



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

JOSÉ NOÉ DA SILVA JÚNIOR

BIOATIVOS DE MICROALGAS COM EFEITO IMUNOMODULADOR E
*ANTI-*Trypanosoma cruzi**

Recife

2023

JOSÉ NOÉ DA SILVA JÚNIOR

**BIOATIVOS DE MICROALGAS COM EFEITO IMUNOMODULADOR E
*ANTI-Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, área de Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Área de concentração: Biologia Aplicada à Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto.

Co-orientadoras: Profa. Dra. Daniela de Araújo Viana Marques

Dra. Virginia Maria Barros de Lorena

Recife

2023

Catálogo na Fonte: Bibliotecária
Natália Nascimento, CRB4/1743

Silva Júnior, José Noé da.

Bioativos de microalgas com efeito imunomodulador e *anti-trypanosoma cruzi*. / Recife. – 2023.73f. : il.,
fig.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto. Coorientadora:
Daniela de Araújo Viana Marques.
Virginia Maria Barros de Lorena.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação
em Biologia aplicada à saúde, 2023.
Inclui referências.

1. Microalgas. 2. Compostos bioativos. 3. Atividade tripanocida. 4. Imunomodulação. I. Porto, AnaLúcia
Figueiredo. (Orient.). II. Marques, Daniela de Araújo Viana. (Coorient.). III. Lorena, Virginia Maria Barros de.
(Coorient.). IV. Título.

JOSÉ NOÉ DA SILVA JÚNIOR

**BIOATIVOS DE MICROALGAS COM EFEITO IMUNOMODULADOR E
ANTI-*Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, área de Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Área de concentração: Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: 27/07/2023.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto / UFPE-
Orientadora

Profa. Dra. Daniela de Araújo Viana Marques / UPE-Coorientadora

Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto / UFPE

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra / UFPE

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho / UFPE

Profa. Dra. Raquel Pedrosa Bezerra/ UFRPE

A Deus, Nossa Senhora, meus pais, minha irmã, e minha
avó Maria José Lopes de Souza (***In memorian***),

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por todas as maravilhas que Ele vem realizando na minha vida. E claro, jamais conseguiria me sustentar sem a constante proteção e intercessão da Virgem Maria. Obrigado por me socorrer em todos os meus momentos de angústia e aflição, querida mãe. Esses quatro anos não foram nada fáceis. Nos momentos mais angustiantes do doutorado, Maria me sustentou, sempre me mostrando o caminho certo. Um livro não seria suficiente para descrever a importância de Nossa Senhora na minha vida.

Agradeço o apoio da minha família: meus pais, Maria Bernadete, José Noé e minha irmã Aline, cada um do seu jeito. Cada conquista minha eu devo sempre a vocês. E quanto ao meu sobrinho, o pequeno Arthur Guilherme. Mesmo que ainda não tenha noção da realidade da vida, você alegra meus dias!

E um agradecimento especial, ainda no âmbito familiar: minha querida avó, Maria José Lopes de Souza. Sua ausência me deixou um profundo vazio. Se por um momento pudesse falar com ela, faria questão de enfatizar que hoje, como homem feito, me orgulho por ter, em minha personalidade, tantas características parecidas com as dela: coragem, teimosia, que na verdade considero persistência, honestidade e autenticidade. Tudo isso levo não apenas na minha vida pessoal, mas também na profissional. Agradecimentos também à minha avó paterna, Severina Rosa de Mendonça (In memorian). Mesmo com seu jeito mais reservado, de pouca conversa, sentia seu carinho por mim, e alegria em cada conquista na minha vida.

Gostaria também de agradecer à minha prima, Elizete Albuquerque (In memorian). Em todos os aspectos da minha vida, sentia sua torcida por mim, e sua partida tão repentina deixou um vazio enorme. Guardo em meu coração todas as suas palavras de incentivo e coragem, e sou muito grato por ter convivido com você.

Agradeço à minha orientadora, professora Ana Porto, por todos esses anos de parceria e confiança depositada em mim. Tenho profunda admiração pela sua pessoa, pela profissional que é, e por sempre ter me inspirado de forma positiva. À minha co-orientadora, professora Daniela Viana, pelo carinho, parceria e colaboração.

Agradeço à professora Raquel Pedrosa, a qual tenho profundo carinho, admiração e amizade. São muitos anos de convivência, de aprendizado e de muita dedicação. Saiba que és uma das minhas maiores inspirações na vida acadêmica. Ao professor Romero

Brandão, minha eterna gratidão também, por todas as vezes em que se mostrou extremamente solícito em todas as minhas atividades. Sua praticidade e agilidade me ajudaram muito nos momentos de desespero em relação às atividades da pesquisa.

Agradecimento especial à professora Cristiane Moutinho, do LIKA, pela ajuda em um dos momentos mais corridos do doutorado, que foram os experimentos da Imunologia. Agradeço também aos colegas do Aggeu Magalhães: Kamila, Ana Carla, Leyllane e Mineo. Vocês foram muito importantes não só na minha trajetória acadêmica, mas na minha vida também. Tenho profundo carinho, respeito e admiração por vocês.

Aos colegas da UFRPE: Léo, Yanara, Alexsandra, Andreza, Laura, Kety, Elaine e Priscila Santos e Priscilla Calaça. Hoje temos rotinas diferentes, mas todos vocês ocupam um lugar especial na minha vida. Obrigado por todos os momentos de descontração, leveza e amizade que deixaram meus dias muito mais felizes.

Também sou muito grato a todos os colegas da EREM Padre Nércio Rodrigues, em especial meus queridos amigos Cecita, Célio, Carolzinha, Mairma, Anna Rayane e Pedro. Neste local, eu aprendi valores que hoje fazem com que eu me enxergue de outra forma: como um profissional. Em um momento de muita insegurança da minha parte, fui muito bem acolhido pela equipe gestora e pelos colegas professores, e se hoje eu consigo me aperfeiçoar na minha profissão, devo isso também a vocês, que sempre fizeram questão de ressaltar as minhas qualidades.

RESUMO

A doença de Chagas (DC), cujo agente etiológico é o *Trypanosoma cruzi*, é uma zoonose que pode ser transmitida a seres humanos principalmente pela ação vetorial. No curso da infecção, o sistema imune desempenha um papel essencial, visto que estimula o processo inflamatório para controlar a infecção, e dispõe de mecanismos que controlam o processo inflamatório, prevenindo lesões teciduais. Levando em consideração as limitações no tratamento da DC, e a necessidade de novos alvos terapêuticos, as microalgas representam uma alternativa viável, visto que produzem metabólitos com diversas propriedades farmacêuticas, incluindo efeitos anti-*T. cruzi* e moduladores da resposta imune. Logo, o objetivo deste trabalho consistiu na avaliação da atividade anti-*T. cruzi* e imunomoduladora de extratos obtidos da biomassa das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Tetrademus obliquus*, assim como na purificação de uma proteína com ação tripanocida a partir do extrato mais seletivo contra o parasito. As microalgas foram cultivadas em meio enriquecido de sais, sob aeração constante e presença de CO₂, sendo a biomassa obtida após a fase exponencial de crescimento, por centrifugação. A biomassa liofilizada foi dissolvida em tampão Tris-HCl a 0,2 M e pH 7,2, submetida ao rompimento celular por sonicação, centrifugada a 4500 xg, 4°C por 30 minutos, cujo sobrenadante foi o extrato aquoso. Foram determinados a concentração citotóxica mínima (CC50) em células mononucleares de sangue periférico (PBMC), a concentração inibitória mínima (IC50) em formas tripomastigotas de *T. cruzi*, e o índice de seletividade (ISe) de cada extrato. Posteriormente, foi avaliada a ação imunomoduladora dos extratos em células infectadas por *T. cruzi*. Além disso, uma proteína com atividade tripanocida foi purificada a partir do extrato aquoso de *T. obliquus*. O extrato foi fracionado com sulfato de amônio, em saturações que variaram entre 0-80%. Cada fração foi dialisada em tampão Tris HCl, a 20 mM, pH 7,2, 4 °C, por 18 h, e avaliada quanto à ação tripanocida. A fração proteica com maior ação anti-*T. cruzi* foi purificada por cromatografia de troca iônica (DEAE- Sephadex), cujas absorbâncias foram avaliadas em 215, 260 e 280 nm. A proteína purificada foi dialisada em tampão Tris HCl, 20 mM, pH 7,2, 4°C, por 18 h, e nas concentrações entre 4,68 e 150 µg/ml, foi avaliada quanto a ação citotóxica (PBMC), e tripanocida. Os ensaios demonstraram que o extrato de *T. obliquus* foi mais seletivo contra

T. cruzi comparado ao de *C. vulgaris* (ISe = 16,8 e 8,9, respectivamente). Além disso, *T. obliquus*, na concentração de 15,08 µg/ml (IC50) também foi eficiente na modulação da resposta imune, mediante a expressão do fator de necrose tumoral (TNF) e da interleucina-10 (IL-10). Por outro lado, *C. vulgaris*, na concentração de 112,10 µg/ml

(IC₅₀), diminuiu os níveis de interferon-gama (IFN- γ), reduzindo, portanto, o processo inflamatório, e também estimulou a produção de TNF, que é essencial no controle da parasitemia. Além disso, a proteína purificada de *T. obliquus* não foi tóxica para PBMC (CC₅₀ > 150 μ g/ml), e apresentou ação tripanocida (IC₅₀ = 58,7 μ g/ml), confirmando, portanto, que microalgas são potenciais agentes anti-*T. cruzi*.

Palavras-chaves: Microalgas, Compostos bioativos, Atividade tripanocida, Imunomodulação.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the etiological agent of Chagas disease (CD), and can be transmitted to humans mainly through the vectorial action. During the course of the infection, the immune system plays an essential role, stimulating the inflammatory process to control the infection, as well as controlling the inflammation, to prevent the tissue damage. Taking into account the limitations in the treatment of CD, and the necessity of new therapeutic targets, microalgae represent a viable alternative, as they produce metabolites with various pharmaceutical properties, including anti-*T. cruzi* activity and immunomodulatory effects. Therefore, the objective of this work was to evaluate the anti-*T. cruzi* and immunomodulatory activities of extracts obtained from the biomass of *Chlorella vulgaris* and *Tetrademus obliquus* microalgae, as well as the purification of a protein with trypanocidal action from the most selective extract against the parasite. The microalgae were cultivated in a salt-enriched medium, under constant aeration and the presence of CO₂, and the biomass was obtained after the exponential growth phase, by centrifugation. The lyophilized biomass was dissolved in Tris-HCl buffer at 0.2 M and pH 7.2, subjected to cell disruption by sonication, centrifuged at 4500 xg, 4°C for 30 minutes, in which the supernatant was the aqueous extract. The minimum cytotoxic concentration (CC₅₀) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), the minimum inhibitory concentration (IC₅₀) in trypomastigote forms of *T. cruzi*, and the selectivity index (SI) of each extract were determined. Subsequently, the immunomodulatory activity of the extracts was evaluated, in *T. cruzi*-infected PBMC. Furthermore, a protein with trypanocidal activity was purified from the aqueous extract of *T. obliquus*. The extract was fractionated with ammonium sulfate, at saturations that varied between 0-80%. Each fraction was dialyzed against Tris HCl buffer, 20 mM, pH 7.2, 4 °C, for 18 h, and evaluated for trypanocidal activity. The protein fraction with the higher anti-*T. cruzi* activity was purified by ion exchange chromatography (DEAE-Sephadex), whose absorbances were evaluated at 215, 260 and 280 nm. The purified protein was dialyzed against Tris HCl buffer, 20 mM, pH 7.2, 4°C, for 18 h, and at concentrations between 4.68 and 150 µg/ml, it was evaluated for cytotoxic (PBMC) and trypanocidal activities. The extract of *T. obliquus* was more selective against *T. cruzi*, compared to the extract of *C. vulgaris* (SI = 16.8 and 8.9, respectively). Furthermore, *T. obliquus*, at 15.08 µg/ml (IC₅₀) presented immunomodulatory effects, through the expression of tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-10 (IL-10). On the other hand, *C. vulgaris*, at 112.10 µg/ml (IC₅₀), decreased the levels of interferon-gamma (IFN-γ),

reducing, the inflammatory process, and also stimulated the production of TNF, which is essential to the control of the parasitemia. Furthermore, the purified protein from *T. obliquus* was not toxic to PBMC (CC50 > 150 µg/ml), and showed trypanocidal activity (IC50 = 58.7 µg/ml), confirming, therefore, that microalgae are potential anti-*T. cruzi* agents.

Keywords: Microalgae, Bioactive compounds, Trypanocidal activity, Immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
Figura 2 -	Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
Figura 3 -	Evolução sorológica e parasitológica de pacientes chagásicos não tratados.....	21
Figura 4 -	Recrutamento de células de defesa no curso da infecção por <i>T. cruzi</i>	22
Figura 5 -	Perfil de citocinas no curso da infecção por <i>T. cruzi</i>	25
Figura 6 -	Estrutura química do Benzonidazol.....	26
Figura 7 -	Estrutura química do Nifurtimox.....	26
Figura 8 -	Produtos oriundos do metabolismo primário e secundário das microalgas	29
Figura 9 -	Morfologia da microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	31
Figura 10 -	Morfologia da microalga <i>Tetrademus obliquus</i>	32
Figura 11 -	Perfil de purificação proteica de <i>Tetrademus obliquus</i>	56
Figura 12 -	Atividade citotóxica da proteína de <i>Tetrademus obliquus</i>	58
Figura 13 -	Atividade tripanocida da proteína de <i>Tetrademus obliquus</i>	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição bioquímica da microalga <i>Tetradismus obliquus</i>	33
Tabela 2 - Perfil de aminoácidos de <i>Tetradismus obliquus</i>	34
Tabela 3 - Análise quantitativa da atividade tripanocida de proteínas precipitadas com sulfato de amônio de <i>T. obliquus</i> a 60 µg/ml.....	55
Tabela 4 - Resumo da purificação proteica a partir do extrato aquoso de <i>T. obliquus</i> com atividade tripanocida	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Adenosina 3,5-monofosfato
APCs	Células Apresentadoras de Antígeno
ATP	Adenosina trifosfato
BZ	Benzonidazol
CC₅₀	Concentração Citotóxica em 50% das Células
CoA	Concavalina A
DAF	Fator de Decaimento do Crescimento
DC	Doença de Chagas
DEAE-S	Dietil-aminoetil-Sephadex
IC₅₀	Dose letal mediana
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina- G
IgM	Imunoglobulina- M
ILs	Interleucinas
IL-10	Interleucina 10
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-4	Interleucina 4
MASP	Protease Serina Associada a MBL
MHC	Major Histocompatibility Complex
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5 difenil brometo de tetrazolina
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NO	Nitric Oxide
NF	Nifurtimox
NK	Natural killers (células matadoras naturais)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMP	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
Th1	T- helper 1

Th2	T- helper 2
TLRs	Toll like receptors (receptores toll like)
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TCR	Receptor de Células T
ME	Microalgae extracts
TNF	Fator de necrose tumoral
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.	16
1.1	OBJETIVOS.....	17
1.1.1	Objetivo geral.....	17
1.1.2	Objetivos específicos	17
2.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
	REFERÊNCIAS.....	37
3.	RESULTADOS	
3.1	ARTIGO PUBLICADO – DO THIAZOLIDINE COMPOUNDS ACT ON INTRACELLULAR AMASTIGOTES OF <i>Trypanosoma cruzi</i> ? A SYSTEMATIC REVIEW	46
3.2	ARTIGO PUBLICADO – MICROALGAE EXTRACTS MODULATES THE IMMUNE RESPONSE IN <i>Trypanosoma cruzi</i> -INFECTED HUMAN CELLS.....	48
3.3	ARTIGO A SER SUBMETIDO – PROTEÍNA DERIVADA DA BIOMASSA DE MICROALGA COM ATIVIDADE TRIPANOCIDA	50
4.	CONCLUSÃO	63
	APÊNDICES	64
	APÊNDICE A – ARTIGOS COM AUTORIA PRINCIPAL PUBLICADOS.....	64
	APÊNDICE B – OUTROS ARTIGOS PUBLICADOS (COM PARTICIPAÇÃO COLABORATIVA).....	66
	ANEXO A – DADOS DA REVISTA CYTOKINE	71
	ANEXO B – DADOS DA REVISTA INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES	72
	ANEXO C – DADOS DA REVISTA RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT	73

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC), também conhecida com tripanosomíase americana, é considerada negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), cujo agente etiológico é o *Trypanosoma cruzi*. Este, por sua vez, é um protozoário hemoflagelado que pode ser transmitido a seres humanos principalmente pela ação vetorial, sendo possível, também, sua transmissão por via oral, de forma congênita ou por transfusão sanguínea (ECHEVERRIA et al., 2019). Segundo a OMS, a DC atinge cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo (WHO, 2020), e de acordo com um levantamento epidemiológico realizado entre 2010 a 2015, maior parte dos infectados são oriundos de países latinoamericanos (Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates).

