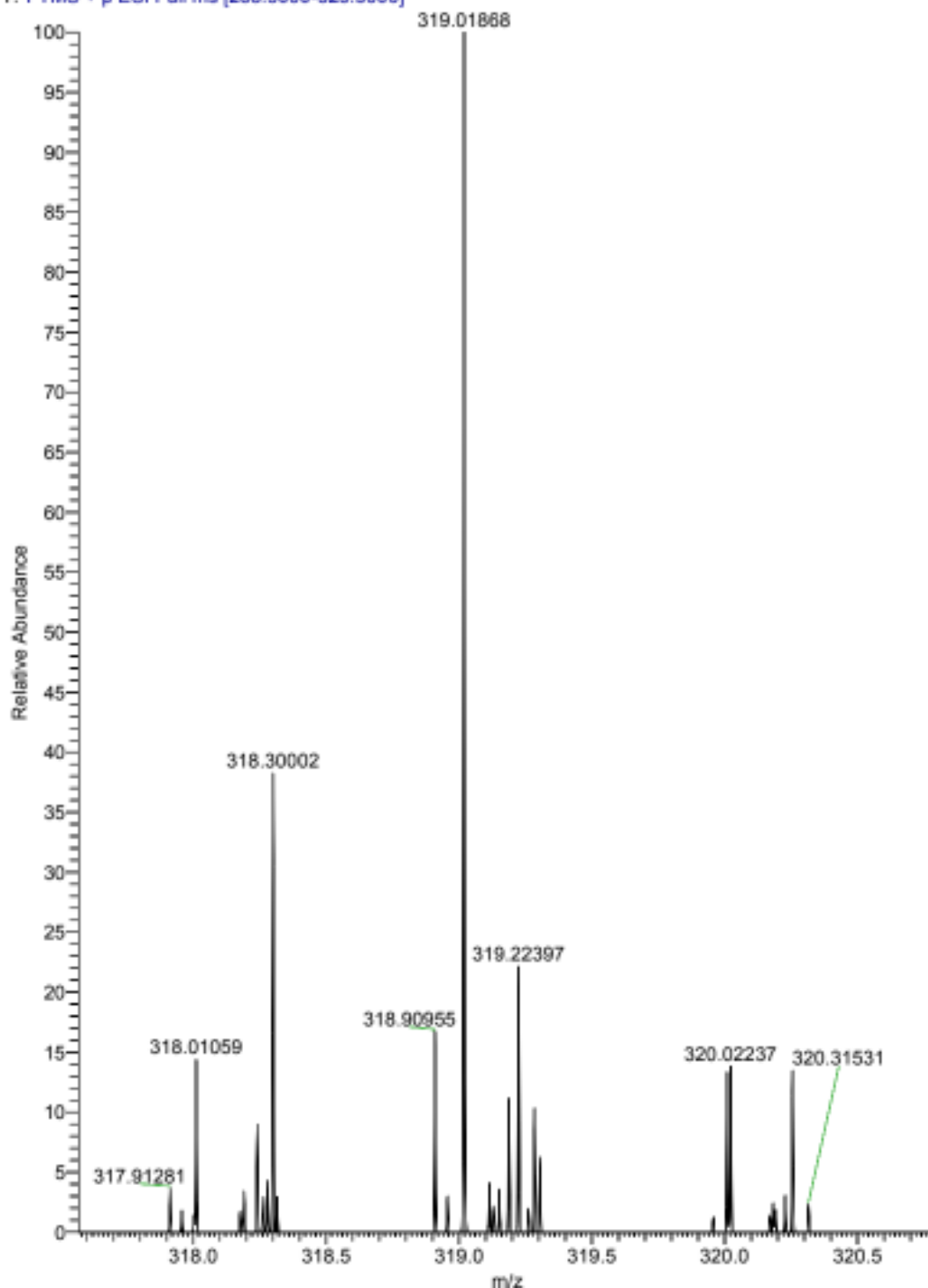


Anexo 06: Espectro NMR HSQC do compostos 6-bromo-2'-de-N-metilaplisinopsina- **MR01** (δ , CD₃OD, 600 e 150 MHz)



Anexo 07: Espectro NMR HMBC do compostos 6-bromo-2'-de-N-metilaplisinopsina- **MR01** (δ , CD₃OD, 600 e 150 MHz)

Pico_V_V_molecular #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 1.31E6
T: FTMS + p ESI Full ms [288.5000-323.5000]



Anexo 08: Espectrometria de massas do composto **MR01**. A partir desse resultado, foi possível realizar a elucidação estrutural do composto, agora identificado como 6-bromo-2'-de-N-methylaplysinopsin. O sinal majoritário na faixa de 319 m/z indica a presença do composto.

Anexo 09: Aprovação do Comitê de Ética Animal



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA-IAL



ANEXO E

São Paulo, 27 de setembro de 2018.

Protocolo 05/2018.
Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL)

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado “**Seleção e Otimização de Novos Candidatos a Fármacos para Leishmaniose e Doença de Chagas**”, sob a responsabilidade da **Dr. André Gustavo Tempone Cardoso**, funcionário do Laboratório de Toxinologia Aplicada a Fármacos Antiparasitários do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz - Central, que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, com o decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação (CONCEA). Este Projeto foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL) na **82a** reunião realizada em **25/09/2018**.

Informamos que devem ser encaminhados relatórios **ANUAIS** à CEUA-IAL, no intuito de acompanharmos os procedimentos realizados segundo os aspectos éticos e sanitários, os quais permitirão a elaboração de relatórios anuais por esta CEUA-IAL, que são encaminhados ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), conforme a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.

Vigência do Projeto	01/10/2018 a 01/10/2021
Espécie	Camundongos isogênicos
Linhagem	Balb/c
Nº de animais	112
Idade	30 dias - recém desmamados
Peso	20 a 25 gr
Sexo	56 fêmeas e 56 machos
Origem	Biotério do Instituto Adolfo Lutz

RAF/raf

Endereço: Avenida Doutor Arnaldo, nº 351 - 11º Andar – Salas 1102
Pacaembu - São Paulo - SP - CEP: 01246-000
Tel: (11) 3068-2887 – e-mail: ceua@lal.sp.gov.br



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA-IAL



Vigência do Projeto	01/10/2018 a 01/10/2021
Espécie	Hamster
Linhagem	Dourado
Nº de animais	30
Idade	30 dias - recém desmamados
Peso	60 gr
Sexo	30 machos
Origem	Biotério do Instituto Adolfo Lutz

Atenciosamente,

Dra. Raquel dos Anjos Fazioli
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-IAL)
Instituto Adolfo Lutz

RAF/raf

Endereço: Avenida Doutor Arnaldo, nº 351 - 11º Andar - Salas 1102
Pacaembu - São Paulo - SP - CEP: 01246-000
Tel: (11) 3068-2887 - e-mail: ceua@ial.sp.gov.br