

DAYANA AGNES SANTOS FERREIRA

**PROTÓTIPOS MICROBIANOS COMO CANDIDATOS A
FÁRMACOS PARA PROTOZOSES
NEGLIGENCIADAS**

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

**Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais
em Saúde Pública**

Orientador: Prof. Dr. André G. 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

Ferreira, Dayana Agnes Santos

Protótipos microbianos como candidatos a fármacos para protozooses negligenciadas / Dayana Agnes Santos Ferreira - 2022.

Dissertação (Mestrado 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 G. Tempone

1. Doenças negligenciadas/parasitologia. 2. Doença de chagas/parasitologia. 3. Produtos biológicos/farmacologia.
4. Bactérias/isolamento & purificação. 5. Ambiente marinho.
6. Antiparasitários/ farmacologia.

SES/CCD/CD - 445/2022

Elaborada por Renan Matheus Predasoli CRB 8/9275

AGRADECIMENTOS

Nesta seção, se faz presente o sentimento de gratidão a todos que colaboraram de alguma forma a este trabalho. Reconhecer o papel de cada um é tão importante quanto cada parte desse documento, pois sem a contribuição de todos essa dissertação certamente não existiria.

Agradeço primeiramente ao Prof. Dr. André Tempone pela oportunidade de desenvolver esse projeto sob sua orientação, o que permitiu meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada por toda confiança depositada em mim, pelo tempo disponível na bancada para me ensinar e por todas as discussões científicas que ampliaram meus horizontes. É muito bonito ver sua paixão pelo seu trabalho e ser sua aluna é uma honra.

Agradeço ao Prof. Dr. Álvaro Migotto e toda sua equipe do CEBIMar-USP pela coleta e identificação dos invertebrados marinhos. Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Henrique Camargo (IAL) por todo suporte na identificação de microrganismos. Agradeço ao Prof. Dr. João Lago (UFABC) pela contribuição na caracterização química e por sempre ser muito solícito. Agradeço ao Lucas Monteiro Santa Cruz (IAL) por todo esforço nas análises espectrométricas.

Agradeço às Profs. Dras. Samantha Borborema, Vera Lúcia Chiacolla e Patrícia Sartoreli por todos os apontamentos feitos durante o exame de qualificação que, com certeza, enriqueceram esse trabalho final.

Agradeço a Dra. Érica Levatti por todo apoio nos experimentos, por sua paciência, didática, animação a cada resultado e por me ensinar tanto. Obrigada a todas as meninas do laboratório que me explicaram tudo do zero e sempre me auxiliaram em cada ensaio. Thaís, Maiara Romanelli, Amaral, Viviane, Beatriz e Mariana: sou eternamente grata a vocês e agradeço por deixarem essa jornada mais leve. Agradeço a técnica de laboratório Matília por sempre cuidar do laboratório e deixar tudo prontinho para trabalhar.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordernadoria de Controles de Doenças da Secretaria do Estado da Saúde pela formação concedida e especialmente a CAPES pelo auxílio financeiro ao projeto.

Por fim, mas não menos importante, agradeço aos meus pais, Anísia e Domingos, por sempre incentivarem meus estudos, por toda paciência, compreensão e auxílio. A minha irmã, Duany pelo companheirismo. Agradeço a toda minha família por estar sempre do meu lado e serem minha base. Agradeço ao Renato, meu amor, melhor amigo e maior incentivador por sempre me motivar e ver o lado bom das coisas. Agradeço também a dona Rosângela, minha sogra, também por todo carinho, confiança e conselhos e também por me apresentar ao meu orientador.

Finalmente, agradeço a Deus por todas as pessoas que Ele colocou em meu caminho, por me permitir viver mais esse desafio com saúde e por todas as bênçãos em meu caminho.

RESUMO

Doenças tropicais negligenciadas atingem cerca de 1,7 bilhões de pessoas, gerando um forte impacto na economia e problemas na Saúde Pública. Dentre as endemias mais negligenciadas, encontra-se a doença de Chagas, que afeta cerca de 6 milhões de pessoas, e no Brasil, dispõe-se de apenas de um fármaco altamente tóxico contra a infecção. Sendo assim, existe uma necessidade urgente para novos tratamentos. A exploração farmacológica de compostos produzidos por microrganismos é de longa data e contribuiu até hoje, com diversos fármacos aprovados. O presente projeto avaliou o potencial anti-*Trypanosoma cruzi* de metabólitos de espécies bacterianas marinhas encontradas no litoral paulista. Para isto, foram coletados invertebrados e sedimentos marinhos e isoladas 32 espécies bacterianas, resultando em 12 microrganismos identificados por MALDI-TOF/MS ou sequenciamento genético. Os extratos orgânicos, contendo os metabólitos microbianos, foram avaliados quanto ao potencial anti-*T. cruzi* em tripomastigotas, apresentando valores de Concentração Efetiva 50% (CE₅₀) entre 1,5 e 59,0 µg/mL. Duas cepas foram submetidas à abordagem *One Strain Many Compounds* (OSMAC), porém, não se observou aumento da potência antiparasitária. O pré-fracionamento do extrato da *Olleya marilimosa*, resultou em uma fração (**FII**) ativa contra os tripomastigotas (CE₅₀ 23 µg/mL), com ausência de citotoxicidade em fibroblastos e hemácias até 200 µg/mL. A análise em ressonância magnética nuclear (RMN ¹H) e espectrometria de massas de alta resolução, demonstrou a presença de 4 ácidos graxos de cadeia iso, **1** (C₁₉H₃₇O₂), **2** (C₂₀H₃₉O₂), **3** (C₂₁H₄₁O₂) e **4** (C₂₂H₄₃O₂). Utilizando espectrofluorimetria, foi observado que **FII** induziu uma alteração na permeabilidade da membrana plasmática do parasita. A análise em espectrometria de massas (MALDI-TOF/MS), demonstrou ainda, alterações do perfil proteico dos parasitas após o tratamento. Este estudo apresentou de forma inédita, o potencial anti-*T. cruzi* de metabólitos das bactérias marinhas estudadas. O isolamento e a caracterização destes compostos, poderão contribuir com novos protótipos farmacêuticos para a doença de Chagas.

Palavras-chave: Doenças negligenciadas, Doença de Chagas, produtos naturais, microbiologia marinha, metabólitos, fármacos

ABSTRACT

Neglected tropical diseases affects about 1.7 billion people, generating a strong impact on the economy and problems in Public Health. Among the most neglected endemic diseases is Chagas disease, which affects about 6 million people, and in Brazil, only one highly toxic drug is available against it. Therefore, there is an urgent need for new treatments. The pharmacological exploitation of compounds produced by microorganisms is long-standing and has contributed to several approved drugs. The present project evaluated the anti-*Trypanosoma cruzi* potential of metabolites of marine bacterial species found on the coast of São Paulo. For this, invertebrates and marine sediments were collected and 32 bacterial species were isolated, resulting in 12 microorganisms identified by MALDI-TOF/MS or genetic sequencing. The organic extracts containing the microbial metabolites were evaluated for anti-*T. cruzi* potential. crossed in trypomastigotes, presenting Effective Concentration 50% (EC₅₀) between 1.5 and 59.0 µg/mL. Two strains were submitted to the One Strain Many Compounds (OSMAC) approach, however, there was no increase in antiparasitic potency. Prefractionation of *Olleya marilimos* extract resulted in an active fraction (**FII**) against trypanomastigotes (EC₅₀ 23 µg/mL), with no cytotoxicity in fibroblasts or red blood cells up to 200 µg/mL. Nuclear Magnetic Resonance analysis (NMR ¹H) and High-Resolution Mass Spectrometry demonstrated the presence of 4 iso chain fatty acids, **1** (C₁₉H₃₇O₂), **2** (C₂₀H₃₉O₂), **3** (C₂₁H₄₁O₂) and **4** (C₂₂H₄₃O₂). Using spectrofluorimetry, it was observed that **FII** induced a change in the permeability of the plasma membrane of the parasite. Analysis in mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) also demonstrated changes in the protein profile of parasites after treatment. This study presented in an unprecedented way, the anti-*T. cruzi* potential metabolites of the marine bacteria studied. The isolation and characterization of these compounds may contribute to new pharmaceutical prototypes for Chagas disease.

Key words: Neglected diseases, Chagas Diseases, natural products, marine microbiology, metabolites

LISTA DE ABREVIATURAS

BZN: Benznidazol

CC₅₀: Concentração Citotóxica 50%

CCDC: Cardiomiopatia Crônica da Doença de Chagas

CE₅₀: Concentração Efetiva 50%

COVID-19: Coronavirus Disease 2019 (“Doença do Coronavírus 2019”)

DMSO: dimetilsulfóxido

DNDi: *Drugs for Neglected Diseases Initiative* (“Iniciativa de Fármacos para Doenças Negligenciadas”)

DTN: Doenças Tropicais Negligenciadas

FDA: *Food and Drug Administration* (“Administração de Alimentos e Fármacos”)

FII: Fração do extrato bruto de *Olleya marilimos* eluída com 60% de metanol em água

Fiocruz: Fundação Oswaldo Cruz

HBSS: Solução de Sais balanceados de Hanks

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

HPLC: *High-performance liquid chromatography* (“Cromatografia Líquida de Alta Eficiência”)

ICC: Insuficiência Cardíaca Crônica

LLC-MK2: Células Epiteliais de Rins de Macaco Rhesus

MALDI-TOF: *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry* (“Espectrometria de massas por Ionização e dessorção a laser assistida por matriz – Tempo de voo”)

MD: *Madracis decactis*

MH: *Mussismilia hispida*

MTT: brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio

NCTC clone 929: linhagem celular de fibroblastos murinos clone 929 do *National Collection of Type Cultures* (Reino Unido)

NFX: Nifurtimox

OMS: Organização Mundial da Saúde

OSMAC: *One Strain Many Compounds* (“Uma Cepa Muitos Compostos”)

PBS: *Phosphate-buffered saline* - “Tampão fosfato salino”

PC: *Palythoa caribaeorum*

PN: Produto Natural

RMN ¹H: Ressonância Magnética Nuclear De Hidrogênio

RPMI-1640; Meio *Roswell Park Memorial Institute*

Sars-Cov-2: *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (Coronavirus-2 Da Síndrome Respiratória Aguda Grave)

SCSB: Sedimento do Canal de São Sebastião

SFB: Soro Fetal Bovino

SIBUZ: Sedimento da Ilha de Búzios

SPE: *Solid Phase Extraction* (“Extração em Fase Sólida”)

TC: *Tubastraea coccinea*

TFA: ácido trifluoroacético

TritonTM X-100: éter terc-octilfenílico de polietilenoglicol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Distribuição geográfica da doença de Chagas em países endêmicos e não endêmicos. Adaptado de DNDi (2019).....	15
Figura 2 - Exemplar fêmea de <i>T. infestans</i>	17
Figura 3 Formas amastigotas em músculo cardíaco de animal infectado (A); tripomastigotas sanguíneas (B) e epimastigotas (C).....	19
Figura 4 - Ciclo de transmissão da doença de Chagas. Adaptada de CDC..	20
Figura 5 - Estrutura química dos compostos utilizados no tratamento contra doença de Chagas (A) benznidazol; (B) nifurtimox.....	22
Figura 6 - Incidência de doença de Chagas aguda (por 100 mil habitantes), por região entre 2007 e 2019.	26
Figura 7 - Casos de doença de Chagas de acordo com a forma de transmissão entre 2007 e 2019.....	26
Figura 8 - Exemplos clássicos de fármacos de origem natural: ácido acetilsalicílico, morfina, penicilina e paclitaxel.....	30
Figura 9 - Estruturas químicas de 3 antiparasitários de origem natural aprovados pelo FDA entre 1981 e 2019: artemisinina, moxidectina e ivermectina.....	33
Figura 10 - Fármacos de origem microbiana – A. tetraciclina; B. paromomicina;C. anfotericina-B.....	35
Figura 11 - Fármacos de origem marinha aprovados por agências regulatórias entre 1969 e 2018, de acordo com origem e atividade.....	37
Figura 12 - Compostos de origem marinha em fase de estudos clínicos: espisulosina, KRN7000 e discodermolido.....	38
Figura 13 - Compostos de origem marinha: salinosporamida-A; cianovirina-n; elangonona; elatol; obtusol e triquinona.....	39
Figura 14 - Compostos de origem marinha com atividade anti-protozoária. Alcaloides 3-hidroxiacetilindol; acetil- β -oxotriptamina, 3-formilindol; tiolactomicina; penidigiamicina e lepadinas E e F.....	40
Figura 15 Compostos de origem marinha com atividade anti-protozoária. saponina esteroidal (pandarosídeo-G-metil-ester); endoperóxido (plakortido-P); alcaloide (dibromopalau'amina); glicósidos esteroidais pregnantes 3'-O-acetil-3-pregna-5,20-dienil-D-arabinopiranosídeo (A) e 4'-O-acetil-3-pregna-5,20-dienil-D-arabinopiranosídeo (B).....	41
Figura 16 Mapa dos locais das coletas. A seta preta aponta a ilha de Búzios e a vermelha o Canal de São Sebastião.....	46
Figura 17 - Invertebrados coletados - TC: <i>Tubastraea coccinea</i> ; MH: <i>Mussismilia hispida</i> ; MD: <i>Madracis decactis</i> ; PC: <i>Palythoa caribaeorum</i>	57
Figura 18 Curvas dose-resposta dos extratos orgânicos bacterianos deTC (<i>Tubastraea coccinea</i>), MH (<i>Mussismilia hispida</i>), PC (<i>Palythoa caribaeorum</i>)	

e MD (<i>Madracis decactis</i>), SCSB (Sedimentos do Canal de São Sebastião) e SIBUZ (Sedimentos da Ilha dos Búzios) em tripomastigotas.....	64
Figura 19- A. Espectro de RMN de ¹ H da fração ativa FII de <i>Olleya marilimosa</i> obtidos em em espectrômetro Varian, modelo INOVA 500, a 500 MHz, sendo o sinal residual do solvente empregado como referência interna. B. Espectro de massas de alta resolução da fração ativa FII de <i>Olleya marilimosa</i> obtidos em espectrômetro Bruker-Daltonics MicroTOF QII, usando uma fonte de ionização por electrospray, operando no modo negativo via injeção direta.....	68
Figura 20- Estruturas moleculares dos 4 ácidos graxos de cadeia <i>iso</i> , presentes na fração FII de <i>Olleya marilimosa</i> . 1. C ₁₉ H ₃₇ O ₂ ; 2. C ₂₀ H ₃₉ O ₂ ;3. C ₂₁ H ₄₁ O ₂ ; 4.C ₂₂ H ₄₃ O ₂	69
Figura 21- Curvas dose-resposta de CE ₅₀ da fração FII de <i>Olleya marilimosa</i> em tripomastigota(A) e amastigotas(B) de <i>T. cruzi</i> ,	70
Figura 22- Atividade hemolítica da fração FII de <i>Olleya marilimosa</i> , determinada em eritrócitos em microplacas.....	71
Figura 23- Avaliação do perfil proteico de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> na presença da fração FII de <i>Olleya marilimosa</i> . Espectro de massas de tripomastigotas tratados com FII (20 e 50 µg/mL), tratados com benznidazol (BZN-40 µM) e não tratadas (CT).....	73
Figura 24- Avaliação da permeabilidade celular dada pela intensidade de fluorescência (U.A.) do parasita <i>T. cruzi</i> tratados por 180 min com a fração FII do extrato de <i>Olleya marilimosa</i> incubados com sonda fluorescente.....	74
Figura 25 Microscopia óptica de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com a fração FII do extrato de <i>Olleya marilimosa</i>	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Origem dos microrganismos associados a corais ou sedimentos	57
Tabela 2- Identificação de 12 isolados isoladas de corais e sedimentos marinhos de acordo com score de MALDI-TOF ou sequenciamento.....	58
Tabela 3- Identificação de cepas marinhas por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.....	60
Tabela 4- Quantidade de extrato bruto obtido das extrações de metabólito das 12 cepas identificadas.....	61
Tabela 5- Avaliação da Concentração Efetiva 50% em tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> dos 12 extratos orgânicos microbianos de cepas marinhas identificadas.....	62
Tabela 6. Avaliação da atividade anti- <i>T. cruzi</i> por microscopia óptica (morfologia e motilidade) de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> incubadas com extratos da cepa SCSB 6.0.2.1 (<i>Shewanella pneumatophori</i>). Abordagem OSMAC com cultivo de antígenos de <i>Leishmania infantum</i> e <i>T. cruzi</i> :.....	65
Tabela 7- Comparação do rendimento e atividade antiparasitária de extratos obtidos de bactérias cultivadas em meio líquido e sólido.....	66
Tabela 8- Frações obtidas por SPE do extrato orgânico bruto de <i>Olleya marilimosa</i> de acordo com porcentagem de metanol utilizada, quantidade e atividade antiparasitária.....	66
Tabela 9- Determinação da Concentração Efetiva 50% (CE ₅₀) em tripomastigota e amastigotas de <i>T. cruzi</i> e Concentração Citotóxica 50% (CC ₅₀) em NCTC da fração FII de <i>Olleya marilimosa</i>	70

ÍNDICE

1. Introdução	14
1.1 Vetores.....	16
1.2 Parasita.....	18
1.3 Quadro clínico.....	20
1.4 Tratamento.....	22
1.5 Cenário brasileiro.....	25
1.6 Relevância econômica	27
1.7 Coinfecção SARS-CoV-2	27
1.8 Produtos naturais como protótipos para doenças negligenciadas ..	29
1.8.1 Classes de Produtos naturais	31
1.9 Potencial marinho como fonte de PN bioativos.....	35
1.9.1 Compostos antiparasitários de origem marinha	39
1.10 Abordagem OSMAC (<i>One Strain Many Compounds</i> - “Uma cepa, muitos compostos”)	41
1.11 Justificativa	43
2 Objetivos.....	44
3 Material e Métodos	45
3.0 Materiais	45
3.1 Coleta de corais e sedimentos:.....	45
3.2 Isolamento e cultivo de microrganismos	46
3.3 Coloração de Gram.....	46
3.4 Identificação de cepas por espectrometria de massas (MALDI-TOF/MS).....	47
3.5 Identificação por sequenciamento do gene parcial 16S rRNA	48
3.6 Extração de metabólitos secundários em meio ágar marinho.....	49
3.7 Extração de metabólitos secundários em meio líquido	49
3.8 Cultivo em meio modificado com antígenos parasitários	50
3.9 Extração em Fase Sólida (<i>Solid Phase Extraction</i> - SPE)	50
3.10 Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria De Massas De Alta Resolução	51
3.11 Cultivo de parasitas e células	51

3.12 Determinação <i>in vitro</i> da atividade antiparasitária e da concentração efetiva 50% (CE ₅₀) dos extratos e frações em tripomastigota (biomonitoramento):	51
3.12.1 Avaliação dos Mecanismos de Ação	52
3.13 Determinação da citotoxicidade <i>in vitro</i> e concentração citotóxica 50% (CC ₅₀):	53
3.14 Atividade hemolítica.....	53
3.15 Determinação <i>in vitro</i> da atividade antiparasitária e da Concentração Efetiva 50% (CE ₅₀) da fração FII de <i>Olleya marilimos</i> a em amastigotas..	54
3.16 Avaliação do Perfil Proteico de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	54
3.17 Avaliação de Permeabilidade de Membrana Plasmática	55
3.18 Análise estatística.....	55
4 Resultados	57
4.1 Coleta e Identificação	57
4.2 Isolamento e Identificação de Espécies Bacterianas Marinhas.	58
4.3 Obtenção de Extratos de Metabólitos Bacterianos	61
4.4 Avaliação da Concentração Efetiva 50%	61
4.5 Abordagem One Strain Many Compounds (OSMAC).....	65
4.6 Fracionamento biomonitorado e estudos espectroscópicos	66
4.7 Estudos de atividade biológica de FII: CE ₅₀ e CC ₅₀	69
4.8 Atividade Hemolítica	71
4.9 Perfil proteico.....	71
4.10 Permeabilidade de membrana plasmática.....	74
5. Discussão	76
6. Conclusões.....	89

1. INTRODUÇÃO

Desenvolvendo-se em climas quentes e úmidos, as doenças tropicais negligenciadas (DTN) podem atingir mais de 1,7 bilhões de pessoas. As DTN podem impedir que as crianças frequentem a escola e os adultos exerçam atividade de trabalho, prendendo as comunidades em ciclos de pobreza e desigualdade, gerando um forte impacto na economia e na Saúde Pública (OMS, 2022). Trata-se de um grupo de 22 doenças causadas por vírus, bactérias e parasitas que está vinculado a alta mortalidade e morbidade, sendo estimadas 500 mil mortes anuais (Rees et al, 2019). Aliado ao desinteresse da indústria farmacêutica em desenvolver novas terapias, a pobreza e precariedade do atendimento clínico geram dificuldades para ações efetivas de tratamento e erradicação dessas doenças. Além disso, é estimada a perda de mais de um bilhão de dólares associados a gastos diretos com saúde, perda de produtividade e redução do nível socioeconômico. Esse grupo de doenças também é responsável por outras consequências, como deficiência, estigma, exclusão social e discriminação, e impõem um enorme ônus financeiro e na qualidade de vida aos pacientes e suas famílias (Vanderslott, 2020; OMS, 2022).

As DTN incluídas na lista da Organização Mundial da Saúde são: doença de Chagas, leishmaniose, tripanossomíase humana africana (doença do sono), dengue, chikungunya, oncocercose (cegueira dos rios), raiva, sarna e outras ectoparasitoses, hanseníase, filariase linfática, úlcera de Buruli, dracunculíase, equinococose, doenças causadas por trematódeos, micetoma, cromoblastomicose e outras micoses profundas, esquistossomose, helmintíase, teníase/cisticercose, tracoma, treponematoses, além da condição do envenenamento por animais peçonhentos (OMS, 2022).

A doença de Chagas é uma doença negligenciada que data de milhões de anos. Surgiu como uma enzootia em animais silvestres e passou a ser transmitida aos humanos como decorrência da invasão de biótopos silvestres. Há indícios de que a infecção parasitária ocorra há pelo menos 5

de idade (OMS, 2019). Com isso, objetiva-se contribuir para a visibilidade internacional da doença, a políticas públicas e a potencialização de recursos em pesquisa e desenvolvimento, a fim de impulsionar ações, no cenário global, para aumentar o acesso ao diagnóstico e tratamento, e proporcionar melhor qualidade de vida às pessoas afetadas pela enfermidade (Ministério da Saúde, 2020).

1.1 Vetores

Os triatomíneos, insetos hematófagos pertencentes a ordem *Heteroptera*, família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae* são os vetores da doença de Chagas. Esses insetos têm como características a hematofagia, hábitos noturnos, termofilicidade, fotofobia, e substâncias anticoagulantes e anestésicas em sua saliva (Tartarotti et al., 2004). A hematofagia infere numa estrita relação com animais reservatórios. Marsupiais, desdentados (tatu, tamanduá, bicho-preguiça), roedores, primatas e morcegos de várias espécies são reservatórios selvagens típicos. Por outro lado, o gato, cachorro, rato, coelho e o próprio ser humano, são reconhecidos como reservatórios domésticos (Barreto & Ribeiro, 1979).

São conhecidas 168 espécies de triatomíneos, das quais 65 são identificadas no Brasil. As mais importantes na transmissão domiciliar são *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. sordida* e *Panstrongylus megistus* (Silveira et al. 1984; Galvão & Paula, 2014), exemplificados na **Figura 2**.

Os países do Cone Sul fizeram durante a década de 1990 um grande esforço conjunto chamado de “Ação para eliminar o *T. infestans*”. Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai investiram milhões de dólares no controle do vetor e em testes em bancos de sangue. O *T. infestans* foi praticamente erradicado do território brasileiro, mas ainda persiste a preocupação com o aumento da população de outras espécies (Molyneux & Morel, 1998; Oliveira Filho, 1999).



Figura 2- Exemplar fêmea de *T. infestans* (Coleção de Triatominae, FCFAR, Unesp Araraquara)

É importante ressaltar que a destruição da natureza ao longo do tempo levou a domiciliação dos triatomíneos, já que prejudicou a fauna silvestre, e, por conseguinte, levou a escassez de alimentos para a espécie. Outro fator contribuinte deste fenômeno é o surgimento de habitações rústicas, onde há abrigo e sangue de animais domésticos e humano para alimentação para os triatomíneos. Algumas espécies destes adaptaram-se perfeitamente a tais novos ambientes e os colonizaram. Por conseguinte, ficou estabelecido um ciclo domiciliar independente do ciclo silvestre, com a mudança no cenário natural, um ciclo domiciliar independente do ciclo silvestre (Tartarotti et al, 2004).

Além da transmissão vetorial, a doença de Chagas pode ser propagada por via oral, transfusão sanguínea, transmissão congênita, transplante de órgãos e acidente laboral (Moreno, 2017).

A transmissão oral foi responsável por cerca de 70% dos casos da tripanossomíase registrados na década de 2000 (Fiocruz, 2013). A ingestão de alimentos contaminados por fezes de triatomíneos, tais como cana-de-açúcar, banana, milho e feijão, e até mesmo a manipulação e consumo de carne de caça de animais contaminados, podem levar ao desenvolvimento da doença. Destacam-se ainda muitos registros de surtos epidêmicos relacionados ao consumo de açaí contaminado, fruto de uma palmeira que é habitat de triatomíneos na região amazônica (Bruneto et al., 2021).

Existem também casos de contaminação durante transplantes de órgãos e transfusões sanguíneas. O risco de um receptor desenvolver a

doença de Chagas via transfusão, a partir de doador chagásico, é de 12 a 48% (Gómez et al., 2019).

A migração de indivíduos chagásicos também pode disseminar a doença para regiões não endêmicas. No Brasil, entre as décadas de 1970 e 2000 foi observado o aumento do número de pessoas infectadas nas áreas urbanas devido à migração de pessoas de regiões rurais (Tartarotti et al, 2004). Ademais, os principais destinos de pessoas infectadas com o parasita provenientes dos países endêmicos são Austrália, Canadá, Espanha e Estados Unidos. Neste último país, estima-se que haja, no mínimo, 100.000 indivíduos infectados, principalmente, devido a imigrantes de países da América Latina (Schmunis & Yadon, 2010). Tal fato leva a compreensão de que a globalização e seus fluxos de pessoas estabelecem um desafio para a hemotransfusão e transplante de órgãos nessas regiões não endêmicas (Moreno, 2017).

Outra via de propagação é a transmissão congênita. A prevalência desta ocorrência varia entre 5 e 10% dos nascidos de mães infectadas. Mais de 60% dos recém-nascidos infectados são assintomáticos. Contudo, nos países endêmicos as mães e as crianças não costumam passar por diagnóstico para a doença de Chagas (Bern et al, 2011).

1.2 Parasita

O parasita *Trypanosoma cruzi* pertence à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e ao subgênero *Schizotrypanum*. O gênero *Trypanosoma* tem grande relevância na família *Trypanosomatidae*, por agrupar uma série de espécies que provocam doenças humanas importantes, como a doença de Chagas (Fiocruz, 2017).

Em tripanosomatídeos, a mitocôndria é única e ramificada e se estende por todo o corpo celular. O cinetoplasto, região que concentra o DNA mitocondrial, é característico dessa família, bem como a presença de flagelo. A posição dessa estrutura em relação ao núcleo é relacionada à fase de

desenvolvimento que o protozoário se apresenta, que são: amastigota, tripomastigota e epimastigota (Fiocruz, 2017), como visto na **Figura 3**.

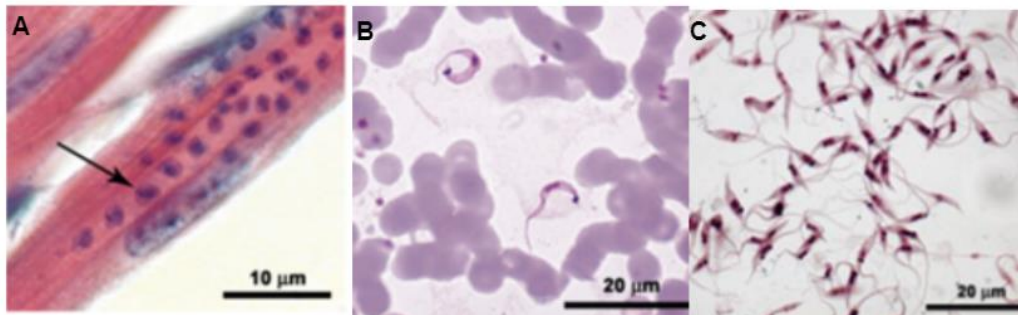


Figura 3 Formas amastigotas em músculo cardíaco de animal infectado (A); tripomastigotas sanguíneas (B) e epimastigotas (C). (Fonte: Fiocruz)

Em vertebrados, o parasita se mostra sob a forma flagelada de tripomastigota no sangue e, nos tecidos, como amastigotas (intracelular aflagelado). Nos vetores invertebrados ocorre um ciclo com a transformação dos tripomastigotas sanguíneos em epimastigotas, que depois se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, que são as formas infectantes acumuladas nas fezes do triatomíneo (Fiocruz, 2017). O ciclo biológico está ilustrado na **Figura 4**.

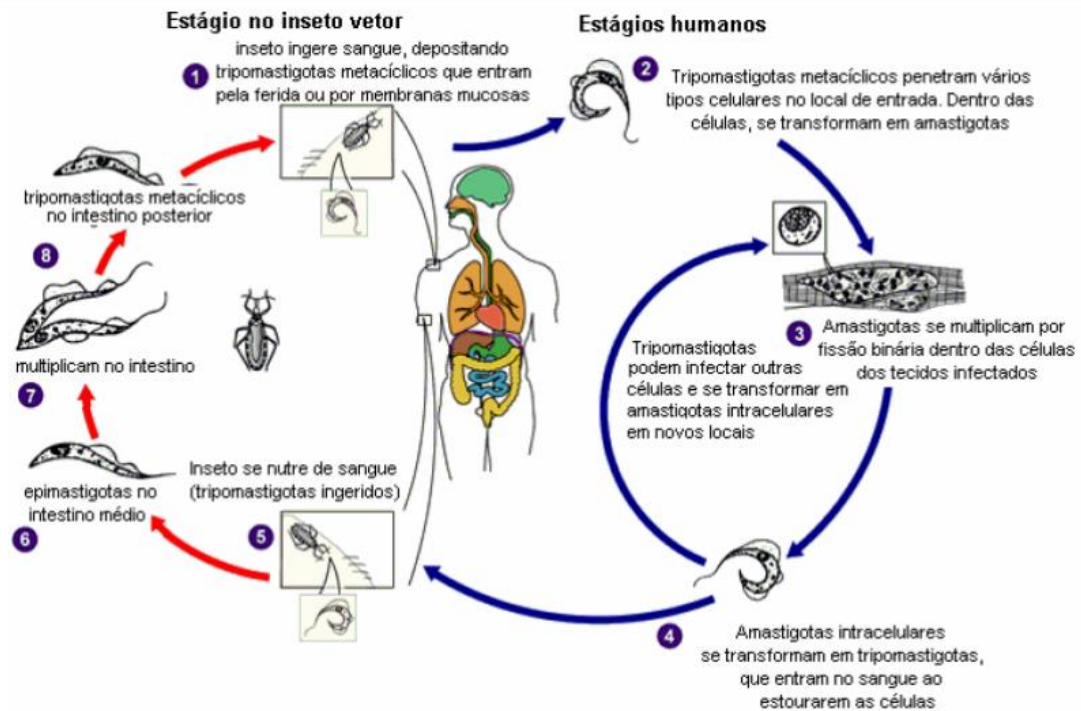


Figura 4- Ciclo de transmissão da doença de Chagas. Adaptada de CDC

1.3 Quadro clínico

A gravidade da doença de Chagas está intimamente relacionada a fatores como a cepa infectante, a via de transmissão e a existência de comorbidades. Existem duas fases da doença:

- Fase Aguda: O parasita circula na corrente sanguínea em quantidades expressivas. Tem como manifestação mais característica a febre constante e prolongada por até 12 semanas de 37,5° a 38,5°C, podendo apresentar picos vespertinos ocasionalmente. O paciente também pode apresentar sintomatologia inespecífica como prostração, diarreia, vômitos, falta de apetite, cefaleia, mialgias, aumento de gânglios linfáticos; e específica, como sinal de Romaña, chagoma de inoculação, edema facial e em membros inferiores, dor torácica, palpitações arrítmicas, pericardite, miocardite e meningoencefalite (Pérez-Molina & Molina, 2018); (Rassi et al., 2010). Durante o período, também é possível detectar anticorpos IgM. Gradativamente, há redução da parasitemia entre a 4ª e a 6ª semana de

infecção e aumento do título de anticorpos IgG. Nesta fase, os sinais e sintomas podem desaparecer naturalmente, e sem tratamento, a doença progride para a fase crônica ou para formas agudas graves que podem levar a óbito, o que ocorre em 5 a 10% dos casos agudos sintomáticos (Rassi et al, 2010; Ministério da Saúde, 2009).