Clinicamente, a DC possui duas fases, aguda e crônica (BENZIGER et al., 2017). A fase aguda é assintomática em 97% dos casos, e aproximadamente 1% desses pacientes podem apresentar sintomas que variam de moderados a graves. São eles hepatoesplenomegalia, miocardite, insuficiência cardíaca ou meningoencefalite (BONNEY et al., 2019). Ao entrarem na fase crônica indeterminada, os indivíduos infectados geralmente permanecem anos ou décadas sem manifestações clínicas sugestivas, mas ainda apresentam sorologia positiva (LINHARES-LACERDA et al., 2018). Por outro lado, cerca de 30% dos infectados desenvolvem a forma crônica sintomática, sendo a cardiomiopatia chagásica a manifestação clínica mais sugestiva.

O sistema imune desempenha um papel essencial na patogênese da DC. Durante a fase aguda, o processo inflamatório é estimulado por citocinas do perfil Th1, mediante o recrutamento de células de defesa como macrófagos, para controlar a parasitemia (GUTIERREZ et al., 2009). Por outro lado, a hipótese da autoimunidade sugere que os danos cardíacos, característicos da fase crônica, ocorrem devido a uma resposta imune exacerbada, promovendo uma disrupção da auto-tolerância que contribui na intensificação dessas lesões cardíacas (NARDY et al., 2015).

Na perspectiva terapêutica, apenas duas drogas estão disponíveis para o tratamento da DC, que são o benzonidazol (BZ) e o nifurtimox (NF). No entanto, essas medicações são tóxicas, pouco eficazes na fase crônica da doença, e podem apresentar efeitos

colaterais que muitas vezes levam ao abandono do tratamento. Os efeitos mais observados são erupções cutâneas, efeitos deletérios na glândula adrenal, cólon, útero e tecido mamário (COURA et al., 2002). Além dos efeitos colaterais, também são observados mecanismos de resistência parasitária às drogas convencionais (CAMPOS et al., 2014).

Devido a essas limitações, faz-se necessária a busca de novos agentes terapêuticos para a DC, que sejam eficazes contra o parasito, e sem efeitos colaterais graves (TORRICO et al., 2018). Nesse contexto, as microalgas podem ser promissoras na prospecção de compostos com ação tripanocida, devido à variedade de metabólitos que produzem, com vasta aplicação biotecnológica, mais precisamente no setor farmacêutico (PRADHAN et al., 2012). Dentre as atividades biológicas das microalgas, destacam-se as antibacterianas, antioxidantes, anti-inflamatórias, antifúngicas, imunomoduladoras e antiparasitárias (MANIRAFASHA et al., 2016; MELO et al., 2023; SILVA-JÚNIOR et al., 2023), que podem ser atribuídas a compostos como pigmentos, lipídeos, polissacarídeos e proteínas (WANG et al., 2021).

Microalgas como *Chlorella vulgaris* e *Tetrademus obliquus* possuem elevado teor proteico em suas biomassas. Dependendo das condições de cultivo, as biomassas de *C. vulgaris* e *T. obliquus* podem corresponder a 58% e 72% de proteínas, respectivamente (KUMAR et al., 2017), e alguns estudos reportam que proteínas como a Concanavalina A (CoA), apresentam efeitos letais ao gênero *Trypanosoma* (SERRANO et al., 2005). Logo, o desenvolvimento de abordagens terapêuticas para a DC através de proteínas oriundas de microalgas precisa ser melhor explorado, visto que estudos a respeito da atividade tripanocida desses microrganismos ainda são escassos.

1.1. OBJETIVOS

1.1.2. OBJETIVO GERAL

- Investigar a ação tripanocida e imunomoduladora de extratos aquosos e proteicos oriundos da biomassa de *Chlorella vulgaris* e *Tetrademus obliquus*.

1.1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a ação citotóxica dos extratos de *C. vulgaris* e *T. obliquus* em células mononucleares de sangue periférico (PBMC);

- Analisar a atividade tripanocida dos extratos frente a formas tripomastigotas de *T. cruzi*;
- Determinar o extrato mais seletivo contra *T. cruzi*;
- Avaliar a ação imunomoduladora dos extratos, no que diz respeito à expressão das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 em PBMC infectadas ou não por *T. cruzi*;
- Purificar proteína a partir do extrato com maior potencial anti-*T. cruzi*;
- Avaliar a ação citotóxica da proteína purificada em PBMC;
- Determinar a atividade tripanocida da proteína purificada.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. DOENÇA DE CHAGAS: MECANISMOS DE INFECÇÃO DO AGENTE ETIOLÓGICO E PATOGÊNESE

O agente etiológico da DC é o *Trypanosoma cruzi*, protozoário hemoflagelado, da ordem Kinetoplastida, que foi identificado pela primeira vez pelo médico brasileiro Carlos Chagas, no ano de 1909 (NEVES, 2005). A OMS estima que a doença afeta aproximadamente 8 milhões de pessoas no mundo inteiro, atingindo, em maioria, países da América Latina (WHO, 2020). O parasito é transmitido a seres humanos e demais vertebrados pela ação vetorial, através de insetos triatomíneos, sendo possível, também, a transmissão por ingestão de alimentos contaminados, transfusão sanguínea, transplante de órgãos, ou ainda de forma congênita (PÉREZ- MOLINA; MOLINA, 2017).

Conforme demonstrado na **figura 1**, o ciclo de vida do *T. cruzi* é heteroxeno, ou seja, apresenta fases distintas em hospedeiros distintos.

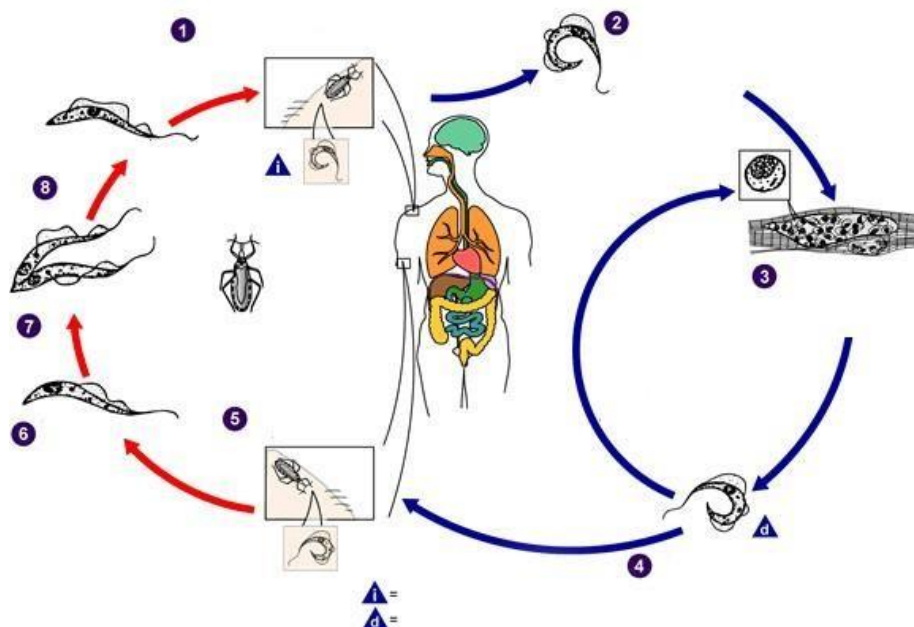


Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Adaptado de <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>. 1. Inicialmente, durante o repasto sanguíneo, o parasito urina e defeca no local da picada. Fezes/urina contêm a forma tripomastigota metacíclica (infectante), e estas penetram no hospedeiro através de feridas ou mucosas. 2. Ao caírem na corrente sanguínea, os tripomastigotas invadem as células hospedeiras e se convertem em amastigota. 3. Os amastigotas se multiplicam por divisão binária. 4. Amastigotas intracelulares se convertem em tripomastigotas, rompem a célula e caem novamente na corrente sanguínea, infectando outras células ou continuando o ciclo. 5. Os triatomíneos realizam o repasto sanguíneo e ingerem formas tripomastigotas. 6. No intestino grosso dos triatomíneos, tripomastigotas se convertem em epimastigotas. 7. Epimastigotas se multiplicam no trato gastrointestinal. 8. Epimastigotas se convertem em tripomastigotas e são eliminados nas fezes ou urina.

Existem três formas evolutivas nas quais o parasito pode se encontrar. São elas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas, conforme demonstrado na **figura 2**.

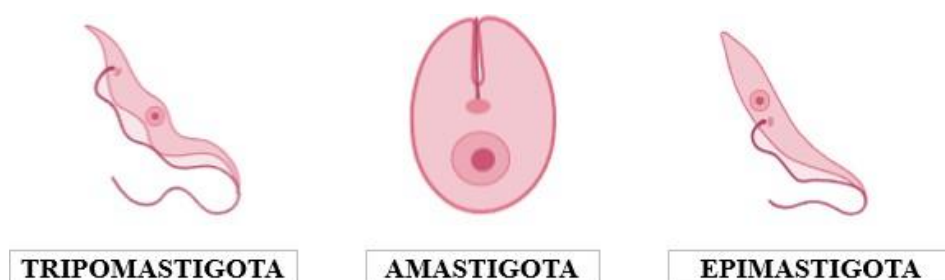


Figura 2. Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: Fonte: Acervo pessoal do autor, BioRender..

Formas epimastigotas são encontradas no intestino médio do vetor, que é o *Triatoma infestans*; tripomastigotas estão presentes nos vertebrados durante as fases infecciosas e não proliferativas; enquanto amastigotas estão presentes no meio intracelular, também no hospedeiro vertebrado. Durante o ciclo, o parasito sofre alterações em sua morfologia, metabolismo e expressão gênica, à medida em que passa do estágio replicativo epimastigota para a forma tripomastigota metacíclica, que infecta seres humanos (GONÇALVES et al., 2018).

O processo de diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos é conhecido como metaciclogênese. Ocorre no intestino médio do triatomíneo, e os tripomastigotas são liberados durante a excreção, enquanto o vetor realiza o respasto sanguíneo (GARCIA et al., 1991; KLEFFMA et al., 1997). Os fatores que ocasionam a metaciclogênese ainda são desconhecidos, mas estudos anteriores relatam que a carência nutricional, adenosina 3,5-monofosfato cíclico (AMP cíclico) e adenilato ciclase são alguns dos elementos essenciais para a ocorrência da metaciclogênese (GONZALES-PREDOMO et al., 1988).

Durante a internalização, a interação entre *T. cruzi* e as células hospedeiras é dividida em duas etapas distintas. São elas a adesão, que inclui reconhecimento e sinalização; e internalização, processo complexo que envolve diferentes vias, semelhantes a mecanismos endocíticos (de SOUZA et al., 2010). A endocitose é iniciada quando há o reconhecimento entre moléculas presentes na superfície celular do hospedeiro e o produto a ser internalizado, que é o *T. cruzi* (SIBLEY et al., 2000). Alguns receptores de superfície celular do hospedeiro, como carboidratos contendo resíduos de galactosil, manosil e sialil,

assim como lectinas, se ligam a carboidratos de superfície do parasito, facilitando a sua internalização (ALVES et al., 2008). Por outro lado, moléculas como citoqueratina 18, fibronectina, laminina e integrinas também podem atuar como receptoras de *T. cruzi*, interagindo com receptores de superfície do parasito, como o Tc85, facilitando a interação parasito-hospedeiro (CLASER et al., 2008).

2.1.2. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO

Clinicamente, a doença de Chagas é classificada em duas fases, aguda e crônica, conforme demonstrado na **figura 3**.

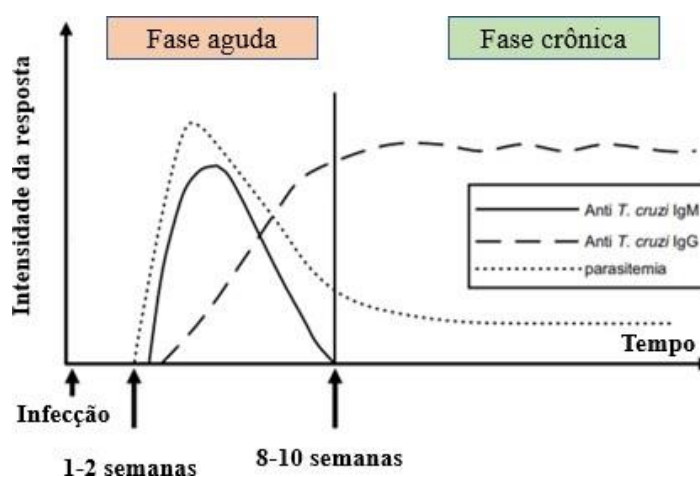


Figura 3. Evolução sorológica e parasitológica da doença de Chagas em pacientes não tratados. Fonte: acervo pessoal do autor, adaptado de Rassi et al. (2012).

A primeira é assintomática em 97% dos casos, durando, em média, de 4 a 8 semanas, e os sintomas que aparecem em 3% desses pacientes são bastante inespecíficos, como febre, náuseas e quadros de hepatoesplenomegalia (ZINGALES et al., 2018). Conforme demonstrado na figura 3, a fase aguda da DC é caracterizada por uma elevada parasitemia, com altos níveis de anticorpos IgM (Imunoglobulina M) anti-*T. cruzi*. 70% dos infectados, após a fase aguda, desenvolvem a forma crônica, na qual os índices da imunoglobulina G (IgG) anti-*T. cruzi* atingem seus níveis máximos. A fase aguda pode ser indeterminada ou sintomática, nesta última quando 30% desses indivíduos poderão apresentar lesões irreversíveis no tecido cardíaco, desenvolvendo a cardiomiopatia

chagásica (SIMÕES et al., 2018).

Modelos experimentais em camundongos infectados por *T. cruzi* demonstram que o sistema imune desempenha um papel essencial no curso da infecção, induzindo uma forte resposta inata e adaptativa. A transição da fase aguda para a fase crônica é caracterizada pela redução da parasitemia sanguínea, e são observados vários mecanismos que regulam o processo inflamatório no curso da infecção (DUTRA et al., 2014). Diversas células atuam no controle da infecção, como macrófagos, células Natural Killers (NKs), linfócitos B e T, além do sistema complemento, conforme ilustrado na **figura 4**.

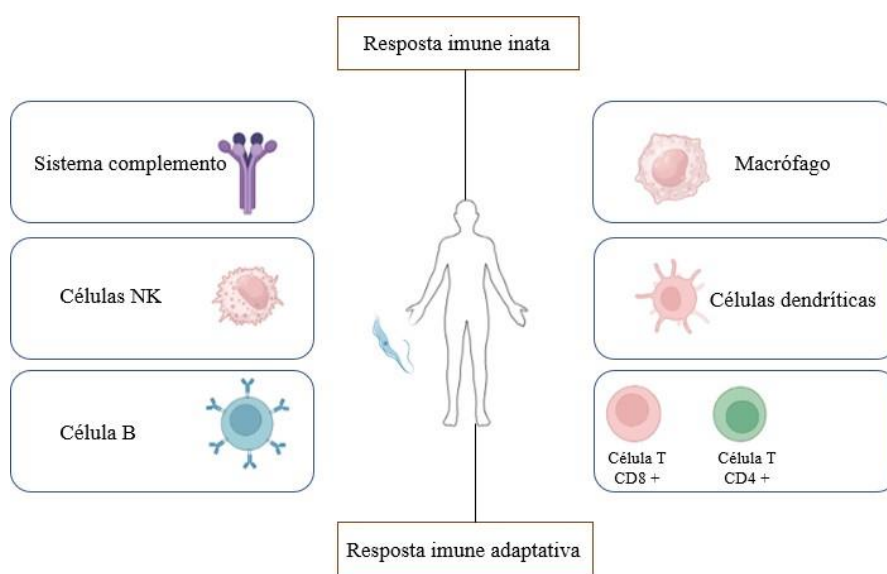


Figura 4. Recrutamento de células de defesa no curso da infecção por *T. cruzi*.

Fonte: Acervo pessoal do autor, BioRender.

As células fagocíticas, como macrófagos, neutrófilos e NK, são a primeira linha de defesa contra patógenos. Macrófagos induzem à secreção da IL-12, com potencial inflamatório, e expressam receptores de membrana que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs), o que permite a detecção e fagocitose de microrganismos (DUTRA et al., 2014). No caso da infecção por *T. cruzi*, existem receptores importantes no reconhecimento do parasito pelo sistema imune do hospedeiro. São eles os *Toll like* (TLRs), denominados TLR1, - 2, - 4, -5 e -6, encontrados na superfície celular, e TLR3, -7, - 8 e - 9, expressos nos compartimentos intracelulares (CHEN et al., 2011).

Em relação à resposta inata, as células NK desempenham um papel essencial no controle do processo infeccioso por *T. cruzi*. Quando ativadas, mediante a expressão de IL-2 (NIHEI et al., 2021), as NK ativam a produção de IFN- γ , ocasionando o recrutamento de macrófagos e estímulo da diferenciação de células T virgens, caracterizando o perfil de resposta Th1 (ACEVEDO et al., 2018). Os efeitos moduladores e citotóxicos das NK são regulados pela expressão de algumas citocinas da resposta imune inata, como IL-12, IL-15, IL-18 e IFN- γ . Por outro lado, modelos experimentais em camundongos relatam que a redução da expressão de IFN- γ e aumento da expressão da interleucina-10 (IL-10) resultam na tolerância imunológica ao *T. cruzi* (CARDILLO et al., 1996). A IL-10 é considerada uma das citocinas anti-inflamatórias mais potentes, sendo detectada desde os estágios iniciais até a fase tardia de pacientes chagásicos na fase crônica (DUTRA et al., 2000; VITELLI-AVELAR et al., 2008).

Vale ressaltar que durante a resposta inata, o sistema complemento também desempenha um papel crucial na defesa do hospedeiro contra o *T. cruzi*. O sistema complemento envolve mais de 35 proteínas receptoras e reguladoras da membrana celular, ativadas por três vias, que são a clássica, lectina e alternativa, ocasionando fagocitose e lise do patógeno (RICKLIN et al., 2010). Ainda assim, o parasita utiliza uma série de eventos para escapar da lise imediata do complemento. Estudos demonstram que o *T. cruzi* expressa moléculas que interferem na iniciação das três vias, mediante o comprometimento da montagem de C3 convertase, proteína essencial para ativar o complemento (LIDANI et al., 2017).

Durante a resposta adaptativa, vale destacar o papel de células B e T. As células B atuam na produção de anticorpos na resposta humoral, e alguns desses anticorpos permitem a lise direta dos parasitos através do bloqueio da evasão do complemento (ACEVEDO et al., 2018). Esses anticorpos também secretam proteínas como mucinas (TcMUC), proteínas de superfície (MASPs), tubulina, hsp70, proteína de haste paraflagelar (TcPRP), e glicoproteína gp82, que também auxiliam na lise do parasito, visto que reconhecem alguns antígenos do *T. cruzi*, como T-DAF, uma proteína de superfície com 90 kDA, glicoproteínas do tipo mucina e gp190 (KRAUTZ et al., 2000).

É importante destacar que os anticorpos produzidos contra *T. cruzi* também não eliminam efetivamente o parasito, havendo a possibilidade de ser estabelecida uma infecção permanente. Isso ocorre devido a três fatores. O primeiro deles é a variabilidade antigênica, visto que o *T. cruzi* expõe uma variedade de antígenos em sua superfície, como

mucinas, trans-sialidases e MASPs, que atrasam a ativação de clones da célula B, assim como a maturação de anticorpos neutralizantes (CARDOSO et al., 2016).

O segundo fator consiste na redução de células B imaturas na medula óssea, provavelmente devido a um aumento significativo da taxa de apoptose. Estudos relatam que o *T. cruzi* também pode comprometer toda a resposta humoral através da limitação da geração de células B maduras na periferia (ZUNIGA et al., 2005). O terceiro fator é a ativação de células B policlonais não específicas, demonstrado em experimentos com camundongos, onde foram observados processos como esplenomegalia e hipergamaglobulinemia associada à produção de anticorpos específicos para *T. cruzi* (BONNEY et al., 2015).

A resposta mediada por células T é iniciada por meio de sinais produzidos pelo reconhecimento de complexos pepídeo-MHC (Complexo maior de histocompatibilidade) na superfície de células apresentadoras de antígeno (APCs) pelo receptor de célula T (TCR). No contexto da fase aguda da DC, as células T se diferenciam em células T_E, aumentando a expressão de CD40L e CD25, que estimulam a maturação de macrófagos para auxiliar nas funções da célula B e expressão de IL-2, respectivamente (ACEVEDO et al., 2018). Em pacientes crônicos, as células T exercem a função de manter a parasitemia reduzida (SARTORI et al., 2003), mas devem ser expressas regularmente, visto que o excesso de secreção dessas células pode ocasionar uma resposta exacerbada, causando danos teciduais e sintomas característicos da fase crônica da DC (TEIXEIRA et al., 2006). O balanço imunológico da DC, no que diz respeito à expressão de citocinas, está descrito na **figura 5**.

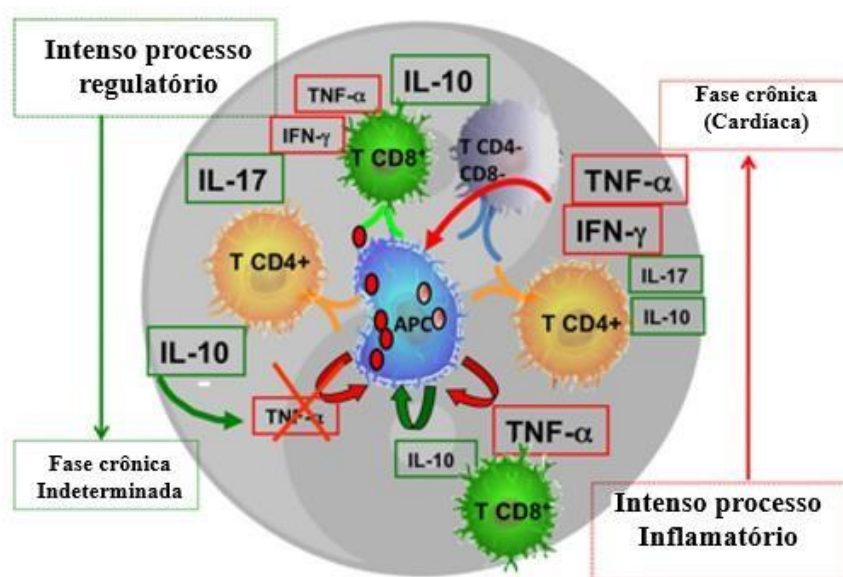


Figura 5. Expressão de citocinas no curso da infecção por *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: acervo pessoal do autor. Adaptado de Dutra et al. (2014).

Em relação ao perfil de expressão de citocinas, é importante ressaltar a importância do $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IFN-}\gamma$, que ativam macrófagos para atuar contra os parasitas intracelulares. No entanto, por serem estimuladoras do processo inflamatório, devem ser controladas para evitar danos teciduais e progressão da doença, e a IL-10 se mostra interessante no mantimento do balanço imunológico. Vale ressaltar que a IL-10 está expressa em pacientes crônicos indeterminados, sugerindo que também previne a progressão da doença para a fase crônica sintomática (Dutra et al., 2014).

Apesar de não completamente elucidados, esses mecanismos imunológicos associados ao controle de infecções ocasionadas por *T. cruzi* são essenciais para o desenvolvimento de novas terapias para a DC, já que o atual tratamento possui uma série de limitações. Um medicamento antichagásico deve atender a uma série de critérios, incluindo baixa toxicidade, efetividade em baixas concentrações e que também seja capaz de controlar o processo inflamatório.

2.1.3. QUIMIOTERAPIA CONVENCIONAL DA DOENÇA DE CHAGAS

Atualmente, duas medicações estão disponíveis para o tratamento de pacientes chagásicos, que são o benzonidazol - BZ (**Figura 6**) e o nifutrimox- NF (**Figura 7**). No entanto, essas drogas são tóxicas e estudos relatam que ambas são pouco eficazes na fase

crônica da doença (LUIZA; SILVA, 2016). No Brasil, o BZ é preferencialmente utilizado por ser menos tóxico que o NF, sendo comercializado em comprimidos de 100 mg. Em pacientes agudos, o tratamento dura, em média, 60 dias, sendo recomendada uma dose diária de 10 mg/kg por dia em adultos e crianças. Já em pacientes crônicos, recomenda-se 5 mg/kg, também durante 60 dias.

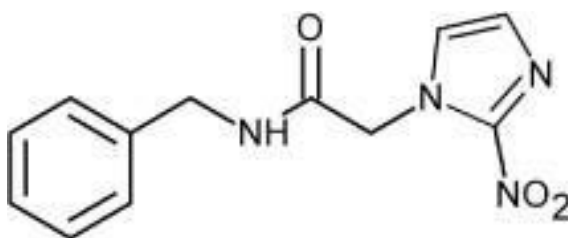


Figura 6. Estrutura química do benzonidazol. Fonte: Acervo pessoal do autor, ChemDraw.

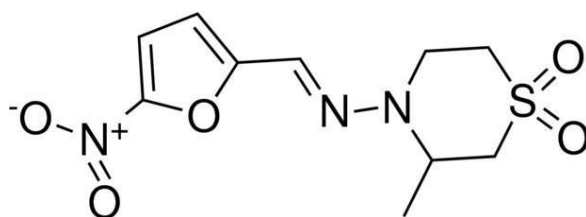


Figura 7. Estrutura química do nifutrimox. Fonte: Acervo pessoal do autor, ChemDraw.

Em relação ao mecanismo de ação, o BZ promove uma redução da síntese proteica, assim como a incorporação dos percursores de RNA e incorporação da timidina em moléculas de DNA (RODRIGUES & CASTRO, 2002). O NF, por outro lado, age diretamente nos amastigotas intracelulares, e compromete a viabilidade parasitária através da detoxificação parametabólica do oxigênio (BERNARDES et al. 2006).

Alguns efeitos colaterais são observados pelo uso do BZ, sendo a dermatite presente em 30% dos casos; Polineuropatia, leucopenia, alterações hepáticas e agranulocitose acontecem com menor frequência, mas há relatos de abandono do tratamento devido a esses efeitos colaterais (ANDRADE et al., 2011; MACHADO et al., 2013).

O BZ também não se mostrou eficaz em pacientes portadores da cardiomiopatia

chagásica (Morillo et al. (2015), e foi demonstrado experimentalmente que tanto o BZ quanto o NF apresentam efeitos neurotóxicos, efeitos deletérios na adrenal, cólon e em tecidos mamários, além de serem potencialmente carcinogênicos (SALAS et al., 2011). Outros estudos também reportam que o *T. cruzi* desenvolve mecanismos de resistência ao BZ (CAMPOS et al., 2014; ZINGALES et al., 2014). Portanto, a busca por novos alvos terapêuticos para a DC é necessária.

Em 1997, A OMS estabeleceu, em uma série de critérios de qualidade para os novos fármacos antichagásicos. São eles: cura parasitológica nas duas fases da doença, efetividade em baixas concentrações, baixo custo, ausência de efeitos colaterais significativos, não oferecer mecanismos de resistência por parte do parasito, dentre outros (SILVA et al., 2012). Levando em consideração as limitações do BZ e NF, principalmente em relação aos efeitos citotóxicos e resistência parasitária (BOIANI et al., 2010), são descritos, na literatura, a ação tripanocida de extratos vegetais, compostos sintéticos e/ou naturais.

2.2. NOVAS PERSPECTIVAS TERAPÊUTICAS PARA A DOENÇA DE CHAGAS

2.2.1 AÇÃO TRIPANOCIDA DE COMPOSTOS SINTÉTICOS

Nos últimos anos, a síntese orgânica evoluiu consideravelmente, ocasionando o surgimento de novos compostos sintéticos para aplicação na indústria farmacêutica (SANGI, 2016). Em relação a compostos com atividade tripanocida, a licarina A e seus derivados semi-sintéticos se mostraram efetivos frente a formas tripomastigotas de *T. cruzi* (MELETI et al., 2020); assim como compostos do tipo cromano e acetofenonas foram promissores em ensaios in vitro contra formas resistentes do *T. cruzi* (GONZÁLEZ et al., 2021).

Haroon et al. (2021) sintetizaram 27 compostos tiazolidínicos, denominados 1,3-tiazóis, através da ciclização de tiosemicarbazomas com etil bromopiruvato. Esses compostos levam à morte do *T. cruzi*, mediante estímulo de necrose e apoptose. Berzal et al. (2022) relataram que derivados do composto 5-nitroindazol se mostraram promissores nos ensaios in vitro contra *T. cruzi*. Observou-se que esses compostos são bastante seletivos contra o parasito, visto que inibem formas tripomastigotas e amastigotas sem ocasionar efeitos citotóxicos na linhagem L929 de fibroblastos.

Naftoquinonas também estão apresentando resultados promissores em ensaios anti-

T. cruzi. Uma série de naftoquinonas denominadas CG9-442, CG8-935 e CG10-248 apresentaram atividade tripanocida, em especial a CG-442, que foi a mais ativa e comprometeu a viabilidade do parasito mediante estresse oxidativo (DUBIN et al., 1990; DE WITTE et al., 2004). Nesse contexto, vale ressaltar que Rani et al. (2022) demonstraram que nanopartículas à base de goma contendo naftoquinonas induziram à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), em culturas de tripanosomatídeos. Outro estudo a respeito da ação antiparasitária de compostos quimicamente sintetizados que merece destaque é o de Paixão et al. (2019), que avaliaram a atividade antiparasitária de complexos oriundos do tenário de cobre (II) sobre formas amastigotas do *T. cruzi*. Observou-se que o composto em questão reduziu em 64% a parasitemia no pico da infecção, sendo até mais eficaz que o BZ.

2.2.2 AÇÃO TRIPANOCIDA DE EXTRATOS E COMPOSTOS NATURAIS

Os organismos vegetais, ao longo da história, sempre foram explorados na terapêutica de doenças infecciosas, devido à diversidade de metabólitos encontrados nesses seres (WATERS et al., 2010; ROESSNER, 2012). Ainda assim, estima-se que apenas 10% da biodiversidade vegetal foi investigada em relação às propriedades biológicas (NEWMAN, 2013). No contexto da DC, muitos extratos naturais estão demonstrando resultados promissores contra o *T. cruzi*, como os extratos alcóolicos da planta *Castanedia santamartensis*, que promovem o colapso da membrana mitocondrial do parasito (PERTUZ et al., 2022); extratos orgânicos da planta *Juncus acutus*, que foram letais para formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* (OLIVEIRA et al., 2016); assim como extratos etanólicos e aquosos da planta *Terminalia catappa*, que inibem a proliferação do *T. cruzi* em testes *in vitro* (ADEBUKOLA et al., 2021).

Por outro lado, as algas marinhas vem ganhando destaque na prospecção de bioprodutos com ação tripanocida. De Felício et al. (2010) relatam que frações de *n*-hexano e diclorometano de *Bostrychia tenella* (Rodophyta) se mostraram eficazes contra formas tripomastigotas de *T. cruzi*; extratos brutos de duas algas marinhas verdes (*Codium fragile* e *Ulva lactuca*) apresentaram atividade tripanocida (SPAVIERI et al., 2010); e o extrato bruto de *Dictyota* sp. inibiu em mais de 60% a viabilidade celular do *T. cruzi* nos ensaios *in vitro* (BIANCO et al., 2013).

A ação tripanocida das algas marinhas pode ser atribuída à diversidade de metabólitos secundários que esses organismos sintetizam, incluindo compostos halogenados (CABRITA et al., 2010), polissacarídeos sulfatados (BERTEAU & MULLOY, 2003), terpenos, polifenóis, alcaloides

e elatol (SANTOS et al., 2013). O mecanismo de ação desses compostos ainda não é totalmente esclarecido, porém, estudos sugerem que alguns desses compostos, como o elatol obtido da alga *Laurencia dendroidea*, podem estar envolvidos no processo de despolarização mitocondrial do parasito, assim como no aumento dos níveis do ânion superóxido (O_2^*), que pode afetar estruturas celulares, levando o *T. cruzi* à morte (SANTOS et al., 2010; DESOTI et al., 2012).

2.3. MICROALGAS: NOVAS FONTES PARA OBTENÇÃO DE COMPOSTOS TRIPANOCIDAS

Além das algas marinhas, outros organismos podem ser promissores na busca de compostos anti-*T. cruzi*: as microalgas. Estas, por sua vez, são microrganismos fotossintetizantes que podem ser encontradas em ambientes marinhos, de água doce e até nos ecossistemas terrestres (HU et al., 2008; RIZWAN et al., 2018), sendo bastante exploradas devido às diversas aplicações comerciais, como na produção de energia (biocombustíveis), tratamento de efluentes e obtenção de compostos de interesse farmacêutico (GAUTAM et al., 2013; HTET et al., 2018; MATA et al., 2010). A utilização de microalgas na prospecção de bioativos de interesse farmacêutico apresenta diversas vantagens em relação a outros organismos, e até mesmo em relação à utilização de compostos sintéticos. Esses microrganismos podem ser cultivados de forma contínua em regiões áridas e/ou improdutivas, e necessitam, basicamente, de energia solar, minerais e dióxido de carbono para estimular a produção dos metabólitos primários e secundários (**Figura 8**) (DIXON et al., 2018).