- Fase Crônica: Nesta fase, há poucos parasitas circulantes e majoritariamente, os sintomas são ausentes. Durante a fase crônica, os pacientes podem desenvolver a forma indeterminada, cardíaca, gastrointestinais ou cardiodigestiva da doença (Pérez-Molina & Molina, 2018). Nos 10-30 anos seguintes, a infecção pode resultar em morte, principalmente devido aos danos cardíacos irreversíveis causados pelo parasita (Rassi et al, 2010; Pecoul et al., 2016).

a) Forma indeterminada: Indivíduos que estão na forma indeterminada em geral, apresentam bom prognóstico. São assintomáticos e sem sinais de comprometimento do aparelho circulatório (avaliação clínica, eletrocardiograma e radiografia de tórax normais) e do aparelho digestivo (avaliação clínica e radiológica normais de esôfago e cólon). Contudo, estima-se que entre 10% e 30% desses indivíduos, desenvolvam, complicações digestivas e cardíacas, respectivamente (Rassi et al, 2010).

b) Forma cardíaca: Ao acometer o sistema cardíaco, a doença evolui para cardiomiopatia crônica da doença de Chagas (CCDC), quadro de grande relevância na morbidade e mortalidade. É a principal causa de cardiomiopatia não isquêmica nos países endêmicos da América Latina, bem como, uma das maiores causas de insuficiência cardíaca e morte súbita (Simões et al, 2018). Nos países não endêmicos da América do Norte, Ásia e Oceania, a CCDC é a mais frequente e grave das manifestações da doença. (Simões et al, 2018) Quadros de CCDC podem evoluir para miocardiopatia dilatada, insuficiência cardíaca congestiva (ICC), arritmias graves e eventos cardioembólicos. Tais complicações podem se agravar sem o manejo correto, tornando necessário o uso de tratamentos de alto custo, como transplante cardíaco, uso de desfibrilador e marcapasso (Marín-Neto, 1999).

c) Forma digestiva: Manifesta-se pelo acometimento do esôfago e do intestino grosso, levando ao aparecimento de megaesôfago e megacólon, respectivamente (Dias et al, 2016). Ocorre em 10% dos casos e pode comprometer a qualidade de vida do indivíduo, mesmo com menor impacto na morbimortalidade em comparação à forma cardíaca, que ocorrem em 30% dos casos crônicos (Ministério da Saúde, 2020).

1.4 Tratamento

O tratamento atual contra a doença de Chagas é baseado em agentes nitroheterocíclicos desenvolvidos há mais de 50 anos: benznidazol (BZN) e nifurtimox (NFX) (**Figura 5**) O mais recente Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da doença de Chagas, recomenda a terapia para todos os casos agudos, congênitos e de reativação da infecção, para crianças e também para adultos na fase crônica entre 19 e 50 anos sem sintomas cardíacos avançados. Naqueles com idade maior que 50 anos, o uso é opcional pois não foram feitos estudos que comprovem o benefício terapêutico nessa população e deve ser feito acompanhamento clínico rigoroso (Conitec, 2018).

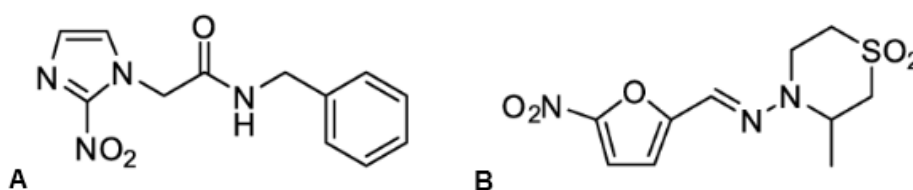


Figura 5- Estrutura química dos compostos utilizados no tratamento contra doença de Chagas (A) benznidazol; (B) nifurtimox.

Contudo, ambos são quimioterápicos muito tóxicos e induzem muitos efeitos adversos graves, exigem longo tempo de administração, são significativamente ineficazes durante a fase crônica e há grande variação na susceptibilidade de isolados do parasita a ação destes agentes, além de registros da resistência de parasitas a esses fármacos (Rassi et al, 2010; (Le

Loup et al., 2011;Coura & Borges-Pereira, 2011). Ademais, BZN E NFX não devem ser administrados em mulheres grávidas ou por pessoas com insuficiência renal ou hepática, nem em pacientes com a forma cardíaca avançada da doença ou com megaesofagia que impeça deglutição (Rassi et al, 2010).

O BZN (N-benzil-2-nitro-1-imidazol acetamida) é um nitroimidazol que inibe a síntese de DNA, RNA e proteínas de *T. cruzi* e gera acúmulo de superóxidos (da Silva et al., 2014). Foi desenvolvido pela farmacêutica Roche® em 1972, vendido como Rochagan® ou Radanil®, e atualmente é produzido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado do Pernambuco no Brasil. Por outro lado, em países não endêmicos como os Estados Unidos, seu uso foi aprovado apenas em 2017, sendo que até esse período, os médicos poderiam prescrevê-los apenas sob protocolo próprio e sob sua própria responsabilidade (Yoshioka et al., 2020).

Sua administração é via oral, na forma de comprimidos, e a dose varia de acordo com idade e peso do paciente, sendo recomendado para adultos 5-7 mg/kg/dia por 60 dias e para crianças 5-10 mg/kg/dia por 90 dias. Os efeitos adversos ocorrem em mais de 50% dos pacientes tratados, sendo os principais deles: reações de hipersensibilidade no começo do tratamento (7 a 10 dias) bem como dermatites com erupções cutâneas, febre e edema generalizado, dor muscular e articular; toxicidade medular, trombocitopenia e agranulocitoses (20 a 30 dias), e neuropatia periféricas (polineuropatia, parestesia e polineurites de nervos periféricos) no final do período de tratamento, geralmente após o acúmulo de 18g (Le loup et al, 2011; Viotti et al, 2009; Conitec, 2018). A eficácia desse fármaco padrão, benznidazol, exceto para crianças e na fase aguda, tem média de 40% e sua segurança em geral é considerada baixa e pode representar uma barreira para prescrição em adultos com condições clínicas variadas (Rassi et al, 2010). Este é o único fármaco disponível no Brasil.

O fármaco NFX (3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamina)tetra-hidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido) é um derivado nitrofurano desenvolvido em 1967 pela

Bayer e vendido como Lampit®. Seu mecanismo de ação envolve várias reações de redução e oxidação de seu constituinte nitro, levando à produção por enzimas parasitárias de uma variedade de espécies reativas de oxigênio que reagem com macromoléculas celulares e são letais ao parasita (Da Silva et al, 2014). O NFX também leva à inativação de uma enzima essencial do parasita, a tripanotiona redutase (Zaidel et al., 2020). O NFX, teve uso descontinuado no Brasil, porém pode ser usado como fármaco de 2ª linha em casos específicos (Conitec, 2018).

Utilizado também desde a década de 1970, o nifurtimox pode ser encontrado em comprimidos e, similar ao benznidazol, deve ser usado em duas ou três dosagens diárias, por via oral, durante 60 a 90 dias. A dose indicada também está relacionada à idade e peso do paciente que varia de 8-10 mg/kg/dia em adultos e 15 mg/kg/dia em crianças. Os efeitos adversos ocorrem em mais de 80% dos tratados. Alguns dos registrados são principalmente relacionados ao trato gastrointestinal (vômitos, diarreia, anorexia e perda de peso) e sintomas neuropsiquiátricos (irritabilidade, distúrbios do sono e neuropatias periféricas) (Le Loup et al, 2009; Conitec, 2018; Thakare et al., 2021).

Além do tratamento contra o agente etiológico, há o tratamento sintomático contra as complicações cardíacas e digestivas da doença. Apesar de poucos estudos observacionais realizados, o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas indica o uso de nifedipina e de isossorbida no tratamento de megaesôfago chagásico; e uso de amiodarona no tratamento de arritmias em pacientes com cardiopatia chagásica. Cirurgias corretivas também são levadas em consideração no manejo dessas complicações (CONITEC, 2018).

Com isso, os fármacos disponíveis hoje são duas opções que não oferecem o melhor tratamento para os pacientes, visto que cerca de 20% deles tem o tratamento suspenso devido a efeitos adversos (Da Silva et al, 2014) e, durante a fase crônica, quando a maioria dos pacientes é diagnosticado, tem baixa eficiência (Rassi et al, 2010). Para conter a doença, além de maior acessibilidade da população ao diagnóstico e tratamento, é

preciso um novo medicamento para os estágios crônicos da doença que seja seguro e eficaz (DNDi, 2021).

1.5 Cenário brasileiro

Estudos recentes estimam que a prevalência da doença de Chagas seja de 4,2%, o que equivale a 4,6 milhões de pessoas portadoras de infecção por *T. cruzi* no Brasil. Os grupos mais reportados são mulheres, acima de 60 anos, residentes da região Nordeste e Sudeste, regiões e áreas mistas (urbanas/rurais) (Martins-Melo et al,2014; Ministério da Saúde, 2020).

No tocante à mortalidade, no período de 2007 a 2017, foram registradas 51.293 mortes pela doença, uma média de 4.663 por ano, que supera a média anual de óbitos atribuídos à tuberculose e às hepatites virais no mesmo período. Dentre as formas clínicas de doença de Chagas, tem-se a forma cardíaca como maior responsável pela alta morbimortalidade da doença, que está dentre as quatro principais causas de óbito por doenças infecciosas e parasitárias no Brasil (Ministério da Saúde, 2020).

Ainda entre 2007 e 2017, o estado de Minas Gerais, no sudeste brasileiro registrou o maior número de óbitos pela doença, contudo os maiores coeficientes médios de mortalidade foram na região centro-oeste: em Goiás (11,67/100 mil habitantes) e Distrito Federal (7,37/100 mil habitantes) (Ministério da Saúde, 2020).

Também neste período, dados mostram que na região norte do país a incidência de doenças de Chagas aguda é cerca de 20 vezes maior do que a média nacional (**Figura 6**). (Ministério da Saúde, 2020)

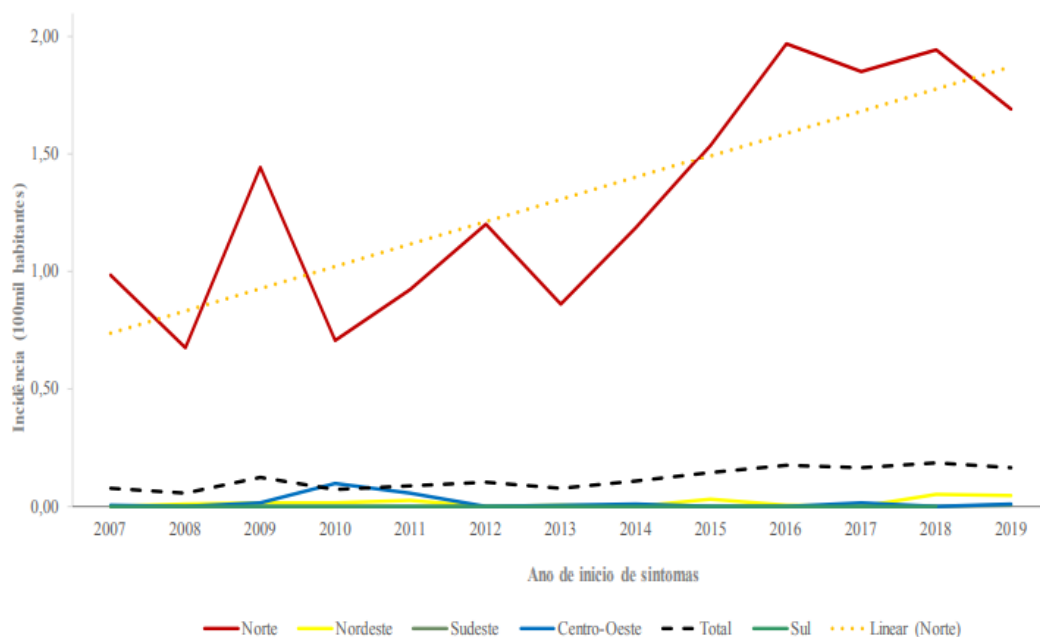


Figura 6- Incidência de doença de Chagas aguda (por 100 mil habitantes), por região entre 2007 e 2019. Fonte:Ministério da Saúde, 2020

Nestes 12 anos, a transmissão oral é expressivamente maior e vem crescendo ao longo dos anos em relação aos outros tipos de transmissão (**Figura 7**) (Ministério da Saúde, 2020).

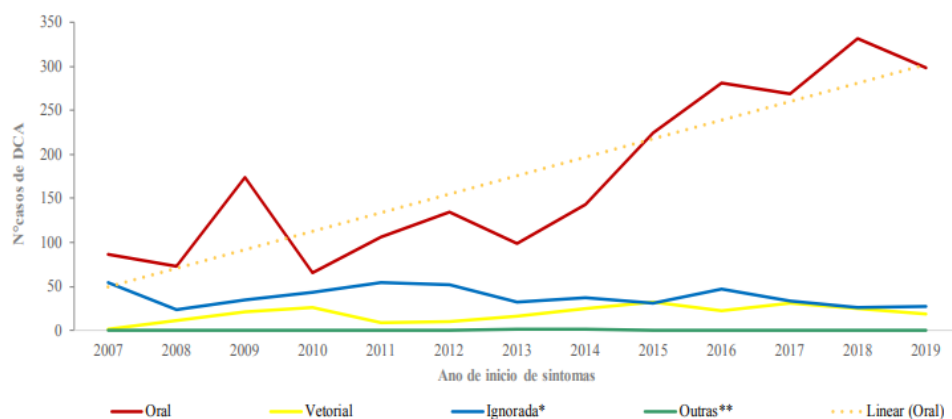


Figura 7- Casos de doença de Chagas de acordo com a forma de transmissão entre 2007 e 2019. Fonte: Ministério da Saúde, 2020.

1.6 Relevância econômica

A doença crônica não tratada pode levar a evolução da doença para um quadro irreversível, o que apresentará maior custo médio total por pessoa afetada. O impacto econômico da fase crônica em sua forma cardíaca é dispendioso. As últimas estimativas demonstram que US\$750 milhões anuais são destinados anualmente para implantes de marcapasso e cirurgias corretivas na América Latina (Moncayo & Silveira, 2009)

Nessa mesma região também são perdidos 752.000 dias úteis anualmente por causa de mortes precoces pela tripanossomíase americana e 7 países da região tem o débito de 1,2 bilhões de dólares por ano em produtividade perdida. Essa estimativa significa uma perda mínima estimada de 5,6 milhões de dólares por ano devido à abstenção dos trabalhadores ao serviço no Brasil (Conteh et al, 2010).

Com menor impacto econômico que a forma cardíaca, a forma digestiva, além de questões relacionadas à qualidade de vida, requer para cada paciente R\$3.757,00 (valor não ajustado pela inflação) apenas para custos médicos por ano e pode vir a requerer intervenções cirúrgicas (Saggia et al, 2007). Ademais, internações devido a megaesôfago e megacólon causados pela doença de Chagas tiveram custo médio por paciente de R\$2.155 segundo o Sistema de Internações Hospitalares no ano de 2018 (Ministério da Saúde, 2020).

Destarte, o acompanhamento profissional ao paciente com a fase crônica garantiria menores chances de surgirem complicações, reduzindo consideravelmente os gastos públicos (Ministério da Saúde, 2020).

1.7 Coinfecção SARS-CoV-2

A OMS declarou em março de 2020 a pandemia de COVID-19, causada pelo novo coronavírus SARS-CoV-2. Até junho de 2022, foram

registrados mais de 515 milhões de casos no mundo todo, sendo 30 milhões no Brasil e 6,3 milhões de mortes no mundo (OMS, 2022).

A COVID-19 interage com o sistema cardiovascular em diversos aspectos. O vírus liga-se ao receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2) principalmente expressa nos pulmões, coração e endotélio vascular (Chen et al, 2020). As respostas iniciais imunes e inflamatórias induzem uma severa alteração das citocinas e quimiocinas, frequentemente relacionadas com a resposta inflamatória implicada na patogênese da cardiomiopatia causada por Chagas, como a interleucina (IL)-6, TNF-alfa, e CXCL-10 (Schett et al,2020; de Araújo et al, 2020; Dutra et al, 2014).

Esta interação pode desencadear uma resposta inflamatória que pode levar a um aumento da lesão e disfunção plaquetária, endotelial e miocárdica e até eventos trombóticos e infarto do miocárdio, similarmente ao que foi registrado em pacientes infectados por *T. cruzi* (Bikdeli et al, 2020; Pinazzo et al, 2016; Nunes et al, 2018). Logo, há uma preocupação de que a COVID-19 tenha potencial de desencadear a reativação da doença de Chagas.

Esta reativação poderia ser causada pela modulação de citocinas causada pela doença, pelo próprio vírus, ou mesmo pelo uso de alguns tratamentos com COVID-19 como esteróides, hidroxicloroquina e imunomoduladores (tocilizumabe ou outros inibidores da interleucina), já que estas estão relacionadas com a progressão da doença de Chagas (Echeverría et al, 2020; López et al, 2006; Keating et al, 2015).

Além disso, devido ao metabolismo hepático de BZN (95%) e NFX (>99%), a hepatotoxicidade em combinação com compostos anti-COVID-19 deve ser monitorada e isto pode ser influenciado por certos fatores do parasita (cepas, carga parasitária) ou fatores do hospedeiro (suscetibilidade genética e estado imune) (Zaidel et al., 2020).

Por outra perspectiva, pessoas que sofrem com a doença de Chagas, de modo geral, se encontram em uma situação de vulnerabilidade social. Os serviços de controle como a dedetização do vetor transmissor foram afetados

e o acesso a serviços de saúde pública ainda mais limitados devido à prioridade contra a COVID-19 e o isolamento social. Tal fato agravou a saúde física e mental da população que convive com a doença de Chagas e as consequências para os coinfectados tem potencial preocupante (Zaidel et al, 2020).

1.8 Produtos naturais como protótipos para doenças negligenciadas

A escassez de opções terapêuticas e as desvantagens dos atuais fármacos supracitados para o tratamento de doenças negligenciadas reforçam a necessidade de busca e desenvolvimento de novos compostos. Nesse sentido, os produtos naturais (PN) têm sido reconhecidos como fonte de protótipos de agentes terapêuticos contra essas moléstias (Cheuka et al., 2017; Tajuddeen & Van Heerden, 2019).

A natureza tem provido há milênios, terapias para o ser humano. O uso de misturas de material vegetal para tratar infecções é conhecido desde as primeiras civilizações da idade do bronze (Forrest, 1982). Com isso em vista, a medicina, a farmacologia e a química começaram a investigar produtos naturais com propriedades medicinais, ou seja, que interagem com o sistema biológico humano, ativando ou desativando receptores, induzindo respostas farmacológicas (Santos et al., 2020; Tempone et al., 2008).

Exemplos clássicos de produtos naturais em uso medicinal incluem a artemisinina, um PN inalterado com ação antimalárica extraído da planta *Artemisia annua* (Dewick, 2009, Newman e Crag, 2020) (Figura 9); o ácido acetilsalicílico, analgésico semi-sintetizado a partir do ácido salicílico presente na casca do salgueiro branco *Salix alba* em 1829 (Lafont, 2007); o analgésico morfina, PN isolado de sementes de *Papaver somniferum* em uso médico desde o século XIX (Duarte, 2005); penicilina, PN antibiótico isolado do fungo *Penicillium chrysogenum* com ação observada pela primeira vez em 1928

(Bush, 2010) e o agente anticancer paclitaxel, PN inalterado isolado do tronco de *Taxus brevifolia* em 1971 (Dewick, 2009) (**Figura 8**). Desde então, muitos organismos foram estudados para uso terapêutico.

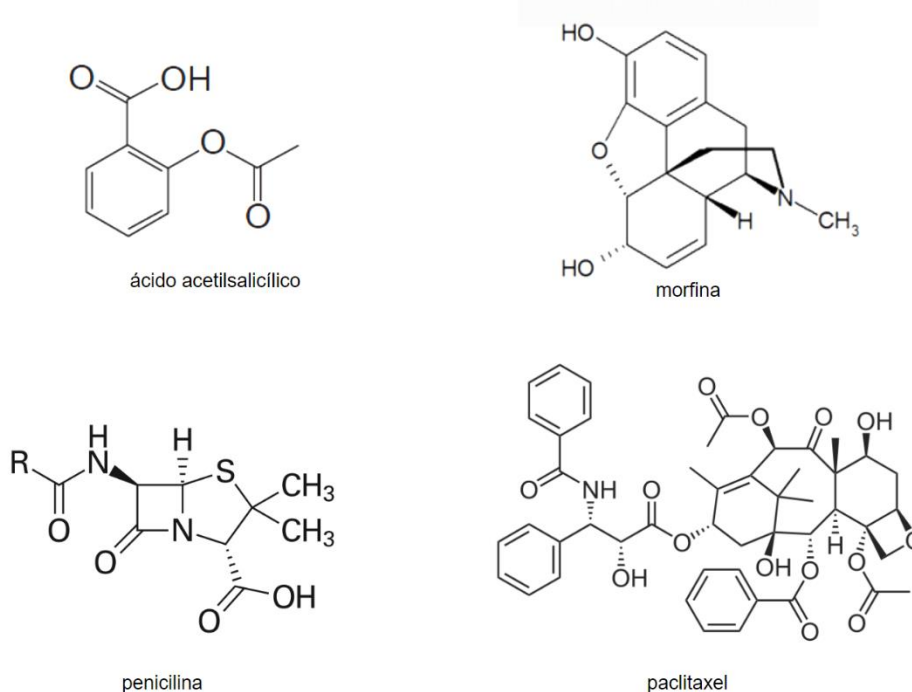


Figura 8- Exemplos clássicos de fármacos de origem natural: ácido acetilsalicílico, morfina, penicilina e paclitaxel.

O termo PN pode ser usado para designar compostos isolados ou misturas complexas. Plantas, animais e microrganismos podem ser citados como fontes de PNs que foram naturalmente otimizados através do tempo. Os metabólitos secundários, geralmente compostos químicos de baixa massa molecular, são produzidos por organismos vivos com diferentes funções, como a defesa, sinalizações e interações com outros organismos (Atanasov et al., 2021; Bhat et al., 2007). Os PNs são compostos conhecidos por uma grande diversidade química e complexidade estrutural quando comparados a moléculas sintetizadas pelo ser humano. Tal fato é uma vantagem no quesito bioatividade, mas também um desafio no processo de *drug discovery* (descoberta de fármacos) (Atanasov et al., 2021).

1.8.1 Classes de produtos naturais

Dentre as principais classes químicas dos PNs podemos citar os alcaloides, terpenos, policetídeos, esteroides, saponinas, flavonóides, entre outras (Bhat et al, 2007; Spainhour, 2005, Dewick, 2009). A seguir, uma breve descrição das principais:

a) **Policetídeos:** Os policetídeos são metabólitos secundários biossintetizados através da condensação enzimática de unidades acetil ou malonil (Daley et al, 2017). É um grupo estrutural diverso, com atividades biológicas e propriedades farmacológicas relatadas. Nessa classe de substância, são incluídos os ácidos graxos, poliacetilenos, prostaglandinas, antibióticos macrolídeos e diversos compostos aromáticos, como antraquinonas e tetraciclina (Dewick, 2009). A maioria dessas substâncias é ativa em diversos sistemas biológicos (Daley et al, 2017; Weissman, 2004), de tal modo que a busca por policetídeos em microrganismos é uma boa estratégia para a descoberta de novos protótipos naturais.

b) **Alcaloides:** São compostos orgânicos nitrogenados de caráter básico, presentes em animais, vegetais e em microrganismos. Os átomos de nitrogênio nos alcaloides originam-se de um aminoácido e, em geral, o esqueleto de carbono do precursor de aminoácido específico também é mantido intacto na estrutura do alcaloide, embora o carbono do ácido carboxílico seja muitas vezes perdido por descarboxilação (Dewick, 2009). Assim, a subdivisão de alcaloides em grupos baseados em precursores de aminoácidos forma uma abordagem racional e muitas vezes esclarecedora para a classificação. Dessa forma, os alcaloides são frequentemente classificados em: pirrolidinícos, piperidínicos, quinolínicos, isoquinolínicos, indólicos etc. (Dewick, 2009). A morfina é um exemplo de alcaloide de origem natural (**Figura 8**).

c) **Terpenos:** Os terpenoides formam uma numerosa classe de produtos naturais e são estruturalmente diversos. Eles são classificados com base no número e organização estrutural dos carbonos formados pelo arranjo linear de unidades de isopreno C₅ (2metilbuta-1,3-dieno), seguidos de ciclização e rearranjos do esqueleto carbônico. Dependendo do número de

unidades isoprênicas, os terpenoides são classificados como: hemiterpenoides (C5), monoterpenoides (C10), sesquiterpenoides (C15), diterpenoides (C20), etc (Ludwiczuk et al, 2017; Jan & Abbas, 2018). Esses compostos têm uma variedade de papéis na mediação de interações benéficas ou antagônicas entre organismos, podendo então apresentar uma diversidade de atividades biológicas (Ludwiczuk et al, 2017, Jan & Abbas, 2018). Muitos terpenoides são utilizados na indústria de alimentos (como flavorizantes) e cosmética, além de apresentarem propriedades com potencial farmacêutico, como: atividade anticarcinogênica (paclitaxel) (**Figura 8**), antimalárica (artemisinina) (**Figura 9**), antiúlcera, hepaticida, antimicrobiana ou diurética (glicirrizina) (Jan & Abbas, 2018).

Uma revisão de Newman e Craig (2020), mostrou que cerca de 56% de 1881 produtos terapêuticos aprovados pelo FDA entre 1981 e 2019, tiveram protótipos naturais, isto é, sua síntese teve como base, compostos isolados da natureza. Dentre os antibióticos aprovados nesse período, 48% são categorizados como produtos naturais ou derivados de produtos naturais (Newman & Cragg, 2020). O levantamento também mostra que no período analisado, apenas 20 antiparasitários foram aprovados para uso. Destes, dois são de origem natural, sete são derivados de produtos naturais e outros 2 tem como farmacofóro um PN (Newman & Cragg, 2020), ou seja, mais da metade dos antiparasitários aprovados tem como origem um protótipo natural. Alguns deles, a artemisinina (extraída da planta *Artemisia annua*), moxidectina (derivado de bactérias do gênero *Streptomyces*) e ivermectina (desenvolvido de composto encontrado em *Streptomyces avermectinius*), estão exemplificados na **Figura 9**.

Por conseguinte, constata-se a importância dos produtos naturais como base para o desenho de novos candidatos a fármacos, especialmente antiparasitários.

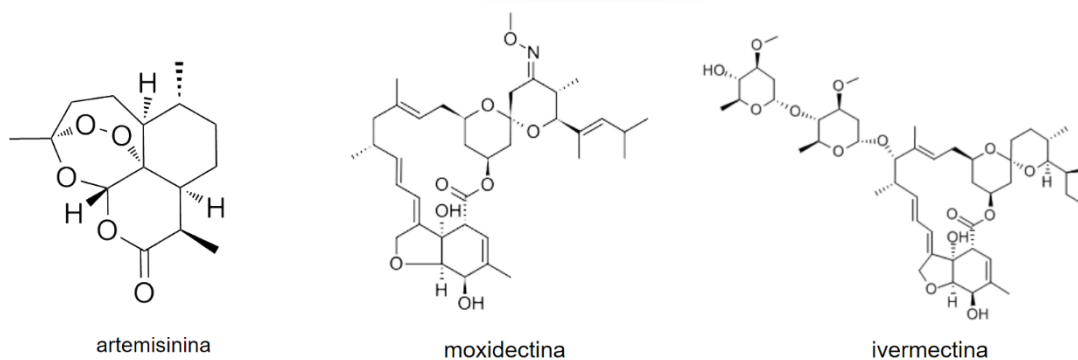


Figura 9- Estruturas químicas de 3 antiparasitários de origem natural aprovados pelo FDA entre 1981 e 2019: artemisinina, moxidectina e ivermectina.

Existem mais de 43 mil PN bioativos catalogados, mas apenas uma porcentagem ínfima é utilizada na terapêutica humana (Bérdy, 2005). A maioria dos produtos naturais relevantes são metabólitos secundários (MS), que são definidos como moléculas não essenciais para a sobrevivência do organismo produtor, mas que incrementam sua competitividade (Mullis et al., 2019).

Metabólitos secundários representam um grupo de compostos bioativos de baixa massa molecular estruturalmente diversos e complexos. Microrganismos, em particular, são prósperas “fábricas de antibióticos”, e provaram ser uma fonte abundante de MSs que foram desenvolvidas com sucesso como principais candidatos a fármacos (Baral et al., 2018). Metabólitos secundários microbianos são cerca de 10% de todos os PN bioativos e, dada sua importância, têm assumido papel central para descoberta e desenvolvimento de novos compostos (Demain & Sanchez, 2009).

Nesse sentido, as actinobactérias, pertencentes à família *Actinomycetaceae*, são bem conhecidas por sua capacidade de produzir metabólitos secundários, muitos dos quais são ativos contra microrganismos patogênicos. Cada cepa de actinobactéria tem potencial genético para a produção de 10-20 metabólitos (Bentley et al. 2002; Lam 2006). Tradicionalmente, estas bactérias têm sido isoladas de fontes terrestres,

embora o primeiro relato de actinobactérias de sedimentos marinhos tenha surgido há várias décadas (Manivasagan et al., 2014).

As actinobactérias marinhas foram recentemente reconhecidas como uma fonte de novos compostos com estruturas e propriedades incomuns como antiparasitários, antibióticos, anticancerígenos, antimaláricos, antivirais, antifúngicos, citotóxicos, citostáticos, antiinflamatórios, antioxidantes, anti-angiogênicos, etc (Manivasagan et al, 2014). O gênero *Streptomyces* é o mais representativo desse filo. Mais de 500 espécies de *Streptomyces* são responsáveis por 70-80% dos metabólitos secundários relevantes, que possuem uma ampla gama de atividades antibacteriana, antifúngica, anticâncer, antitumoral, citostática, anti-inflamatória, antiparasitária, antimalárica e antiviral (Manivasagan et al, 2014; Arvinda swamy et al, 2013).

A tetraciclina (**Figura 10**) é exemplo de composto produzidos por *Streptomyces* sp.. O fármaco é um antibiótico de amplo espectro, mas também vem sendo estudado quanto ao potencial para o tratamento da malária, de infecções causadas por *Leishmania major*, *Trichomonas vaginalis*, *Toxoplasma gondii* e também nematódeos (Chopra et al, 2001; Smith et al, 2000; Walsh et al, 2003; Lin et al., 2002).

A paromomicina, antibiótico aminoglicosídeo isolado de *Streptomyces rimosus*, também tem sido usada no tratamento contra criptosporidiose, amebíase, giardíase e cestódeos (Liu e Weller, 1996). Também foi detectada sua atividade anti-*Leishmania* e atualmente vem sendo incorporada ao tratamento em associações terapêuticas. Já a anfotericina B, produzida por *Streptomyces nodosus*, é um macrolídeo com propriedades antifúngicas, amplamente utilizado. A anfotericina-B ou suas formulações lipídicas (anfotericina-B lipossomal) também são usadas para leishmaniose visceral e leishmaniose mucocutânea (Balasegaram et al., 2012). Suas estruturas moleculares estão representadas na **Figura 10**.

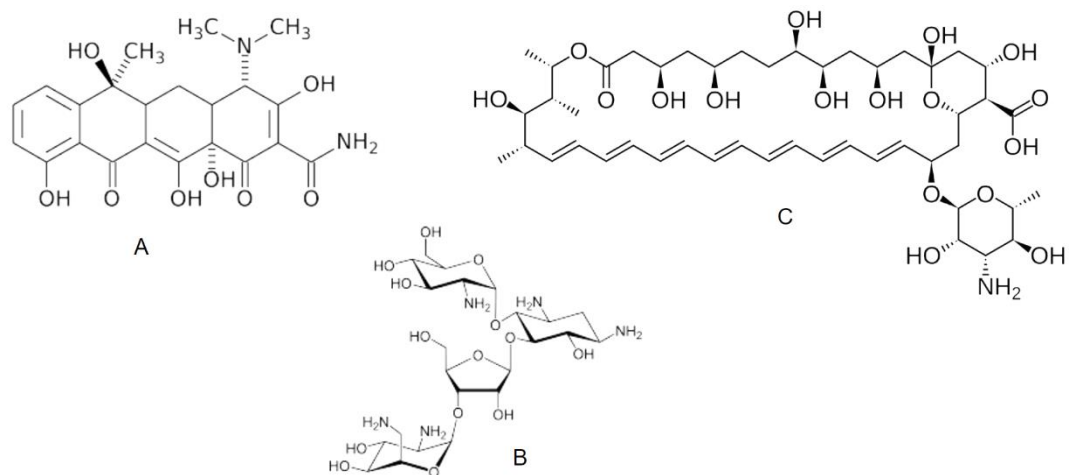


Figura 10 - Fármacos de origem microbiana – A. tetraciclina; B. paromomicina; C. anfotericina-B.

Os bioativos conhecidos são de grande maioria provenientes do ambiente terrestre. Contudo, a exploração da microbiota marinha já se mostra muito promissora tanto na área médica quanto na biotecnologia, mesmo sendo relativamente recente e pouco explorada (Smith et al., 2019).

1.9 Potencial marinho como fonte de PN bioativos

A exploração do ambiente marinho como fonte de produtos naturais é recente: data de meados dos anos 1970. Como os oceanos cobrem mais de 70% da superfície da Terra, eles são a fonte de uma parte substancial da biodiversidade mundial, que vive em condições distintas e variadas e evoluiu através de um longo período de adaptações metabólicas. A exploração da biodiversidade e da riqueza metabólica dos oceanos resultou na descoberta de milhares de produtos naturais marinhos bioativos estruturalmente únicos. A exploração de outras fontes de organismos marinhos bioativos, principalmente microrganismos, também levou à descoberta de novas pistas promissoras (Santos et al, 2020; Romano et al, 2018).