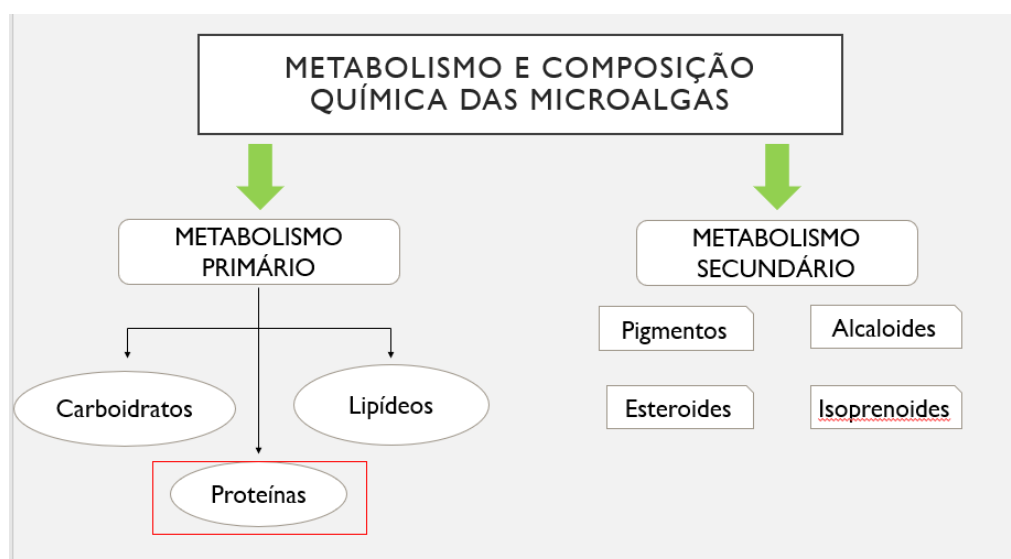


Figura 8. Produtos oriundos do metabolismo primário e secundário das microalgas. Fonte: acervo pessoal do autor.

As microalgas podem modular seu metabolismo de acordo com as alterações ambientais, produzindo metabólitos primários (proteínas, carboidratos e lipídeos) que estão diretamente relacionados ao crescimento, desenvolvimento e reprodução (VUPPALADADIYAM et al., 2018), assim como metabólitos secundários, que atuam principalmente na defesa desses microrganismos, na resposta a situações de estresse e sinalização (JEONG et al., 2020). Os principais metabólitos secundários produzidos pelas microalgas são pigmentos, alcaloides, esteroides e isoprenoides (SREENIKETHANAM et al., 2022).

Dentre as atividades biológicas atribuídas às microalgas, destacam-se: antimicrobiana, anticâncer, anti-hipertensiva e cicatrizante (SILVA-JÚNIOR et al., 2019; SILVA et al., 2021; AMORIM et al., 2022; ANDRADE et al., 2022). Apesar dessa diversidade de aplicações, as microalgas ainda são pouco exploradas quanto à prospecção de compostos tripanocidas. Na literatura, há disponível a patente BR 1020200228609, que relata o processo de formulação de um produto tripanocida à base do extrato celular da microalga *Chlorella vulgaris*. Foram adicionados amido e lactose como adjuvantes, e o produto inibiu a proliferação de formas tripomastigotas do *T. cruzi*. Silva-Júnior et al. (2023) demonstraram o potencial tripanocida de *C. vulgaris* e *T. obliquus*. Extratos aquosos obtidos pelo método de homogeneização foram letais para formas tripomastigotas de *T. cruzi* em concentrações variando de 40 a 100 µg/ml, sendo *C. vulgaris* a mais seletiva frente ao parasito (Índice de seletividade > 18).

Veas et al. (2020) avaliaram a ação tripanocida de extratos aquosos e orgânicos das espécies *Chlamydomonas reinhardtii*, *Tetraselmis suecica*, *Scenedesmus obliquus* e *Arthrospira platensis*, e foi constatado que os extratos metanólicos e etanólicos de *T. suecica* foram bastante seletivos contra tripomastigotas de *T. cruzi* (SI = 11,2 para o extrato metanólico e SI = 4,8 para o extrato etanólico).

2.3.1 *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris, microalga do filo Chlorophyta, possui células morfológicamente esféricas (**Figura 9**), com aproximadamente 2 ou 10 µm de diâmetro, e possui vários elementos estruturais semelhantes aos das plantas. A rigidez que preserva sua integridade celular é, basicamente, uma proteção contra invasores e de ambientes com condições adversas (SAFI et al., 2014). O citoplasma é composto por substâncias gelatinosas e abriga organelas celulares, a exemplo da mitocôndria. Em relação às aplicações biotecnológicas, *C. vulgaris* destaca-se devido ao rápido crescimento e sua composição bioquímica, que dificulta a invasão de agentes oportunistas (PRIBYLet al., 2013).

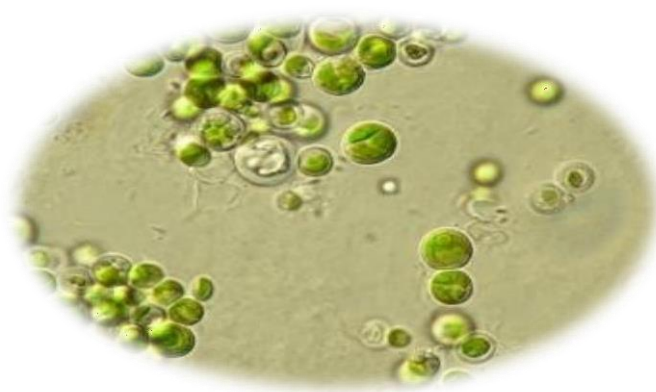


Figura 9. Morfologia da microalga *Chlorella vulgaris*.

Bioquimicamente, *C. vulgaris* é constituída essencialmente por lipídeos e proteínas, oriundos do metabolismo primário. Além disso, há a presença de íons e algumas vitaminas, todos com vasta aplicação biotecnológica. Dependendo das condições de cultivo, cerca de 42 a 58% da biomassa de *Chlorella vulgaris* pode corresponder a elementos proteicos (SEYFABADI et al., 2011).

Estudos relatam que *Chlorella vulgaris* possui eficiência em testes antitumorais, anti-inflamatórios, imunomoduladores, antioxidantes e antibacterianos (VIJAYAVEL et al., 2007). Em relação ao potencial imunomodulador, Hyrslova et al. (2021) demonstraram que *C. vulgaris* foi capaz de manter um equilíbrio na resposta imune, mediante a expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF e IFN- γ , assim como controlar o processo inflamatório através do aumento dos níveis de IL-10, sendo um

fator interessante no que diz respeito à terapia antichagásica, visto que esse balanço imunológico é importante para controlar a parasitemia e prevenir eventuais danos teciduais.

Nesse contexto, já existem, na literatura, relatos da ação antiparasitária de *C. vulgaris*. Silva-Júnior et al. (2023) testaram o extrato aquoso de *C. vulgaris* frente a formas tripomastigotas de *T. cruzi*, e Melo et al. (2023) avaliaram o potencial leishmanicida dessa microalga. O extrato de *C. vulgaris* foi consideravelmente seletivo contra *T. cruzi* (ISE > 18), e também foi letal para *Leishmania braziliensis* (ISE = 6,89), além de oferecer um efeito protetor, mediante estímulo de citocinas do perfil Th1 (TNF) em células infectadas por *L. braziliensis*.

2.3.2 *Tetrademus obliquus*

O gênero *Tetrademus* (**Figura 10**) é predominantemente encontrado entre populações planctônicas. As espécies diferem entre si pela textura da parede celular, sendo as células formadas por um cloroplasto simples, único e laminado.

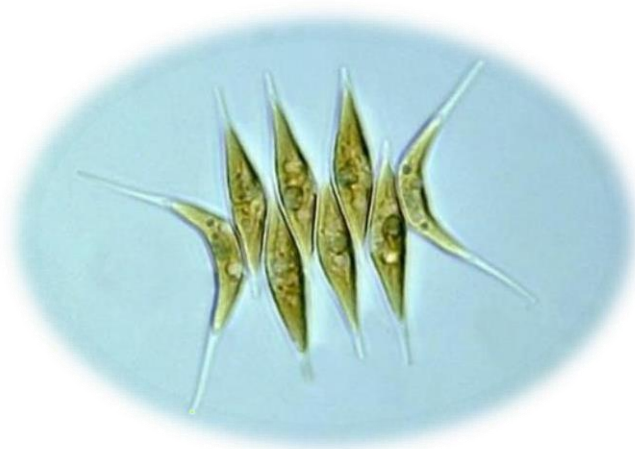


Figura 10. Morfologia de *Tetrademus obliquus*.

É uma espécie que possui alta taxa de crescimento, sendo bastante resistente a condições adversas, como elevadas temperaturas e estresse salino (OLIVEIRA et al., 2021). Pode ser cultivada em condições autotróficas e heterotróficas (SHEN et al., 2018), sendo o autotrófico o mais comum, por ser um método de produção em larga escala. Pela fotossíntese, ocorre a conversão de energia luminosa em energia química, na qual compostos como adenosina trifosfato (ATP) e nicotinamida e adenina

dinucleotídeo fosfato (NADPH) são conservados e subsequentemente utilizados na redução de CO₂, para a síntese de carboidratos e outros compostos orgânicos (XIA & MURPHY, 2016).

Estudos relatam que *T. obliquus* é uma espécie interessante no que diz respeito à prospecção de compostos biologicamente ativos, com aplicação em processos ambientais, como na produção de biodiesel e biorremediação, assim como na prospecção de biomoléculas de interesse farmacêutico (RUEN - NGAM, 2017).

Em relação à composição bioquímica de *T. obliquus*, alguns fatores interferem na produção dos metabólitos. São eles as condições de crescimento e a composição do meio de cultura (OLIVEIRA et al., 2021). Dentre os metabólitos primários produzidos por *Tetrademus* sp, destacam-se os lipídeos, carboidratos e proteínas, conforme descritos na **tabela 1** (GUEDES et al., 2011; di CAPRIO et al., 2021).

Composição bioquímica (%)	Referência
Carboidratos (10-69%)	HARUN et al. (2009); OLIVEIRA et al., (2020).
Lipídeos (10-56%)	QU et al., (2020); OLIEIRA et al., (2020).
Proteínas (19-56%)	BECKER (2007); OLIVEIRA et al., (2020).

Tabela 1. Composição bioquímica da microalga *Tetrademus obliquus*. Fonte: acervo pessoal do autor, adaptado de Oliveira et al. (2021).

Em relação às proteínas, é importante ressaltar que as algas, em geral, são responsáveis pela biossíntese de aminoácidos essenciais nos ambientes aquáticos, que são tradicionalmente explorados e utilizados na indústria de alimentos (GARCÍA et al., 2012). Na literatura, são descritos, aproximadamente, 17 alfa-aminoácidos presentes em *T. obliquus*, e o glutamato pode corresponder à maioria da composição desses aminoácidos, conforme descrito na **tabela 2**.

Aminoácido	Polaridade	Classificação	Composição – g/100 g de biomassa
Alanina	Apolar	Não essencial	4,8 a 5,14
Arginina	Básico polar	Não essencial	3,85 a 6,4
Ácido aspártico	Ácido polar	Não essencial	6,99 a 9,9
Cistina	Apolar	Não essencial	0,08 a 0,6
Glutamato	Polar	Não essencial	6,01 a 10,8
Glicina	Apolar	Não essencial	2,92 a 5,8
Histidina	Básico polar	Essencial	1,86 a 2,9
Isoleucina	Apolar	Essencial	4,1 a 4,97
Leucina	Apolar	Essencial	5,44 a 8,5
Lisina	Básico polar	Essencial	4,24 a 7,4
Metionina	Apolar	Essencial	1,2 a 2,2
Fenilalanina	Apolar	Essencial	3,12 a 6,5
Prolina	Apolar	Não essencial	3,28 a 4,1
Serina	Polar	Não essencial	2,72 a 3,2
Treonina	Polar	Essencial	2,95 a 3,2
Tirosina	Polar	Não essencial	2,07 a 3,1
Valina	Apolar	Essencial	3,2 a 3,91

Tabela 2. Perfil de aminoácidos de *Tetrademus obliquus*. Fonte: adaptado de Oliveira et al. (2021).

Muitos hidrolisados proteicos de *T. obliquus*, em especial os constituídos por papaína e tirosina, apresentam propriedades farmacêuticas, como antioxidantes e antivirais, e nesse contexto, Afify et al. (2018) avaliaram a ação antiviral e antioxidante de proteínas obtidas de *T. obliquus*, sendo essas submetidas a hidrólise por 3 enzimas.

As proteínas hidrolisadas pela papaína e tripsina induziram ação oxidante baseada em DPPH e ABTS, respectivamente, a 150 µg/mL. Já as que foram hidrolisadas por papaína e pepsina, a 100 µg/mL, apresentaram atividade antiviral (CBV₃) com inibição de 66,2% e 57,6%, respectivamente.

Em relação às propriedades antimicrobianas, Ishaq et al. (2015) avaliaram a atividade antibacteriana de pigmentos extraídos da biomassa de *Scenedesmus* sp. frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Salmonella* sp. (ATCC 14028). O extrato foi eficaz nos ensaios com *Staphylococcus aureus*, apresentando Concentração Inibitória Mínima (CIM) a 0,08 mg/ml. Estudos realizados por Habibi et al. (2018) demonstraram a ação antibacteriana de vários extratos orgânicos obtidos da microalga *Scenedesmus dimorphus*, sendo etanol, metanol, *n*-hexano e éter dietílico os solventes utilizados no processo de extração. Constatou-se que em todos os métodos utilizados, a microalga foi eficaz em testes frente a isolados Gram-positivos (*Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus*) e Gram-negativos (*Aeromonas hydrophila* e *Escherichia coli*). Técnicas de cromatografia gasosa (GC) atribuem a ação bactericida dos extratos de *S. dimorphus* a compostos como terpenos, hidrocarbonetos e ésteres.

Muitos desses compostos presentes em microalgas, no geral, já foram previamente descritos em ensaios antiparasitários, e podem ser alternativas no que diz respeito a novos alvos terapêuticos para a DC.

2.3.3 POSSÍVEIS COMPOSTOS TRIPANOCIDAS PRESENTES NA BIOMASSA DE MICROALGAS

Estudos prévios demonstram a presença de taninos, fenóis, terpenos, saponinas e alcaloides em extratos aquosos e orgânicos de *T. obliquus* (BHUVANA et al., 2018; ABDU et al., 2019; FERREIRA et al., 2022). No geral, esses compostos agem no *T. cruzi* através da modificação de estruturas celulares, assim como na redução da expressão de metabólitos essenciais do parasito. Fenóis promovem o colapso da membrana mitocondrial (PAIVA et al., 2018), alcaloides inibem a síntese de DNA (GARRO et al., 2010), terpenos reduzem a expressão de acetato e succinato, essenciais no metabolismo do *T. cruzi*, e saponinas inibem a produção da tirosina quinase, proteína presente nos estágios replicativos do parasito (MACIAS et al., 2012).

Em relação às proteínas, Cavalcanti et al. (2021) e Silva et al. (2019) purificaram e caracterizaram, bioquimicamente, lectinas a partir dos extratos aquosos de *C. vulgaris* e

T. obliquus, respectivamente. Lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos, e já existem relatos de lectinas, como a concavalina A, obtida de *Canavalia ensiformis*, que comprometem o metabolismo dos tripanosomatídeos através do ataque à porção N-glicano da superfície do parasita (SERRANO et al., 2000). Levando em consideração as atividades biológicas descritas a partir de microalgas, tais como antiparasitária e imunomoduladora, esses organismos representam alternativas viáveis para a terapia chagásica, devendo serem melhor investigados quanto aos ensaios in vitro, in vivo, princípio ativo e mecanismo de ação.

REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, Gonzalo R.; GIRARD, Magalí C.; GÓMEZ, Karina A. The unsolved jigsaw puzzle of the immune response in Chagas disease. *Frontiers in immunology*, v. 9, p. 1929, 2018.
- AFIFY, A.E.M.R.; BAROTY, G.S.; BAZ, F.K.L.; BAKY, H.H.A.E.; MURAD, S.A. *Scenedesmus obliquus*: Antioxidant and antiviral activity of proteins hydrolyzed by three enzymes. *Journal of Genetic Engenniering and Biotechnology*, v. 16, n. 2, p. 399-408, 2018.
- ALVES, M.J.; COLLI, W. Role of the gp85/trans-sialidase superfamily of glycoproteins in the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host structures. *Subcellular Biochemistry*. v. 47, p. 58-69, 2008.
- AMORIM, A.P.; SILVA, G.H.; BRANDÃO, R.M.P.; PORTO, A.L.F., BEZERRA, RP. Algae as a source of peptides inhibitors of the angiotensin-converting enzyme: a systematic review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. v. 94, n. 2, p. 1-14, 2022.
- ANDRADE, A.F.; PORTO, A.L.F.; BEZERRA, R.P. Photosynthetic microorganisms and their bioactive molecules as new product to healing wounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 106, n. 2, p. 497-504, 2022.
- ANDRADE, J. P. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Latino Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, v. 97, p. 1–48.
- BECKER, E.W. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, v. 25, p. 207-210, 2007.
- BERNARDES, L.S. C.; KATO, M.J.; ALBUQUERQUE, S.; CARVALHO, I. Synthesis and trypanocidal activity of 1,4- bis(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-1,4- butanediol and 1,4-bis-(3,4 dimethoxyphenyl)-1,4-butanediol. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*, v.14, p. 7075-7082.

BERZAL, C.F.; ESCRIBANO, A.I.; CASTRO, S.; ESCARIO, J.A.; BARRIO, A.G.; ARÁN, V.J. 5-Nitroindazole-based-compounds: further studies for activity optimization as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Acta Tropica*. 2022.

BOIANI, M.; PIACENZA, L.; HERNANDEZ, P.; BOIANI, L.; CERECETTO, H.; GONZALEZ, M.; DENICOLA, A. Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina, *Biochemical Pharmacology*, v. 79, p. 1736-1745, 2010.

BONNEY, K.M.; TAYLOR, J.M.; THORP, E.B. et al. Depletion of regulatory T cells decreases cardiac parasitosis and inflammation in experimental Chagas disease. *Parasitology Research*. p. 1167–78, 2015.

BONNEY, K.M.; LUTHRINGER, D.J.; KIM, S.A.; GARG, N.J.; ENGMAN, D.M.; Pathology and pathogenesis of Chagas hearth disease. *Annual Reviews*. v. 14. p. 421-47, 2019.

CAMPOS, M.C.; LEON, L.L.; TAYLOR, M.C.; KELLY, J.M. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: Evidence that distinct mechanisms can act in concert. *Molecular Biochemistry Parasitology*. v. 193, p. 17–19, 2014.

CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J.; C., REED, S. G., AND SILVA, J. S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice by Gamma Interferon and Interleukin 10: Role of NK Cells. *Infection and Immunity*, v. 64, n. 1, p. 128–134, 1996.

CARDOSO, M.S.; REIS-CUNHA, J.L.; BARTHOLOMEU, D.C. Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. *Frontiers in Immunology*. v. 6, p. 1-15, 2016.

CHEN, K.; XIANG, Y.; YAO, X.; LIU, Y.; GONG, W.; YOSHIMURA, T. et al. The active contribution of Toll-like receptors to allergic airway inflammation. *International Immunopharmacology*. v. 11, p. 1391-98, 2011.

CLASER, C.; CURCIO, M.; MELLO, S.M.; SILVEIRA, E.V.; MONTEIRO, H.P.; RODRIGUES, M.M. Silencing cytokeraatin 18 gene inhibits intracellular replication of *Trypanosoma cruzi* in HeLa cells but not binding and invasion of trypanosomes. *BMC Molecular and Cell Biology*, p. 9-68, 2008.

COURA, J. R. Chagas Disease: what is known and what is needed – A background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 102, p. 113-122, 2007.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T.M.; BARRIAS, E.S. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. *International Journal of Cellular Biology*, 2010.

DIXON, C.; WILKEN, L. Green microalgae biomolecule separations and recovery. *Bioresources and Bioprocessing*. v. 5, n. 14, 2018.

DUTRA, W.O.; COLLEY, D.G.; PINTO-DIAS, J.C. et al. Self and nonself stimulatory molecules induce preferential expansion of CD5+ B cells or activated T cells of chagasic patients, respectively. *Scandinavian Journal of Immunology*. v. 51, p. 91-97, 2000.

DUTRA, W. O., MENEZES, C. A., MAGALHÃES, L. M., & GOLLOB, K. J. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite immunology*. v. 36, n. 8, p. 377-387, 2014.

GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitology Today*. v. 7, p. 240–4, 1991.

GAUTAM, K., PAREEK, A., AND SHARMA, D. K. Biochemical composition of green alga *Chlorella minutissima* in mixotrophic cultures under the effect of different carbon sources. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. v.116, p.624-627, 2013.

GONÇALVES, C.S.; ÁVILA, A.R.; SOUZA, W.; MOTTA, M.C.; CAVALCANTI, D.P. Revisiting *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: morphological and ultrastructural analysis during cell differentiation. *Parasites & Vectors*. v. 11, p. 1-14, 2018.

GONZÁLEZ, L.A.; ROBLEDO, S.; UPEGUI, Y.; ESCOBAR, G.; QUIÑONES, W. Synthesis and Evaluation of trypanocidal activity of Chromane-type compounds and acetophenones. *Molecules*. v. 23, p. 1-11, 2021.

GONZALES-PERDOMO, M.; ROMERO, P.; GOLDENBERG, S. Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Experimental Parasitology*. v. 66, p. 205–12, 1988.

GUTIERREZ, F.R.S.; GUEDES, P.M.M.; GAZZINELLI, R.T.; SILVA, J.S. “The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease,” *Parasite Immunology*, v. 31, n. 11, p. 673–685, 2009.

HARUN, R.; DANQUAH, M.K.; FORDE, G.M. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. v. 85, p. 199-203, 2009.

HAROON, M.; DIAS, M.B.; SANTOS, A.C.S. et al. The design, synthesis, and in vitro trypanocidal and leishmanicidal activities of 1,3-thiazole and 4-thiazolidine ester derivatives. *Royal Society of Chemistry*. n. 11, p. 1-14, 2021.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant Journal* v. 54, p. 621-39, 2008.

HTET, A. N., NOGUCHI, M., NINOMIYA, K., TSUGE, Y., KURODA, K., KAJITA, S., MASAI, E., KATAYAMA, Y., SHIKINAKA, K., OTSUKA, Y., and other 3 authors. Application of microalgae hydrolysate as a fermentation medium for microbial production of 2- pyrone 4, 6-dicarboxylic acid, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.125, p.717-722, 2018.

JEONG, G.T.; KIM, S.O.; OH, B.K. Production of fermentable sugars from *Chlorella* sp. by solid-acid catalyst. *Algal Research*. v. 51, p. 1-7, 2020.

KLEFFMAN, T.; SCHMIDT, J.; SCHAUB, G.A. Attachment of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes to hydrophobic substrates and use of this property to separate stages and promote metacyclogenesis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. v. 45, p.548–55, 1998.

KRAUTZ, G.M.; KISSINGER, J.C., KRETTLI, A.U. The targets of the lytic antibody response against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*. n. 16, p. 31–34, 2000.

KUMAR, S.P.; DINESHKUMAR, R.; JAYASINGAM, P. Cultivation and chemical composition of microalgae *Chlorella vulgaris* and its antibacterial activity against human pathogens. *Aquaculture & Marine Biology*. v. 5, n. 3, p. 1-7, 2017.

LIDANI, K.C.F.; BAVIA, L.; AMBROSIO, A.R.; MESSIAS-REASON, I.J. The complement system: a prey of *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Microbiology*. v. 8, p. 1-14, 2017.

LINHARES-LACERDA L.; GRANATO A.; GOMES-NETO JF.; CONDE L, FREIRE-DE-LIMA L, et al. Circulating plasma microRNA-208a as potential biomarker of chronic indeterminate phase of Chagas disease. *Frontiers in Microbiology*. v. 9, 2018.

LUIZA, A.; SILVA, S. Tecnologias que empregam fármacos antiparasitários para tratamento da doença Chagas, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2016.

MACHADO, A. G. F.; DINIZ, G. A.; MONTOYA, R. A.; DIAS, J. C.; COURA, J.R.; MACHADO-COELHO, G. L.; ALBAJAR-VIÑAS, P.; TORRES, R. M.; LANA, M. D. A serological, parasitological and clinical evaluation of untreated Chagas disease and those treated with benznidazole before and thirteen years after intervention. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, p. 873–80, 2013.

MANIRAFASHA, E.; NDIKUBWIMANA, T.; ZENG, X.; LU, Y.; JING, K. Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. *Biochemical Engineering Journal*. v. 109 p. 282-296, 2016.

MATA, T. M., MARTINS, A. A., AND CAETANO, N. S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v.14, p.217-232, 2010.

MELO, M.G.N.; REINO, I.B.S.M.; ANTÃO, V.V.; SILVA, J.M.; SILVA-JÚNIOR, J.N.; ANDRADE et al. *Chlorella vulgaris* extract and imiquimod as new therapeutic targets for leishmaniasis: an immunological approach. *Immunobiology*, v. 229, n. 1, p. 1-13, 2023.

MELETI, V.R.; ESPERANDIM, V.R.; FLAUZINO et al. Licarin A and its semi-synthetic derivatives: In vitro and in silico evaluation of trypanocidal and schistosomicidal activities. *Acta Tropica*. P. 1-30, 2020.

NARDY, A.F.; FREIRE de LIMA, C.G.; MORROT, A. Immune evasion strategies of *Trypanosoma cruzi*. *Hindawi Publishing Corporation*. P. 1-7, 2015.

NIHEI, J.; CARDILLO, F.; MENGEL, J. The blockade of interleukine-2 during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection reveals its dominant regulatory role. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. v. 11, p. 1-13, 2021.

OLIVEIRA, C.Y.B.; NADER, C.; SILVA, M.F.O.; FRACALOSI, D.M.; GÁLVEZ, A.O.; LOPES, R.G. Integrated use of microalgal biomass of *Choricystis minor* var. *minor*: a promising model of production of biodiesel and aquafeeds. *Biomass conversion and Biorefinery*, 2020.

OLIVEIRA, C.Y.B.; PRASAD, R.; OLIVEIRA, C.D.L.; ONG, H.C. A multidisciplinary review of *Tetrademus olbiquus*: a microalga suitable for large-scale biomass production and emerging environmental applications. *Reviews in Aquaculture*. p. 1-25, 2021.

QU, F.; JIN, W.; ZHOU, X.; WANG, M.; CHEN, C.; TU et al. Nitrogen ion beam implantation for enhanced lipid accumulation of *Scenedesmus obliquus* in municipal wastewater. *Biomass and Bioenergy*, v. 134, 2020.

PÉREZ-MOLINA, J.A.; MOLINA, I. Chagas disease. *Lancet*. p. 82-94, 2017.

PRADHAN, J.; KUMAR, B.; DAS, SAHU, S.; MARHUAL, N. P.; SWAIN, A.; K.; MISHRA, B.; K.; & EKNATH, A.; E. Traditional antibacterial activity of fresh water microalga *Spirulina platensis* to aquatic pathogens. *Aquaculture Research*. v. 43, p. 1287-1295, 2012.

RANI, R.; NARSIMAN, B.; VARMA, R.S.; KUMAR, R. Gum-based nanocapsules comprising naphthoquinones enhance the apoptotic and trypanocidal activity against *Trypanosoma evansi*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 171. p. 1-12, 2022.

RICKLIN, D.; HAJISHENGALLIS, G.; YANG, K.; LAMBRIS, J.D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Natural Immunology*, v. 11, p. 785–797, 2010.

RODRIGUES, C. J.; CASTRO, S. L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 3-24, 2002.

RIZWAN, M. et al. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 92, p. 394–404, 2018.

SALAS, C. O.; FAÚNDEZ, M.; MORELLO, A.; MAYA, J. D.; TAPIA, R., A. Natural and synthetic naphthoquinones active against *Trypanosoma cruzi*: An initial step towards new drugs for Chagas disease. *Current Medicinal Chemistry* v. 18, p. 144-161, 2011.

SANGI, D. P. Estratégias de Síntese na Descoberta de Fármacos: o emprego da síntese orientada pela diversidade estrutural. *Química Nova*. v. 39, n. 8, 2016.

SARTORI, M.J.; MEZZANO, S.; MUÑOZ, S.; FABRO, S.P. Role of placental alkaline phosphatase in the internalization of trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* into HEp 2 cells. *Tropical Medicine and International Health*. V. 8, p. 1-8, 2003.

SERRANO, A.; COLE, R.N.; ENGLUND, P.T. Killing of *Trypanosoma brucei* by concanavalin A: structural basis of resistance in glycosylation mutants. *Journal of Molecular Biology*. v. 304, p. 633-44, 2000.

SHEN, X.F.; HU, H.; MA, L.L.; LAM, P.K.S.; S.K.; YAN, ZHOU, S.B. FAMEs production from: *Scenedesmus obliquus* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures under different nitrogen conditions. *Environmental Science: Water Research & Technology*. v. 4, p. 461-468, 2018.

SIBLEY, L.D.; ANDREWS, N.W. Cell invasion by un-palatable parasites. *Traffic*. v. 1, n. 2, p. 100-6, 2000.

SILVA, F. C.; FERREIRA, S. B; da ROCHA, D. R.; FERREIRA, V.F. Chagas disease: challenges in developing new trypanocidal lead compounds. *Revista Virtual de Química*, v. 4, n. 1, p.46-72, 2012.

SILVA, M.R.O.; MOURA, Y.A.S.; CONVERTI, A.; PORTO, A.L.F.; VIANA-MARQUES, D.A.; BEZERRA, R.P. Assessment of the potential of the potential of *Dunaliella* microalgae for different biotechnological applications: A systematic review. 2021. *Algal Research*, v. 58, p. 1-14.

SILVA-JÚNIOR, J.N.; ARAÚJO, E.M.; MOTA, R.A et al. Antimicrobial activity of photosynthetic microorganisms biomass extract against bacterial isolates causing mastitis. 2019. *Journal of Dairy and Veterinary Sciences*. v. 10, n. 3, p. 1-7, 2019.

SILVA-JÚNIOR, J.N.; SILVA, A.C.; OLIVEIRA, K.K.S.; MOREIRA, L.R.; CAIRES, S.F.F.S.; SILVA et al. Green microalgae as a potential source of trypanocide compounds. *Natural Product Research*, p. 1-7, 2023.

SIMÕES, M.V.; ROMANO, M.M.D.; SCHMITD, A.; MARTINS, K.S.M.; MARINETO, J.A. Chagas disease cardiomyopathy. *International Journal of Cardiovascular Science*. v. 31, n. 2, p. 173-189, 2018.

SREENIKETHANAM, A.; RAJ, S.; BANU, R.J.; GUGULOTHU, P.; BAJHAIYA, A.K. Genetic engineering of microalgae for secondary metabolite production: recent developments, challenges, and future prospects. *Frontiers in Bioengineering Biotechnology*. v. 10, p. 1-14, 2022.

TEIXEIRA, A.R.L.; NASCIMENTO, R.J.; STURM, N.R. Evolution and pathology in Chagas disease – A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. V. 101, p. 463-491, 2006.

TORRICO, F.; GASCON, J.; ORTIZ, J.; ALONSO-VEGA, C., et al. Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Infectious Disease*. v. 18, n. 4, p. 419-430, 2018.

VITELLI-AVELAR, D.M.; SATHLER-AVELAR, R.; TEIXEIRA-CARVALHO, A. et al. Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. *Scandinavian Journal of Immunology*. v. 68, n. 5, p. 516-25, 2008.

VUPPALADADIYAM, A.K.; MERAYO, N.; BLANCO, A.; HOU, J.; DIONYSIOU, D.; ZHAO, M. Stimulation study on comparison of algal treatment to conventional biological processes for greywater treatment. *Algal Research*. v. 35, p. 106-114, 2018.

WANG, Y.; TIBBETTS, S.M.; MCGINN, P.J. Microalgae as sources of high quality protein for human food and protein supplements. *Foods*. v. 10, n. 12, p. 1-49, 2021.

XUE, Y.; LI, Y.; ZOU, X.; XU, K.; WHEN, H.; ZHANG, B. Optimization of thermal pre-flocculation treatment for effective air flotation harvesting of microalgae. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. v. 94, p. 1760-1769, 2019.

ZINGALES, B.; Miles, M.A.; Moraes, C.B.; Luquetti, A.; Guhl F.; Schijman AG.; Ribeiro, I. Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 109, p. 828–833, 2014.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica*, v. 184, p. 38–52, 2018.

ZUNIGA, E.; RODRIGUEZ, E.A.; MERINO, M.C.; MONTES, C.; GRUPPI, A.
Depletion of immature B cells during *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of myeloid cells and the cyclooxygenase pathway. *European Journal of Immunology*. v. 35, p. 1849-1858, 2005.

3. RESULTADOS

3.1. Do thiazolidine compounds act on intracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi*? A systematic review.

Os resultados descritos neste capítulo foram publicados no periódico “Research, Society and Development”.



Fator de Impacto: 1.78 (2020-21, CiteFactor).

Qualis CAPES: A3.

DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i3.26531>

José Noé da Silva Júnior^a, Priscilla Régia de Andrade Calaça^b, Yanara Alessandra Santana Moura^b, Andreza Pereira de Amorim^b, Ana Carla da Silva^c, Raquel Pedrosa Bezerra^b, Virginia Maria Barros de Lorena^c, Daniela de Araújo Viana Marques^d, Silvana de Fátima Ferreira Caires^d, Ana Lúcia Figueiredo Porto^{a, b}.

^a Instituto Keizo Asami (Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil).

^b Laboratório de Tecnologia de Bioativos, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil.

^c Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Imunologia, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Aggeu Magalhães, Recife, Brazil.

^d Laboratório de Biotecnologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Brazil.

Do thiazolidine compounds act on intracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi*? A systematic review

Compostos tiazolidínicos atuam sobre formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*? Uma revisão sistemática

Actúan los compuestos tiazolidínicos sobre los amastigotas intracelulares de *Trypanosoma cruzi*? Una revisión sistemática

Received: 02/03/2022 | Reviewed: 02/14/2022 | Accept: 02/19/2022 | Published: 02/28/2022

Resumo

O Benznidazol (Bdz) é a droga de escolha para o tratamento da doença de Chagas. No entanto, o medicamento possui vários efeitos colaterais, e o *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, pode ser menos suscetível à ação de drogas na fase crônica, devido ao seu metabolismo reduzido e dormência nos tecidos. Assim, a utilização de compostos letais às formas amastigotas, prevalentes na fase crônica da doença de Chagas, é essencial para o sucesso da terapia. Nesse contexto, propomos avaliar, através de uma revisão sistemática, a eficácia de compostos tiazóis e seus derivados imidazóis contra amastigotas intracelulares de *T. cruzi*, e comparar esses dados com a eficácia do Bdz. Scopus, Pubmed, Google Scholar, LILACS, Scielo, Trip Database e Cochrane, para coleta de estudos, sem escala de tempo. Valores de IC₅₀, efeitos citotóxicos (CC₅₀), Índice de seletividade (ISe), o mecanismo de ação de cada composto, e a duração do tratamento foram incluídos neste estudo para avaliar a eficácia de cada composto. O composto 2-iminotiazolidin-4-ona 18 foi mais eficaz que o Bdz, afetando as formas amastigotas intracelulares através de modificação estrutural no parasita, e por inibição da cruzaina, sendo considerado um composto promissor para a terapia antichagásica.

Palavras-chave: Tratamento alternativo; Drogas antichagásicas; Benznidazol; Amastigotas intracelulares; Compostos tiazolidínicos.

Resumen

El benznidazol (Bdz) es el fármaco de elección para tratar la enfermedad de Chagas. Sin embargo, el fármaco provoca varios efectos secundarios, y *Trypanosoma cruzi*, el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, puede ser menos susceptible a la acción de los fármacos en la fase crónica, debido a su metabolismo reducido y latencia en los tejidos. En ese contexto, el uso de compuestos letales para las formas de amastigote, que son frecuentes en la fase crónica de la enfermedad de Chagas, es esencial para el éxito de la terapia. Proponemos evaluar, a través de una revisión sistemática, la eficacia de compuestos tiazolidínicos y sus derivados de imidazolidínicos contra los amastigotes intracelulares de *T. cruzi*, y comparar estos datos con los de Bdz. Se realizó una búsqueda sistemática en ocho bases de datos sistemáticas en idioma inglés - Science Direct, Scopus, Pubmed, Google Scholar, LILACS, Scielo, Trip Database y Cochrane, para recolectar estudios, sin escala de tiempo. Los valores IC₅₀, los efectos citotóxicos (CC₅₀), índice de selectividad (ISe), el mecanismo de acción de cada compuesto y la duración del tratamiento se incluyeron en esta revisión para evaluar la eficacia de cada compuesto. El compuesto 2-Iminotiazolidin-4-one 18 fue más efectivo que Bdz, ya que afectó a los amastigotes intracelulares al realizar una modificación estructural en el parásito, así como inhibiendo la cruzaina, siendo un compuesto promisorio para la terapia antichagásica.

Palabras clave: Tratamiento alternativo; Fármacos antichagásicos; Benznidazole; Amastigotes intracelulares; Compuestos tiazolidínicos.

1. Introduction

Chagas disease (CD), or American trypanosomiasis, is a neglected tropical disease (NTD) caused by a hemoflagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*. The disease is endemic in 21 Latin American countries, and 6 - 7 million people in the world are infected (WHO 2020). The number of cases of CD has been increasing in North America and Europe, due to globalization (Liu et al. 2015, Requena-Méndez et al. 2015). *T. cruzi* transmission occurs congenitally, via organ transplantation, orally, due to the ingestion of parasite-contaminated food or drink, or vectorially (WHO 2018).

Clinically, CD has acute and chronic phases. The acute phase is characterized by a high parasitaemia, with circulating trypomastigotes, and is asymptomatic in most cases. The acute phase may range from being asymptomatic to a severe presentation in <1% of cases, such as fulminant myocarditis or meningoencephalitis (Yeung et al., 2020); on the other hand,

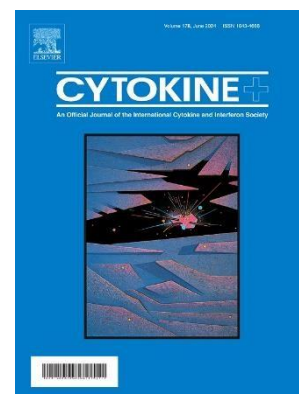
3.2. Microalgae extracts modulates the immune response in *Trypanosoma cruzi*-infected human cells.

Os resultados descritos neste capítulo foram publicados no periódico “Cytokine”.

Fator de impacto: 3.8.

Qualis CAPES: A2.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2024.156621>



José Noé da Silva Júnior^a, Kamila Kassia dos Santos Oliveira^b, Ana Carla da Silva^b, Virginia Maria Barros de Lorena^b, Daniela de Araújo Viana Marques^c, Raquel Pedrosa Bezerra^{d,*}, Ana Lúcia Figueiredo Porto^{a, d}.

^a Instituto Keizo Asami (Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

^b Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Imunologia, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Aggeu Magalhães, Recife, Brazil.

^c Laboratório de Biotecnologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Brazil.

^d Laboratório de Tecnologia de Bioativos, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil.



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

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

Microalgae extracts modulates the immune response in *Trypanosoma cruzi*-infected human cells

José Noé da Silva Júnior^a, Kamila Kassia dos Santos Oliveira^b, Ana Carla da Silva^b, Virginia Maria Barros de Lorena^b, Daniela de Araújo Viana Marques^c, Raquel Pedrosa Bezerra^{d,*}, Ana Lúcia Figueiredo Porto^{a,d}

^a Instituto René Aseri (ILKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

^b Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Imunologia, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Aggeu Magalhães, Recife, Brazil

^c Laboratório de Biotecnologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Brazil

^d Laboratório de Tecnologia de Biotecnologia, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Chagas disease
Microalgae extracts
Cytokines
Inflammation

ABSTRACT

Chagas disease (CD) is caused by the hemoflagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*. The control of the infection depends of the innate and acquired immune response of host. Moreover, CD plays a significant role in the immune response, and, in this context, microalgae can be an interesting alternative due to its immunomodulatory and trypanocidal effects. This study aimed to evaluate, *in vitro*, immunomodulatory potentials of the aqueous extracts of *Chlorella vulgaris* and *Tetradismus obliquus*. Both microalgae extracts (ME) were obtained by sonication, and the selectivity index (SI) was determined by assays of inhibitory concentration (IC₅₀) in *T. cruzi* trypomastigotes cells as well as the cytotoxic concentrations (CC₅₀) in human peripheral mononuclear cells (PBMC). The immune response was evaluated in *T. cruzi*-infected PBMC using the IC₅₀ value. ME led to inhibition of *T. cruzi* trypomastigotes after 24 h of treatment, in which the IC₅₀ values were 112.1 µg/ml in *C. vulgaris* and 15.8 µg ml⁻¹ to *T. obliquus*. On the other hand, *C. vulgaris* did not affect the viability of PBMCs in concentrations up to 1000 µg ml⁻¹, while *T. obliquus* was non-toxic to PBMCs in concentrations up to 253.44 µg ml⁻¹. In addition, *T. obliquus* displayed a higher SI against *T. cruzi* (SI = 16.8), when compared with *C. vulgaris* (SI = 8.9). *C. vulgaris* decreased the levels of IFN, indicating a reduction of the inflammatory process; while *T. obliquus* displayed an interesting immunomodulatory effect, since discretely increased the levels of TNF and stimulated the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10. This study confirms that ME are effective against *T. cruzi* trypomastigotes, and may able to control the parasitemia and preventing the progress of CD while regulating the inflammatory process.

1. Introduction

Chagas disease (CD), also known as American trypanosomiasis, is a neglected tropical disease (NTD) caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. The disease is endemic in 21 Latin American countries, and according the World Health Organization (WHO), 8 million of people are infected worldwide [1]. Benzimidazole (Bdz) and Nifurtimox (NF) are the reference drugs available to the treatment of CD, however,

due to migration, CD is increasingly diagnosed also in non-endemic countries, which include European and North American countries [5].

In the mammalian host, trypomastigotes forms of the parasite infect macrophages, fibroblasts and muscle cells [6], and turns into intracellular form, which are amastigotes. These amastigotes will turn into trypomastigotes, that promotes the cell rupture, and spread the infection in the host. Clinically, CD has two clinical phases: acute and chronic. Most acute infections are asymptomatic, and is characterized by

3.3.PROTEÍNA DERIVADA DA BIOMASSA DE MICROALGA COM ATIVIDADE TRIPANOCIDA.

Os resultados descritos neste capítulo serão submetidos no periódico *International Journal of Biological Macromolecules*.

Fator de impacto: 8.2.

Qualis capes: A1.



RESUMO

Uma proteína com ação tripanocida foi isolada a partir da microalga *Tetrademus obliquus*. Inicialmente, as células liofilizadas de *T. obliquus* foram dissolvidas em tampão Tris HCl (200 mM, pH 7,2), sendo misturadas e sonificadas em banho de gelo, com 20 pulsos de 1 minuto, e intervalo de 1 minuto entre cada pulso. O material lisado foi centrifugado a 4500 xg, 4°C por 30 min, e o sobrenadante foi o extrato aquoso. O extrato foi precipitado com diferentes níveis de sulfato de amônio (20 a 80%), dialisado em tampão Tris HCl (20 Mm; pH = 7,2) por 18 horas a 4°C e testado frente a formas tripomastigotas de *T. cruzi*. A fração de 20-40% (p/v) apresentou a maior atividade tripanocida (89,6% de inibição a 60 µg/ml) e foi carregada em coluna DEAE-Sephadex (AKTA avant 25, Suécia), sendo pré-equilibrada com 200 mM de tampão Tris HCl (pH 7,2) e a absorbância monitorizada a 280 nm. Ambas as frações não adsorvidas e adsorvidas foram reunidas, concentradas e dialisadas em tampão Tris HCl (20 mM; pH = 7,2) por 18 horas a 4°C. Em concentrações entre 4,68 e 150 µg/ml, a proteína de *T. obliquus* foi avaliada quanto à atividade citotóxica, em células mononucleares periféricas (PBMCs), bem como à atividade tripanocida, contra tripomastigotas de *T. cruzi*. A

proteína de *T. obliquus* levou à síntese de tripomastigotas de *T. cruzi*, com valor de IC₅₀ de 58,7 µg/ml. Por outro lado, a proteína não foi tóxica para PBMC em qualquer concentração avaliada, com valor de CC₅₀ > 150 µg/ml. Este estudo confirma que proteínas derivadas de microalgas podem ser uma alternativa interessante para a terapia da DC, uma vez que são eficazes contra o *T. cruzi* em baixas concentrações e não afetam a viabilidade das células humanas.

Palavras-chaves: *Tetrademus obliquus*, proteína, atividade tripanocida.

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC), também conhecida como tripanossomíase americana, é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, que pode ser transmitido ao homem pela ação vetorial, transfusão de sangue, ou alimentos contaminados (Monsalve-Lara et al., 2021). A doença é endêmica em 21 países latino-americanos, e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima 8 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo (WHO, 2020). O tratamento é limitado a apenas dois agentes: benzonidazol e nifurtimox, e ambos os medicamentos são tóxicos e pouco eficazes em pacientes crônicos (Morillo et al., 2015).

A busca de novos agentes terapêuticos para a DC é necessária, devido às limitações que já existem na terapia convencional. Nesse contexto, as microalgas podem ser uma alternativa interessante na busca de novos compostos tripanocidas, uma vez que estes organismos produzem metabólitos primários e secundários com propriedades farmacêuticas, incluindo atividade antibacteriana, anti-hipertensiva, anticancerígena e antiparasitária (Amorim et al., 2022; Martínez Andrade et al., 2018; Silva-Júnior et al., 2019). A atividade tripanocida de microalgas ainda é inexplorada na literatura, porém, alguns estudos relataram a atividade tripanocida de algumas espécies, que incluem *Tetrademus obliquus* e *Chlorella vulgaris* (Veas et al., 2020; Silva-Júnior et al., 2023).

Tetrademus obliquus é uma microalga que pode acumular quantidades substanciais de macromoléculas, como lipídios, carboidratos e proteínas (Caprio et al., 2014). Dependendo das condições de cultivo, 60% do peso seco de *T. obliquus* pode ser constituído por proteínas (Breuer et al., 2013; Pignolet et al., 2013). Nesse contexto, Silva et al. (2020) purificaram e caracterizaram uma nova lectina do extrato aquoso de *T. obliquus*. Lectinas são proteínas fornecedoras de carboidratos com múltiplas aplicações

potenciais, e já existem relatos, na literatura, da ação tripanocida de lectinas (Serrano et al., 2000)

Neste trabalho, uma proteína foi purificada a partir do extrato aquoso de *T. obliquus*, por fracionamento salino e cromatografia de troca iônica. Além disso, foram descritos, pela primeira vez, os efeitos citotóxicos e tripanocida de uma proteína proveniente da biomassa de microalga.

MATERIAIS E MÉTODOS

MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTURA

T. obliquus (SISGEN A5F5402) foi isolada no açude de Apipucos (Recife, Pernambuco, Brasil) e cultivada em frascos Erlenmeyer de 1 L cada um contendo 400 ml de meio BG-11 (Ripka et al., 2016) a 25,0 °C, e sob intensidade de luz contínua de 52,0 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Na fase exponencial de crescimento, a biomassa foi obtida por centrifugação, a 3500 xg, 4 °C por 15 min.

EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

As células liofilizadas de *T. obliquus* foram dissolvidas em tampão Tris HCl (pH 7,2) e submetidas à sonicação (Bandelin Sonopulus, Berlim, Alemanha), com 20 pulsos de 1 minuto, em banho de gelo (Chu et al., 2007). O extrato foi centrifugado a 2500 xg, 4 °C por 30 minutos e sobrenadante foi o extrato aquoso de *T. obliquus* contendo proteínas.

ETAPAS DE PRECIPITAÇÃO PROTEICA

O extrato aquoso de *T. obliquus* foi submetido ao fracionamento salino, pela adição de sulfato de amônio em diferentes saturações, que foram 0-20%, 20-40%, 40-60% e 60-80% (p/v). A proteína precipitada por centrifugação (2500 xg, 4°C, por 10 min) foi dissolvida em 200 mM de tampão Tris HCl (pH 7,2) e dialisada em 20 mM do mesmo tampão por 27 h a 4°C (Silva et al., 2019). Posteriormente, foi avaliada a atividade tripanocida de cada fração.

PURIFICAÇÃO PROTEICA POR CROMATOGRAPHIA DE TROCA IÔNICA

A fração proteica de *T. obliquus* com maior atividade tripanocida foi submetida à cromatografia de troca aniônica, utilizando coluna DEAE-Sephadex (AKTA avant 25, Suécia). A eluição foi realizada a uma vazão de 1 ml/min⁻¹ e a absorbância foi monitorada a 215, 254 e 280 nm. As proteínas não ligadas foram eluídas com 200 mM de tampão Tris HCl (pH 7,2) e as proteínas ligadas foram eluídas com o mesmo tampão com gradiente de NaCl (0,0 – 1,0 M). Um total de 40 frações foram coletadas e os picos foram reunidos, concentrados e utilizados para determinar as atividades citotóxica e tripanocida.

QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

O conteúdo de proteína total ($\mu\text{g ml}^{-1}$) em *T. obliquus* foi medido pelo método de Smith et al. (1985), utilizando o Kit de Ensaio de Proteína BCA (Kit de Ensaio de Proteína BCATM, Thermo SCIENTIFIC).