Na década de 1950, deu-se o isolamento da espongotimidina e espongouridina da esponja marinha *Tethya crypta* (Bergman et al, 1951; Bergman et al, 1956; Bergman et al, 1957), que eventualmente levaram ao

desenvolvimento do Ara-C (citarabina, um agente antitumoral) e Ara-A (vidarabina, agente antiviral), agentes que receberam a aprovação da FDA em 1969 e 1976, respectivamente (Glaser e Mayer, 2009).

A aprovação do próximo produto natural marinho ocorreu apenas décadas depois. Em 2004, foi liberado o uso de ziconotide (PRIALT[®]) isolado de veneno do caramujo marinho *Conus magus* (Klotz, 2004), para o tratamento de dor crônica severa. Em seguida, em 2007, a União Europeia aprovou o uso da trabectina (Yondelis[®]), fármaco órfão para sarcomas de tecidos moles isolado do invertebrado *Ecteinascidia turbinata* (Schoffski et al, 2008). Na **Figura 11** alguns destes compostos estão representados de acordo com sua data de aprovação em agências regulatórias.

A aprovação de tão poucos produtos naturais marinhos vem depois de muitos anos de pesquisa principalmente pela comunidade acadêmica e apoio esporádico das principais empresas farmacêuticas (Glaser e Mayer, 2009). Uma revisão de Pereira (2019) revelou que o ramo farmacêutico marinho global é constituído atualmente por 30 compostos, que inclui 8 medicamentos aprovados pelas mais importantes agências regulatórias como a FDA dos EUA, Agência Europeia de Medicamentos (EMA), Ministério da Saúde do Japão e Administração de bens terapêuticos da Austrália e 22 candidatos a fármacos na fase I, II ou III de desenvolvimento de medicamentos (Pereira, 2019; Newman & Cragg, 2016). São exemplos de compostos em estudos clínicos a episulósina (es-285), molécula isolada do molusco bivalve *Spisula polynyma*; KRN 7000, glicolípido sintético derivado das agelasfinas, α -galactosilceramidas isoladas pela primeira vez da esponja marinha *Agelas mauritianus*; e o discodermólido, policetídeo isolado da esponja marinha *Discodermia dissoluta* por Gunasekera e colaboradores. Todos em estudos clínicos que envolvem pacientes com tumores sólidos

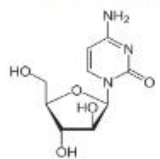

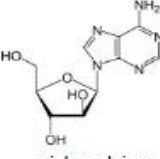

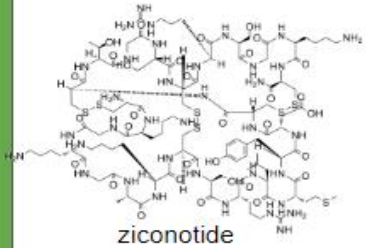

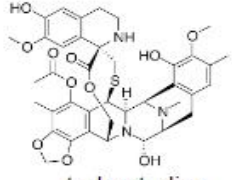

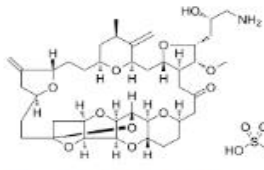

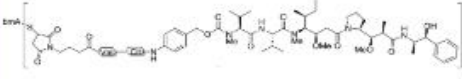

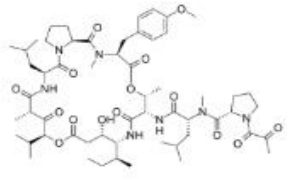

Ano	Composto	Origem	Atividade
1969	 citarabina	 <i>Tectitethya crypta</i>	anti-câncer
1976	 vidarabina	 <i>Tectitethya crypta</i>	antiviral
2004	 ziconotide	 <i>Conus magnus</i>	analgésico
2007	 trabectedina	 <i>Ecteinascidia turbinata</i>	anti-câncer
2010	 mesilato de eribulina	 <i>Halichondria okadai</i>	anti-câncer
2011	 brentuximab vedotina	 <i>Dolabella auricularia</i>	anti-câncer
2018	 plitidepsina	 <i>Aplidium albicans</i>	anti-câncer

Figura 11-Fármacos de origem marinha aprovados por agências regulatórias entre 1969 e 2018, de acordo com origem e atividade. Adaptado de Pereira, 2019.

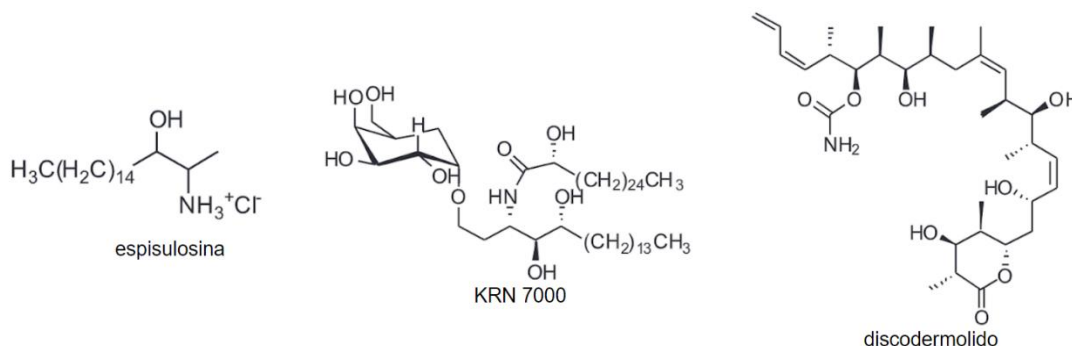


Figura 12- Compostos de origem marinha em fase de estudos clínicos: espisulosina, KRN7000 e discodermolido.

Apesar dos invertebrados marinhos como a esponja, a água-viva, anêmona, nudibrânquios e brizoários serem reconhecidos como os maiores produtores de PN marinhos bioativos, especialmente os pertencentes aos filos *Porifera* e *Cnidaria*, reconhecidos como mais prolíficos, a origem real da maioria destas moléculas parece ser dos microrganismos que vivem com eles em simbiose (Pereira, 2019; Carrol et al, 2020).

A grande maioria dos PN marinhos aprovados como fármacos ou atualmente em ensaios clínicos vêm de fontes biossintéticas bacterianas e cianobactérias. Os *Ascomycota* (fungos) e *Actinobacteria* têm estado entre as quatro mais amplamente coletados durante os últimos anos, associados aos organismos dos filos *Porifera* e *Cnidaria* (Jimenez, 2018). A exemplo disso, brentuximab vedotina, molécula antitumoral presente na lebre do mar *Dolabella auricularia*, devido a sua dieta consistente em cianobactéria *Symploca sp* (**Figura 11**) e salinosporamida A, anticancerígeno e antimalárico, isolado da actinobactéria *Salinispora tropica* (Jimenez, 2018;Arvinda swamy, 2013) (**Figura 13**). Também é notável a cianovirina-n, proteína anti-HIV isolada da cianobactéria *Nostoc ellipsosporum* (Boyd et al., 1997) (**Figura 13**).

1.9.1 Compostos antiparasitários de origem marinha

No meio marinho, diversos compostos antiparasitários podem ser elencados: foi isolado o diterpeno com ação tripanocida elangalonona proveniente da alga marrom *Bifurcaria bifurcata*, (CE_{50} = 45 μ M contra *T. brucei rhodesiense*) (Galle et al, 2013) (**Figura 13**). Já da alga vermelha brasileira, *Laurencia dendroidea*, foram isolados os sesquiterpenos elatol (CE_{50} =1 μ M em amastigotas de *T. cruzi*), obtusol (CE_{50} = 9 μ M em amastigotas de *L. amazonensis*) e triquinona (CE_{50} = 195 μ M e 219 μ M, em promastigotas e amastigotas de *Leishmania* sp., respectivamente) (Veiga-Santos et al., 2010; dos Santos et al., 2010).

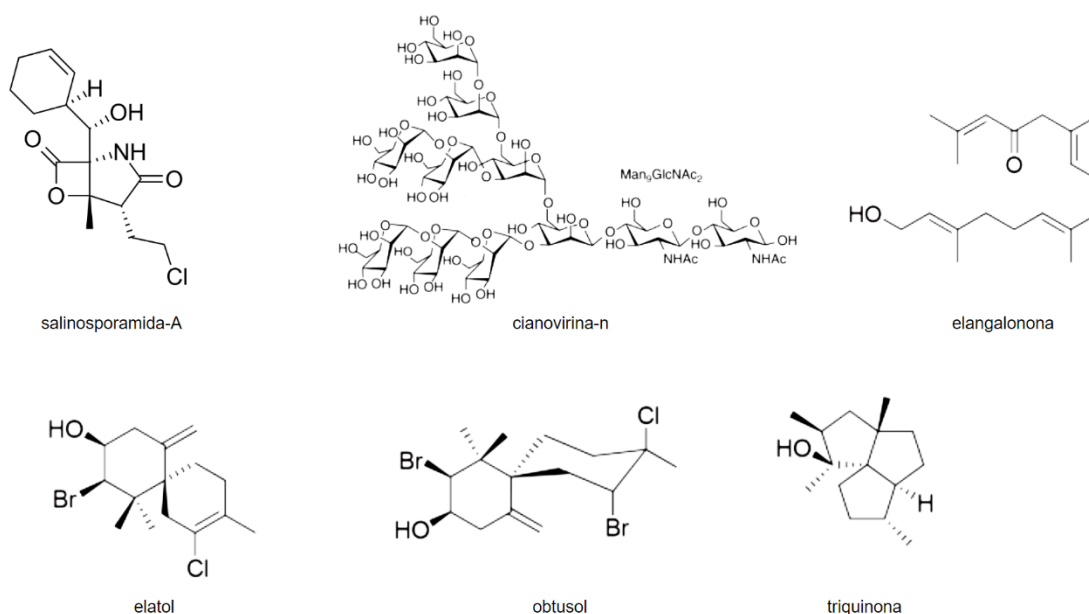


Figura 13- Compostos de origem marinha: salinosporamida-A; cyanovirina-n; elangalonona; elatol; obtusol e triquinona.

No ambiente marinho, há também diversos alcaloides com ação antiparasitária descritos (**Figura 14**). Três compostos isolados da bactéria marinha *Bacillus pumilus*, isolados do coral preto *Antipathes* sp. na costa Pacífica do Panamá, foram comprovadamente eficazes e específicos contra *T. cruzi*. São eles: 3-hidroxiacetilindol (CE_{50} = 20,6 μ M), acetil- β -oxotriptamina (CE_{50} = 19,4 μ M) e 3-formilindol (CE_{50} = 26,9 μ M), (Martínez-Luis et al., 2012). Outro alcaloide isolado de cepa marinha, *Paenibacillus* sp. DE2SH mostrou atividade antileishmania e antimalárica: a penidigamicina- A,

com valores de CE_{50} de 0,75 μM (promastigotas *L. major*); 7,0 μM (promastigotas de *L. donovani*); 0,78 μM (tripomastigotas *T.b.brucei*) e 9,1 μM (*P. falciparum*) (Osei et al, 2018). Foi explorada também a tiolactomicina, produzida pelo actinomiceto *Nocardia sp.*, que mostrou inibição da atividade de *Trypanosoma brucei* e *Toxoplasma gondii* (Roberts et al, 2003; Shiomi & Omura, 2004). Desta mesma classe é possível citar ainda as lepadinas E e F, isolados de uma espécie de tunicado do gênero *Didemnum*, ambos alcaloides com valor de CE_{50} de 2,2 e 2,6 $\mu\text{g/mL}$ (Wright et al, 2002) (**Figura 14**).

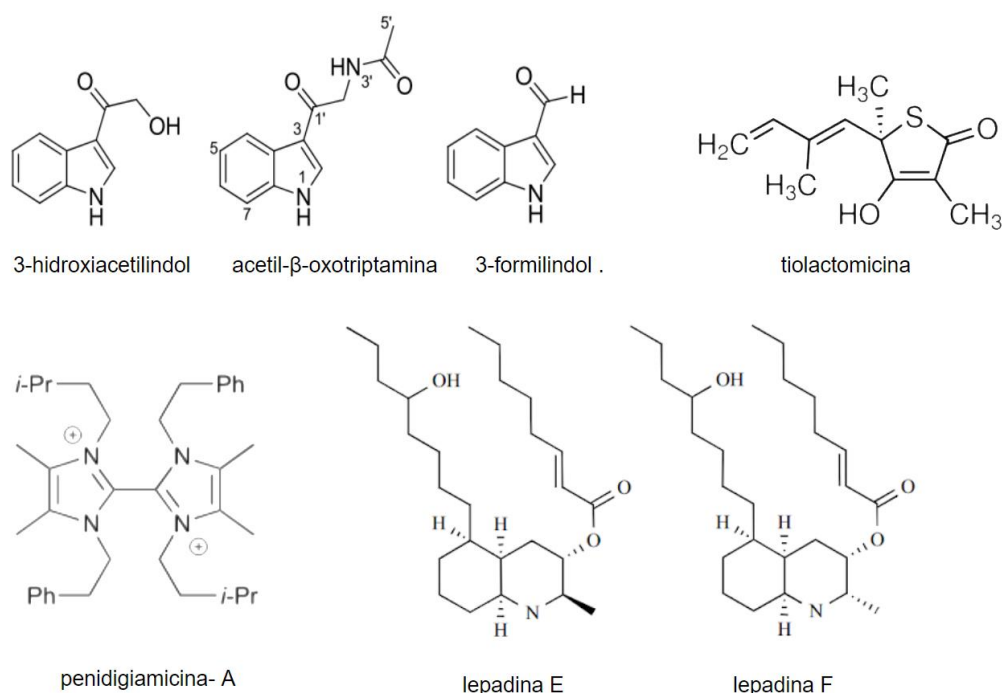


Figura 14-Compostos de origem marinha com atividade anti-protozoária. Alcaloides 3-hidroxiacetilindol; acetil-β-oxotriptamina, 3-formilindol; tiolactomicina; penidigamicina e lepadinas E e F.

Compostos halogenados, fenólicos, endoperóxidos, policetídeos e esteroides também fazem parte do grupo de produtos naturais com ação antiparasitária. Ilustrados abaixo (**Figura 15**) estão: pandarosídeo-G-metil-ester, saponina esteroidal isolada da esponja caribenha *Pandaros acanthifolium* eficaz contra *T. cruzi* ($CE_{50}=9,7 \mu\text{M}$), *T. brucei* ($CE_{50}=0,8 \mu\text{M}$) e *L. donovani* ($CE_{50}=1,3 \mu\text{M}$) (Regalado et al., 2010). Isolado da esponja

Plakortis angulospiculatus, o endoperóxido plakortido-P mostrou atividade contra *T.cruzi* ($CE_{50}=6,3 \mu\text{M}$) e ação leishmanicida em *L. donovani* ($CE_{50}= 5,2 \mu\text{M}$) (Kossuga et al, 2008); o composto halogenado dímero de oroidina dibromopalau'amina isolado do coral *Axinella verrucosa* demonstrou atividade em *T. brucei* ($CE_{50}=0,8 \mu\text{M}$), *L. donovani* ($CE_{50}=1,9 \mu\text{M}$) e *P.falciparum* ($CE_{50}=2,6 \mu\text{M}$) (Scala et al, 2010; Aiello et al, 2006). Além disso, dois novos compostos foram isolados do coral *Muricea austero*, os glicosídeos esteroidais pregnantes 3'-O-acetil-3-pregna-5,20-dienil-D-arabinopiranosídeo (A) e 4'-O-acetil-3-pregna-5,20-dienil-D-arabinopiranosídeo (B), com atividade anti-*P. falciparum* ($CE_{50} = 32$ e $38 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) (Figura 15). (Gutiérrez et al., 2005).

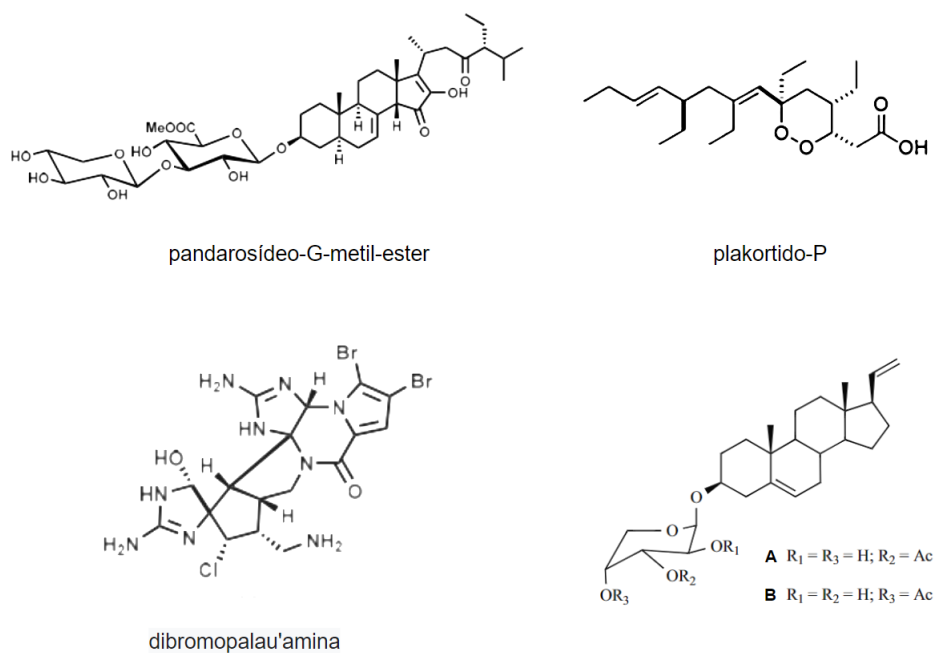


Figura 15 - Compostos de origem marinha com atividade anti-protozoária. saponina esteroidal (pandarosídeo-G-metil-ester); endoperóxido (plakortido-P); alcaloide (dibromopalau'amina); glicosídeos esteroidais pregnantes 3'-O-acetil-3-pregna-5,20-dienil-D-arabinopiranosídeo (A) e 4'-O-acetil-3-pregna-5,20-dienil-D-arabinopiranosídeo (B).

1.10 Abordagem OSMAC (One Strain Many Compounds - “Uma cepa, muitos compostos”)

Estudos demonstram uma inconsistência entre o número de grupos de genes identificados em microrganismos como potencialmente produtores de metabólitos secundários, e o número real de metabólitos secundários microbianos quimicamente produzidos. Esses grupos de genes são geralmente considerados crípticos ou “silenciosos”, sendo expressos em condições especiais.

Para isto, diversos autores vêm demonstrando que a abordagem OSMAC é de grande utilidade. É uma abordagem relativamente simples e versátil que permite a ativação de diversas vias metabólicas crípticas, regulando a biossíntese de metabólitos secundários através de alterações nos parâmetros de cultivo como composição do meio, taxa de aeração, tipo de recipiente de cultura, sais, aminoácidos, fonte de carbono e nitrogênio, adição de halogênios, variação de pH e temperatura, cultura com aeração, ou ainda uma combinação desses fatores (Bode et al., 2002, Baral et al., 2020). Com isso, o desencadeamento da expressão desses grupos genômicos crípticos pode resultar em um aumento da diversidade química que esses genes controlam, permitindo a descoberta de novas biomoléculas de interesse farmacêutico (Romano et al., 2018).

Desse modo, alterar alguns desses parâmetros visando a maior produção de metabólitos microbianos marinhos pode ser interessante tendo em vista todo o potencial destes microrganismos descrito anteriormente, podendo trazer moléculas inéditas de interesse farmacológico.

1.11 Justificativa

Considerando a problemática da terapia para doença de Chagas e o potencial de microrganismos como fonte de opções terapêuticas associado com a expressiva biodiversidade encontrada na costa litorânea brasileira, o presente estudo visou isolar e caracterizar novos protótipos farmacêuticos ativos no parasita em estudo, disponibilizando novas moléculas que poderiam ser utilizadas para o desenho de novos fármacos antiparasitários.

2 OBJETIVOS

O presente projeto visou isolar e caracterizar espécies bacterianas marinhas e avaliar o potencial anti-*Trypanosoma cruzi* de seus metabólitos.

Específicos:

1. Coletar, isolar e caracterizar por MALDI-TOF-MS ou sequenciamento genético, bactérias de invertebrados marinhos e sedimentos coletados no litoral paulista.
2. Preparar extratos orgânicos e avaliar a atividade antiparasitária dos metabólitos secundários em tripomastigotas de *T. cruzi*.
3. Avaliar as Concentrações Efetivas 50% dos extratos microbianos em tripomastigotas de *T. cruzi*.
4. Selecionar uma espécie bacteriana que apresente o extrato com atividade anti-*T. cruzi* para estudos OSMAC.
5. Selecionar um extrato com atividade anti-*T. cruzi* para pré-fracionamento biomonitorado, utilizando a extração em fase sólida.
6. Caracterizar quimicamente a fração ativa utilizando ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM).
7. Determinar a Concentração Efetiva 50% *in vitro* da fração ativa em tripomastigotas e amastigotas intracelulares de *T. cruzi*.
8. Avaliar *in vitro* a atividade hemolítica e a citotoxicidade da fração ativa em células de mamíferos.
9. Estudar possíveis alterações proteicas de tripomastigotas tratados com a fração ativa por meio de espectrometria de massas.
10. Estudar a permeabilidade da membrana plasmática de tripomastigotas tratados com a fração ativa.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.0 Materiais

Os meios de cultura Marine Agar e Marine Broth foram obtidos da Difco. PBS (*Phosphate-buffered saline* - “Tampão fosfato salino”), RPMI-1640 (Meio *Roswell Park Memorial Institute*), Alamar-Blue™ (rezazurina), MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), DMSO (dimetilsulfóxido), Triton™ X-100 (éter terc-octilfenílico de polietilenoglicol) ácido fórmico e TFA (ácido trifluoroacético), água destilada ultrapura (Milli-Q®) foram adquiridos de Sigma Aldrich/Merck. Solventes orgânicos grau HPLC (acetato de etila, metanol, etanol e acetonitrila) foram adquiridos de JTBaker. Kit Wizard e Go Taq Master Mix foram adquiridos da Promega e o kit QIAquick da Qiagen. Ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico (HCCA) de Bruker-Daltonics. O fluoróforo Sytox™ Green foi adquirido de Thermo Fisher, assim como Soro Fetal Bovino (SFB). Corantes para coloração de Gram (violeta genciana, lugol fraco, solução álcool-acetona e fucsina) foram adquiridos da Laborclin. Cartuchos de extração em fase sólida C18 Bond Elute foram adquiridos de Agilent.

3.1 Coleta de corais e sedimentos:

As coletas foram realizadas em fevereiro de 2020 por meio de mergulho autônomo na região de São Sebastião com o auxílio do CEBIMar-USP sob licença permanente para coleta de material zoológico número 10186-2 concedida pelo SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade). Os corais foram coletados em quantidades mínimas para não causar impacto ambiental. Os invertebrados marinhos foram posteriormente identificados pelo Dr. Álvaro E. Migotto. Os sedimentos do mar, uma mistura de materiais orgânicos e inorgânicos depositado no fundo do oceano, foram coletados com auxílio de uma draga no Canal de São Sebastião (a 35 metros de profundidade) (S 23°49'40.7" W045°24'44.7”), como também na Ilha dos

Búzios, por meio de mergulho autônomo (13 metros de profundidade) (S 23°48'05.2" W 45°08'32.2") (**Figura 16**).



Figura 16- Mapa dos locais das coletas. A seta preta aponta a ilha de Búzios e a vermelha o Canal de São Sebastião. Fonte: Google Maps.

3.2 Isolamento e cultivo de microrganismos

Após a coleta, as amostras foram imediatamente processadas no CEBIMar sob condições estéreis e o conteúdo do interior coralino e das amostras de sedimentos foram inoculados em placas de Petri de 90x15 mm em estufa B.O.D. a 25°C, em um meio ágar rico em nutrientes e específico para bactérias marinhas heterotróficas (Marine Agar, Difco). A partir disso, obteve-se vários isolados. Os isolados foram armazenados em meio líquido específico para bactérias marinhas heterotróficas (Marine Broth, Difco) e DMSO (Merck) a 15% em freezer a -30°C.

3.3 Coloração de Gram

Isolados bacterianos foram levados ao teste da coloração de Gram padrão. Algumas colônias foram transferidas do meio de cultivo ágar e diluídas em 20 µL de água marinha. A suspensão foi depositada e distribuída em lâmina. Após secagem a temperatura ambiente, adicionou-se violeta

genciana por toda a lâmina por 10 segundos. Lavou-se em água corrente e foi depositado lugol fraco por 10 segundos. Repetiu-se a lavagem e a seguir a lâmina foi aplicada a solução descorante de álcool e acetona. Novamente, lavou-se em água corrente e em seguida a lâmina foi coberta com solução diluída de fucsina (1:10) por 30 segundos. A lâmina foi lavada em água corrente e seca ao ar e levada a análise em microscópio óptico, admitindo como gram-positivas as cepas que mantêm a cor roxa do corante violeta genciana e como gram-negativas as que são descoradas com o álcool-acetona e coradas por fucsina, aparentando cor mais avermelhada.

3.4 Identificação de cepas por espectrometria de massas (MALDI-TOF/MS)

Para identificação dos microrganismos foi utilizada a técnica proteômica *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight* (“Espectrometria de massas por Ionização e dessorção a laser assistida por matriz – Tempo de voo”). As amostras foram extraídas em tubos de 1,5 mL ou diretamente na placa.

Na extração em tubos, algumas colônias (até 5) foram suspendidas em 300 µL de água ultrapura (Milli-Q) e submetidas ao vórtex. Foram adicionados 900 µL de etanol, vórtex e centrifugação a velocidade máxima por 1 minuto. Todo etanol foi retirado com pipeta. Ao pellet foram adicionados 50 µL de ácido fórmico a 70% e a mesma quantidade de acetonitrila. Os extratos foram centrifugados novamente por 2 minutos. O sobrenadante foi distribuído em duplicatas (1 µL) em uma placa de 96 poços para MALDI-TOF/MS (Bruker-Daltonics) e seca ao ar. A matriz, ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (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 amostra seca.

Na extração direta, algumas colônias (até 5) foram transferidas para a placa de 96 poços e cobertas com a matriz conforme descrito acima.

Um extrato de proteína DH5-alfa de *Escherichia coli* (Bruker-Daltonics) foi adicionado na placa para controle externo. As análises foram realizadas no espectrômetro de massas MALDI-TOF/MS Microflex (Bruker-Daltonics) 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).

3.5 Identificação por sequenciamento do gene parcial 16S rRNA

Algumas cepas que não foram identificadas pelo método de MALDI-TOF/MS foram selecionadas para sequenciamento genético realizado pelo Dr. Carlos Henrique Camargo, do Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz. O DNA genômico da cultura bacteriana foi isolado utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification, com algumas modificações. Neste protocolo modificado aumentamos o período de incubação com a Proteinase K e utilizamos uma maior concentração de RNase. A amplificação parcial do gene 16S rRNA foi realizada com o kit GoTaq Master Mix e primers universais para eubactérias.

Os produtos de PCR foram purificados com um kit de purificação QIAquick e sequenciados usando o ABI 3730 DNA Analyzer, um sistema de análise de DNA de 48 capilares (Applied Biosystems). As reações de seqüenciamento foram realizadas usando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) e as execuções realizadas em capilares (36 cm) usando o polímero POP7. As seqüências foram analisadas usando o software BioNumerics v.8.0 (Applied Maths, BioMerieux) ChromasPro (versão 2.0, Technesium DNA Sequencing Software, Austrália, <http://technesium.com.au/wp/chromaspro/>), em comparação com as

sequências presentes no banco de dados Ezbiocloud e Microbenet para espécies-tipo e também no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). As sequências genéticas foram depositadas no banco de dados GenBank (NCBI).

3.6 Extração de metabólitos secundários em meio ágar marinho

Cepas bacterianas isoladas e identificadas foram semeadas em placas de Petri (140x15 mm) e cultivadas por 120 h a 25°C. As colônias foram raspadas com raspador de células (Corning) e diluídas em água ultrapura (Milli-Q) em frasco de vidro. Após agitação em vórtex por 2 minutos e banho de ultrassom por 10 min, foram adicionados 200 mL acetato de etila (JT Baker) e a solução foi transferida para o banho de ultrassom por 40 min. Após este período, o material foi transferido para um funil de separação. Após partição, a fase orgânica foi filtrada em funil sinterizado e solvente eliminado sob evaporação rotativa a 40°C. À fase aquosa, foi adicionado novo volume de AcOEt (200 mL), repetindo-se o processo a partir desse ponto por 3 vezes. O extrato assim obtido foi seco e armazenado em freezer a -20°C.

3.7 Extração de metabólitos secundários em meio líquido

Nessa variação de cultivo que configura uma abordagem OSMAC, colônias isoladas do meio sólido foram transferidas para 20 mL de meio líquido específico para bactérias marinhas (Marine Broth) e cultivadas por 24h. A densidade óptica dessa cultura foi mensurada e ajustada para corresponder a 0,5 na escala de McFarland, ou seja, $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Em um frasco de vidro com capacidade de 1 L, foram adicionados 250 mL do meio líquido e 1% do volume (2,5 mL) da cultura bacteriana ajustada anteriormente. O cultivo foi mantido a 25°C em agitador orbital e sem agitação por 96 h. Após esse período, as culturas foram transferidas para tubos cônicos de plástico com capacidade de 50 mL e levados a centrifugação a 4000g por 20 min. O precipitado celular foi separado do sobrenadante e concentrado em 100 mL

de água ultrapura (Milli-Q). Após agitação em vórtex por 2 minutos e sonicação em banho de ultrassom por 10 min, foram adicionados a essa fase aquosa 100 mL acetato de etila. A partir disso, a extração seguiu como já descrito no tópico 3.6.

3.8 Cultivo em meio modificado com antígenos parasitários

Nessa abordagem OSMAC, culturas de *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi* foram concentradas e levadas para congelamento, banho de ultrassom e adição de água marinha para garantir a morte parasitária. Ao ágar marinho (Difco) foi adicionada a concentração de 1×10^6 /mL parasitas processados como descrito acima (*L. infantum* ou *T. cruzi*) em 40mL do meio em placas de Petri (140x15mm). A cepa bacteriana marinha *Shewanella pneumatophori* foi semeada nesse meio com os antígenos parasitários e o cultivo deu-se por 120 h. O grupo controle caracterizou-se pelo crescimento da cepa bacteriana em meio ágar sem a presença de antígenos. A partir disso, foi seguido o protocolo de extração de metabólitos descrito no tópico 3.6. Os extratos brutos foram avaliados quanto sua atividade tripanocida como descrito em 3.12.

3.9 Extração em Fase Sólida (Solid Phase Extraction - SPE)

Para fracionamento do extrato em AcOEt em frações de diferentes polaridades, foi utilizado um cartucho SPE Bond Elute C18 (1 g) (Agilent), o qual foi ativado previamente com 10 mL de metanol (100%) e condicionada com 10 mL metanol em água a 10% (v/v). O extrato (50 mg para cada cartucho) foi dissolvido em 20 mL de metanol em água (10% v/v). A amostra foi então aplicada e eluída a uma vazão de 1 mL/min para adsorção dos metabólitos. Diferentes concentrações de metanol em água foram aplicadas para a eluição dos metabólitos (30, 60 e 100%). Deste processo, foram coletadas 4 frações de 20 mL, cujo solvente foi eliminado em evaporador rotativo a 40°C. Para o estudo biomonitorado, as frações (**F0, FI, FII e FIII**)

foram dissolvidas em metanol e testadas contra tripomastigotas de *T. cruzi* (item 3.12).

3.10 Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria De Massas De Alta Resolução

Alíquotas de cada fração ativa do extrato microbiano da cepa SCSB 6022 (*Olleya marilimos*a), foram analisadas por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) pelo Prof. Dr. João Henrique G. Lago na Universidade Federal do ABC. Os espectros foram registrados em metanol deuterado (Sigma-Aldrich) em espectrômetro Varian, modelo INOVA 500, operando a uma frequência de 500 MHz, sendo o sinal residual do solvente empregado como referência interna. Os espectros foram processados no software MNova v.12.0.1-20560, da Mestrelab Research S. L.

Os espectros de massas em alta resolução dos compostos foram obtidos em espectrômetro Bruker-Daltonics MicroTOF QII, usando uma fonte de ionização por *electrospray*, operando no modo negativo via injeção direta.

3.11 Cultivo de parasitas e células

Tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram cultivados em células LLC-MK2 em meio RPMI-1640, suplementado com 2% de SFB a temperatura de 37°C em estufa com 5% CO₂. Células NCTC foram cultivadas em meio RPMI-1640 com 10% de SFB em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

3.12 Determinação in vitro da atividade antiparasitária e da concentração efetiva 50% (CE₅₀) dos extratos e frações em tripomastigota (biomonitoramento):

Os diferentes compostos (frações e fármacos padrões) foram dissolvidos em DMSO, diluídos em meio de cultura e incubados com os parasitas em diferentes concentrações com o objetivo de se determinar as

respectivas CE₅₀. A concentração do solvente não ultrapassou 0,5% (v/v) para não causar danos aos parasitas.

As formas tripomastigotas, obtidas no primeiro dia da cultura de células LLC-MK2, na concentração de 1×10^6 /poço em placas de 96 poços foram tratadas com os diferentes extratos microbianos em diluições seriadas de 200 µg/mL a 1,56 µg/mL em meio RPMI-1640, suplementado com 2% de SFB. As placas foram incubadas a 37°C em estufa de 5% CO₂ por 24 horas e a viabilidade dos tripomastigotas foi determinada pelo método colorimétrico usando a resazurina (Alamar Blue™), analisada no comprimento de onda (λ) 570 nm em espectrofotômetro (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices). O fármaco benznidazol foi usado como controle positivo do ensaio (100% morte) e, como controle negativo (100% de células vivas), utilizaram-se as células não tratadas. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

Na avaliação biomonitorada da atividade das frações de *Olleya marilimosa* (F0 a FIII) e dos extratos OSMAC de *Shewanella* sp (SCSB 6.0.2.1), os tripomastigota (1×10^6 /poço) foram incubados com os extratos na concentração de 150 µg/mL meio RPMI-1640. Após incubação em estufa a 37°C 5% CO₂ por 24 horas, avaliou-se a efetividade dos extratos visualmente e atividade tripanocida foi determinada de acordo com motilidade e morfologia do parasita considerando (+):baixa atividade; (++) : média atividade e (+++) alta atividade tripanocida ou N/A (não ativo).

3.12.1 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 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 a fração de extrato bruto FII serialmente diluída em base 2 (200 a 1,6 µM) em meio HBSS suplementando com NaHCO₃ (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 método colorimétrico com resazurina(Alamar Blue®). A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro (FilterMax F5Multi-Mode) com comprimento de onda de 570 nm.

3.13 Determinação da citotoxicidade in vitro e concentração citotóxica 50% (CC₅₀):

A fração ativa do extrato de *Olleya marilimos* (**FII**) foi distribuída de acordo com uma diluição seriada da concentração de 200 µg/mL a 1,56 µg/mL. Foram adicionadas células NCTC 929 na quantidade de 1×10^6 /poço em em meio RPMI-1640, suplementado com 10% de SFB em placas de 96 poços. As placas foram incubadas a 37°C em estufa de 5% CO₂ por 48 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico usando o cromógeno MTT, analisada no comprimento de onda (λ) 570 nm em espectrofotômetro (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices) (Tada et al., 1986; Mesquita et al, 2014).

3.14 Atividade hemolítica

Eritrócitos (BALB-c) foram centrifugados (500 rpm, 10 minutos) e utilizados para obter uma solução a 3% em PBS. Em uma microplaca de titulação com fundo U, a fração do extrato bacteriano ativo (**FII**) foi distribuído em diluição seriada de 200 µg/mL a 1,56 µg/mL. A seguir foi adicionado a suspensão de eritrócitos (100 µL/poço) por 2 horas a 24°C. O sobrenadante foi coletado e a densidade óptica determinada no comprimento de onda (λ) 570 nm (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices). A hemólise máxima foi obtida usando suspensão de hemácias em água destilada ultrapura (Milli-Q®) (controle positivo) e hemácias não tratadas como controle negativo.

3.15 Determinação *in vitro* da atividade antiparasitária e da Concentração Efetiva 50% (CE₅₀) da fração FII de *Olleya marilimos* em amastigotas:

Macrófagos (1×10^5 células/poço) foram adicionados em placas de 16 poços (NUNC®) e incubados a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por 24h. Em seguida, as células foram infectadas (10:1 parasita/macrófago) com 1×10^6 tripomastigotas/poço por 2 horas. Adicionou-se a fração ativa **FII** de *Olleya marilimos* diluído seriadamente em base 2 (100 - 0,78 µM). As formas intracelulares do parasita permaneceram incubadas durante 48 horas. 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 CE₅₀, foi utilizado o índice de infecção (IF), obtido através da contagem diferencial de 200 macrófagos/poço. O IF é calculado com a multiplicação do número de macrófagos infectados pelo número de amastigotas totais, dividido pelo número de macrófagos totais.

3.16 Avaliação do Perfil Proteico de tripomastigotas de *T. cruzi*

Tripomastigotas (1×10^7 /poço) foram tratados com **FII** de *Olleya marilimos* (25 µg/mL e 50 µg/mL) e benznidazol (40 µM) durante 24 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%. 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) e seca em temperatura ambiente. A matriz, ácido α-ciano-4- hidroxí-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* (Bruker-Daltonics)

foi adicionada na placa para controle externo. As análises foram realizadas em um espectrômetro de massa Bruker-Daltonics 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).

3.17 Avaliação de Permeabilidade de 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* (2×10^6 parasitas/poço) foram adicionados em placas pretas de 96 poços e incubados com Sytox® Green (1 μ M) em meio HBSS suplementando com NaHCO₃ (4,2 mM) e D-glicose (10 mM), juntamente com a fração de extrato ativa de *Olleya marilimosa* (FII) a 24°C por 15 min. Posteriormente, foi realizada uma leitura basal da placa, após essa leitura, o composto foi adicionado e a fluorescência foi monitorada por 3 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 X-100 0,5% (v/v) e parasitas não tratados foram utilizados como controle negativo (100% viabilidade, membrana íntegra).

3.18 Análise estatística

Valores de CE₅₀ e CC₅₀ foram calculados a partir de curva sigmoide dose-resposta. Salvo indicação em contrário, os dados relatados são a média \pm desvio padrão de pelo menos dois experimentos independentes realizados

com amostras duplicadas. Para análise da atividade hemolítica e permeabilidade de membrana plasmática foram feitas análises de variância One-way ANOVA com teste de Comparação Múltipla de Tukey, aplicadas para os testes de significância (p valor <0.05) usando o software GraphPad Prism 6.0. As amostras foram testadas em duplicata/triplicata e os experimentos repetidos pelo menos duas vezes.

4 RESULTADOS

4.1 Coleta e Identificação

Em colaboração com o CEBIMar-USP, foram coletados por meio de mergulho autônomo e por meio de dragagem no Canal de São Sebastião e na Ilha de Búzios, 4 diferentes espécies de invertebrados marinhos e 2 amostras de sedimentos que serão descritos nesse trabalho de acordo com as siglas correspondentes (**Tabela 1**). A profundidade da coleta variou de 5 a 35 metros (**Tabela 1**). Na **Figura 17** estão representados os exemplares coletados. Os invertebrados foram identificados pelo Prof. Dr. Álvaro Migotto.

Tabela 1- Origem dos microrganismos associados a corais ou sedimentos

Sigla	Origem	Profundidade (metros)
TC	<i>Tubastraea coccinea</i>	5
MH	<i>Mussismilia hispida</i>	10
PC	<i>Palythoa caribaeorum</i>	5
MD	<i>Madracis decactis</i>	10
SCSB	Sedimento do Canal de São Sabastião	35
SIBUZ	Sedimento da Ilha de Búzios	13

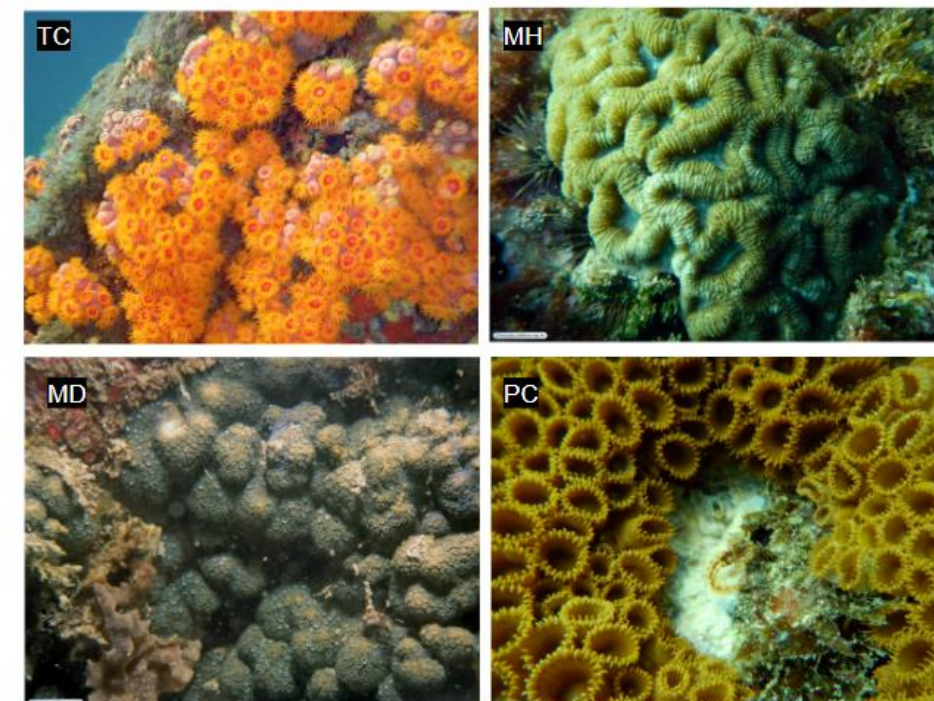


Figura 17- Invertebrados coletados - TC: *Tubastraea coccinea*; MH: *Mussismilia hispida*; MD: *Madracis decactis*; PC: *Palythoa caribaeorum*. Fotos

de Álvaro E. Migotto. e Marcelo Visentini Kitahara. Disponíveis no Banco de imagens Cifonauta (Universidade de São Paulo).

4.2 Isolamento e Identificação de Espécies Bacterianas Marinhas.

Destes invertebrados, a microbiota associada foi isolada sob condições estéreis. Deste processo, constituímos um acervo de 32 microrganismos isolados (**anexo I e II**), os quais foram submetidos a identificação por MALDI-TOF-MS e armazenados a -80°C.

Na identificação destes microrganismos através da técnica de MALDI-TOF/MS (Bruker-Daltonics), após a extração das proteínas, as moléculas são ionizadas, separadas de acordo com sua relação massa/carga, e é determinado o tempo que leva para que os íons viajem até o detector, gerando um *fingerprint* de proteínas característico que, comparado ao banco de dados, permite a identificação a nível de espécie, de acordo com sistema logarítmico de pontuação intrínseco do programa que atribui um grau de confiabilidade (*score*) ao resultado (**Tabela 2**). Os valores acima de 2,0 garantem a identificação de gênero e espécie.

Tabela 2- Identificação de 12 isolados isoladas de corais e sedimentos marinhos de acordo com *score* de MALDI-TOF ou sequenciamento

Sigla	Gram e morfologia	Identificação	Score*
TC 2.0.2	<i>NEG - bacilos</i>	<i>Alteromonas macleodi</i>	S
			2,25
TC 2.2	<i>NEG- bacilos</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2,12
			2,28
MH 3.0	<i>NEG - bacilos</i>	<i>Vibrio harveyi</i>	2,21
			2,31
MH 3.3	<i>NEG - bacilos</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2,16

			2,27
PC 4.0.1	NEG - cocobacilos	<i>Vibrio harveyi</i>	2,17
			2,3
MD 5.0	NEG - bacilos	<i>Vibrio harveyi</i>	2,29
SCSB 6.0.2.1	NEG - bacilos	<i>Shewanella pneumatophori</i>	S
SCSB 6.0.2.2	POS- bacilos	<i>Olleya marilimosa</i>	S
SCSB 6.1	POS- bacilos	<i>Bacillus megaterium</i>	2,29 2,25
SCSB 6.2	NEG- bacilos	<i>Vibrio harveyi</i>	2,15 2,06
			2,35
SIBUZ 7	NEG- cocobacilos	<i>Vibrio harveyi</i>	2,17
SIBUZ 7.2.2	NEG- cocos	<i>Halomonas aquamarina</i>	S

*score obtido no MALDI TOF-MS de dois estudos independentes. Scores acima de 2 confirmam gênero e espécie ; S: identificação por sequenciamento genético. NEG=gram-negativo. POS=gram-positivo; TC (*Tubastraea coccinea*), MH (*Mussismilia hispida*), PC (*Palythoa caribaeorum*), MD (*Madracis decactis*), SCSB (Sedimentos do Canal de São Sebastião) e SIBUZ (Sedimentos da Ilha dos Búzios)

Com a coloração de Gram, constatou-se que a maioria destes eram bacilos gram-negativos (**Tabela 2**).

Não foi possível a identificação de alguns isolados por este método, por não apresentarem similaridade com nenhum padrão proteico das bactérias disponíveis no banco de dados do equipamento. Por isso, algumas delas foram selecionadas para identificação por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.

A estrutura molecular do RNA ribossômico (rRNA), nomeadamente o 16S rRNA, é a base para a maioria dos métodos utilizados na investigação da ecologia microbológica. A sequência genética do gene 16S rRNA é a sequência é mais frequentemente utilizada como marcador filogenético para a ecologia microbológica, segundo Innui (2009). Dado o grande nível de conservação visível na sequência do gene 16S rRNA, a distância filogenética

entre microrganismos pode ser calculada. Através do sequenciamento e análise de amplicons obtidos da área do 16S rDNA utilizando uma base de dados onde foram depositadas sequências do gene 16S rRNA, é possível identificar rapidamente bactérias com base em suas sequências ribossômicas.

Logo, após sequenciamento, as sequências de nucleotídeos (**Anexo III**) microbianos marinhos foram comparadas as depositadas nos bancos de sequencias EzTaxon (<https://www.ezbiocloud.net/>), SepsitTest (<http://www.sepsitest-blast.de/en/index> e Microbenet (<https://microbenet.cdc.gov/>). A **Tabela 3** mostra os respectivos percentuais de similaridade baseado no sequenciamento do gene parcial 16S rRNA, de forma que os organismos identificados são compatíveis com as bactérias marinhas *Alteromonas macleodii*, *Shewanella pneumatophori*, *Olleya marilimosa* e *Halomonas aquamarina*, respectivamente. As sequências genéticas foram depositadas no banco de dados GenBank (NCBI) sob os seguintes códigos: OP163900, OP163958, OP163959.

Tabela 3- Identificação de cepas marinhas por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.

Sigla	Microrganismo	Similaridade	Compleitude	Identidade	Comprimento de alinhamento
SCSB	<i>Shewanella</i>				1442
6.0.2.1	<i>pneumatophori</i>	99,72%	97,3%	99,7%;	(99,7%)
SIBUZ	<i>Halomonas</i>				1430
7.2.2	<i>aquamarina</i>	99,4	-	99,6%	(100,0%)
TC	<i>Alteromonas</i>				
2.0.2	<i>macleodii</i>	99,4%	93,8%	99,8%	1385(99,9%)
SCSB	<i>Olleya</i>				
6.0.2.2	<i>marilimosa</i>	95,5%	100%	-	-

Com isso, o estudo apresenta 12 cepas identificadas ao todo, sendo 7 diferentes espécies: *Alteromonas macleodii* (1), *Vibrio harveyi* (5), *Vibrio alginolyticus* (2), *Bacillus megaterium* (1), *Shewanella pneumatophori* (1), *Olleya marilimosa* (1) e *Halomonas aquamarina* (1).

4.3 Obtenção de Extratos de Metabólitos Bacterianos

Visando avaliar o potencial anti-*Trypanosoma cruzi* dos metabólitos microbianos, partiu-se para a obtenção de extratos orgânicos brutos, após cultivo em meio Marine Agar em placas de Petri de 140x15 mm. Para isto, utilizou-se um total de sete placas e cultivo por 120 horas para cada espécie. Os extratos orgânicos das 12 cepas isoladas de invertebrados marinhos e sedimentos, foi obtida uma quantidade total de 2 a 11 mg (**Tabela 4**).

Tabela 4- Quantidade de extrato bruto obtido das extrações de metabólito das 12 cepas identificadas.

Sigla	Cepa	Quantidade (mg)
TC 2.0.2	<i>Alteromonas macleodii</i>	2,6
TC 2.2	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2,1
MH 3.0	<i>Vibrio harveyi</i>	11,4
MH 3.3	<i>Vibrio alginolyticus</i>	8,4
PC 4.0.1	<i>Vibrio harveyi</i>	7,9
MD 5.0	<i>Vibrio harveyi</i>	3,4
SCSB 6.0.2.1	<i>Shewanella pneumatophori</i>	5,5
SCSB 6.0.2.2	<i>Olleya marilimosa</i>	4,8
SCSB 6.1	<i>Bacillus megaterium</i>	2,7
SCSB 6.2	<i>Vibrio harveyi</i>	3,9
SIBUZ 7	<i>Vibrio harveyi</i>	8,9
SIBUZ 7.2.2	<i>Halomonas aquamarina</i>	3,2

TC (*Tubastraea coccinea*), MH (*Mussismilia hispida*), PC (*Palythoa caribaeorum*), MD (*Madracis decacactis*), SCSB (Sedimentos do Canal de São Sebastião) e SIBUZ (Sedimentos da Ilha dos Búzios)

4.4 Avaliação da Concentração Efetiva 50%

Com os extratos orgânicos foram realizados ensaios para avaliar a Concentração Efetiva 50% em formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Dentre os 12 extratos testados, 100% destes apresentaram atividade antiparasitária, com valores de CE₅₀ encontrados variaram entre 1,5 ± 0,25 µg/mL e 59,9 ± 0,1 µg/mL. O extrato mais ativo foi obtido de *Vibrio harveyi*, encontrada no

coral *Palythoa caribaeorum*. O extrato menos ativo foi da cepa de *Bacillus megaterium*, isolada em sedimentos do Canal de São Sebastião (**Tabela 5**).

Além disso, não se pode deixar de notar a diferença de atividade entre os extratos metabólitos de *Vibrio* spp, obtidos de diferentes amostras de corais e sedimentos marinho. Os valores de CE₅₀ dos extratos obtidos das cepas *V. harveyi* (MH 3.0, PC 4.0.1, MD 5.0, SCSB 6.2 e SIBUZ 7) variaram entre 1,5 e 51,3 µg/mL e dos obtidos de *V. alginolyticus* (TC 2.2 e MH 3.3) variavam 13,9 e 25,4 µg/mL.

Tabela 5- Avaliação da Concentração Efetiva 50% em tripomastigotas de *T. cruzi* dos 12 extratos orgânicos microbianos de cepas marinhas identificadas

Sigla	Cepa	CE ₅₀ ± DP (µg/mL)
TC 2.0.2	<i>Alteromonas macleodii</i>	31,2±2,6
TC 2.2	<i>Vibrio alginolyticus</i>	13,9±3,0
MH3.0	<i>Vibrio harveyi</i>	51,3±1,1
MH3.3	<i>Vibrio alginolyticus</i>	25,4±1,2
PC 4.0.1	<i>Vibrio harveyi</i>	1,5±0,2
MD 5.0	<i>Vibrio harveyi</i>	18,3±2,6
SCSB 6.0.2.1	<i>Shewanella pneumatophori</i>	15,1±3,3
SCSB 6.0.2.2	<i>Olleya marilimosa</i>	17,9±0,7
SCSB 6.1	<i>Bacillus megaterium</i>	59,9±0,1
SCSB 6.2	<i>Vibrio harveyi</i>	32,8±3,9
SIBUZ 7	<i>Vibrio harveyi</i>	8,0±0,7
SIBUZ 7.2.2	<i>Halomonas aquamarina</i>	15,4±0,5

Valores de CE₅₀ calculados a partir de curva sigmoidal dose-resposta DP: desvio padrão; CE₅₀: Concentração Efetiva 50%; TC (*Tubastraea coccinea*), MH (*Mussismilia hispida*), PC (*Palythoa caribaeorum*), MD (*Madracis decactis*), SCSB (Sedimentos do Canal de São Sebastião) e SIBUZ (Sedimentos da Ilha dos Búzios).

Com base nas curvas sigmoidais dose-resposta (**Figura 18**), foi possível verificar que sete extratos mataram aproximadamente 100% dos parasitas nas maiores concentrações testadas, sendo estes: **TC 2.2, MH 3.3, PC 4.0.1, SCSB 6.0.2.2, SCSB 6.2, SIBUZ 7, SIBUZ 7.2.2**. Além disso, com

base no método de viabilidade celular utilizando a resazurina pela atividade mitocondrial, pôde-se verificar que todos os extratos apresentaram atividade tripanocida.

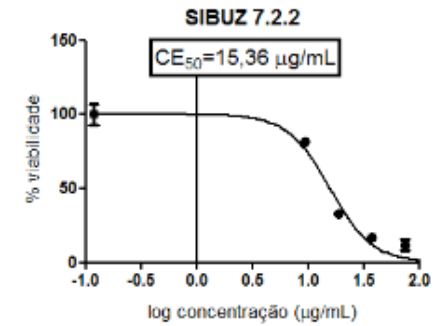
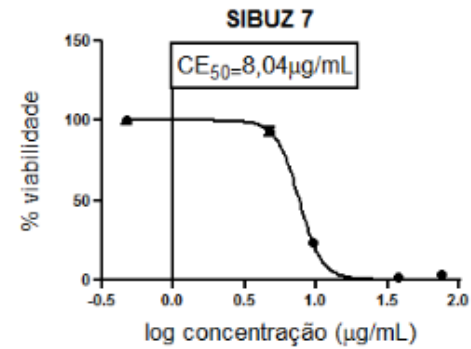
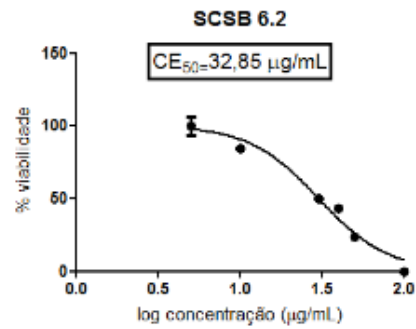
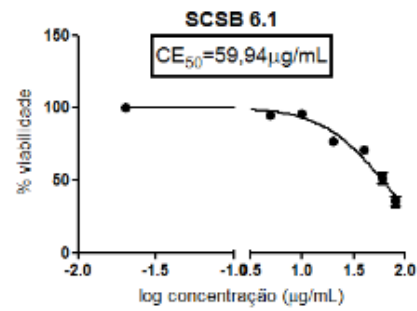
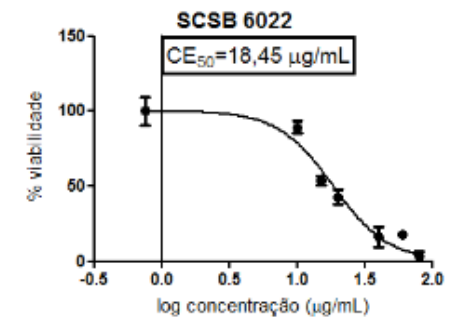
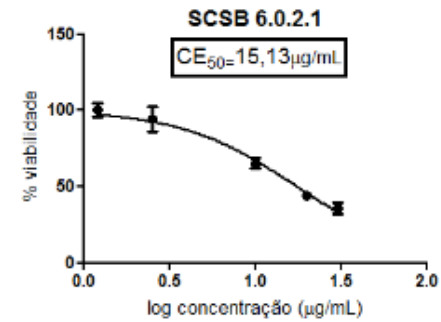
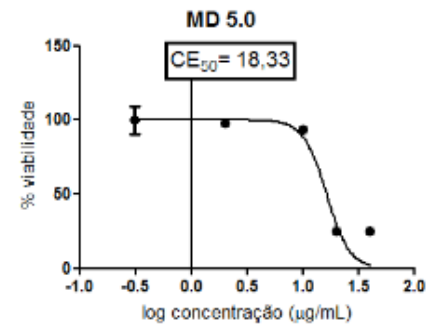
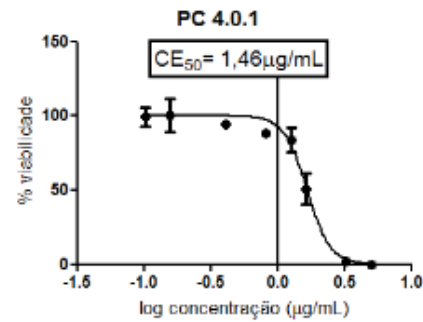
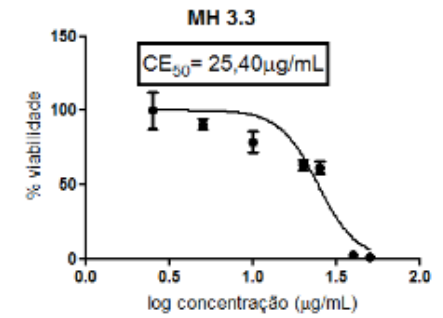
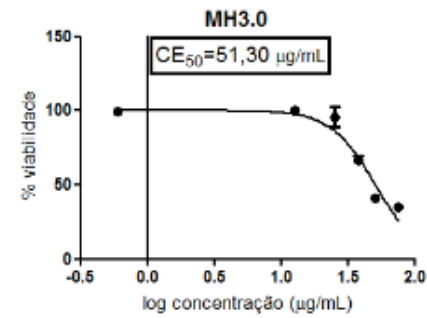
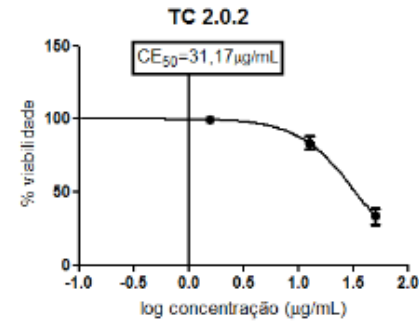
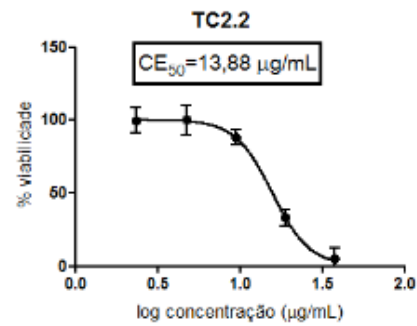


Figura 18 Curvas dose-resposta dos extratos orgânicos bacterianos de TC (*Tubastraea coccinea*), MH (*Mussismilia hispida*), PC (*Palythoa caribaeorum*) e MD (*Madracis decactis*), SCSB (Sedimentos do Canal de São Sebastião) e SIBUZ (Sedimentos da Ilha dos Búzios) em tripomastigotas de *T. cruzi*. Concentração efetiva 50% determinada pelo método colorimétrico utilizando resazurina ($\lambda=570\text{nm}$) (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices). (CE₅₀: Concentração Efetiva 50%).

4.5 Abordagem One Strain Many Compounds (OSMAC).

I. *Shewanella pneumatophori*- Cultivo com Antígenos Parasitários.

A seleção desta bactéria foi baseada nos seguintes critérios: i) extrato bruto com 50% de morte do *T. cruzi*; ii) primeiro estudo de atividade farmacológica de seus metabólitos. Para isto, o cultivo foi realizado em placas contendo antígenos de *Leishmania* ou *T. cruzi* e a extração dos metabólitos foi obtida em acetato de etila. Após a incubação dos tripomastigotas com os respectivos extratos na concentração máxima de 150 $\mu\text{g/mL}$, não foi observado diferença de potência entre os mesmos (**Tabela 6**).

Tabela 6. Avaliação da atividade anti-*T. cruzi* por microscopia óptica (morfologia e motilidade) de tripomastigotas de *T. cruzi* incubadas com extratos da cepa SCSB 6.0.2.1 (*Shewanella pneumatophori*). Abordagem OSMAC com cultivo de antígenos de *Leishmania infantum* e *T. cruzi*:

Sigla	Cultivo	Quantidade de extrato(mg)	Atividade Anti- <i>T.cruz</i>
I-SCSB 6.0.2.1	<i>S.pneumatophori</i>	1,7	++
II-SCSB 6.0.2.1+LI	<i>S. pneumatophori</i> + <i>Leishmania infantum</i>	1,1	++
III-SCSB 6.0.2.1 +TC	<i>S. pneumatophori</i> + <i>Trypanosoma cruzi</i>	1	++

SCSB: Sedimentos do Canal de São Sebastião; ++ 50% atividade anti-*T. cruzi*

II. *Olleya marilimosa* - Cultivo em Meio Sólido e Líquido (Estático/Movimento)

A seleção desta bactéria foi baseada nos seguintes critérios: i) extrato bruto com 100% de morte do *T. cruzi*; ii) coletado pela primeira vez em águas

tropicais no Oceano Atlântico e iii) primeiro estudo de atividade farmacológica de seus metabólitos. Foi realizado um estudo para comparação da produção de metabólitos em diferentes condições de crescimento, sendo estas: i) meio sólido *Marine Agar*; ii) meio líquido *Marine Broth* em movimento e iii) meio líquido *Marine Broth* estático (**Tabela 7**).

Tabela 7- Comparação do rendimento e atividade antiparasitária de extratos obtidos de bactérias cultivadas em meio líquido e sólido.

Meio de cultura	Qntd. de extrato(mg)	CE ₅₀ (µg/mL)
Caldo	3,1	53,0
Caldo + rotação 100rpm	8,5	147,5
Ágar	3,2	18,4
Controle caldo	0,7	Ativo a 100 µg/mL (+++)

CE₅₀: Concentração efetiva 50%; +++: Alta ação tripanocida

4.6 Fracionamento biomonitorado e estudos espectroscópicos

Para tal, procedemos com a obtenção de 500 mg de extrato bruto em acetato de etila. O extrato total foi fracionado em cartucho de extração de fase sólida, resultando em quatro frações distintas (**F0** a **FIII**) de acordo com a porcentagem de metanol utilizada. As frações eluídas com 30 e 60% de metanol não apresentaram a cor amarelada, característica das frações **F0** e **FIII**. A fração eluída com 60% de metanol em água (**FII**) foi a que apresentou a maior potência contra os tripomastigotas de *T. cruzi*, eliminando 100% após 24 h de incubação (**Tabela 8**).

Tabela 8- Frações obtidas por *SPE* do extrato orgânico bruto de *Olleya marilimosa* de acordo com porcentagem de metanol utilizada, quantidade e atividade antiparasitária.

Fração	%MeOH	Qntd.(mg)	Atvd.
F0	10%	158,7	N/A
FI	30%	11,9	N/A
FII	60%	10,2	+++
FIII	100%	161,6	++

N/A:não ativo; ++ 50% média atividade tripanocida; +++ 100% alta atividade tripanocida

Sendo **FII** a fração de maior atividade anti-*T. cruzi*, a mesma foi analisada por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) e por espectrometria de massas (EM) de alta resolução para avaliar qualitativamente os possíveis metabólitos presentes (**Figura 19 e Anexo IV**). A Fração FIII também foi analisada em RMN (**Anexo V**), mas foi decidido prosseguir os estudos com a fração FII, de maior atividade tripanocida.

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica analítica de espectroscopia usada para determinar a estrutura molecular e a composição química de uma amostra. Nesta análise, um campo magnético externo induz certos núcleos em moléculas a absorverem radiofrequências seletivas. A energia absorvida causa uma transição de spin nuclear, que pode ser observada na espectroscopia de RMN.

Inicialmente, o espectro de RMN de ^1H indicou a presença majoritária de material graxo devido, dentre outros sinais, ao simpleto intenso em δ 1,2 ppm, característico de cadeias metilênicas. No entanto, o sinal referente a terminação da cadeia carbônica, comumente observado como um tripleto em δ 0,8 ppm, foi detectado como um duplete ($J = 6,5$ Hz) sugerindo a presença de ácidos graxos *iso* (**Figura 19A e Anexo V**).

Na tentativa de se identificar tais compostos, foi registrado o espectro de massas de alta resolução em modo negativo, para que fossem observados apenas os íons $[\text{M} - \text{H}]^-$ dos ácidos graxos (**Figura 19B**).

A **Figura 19B** mostra que foram observados quatro íons majoritários com m/z 297,2790, 311,2954, 325,3104 e 339,3260, compatíveis com as fórmulas moleculares $\text{C}_{19}\text{H}_{37}\text{O}_2^-$ (calculado 297,2794), $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{O}_2^-$ (calculado 311,2950), $\text{C}_{21}\text{H}_{41}\text{O}_2^-$ (calculado 325,3106) e $\text{C}_{22}\text{H}_{43}\text{O}_2^-$ (calculado 339,3263), todos com um grau de insaturação, ou seja, uma carbonila.

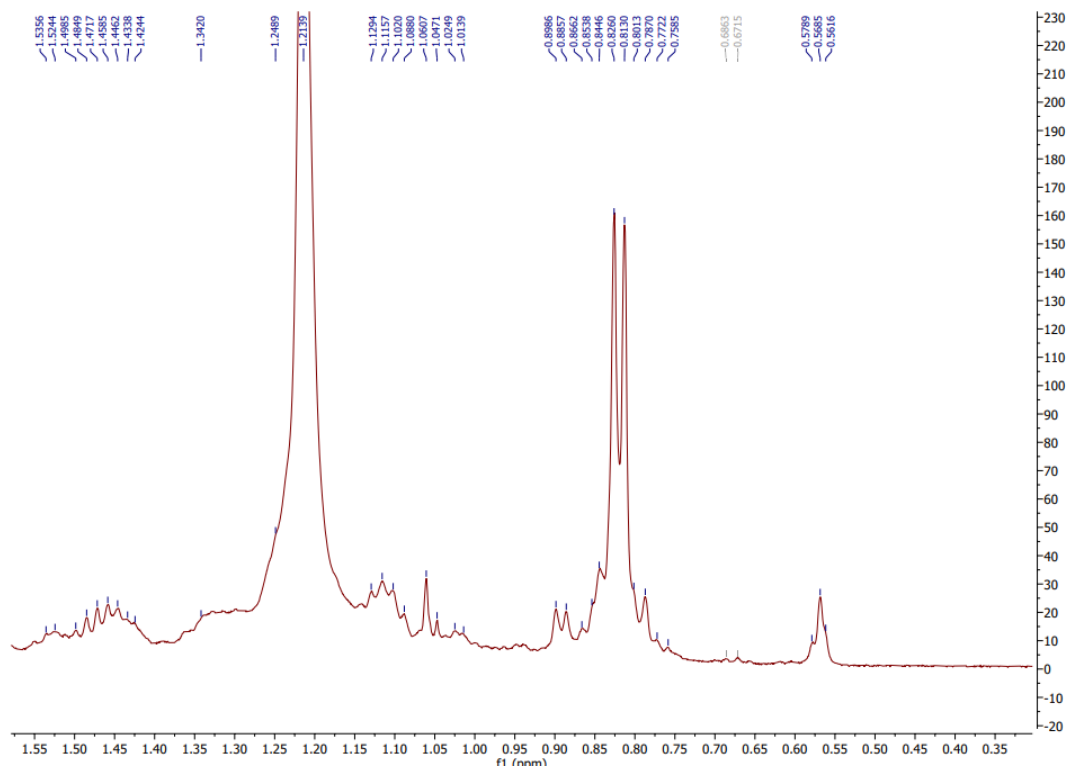
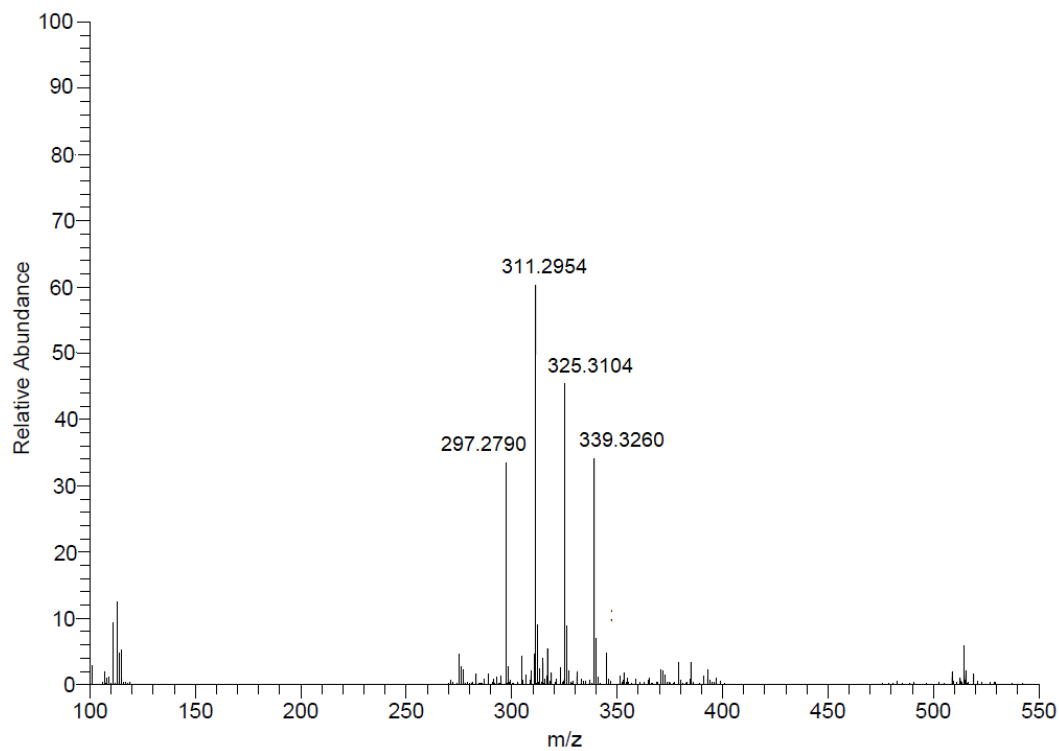
A**B**

Figura 19- A. Espectro de RMN de ^1H da fração ativa **FII** de *Olleya marilimosa* obtidos em em espectrômetro Varian, modelo INOVA 500, a 500 MHz, sendo

o sinal residual do solvente empregado como referência interna. **B.** Espectro de massas de alta resolução da fração ativa **FII** de *Olleya marilimos* obtidos em espectrômetro Bruker-Daltonics MicroTOF QII, usando uma fonte de ionização por electrospray, operando no modo negativo via injeção direta.

De acordo com a literatura (Nichols,2005), a presença de ácidos graxos do tipo *iso* foi descrita anteriormente na espécie em estudo. Desta forma, foi proposta a ocorrência de tais ácidos graxos com variação na extensão da cadeia lateral. Os compostos identificados nessa fração ativa foram os 4 desenhados a seguir pelo Prof. Dr. João Henrique G. Lago (UFABC) (**Figura 20**):

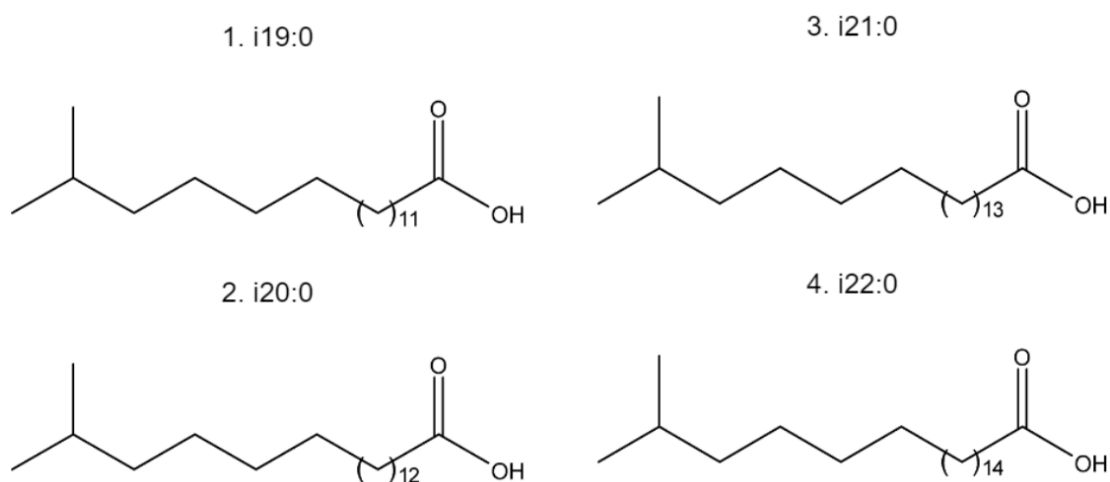


Figura 20- Estruturas moleculares dos 4 ácidos graxos de cadeia *iso*, presentes na fração **FII** de *Olleya marilimos*. 1. C₁₉H₃₇O₂; 2. C₂₀H₃₉O₂ ;3. C₂₁H₄₁O₂; 4.C₂₂H₄₃O₂.

4.7 Estudos de atividade biológica de FII: CE₅₀ e CC₅₀

Após a caracterização estrutural dos constituintes dessa mistura, prosseguimos com a atividade biológicas desses metabólitos. O valor de CE₅₀ contra a forma tripomastigota foi de 17,7 µg/mL após 48 horas e 23,8 µg/mL em amastigotas. Na **Figura 21** podemos observar que nas concentrações mais elevadas da **FII** houve 100% de morte dos parasitas. Os estudos em

células NCTC clone 929 revelou que a fração não apresentou citotoxicidade até a concentração máxima testada de 200 µg/mL (**Tabela 9**).

Tabela 9- Determinação da Concentração Efetiva 50% (CE₅₀) em tripomastigota e amastigotas de *T. cruzi* e Concentração Citotóxica 50% (CC₅₀) em NCTC da fração **FII** do extrato de *Olleya marilimosa*.

Amostra	Tripomastigotas CE ₅₀ ±DP	Amastigotas CE ₅₀ ±DP	CC ₅₀ ±DP
FII	17,7 ± 3,5 µg/mL	23,8 ± 2,7 µg/mL	>200 µg/mL
Benznidazol	14,0 ± 3,5 µM	5,5±0,5 µM	>200 µM

Valores de CE₅₀ calculados a partir de curva sigmoidal dose-resposta. DP: desvio padrão; CE₅₀: Concentração Efetiva 50%; CC₅₀:Concentração Citotóxica 50%

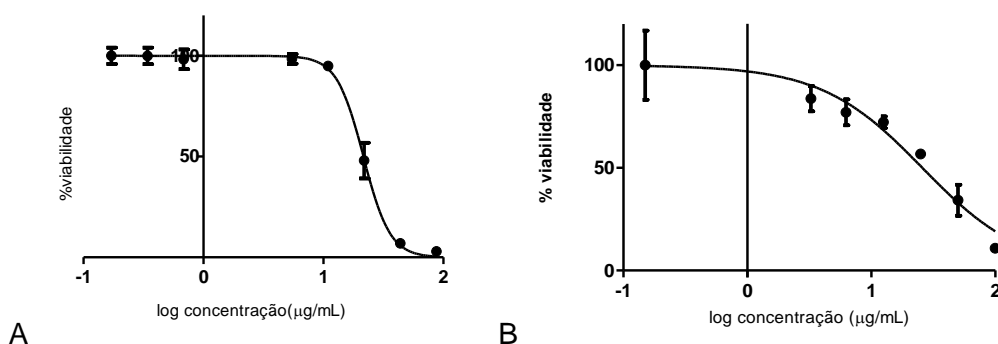


Figura 21- Curvas dose-resposta de CE₅₀ da fração **FII** de *Olleya marilimosa* em tripomastigota(A) e amastigotas(B) de *T. cruzi*, pelo método colorimétrico utilizando resazurina em espectrofotômetro de placas ($\lambda=570$ nm) (Filter Max F5, Molecular Devices).

4.7.1 Determinação da Concentração Efetiva 50% Para Estudos De Mecanismo De Ação

Os tripomastigotas foram tratados com a fração **FII** por até 4 horas para determinar o tempo e a concentração dos ensaios de permeabilidade de membrana plasmática e perfil proteico. Os resultados mostraram que após 2h de tratamento, foi obtido um valor de CE₅₀ de 56,18 µg/mL. Com isso, os estudos citados foram realizados com a concentração de 50 µg/mL da fração do extrato **FII**.

4.8 Atividade Hemolítica

Visando avaliar a toxicidade da **FII**, a atividade hemolítica em eritrócitos também foi realizada e não foi observada hemólise significativa em concentrações até 200 µg/mL, tendo como comparação o controle negativo (não tratado) (**Figura 22**).

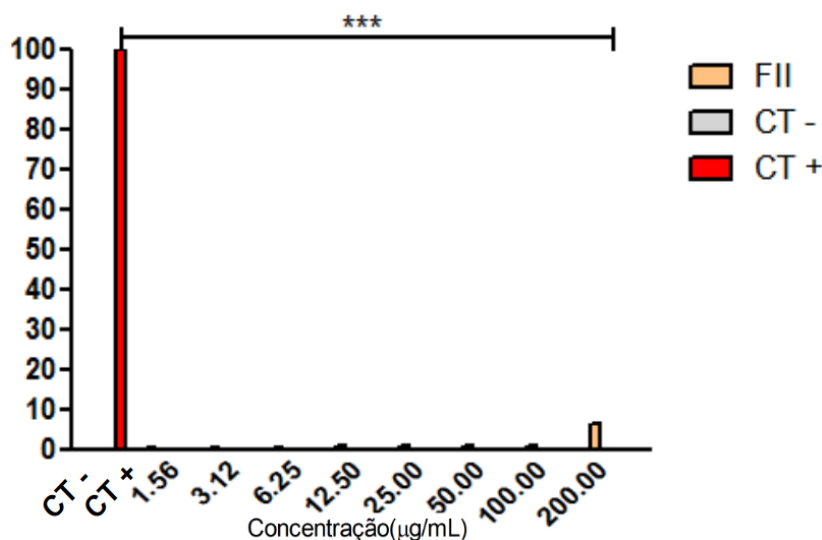


Figura 22- Atividade hemolítica da fração **FII** de *Olleya marilimos*, determinada em eritrócitos em microplacas. A absorbância foi verificada em espectrofotômetro de placas ($\lambda=570$ nm) (FilterMax F5, Molecular Devices). Análise de variância One-way ANOVA, $p < 0,05$.

4.9 Perfil proteico

Em seguida, o perfil proteico foi avaliado por MALDI-TOF/MS (Bruker-Daltonics) utilizando tripomastigotas (1×10^7 /poço) tratados com a fração **FII** do extrato de *Olleya marilimos*, tripomastigotas não tratados (controle) e tratados com benznidazol ($40 \mu\text{M}$) por 24 horas. Os espectros das amostras tratadas foram comparados para avaliação das alterações no perfil da proteína. Com base no espectro de massas, foi possível confirmar uma alteração no perfil proteico dos grupos tratados quando comparados aos tripomastigotas não tratados (**Figura 23**). Alterações espectrais significativas foram observadas nos picos 4.417m/z , com diminuição das intensidades em parasitas tratados com a maior concentração de **FII** em relação ao controle não tratado, assim como ocorre com o tratamento padrão com benznidazol. A

área do pico 3.0975 m/z teve sua área significamente diminuída pelo tratamento com 50 µg/mL em relação ao controle e o mesmo ocorre em 2.780 m/z e de modo similar ao fármaco padrão. Observa-se além disso, que os parasitas tratados com **FII** em sua maior concentração tiveram depleção de proteínas com relação massa abaixo de 2.690 m/z assim como acima de 10.000 m/z. Houve também aumento da intensidade de outros picos, como o 8.075 m/z, que tem maior intensidade no tratamento pelo extrato na maior concentração de modo semelhante ao benznidazol. O fármaco benznidazol também foi analisado quanto a seu perfil de alterações espectrais. Os dados espectrais brutos foram inseridos como **Anexo VI**.

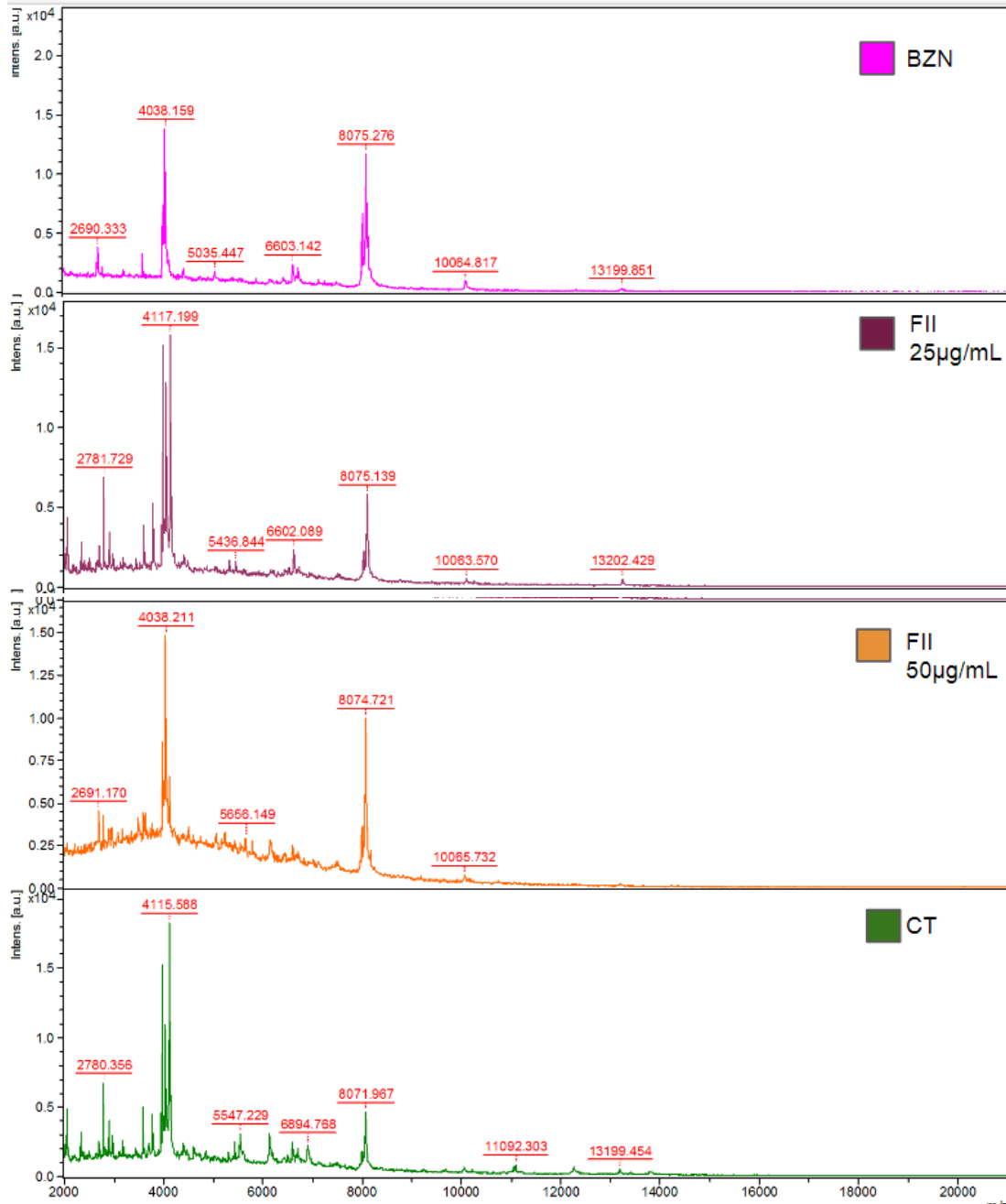


Figura 23- Avaliação do perfil proteico de tripomastigotas de *T. cruzi* na presença da fração **FII** de *Olleya marilimosa*. Espectro de massas de tripomastigotas tratados com **FII** (20 e 50 µg/mL), tratados com benznidazol (BZN-40 µM) e não tratadas (CT). Os parasitas foram tratados por 24h, e após o tratamento, as amostras foram analisadas em MALDI-TOF/MS Microflex (Bruker-Daltonics). O perfil de proteína dos parasitas tratados foi comparado com o perfil proteico dos parasitas não tratados.

4.10 Permeabilidade de membrana plasmática

A seguir, foi analisada a alteração da permeabilidade plasmática de tripomastigotas na presença da fração **FII** do extrato de *Olleya marilimosa*, com a sonda *Sytox Green*, corante que intercala em DNA celular quando há poros na membrana celular. A fração **FII** na concentração de 50 µg/mL foi capaz de causar alteração da permeabilidade da membrana plasmática dos parasitas durante o período analisado (180 min), de acordo com a emissão de fluorescência significativamente maior do que o controle (**Figura 24**).

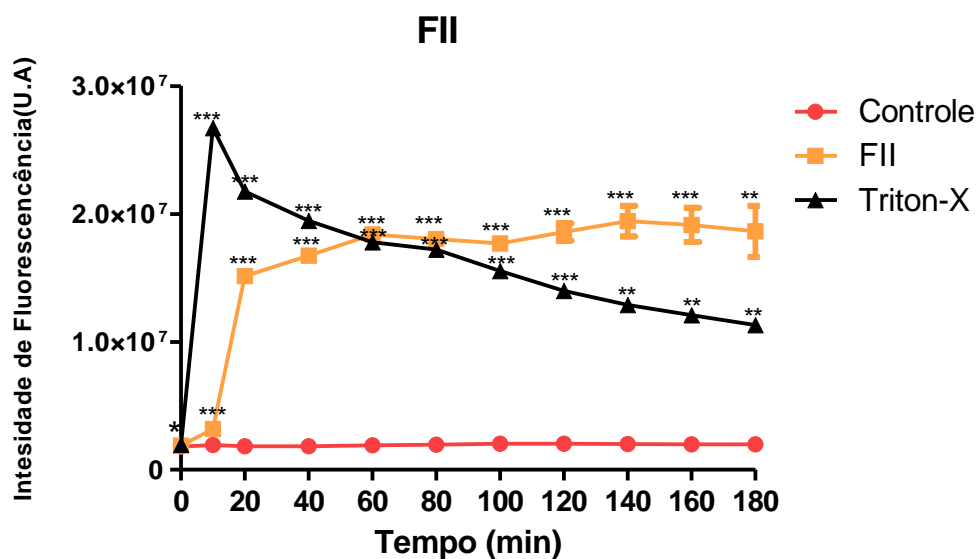


Figura 24- Avaliação da permeabilidade celular dada pela intensidade de fluorescência (U.A.) do parasita *T. cruzi* tratados por 180 min com a fração **FII** do extrato de *Olleya marilimosa* incubados com a sonda fluorescente Sytox Green. Análise de variância One-way ANOVA, $p < 0,05$.

Estudos em microscopia óptica foram feitos para corroborar os resultados espectrofotométricos e demonstraram que a sonda *Sytox Green* se encontra internalizada no parasita. Pode-se inferir que a fração FII foi capaz de se inserir na membrana parasitária e modificar sua morfologia a uma forma “amastigota-like” em comparação ao grupo controle que se mostra preservado. O controle positivo (Triton-X) causou as alterações de permeabilidade esperadas e houve a emissão de fluorescência (**Figura 25**).

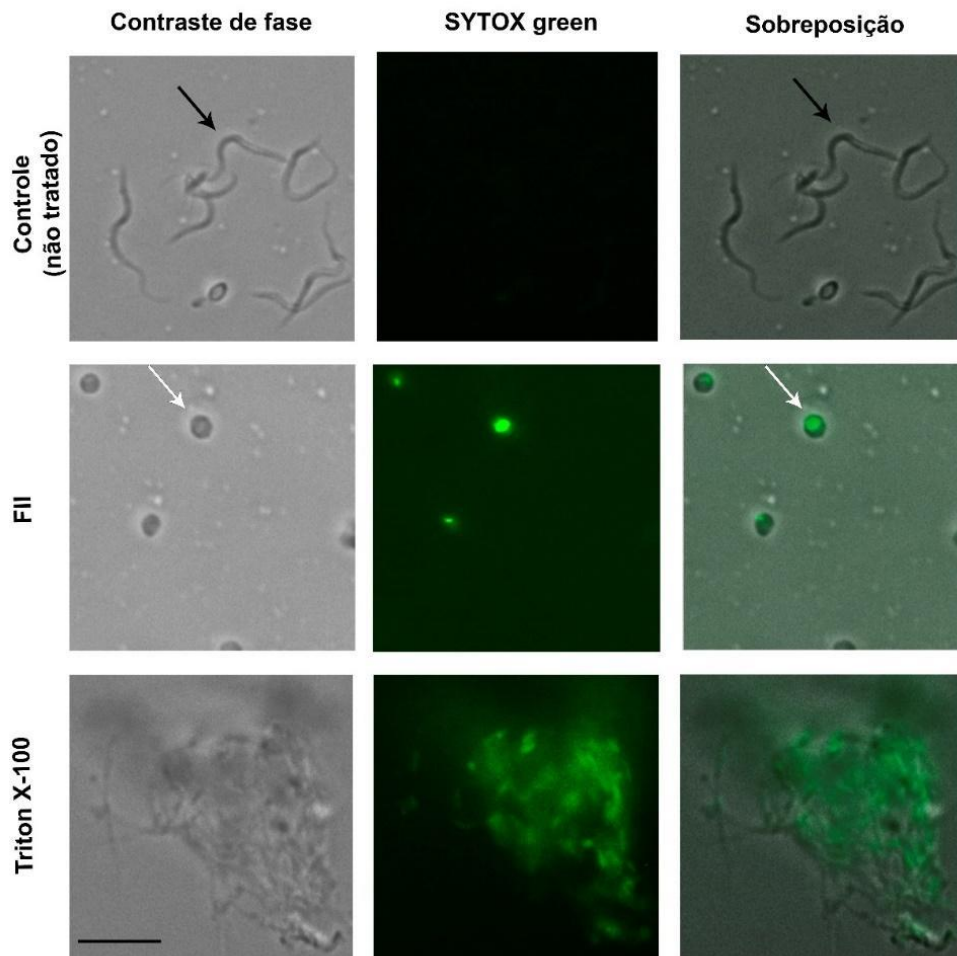


Figura 25- Microscopia óptica de tripomastigotas de *T. cruzi* tratados com a fração FII do extrato de *Olleya marilimosa*.

5. DISCUSSÃO

A doença de Chagas é um sério problema de Saúde Pública em cerca de 21 países endêmicos, sendo estes na sua maioria, países em desenvolvimento. Ainda, conta apenas com um único fármaco no Brasil, e com eficácia limitada.

Em 2015, foi publicado o maior estudo clínico sobre o benznidazol (Morillo et al, 2015). Este estudo prospectivo foi realizado de forma multicêntrica, randomizada, envolvendo 2.854 pacientes com cardiomiopatia chagásica, os quais foram tratados por 80 dias e acompanhados por 5,4 anos. Os resultados demonstraram que a terapia reduziu a parasitemia, porém não impediu o desenvolvimento dos danos cardíacos ao longo dos 5 anos de seguimento do estudo, sendo equiparado ao grupo placebo. Com isto, o DNDi publicou uma nota afirmando que nos anos seguintes, teremos uma projeção de 200.000 mortes causadas pela doença de Chagas, principalmente pelas complicações cardíacas e outras correlacionadas. Sendo assim, concluem que é necessário redobrar os esforços de pesquisas para novos tratamentos (Pecoul et al., 2016).

Conforme demonstrado por Newman & Cragg (2020), compostos naturais são definitivamente uma das mais importantes ferramentas utilizadas para a descoberta de novos fármacos. No presente estudo, buscamos explorar a quimiodiversidade encontrada em bactérias do ambiente marinho, ainda pouquíssimo explorada no Brasil. Coletadas em invertebrados marinhos e sedimentos, nosso estudo identificou 12 cepas bacterianas, e por meio de estudos biológicos, demonstrou o potencial anti-*Trypanosoma cruzi* em formas tripomastigotas. As avaliações da Concentração Efetiva 50% demonstraram que 100% dos extratos orgânicos obtidos apresentaram atividade tripanocida, isto é, letal ao parasita. Por meio de sonda resazurina, um cromógeno específico para atividade mitocondrial, foi possível confirmar a ausência de viabilidade do parasita nas concentrações máximas testadas.

Dentre os extratos mais ativos foi observado que metabólitos da bactéria *Vibrio harveyi* foram os mais potentes. Esta cepa foi isolada de quatro

fontes, uma do coral *Mussismilia hispida*, uma do coral *Palythoa caribaeorum*, e outras duas de sedimentos do Canal de São Sebastião e da Ilha dos Búzios. Membros da família *Vibrionacea* são encontrados livremente em águas marinhas tropicais ou como comensais ou patógenos na microbiota intestinal de animais marinhos (Thomson et al, 2004).

O gênero *Vibrio* foi o mais comum encontrado neste trabalho, representando 7 das 12 cepas identificadas. A literatura o reconhece como uma fração considerável do microbioma coralino de diversas espécies, tanto em organismos saudáveis como em doentes, e livremente nas águas. Seus papéis no holobionte incluem a fixação de nitrogênio, recurso alimentar, decomposição da quitina, e produção de antimicrobianos (Chimetto et al, 2008; Kooperman et al, 2007; Duclow et al, 1979; Ritchie, 2006).

Uma revisão de Mansson e colaboradores (2011) revelou que até a data de publicação do artigo, 93 metabólitos bioativos haviam sido isolados de *Vibrionacea*. A maioria deles foi isolada de 3 espécies *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum*, e *V. vulnificus*, que são reconhecidos como organismos patogênicos em humanos e RATs marinhos. Para alguns desses compostos são reportadas propriedades antifúngica, antibacteriana e anticâncer. De acordo com essa revisão, apenas um deles, a prodigiosina, teve atividade antiprotozoária (antimalárica) relatada (Mansson et al., 2011). Para as espécies *V. harveyi* e *V. alginolyticus*, apenas um composto foi descrito, a neurotoxina TTX (tetrodotoxina), uma toxina não proteica, hidrofílica e encontrada em peixes da família *Tetraodontidae* (“baiacu”) (Mansson et al, 2011). De fato, estudos revelam que a presença desta toxina em alguns animais exerce o poder protetor contra infecções parasitárias (Johnson et al., 2018).

O presente estudo demonstrou pela primeira vez a atividade anti-*T. cruzi* de metabólitos de *Vibrio* spp., sendo o extrato metabólico de *V. harveyi*, o mais ativo entre todos os testados. Além disso, é notável a diferença de atividade tripanocida dentre os extratos metabólitos de *V.harveyi* e *V. alginolyticus*, com origem de diferentes corais ou sedimentos. Estudos já

verificaram a diferença do perfil metabólico em cepas geneticamente similares de *Streptomyces griseus*, exemplar do gênero mais prolífico na produção de compostos bioativos (Sottorff et al., 2019). De acordo com este estudo, espécies intimamente associadas pelo 16S rRNA mantêm um conjunto comum de compostos químicos. Porém, apesar das sequências genéticas idênticas desse gene, foi constatada notável diferença no conjunto acessório de metabólitos secundários, que são únicos para cada isolado analisado. Os autores sugerem que, com base na proximidade filogenética e na similaridade dos metabólitos, ambas as cepas de *Streptomyces* sp. analisadas tiveram uma origem comum que passou pela especialização posterior em função de seu habitat (Sottorff et al., 2019). Com isso em vista, nossos resultados podem indicar que as cepas das espécies bacterianas marinhas *Vibrio* spp. encontradas podem ter sofridos o processo de especialização de seus metabólitos de acordo com o coral ou sedimento marinho no qual habitam.

Outro potente extrato com atividade anti-*T. cruzi* foi do microrganismo *Shewanella pneumatophori*, isolada de sedimentos marinhos. Esta bactéria pertence a um gênero encontrado em locais extremos e variados em relação a temperaturas, e até em mesmo onde há histórico de contaminação de petróleo e no trato digestivo de animais aquáticos (Hirota et al., 2005). Pertence ao grupo das bactérias redutoras de ferro, e alguns de seus exemplares exercem resposta antimicrobiana em diferentes temperaturas e pH contra os *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus*, além do antagonismo ao *Vibrio harveyi* (Shakibazadeh et al, 2012).

Bactérias desse gênero tem características probióticas e têm sido utilizados na aquicultura, especialmente na criação de camarões em cativeiro, com a finalidade de controle biológico, aumento da taxa de conversão alimentar e redução dos custos para alimentação dos animais e melhora do sistema imune dos camarões (Portela, 2014). Outros estudos sobre atividades antifúngica contra *Aspergillus* e antimicrobiana contra *Eschericia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Staphylococcus aureus*, trazem a descoberta de compostos orgânicos voláteis e extratos ativos derivados de cepas do gênero

Shewanella encontradas em algas e raízes de plantas terrestre, respectivamente (Fitriani et al., 2015; Gong et al., 2015). Nosso estudo demonstrou pela primeira vez na literatura a atividade anti-*T. cruzi* de metabólitos deste gênero bacteriano.

O microrganismo *Bacillus megaterium*, também foi isolado de sedimentos profundos no Canal de São Sebastião, especificamente a 35 metros. A espécie é conhecida do ambiente terrestre e tem capacidade de solubilizar fosfatos naturais existentes no solo, disponibilizando o fósforo contido nestes materiais, para as plantas cultivadas. Suas enzimas também geram grande interesse para a indústria para a produção de bioprodutos (Vary et al., 2007; Wyciszkievicz et al., 2015). Do gênero *Bacillus*, foram reportados alguns peptídeos com atividades antimicrobianas (*B. subtilis*), (Kaspar et al., 2019) e alcaloides anti-*Trypanosoma* (*B. pulmilus*) (Martínez-Luis et al., 2012). Da espécie *B. megaterium*, análises exploraram apenas atividade antimicrobianas e antifúngicas de 3 compostos isolados, sugerindo uso contra dermatofitoses e na aquacultura contra vibrioses (Malanicheva et al., 2012; Viet Cuong et al., 2014) e o biocontrole de *Aspergillus flavus* (Kong et al., 2010). Em nosso estudo, seu extrato foi o menos potente contra os parasitas.

A espécie *Halomonas aquamarina* também foi coletada de sedimentos marinhos. O gênero tem ampla distribuição geográfica e já tem exemplares produtores de lipopeptídeos com propriedades biosurfactantes, antitumorais e cicatrizantes (Cheffi et al., 2021) e ácidos di-carboxílicos que também inibem tumores (Wang et al., 2006). A espécie *H. aquamarina* apresentou compostos com atividades antimicrobianas e antioxidantes comprovadas por outros estudos (Fariq et al., 2019). Em nosso trabalho, verificamos pela primeira vez a atividade antiparasitária de metabólitos de *Halomonas* sp.

A espécie bacteriana *Alteromonas macleodii*, por sua vez, foi isolada do interior do coral *T. coccinea*. Trata-se de um gênero bacteriano amplamente distribuído em água tropicais, sendo considerados microrganismos eurialinos e euritermais que são abundantes especialmente

no mar Mediterrâneo (López-Pérez et al., 2012). Estudos anteriores já relataram atividade antimicrobiana do seu extrato (Kalinovskaya et al., 2004). Em nosso trabalho, foi verificada pela primeira vez a atividade anti-*T. cruzi* de extrato metabólito de *Alteromonas* sp.

De maneira geral, os corais são animais marinhos invertebrados de diversas formas, tamanhos e cores, habitando todos os mares do mundo, desde zonas costeiras até abissais. Eles são um grupo de organismos coloniais ou solitários que estão em simbiose com uma vasta gama de organismos microscópicos, constituindo seu holobionte. (Pérez, 1999). Microalgas, fungos, bactérias, arqueobactérias e vírus vivem no ou sobre o tecido, muco, cavidade gastrovascular e esqueleto coralino, representando uma diversidade funcional e genética enorme, sendo poucos microrganismos conhecidos e uma infinidade a espera de classificação (van Oppen & Blackall, 2019).

A microbiota de corais é variável de acordo com seu estágio de vida, nicho ecológico e fatores de estresse ambiental como o aumento da temperatura dos oceanos e a invasão de microrganismos prejudiciais (Oppen e Blackall, 2019).

As coletas na região de São Sebastião e Ilhabela são amostras do potencial da biodiversidade da nossa chamada “Amazônia Azul”, área que compreende 4,5 milhões de km² da costa brasileira banhada pelo Oceano Atlântico e que se tornou objeto de estudo científico recentemente (Hazin, 2010). Apenas 4 espécies de invertebrados foram coletadas, mas esses carregam consigo uma microbiota rica composta de milhares de microrganismos. A seguir, discutiremos a relevância de cada coral coletado.

O gênero *Tubastraea*, conhecido como “coral sol”, é nativo dos oceanos Pacífico e Índico e cresce em águas rasas e costões rochosos tropicais. Foi coletado o exemplar *Tubastraea coccinea* (TC), de cor vermelho-alaranjado. O gênero é invasor do litoral brasileiro, em consequência de atividades como a navegação, que possibilita seu acesso através de água de

lastro. Sua resistência a diversas condições físico-químicas e capacidade de regeneração a partir de fragmentos de esqueletos contribuem para sua propagação. Além disso, seu sucesso contra predadores e na competição com outras espécies se dá pela produção de metabólitos com ação anti-incrustante e anti-predação (Luz et al,2018). Recentemente, nosso grupo isolou um alcaloide da espécie *Tubastraea tagusensis*, que apresentou grande potencial anti-*T. cruzi* (Romanelli et al., 2022). Deste coral, identificamos por MALDI-TOF as bactérias *Alteromonas macleodii* e *Vibrio alginolyticus* (TC 2.0.2 e TC 2.2, respectivamente).

Mussismilia hispida é um coral nativo da costa brasileira. Estudos mostram que a espécie tem sido dominada pela presença do coral invasor descrito acima, sendo extinto em alguns locais (Creed, 2006). Já foi relatado que o gênero *Vibrio* domina esse organismo, fato que foi confirmado pela identificação de isolados de *V. harveyi* (MH 3.0) *V. alginolyticus* (MH 3.3), o que indica possibilidade de doença causada no coral (Chimetto et al, 2008).

Palythoa é um gênero de zoantídeos, ou seja, são cnidários polipóides exclusivamente marinhos e habitantes dos recifes costeiros. São caracterizados pela incorporação de grãos de sedimento nos tecidos da sua parede corporal. Na espécie *Palythoa caribaeorum*, colônias formam extensos “tapetes” nas áreas submersas, mas quando estão expostos durante a maré baixa, seus pólipos produzem um muco que protege a colônia da dessecação (Soares et al., 2006). O coral *Palythoa* também sofre com a competição com os esclactíneos invasores do gênero *Tubastraea* (Luz e Kitahara, 2017) também demonstram que o coral possui compostos com ação antibiótica e anti-inflamatória (Soares et al., 2006).

Madracis decactis apresenta uma ampla distribuição ao longo da costa brasileira e em toda a ilha oceânica brasileiras (Fernando de Noronha, Roca Atol, SPSPA, e Trindade/Martim Vaz) e África Ocidental, tanto em águas rasas quanto profundas. A espécie é responsável pelas estruturas de recife mais relevantes no sudeste do Brasil e estas populações foram gravemente afetadas por um evento de branqueamento na década de 90 (Moreira et al.,

2014). No coral coletado dessa espécie tivemos um isolamento de uma cepa de *V. harveyi*.

Dos sedimentos coletados (SCSB e SIBUZ), foram identificadas 6 espécies bacterianas: *Bacillus megaterium* (SCSB 6.1), *Shewanella pneumatophori* (SCSB 6.0.2.1) e *Olleya marilimosa* (SCSB 6.0.2.2), *V. harveyi* (SCSB 6.2 e SIBUZ 7) e *Halomonas aquamarina* (SIBUZ 722).

Um dos potentes extratos microbianos contra *T. cruzi* foi isolado da cepa de *Olleya marilimosa*, isolada de sedimentos marinhos. Esta espécie foi descrita pela primeira vez na Antártica em 2005, encontrada também em sedimentos (Nichols et al., 2005) e até o momento, não havia sido descrita no Oceano Atlântico. A espécie pertence à família *Flavobacteriaceae*, e tem como característica a coloração amarela/alaranjada de suas colônias (Nichols et al., 2005).

Os sedimentos marinhos constituem mais de dois terços da superfície da Terra. Como é o local onde se deposita matéria orgânica particulada, os sedimentos contêm o maior reservatório de carbono orgânico do planeta. Estima-se que os micróbios do subsolo constituem cerca de 85% da biomassa total do planeta e 35% da sua biomassa viva (Whitman et al. 1998). Estas comunidades microscópicas processam tanto carbono orgânico como inorgânico e contribuem para a ciclagem de nutrientes como o enxofre, nitrogênio e ferro (Parkes et al., 2014). Apesar da importância global destes organismos, os sedimentos marinhos estão entre os ambientes menos compreendidos. Isto deve-se em parte à dificuldade de amostragem, especialmente no mar profundo, bem como a complexidade das comunidades habitadas (Baker et al., 2021). As bactérias sedimentares vivem num ambiente física e quimicamente complexo e muitas variáveis influenciam a sua distribuição. Alguns fatores que influenciam o crescimento de bactérias nesses locais são: tamanho e natureza do mineral do grão de areia; a atividade de animais bentônicos como escavação e para abrigo ou alimentação; e a profundidade, sendo que em regiões mais superficiais ocorre

a maioria da decomposição dos detritos devido grande deposição de fontes de carbono (Baker et al., 2021; Findlay et al., 1990).

Nosso estudo demonstrou pela primeira vez a atividade biológica e especificamente, anti-*Trypanosoma cruzi* de metabólitos da bactéria *Olleya marilimos* (SCSB 6.0.2.2). Não foram encontrados estudos que descrevem a atividade biológica de seus metabólitos, apenas o registro de uma patente que utiliza uma cepa para a produção de zeaxantina microbiana com fins nutracêuticos (Dai, 2012).

Considerando o potencial antiparasitário de metabólitos desta bactéria realizamos um estudo para uma produção escalonada, utilizando meios sólido e líquido de cultivo, configurando um estudo OSMAC. Nossos resultados demonstraram que o cultivo em meio líquido com rotação, resultou em uma maior massa de metabólitos microbianos. Porém, a potência destes metabólitos anti-*T. cruzi* reduziu em 8 vezes, quando comparado aos metabólitos provenientes de um cultivo em meio sólido (ágar).

Nossos resultados são corroborados por outros estudos na literatura em relação a alterações no cultivo bacteriano. A produção de compostos microbianos pode variar não apenas com a composição do meio, mas também uma produção diferencial tem sido relatada em meios sólidos quando comparados a meios líquidos. English e colaboradores usaram uma abordagem sistemática OSMAC para testar a produção de antibióticos em *Streptomyces* sp. em meios na forma líquida e sólida com a adição de ágar. A produção de antibióticos foi avaliada contra *S. aureus*. Nenhuma atividade antibiótica foi detectada em metabólitos de culturas obtidas em meio líquido. Diferentes espectros de RMN também foram observados nos extratos obtidos em ágar (ativos), quando comparados em espectros de extratos de bactérias cultivadas em meio caldos/líquido (inativos) (English et al., 2017). De forma similar, Guo e colaboradores observaram que o fungo marinho *Penicillium* sp. F23-2, apresentou diferentes compostos químicos quando se comparou o crescimento da cepa em meio líquido e sólido. O cultivo em meio sólido levou ao isolamento de cinco novos análogos do ácido ambuico (peniciclones A-E),

que mostrou atividade antibacteriana contra *S. aureus* (Guo et al., 2015). Isso parece estar associado a possibilidade de formação de biofilme quando há cultivo em meio ágar, o que possibilita melhor sinalização e interação celular, e consequente produção aumentada de metabólitos secundários (Rieusset et al, 2020).

Nossos estudos da fração **FII**, ativa contra anti-*T. cruzi*, utilizando ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas de alta resolução, confirmaram a presença de ácidos graxos *iso*, de ocorrência rara na natureza. Um estudo de Nichols e colaboradores (2005) corrobora a predominância de ácidos graxos saturados ramificados, além dos monoinsaturados ramificados e hidroxiácidos ramificados é uma característica comum nas *Flavobacteriaceae*, e além disso, a presença de tais estruturas foram detectadas na primeira cepa descrita, proveniente do Oceano Antártico (CAM030^T) (Mancuso Nichols, 2005; Bowman et al 1998, 2003; Nedashkovskaya et al., 2005).

Os ácidos graxos são ácidos orgânicos caracterizados pela presença de um grupo carboxila em uma extremidade e de um grupo metil na oposta. Os ácidos graxos são ubíquos na natureza e, como tal, pertencem a uma classe fisiologicamente importante de molécula envolvida no armazenamento de energia celular, estrutura de membrana e em várias vias de sinalização (Silvain & Elisabeta, 2009). Na indústria, a produção de ácidos graxos é destinada a diversos fins nas indústrias farmacêutica, alimentícias, e de produtos de higiene (Dewick, 2009). Até mesmo a produção de ácidos graxos microbianos vem sido estudada com fonte de biocombustíveis (Beller et al, 2015).

De fato, a maioria dos ácidos graxos são considerados metabólitos primários. No entanto, há uma grande diversidade de estruturas raras e exclusivas de certas espécies encontradas nessa classe, e, portanto, eles são melhores classificados como metabólitos secundários (Dewick, 2009). Logo, essa subdivisão é uma “área cinzenta” considerada meramente uma conveniência (Dewick, 2009). Como exemplo, os ácidos chaulmoogrico e

hidnocárpicos são ácidos graxos ciclopentenil incomuns encontrados no óleo de chaulmoogra, obtido de sementes de *Hydnocarpus wightiana*. O óleo de Chaulmoogra se consagrou por muitos anos como o único tratamento para o tratamento da hanseníase, sendo estes dois ácidos com alta eficácia contra o agente etiológico *Mycobacterium leprae* (Dewick, 2009).

Os ácidos graxos variam em comprimento e grau de saturação, com ácidos graxos de ocorrência natural com um comprimento de cadeia de 4 a 28 ou mais carbonos que podem estar saturados ou insaturados (Silvain & Elisabeta, 2009). Os mais abundantes têm de 16 a 18 carbonos enquanto os mais raros contêm número ímpar de carbonos (Dewick, 2009). Os ácidos graxos saturados são lineares e consistem em uma cadeia de carbono com ligações simples, enquanto ácidos graxos insaturados contêm uma ou mais ligações duplas carbono-carbono que introduz curvas fixas na cadeia do carbono (Pohl et al., 2011).

Ácidos graxos insaturados são componentes típicos de produtos naturais. Dentre eles, os ômega 3 e 6 são bastantes estudados na literatura, pois são essenciais para as células de mamíferos, não sendo capazes de sintetizá-los (Alhusseiny & El-Beshbishi, 2020). Esses ácidos têm efeitos terapêuticos em doenças cardiovasculares, autoimunes e inflamatórias, além de propriedades imunomoduladoras (Alhusseiny e El-Beshbish, 2020).

Ácidos graxos saturados tem inúmeras propriedades reportadas. Há muitos ácidos graxos com atividades antifúngicas. São alguns deles: ácido palmítico (ativo contra *Aspergillus* sp. etc; Altieri et al, 2007), cáprico (ativo contra *C. albicans* e outros; Bergsson et al, 2001), pelargônico (ativo contra *Microsporum gypseum* entre outros; Chadeganipour et al, 2001) e butírico (ativo contra *Fusarium oxysporum*; Liu et al, 2008). Ao se inserirem naturalmente na bicamada lipídica da membrana fúngicas, perturbando-a fisicamente, há um aumento da fluidez da membrana. Estas elevações na fluidez da membrana provocam uma desorganização geral da membrana celular que leva a mudanças conformacionais nas proteínas da membrana, a liberação de componentes intracelulares, uma consequente sinalização intracelular,

desordens citoplasmáticas e eventualmente a desintegração celular (Pohl et al, 2011).

Ácido graxos saturados com atividade antimicrobiana também foram descritos. Como exemplo, ácido mirístico, eficaz contra *Mycobacterium tuberculosis* e *M. bovis* numa concentração de 0,04mM; ácido láurico com MIC entre 6,25 e 25 µg/mL contra micobactérias (Kondo e Kanai, 1977; Saito et al, 1984). Um possível mecanismo é a capacidade destes ácidos graxos de causar poros na membrana bacteriana e alterar a permeabilidade celular, o que ativa vias de sinalização que levam o parasita à morte (Carballeira, 2008). Os estudos de atividade antiparasitária com essa classe de PN se restringem aos ácidos graxos insaturados, e ainda são escassos. Nossas análises da membrana celular sugerem que a fração **FII** de *Olleya marilimosa*, contendo ácidos graxos do tipo *iso*, alteraram fortemente a permeabilidade da membrana plasmática do *T. cruzi*, um fato responsável por um desbalanceamento iônico levando o parasita a morte.

Em bactérias, um gama de ácidos graxo do tipo *iso* atuam no controle da fluidez da membrana (Kaneda et al, 1991). Tais estruturas são produzidos pela extensão da cadeia de malonato de diferentes unidades iniciadoras derivadas de cadeia ramificada de aminoácidos modificados com ésteres CoA (Dewick, 2009). A lipstatina, derivada da lactona encontrada em *Streptomyces toxytricini*, é um exemplo de ácido graxo de origem microbiana. Este composto despertou muito interesse devido à sua capacidade de inibir a lipase pancreática, e foi desenvolvido para ser um fármaco antiobesidade. A lipestatina é composta por dos ácidos graxos tetradeca-5,8-dienóico e octanóico. (Dewick, 2009).

Iso-ácidos graxos têm sido surpreendentes quanto a sua relevância. O ácido esteárico, por exemplo, é muito versátil e utilizado desde a composição de cosméticos, produtos automotivos a indústria têxtil (Cavani et al, 2016). Já relacionado a bioatividade desses PN, uma série de ácidos graxos *iso* e *anti-iso* foram detectados de uma espécie marinha de *Streptomyces* como responsáveis pela inibição de enzima topoisomerase

(Lee et al, 1998), o que é interessante no desenvolvimento de fármacos anticancerígenos (Carballeira, 2008). Além disso, estão presentes em diversas estruturas na forma de ésteres e amidos, incluindo septacidina, no qual é encontrado o raro ácido iso-palmítico (Acton et al, 1997), teicoplaninas (Borghini et al, 1989); nos antibióticos tunicamicina (Ito et al, 1980), corinetoxinas (Edgar et al, 1982), e streptovirudina (Eckardt et al 1980); nos antibióticos de glicopeptídeos arilomicina (Kulanthaivel et al, 2004; Liu et al, 2011), maradolídeos (Penkov et al, 2010), lipopetos do tipo plipastatina (Esumi et al, 2003), glicosilglicerídeos (Hunter et al, 1986; Orgambide et al, 1992), fosfoglicolídeos (Fujimoto et al, 2013), e esfingolipídeos (Minamio et al, 2003; Yano et al, 1982).

Para além disso, uma revisão de Carballeira (2008) destaca que ácidos graxos marinhos são promissores no tratamento de doença infecciosas. Nossos estudos demonstraram pela primeira vez na literatura a atividade antiparasitária dos ácidos graxos saturados do tipo *iso* de origem bacteriana, especificamente contra o parasita causador da doença de Chagas.

A fração caracterizada quimicamente neste trabalho demonstra o potencial de misturas complexas, principalmente em relação aos seus efeitos potencialmente sinérgicos de seus componentes (Schmidt et al, 2007; Schmidt et al, 2008). A ação parasitária dos *iso* ácidos graxos descritos provenientes de *Olleya marilimosa* e presentes majoritariamente nessa mistura, poderia ser devida a ação conjunta destes compostos. Porém, somente o isolamento de cada substância, poderá confirmar esta hipótese, assim como validar o potencial antiparasitário das substâncias individualmente.

Visando estudos de otimização de compostos líderes, futuros isolamentos serão necessários para a fração II (**FII**) da bactéria *Olleya marilimosa*, com desenvolvimento de séries de substâncias análogas, para estudar as relações estrutura-atividade (SAR) (Shahlaei, 2013). Essas

relações geralmente são baseadas em descritores moleculares para prever a farmacodinâmica e farmacocinética do ligante (Polêto et al, 2018).

Apesar de grande parte dos fármacos aprovados conter anéis aromáticos em sua estrutura, compostos como a miltefosina, uma hexadecilfosfolina, vem contrapor este paradigma. A miltefosina é um dos mais recentes fármacos introduzidos para o tratamento clínico das leishmanioses visceral e tegumentar (Sunyoto et al., 2018). Este fato demonstra que compostos não aromáticos possam também servir como base e inspiração para o desenho de novos protótipos farmacêuticos.

A microbiota marinha representa uma rica fonte de novos protótipos farmacêuticos para o tratamento de doenças que acometem o ser humano. Nosso estudo corrobora este potencial já observado, e contribui diretamente e de forma inédita, para futuros estudos farmacológicos na doença de Chagas.

6. CONCLUSÕES

- 1- Foram obtidos 32 isolados e identificadas 12 cepas bacterianas marinhas provenientes de corais e sedimentos.
- 2- Dentre os doze extratos orgânicos microbianos produzidos, todos apresentaram atividade contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi*.
- 3- As Concentrações Efetivas 50% foram determinadas nos tripomastigotas, demonstrando um grande potencial antiparasitário.
- 4- O estudo OSMAC com a bactéria marinha *Shewanella pneumatophori* não potencializou o extrato.
- 5- Estudos espectroscópicos e espectrométricos das frações ativas da *Olleya marilimos*a demonstraram a presença de ácidos graxos saturados do tipo *iso*.
- 6- A fração de extrato microbiano de *Olleya marilimos*a contendo os ácidos graxos apresentou potente atividade contra tripomastigotas de *T. cruzi*.
- 7- Os estudos de citotoxicidade da fração ativa **FII** demonstraram que não houveram danos a fibroblastos, assim como nenhuma atividade hemolítica foi verificada em eritrócitos.
- 8- O perfil de proteínas parasitárias foi alterado com a presença do extrato **FII** assim como a permeabilidade da membrana plasmática dos mesmos.
- 9- O extrato da bactéria *Olleya marilimos*a apresentou metabólitos promissores para futuros isolamentos e estudos de otimização molecular em *T. cruzi*.
- 10- Metabólitos microbianos obtidos das bactérias estudadas demonstram um potencial antiparasitário promissor para futuros isolamentos.

REFERÊNCIAS

Acton E, Ryan K, Luetzow A. Antitumor septacidin analogs. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1977;20(11):1362-1371.

Aiello A, D'Esposito M, Fattorusso E, Menna M, Müller WEG, Perović-Ottstadt S, Schröder HC. Novel bioactive bromopyrrole alkaloids from the Mediterranean sponge *Axinella verrucosa*. *Bioorg. Med. Chem.* 2006, 14, 17–24.

Alhusseiny SM, El-Beshbishi SN. Omega polyunsaturated fatty acids and parasitic infections: An overview. *Acta Tropica* 2020;207:105466. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2020.105466>.

Altieri, C, Cardillo D, Bevilacqua A, Singaglia, M. Inhibition of *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by fatty acids and their monoglycerides. *Journal of Food Protection*. 2007;70:1206-1212.

Arvinda swamy ML. Marine Actinomycetes as Source of Pharmaceutically Important Compounds. *Marine Microbiology: Bioactive Compounds and Biotechnological Applications*, 2013, p. 173–90. <https://doi.org/10.1002/9783527665259.ch10>.

Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM, Orhan IE, Banach M, Rollinger JM, et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery* 2021 20:3 2021;20:200–16. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>.

Aufderheide A, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(7):2034-2039.

Baker BJ, Appler KE, Gong X. New Microbial Biodiversity in Marine Sediments. *Annual Review of Marine Science* 2021;13:161–75. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-MARINE-032020-014552>.

Balasegaram M, Ritmeijer K, Lima MA, Burza S, Ortiz Genovese G, Milani B, et al. Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. 2012;17:493–510. <https://doi.org/10.1517/14728214.2012.748036>.

Baral B, Akhgari A, Metsä-Ketelä M. Activation of microbial secondary metabolic pathways: Avenues and challenges. *Synthetic and Systems Biotechnology* 2018;3:163–78. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2018.09.001>.

Barreto MP, Ribeiro RD. Reservatórios silvestres do *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi* Chagas, 1909. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1979;39:25-36

Beller H, Lee T, Katz L. Natural products as biofuels and bio-based chemicals: fatty acids and isoprenoids. *Natural Product Reports*. 2015;32(10):1508-1526.

Bentley S, Chater K, Cerdeno-Tarraga A-M, Challis G, Thomson N, James K, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nature* 2002;417(6885):141–7.

Bérdy J. Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics*. 2005;58(1):1-26.

Bergmann W, Feeney RJ. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. I.. *J Org Chem* 1951;16:981–7.

Bergmann W, Stempien MF. Contributions to the study of marine products. XLIII. The nucleosides of sponges. V. The synthesis of spongosine. *J Org Chem* 1957;22:1575–657.

Bergmann W, Burke DC. Contributions to the study of marine products. XL. The nucleosides of sponges. IV. Spongosine. *J Org Chem* 1956;22:226–8.

Bergsson G, Arnfinnsson J, Steingrímsson O, Thormar H. In vitro killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:3209–12

Bern C, Martin DL, Gilman RH. Acute and congenital Chagas disease. *Adv Parasitol*. 2011;75:19–47

Bhat S, Nagasampag B, Sivakumar M. Chemistry of Natural Products, 4th ed, New Delhi, India: Narosa Publishing House, 2007, p. 840

Bikdeli B, Madhavan MV, Jimenez D, Chuich T, Dreyfus I, Driggin E, et al. COVID-19 and thrombotic or thromboembolic disease: Implications for prevention, antithrombotic therapy, and follow-Up: JACC state-of-the-art review. Journal of the American College of Cardiology. 2020; 75(23): 2950–2973. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.04.031>

Bode HB, Bethe B, Höfs R, Zeeck A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. Chembiochem. 2002;3:619.[https://doi.org/10.1002/1439633\(20020703\)3:7<619::AID-CBIC619>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1439633(20020703)3:7<619::AID-CBIC619>3.0.CO;2-9).

Borghi A, Antonini P, Zanol M, Ferrari P, Zerilli L, Lancini G. Isolation and structure determination of two new analogs of teicoplanin, a glycopeptide antibiotic. The Journal of Antibiotics. 1989;42(3):361-366.

Bowman, J. P., Mancuso Nichols, C. & Gibson, J. A. E..*Algoriphagus ratkowskyigen. nov., sp. nov., Brumimicrobium glaciale gen. nov., sp. nov., Cryomorpha ignavagen. nov., sp. nov.* and *Crocinitomix catalasiticagen. nov., sp. nov.*, novel flavobacteria isolated from various polar habitats. Int J Syst Evol Microbiol 2003; 53,1343–135

Bowman, J. P., McCammon, S. A., Lewis, T., Skerratt, J. H., Brown, J. L., Nichols, D. S. & McMeekin, T. A. *Psychroflexus torquis gen. nov., sp. nov.*, a psychrophilic species from Antarctic sea ice, and reclassification of *Flavobacterium gondwanense gen. nov., comb.nov.* Microbiology 1998;144, 1601–1609.

Boyd MR, Gustafson KR, McMahon JB, Shoemaker RH, O'Keefe BR, Mori T, et al. Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: potential applications to microbicide development. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:1521–30. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.7.1521>.

Bruneto EG, Fernandes-Silva MM, Toledo-Cornell C, Martins S, Ferreira JMB, Corrêa VR, et al. Case-fatality from Orally-transmitted Acute Chagas Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases* 2021;72:1084–92. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1148>.

Bush, K. The coming of age of antibiotics: discovery and therapeutic value. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2010; 1213, 1–4. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05872.x

Carballeira NM. New advances in fatty acids as antimalarial, antimycobacterial and antifungal agents. *Progress in Lipid Research* 2008;47:50–61. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2007.10.002>.

Carroll AR, Copp BR, Davis RA, Keyzers RA, Prinsep MR. Marine natural products. *Natural Product Reports*. 2020;37(2):175–223.

Cavani F, Albonetti S, Basile F, Gandini A. Chemicals and fuels from bio-based building blocks. 2016. p. 55, 74.

Chadeganipour M, Haims A. Antifungal activities of pelargonic and capric acid on *Microsporum gypseum*. *Mycoses*.2001;44:109-112

Cheffi M, Maalej A, Mahmoudi A, Hentati D, Marques AM, Sayadi S, et al. Lipopeptides production by a newly *Halomonas venusta* strain: Characterization and biotechnological properties. *Bioorganic Chemistry* 2021;109:104724. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104724>.

Chen L, Li X, Chen M, Feng Y, Xiong C. The ACE2 expression in human heart indicates new potential mechanism of heart injury among patients infected with SARS-CoV-2. *Cardiovascular Research*. 2020; 116(6): 1097–1100. DOI: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa078>

Cheuka PM, Mayoka G, Mutai P, Chibale K. The Role of Natural Products in Drug Discovery and Development against Neglected Tropical Diseases. *Molecules* 2017, Vol 22, Page 58 2016;22:58. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES22010058>.

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), acecropin-melittin hybrid peptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001;45, 2441–2449

Chimetto LA, Brocchi M, Thompson CC, Martins RC, Ramos HR, Thompson FL. *Vibrio* dominate as culturable nitrogen-fixing bacteria of the Brazilian coral *Mussismilia hispida*. *Syst Appl Microbiol.* 2008;31(4):312-319. doi:10.1016/j.syapm.2008.06.001

Chopra I., Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epi- demiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*2001; 65, 232-260.

CONITEC. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença de Chagas. 2018.

Conteh L, Engels T, Molyneux DH. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. *Lancet.* 2010; 375, 239–47

Costa-lotufo LV, Wilke DV, Jimenez PC, Epifanio RDA. Marine organisms as a source of new pharmaceuticals: History and perspectives. *Quimica Nova* 2009;32:703–16. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422009000300014>.

Coura JR, Borges-Pereira J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 2011;106:641–5.

Creed JC. Two invasive alien azooxanthellate corals, *Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis*, dominate the native zooxanthellate *Mussismilia hispida* in Brazil. *Coral Reefs* 2006;25:350.

da Silva EN, Jardim GAM, Menna-Barreto RFS, de Castro SL. Anti-*Trypanosoma cruzi* compounds: Our contribution for the evaluation and insights on the mode of action of naphthoquinones and derivatives. *J Braz Chem Soc* 2014;25:1780–98.

Dai KS. Composition containing microbial zeaxanthin and preparation. US 2012/0095.108A, 2012.

Daley DK, Brown KJ, Badal S. Fungal Metabolites. In: Pharmacognosy. Academic Press, 2017, P. 413–421.

de Araújo FF, Lima Torres KC, Viana Peixoto S, Pinho Ribeiro AL, Vaz Melo Mambrini J, Bortolo Rezende V, et al. CXCL9 and CXCL10 display an age-dependent profile in Chagas patients: A cohort study of aging in Bambui, Brazil. *Infectious diseases of poverty*. 2020; 9(1): 51.

Demain AL, Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 Years of progress. *Journal of Antibiotics* 2009;62:5–16.

Dewick P. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 3rd ed. Chichester, U.K.: Wiley; 2009.

Dias, J. C. P. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiol. e Serv. saude Rev. do Sist. Unico Saude do Bras.* 25, 7–86 (2016)

Dias, J. C. P. Os primórdios do controle da doença de Chagas (em homenagem a Emmanuel Dias, pioneiro do controle, no centenário de seu nascimento). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 44, 12–18 (2011)

DNDi. Desafios no tratamento doença de chagas progresso na busca de tratamentos melhores contra uma assassina silenciosa 2019.

dos Santos, A.O., Veiga-Santos, P., Ueda-Nakamura, T., Sudatti, D.B., Bianco, E.M., Pereira, R.C., Nakamura, C.V., 2010. Effect of elatol, isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*, on *Leishmania amazonensis*. *Mar. Drugs* 8, 2733-2743. Dos

Duarte DF. Uma breve história do ópio e dos opióides. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. 2005, v. 55, n. 1, pp. 135-146.

Dutra WO, Menezes CA, Magalhães LM, Gollob KJ. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunology*. 2014; 36(8): 377–387.

Echeverría LE, Marcus R, Novick G, Sosa-Estani S, Ralston K, Zaidel EJ, et al. WHF IASC Roadmap on Chagas Disease. *Global Heart*. 2020; 15(1): 26.

Eckardt K, Wetzstein H, Thrum H, Ihn W. Streptovirudin and tunicamycin, two inhibitors of glycolipid synthesis differentiation by use of gel chromatography, H.P.L.C. and hydrolysis. *The Journal of Antibiotics*. 1980;33(8):908-910.

Edgar J, Frahn J, Cockrum P, Anderton N, Jago M, Culvenor C et al. Corynetoxins causative agents of annual ryegrass toxicity; their identification as tunicamycin group antibiotics. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. 1982;(4):222.

English AL, Boufridi A, Quinn RJ, Kurtböke DI. Evaluation of fermentation conditions triggering increased antibacterial activity from a near-shore marine intertidal environment-associated *Streptomyces* species. *Synthetic and Systems Biotechnology* 2017;2:28–38.

Esumi Y, Suzuki Y, Itoh Y, Chijimatsu M, Uramoto M, Kimura K Et Al. SNA-60-367 Components, New Peptide Enzyme Inhibitors of Aromatase: Structure of the Fatty Acid Side Chain and Amino Acid Sequence by Mass Spectrometry. *The Journal of Antibiotics*. 2003;56(8):716-720.

Fariq A, Yasmin A, Jamil M. Production, characterization and antimicrobial activities of bio-pigments by *Aquisalibacillus elongatus* MB592, *Salinicoccus sesuvii* MB597, and *Halomonas aquamarina* MB598 isolated from Khewra Salt Range, Pakistan. *Extremophiles* 2019;23:435–49.

Findlay RH, Trexler MB, Guckerte JB, White DC. Laboratory study of disturbance in marine sediments: response of a microbial community 1990;62:121–33.

Fiocruz. Doença de Chagas. Agência Fiocruz de Notícias. 2013. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7a-de-chagas>

Organização estrutural do *Trypanosoma cruzi*. Portal Da Doença de Chagas 2017:1–16.

Fiocruz. Organização Estrutural do Parasita. Portal da Doença de Chagas. 2017 Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/parasita/organizacao-estrutural/>

Fitriani A, Ihsan F, Hamdiyati Y. Antibacteria Activity of *Shewanella* and *Pseudomonas* as Endophytic Bacteria from the Root of *Ageratum conyzoides* L. *Asian Journal of Applied Sciences* 2015;03:2321–893.

Forrest, R.D. Early history of wound treatment. *J. R. Soc. Med.* 1982, 75, 198–205.

Fujimoto Y, Mitsunobe K, Fujiwara S, Mori M, Hashimoto M, Suda Y et al. Synthesis and biological activity of phosphoglycolipids from *Thermus thermophilus*. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2013;11(30):5034.

Galle JB Attioua, B., Kaiser M, Rusig AM., Lobstein A., Vonthron-Senecheau C. Eleganolone, a diterpene from the French marine alga *Bifurcaria bifurcata* inhibits growth of the human pathogens *Trypanosoma brucei* and *Plasmodium falciparum*. *Marine Drugs*. 2013 11, 599-61

Galvão C, Paula AS de. Sistemática e evolução dos vetores. 2014. <https://doi.org/10.7476/9788598203096.0003>.

Glaser K, Mayer A. A renaissance in marine pharmacology: From preclinical curiosity to clinical reality. *Biochemical Pharmacology*. 2009;78(5):440-448.

Gómez LA, Gutierrez FRS, Peñuela OA. *Trypanosoma cruzi* infection in transfusion medicine. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy* 2019;41:262–7.

Gong AD, Li HP, Shen L, Zhang JB, Wu AB, He WJ, et al. The *Shewanella algae* strain YM8 produces volatiles with strong inhibition activity against

Aspergillus pathogens and aflatoxins. *Frontiers in Microbiology* 2015;6:1091.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.01091/BIBTEX>.

Guo W, Zhang Z, Zhu T, Gu Q, Li D. Penicyclones A-E, Antibacterial Polyketides from the Deep-Sea-Derived Fungus *Penicillium* sp. F23-2. *Journal of Natural Products* 2015;78:2699–703.

Gutiérrez M, Capson T, Guzmán H, González J, Ortega-Barría E, Quiñoá E et al. Antiprotozoal Activity Against *Plasmodium falciparum* And *Trypanosoma cruzi*. of Aeroplysinin-1 Isolated from the New Sponge *Aplysina chiriquensis*. *Pharmaceutical Biology*. 2005;43(9):762-765.

Hazin FHV. Apresentação: a amazônia azul e a sua herança para o futuro do Brasil. *Cienc. Cult.* 2010; 62(3): 22-22.

Hirota K, Nodasaka Y, Orikasa Y, Okuyama H, Yumoto I. *Shewanella pneumatophori* sp. nov., an eicosapentaenoic acid-producing marine bacterium isolated from the intestines of Pacific mackerel (*Pneumatophorus japonicus*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2005;55:2355–9.

Hunter S, McNeil M, Brennan P. Diglycosyl diacylglycerol of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*. 1986;168(2):917-922.

Ito T, Takatsuki A, Kawamura K, Sato K, Tamura G. Isolation and structures of components of tunicamycin. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1980;44(3):695-698.

Jan, S.; Abbas, N. *Chemistry of Himalayan Phytochemicals*. In: *Himalayan Phytochemicals*. Elsevier. 2018, p. 121–166.

Jimenez C. Marine natural products in medicinal chemistry. *ACS Med Chem Lett*. 2018;9(10):959–961.

Johnson PTJ, Calhoun DM, Stokes AN, Calvin J, Susbilla B, Mcdevitt-Galles T, et al. Of poisons and parasites-the defensive role of tetrodotoxin against infections in newts. *J Anim Ecol* 2018;87:1192–204.

Kalinovskaya N, Ivanova E, Alexeeva Y, Gorshkova N, Kuznetsova T, Dmitrenok A et al. Low-Molecular-Weight, Biologically Active Compounds from Marine Pseudoalteromonas Species. *Current Microbiology*. 2004;48(6).

Kaneda T. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiological Reviews*. 1991;55(2):288-302.

Kaspar F, Neubauer P, Gimpel M. Bioactive Secondary Metabolites from *Bacillus subtilis*: A Comprehensive Review. *Journal of Natural Products* 2019;82:2038–53.

https://doi.org/10.1021/ACS.JNATPROD.9B00110/ASSET/IMAGES/ACS.JNATPROD.9B00110.SOCIAL.JPEG_V03.

Keating SM, Deng X, Fernandes F, Cunha-Neto E, Ribeiro AL, Adesina B, et al. Inflammatory and cardiac biomarkers are differentially expressed in clinical stages of Chagas disease. *International Journal of Cardiology*. 2015; 199: 451–459. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.07.040>

Klotz U. Ziconotide—a novel neuron-specific calcium channel blocker for the intrathecal treatment of severe chronic pain—a short review. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2006;44:478–83

Kondo E, Kanai K. The relationship between the chemical structure of fatty acids and their mycobactericidal activity. *Jpn J Med Sci Biol* 1977;30:171–8.

Kong Q, Shan S, Liu Q, Wang X, Yu F. Biocontrol of *Aspergillus flavus* on peanut kernels by use of a strain of marine *Bacillus megaterium*. *International Journal of Food Microbiology* 2010;139:31–5.

Kossuga MH, Nascimento AM, Reimao JQ, Tempone AG, Taniwaki NN, Veloso K, Ferreira AG, Cavalcanti BC, Pessoa C, Moraes MO et al.: Antiparasitic, antineuroinflammatory, and cytotoxic polyketides from the marine sponge *Plakortis angulospiculatus* collected in Brazil. *J Nat Prod* 2008, 71: 334-339.

Kulanthaivel P, Kreuzman A, Strege M, Belvo M, Smitka T, Clemens M et al. Novel Lipoglycopeptides as Inhibitors of Bacterial Signal Peptidase I. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(35):36250-36258.

Lafont O. From the willow to aspirin. *Revue d'histoire de la pharmacie*. 2007;94(354):209-216.

Lam KS. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Curr Opin Microbiol* 2006;9(3):245–51.

Lee HK, Lee DS, Kim J, Kim JS, Im KS, Jung JH. Topoisomerase inhibitors from the *Streptomyces* sp. strain KM86-9B isolated from a marine sponge. *Arch Pharm Res* 1998;21:729–33

Le Loup G, Pialoux G, Lescure FX. Update in treatment of Chagas disease. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2011;24:428–34.

Lin Q, Katakura K., Suzuki M. Inhibition of mitochondrial and plastid activity of *Plasmodium falciparum* by minocycline. *FEBS Letters*. 2002; 515, 71-74.

Liu J, Luo C, Smith P, Chin J, Page M, Paetzel M et al. Synthesis and Characterization of the Arylomycin Lipoglycopeptide Antibiotics and the Crystallographic Analysis of Their Complex with Signal Peptidase. *Journal of the American Chemical Society*. 2011;133(44):17869-17877.

Liu L, Weller P. Antiparasitic Drugs. *New England Journal of Medicine*. 1996;334(18):1178-1184.

Liu S, Weibin R, Jing L, Hua X, Jingan W, Yubao G, Jingguo W. Biological control of phytopathogenic fungi by fatty acids. *Mycopathologia*. 2008;166:93-102

López L, Arai K, Giménez E, Jiménez M, Pascuzo C, Rodríguez-Bonfante C, et al. C-reactive protein and interleukin-6 serum levels increase as Chagas disease progresses towards cardiac failure]. *Revista Española de Cardiología*. 2006; 59(1): 50–56.

López-Pérez M, Gonzaga A, Martin-Cuadrado A, Onyshchenko O, Ghavidel A, Ghai R et al. Genomes of surface isolates of *Alteromonas macleodii*: the life of a widespread marine opportunistic copiotroph. *Scientific Reports*. 2012;2(1).

Ludwiczuk, A.; Skalicka-Woźniak, K.; Georgiev, M. I. Terpenoids. In: *Pharmacognosy - Fundamentals, Applications and Strategies*. Academic Press, 2017, p. 233-266.

Luz BLP, Kitahara M V. Could the invasive scleractinians *Tubastraea coccinea* and *T. tagusensis* replace the dominant zoantharian *Palythoa caribaeorum* in the Brazilian subtidal? *Coral Reefs* 2017;36:875.

Luz BLP, Capel, KCC, Zilberberg C., Flores AAV, Migotto AE., Kitahara, MV. A polyp from nothing: The extreme regeneration capacity of the Atlantic invasive sun corals *Tubastraea coccinea* and *T. tagusensis* (Anthozoa, Scleractinia). *Journal of experimental marine biology and ecology*. 2018; 503, 60-65

Malanicheva IA, Kozlov DG, Sumarukova IG, Efremenkova O, Zenkova VA, Katrukha GS, et al. Antimicrobial activity of *Bacillus megaterium* strains. *Microbiology* 2012 81:2 2012;81:178–85.

Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim SK. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiological Research* 2014;169:262–78.

Mansson M, Gram L, Larsen TO. Production of Bioactive Secondary Metabolites by Marine Vibrionaceae. *Marine Drugs* 2011, Vol 9, Pages 1440-1468 2011;9:1440–68.

Marín-Neto JA; Simões MV, Sarabanda AVL. Cardiopatía chagásica. *Arq Bras Cardiol*, 1999;72(3):247-63.

Martínez-Luis S, Gómez JF, Spadafora C, Guzmán HM, Gutiérrez M. Antitrypanosomal Alkaloids from the Marine Bacterium *Bacillus pumilus*. *Molecules* 2012, Vol 17, Pages 11146-11155 2012;17:11146–55.

Martins-Melo FR, Ramos AN Jr, Alencar CH, Heukelbach J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis. *Acta Trop*. 2014 Feb;130:167-74. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.10.002

Minamino M, Sakaguchi I, Naka T, Ikeda N, Kato Y, Tomiyasu I et al. Bacterial ceramides and sphingophospholipids induce apoptosis of human leukaemic cells. *Microbiology*. 2003;149(8):2071-2081.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas: 14 de abril – Dia Mundial. *Bol Epidemiol*. 2020; 51(n.esp.):1-43. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica Brasília; 2009; Caderno 10p. 1-19. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_epidemiologica_7ed.pdf

Molyneux DH, Morel C. Onchocerciasis and Chagas' disease control: the evolution of control via applied research through changing development scenarios. *Br Med Bull* 1998;54:327-39.

Moncayo Á., Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. 2009;104:17–30

Moreira APB, Chimetto Tonon LA, Do Valle P, Pereira C, Alves N, Amado-Filho GM, Francini-Filho RB, et al. Culturable heterotrophic bacteria associated with healthy and bleached scleractinian madracis decactis and the fireworm hermodice carunculata from the remote St. Peter and St. Paul Archipelago, Brazil. *Current Microbiology* 2014;68:38–46.

Moreno AMH. Mecanismos de Transmissão da Doença de Chagas 2017. <http://chagas.fiocruz.br/doenca/transmissao/#controle>

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.

Mullis MM, Rambo IM, Baker BJ, Reese BK. Diversity, Ecology, and Prevalence of Antimicrobials in Nature. *Frontiers in Microbiology* 2019;10.

Nedashkovskaya OI, Kim SB, Lysenko AM, Frolova GM, Mikhailov VV, Bae KS. *Bizonia paragorgiaegen*. nov., sp. nov., a novel bacterium of the family *Flavobacteriaceae* isolated from the soft coral *Paragorgia arborea*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2005;55:375–378

Kooperman N, Ben-Dov E, Kramarsky-Winter E, Barak Z, Kushmaro A. Coral mucus-associated bacterial communities from natural and aquarium environments. *FEMS Microbiology Letters*. 2007;276(1):106-113.

Newman DJ, Cragg GM. Drugs and drug candidates from marine sources: an assessment of the current “State of play”. *Planta Med*. 2016;82:775–789

Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products* 2020;83:770–803.

Nichols CM, Bowman JP, Guezennec J. *Olleya marilimos* gen. nov., sp. nov., an exopolysaccharide-producing marine bacterium from the family *Flavobacteriaceae*, isolated from the Southern Ocean. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2005;55:1557–61..

Nunes MCP, Beaton A, Acquatella H, Bern C, Bolger AF, Echeverría LE, et al. Chagas cardiomyopathy: An update of current clinical knowledge and management: A scientific statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2018; 138(12): e169–e209.

Oliveira Filho AM. Differences of susceptibility of five triatomine species to pyrethroid insecticides- implications for Chagas disease vector control. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94:425-8

OMS. Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). World Health Organization. 2022. Disponivel em: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))

OMS. Neglected tropical diseases. World Health Organization. 2022. https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_2

OMS. Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data. World Health Organization. 2022. <https://covid19.who.int/>

OMS. World Chagas Disease Day: raising awareness of neglected tropical diseases. 2019. World Health Organization. Available at: https://www.who.int/neglected_diseases/news/world-Chagas-day-approved/en/.

Orgambide G, Hollingsworth R, Dazzo F. Structural characterization of a novel diglycosyl diacylglyceride glycolipid from *Rhizobium trifolii* ANU843. *Carbohydrate Research*. 1992;233:151-159.

Osei E, Kwain S, Mawuli G, Anang A, Owusu K, Camas M et al. Paenidigymycin A, Potent Antiparasitic Imidazole Alkaloid from the Ghanaian *Paenibacillus* sp. DE2SH. *Marine Drugs*. 2018;17(1):9.

Parkes RJ, Cragg B, Roussel E, Webster G, Weightman A, Sass H. A review of prokaryotic populations and processes in sub-seafloor sediments, including biosphere:geosphere interactions. *Marine Geology* 2014;352:409–25.

Pecoul B, Batista C, Stobbaerts E, Ribeiro I, Vilasanjuan R, Gascon J, et al. The BENEFIT Trial: Where Do We Go from Here? *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2016;10:e0004343.

Penkov S, Mende F, Zagoriy V, Erkut C, Martin R, Pässler U et al. Maradolipids: Diacyltrehalose Glycolipids Specific to Dauer Larva in *Caenorhabditis elegans*. *Angewandte Chemie International Edition*. 2010;49(49):9430-9435.

Pereira F. Have marine natural product drug discovery efforts been productive and how can we improve their efficiency? *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2019;14(8):717–22.

Pérez CD. Taxonomía, distribución y diversidad de los *Pennatulacea*, *Gorgonacea* y *Alcyonacea* del Mar Epicontinental Argentino y zonas de influencia. Tese de Doutorado - Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.1999

Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *The Lancet* 2018;391:82–94.

Pinazo MJ, de Posada EJ, Izquierdo L, Tassies D, Marques AF, de Lazzari E, et al. Altered hypercoagulability factors in patients with chronic Chagas disease: Potential biomarkers of therapeutic response. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2016; 10(1): e0004269.

Pohl CH, Kock JLF, Thibane VS. Antifungal free fatty acids: a review. *Science against Microbial Pathogens: Current Research and Technological Advances* 2011;1:61–71.

Polêto M D, Rusu VH, Grisci BI, Dorn M, Lins RD, Verli H. Aromatic Rings Commonly Used in Medicinal Chemistry: Force Fields Comparison and Interactions With Water Toward the Design of New Chemical Entities. *Frontiers in pharmacology*. 2018; 9, 395.

Portela RWS. Isolamento e caracterização de cepas *Shewanella* sp. do cultivo heterotrófico de *Litopenaeus vannamei* (Boone , 1931) Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.2014.

Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *The Lancet* 2010;375:1388–402.

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;73:26.

Rees CA, Hotez PJ, Monuteaux MJ, Niescierenko M, Bourgeois FT. Neglected Tropical Diseases in Children: An Assessment of Gaps in Research Prioritization. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2019;13 (1):e0007111.

Ritchie KB. Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. *Marine Ecology Progress Series*.2006; 322; 1-14.

Rieusset L, Rey M, Muller D, Vacheron J, Gerin F, Dubost A et al. Secondary metabolites from plant-associated *Pseudomonas* are overproduced in biofilm. *Microbial Biotechnology*. 2020;13(5):1562-1580.

Roberts CW, McLeod, R., Rice DW, Ginger M, Chance ML, Goad LJ. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2003; 126, 129-142

Romanelli M, Amaral M, Thevenard F, Santa Cruz L, Regasini L, Migotto A et al. Mitochondrial Imbalance of *Trypanosoma cruzi* Induced by the Marine Alkaloid 6-Bromo-2'-de-N-Methylaplysinopsin. *ACS Omega*. 2022;7(32):28561-28570.

Romano S, Jackson SA, Patry S, Dobson ADW. Extending the “one strain many compounds” (OSMAC) principle to marine microorganisms. *Marine Drugs*. 2018;16(7):1–29.

Saggia MG, Santos EAV, Dietze R. Custo-efetividade de benzonidazol para a doença de chagas no Brasil. 2007

Saito H, Tomioka H, Yoneyama T. Growth of group IV mycobacteria on medium containing various saturated and unsaturated fatty acids. *Antimicrob Agents Chemother* 1984;26:164–9

Santos JD, Vitorino I, Reyes F, Vicente F, Lage OM. From ocean to medicine: Pharmaceutical applications of metabolites from marine bacteria. *Antibiotics*. 2020;9:1–30.

Scala F, Fattorusso E, Menna M, Tagliatela-Scafati O, Tierney M, Kaiser, M, Tasdemir D. Bromopyrrole Alkaloids as Lead Compounds against Protozoan Parasites. *Mar. Drugs* 2010, 8, 2162–2174.

Schett G, Sticherling M, Neurath MF. COVID-19: Risk for cytokine targeting in chronic inflammatory diseases. *Nature Reviews Immunology*. 2020; 20(5): 271–272.

Schmidt B, Ribnicky DM, Lipsky PE, Raskin I. Revisiting the ancient concept of botanical therapeutics. *Nat Chem Biol.* 2007;3(7):360-6. doi: 10.1038/nchembio0707-360

Schmidt B, Ribnicky DM, Poulev A, Logendra S, Cefalu WT, Raskin I. A natural history of botanical therapeutics. *Metabolism.* 2008;57(7 Suppl 1):S3-9.

Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica* 2010;115:14–21.

Schoffski P, Dumez H, Wolter P, Stefan C, Wozniak A, Jimeno J, et al. Clinical impact of trabectedin (ecteinascidin-743) in advanced/metastatic soft tissue sarcoma. *Expert Opin Pharmacother* 2008;9:1609–18.

Shahlaei M. Descriptor selection methods in quantitative structure-activity relationship studies: A review study. *Chemical Reviews* 2013;113:8093–103.

Shakibazadeh S, Roos SC, Hafezieh M, Christianus A, Kamarudin MS, Kamaruzaman S. A putative probiotic isolated from hatchery reared juvenile *Penaeus monodon*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences.* 2012; 11: 849-866.

Shiomi K, Omura S. Antiparasitic agents produced by microorganisms. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences* 2004;80:245–58.

Silveira AC, Rezende DF Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1984;27: 11- 22

Simões MV, Romano MM, Schmidt A, Martins KSM, Marin-Neto JA. Chagas Disease Cardiomyopathy. *Int. J. Cardiovasc. Sci.* 2018; 31, 173–189

Smith D, Buddie AG, Goss RJM, Overmann J, Lepleux C, Brønstrup M, et al. Discovery pipelines for marine resources: an ocean of opportunity for biotechnology? *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2019;35.

Smith HL, Rajan TV. Tetracycline inhibits development of the infective-stage larvae of filarial nematodes in vitro. *Exp. Parasitol.* 2000;95, 265-270.

Soares CL, Pérez CD, Maia MB, Silva RS, Melo LF. Avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica do extrato bruto hidroalcoólico do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860). *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2006;16:463–8.

Sottorff I, Wiese J, Lipfert M, Preußke N, Sönnichsen FD, Imhoff JF. Different secondary metabolite profiles of phylogenetically almost identical *Streptomyces griseus* strains originating from geographically remote locations. *Microorganisms* 2019;7.

Spainhour CB. Natural products. In: GAD. S. C. (Ed.). *Drug discovery handbook*, New York: Wiley-Interscience, 2005, Chap. 1, p. 12-72.

Sunyoto T, Potet J, Boelaert M. Why miltefosine-a life-saving drug for leishmaniasis unavailable to people who need it the most. *BMJ Glob Health* 2018;3:709.

Sylvain LS, Lucia VM, Elisabetta G. Effect of α -linolenic, capric and lauric acid on the fatty acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*. 2009;129:288-294

Tajuddeen N, van Heerden FR. Antiplasmodial natural products: an update. *Malaria Journal* 2019 18:1 2019;18:1–62.

Tartarotti E, Oliveira-Azereido MT, Ceron CR. Problemática vetorial da doença de chagas. *Arq Ciênc Saúde* 2004;11:44–7.

Tempone AG, Pieper P, Borborema SET, Thevenard F, Lago JHG, Croft SL, et al. Marine alkaloids as bioactive agents against protozoal neglected tropical diseases and malaria. *Natural Product Reports* 2021;38:2214–35.

Tempone AG, Sartorelli P, Mady C. Natural Products to Anti-trypanosomal Drugs: An Overview of New Drug Prototypes for American Trypanosomiasis. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry* 2008;5:222–35.

Thakare R, Dasgupta A, Chopra S. Update on nifurtimox for treatment of Chagas disease. *Drugs of Today* 2021;57:251–63.

Thompson FL, Iida T, Swings J. Biodiversity of vibrios. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68(3):403-431.

van Oppen MJH, Blackall LL. Coral microbiome dynamics, functions and design in a changing world. *Nature Reviews Microbiology* 2019;17:557–67.

Vanderslott S. Neglected Tropical Diseases. *Nature and Culture* 2020;15:78–110.

Vary PS, Biedendieck R, Fuerch T, Meinhardt F, Rohde M, Deckwer W-D, et al. *Bacillus megaterium*—from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2007;76:957–67.

Veiga-Santos P, Pelizzaro-Rocha KJ, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Silva, SO, Sudatti DB, Bianco EM, Pereira RC, Nakamura CV. In vitro anti-trypanosomal activity of elatol isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*. *Parasitology.* 2010; 137, 1661-1670

Viet Cuong P, Thi Kim Cuc N, Thi Quyen V, Thanh Binh P, van Kiem P, Hoai Nam N, et al. Antimicrobial Constituents from the *Bacillus megaterium* LC Isolated from Marine Sponge *Haliclona oculata*. *Natural Product Sciences* 2014;20:202–5.

Viotti R, Vigliano C, Lococo B, et al. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 7: 157–63

Walsh, C. *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance.* Washington DC, ASM Press. 2003

Wang L, Große T, Stevens H, Brinkhoff T, Simon M, Liang L, et al. Bioactive hydroxyphenylpyrrole-dicarboxylic acids from a new marine *Halomonas* sp.: Production and structure elucidation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006;72:816–22.

Weissman KJ. Polyketide biosynthesis: understanding and exploiting modularity. *Philos. Trans. R. Soc., London, Ser. A*, 2004;362:2671-2690

Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(12):6578-6583.

Wright A, Goclik E, König G, Kaminsky R. Lepadins D–F: Antiplasmodial and Antitrypanosomal Decahydroquinoline Derivatives from the Tropical Marine Tunicate *Didemnum* sp. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2002;45(14):3067-3072.

Wyciszkievicz M, Saeid A, Chojnacka K, Górecki H. Production of phosphate biofertilizers from bones by phosphate-solubilizing bacteria *Bacillus megaterium*. *Open Chemistry* 2015;13:1063–70.

Yano I, Tomiyasu I, Yabuuchi E. Long chain base composition of strains of three species of *Sphingobacterium* gen. nov. *FEMS Microbiology Letters*. 1982;15(4):303-307.

Yoshioka K, Manne-Goehler J, Maguire JH, Reich MR. Access to Chagas disease treatment in the United States after the regulatory approval of benznidazole. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2020;14:e0008398.

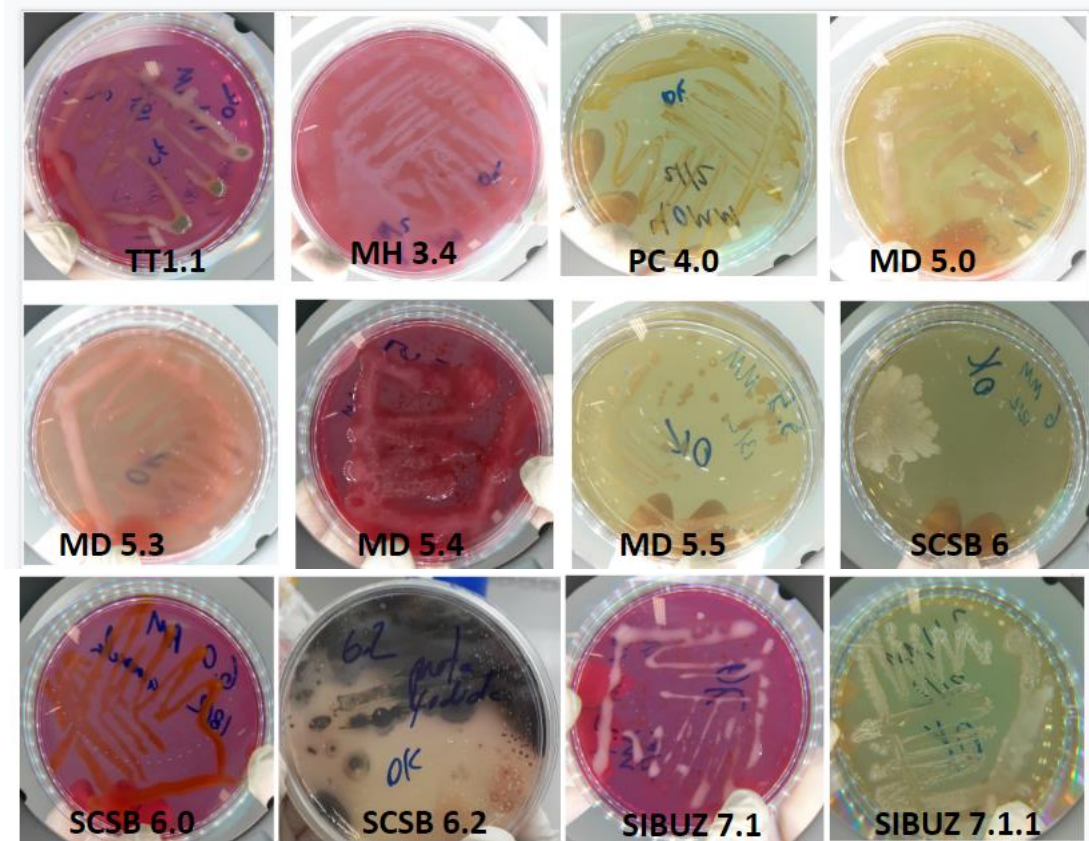
Zaidel EJ, Forsyth CJ, Novick G, Marcus R, Ribeiro ALP, Pinazo MJ, et al. COVID-19: Implications for People with Chagas Disease. *Global Heart* 2020;15:1–15.

Anexo I – Isolados bacterianos da coleta de vertebrados marinhos e sedimentos da Ilha dos Búzios (Ilhabela) e Canal de São Sebastião.

	Sigla	Colônias	Crescimento*
TT	1.1	bege cremosa	++
	1.2	Branca seca	+
	1.3	Branca perola seca	+
TC	2.0	bege cremosa brilhante	+++
	2.0.1	branca cremosa	+++
	2.0.2	branca seca brilhante	++
	2.1		
	2.2	branca bege chiclete brilhante	++
	2.2.2	branca cremosa brilhante	+++
	2.2.4	creme seca	+
MH	3.0	branca cremosa brilhante	+++
	3.3	bege cremosa	+++
	3.4	bege cremosa brilhante	+++
PC	4.0	amarelada cremosa brilhante	+
	4.0.1	creme brilhante	++
MD	5.0	branca cremosa brilhante	+++
	501	branca cremosa	+++
	5.3	bege cremosa opaca	++
	5.4	bege brilhante cremosa	+++
	5.5	creme brilhante chiclete	++
SCSB	6	Creme amarelada opaca	++
	6.0	amarelo forte brilhante	++
	6.0.2	alaranjada brilhante	++
	6.0.2.1	rosada brilhante	++
	6.0.2.2	amarela brilhante	+++
	6.1	creme opaca	++
	6.2	Branca brilhante	++
SIBUZ	7	bege cremosa brilhante	+++
	7.1		
	7.1.1	bege brilhante	++
	722	branca seca	++

*crescimento verificado visualmente após 24h a 25°C em meio *Agar Marine* (Difco).

Anexo II- Fotografias de colônias bacterianas coletadas sem identificação possível por MALDI-TOF



TC: *Tubastraea coccinea*; MH: *Mussismilia hispida*; PC: *Palythoa caribaeorum*; MD: *Madracis decactis*; SCSB: Sedimento do Canal de São Sebastião; SIBUZ: Sedimento da Ilha de Búzios

Anexo III- Sequência de nucleotídeos das bactérias T.C 2.0.2, S.C.S.B 6.0.2.1, SIBUZ 7.2.2 por sequenciamento do gene 16S rRNA

TC 2.0.2- *Alteromonas macleodii*

atgcttgggaactgcctttgagggggataacagttggaacgactgctaataccgcataatgtcttcgg
accaaacggggcttcggctccggcgcaagagaggccaagtgagattagctagtggtaaggtaacg
gcttaccaaggcgacgatctctagctgttctgagaggaagatcagccacactgggactgagacacggcc
cagactctacgggaggcagcagtggggaatattgcacaatgggggaaaccctgatgcagccatgccg
cgtgtgtgaagaaggccttcgggtgtaaagcacttccagttgtgaggaaaagttagtagttaatacctgcta
gccgtgacgtaacaacagaagaagcaccggctaactccgtgccagcagccgcgtaatacggagggt
gagcagcgttaacggaattactggcgtaaagcgcacgcagggcggttggtaagctagatgtgaaagccc
cgggctcaacctgggatggtcatttagaactggcagactagagtcttgagaggggagtggaattccagg
tgtagcggtaaatcgtagatatctggaggaacatcagtggaaggcgactccctggccaaagactg
acgctcatgtgcaaggtggtgtagcgaacaggattagataccctgtagtccacaccgtaaaccgtgt
ctactagctgtgtgtctttaagacgtgctgtagcgaagctaaccgctaaagtagaccgctggggagtag
ggccgcaagggtaaaactcaaatgaattgacggggggccgcacaagcgggtggagcatgtggttaattcg
atgcaacgcaagaaccttacctacactgacatgctgagaagtactagagatagttcgtgccttcggga
actcagacacagggtgctgcatggctgctgctcagctcgtgctgagatgttgggtaagtcccgcacgag
cgcaacctgtccttagttgccagccttaagttggcactctaaggagactgccggtgacaaaccggagg
aagggtgggacgacgtcaagtcacatggcccttacgtgtagggctacacacgtgctacaatggcatttac
agagggaaagcgagacagtgatgtggagcggaccctaaagaatgctgtagtccggattggagtgctgca
actcgactccatgaagtcggaatcgtagtaatcgcaggtcagaataactgcggtgaatacgttccggggcc
ttgtacacaccgcccgtcacaccatgggagtggtgcaaaagaagtagttagttaaccttcggggagga
cgattaccactttgtttcatgactgggggtgaagtcgtaacaaggaaccgt

SCSB 6.0.2.1- *Shewanella pneumatophori*

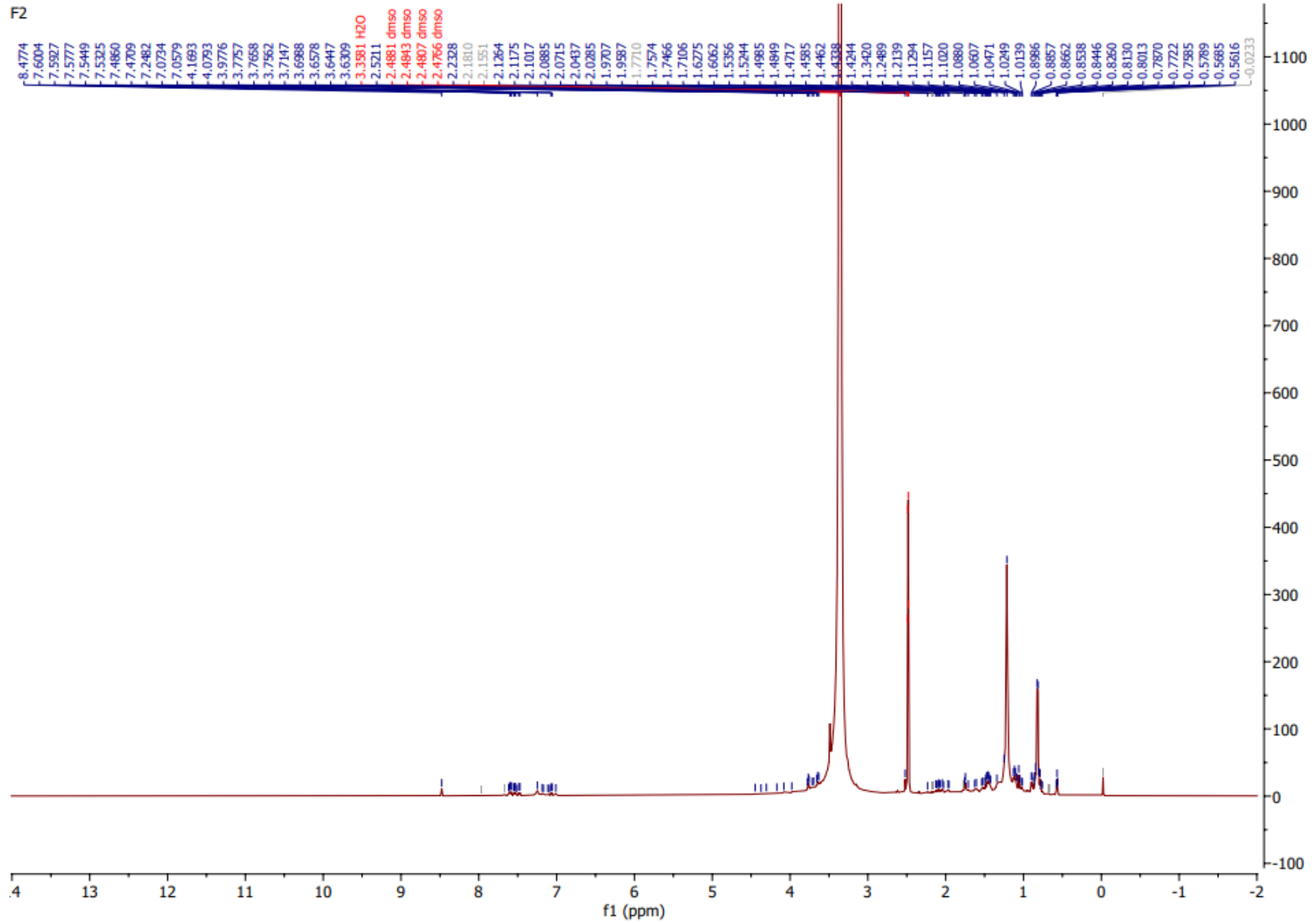
cggtaacacaagggagcttgctcctgaggtgacgagcggcgagcgggtgagtaatgcctaggtatctgc
ccagtcgagggggataacagttggaacgactgctaataccgcatacgcctacgggggaaaggagg
ggaccttcgggccttcggcattggatgaacctaggtgggattagctagtggtaggtaattggctaccaa
ggcagcagatccctagctggtctgagaggatgatcagccacactggaactgagacacgggtccagactcct
acgggaggcagcagtggggaatattgcacaatgggcgaaagcctgatgcagccatgccgctgtgtga
agaaggccttcgggtgtaaagcacttccagcagggaggaaaggttagtgattaatactactagctgtga
cgttactcgcagaagaagcaccggctaactcgtgccagcagccgcgtaatacaggggtgcaagcgt
taatcgaattactgggcgtaaagcgtacgcagggcggttggtaagcgagatgtgaaagccccgggctca
acctgggaactgcattcgaactggcaactagagtctttagaggggggtagaatttcagggttagcgggt
gaaatgctgagagatctgaaggaataccggtggcgaaggcggccccctggacaaagactgacgctca
ggtagcgaagcgtggggagcaaacaggattagataccctgtagtccacgccgtaaacgatgtctactc
ggaattgggtcttgaacactgggttctcaagctaacgcattaagtagaccgctggggagtagcggccgc
aaggttaaaactcaaatgaattgacggggggccgcacaagcgggtggagcatgtggttaattcagtgca
cgcaagaaccttacctactcttgacatccagagaattcgctagagatagcttagtgccttcgggaactctg
agacagggtgctgcatggctgctcagctcgtgtgtgaaatgttgggtaagtcccgcacagcgcgaac
ccttatcctatttccagcagcgaatgggtgggaactttagggagactgccggtgataaaccggagggaagg
ggggacgacgtcaagtcacatggcccttacgagtagggctacacacgtgctacaatggcggtagcaga

gggttgcaagccgcgaggtggagctaattcacaagccggctgtagtccggattggagtctgcaactc
gactccatgaagtcggaatcgctagtaatcgtagatcagaatgctacgggtaatacgttcccggccttgta
cacaccgcccgtcacaccatgggagtggtgctgcaccagaagtagatagctaacctcgggagggcggtt
accacggtgtggtcatgactggggtgaagtcgtaacaaggtaaccgt

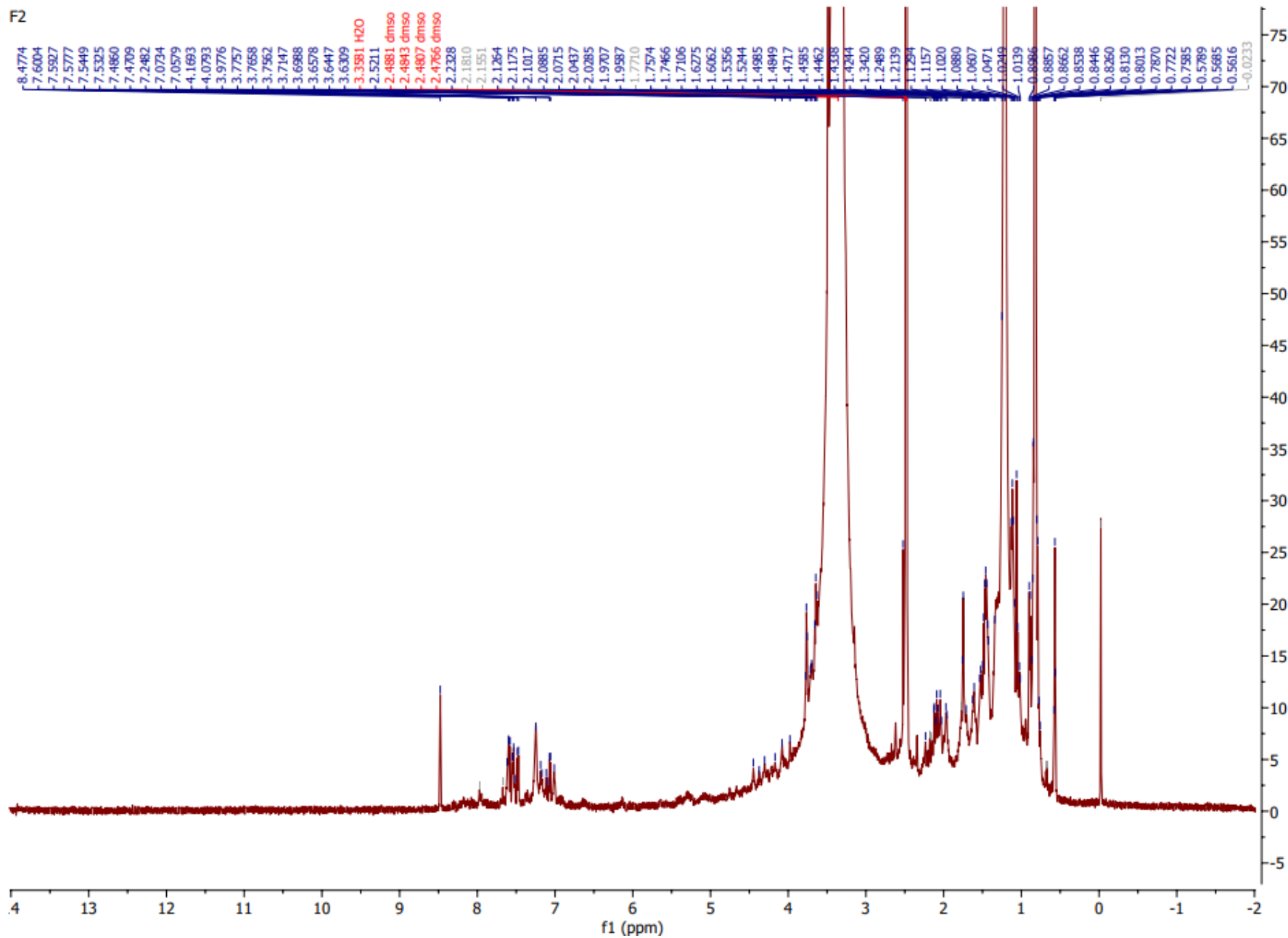
SIBUZ 7.2.2- *Halomonas aquamarina*

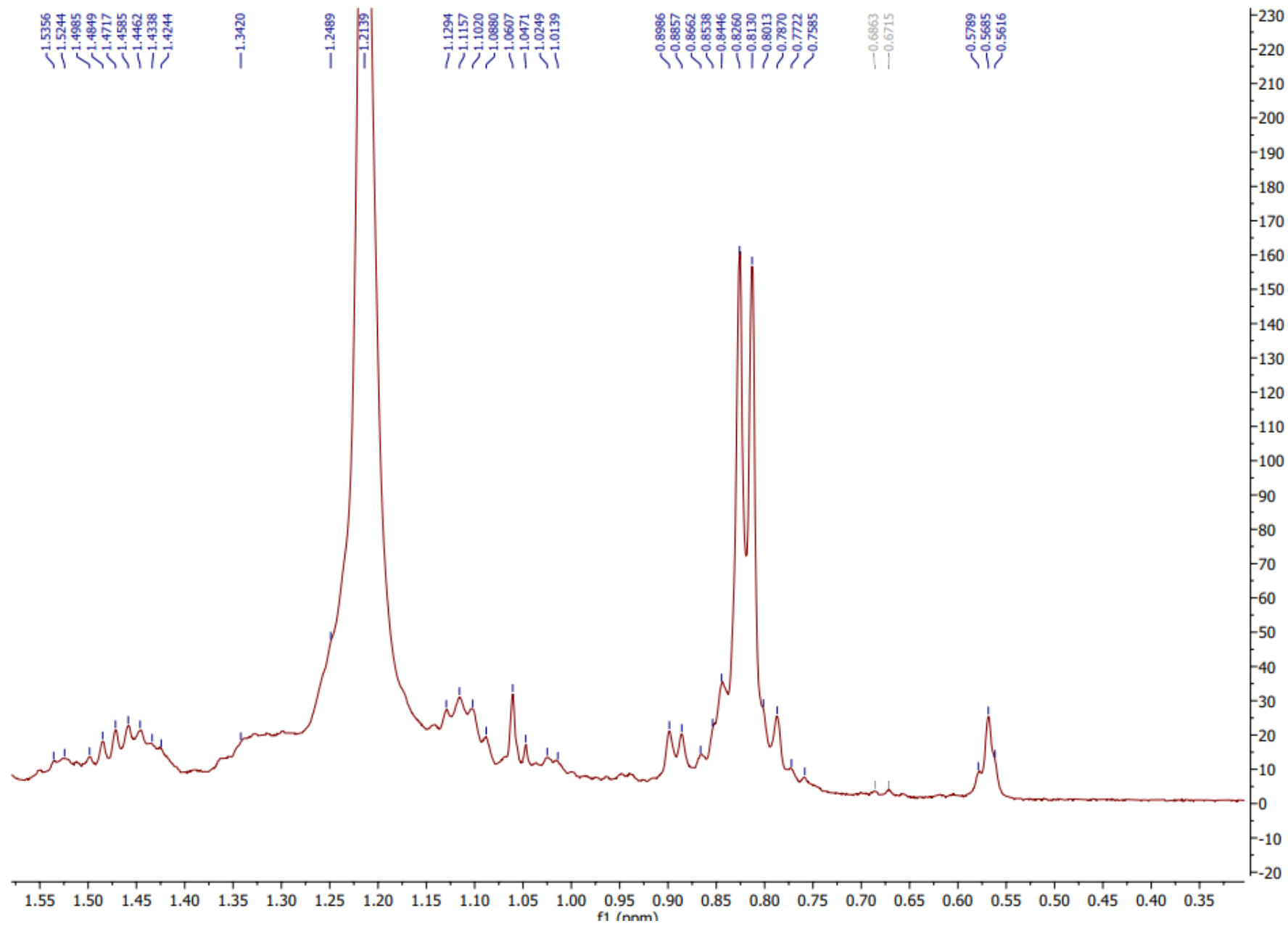
gatccagcttgctggatgctgacgagcggcggacgggtgagtaatgcataggaatctgcccgatagtggg
ggataacctgggaaaccaggctaataaccgcatacgtcctacgggagaaaggggcttcggctcccg
ctrtcggatgagcctatgctggattagctagttggtgaggtaacggctcaccaaggccacgatccgtagctg
gtctgagaggatgatcagccacatcgggactgagacacggcccgaactcctacgggagggcagcagtg
gggaatattggacaatgggggsaacctgatccagccatgccgcgtgtgtaagaaggccctcgggtgt
aaagcactttcagcgaggaagaacgcctagcgggtaataaccgctaggaaagacatcactgcagaag
aagcaccggctaactccgtgccagcagccgcggtaatacggagggtgcaagcgtaatcggaactctg
ggcgtaaagcgcgcgtaggtggcttgataagccggttgaaagccccgggctcaacctgggaacggc
atccggaactgtcaagctagagtgaggagaggaaggtagaattcccgggtgtagcggtgaaatgcgtag
agatcgggaggaataaccagtggaagggcggccttctggactgacactgacactgaggtgcgaaagcg
tggtagcaaacaggattagataccctgtagtcacgccgtaaacgatgtcgaccagccgtgggtgcc
tagcgcactttgtggcgaagttaacgcgataagtcgaccgctggggagtagcggcgaaggtaaaact
caaatgaattgacgggggcccgcacaagcgggtggagcatgtggttaattcgatgcaacgcgaagaacc
ttacctactctgacatcctgcgaatttgtagagataccttagtccttcgggaacgcagagacaggtgctg
catggctgtcgtcagctcgtgtgtgaaatggtgggtaagtcccgtaacgagcgcgaacctgtccttattgc
cagcgcgtaatggcgggaactctaaggagactgccggtgacaaaccggagggaaggtggggacgacgt
caagtcatcatggccctacgagtagggctacacacgtgctacaatggtcgggtacaaaggggtgccaaactc
gagagagtgagccaatcccgaagccgatctcagtcggatcggagctgcaactcgactccgtgaag
tcggaatcgctagtaatcgtagatcagaatgctacgggtaatacgttcccggcctgtacacaccgcccgt
cacaccatgggagtgactgcaccagaagtggttagcctaacgcaagagggcgatcaccacggtgtgg
tcatgactggggtgaagtcgtaacaaggtaaccgta

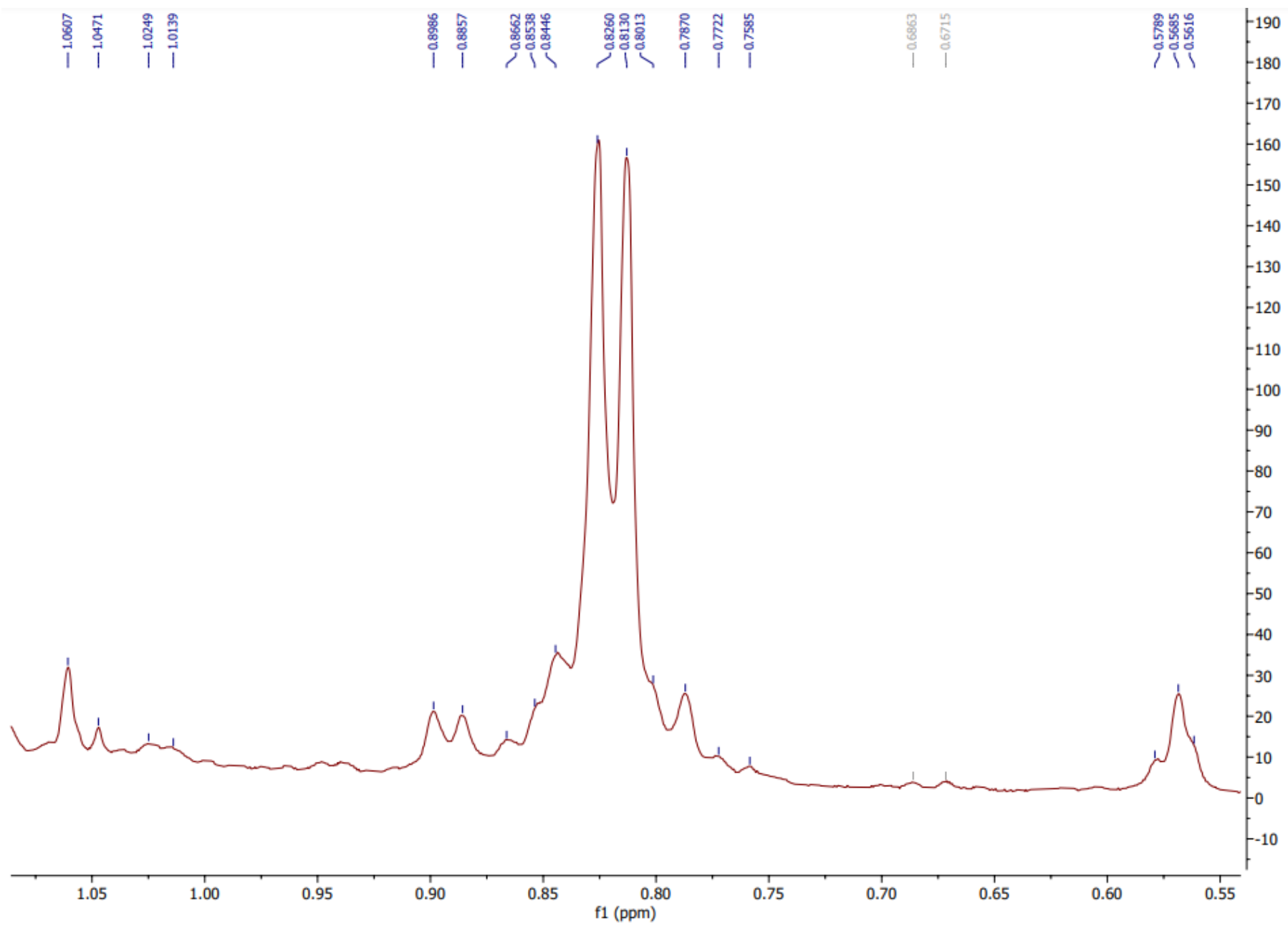
ANEXO IV- Espectros ¹H-RMN da fração FII de *Olleya marilimosa*



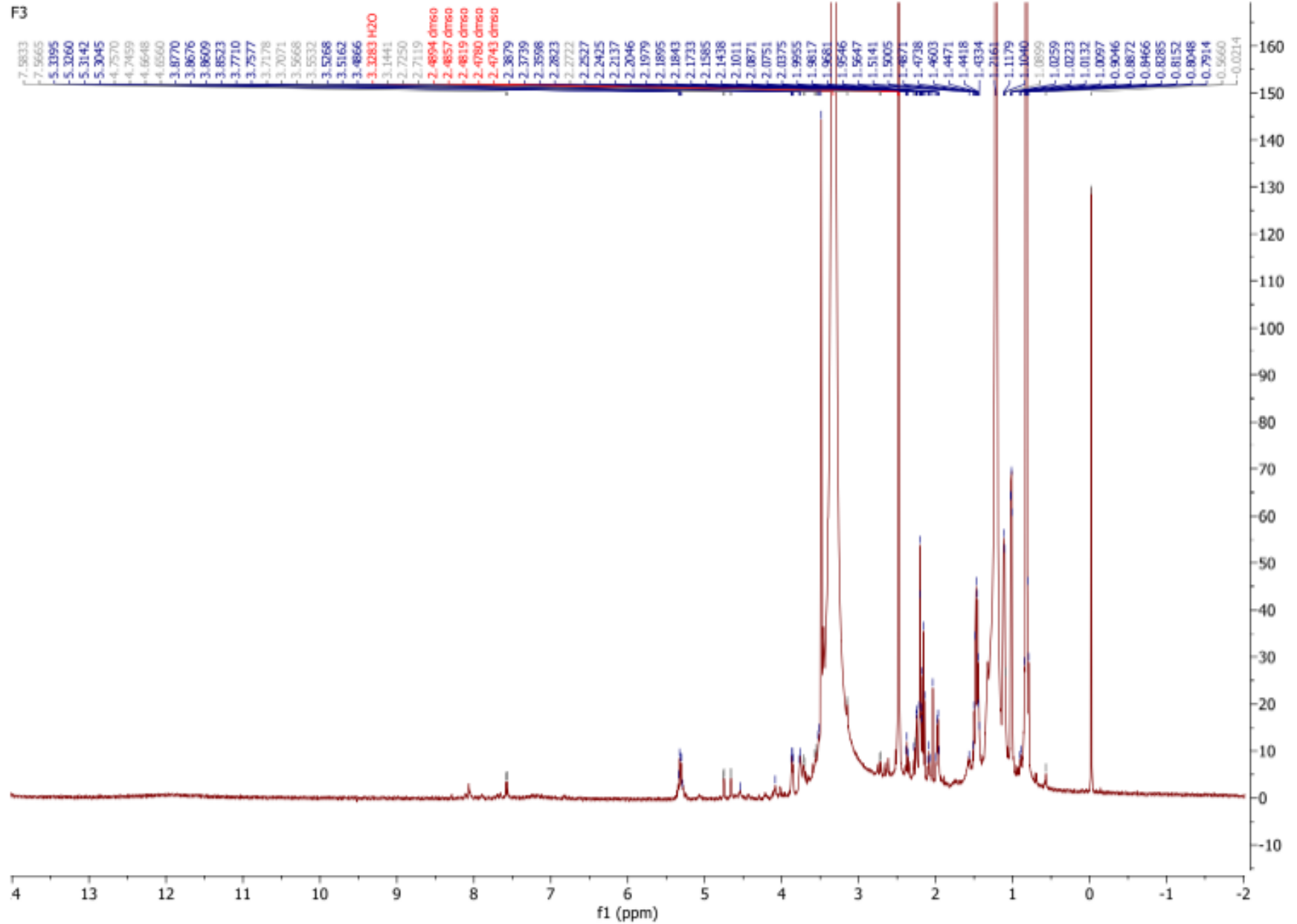
F2

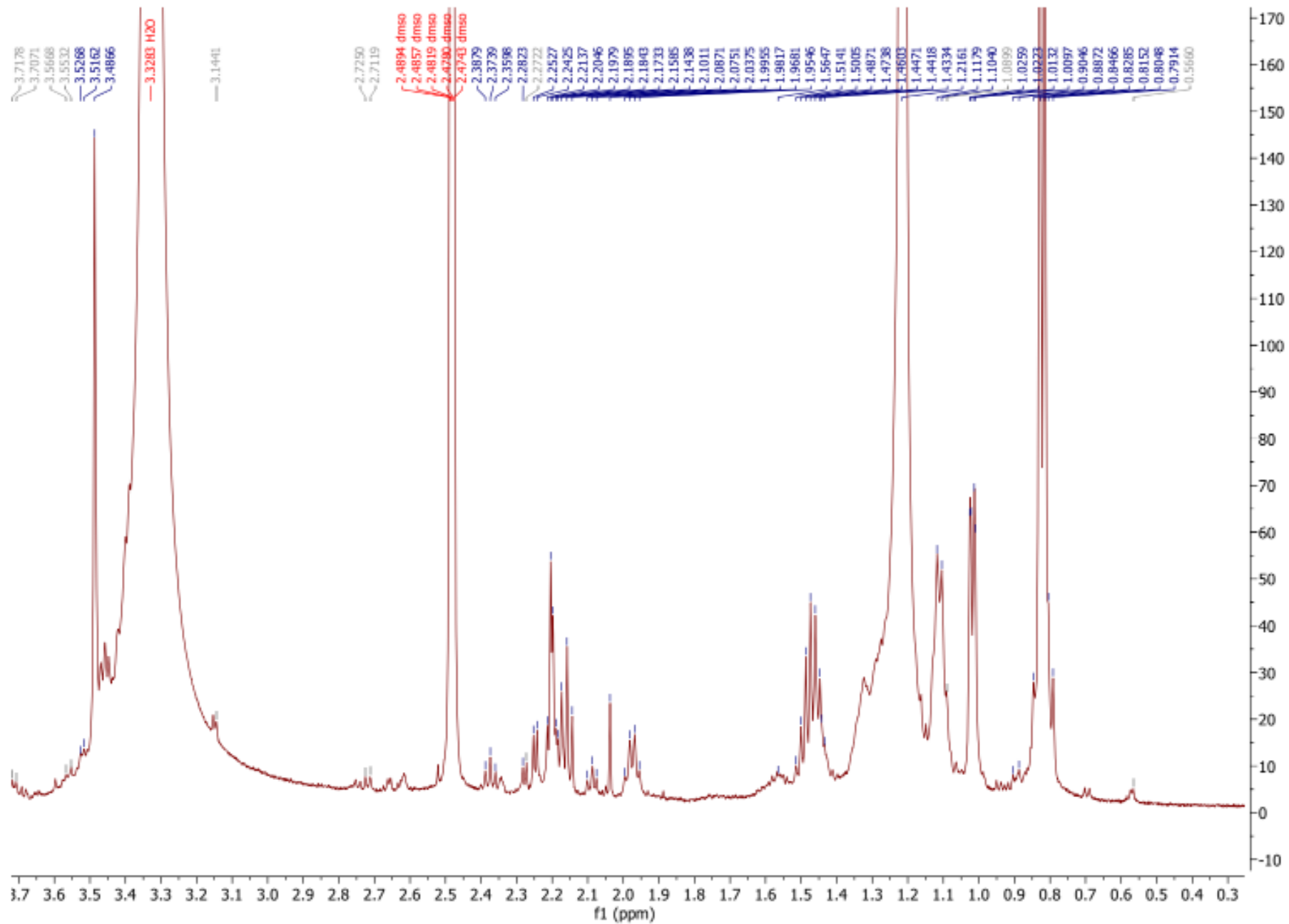






ANEXO V- Espectros ¹H-RMN da fração FIII de *Olleya maritima*





ANEXO VI – DADOS PERFIL PROTEICO – MALDI TOF

Controle					Fil (20 µg/mL)					Fil (50 µg/mL)					Benzimidazol				
m/z	S/N	Res.	Intens.	Area	m/z	S/N	Res.	Intens.	Area	m/z	S/N	Res.	Intens.	Area	m/z	S/N	Res.	Intens.	Area
2015,135	3	642	2350	4703	2015,834	4	743	2075	4187	2691,17	5	904	4531	10087	2664,075	4	1066	2519	5613
2055,506	10	673	4897	15525	2056,46	11	845	4410	11809	2781,908	4	694	4287	11698	2682,109	3	1386	2118	3449
2068,946	3	581	2273	6339	2063,342	3	690	1764	3954	3483,932	3	1095	4161	7632	2690,333	9	672	3805	13954
2335,717	6	594	3180	10503	2070,153	4	913	2027	4642	3577,487	4	497	4478	10515	2699,407	6	1014	2970	7126
2689,354	4	1349	2573	4436	2327,608	3	540	1871	4262	3613,278	3	583	4274	11884	2781,947	4	729	2214	4701
2696,163	3	525	2381	7139	2336,717	6	567	2824	9740	3627,547	4	686	4440	11838	3578,838	8	819	3309	11560
2780,356	14	580	6699	32802	2690,359	5	1170	2586	5468	3977,528	12	852	8587	41946	3979,141	6	654	2850	14765
2896,711	7	577	3940	17374	2698,036	5	599	2530	9427	3998,382	8	1121	6298	25167	3984,344	5	1677	2485	6411
2966,007	5	748	2967	8942	2781,729	18	588	6872	32379	4006,558	4	2883	4686	5541	3997,886	22	838	7370	53474
3173,896	4	745	2659	6899	2898,119	8	564	3458	16230	4009,553	5	2241	4814	6482	4011,094	11	1096	4074	24163
3577,343	10	630	5032	23540	2966,813	4	542	2100	7688	4013,901	5	2809	4880	8414	4024,91	12	895	4605	29836
3771,764	9	597	4507	20408	3175,138	3	904	1891	3974	4023,769	7	772	5766	21999	4038,159	44	808	13807	86745
3947,291	9	660	4561	23072	3578,712	9	762	3907	14653	4038,211	25	904	14855	76509	4052,022	19	699	6394	50155
3966,013	3	1666	2427	3751	3599,472	4	775	2401	6816	4052,234	9	1359	7104	33371	4063,586	8	3257	3165	7429
3961,779	3	1572	2555	5176	3773,812	13	761	5251	24416	4068,325	6	999	5311	18122	4070,523	6	1075	2802	9824
3975,89	38	750	15257	92591	3948,816	9	682	3895	20333	4077,888	4	3275	4525	7379	4078,051	8	755	3374	26298
3987,679	4	1267	2835	4551	3960,786	3	1146	2151	5822	4087,562	4	1229	4398	9575	4090,429	6	2793	2669	5838
3997,246	8	901	4335	27493	3977,658	46	737	15163	95745	4117,196	8	793	6537	31489	4101,786	5	2362	2408	6320
4004,478	6	1633	3411	8242	3999,67	10	856	4262	20001	5656,149	3	792	2999	7757	4112,01	4	862	2197	6445
4010,492	5	1162	3280	9356	4006,182	8	922	3398	17659	6143,043	4	865	2837	16054	4116,162	6	1118	2699	9873
4021,161	5	491	3291	19935	4017,218	7	1339	3262	9436	6161,906	3	875	2670	9033	4130,501	4	1105	2070	5795
4021,161	5	506	3291	19935	4023,219	9	1015	3803	23828	6602,605	3	1564	2531	7102	4401,734	3	723	1835	4872
4036,34	26	733	10951	74389	4038,038	38	817	12814	74765	7966,312	3	1102	1621	7122	4407,563	4	1708	1968	3065
4050,957	8	792	4319	27099	4050,989	13	742	5061	36149	7980,687	3	1165	1582	6373	5035,447	4	629	1779	7855
4063,556	6	1161	3597	12286	4065,327	8	800	3362	18127	7995,453	12	1025	3665	31565	6603,142	8	786	2376	25165
4067,144	6	2727	3542	6884	4074,106	7	564	3244	20770	8008,324	4	3788	1859	7294	6622,662	4	1264	1546	5755
4072,719	8	609	4142	22853	4091,268	5	722	2469	10014	8022,537	6	842	2152	13304	6668,455	4	690	1440	6961
4085,751	6	1461	3376	9325	4100,965	5	700	2568	10380	8025,856	5	843	2106	13304	6674,031	3	2359	1277	2303
4089,843	6	556	3361	13147	4117,199	49	669	15808	109194	8046,852	9	960	2935	23453	6698,247	3	862	1290	5423
4100,177	6	968	3356	12341	4131,566	12	751	4679	30309	8060,908	7	1401	2482	12419	6709,741	7	589	2052	20807
4115,588	47	704	18291	132043	4145,062	17	771	6235	43857	8074,721	39	1099	9983	93513	6727,793	3	1865	1328	4336
4129,801	12	798	5572	33200	4156,108	5	1600	2475	4461	8088,456	11	1557	3400	19755	6735,048	3	780	1279	4454
4143,516	14	796	6462	45114	4161,836	4	522	2337	9511	8101,083	12	721	3701	37895	7954,533	4	1085	1086	5248
4156,627	4	2711	2738	5112	4185,037	3	551	2070	6884	8116,38	6	1435	2226	11907	7968,452	8	1315	1753	14646
4399,958	3	937	2366	6558	4399,737	3	606	2001	6564	8125,179	5	3113	2016	9935	7981,873	7	2625	1552	6528
4597,734	3	2856	2194	4904	5307,851	3	842	1601	7211	8137,872	4	1881	1767	5941	7995,695	39	1151	6660	61530
5434,395	5	719	2441	14482	5435,754	3	571	1571	8767	8146,327	4	4957	1689	3797	8009,644	11	1568	2156	13194
5526,855	4	1088	2266	12774	5436,844	4	583	1638	8767	8156,47	3	1407	1620	5447	8024,751	16	1245	2869	30468
5547,229	7	867	3100	22565	6505,132	3	1089	1245	5287	8171,721	6	876	2199	20891	8033,958	11	2369	2207	9796
5561,44	4	3342	2024	4402	6602,089	9	1171	2391	24599	10065,732	3	3366	749	3033	8046,276	20	1256	3499	38357
6130,69	8	1262	3077	18547	6709,019	3	1840	1265	3488					8062,036	15	1616	2793	14850	
6137,735	6	1865	2601	8617	7980,3	3	1512	868	3384					8075,276	72	1069	11741	124173	
6142,914	5	1659	2344	7341	7995,48	12	1084	2298	20130					8088,679	22	1706	3856	26886	
6148,784	5	1599	2172	5678	8011,836	4	864	1030	7340					8102,604	28	1132	4771	70224	
6174,786	3	2025	1749	4143	8015,26	4	860	1042	7340					8125,648	10	1129	2015	11388	
6197,242	3	1354	1751	5097	8024,211	6	1275	1232	7064					8136,189	10	1072	1953	12847	
6599,239	6	883	2510	20758	8036,255	5	1381	1130	5271					8142,095	10	1703	1940	9101	
6703,924	5	770	2049	11681	8047,961	10	1097	1854	16816					8152,799	10	839	1986	20633	
6712,014	3	772	1702	7084	8060,33	7	2059	1453	6464					8157,555	10	809	1932	20633	
6894,768	5	1364	2213	13286	8075,139	35	965	5797	59593					8165,219	8	3272	1692	6707	
6909,344	5	532	2058	16285	8089,911	10	963	1984	15474					8181,083	7	2050	1565	9282	
7992,107	6	1129	19647		8101,691	13	959	2397	23102					8192,744	5	1351	1123	6818	
8020,221	4	935	1242	8958	8113,748	6	1260	1253	11769					8215,414	4	1094	1070	5516	

8045,452	5	874	1534	13423	8131,963	4	4342	1006	2655
8071,967	20	949	4623	52911	8148,016	4	5531	970	3572
8087,243	6	1039	1686	10977	8153,875	3	4106	894	2747
8099,025	7	1082	1896	17291	10063,57	3	1037	537	3623
10061,429	3	1690	712	2575	13202,429	8	1738	512	4691
11051,532	4	1239	669	6785	13220,557	4	4840	287	1512
11092,303	6	1197	841	11463					
12257,399	6	1169	658	8532					
12270,446	5	5005	600	2565					
12275,619	4	1931	491	2791					
12285,036	4	2430	500	2828					
12299,204	3	3741	431	1765					
12312,077	3	5862	407	1942					
13199,454	5	1394	510	4705					
13789,336	4	2094	394	3385					
13807,861	3	3978	327	1678					
13829,907	3	4910	314	1084					
13839,862	3	1816	314	1831					

8225,605	4	2028	946	3339
8241,23	4	805	1042	8116
8246,196	4	758	988	8116
8261,63	4	965	949	5386
10045,717	3	1675	561	2760
10056,492	6	3465	853	4149
10064,817	7	3387	957	6353
10074,889	7	2555	900	5667
10085,549	4	4243	624	2340
10095,254	4	2230	606	3042
13199,851	5	1554	370	4883
13221,163	4	3172	315	2023



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CONSELHO TÉCNICO CIENTÍFICO – CTC / IAL



São Paulo, 01 de Outubro de 2021

Projeto: CTC 08-N / 2021

“Protótipos Microbianos e Vegetais como Candidatos a Fármacos para Protozooses Negligenciadas e Bactérias Multirresistentes”

Coordenação: Andre Gustavo Tempone Cardoso

Prezado(s) Coordenador(es),

Comunicamos que o projeto foi aprovado quanto ao Mérito Científico pelo Conselho Técnico Científico do IAL com Ciência da Direção Geral e cadastro CTC-IAL 08-N/2021.

Por tratar-se de projeto que *não envolve, direta ou indiretamente, a pesquisa com seres humanos, e que não envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (não humano) segundo a Lei nº 11794/2008, não exige* a avaliação quanto aos aspectos éticos pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CEPIAL) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Experimentação do Instituto Adolfo Lutz (CEUA/IAL).

Atenciosamente,

ADRIANA BUGNO
Presidente do CTC/IAL

1ª Via: Coordenador
2ª Via: Diretor de Núcleo
3ª Via: Diretor de Centro
4ª Via: CTC