ENSAIOS BIOLÓGICOS

CULTIVO E OBTENÇÃO DE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi*

Inicialmente, os tripomastigotas criopreservados da cepa Y de *T. cruzi* (10^7 tripomastigotas/ml) (Serviço de Referência em Doença de Chagas – SRDC) foram descongelados em banho-maria a 37°C e centrifugados a 400 xg, 22°C por 10 min. O pellet foi dissolvido em meio RPMI 1640 (SigmaTM) e distribuído em frasco de cultura contendo células Vero, e incubado (37°C, 5% de CO₂) por 7 dias.

ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO

A coleta de sangue foi realizada através do protocolo aprovado (07511612.2.0000.5190) pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz. As PBMC foram obtidas de amostras de sangue venoso periférico de 10 indivíduos saudáveis, 5 mulheres e 5 homens. PBMC (10^6 células/ml) foram tratadas com proteína de *T. obliquus* em diferentes concentrações de

proteína, que foram 400, 200, 100, 50,0 e 25,0 µg/ml. As placas foram incubadas a 37,0 °C, 5,0% de CO₂ por 24 h. A atividade de citotoxicidade foi realizada pelo método colorimétrico MTT (MTT; brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) a 570 nm. DMSO foi o controle negativo e o meio RPMI 1640 foi o controle positivo (Mosmann et al., 1983). A porcentagem de viabilidade celular foi determinada através da equação:

$$\% \text{ viabilidade celular} = 1 - \frac{(Y - N)}{(N - P)} * 100$$

onde Y é a absorbância dos poços contendo extratos aquosos de PBMC e *T. obliquus*; N é o controle negativo e P o controle positivo.

ATIVIDADE TRIPANOCIDA

Após o ciclo de infecção, os tripomastigotas foram isolados e contados em hemocítmetro Neubauer, com concentração parasitária de 1 x 10⁶ células/ml. A proteína de *T. obliquus* foi avaliada em triplicata nas concentrações de 62,5, 31,25, 15,6, 7,81 e 3,90 µg/ml em placas de microdiluição de 96 poços. A microplaca foi incubada a 37,0 °C, 5,0% de CO₂ por 24 horas, e a atividade tripanocida foi avaliada por quantificação direta dos parasitas em câmara de Neubauer (Rashed et al., 2016), na qual a porcentagem de lise do parasita foi determinada por comparação do grupo controle e tratamento.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As concentrações citotóxicas (CC₅₀) e a metade da concentração máxima (IC₅₀) da proteína *T. obliquus* foram realizadas por curvas de regressão não linear do software GraphPad Prism 8.0 versão Windows e do software estatístico ANOVA, sendo considerado um valor de p < 0,1. significativo, com um índice de confiança de 90%. O valor do Índice de Seletividade (ISe) foi determinado como a razão entre CC₅₀ e IC₅₀ da proteína extraída e purificada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ATIVIDADE TRIPANOCIDA DAS FRAÇÕES PROTEICAS DE *Tetrademus obliquus*.

Neste estudo, quatro frações proteicas de *T. obliquus* foram obtidas por precipitação com sulfato de amônio (0-20, 20-40, 40-60 e 60-80% m/v). A proteína fracionada com 20-40% (p/v) de sulfato de amônio exibiu a maior atividade tripanocida, inibindo 89,6% da viabilidade dos tripomastigotas a 60 µg/ml (**Tabela 3**).

Frações dos níveis de saturação de sulfato de amônio (%)	Inibição de tripomastigotas (60 µg/ml)
0-20%	83.33
20-40%	89.65
40-60%	68.69
60-80%	8.18

Tabela 3. Análise quantitativa da atividade tripanocida de proteínas precipitadas com sulfato de amônio de *T. obliquus* a 60 µg/ml.

A literatura relata uma correlação existente entre o precipitante de saturação e a massa molecular da proteína. Concentrações de saturação mais altas precipitam proteínas de maior massa molecular, e concentrações de saturação mais baixas precipitam proteínas de menor massa molecular (Kuwano et al., 2005). Neste estudo, a atividade tripanocida relativamente maior foi observada em proteínas de *T. obliquus* fracionadas com 20-40% de sulfato de amônio, sugerindo que esta proteína pode ser de menor massa molecular.

PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DE *Tetrademus obliquus* ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

A fração proteica obtida com saturação de 20-40% (p/v) foi utilizada para purificação em cromatografia de troca iônica (ânion) DEAE-Sephadex. 40 frações proteicas (1 ml) foram coletadas da coluna eluída com 200 mM de tampão Tris HCl (pH 7,2) com gradiente linear de NaCl (0,0 – 1,0 M). O processo resultou em um único pico de proteínas não adsorvidas, bem como um único pico de proteínas adsorvidas (Figura 14), no qual o único pico de proteínas adsorvidas apresentou atividade tripanocida. O resumo da purificação proteica de *T. obliquus* é mostrado na **tabela 4**.

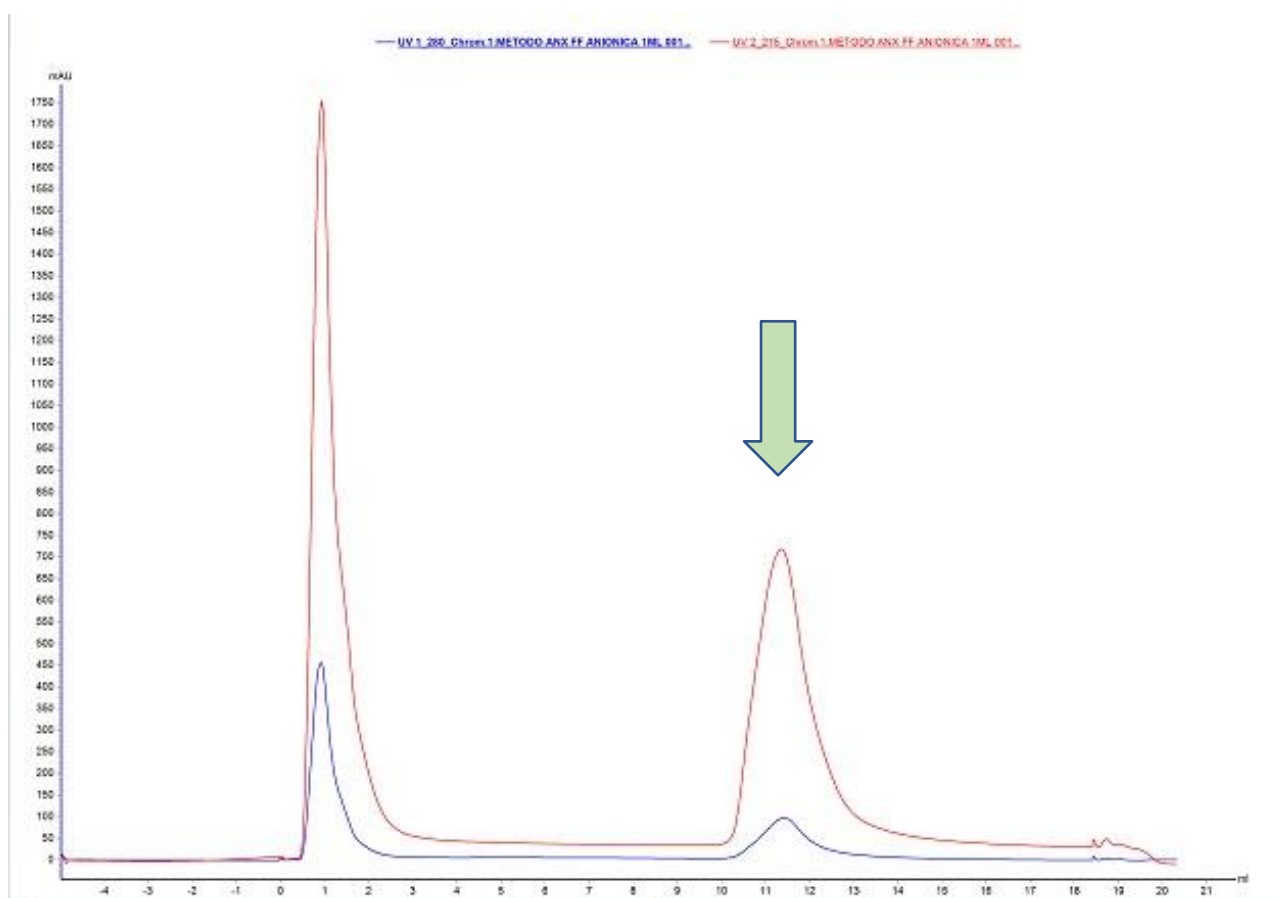


Figura 11. Padrão de eluição da proteína *Tetrademus obliquus* durante cromatografia de troca aniônica em DEAE-Sephadex.

Amostras	Quantidade total de proteínas (mg/ml)	Rendimento (%)
Extrato aquoso	2.16	100
Precipitação com sulfato de amônio (0-20%)	0.64	29.61
Precipitação com sulfato de amônio (20-40%)	1.21	56.21
Precipitação com sulfato de amônio (40-60%)	0.59	27.68
Precipitação com sulfato de amônio (60-80%)	0.16	7.52
Coluna DEAE Sephadex	0.319	14.76

Tabela 4. Resumo da purificação proteica a partir do extrato aquoso de *T. obliquus* com atividade tripanocida.

Em geral, as proteínas de microalgas têm um potencial significativo para serem uma fonte proteica alternativa devido à presença de todos os aminoácidos essenciais (Safi et al., 2017). Neste estudo, uma proteína foi purificada a partir do extrato aquoso de *T. obliquus* usando ruptura celular por sonicação, fracionamento salino por sulfato de amônio, e cromatografia de troca iônica.

A cromatografia de troca iônica utiliza a diferença entre a carga das proteínas para promover suas separações, portanto, moléculas ionizáveis, tais como proteínas, ácidos nucleicos e peptídeos podem ser obtidas por esta técnica (Carling et al., 2020). Estudos anteriores relataram que a cromatografia de troca iônica pode ser uma alternativa interessante na purificação de proteínas derivadas de microalgas. Nesse contexto, Cavalcanti et al. (2021) purificaram uma lectina no extrato aquoso de *C. vulgaris* que mata larvas de *Aedes aegypti*; e Silva et al. (2019) purificaram uma lectina no extrato aquoso de *T. obliquus*, tanto por combinação de precipitação salina quanto por cromatografia de troca iônica utilizando DEAE-Sephadex, semelhante a este estudo.

ATIVIDADE CITOTÓXICA E TRIPANOCIDA DA PROTEÍNA DE *Tetrademus obliquus*.

As atividades citotóxicas e tripanocida da proteína *T. obliquus* são mostradas nas figuras 15 e 16, respectivamente.

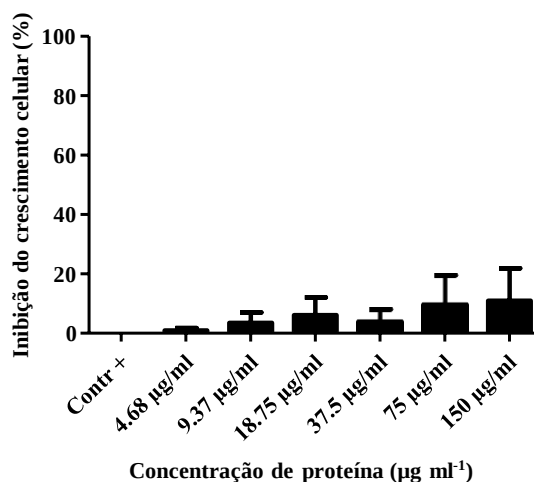


Figura 12. Efeitos da proteína de *Tetradesmus obliquus* (CC₅₀ > 150 µg/ml) na viabilidade de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).

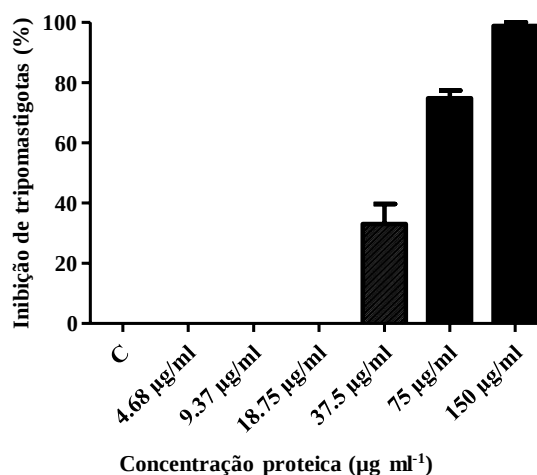


Figura 13. Efeitos da proteína de *Tetradesmus obliquus* (IC₅₀ = 58,7 µg/ml) na viabilidade de formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*.

Em PBMC humanas, a proteína de *T. obliquus* não afetou a viabilidade celular em nenhuma concentração avaliada. Por outro lado, este estudo descreve, pela primeira vez, a atividade tripanocida de uma proteína derivada de microalgas. A proteína de *T. obliquus* foi capaz de inibir formas tripomastigotas de *T. cruzi* nas concentrações mais elevadas, que foram 150 e 75 µg/ml, e apresentou IC₅₀ no valor de 58,7 µg/ml, sendo um alvo terapêutico promissor para a DC. Estudos sobre a atividade tripanocida de proteínas naturais são poucos relatados na literatura. Foi observado, no entanto, o estudo de Serrano et al. (2000), em que a proteína Concanalina-A é letal para as formas pró-cíclicas do

Trypanosoma brucei, anexando N-glicanos na superfície do parasita. Por outro lado, vários compostos derivados de microalgas são conhecidos pelos seus efeitos anti-*T. cruzi*, dentre eles os alcalóides e terpenos.

Sabe-se que esses compostos modificam a estrutura celular e reduzem a expressão de metabólitos essenciais do *T. cruzi*, como os polifenóis que promovem o colapso do potencial de membrana mitocondrial (Paiva et al., 2018); alcalóides que inibem a síntese de DNA do *T. cruzi* (Garro et al., 2020); e terpenos que induzem a vacuolização e dilatação do cinetoplasto (Macias et al., 2012).

CONCLUSÕES

Uma proteína com atividade tripanocida foi obtida através do extrato aquoso de *T. obliquus* pela combinação de precipitação salina e cromatografia de troca iônica. A fração proteica com maior atividade tripanocida foi carregada em coluna DEAE-Sephadex, onde foi obtido um único pico de proteínas adsorvidas e um único pico de proteínas não adsorvidas. Ambos os picos foram avaliados quanto à atividade citotóxica e tripanocida, sendo que apenas o pico não adsorvido foi eficaz contra tripomastigotas de *T. cruzi*, sem efeitos colaterais às PBMC humanas. Este estudo confirma, portanto, que proteínas derivadas de microalgas podem ser um alvo terapêutico interessante para a doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, A.P.; SILVA, G.H.; BRANDÃO, R.M.P.; PORTO, A.L.F.; BEZERRA, R.P. Algae as a source of peptides inhibitors of the angiotensin-converting enzyme: a systematic review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 94, n. 2, p. 1-14, 2022.
- BREUER, G.; LAMERS, P.P.; MARTENS, D.E.; DRAAISMA, R.B.; WIJFFELS, R.H. Effect of light intensity, pH, temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, v. 143, p. 1-9, 2022.

CAPRIO, F.; PAGNANELLI, F.; WIJFFELS, R.H. Quantification of *Acutodesmus obliquus* (Chlorophyceae) cell size and lipid content heterogeneity at single cell level 1. *Journal of Phycology*, v. 54, n. 2, p.187-197, 2014.

CARLING, R.S.; MCDONALD, B.A.; AUSTIN, D.; BURDEN, D.; CORREIA, J.; LEUNG, J.; MAYERS, B.; JOHN, C. Challenging the status quo: A comparison of ion exchange chromatography with liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods for the measurement of amino acids in human plasma. *Annals of Clinical Biochemistry*, v. 57, n. 4, p. 277-290, 2020.

CAVALCANTI, V.L.R.; COSTA, R.M.P.; PONTUAL, E.V.; ANDRADE, A.F.; ALVES, L.C.; PORTO, A.L.F.; BEZERRA, R.P. *Chlorella vulgaris* lectin kills *Aedes aegypti* larvae. *Algal Research*, v. 56, p.1-7, 2021.

CHU, C.Y.; HUANG, R.; LIN, L.P. Analysis of the agglutinating activity from unicellular algae. *Journal of Applied Phycology*, v. 19, p.401–8, 2007.

GARRO, H.A.; AYUB, M.J.; NIETO, M.; ESTRADA, C.L.; PUNGITORE, C.R.; TONN, CEE. The trypanocidal activity of the alkaloid oliverine involves inhibition of DNA synthesis. *Cellular and Molecular Biology*, v. 56, p. 1318-1323, 2010.

KUWANO, K.; TANAKA, N.; SHIMIZU, T.; NAGATOSHI, K.; NOU, S.; SONOMOTO, K. Dual antibacterial mechanisms of nisin Z against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 26, n. 5, p. 396–402, 2005.

MACÍAS, I.; MARÍN, C.; ES-SAMTI, H.; FERNÁNDEZ, A.; GUARDIA, J.J.; ZENTAR, H.; AGIL, A.; CHAHBOUN, R.; ALVAREZ-MANZANEDA, E.; SÁNCHEZ-MORENO, M. Taiwaniaquinoid and abietane quinone derivatives with trypanocidal activity against *T. cruzi* and *Leishmania* spp. *Parasitology International*, v. 61, n. 3, p. 405–413, 2012.

MARTINEZ-ANDRADE, K.A.; LAURITANO, C.; ROMANO, G.; IANORA, A. Marine microalgae with anti-cancer properties. *Marine Drugs*, v. 6, n. 5, p. 1-17, 2018.

MONSALVE-LARA, J.; LILIOSO, M.; VALENÇA-BARBOSA, C.; THYSSEN, P.J.; MIGUEL, D.C.; LIMEIRA, C.; GADELHA, F.R.; FONTES, F.V.; PIRES-SILVA, D.; DORNAK, L.L.; LIMA, M.M.; DONALISIO, M.R.; ALMEIDA, C.E. The risk of oral

transmission in an area of a Chagas disease outbreak in the Brazilian northeast evaluated through entomological, socioeconomic and schooling indicators. *Acta Tropica*, 2021.

MORILLO, C.A.; MARIN-NETO, J.A.; AVEZUM, A.; SOSA-ESTANI, S.; RASSI, A.; ROSAS, F.; VILLENA, E.; QUIROZ, R.; BONILLA, R.; BRITTO, C. et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 14, p. 1295–1306.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65, p. 55–63, 1983.

PAIVA, C.N.; MEDEI, E.; BOZZA, M.T. ROS and *Trypanosoma cruzi*: fuel to infection, poison of the hearth. *PLOS Pathology*, v. 14, n. 4, p. 1-19, 2018.

PIGNOLET, O.; JUBEAU, S.; VACA-GARCIA, C.; MICHAUD, P. Highly valuable microalgae: Biochemical and topological aspects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 40, n. 8, p. 781–796, 2013.

RASHED, K.; FERREIRA, D.S.; ESPERANDIM, V.R.; MARÇAL, M.G.; SEQUEIRA, B.M.; FLAUZINO, L.G.B.; CUNHA, W.R. In vitro trypanocidal activity of the Egyptian plant *Schinopsis lorentzii* against trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 6, n. 6, p. 55–60, 2016.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.B. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, v. 111, n. 1, p. 1–61, 1979.

SAFI, C.; OLIVIERI, G.; CAMPOS, R.P.; ENGELEN-SMIT, N.; MULDER, W.J.; BROEK, L.A.M.; SIJTSMA, L. Biorefinery of microalgal soluble proteins by sequential processing and membrane filtration. *Bioresource Technology*, v. 225, p. 151–158, 2017.

SERRANO, A.; COLE, R.N.; ENGLUND, P.T. Killing of *Trypanosoma brucei* by concanavalin A: structural basis of resistance in glycosylation mutants. *Journal of Molecular Biology*, v. 304, p. 633–44, 2000.

SILVA, A.J.; CAVALCANTI, V.L.R.; PORTO, A.L.F.; GAMA, W.A.; COSTA, R.M.P.; BEZERRA, R.P. The green microalgae *Tetradismus obliquus* (*Scenedesmus acutus*) as lectin source in the recognition of ABO blood type: purification and characterization. 2019. *Journal of Applied Phycology*, v. 32, n. 4, p. 103-110, 2020.

SILVA-JÚNIOR, J.N.; AGUIAR, E.M.; MOTA, R.A.; BEZERRA, R.P.; PORTO, A.L.F.; HERCULANO, P.N.; MARQUES, D.A.V. Antimicrobial activity of photosynthetic microorganisms biomass extract Against bacterial isolates causing mastitis. *Journal of Dairy and Veterinary Science*, v. 10, n. 3, p. 555-788, 2019.

SILVA-JÚNIOR, J.N.; SILVA, A.C.; OLIVEIRA, K.K.S.; MOREIRA, L.R.; CAIRES, S.F.; SILVA, A.J.; MOURA, Y.A.S.; VIANA-MARQUES, D.A.; BEZERRA, R.P.; LORENA, V.M.B.; PORTO, A.L.F. Green microalgae as potential source of trypanocide compounds. *Natural Product Research*, p. 1-7, 2023.

SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

VEAS, R.; ROJAS-PIRELA, M.; CASTILLO, C.; OLEA-AZAR, C.; MONCADA, M.; ULLOA, P.; ROJAS, V.; Kemmerling, U. Microalgae extracts: Potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents? *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 127, p. 1-11.

WHO | Epidemiology. 2020. WHO.

4. CONCLUSÃO

No que diz respeito às novas perspectivas terapêuticas para a DC, os extratos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Tetrademus obliquus* apresentaram dados promissores. Primeiramente, a ausência de efeitos citotóxicos significativos para células humanas e efetividade contra tripomastigotas de *T. cruzi* em baixas concentrações. Além disso, *C. vulgaris* e *T. obliquus* estimularam discretamente o recrutamento de TNF, citocina pró-inflamatória, que desencadeia mecanismos letais ao parasita. *C. vulgaris* também diminuiu o processo inflamatório mediante a redução da expressão de IFN- γ , e *T. obliquus* estimulou uma das mais importantes citocinas anti-inflamatórias, que foi a IL-10. Outro avanço significativo deste estudo consistiu na obtenção de uma molécula ativa contra *T. cruzi*, que foi a proteína purificada a partir do extrato aquoso de *T. obliquus*. A proteína em questão também não apresentou toxicidade para células humanas, ao mesmo tempo em que comprometeu a viabilidade celular de tripomastigotas em baixas concentrações. O estudo comprova, portanto, as vantagens na utilização de microalgas na prospecção de novos alvos terapêuticos para tratar pacientes acometidos pela DC.

APÊNDICES

APÊNDICE A – ARTIGOS COM AUTORIA PRINCIPAL SUBMETIDOS E/OU PUBLICADOS

- ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA NATURAL PRODUCT RESEARCH



The screenshot shows the article page for 'Green microalgae as a potential source of trypanocide compounds' in the journal 'Natural Product Research'. The journal is noted as 'Formerly Natural Product Letters'. The article is a 'Short Communication' by José Noé da Silva Júnior, Ana Carla da Silva, Kamila Kássia dos Santos Oliveira, Leyllane Rafael Moreira, Silvana de Fátima Ferreira da Silva Caires, and Aldeni José da Silva. It was received on 09 Feb 2022, accepted on 04 Jan 2023, and published online on 20 Jan 2023. The article has 170 views and 2 CrossRef citations. The DOI is 10.1080/14786419.2023.2169688. The page includes a search bar, a 'Submit an article' button, and a 'Journal homepage' button.

- ✓ Título: Green Microalgae as Source of Trypanocidal Compounds
- ✓ Número da submissão: 223601888.
- ✓ Aceito em: 20/01/2023.
- ✓ DOI: [10.1080/14786419.2023.2169688](https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2169688)
- ✓ Fator de Impacto da revista: 2.488 (2021), Qualis A4 das Ciências Biológicas.

- **DEPÓSITO DE PATENTE**

**TRIPANOCIDA NATURAL E ATÓXICO PROVENIENTE DA BIOMASSA DE
MICROORGANISMO FOTOSSINTETIZANTE**



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

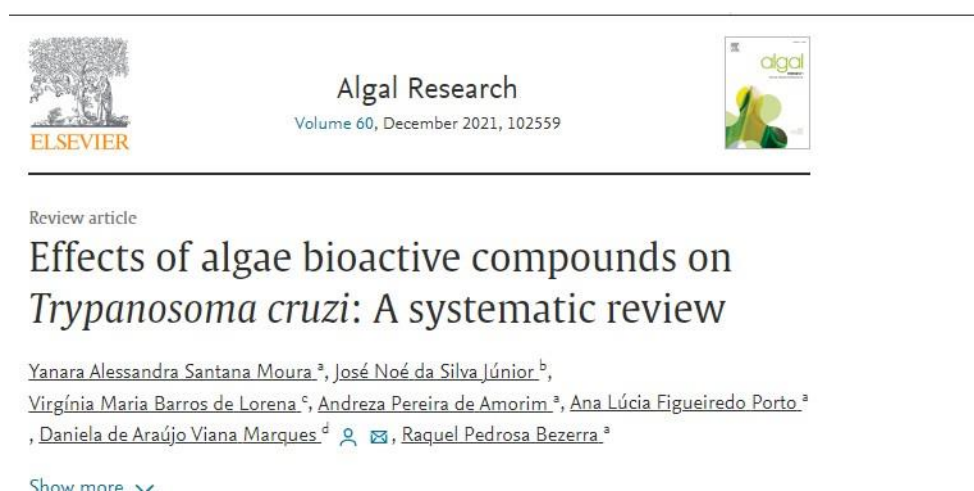
Número do Processo: BR 10 2020 022860 9

Dados do Depositante (71)

- ✓ Título: Tripanocida natural e atóxico proveniente da biomassa de microrganismo fotossintetizante.
- ✓ Processo: BR 10 2020 022860 9.
- ✓ Data de depósito: 10/11/2020.

APÊNDICE B – OUTROS ARTIGOS PUBLICADOS (COM PARTICIPAÇÃO COLABORATIVA)

- ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA ALGAL RESEARCH



- ✓ Título: Effects of algae bioactive compounds on *Trypanosoma cruzi*: a systematic review.
- ✓ Participação: Segundo autor (escrita).
- ✓ DOI: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102559>
- ✓ Data da publicação: 15/11/2021.
- ✓ Fator de impacto da revista: 4.4, Qualis A1 das Ciências Biológicas.

- ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA FRONTIERS IN IMMUNOLOGY



Therapeutic Potential of Photosynthetic Microorganisms for Visceral Leishmaniasis: An Immunological Analysis

Victor Vaitkevicius-Antão¹, Jady Moreira-Silva¹, Isabelle Barreto da Silva Moreira Reino¹, Maria Gabriella Nunes de Melo¹, José Noé da Silva-Júnior², Alessandra Frazão de Andrade², Paulo Sérgio Ramos de Araújo¹, Raquel Pedrosa Bezerra², Daniela de Araújo Viana Marques³, Silvana Ferreira³, Rômulo Pessoa-e-Silva⁴, Virginia Maria Barros de Lorena⁵ and Milena de Paiva-Cavalcanti^{1*}

OPEN ACCESS

- ✓ Título: Therapeutical potential of photosynthetic microorganisms for visceral leishmaniasis: an immunological analysis.
- ✓ Participação: Quinto autor (procedimentos experimentais).
- ✓ DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.891495>
- ✓ Data da publicação: 30/06/2022.
- ✓ Fator de impacto da revista: 7.5, Qualis A1 das Ciências Biológicas.

- **ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT**

Research, Society and Development, v. 10, n. 8, e14610817259, 2021
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i8.17259>

Can postbiotics show antiviral effects against Sars-CoV-2?

Podem os pós-bióticos apresentarem efeitos antivirais contra Sars-CoV-2?

Pueden los postbióticos mostrar efectos antivirales contra Sars-CoV-2?

Received: 06/16/2021 | Reviewed: 06/22/2021 | Accept: 06/22/2021 | Published: 07/09/2021

- ✓ Título: Can postbiotics show antiviral effects against SARS-CoV-2?
- ✓ Participação: Segundo autor (escrita).
- ✓ DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i8.17259>
- ✓ Data da publicação: 09/07/2021.
- ✓ Qualis da revista: A3 das Ciências Biológicas.

- ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA IMMUNOBIOLOGY



Immunobiology
Volume 229, Issue 1, January 2024, 152779



Chlorella vulgaris extract and Imiquimod as new therapeutic targets for leishmaniasis: An immunological approach

Maria Gabriella Nunes de Melo^a, Isabelle Barreto da Silva Moreira Reino^a,
Victor Vaitkevicius-Antão^a, Jady Moreira da Silva^{a b}, José Noé da Silva Júnior^c,
Alexsandra Frazão de Andrade^c, Raquel Pedrosa Bezerra^c,
Daniela de Araújo Viana Marques^d, Silvana de Fátima Ferreira da Silva^d,
Paulo Sérgio Ramos de Araújo^{b e}, Virginia Maria Barros de Lorena^f,
Rayana Carla Silva de Moraes^a, Milena de Paiva-Cavalcanti^a  

- ✓ Título: *Chlorella vulgaris* extract and Imiquimod as new therapeutic targets for leishmaniasis: An immunological approach.
- ✓ Participação: Quinto autor (parte experimental).
- ✓ DOI: <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2023.152779>
- ✓ Data da publicação: 09/07/2021.
- ✓ Qualis da revista: A3 das Ciências Biológicas.

- **DEPÓSITO DE PATENTE**

**PRODUTO ATÓXICO COM ATIVIDADE ANTI-*Trypanosoma cruzi*
CONSISTIDO POR PROTEÍNA DE *Arthrospira platensis***



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2024 002088 0

- ✓ Título: Produto atóxico com atividade anti-*Trypanosoma cruzi* constituído por proteína de *Arthrospira platensis*.
- ✓ Participação: 13º autor (parte experimental)
- ✓ Processo: BR 10 2024 022088 0.
- ✓ Data de depósito: 01/02/2024.

ANEXO 1 – DADOS DA REVISTA CYTOKINE

Cytokine is devoted exclusively to the study of the molecular biology, biochemistry, immunology, diagnostic and clinical applications of all known interleukins, hematopoietic factors, growth factors, cytotoxins, interferons, and new cytokines, *Cytokine* provides comprehensive coverage of cytokines and their receptors, 12 times a year, by publishing original high quality refereed scientific papers from prominent investigators in both the academic and industrial sectors.

Fator de impacto: 3.8.

Qualis Capes: A2.

Dados disponíveis em:

<https://www.sciencedirect.com/journal/cytokine/publish/guide-for-authors>.

ANEXO 2 – DADOS DA REVISTA INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES

DESCRIPTION

International Journal of Biological Macromolecules is an established international journal of research into **chemical** and **biological** aspects of all **natural macromolecules**. It presents the latest findings of studies on the molecular structure and properties of proteins, macromolecular carbohydrates, glycoproteins, proteoglycans, lignins, biological poly-acids, and nucleic acids. These findings must be new and novel rather than a repeat of earlier or analogous published work. The scope includes biological activities and interactions, molecular associations, chemical and biological modifications, and functional properties. Papers on related model systems, structural conformational studies, theoretical developments and new analytical techniques are also welcome. All papers are required to focus primarily on at least one named **biological macromolecule**. This naming should appear in the title, the abstract and the text of the paper.

Examples of papers which are not appropriate for *International Journal of Biological Macromolecules* include:

papers where the biological macromolecule has not been characterized by modern analytical techniques (including molecular weight) rather than historical methods. e.g. colorimetric assays. papers which focus on biological, physiological and pharmacological aspects of non-macromolecules attached to, or mixed with, biological macromolecules. papers on the materials science of biocomposites where there is no mention of any specific biological macromolecule. papers where the structure or role of the biological macromolecule is not the major proportion of the study. routine studies of extraction of macromolecules without purification and characterization of the extracted molecule. applications of macromolecules where the structure of the macromolecule is completely unknown. papers where the molecular weight of the biological molecule is less than five thousand. paper which are majorly about clinical studies and animal trials, where a biological macromolecule is not the biologically active agent, and/or the biological macromolecule is not the major focus of the study.

Fator de impacto 8.0

Qualis Capes: A1

Dados disponíveis em:

https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/525446?generatepdf=true.

ANEXO 3 – DADOS DA REVISTA RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT

RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT [Register](#) [Login](#)

[HOME](#) [CURRENT](#) [ARCHIVES](#) [ABOUT](#) [SEARCH](#)

About the Journal

The Research, Society and Development journal (whose abbreviated title is Res., Soc. Dev.) is a multidisciplinary scientific publication focused on promoting the social, scientific and technological development through the publication of the findings that have occurred in different areas. This is a monthly journal, which publishes various types of manuscript, such as scientific articles, reviews and case teaching in diversified areas of knowledge. The journal receives many contributions in Portuguese, or English or Spanish, (or other language on request) from researchers in the area of Teaching, which allows to evaluate and publish also educational objects.

Ad hoc revisors 2023

We thank all of the more than 325 “ad hoc” reviewers who contributed to this Journal (double-blind peer review) during the year 2023.

[Reviewers 2023](#)

JOURNAL METRICS

Índice H5 (Google Metrics): 28 (2023)

LANGUAGE

English
Español (España)
Português (Brasil)

[MAKE A SUBMISSION](#)

Fator de Impacto: 1.78 (2020-21, CiteFactor).

Qualis CAPES: A3.

Dados disponíveis em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd>