



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

JOSÉ NOÉ DA SILVA JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DE COMPOSTOS
BIOATIVOS OBTIDOS DE MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES
FRENTE A
*Trypanosoma cruzi***

Recife
2019

JOSÉ NOÉ DA SILVA JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DE COMPOSTOS BIOATIVOS
OBTIDOS DE MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES FRENTE A
*Trypanosoma cruzi***

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

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof^ª. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Daniela de Araújo Viana Marques

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz,
CRB4/1752

Silva Júnior, José Noé da

Avaliação da atividade antiparasitária de compostos bioativos obtidos de microrganismos fotossintetizantes frente a *Trypanosoma cruzi* / José Noé da Silva Júnior - 2019.

59 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto

Coorientadora: Daniela de Araújo Viana Marques

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. Recife, 2019.

Inclui referências e anexos.

1. Microalgas 2. *Trypanosoma cruzi* 3. Citotoxicidade
I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo (orient.) II. Marques, Daniela de Araújo Viana III. Título

615.329

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-269

JOSÉ NOÉ DA SILVA JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DE COMPOSTOS BIOATIVOS
OBTIDOS DE MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES FRENTE A
*Trypanosoma cruzi***

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

Aprovada em: 21/02/2019.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Daniela de Araújo Viana Marques / UPE-Co-orientadora

Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto / UFPE

Profa. Dra. Vláudia Maria Assis Costa / UFPE

A Deus, Nossa Senhora, meus pais, familiares, amigos e em especial minha avó Maria José Lopes de Souza (*in memoriam*),

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me permitido chegar até aqui através de muito esforço, dedicação, persistência e fé, sempre me guiando em todos os passos de minha vida, não apenas profissional, mas principalmente em minha vida pessoal.

Hoje sei que apesar de todos os obstáculos, venho me tornando uma pessoa melhor, pois tento seguir os passos daquele que nos ensina que a bondade, justiça, ética e humildade são algumas das maiores virtudes que o ser humano pode ter: Ele, que é o mestre dos mestres, Jesus Cristo. Não sou capaz de descrever o quanto me fortaleci (e me fortaleço) através das orações e da Eucaristia nos momentos mais difíceis que passei nestes 2 anos de mestrado.

Jamais poderia deixar de mencionar o papel que a Virgem Maria desempenha na minha vida. Todos os dias clamo pelo seu nome, sempre pedindo forças e sua poderosa intercessão perante seu Filho. Posso afirmar, com certeza, que todo o meu trabalho de mestrado foi depositado nas mãos de Maria, pois aprendi com ela que devemos sempre aceitar a vontade de Deus, já que Ele sabe o que é melhor para todos nós.

E é claro, eu não estaria aqui se não fosse o incentivo dos meus pais. Não sou bom em demonstrar sentimentos pelas pessoas que tenho afeição. Mas afirmo que o amor e gratidão que sinto por eles são infinitos. Tenho orgulho imenso de ser filho de seu José Noé e dona Bernadete, que apesar de não terem tido a oportunidade de concluir os estudos, sempre mostraram a mim e a minha irmã que a educação é o melhor presente que um pai e uma mãe podem proporcionar a um filho.

Agradeço por ter uma irmã como Aline, que sempre foi minha inspiração na vida acadêmica e apesar das brigas, comuns de irmãos, somos muito unidos e os laços que nos unem são muito fortes, principalmente agora com a chegada do meu sobrinho Arthur. Ah! Esse moleque é um dos amores da minha vida hoje. É inexplicável a alegria que sinto ao chegar cansado em casa após um dia intenso de experimentos e dar de cara com aquele sorriso.

A minha avó, que na verdade era uma segunda mãe, Maria José, que há 12 anos não está mais entre nós. Foi a mulher que mais admirei em toda a minha vida, em todos os aspectos. A saudade que sinto é eterna, e o amor também. Agradeço ao meu querido tio e padrinho João Guilherme. Há poucos meses nos deixou, e a dor de sua ausência é tão grande quanto à da minha avó. Como não conheci meu avô, ele o substituíu nesse aspecto, e grandes ensinamentos obtive com ele, principalmente a honestidade, sinceridade e forte repúdio a qualquer forma de

bajulação. Deixo meus agradecimentos a todos os familiares que direta ou indiretamente torcem pelo meu sucesso, em especial minha avó Severina, minha tia e madrinha Maria do Carmo (Ica), minha tia Lúcia e tios Marcos e Paulo.

Agradeço à professora Ana Porto, pela confiança depositada em mim durante todo esse tempo e ter me permitido a oportunidade de construir minha vida profissional tomando como exemplo sua persistência, competência e ética.

À minha querida coorientadora, professora Daniela Viana, por toda a amizade e carinho que começaram desde que eu ainda estava dando os primeiros passos na ciência. Dentre os vários ensinamentos, guardo comigo a sua boa energia, constante pensamento positivo e ter me feito compreender que a negatividade é o pior sentimento que uma pessoa pode ter.

À professora Raquel Pedrosa, a quem eu considero uma grande amiga e conselheira e modelo de inspiração na vida acadêmica. Minha primeira orientadora, que me ensina constantemente o que é ser cientista. Não tenho palavras para agradecer toda a dedicação dessa pessoa incrível que sempre me socorre nos momentos de dificuldade e me aconselha nas tomadas de decisões importantes.

À professora Silvana Caires, que me ensinou todos os procedimentos básicos referentes ao meu projeto e pela excelente convivência que tivemos juntos, mesmo que por pouco tempo, devido às dificuldades de execução das atividades.

À doutora Virginia Lorena, por ter me acolhido, como costumo dizer, “nos 45 do segundo tempo”, sem nenhuma objeção, quando mais precisei. Pelo pouco contato que temos, já tenho grande carinho e enorme gratidão por essa pessoa maravilhosa.

Aos colegas do Aggeu, principalmente Ana Carla, por ter me recebido tão bem e ter se comprometido tanto em me ajudar nos experimentos. Agradeço infinitamente pelo companheirismo, amizade, conselhos e já a considero como uma grande amiga. E claro, também não posso deixar de mencionar Kamila, que em pouco tempo nos tornamos bons amigos.

À Elaine, Ketyline e Priscila, vocês são muito mais que amigas, são as pessoas que mais desabafo, converso e sou próximo, fora minha família. Aos colegas do CENAPESQ, em especial Vivianne, Aldeni e Priscila Calaça, tenho muito carinho e amizade por todos.

Aos colegas do LIKA, em especial Tayrine, Emanuel, Bárbara, Jean, Thamiris e Adriano. Posso dizer que os melhores momentos do mestrado passei ao lado de vocês, sinto

falta das risadas, aperreios, estresses e principalmente do alívio que era acabar cada disciplina sem enlouquecer. Tenho profundo respeito, gratidão e amizade por cada um.

RESUMO

A doença de Chagas é uma enfermidade negligenciada endêmica em vários países da América Latina, cujo agente etiológico é o *Trypanosoma cruzi*. Este, por sua vez, é transmitido a seres humanos e outros mamíferos principalmente pela ação vetorial de triatomíneos, assim como pela ingestão de alimentos contaminados, transfusão sanguínea e congênita. O tratamento convencional da doença de Chagas se dá pelo uso do benzonidazol e do nifutrimox, no entanto, essas medicações são tóxicas e alvo de controvérsias quanto à eficácia em indivíduos acometidos pela fase crônica da doença. Logo, é necessária a busca de novos compostos anti-chagásicos, preferencialmente não tóxicos, de baixo custo e eficazes no tratamento. Nesse contexto, microrganismos fotossintetizantes, especialmente as microalgas, podem ser inovadores na busca de moléculas bioativas com ação anti-*T.cruzi*, visto que possuem várias atividades biológicas já descritas na literatura. Diante do exposto, este trabalho teve por finalidade avaliar a atividade antiparasitária *in vitro* de extratos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus* sp. frente a formas tripomastigotas de *T. cruzi*, assim como selecionar o extrato mais seletivo e submeter a estudos de formulação de um produto anti-chagásico. *C. vulgaris* e *Scenedesmus* sp. foram cultivadas em meios padronizados contendo sais minerais, em condições já pré-estabelecidas de luminosidade, temperatura e constante aeração. Os extratos foram obtidos com Tris HCl a 0,2 M, pH 7.2, inicialmente homogeneizados por agitação magnética e centrifugados em condições específicas, no qual foi determinada a concentração proteica desses extratos. A atividade antiparasitária e a análise da citotoxicidade em células Vero foram realizadas, e determinou-se a LC₅₀ e CC₅₀, respectivamente. Dois experimentos independentes foram realizados em cada análise, com os extratos em concentrações de 100 a 3,15 µg/mL. Ambos os extratos foram letais para o *T. cruzi*, no qual *C. vulgaris* apresentou LC₅₀ de 32,9 µg/mL e *Scenedesmus* sp. de 36,4 µg/mL. No entanto, o extrato de *Scenedesmus* sp. foi tóxico em linhagem de célula Vero (CC₅₀ de 82,85 µg/mL), enquanto *C. vulgaris* não foi citotóxica em nenhuma concentração testada, com CC₅₀ estimada em 254,2 µg/mL. *C. vulgaris* foi utilizada na formulação do produto antichagásico, através da adição de 138 mg de lactose e 126 mg de amido como crioprotetores, apresentando ação considerável contra o parasita nas maiores concentrações, chegando a reduzir em 94% a viabilidade do mesmo a 100 µg/mL. Logo, os resultados obtidos neste estudo indicam que microalgas podem ser promissoras na obtenção de compostos bioativos com ação antiparasitária.

Palavras-chaves: Microalgas. *Trypanosoma cruzi*. citotoxicidade.

ABSTRACT

Chagas disease is a neglected disease, endemic in several Latin American countries, whose etiologic agent is *Trypanosoma cruzi*. This, in turn, can be transmitted to humans and other mammals mainly by vector action of triatomines, as well as by the ingestion of contaminated foods, blood transfusion, besides the congenital transmission. Conventional treatment of Chagas' disease is by the use of benznidazole and nifutrimox. However, these drugs are toxic and subject to controversy regarding efficacy in individuals affected by the chronic phase of the disease. Therefore, the search for new antichagasic compounds, non-toxic, low cost and effective in the treatment is necessary. In this context, photosynthetic microorganisms, especially microalgae, may be innovative in the search for bioactive molecules with trypanocidal action, since they have several biological activities already described in the literature. This work aimed to evaluate the antiparasitic activity of protein extracts of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. microalgae against *T. cruzi* trypomastigotes, as well as to select the most effective extract and to establish a formulation model of the same through the use of cryoprotectants. *C. vulgaris* and *Scenedesmus* sp. were cultured in standard media containing mineral salts, under pre-established conditions of illuminance and temperature, and constant aeration. The extracts were obtained with 0.2 M Tris HCl, pH 7.2, being homogenized by magnetic stirring and centrifuged under specific conditions, and the protein concentration of these extracts was determined. The following tests were performed: anti-*T. cruzi* activity and cytotoxicity analysis in Vero cells, in which the LC₅₀ and CC₅₀ of the extracts, respectively, were determined. Two independent experiments were performed in each analysis, with the extracts in concentrations of 100 to 3.15 µg/mL. Both extracts were lethal to *T. cruzi*, in which *C. vulgaris* presented LC₅₀ of 32.9 µg/mL and *Scenedesmus* sp. of 36.4 µg/mL. However, *Scenedesmus* sp. extract was toxic to Vero cells (CC₅₀ of 82.85 µg/mL), whereas *C. vulgaris* did not show toxicity at any concentration tested, with CC₅₀ estimated at 254.2 µg/mL. *C. vulgaris* was used in the formulation of the antichagasic product, through the addition of 138 mg of lactose and 126 mg of starch as cryoprotectants, presenting considerable action against the parasite in the highest concentrations, reducing its viability by 94% to 100 µg/mL. Therefore, the results obtained in this study indicate that microalgae may be promising in obtaining bioactive compounds with antiparasitic action.

Keywords: microalgae. *Trypanosoma cruzi*. cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 1- | Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i> | 16 |
| Figura 2- | Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> | 17 |
| Figura 3- | Cardiomiopatia chagásica | 18 |
| Figura 4- | Megacólon chagásico | 18 |
| Figura 5- | Megaesôfago chagásico | 18 |
| Figura 6- | Distribuição geográfica dos municípios prioritários para doença de Chagas. Pernambuco. Brasil. 2015 | 19 |
| Figura 7- | Estrutura química do benzonidazol | 20 |
| Figura 8- | Estrutura química do nifurtimox | 20 |
| Figura 9- | Morfologia da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> | 26 |
| Figura 10- | Morfologia de microalgas do gênero <i>Scenedesmus</i> | 28 |
| Figura 11- | Cytotoxic activity of <i>Chlorella vulgaris</i> crude extract | 35 |
| Figura 12- | Antiparasitic activity of <i>Chlorella vulgaris</i> crude extract against trypomastigotes forms of <i>Trypanosoma cruzi</i> | 35 |
| Figura 13- | Cytotoxic activity of <i>Scenedesmus</i> sp. crude extract..... | 36 |
| Figura 14- | Antiparasitic activity of <i>Scenedesmus</i> sp. crude extract against trypomastigotes forms of <i>Trypanosoma cruzi</i> | 36 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabela 1- | Principais aplicações biotecnológicas das microalgas | 24 |
| Tabela 2- | Effects and Selectivity index (SI) of <i>Scenedesmus</i> sp. and <i>Chlorella vulgaris</i> on the viability cells and trypomastigotes forms of <i>Trypanosoma cruzi</i> | 37 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|--|
| BZ | Benzonidazol |
| CC ₅₀ | Concentração Citotóxica em 50% das Células |
| CG | Cromatografia gasosa |
| CDK2 | Cyclin-dependent Kinase 2 |
| CMI | Concentração Mínima Inibitória |
| DC | Doença de Chagas |
| ECA | Enzima conversora de angiotensina |
| ECG | Eletrocardiograma |
| LC ₅₀ | Dose letal mediana |
| MS | Ministério da Saúde |
| MTT | 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PLE | Pressurized Liquid Extraction |
| UAE | Ultrasound-Assisted Extraction |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 | OBJETIVOS | 15 |
| 1.1.1 | Objetivo geral | 15 |
| 1.1.2 | Objetivos específicos | 15 |
| 2 | REFERENCAL TEÓRICO | 16 |
| 3 | RESULTADOS | 29 |
| 3.1 | ARTIGO – ANTIPARASITIC ACTIVITY OF CHLORELLA VULGARIS AND SCENEDESMUS SP. AGAINST TRYPANOSOMA CRUZI: AN IN VITRO STUDY | 29 |
| 3.2 | PATENTE – ANTICHAGÁSICO OBTIDO DE MICRORGANISMO FOTOSSINTETIZANTE E SUA FORMULAÇÃO | 40 |
| 4 | CONCLUSÃO | 50 |
| | REFERÊNCIAS | 51 |
| | ANEXO A – DADOS REFERENTES À APROVAÇÃO DA PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA | 59 |
| | ANEXO B – INFORMAÇÕES SOBRE A REVISTA ESCOLHIDA PARA A SUBMISSÃO DO ARTIGO | 59 |

1 INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas são aquelas provocadas por agentes infecciosos que atingem, prioritariamente, regiões de precárias condições socioeconômicas, não sendo, portanto, lucrativas o suficiente para receberem a devida atenção da indústria farmacêutica (STURGEON et al., 2014). A Organização Mundial de Saúde (OMS) relata a existência de 17 dessas doenças com índices elevados em países tropicais, dentre elas a doença de Chagas (DC) (SCARIM et al., 2018; WHO, 2018). O agente etiológico da DC é o *Trypanosoma cruzi*, protozoário hemoflagelado, cuja forma de transmissão ocorre, principalmente, pela ação vetorial, podendo ocorrer, também, de forma oral, congênita ou pela transfusão de sangue (ECHEVERRIA et al., 2019).

A doença é classificada em duas fases distintas, que são aguda e crônica. A primeira é caracterizada por uma elevada parasitemia no sangue, sendo assintomática na maioria dos casos. Cerca de 2 ou 3% dos indivíduos podem apresentar sintomas, porém inespecíficos, que são febre de intensidade leve a moderada, mal-estar e quadros de hepatoesplenomegalia. Já na fase crônica, há redução do número de parasitas circulantes, podendo ser assintomática ou caracterizada por quadros clínicos específicos, em especial a cardiomiopatia chagásica, comprometimento dos órgãos do aparelho digestivo (megacólon e megaesôfago), assim como alterações neurológicas (COURA, 1997).

O tratamento convencional da DC é realizado pelo uso de drogas como benzonidazol (BZ) e nifurtimox (NF) (WILKINSON et al., 2012). No entanto, essas medicações são consideravelmente tóxicas, especialmente o nifurtimox, que não é mais comercializado no Brasil, e há controvérsias em relação à eficácia dessas medicações na fase crônica da doença, principalmente em indivíduos portadores da cardiomiopatia chagásica (CURRAN et al., 2012). Logo, faz-se necessária a busca de novos compostos, preferencialmente não tóxicos, que possam ser utilizados no tratamento desta enfermidade (ALMEIDA et al., 2018).

A literatura relata diversos compostos obtidos de fontes naturais com ação anti-*T. cruzi*, e diante desse contexto, as microalgas podem ganhar destaque, visto que estão sendo cada vez mais exploradas devido à presença de metabólitos biologicamente ativos em suas biomassas, oferecendo, portanto, consideráveis inovações, principalmente no setor farmacêutico (PRADHAN et al., 2012).

São vários os compostos bioativos obtidos desses microrganismos que possuem aplicação na indústria farmacêutica, tais como carotenoides, luteína, β -caroteno, fucoxantina e

astaxantina (FU et al., 2017), e as principais atividades biológicas das microalgas descritas na literatura são as anticancerígenas, antioxidantes, anti-inflamatórias, antifúngicas e antibacterianas (MANIRAFASHA et al., 2016).

Diante do exposto, o propósito deste trabalho consistiu na avaliação, *in vitro*, da atividade antiparasitária de compostos bioativos extraídos da biomassa de *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus* sp. frente a formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, além da ação citotóxica desses compostos em linhagem de células de mamíferos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a citotoxicidade e ação antiparasitária, *in vitro*, de compostos bioativos obtidos da biomassa de *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus* sp. frente a formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o extrato proteico de *C. vulgaris* e *Scenedesmus* sp. a partir de métodos pré-estabelecidos;
- Avaliar a ação citotóxica dos extratos frente a linhagem de célula Vero;
- Avaliar a atividade antichagásica, *in vitro*, dos extratos frente a formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*;
- Selecionar o extrato mais eficaz nos testes anti-*T. cruzi* e com menor toxicidade;
- Estabelecer um modelo de formulação desse extrato, usando crioprotetores já presentes em medicamentos utilizados na terapia chagásica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Trypanosoma cruzi* E A DOENÇA DE CHAGAS

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas. Protozoário hemoflagelado da ordem Kinetoplastida, foi identificado pela primeira vez em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas, que, ao investigar um caso específico de uma garota chamada Berenice, constatou que o parasita encontrado em seu sangue era o mesmo presente no hospedeiro invertebrado e em animais examinados em laboratório. O parasita possui três formas evolutivas (Figura 2), são elas: epimastigota, encontrada no hospedeiro invertebrado; tripomastigota e amastigota, essas últimas presentes no hospedeiro vertebrado, podendo circular pela corrente sanguínea ou no interior das células de defesa, respectivamente (NEVES, 2005). O ciclo do parasita é classificado como heteroxeno, visto que ocorre em dois hospedeiros distintos (Figura 1).

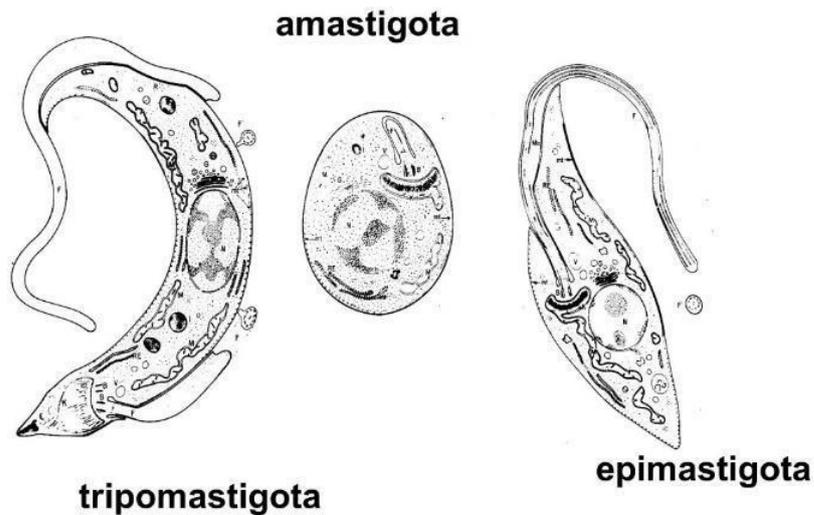


Figura 1. Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*.

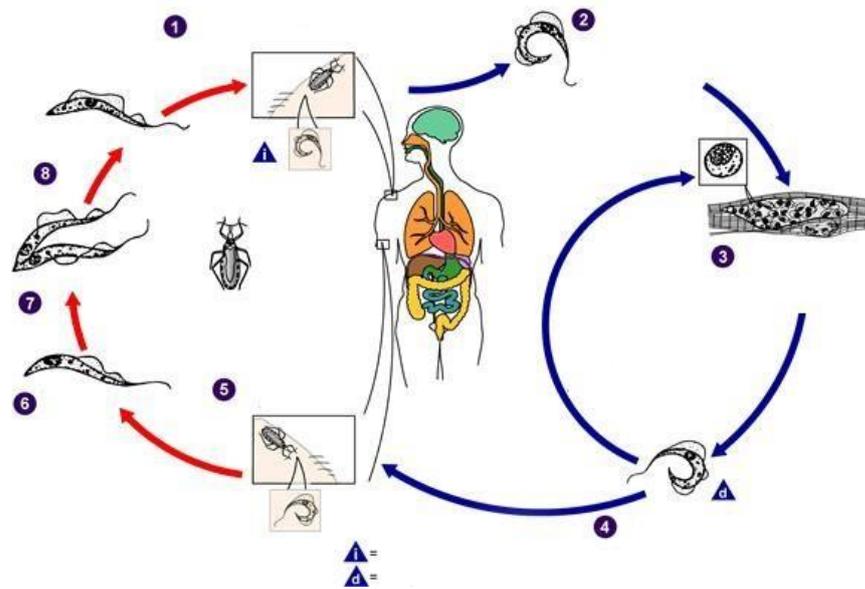


Figura 2. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Adaptado de <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>. **1.** Inicialmente, durante a hematofagia, o inseto pode defecar ou urinar no local da picada. As fezes/urina contêm a forma tripomastigota metacíclica do parasita e estas penetram no hospedeiro através de feridas ou membrana mucosa (conjuntiva, por exemplo). **2.** Os tripomastigotas metacíclicos, ao caírem na corrente sanguínea, invadem as células hospedeiras e se convertem em amastigotas. **3.** Os amastigotas se multiplicam por fissão binária. **4.** Amastigotas intracelulares se transformam em tripomastigotas, provocam ruptura celular e novamente caem na corrente sanguínea, infectando outras células ou continuando o ciclo. **5.** Os triatomíneos realizam o repasto sanguíneo e ingerem as formas tripomastigotas. **6.** O parasita muda a conformação no intestino do inseto (epimastigota). **7.** Ocorre a multiplicação de epimastigotas no trato gastrointestinal. **8.** Epimastigotas se transformam em tripomastigotas, que são eliminados nas fezes.

A transmissão se dá, principalmente, pela ação vetorial, especificamente por insetos triatomíneos. No entanto, também é possível ocorrer por transfusão sanguínea, ingestão de alimentos contaminados, transplante de órgãos, ou ainda de forma congênita (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Clinicamente, a doença de Chagas é classificada em fase aguda e crônica. A primeira é assintomática na maioria dos casos, apesar de 2 a 5% apresentar sintomas não característicos, como febre, náuseas e até quadros de hepatoesplenomegalia. A fase aguda dura, em média, de 4 a 8 semanas, momento em que os 70% dos indivíduos infectados desenvolvem a forma crônica assintomática (ZINGALES, 2018). No entanto, aproximadamente 30% desses indivíduos poderão apresentar sintomas característicos no coração, caracterizando a cardiomiopatia chagásica (Fig. 3) e em órgãos do sistema digestivo, como esôfago (Fig. 4) e cólon (Figura 5) (SIMÕES et al., 2018). Apesar de todos os conhecimentos obtidos a respeito da DC desde a sua descoberta, o papel que o parasita desempenha na fase crônica da doença ainda é incerto e alvo de discussões (HIGUCHI et al., 2003).

Dentre os parâmetros utilizados no acompanhamento de pacientes chagásicos, o eletrocardiograma é uma ferramenta de grande importância, sendo necessária, também, a avaliação sorológica e exames mais específicos como o ecocardiograma (FRAGATA-FILHO et al., 2016).

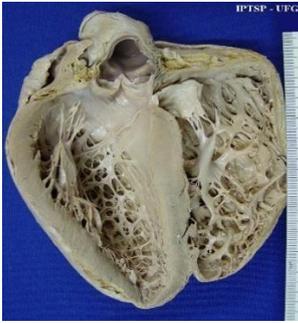


Figura 3
Cardiomiopatia chagásica



Figura 4
Megacólon chagásico



Figura 5
Megaesôfago chagásico

Imagens disponíveis em: <https://patologia.iptsp.ufg.br/n/4931>.

2.2 ASPECTOS ECONÔMICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a doença de Chagas é endêmica em 21 países da América Latina (WHO, 2018), e o número de casos vem aumentando também na Europa, América do Norte, Japão e Austrália, devido, principalmente, a processos migratórios (CHATELAN, 2017), sendo considerada a principal causa de cardiomiopatia infecciosa no mundo (CUCUNUBÁ et al. 2016). Um estudo publicado no periódico *The Lancet Infectious Diseases*, em 2013, fez um panorama global dos prejuízos econômicos causados pela Doença de Chagas. Constatou-se que os gastos mundiais excederam valores de 7 bilhões de dólares anuais, bem maiores quando comparados com o câncer de colo uterino (4,7 bilhões de dólares) e rotavírus (2 bilhões de dólares), sendo mais de 10 % desse valor oriundo de países desenvolvidos, como Estados Unidos e Canadá (LEE et al., 2013).

No Brasil, várias regiões são consideradas endêmicas para a doença de Chagas. Recentemente, no município de Santana (Amapá), em menos de 1 mês foram diagnosticados 9 casos da doença, e a Secretaria de Saúde suspeita que isso se deve ao consumo de açaí contaminado. Um levantamento epidemiológico realizado entre 2007 a 2016, constatou que a maioria dos casos da doença se concentra na região Norte do país, com cerca de 68% dos casos. As regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste apresentam os menores índices, variando de 2 a 3% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Apesar dos índices ainda elevados, desde a década de 1970 o Brasil vem adotando medidas que visam combater a proliferação da doença através da eliminação do inseto vetor, tendo recebido, em 2006, a certificação internacional da interrupção da transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). No entanto, o Ministério da Saúde (MS) atribui causas específicas a alteração da situação epidemiológica da DC, sendo as principais devido à existência de espécies de triatomíneos autóctones com elevado potencial de colonização e vários reservatórios do *Trypanosoma cruzi* próximos às populações locais. O MS também divulgou dados referentes à taxa de mortalidade da DC entre 2014 a 2016. Goiás é o estado com os maiores índices de Mortalidade (10,68 por habitante), no entanto a região Centro-Oeste em si foi a única que apresentou quedas consecutivas ao longo dos dois anos. O Norte e Nordeste foram as que mais apresentaram aumento da taxa de mortalidade (FONTE: Sistema de Informação de Mortalidade – SIM, 2016).

No estado de Pernambuco, a DC é alvo do programa SANAR, criado pela Secretaria Estadual de Saúde, com o intuito de fazer levantamentos epidemiológicos das principais doenças negligenciadas que atingem o estado e desenvolver estratégias de controle dessas doenças. No caso da DC, os municípios prioritários se concentraram, em maioria, no sertão pernambucano, atingindo, também, porém em menor quantidade, cidades do agreste e zona da mata (Figura 5). O SANAR aplicou medidas de combate ao vetor, com prazo máximo de execução até dezembro de 2018.

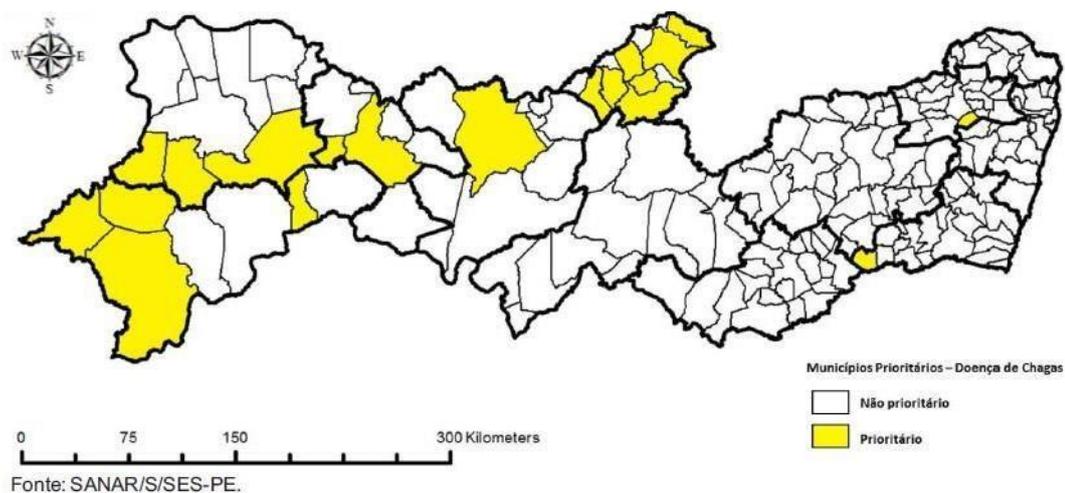


Figura 6. Distribuição geográfica dos municípios prioritários para doença de Chagas. Pernambuco, 2015. Fonte: SANAR, 2015.

2.3 QUIMIOTERAPIA CONVENCIONAL DA DOENÇA DE CHAGAS

Atualmente, duas medicações estão disponíveis para o tratamento de indivíduos acometidos pela DC, são eles o benzonidazol - BZ (Figura 6) e nifurtimox- NF (Figura 7). No entanto, essas drogas podem ocasionar uma série de efeitos colaterais, cujas ações citotóxicas já foram elucidadas em diversos estudos, além de suas eficácias na fase crônica serem alvos de discussão (LUIZA; SILVA, 2016). No Brasil, apenas o BZ é utilizado na terapia chagásica, sendo comercializado em comprimidos de 100 mg. Em pacientes agudos, a dose diária recomendada é de 10 mg/kg por dia, tanto em adultos quanto em crianças, por um período de 60 dias, enquanto nos pacientes crônicos recomenda-se 5 mg/kg, também durante 60 dias.

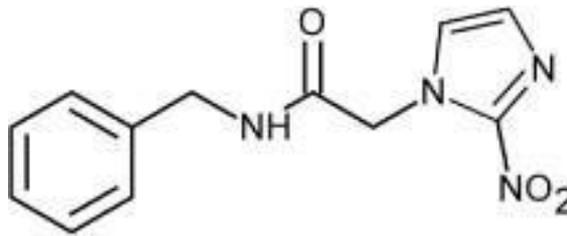


Figura 7. Estrutura química do benzonidazol. Disponível em: http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol34No8_1459_27-NT10823.pdf.

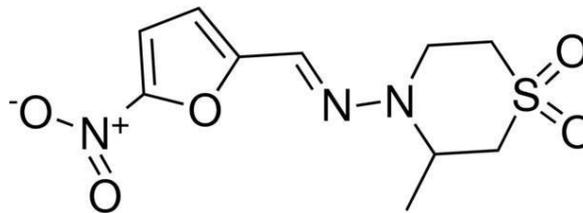


Figura 8. Estrutura química do nifurtimox. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n3415?lang=pt®ion=BR>.

O mecanismo de ação do BZ consiste, basicamente, em promover uma redução da síntese proteica, assim como incorporação dos precursores de RNA e incorporação da timidina em moléculas de DNA (RODRIGUES & CASTRO, 2002). Já o NF possui ação direta frente a formas amastigotas, promovendo a detoxificação parametabólica do oxigênio, em especial o peróxido de hidrogênio, o que altera a viabilidade e afeta negativamente o parasita (BERNARDES et al. 2006). A dermatite é um dos principais efeitos ocasionados pelo uso do

BZ, estando presente em aproximadamente 30% dos casos. Outros como polineuropatia, leucopenia, alterações hepáticas e agranulocitose são menos frequentes, e no geral, muitos indivíduos apresentam tolerância razoável a esses efeitos, apesar de em alguns casos ocorrer o abandono do tratamento devido a esses efeitos colaterais (ANDRADE et al., 2011; MACHADO et al., 2013).

Fragata-Filho et al. (2016) publicaram um estudo no qual foi avaliado, por mais de uma década, a evolução da doença em indivíduos acometidos pela fase crônica submetidos ou não ao tratamento com BZ. O eletrocardiograma, aliado a exames sorológicos e avaliação clínica foram os parâmetros utilizados para um total de 310 pacientes chagásicos na fase crônica, sem alterações no eletrocardiograma (ECG). Desses, 263 foram submetidos ao tratamento e 47 não foram tratados. Constatou-se que nos indivíduos tratados, foi menor a ocorrência de anormalidades eletrocardiográficas e eventos clínicos relevantes, como acidente vascular cerebral, mortalidade total e mortalidade cardíaca.

No entanto, existem outros estudos randômicos que põem em questionamento a eficácia do BZ em indivíduos acometidos pela fase crônica. Morillo et al. (2015), através de estudos randômicos envolvendo diferentes grupos, afirmam que em pacientes portadores da cardiomiopatia chagásica a droga não possui eficácia significativa. Vale ressaltar que ensaios *in vitro* realizados com BZ e NF constataram que essas drogas são consideravelmente neurotóxicas e possuem efeitos deletérios na adrenal, cólon e em tecidos mamários, especialmente o NF, além de ambas serem potencialmente carcinogênicas (SALAS et al., 2011).

Em 1997, a OMS estabeleceu uma série de critérios que os medicamentos antichagásicos devem atender para serem administrados em seres humanos. São eles: cura parasitológica nas duas fases da doença, efetividade em baixas concentrações, baixo custo, sem efeitos colaterais significativos, não oferecer mecanismos de resistência por parte do parasita, dentre outros (SILVA et al., 2012). Tanto o BZ quanto o NF são considerados inapropriados pelo fato de não atenderem boa parte desses critérios (BOIANI et al., 2010), e devido a isso, é crescente o esforço na busca de novos compostos com ação frente ao *T. cruzi* que atendam esses critérios e possam ser utilizados na terapia chagásica.

2.4 OBTENÇÃO DE NOVOS COMPOSTOS COM AÇÃO ANTICHAGÁSICA

Por se tratar de uma doença negligenciada, o desenvolvimento de novas medicações para terapia antichagásica não é muito viável a nível industrial por não gerar lucros significativos para as indústrias farmacêuticas. No geral, especialmente nos dias atuais, a maioria dos esforços concentrados na busca de novos compostos com ação frente ao *T. cruzi* se concentra em princípios ativos e compostos quimicamente sintetizados de plantas, em especial as quinonas e heterocíclicos (SILVA et al., 2012).

As quinonas estão sendo bastante investigadas para aplicações biotecnológicas devido às suas propriedades biológicas e estruturais. Podendo ser encontradas em diversas famílias de plantas e também em microrganismos, essa classe de moléculas já apresentou ação eficaz em ensaios antibacterianos, antifúngicos e antiparasitários, especialmente com ação anti-*T. cruzi* e anti-malária (SACAN et al., 2005). Dentre as principais quinonas de origem natural, as mais eficazes em testes frente ao *T. cruzi* foram lapachol, β -lapachona, α -lapachona e juglona (GOULART et al., 1997; SALAS et al., 2008; PINTO et al., 2009). Além das quinonas, outros compostos quimicamente sintetizados são promissores quanto ao potencial antiparasitário, a exemplo dos heterocíclicos.

Pagliari et al. (2010) sintetizaram derivados de 1-benzenesulfonil-2-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolina com moderada atividade antichagásica e baixa toxicidade. Dentre os compostos sintetizados, o denominado 52c apresentou efeitos consideráveis sobre o *T. cruzi*, com IC₅₀ de 11,44 μ M e seletividade a 30 μ M, além de ter demonstrado baixa toxicidade.

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.

Além dos compostos sintéticos, muitos estudos também relatam o potencial anti-*T. cruzi* de extratos provenientes de organismos fotossintetizantes, especialmente plantas. Conserva et al. (2019) extraíram butenolides da espécie *Nectandra oppositifolia* (Lauraceae) e testaram a ação desses compostos, *in vitro*, frente a formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*. Os compostos, numerados de 1 a 3, apresentaram IC₅₀ de 12,9, 29,9 e 15,5 μ M nas formas tripomastigotas, e 25,3, 10,1 e 12,3 μ M frente aos amastigotas intracelulares. Os autores ainda destacam que os compostos causaram alterações do potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) do parasita,

além de estudos *in silico* terem comprovado que esses compostos não possuem efeitos mutagênicos ou carcinogênicos.

Estudos realizados por Oliveira et al. (2016) a partir de extratos orgânicos de *Juncus acutus* relataram que esses são eficazes em ensaios frente às formas tripomastigota e amastigota intracelular. Os extratos foram obtidos com metanol e diclorometano, e das 94 amostras analisadas, a mais eficaz nos ensaios contra o parasita ($IC_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$) foi submetida ao fracionamento por HPLC, do qual 11 frações foram obtidas e avaliadas quanto a ação tripanocida. A fração 8 foi a mais expressiva nos ensaios, com IC_{50} de $4,1 \mu\text{g/mL}$. Análises estruturais permitiram a identificação química desses compostos, que foram 9,10-dihidrofenantrenes e benzocoumarins.

Outro estudo relevante a respeito da ação antiparasitária de plantas são os de Estevam et al. (2017). Foi avaliada a ação de óleos essenciais de sementes da espécie *Protium ovatum* (Burceraceae) frente a formas tripomastigotas, assim como a ação citotóxica desses óleos em linhagens LLCMK₂. Resultados promissores foram encontrados, visto que os óleos apresentaram IC_{50} de $28,55 \mu\text{g/mL}$ e toxicidade moderada, com CC_{50} de $150,9 \mu\text{g/mL}$. Spina et al. (2018) também reportaram que moléculas obtidas de *Oxalis erythrorhiza* inibem a proliferação de formas epimastigotas de *T. cruzi*, a partir de ensaios realizados *in vitro*.

2.5 MICROALGAS E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

A literatura traz o potencial antiparasitário, especificamente anti-*T. cruzi*, de uma considerável quantidade de espécies vegetais, sendo a maioria delas plantas e sementes. No entanto, outras fontes podem ser investigadas na busca de bioativos com ação antiparasitária, e os microrganismos, em especial os fotossintetizantes podem oferecer uma considerável inovação nesse aspecto, visto que são pouco explorados quanto à obtenção de bioativos antiparasitários.

Os microrganismos fotossintetizantes apresentam uma ampla biodiversidade no planeta, e nesse contexto destacam-se as microalgas, seres eucariontes e unicelulares que podem ser encontradas tanto em ambientes marinhos quanto nos de água doce e até mesmo em ecossistemas terrestres (HU et al., 2008; RIZWAN et al., 2018). As microalgas produzem metabólitos primários, que estão diretamente relacionados ao crescimento, desenvolvimento e reprodução, assim como os secundários (MOSTAFA, 2012). Muitos desses metabólitos

secundários são de alto valor comercial, e por serem intracelulares, localizados, especificamente, em estruturas internas como vacúolo e cloroplasto (PARNIAKOV et al., 2015), é necessária a utilização de técnicas eficientes na extração desses componentes, sendo a ruptura celular por ultrasonicação e agitação magnética alguns dos mais utilizados (CHU et al., 2006; LEE et al., 2015).

São várias as vantagens da utilização de microalgas na prospecção de moléculas biologicamente ativas, principalmente pelos seus requisitos nutricionais mínimos e baixo custo de produção (BRASIL et al., 2017). Os metabólitos primários produzidos por esses organismos apresentam uma complexa estrutura bioquímica, sendo constituídos por diversos tipos de carboidratos, proteínas, lipídeos, vitaminas e alguns minerais (PRADHAN et al., 2012). Boa parte desses componentes são dotados de propriedades biológicas distintas e por isso podem ser aplicadas em vários setores, desde comerciais, como alimentação e cosméticos, a utilização a nível industrial, especialmente o farmacêutico (CHU et al., 2012). A Tabela 1 apresenta os principais grupos de microalgas e seus respectivos compostos e aplicações biotecnológicas.

| Microalga | Compostos obtidos | Aplicações |
|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| <i>Chlorella</i> spp. | Luteína, β -caroteno | Farmacêuticas e nutritivas |
| <i>Dunaliella salina</i> | Carotenoides e β -caroteno | Farmacêuticas e nutritivas |
| <i>Odontella aurita</i> | Ácidos graxos | Cosméticos |
| <i>Phaedactylum tricornutum</i> | Lipídeos e ácidos graxos | Produção de combustíveis |
| <i>Scenedesmus almeriensis</i> | Luteína, β -caroteno | Nutritivas e cosméticos |
| <i>Spirulina platensis</i> | Proteínas e ácido linoleico | Farmacêutica e nutritiva |

Tabela 1. Principais aplicações biotecnológicas das microalgas. Fonte: acervo pessoal do autor, com informações obtidas de SIGAMANI et al. (2016).

A literatura descreve diversas atividades biológicas atribuídas a compostos bioativos de microalgas, sendo as antimicrobianas, antioxidantes, imuno-moduladoras e anti-cancerígenas as principais (MANIRAFASHA et al., 2016). Maadane et al., (2015) avaliaram a atividade antioxidante de fenóis e carotenoides obtidos de nove espécies distintas de microalgas, dentre

elas *Dunaliella salina* e *Chlorella* sp., utilizando água, etanol e a combinação de água-etanol como solventes de extração. Dentre os solventes testados, a extração com etanol apresentou os resultados mais relevantes, com IC₅₀ no valor de 283 ± 0,02 µg/mL para *D. salina* e IC₅₀ de 382 ± 0,03 µg/mL para *Chlorella* sp. Também foram relatados potenciais antioxidantes de alcaloides extracelulares nas espécies *Wollea saccata*, *Spirulina platensis* e *Phormidium fragile* (MOSTAFA, 2012).

Muitos bioativos oriundos da biomassa de microalgas apresentaram resultados promissores em ensaios de efeitos citotóxicos sobre linhagens de células cancerígenas. Gupta et al. (2014) avaliaram a ação de extrato orgânico da espécie *Chlorella* sp. obtido com dimetilsulfóxido (DMSO) frente à linhagem B16F10 (melanoma), e constatou-se que, a 2 µg/mL, o extrato foi capaz de diminuir em 50% a viabilidade dessas células. O extrato etanólico da microalga *Chaetoceros calcitrans*, em ensaios *in vitro*, demonstrou efeitos satisfatórios em duas linhagens de células do câncer de mama. A 3 µg/mL o extrato apresentou efeitos citotóxicos na linhagem MCF-7 A, reduzindo em 50% sua viabilidade, assim como em 12 µg/mL relatou os mesmos efeitos em MCF-10 A. Também foi constatado que *C. calcitrans* induziu apoptose na linhagem MCF-7, durante as fases subG0/G1, via modulação de CDK₂, MDM₂, p21Cip1, Cyclin A2, Bax e Bcl-2 (NIGJEH et al., 2013).

A ação antimicrobiana desses microrganismos vem sendo estudada há décadas. Muitos autores atribuem a atividade antimicrobiana de microalgas a compostos orgânicos como terpenos, fenóis, ácidos graxos e hidrocarbonetos voláteis halogenados (MAYER et al., 2009). Há estudos que também comprovam o potencial anti-hipertensivo de microalgas. Ko et al., (2016), ao avaliarem a ação de peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) extraídos da biomassa de *Chlorella ellipsoidea*, afirmam que essas moléculas biologicamente ativas representam uma inovação no setor farmacêutico, visto que possuem a capacidade de inibir a conversão da angiotensina 1 em angiotensina 2, processo que acarreta um aumento na pressão arterial.

Alguns polissacarídeos extraídos da biomassa de microalgas também são alvos de estudos quanto aos seus potenciais imunomoduladores. *Chlorella vulgaris*, por exemplo, cujas frações de polissacarídeos F1, F2 e F3, é capaz de induzir a produção de óxido nítrico pelas células RAW264,7, além de algumas citocinas inflamatórias como TNF-, IL-6 e IL-10 (TABARSA et al., 2015). Estudos semelhantes realizados por Kim et al. (2017) constataram a atividade imunomoduladora de polissacarídeos obtidos da espécie *Chlorella ellipsoidea*. Os

polissacarídeos foram extraídos por cromatografia de troca iônica, na qual obteve-se duas frações (F1 e F2). A glicose foi o maior monossacarídeo obtido dessas frações, com diferentes níveis de ramnose (0,2 – 11,6%), manose (0,4 – 2,6%) e galactose (1,8 – 27%). Ambas as frações estimularam as células RAW264.7 na produção de consideráveis níveis de óxido nítrico e várias citocinas, como IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-12, pela regulação do mRNA.

Alguns estudos sugerem que microalgas também podem ser fontes de obtenção de bioativos com ação antiparasitária, a exemplo espécie *Cladophora crispata*, que apresentou resultados promissores em ensaios frente a *Echinococcus granulosus*, quando comparado ao uso do albendazol (ATHBI et al., 2014). Diterpenoides, identificados pela primeira vez na espécie *Udotea flabellum* e *Halimeda* sp. (FENICAL & PAUL, 1984), assim como alcaloides e proteínas presentes nas *Chlorophytas* são alguns dos bioativos oriundos de microalgas com potencial antiparasitário (AL-NASIRI, 2010). No entanto, não há relatos na literatura da utilização de microalgas na prospecção de compostos com ação frente a protozoários como o *T. cruzi*.

2.5.1 *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris é uma microalga constituída por células morfológicamente esféricas (Figura 8), 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. Existem diversos pontos positivos que fazem dessa microalga uma das mais viáveis para serem utilizadas em pesquisas dentro da biotecnologia. Possui um rápido crescimento e sua composição bioquímica dificulta a invasão de agentes oportunistas (PRIBYL et al., 2013).

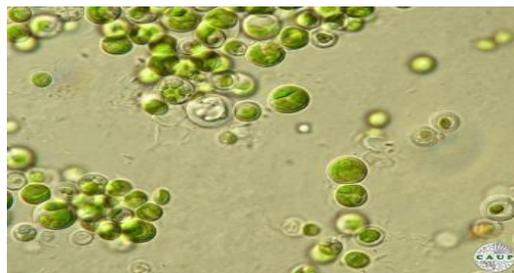


Figura 9. Morfologia da microalga *Chlorella vulgaris*. Disponível em: <https://botany.natur.cuni.cz/algo/database/node/110>.

Essa microalga é constituída bioquimicamente por diversos compostos lipídicos e proteicos, além da presença de íons e algumas vitaminas de interesse biotecnológico. Cerca de 42 a 58% da biomassa de *Chlorella vulgaris* é composta por proteínas, podendo essa quantidade variar de acordo com as condições de cultivo e fase de crescimento (SEYFABADI et al., 2011).

Em laboratório, *C. vulgaris* pode ser cultivada de duas formas: autotrófica e mixotrófica. No primeiro caso, a microalga necessita, basicamente, de CO₂, luz e alguns minerais para se desenvolver, enquanto em cultivos mixotróficos, o crescimento é suplementado com materiais orgânicos, em especial a glicose (LIANG et al., 2009). Em condições heterotróficas, a luz não é necessária, visto que a biomassa é alimentada com fonte de carbono orgânico. O cultivo é realizado em biorreator de tanque agitado ou fermentado. As fontes de carbono mais utilizadas no cultivo de *C. vulgaris*, além da glicose, são acetato, glicerol e glutamato (ZHANG et al., 2001).

As biomoléculas produzidas por essa microalga podem apresentar diferentes atividades biológicas. Estudos relatam que *Chlorella vulgaris* possui eficiência em testes antitumorais, anti-inflamatórios, imunomoduladores, antioxidantes e antibacterianos (VIJAYAVEL et al., 2007). Além da biomassa rica em compostos bioativos, *C. vulgaris* apresenta alta taxa de crescimento em curto tempo, aumentando a produtividade celular. No entanto, o maior problema na extração desses compostos consiste na rigidez da parede celular, exigindo métodos de extração relativamente sofisticados (URSU et al., 2014).

Plaza et al., (2012) avaliaram dois métodos distintos na extração de compostos antibacterianos oriundos da biomassa dessa microalga. Os métodos testados foram Pressurized Liquid Extraction (PLE) e Ultrasound-Assisted Extraction (UAE) no qual os solventes utilizados em ambos os processos de extração foram acetona, etanol e água, obtendo-se resultados relevantes em condições específicas frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* causadores de doenças em seres humanos.

2.5.2 *Scenedesmus* sp.

O gênero *Scenedesmus* (Figura 9) é constituído por um complexo grupo de microalgas encontrado, principalmente, em populações planctônicas. As espécies diferem entre si principalmente pela textura da parede celular, sendo as células formadas por um cloroplasto

simples, único e laminado. Muitas espécies de *Scenedesmus* também estão sendo investigadas quanto ao potencial biotecnológico, visto que possuem alto valor nutricional e a biomassa rica em diferentes compostos bioativos (GUEDES et al., 2011).



Figura 10. Morfologia de microalgas do gênero *Scenedesmus*. Disponível em: <https://www.landcareresearch.co.nz/resources/identification/algae/identification-guide/identify/guide/colonial/green-or-blue-green/organelles-grass-green/regular-structure/cells-ellipsoidal/scenedesmus>.

Muitos estudos relatam a importância de microalgas do gênero *Scenedesmus* na produção de biodiesel e aplicação em processos ambientais como a biorremediação, apesar de já existirem outros que demonstrem o potencial dessas microalgas na busca de compostos bioativos com propriedades farmacológicas (RUEN - NGAM, 2017). Dentre as atividades biológicas mais conhecidas de *Scenedesmus* sp., destacam-se as antimicrobianas, antivirais e antioxidantes. 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). No entanto, o extrato foi eficaz apenas em ensaios com *S. 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.

Afify et al. (2018) avaliaram a ação antiviral e antioxidante de proteínas obtidas de *Scenedesmus obliquus*, sendo essas submetidas a hidrólise por 3 enzimas. Foi constatado, por

SDS-PAGE, que o extrato proteico de *S. obliquus* é composto por 4 aminoácidos não essenciais, que são arginina, asparagina, alanina e histidina, e 1 essencial, que é a lisina. 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.

3 RESULTADOS

3.1 ANTIPARASITIC ACTIVITY OF *Chlorella vulgaris* AND *Scenedesmus* sp. AQUEOUS EXTRACTS AGAINST *Trypanosoma cruzi*: AN *In vitro* STUDY

Artigo a ser submetido à Revista **Food and Chemical Toxicology**

Antiparasitic activity of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. aqueous extracts against *Trypanosoma cruzi*: an *in vitro* study

José Noé da Silva Júnior ^a, Ana Carla da Silva ^b, Virginia Maria Barros de Lorena ^b, Aldeni José da Silva ^c, Silvana de Fátima Ferreira Caires ^c, Ana Lúcia Figueiredo Porto ^c, Daniela de Araújo Viana Marques ^d, Raquel Pedrosa Bezerra ^c.

^a Federal University of Pernambuco, LIKA – Recife, Pernambuco, Brazil

^b Oswaldo Cruz Foundation, Aggeu Magalhães Institute, Fiocruz, IAM – Recife, Pernambuco, Brazil

^c Federal Rural University of Pernambuco, UFRPE – Recife, Pernambuco, Recife, Brazil

^d University of Pernambuco, UPE – Serra Talhada, Pernambuco, Brazil.

^e University of Pernambuco, UPE – Instituto de Ciências Biológicas, Campus Santo Amaro, Pernambuco, Brazil.

ABSTRACT

American trypanosomiasis is a neglected parasite disease endemic in several Latin American countries, and responsible for high mortality rates. Conventional therapy for *Trypanosoma cruzi* infections occurs through use of benznidazole and nifurtimox, however, these drugs are highly hepatotoxic, nephrotoxic and not very effective in chronic phase. Therefore, the search of new trypanocidal compounds of low cost, reduced toxicity and effective is necessary. Natural products are being increasingly investigated for use in antiparasitic therapy, and in this context, microalgae can be promising in the search of anti-*T. cruzi* compounds, since they are rich in bioactive molecules that present many biological properties. In this paper, for the first time, we investigated the antiparasitic activity of two species of microalgae, that was *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. against *T. cruzi* trypomastigotes. Aqueous extracts were obtained through Tris HCl buffer (0,2 M, pH 7,2) being subsequently mixed and homogenized by magnetic stirring. These extracts were promising against *T. cruzi* trypomastigotes, in which *C. vulgaris* presented LC₅₀ at 32,9 µg/ml and *Scenedesmus* sp. at 36,4 µg/ml. In addition, *C. vulgaris* aqueous extract had moderate toxicity against Vero cells (CC₅₀ = 254,2 µg/ml), demonstrated selectivity of 7,7. *Scenedesmus* sp presented considerable toxicity in those cells (CC₅₀ = 82,85 µg/ml, with low selectivity (2,45).

Keywords: *Microalgae*, *Trypanosoma cruzi*, *Cytotoxicity*, *antiparasitic activity*.

INTRODUCTION

Chagas disease, caused by protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, is a neglected tropical disease that represent a serious health problem in the world. According World Health Organization, about 8 million of people are infected, and this disease is endemic in 21 Latin American countries, including Brazil (Who, 2018). However, the epidemiological profile of Chagas disease has been changing in the last years, with registered cases in Europe and North America because the increase of factors as immigration, blood transfusion transmission and the contaminated food ingestion (Chatelain, 2017). The global economic losses of Chagas disease exceed 4 billion dollars annual (Cuncubá et al., 2016; Lee et al., 2013).

Benzonidazole and Nifurtimox are the only chemotherapeutic agents available for Chagas disease treatment, having direct action against circulating trypomastigotes and intracellular amastigotes. However, these drugs are very toxic and not effective in patients affected by the cronic phase (Morillo et al., 2015). Experimental studies performed with nifutrimox and benzonidazole showed that these drugs have a high neurotoxicity and deleterious effects on adrenal gland, colon and breast tissue (Salas et al., 2011). Therefore, it is necessary to search for new effective therapeutic agents with reduced toxicity that can be used in the treatment of this disease (Bi et al., 2011).

Photosynthetic microorganisms, such microalgae, can be an alternative in the search of new trypanocidal compounds, due to the amount the complexity of bioactive compounds that these organisms can synthesize (Pradhan et al., 2012). Microalgae are a group of unicelular or simple multicelular microorganisms, being vitamins polysaccharides and proteins represent the major chemical composition of these organisms (Mohan et al., 2009) and many biological activities were reported in these microorganisms, such as antibacterial, antifungal and anti-oxidant (Ghasemi et al., 2007). Due to the emerging infectious disease, specifically bacterial and viral infections, many species of microalgae was explored for their therapeutical potential (Mayer et al., 2005).

Chlorella vulgaris and *Scenedesmus* sp. are one of these organisms, structurally simple, abundant in nature and with a high capacity of cell multiplication, requiring CO₂, light and mineral to reproduce. *C. vulgaris* is interesting for different types of industry, because has many health benefits, such as assisting gastric ulcers, wounds, constipation, anemia, hypertension, diabetes and neuroses (Mohamed et al., 2013). Those microalgae has been show imune-modulation and cancer properties (Justo et al., 2001). Many species of *Scenedesmus* are being

used for biotechnological applications (Ishaq et al., 2016) and biological activities were reported in these species, such as antibacterial, enhances immune response and antioxidant (Guerin et al., 2003).

Due to biological properties attributed to many species of microalgae, this study aims to determine the antiparasitic activity, *in vitro*, of bioactive compounds extracted from *C. vulgaris* and *Scenedesmus* sp. biomass against *T. cruzi* trypomastigotes forms, as well to verify the cytotoxicity in Vero cell lines of this compounds.

MATERIAL AND METHODS

MICROALGAE GROWTH

C. vulgaris (UTEX, 1803) was obtained from Texas University collection culture and maintained and growth on Bold Basal Medium (Bischoff and Bold, 1963). *Scenedesmus* sp. (SISGEN A5F5402) was isolated from Apipucos weir, North Zone of Recife, Pernambuco, Brazil and maintained on BG-11 Medium (Rippka, 1979). Both species grew at 25 °C and under continuous light intensity of 52 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. At the late exponential growth phase, microalgae harvested by centrifugation at 3500 $\times g$, 4 °C for 15 min and the cell used for biological activities.

BIOACTIVE COMPOUNDS EXTRACTION

Extracts from *C. vulgaris* and *Scenedesmus* sp. were prepared using Tris Hcl Buffer, 0,2 M, pH 7.2 as solvent. Two hundred grams of dried cells with 1 ml of solvent were mixed and homogenized for 9 h by magnetic stirring (Chu et al., 2007). After extraction, the extracts were centrifuged at 2500 $\times g$, 4 °C for 10 min and supernatant used to cytotoxicity and anti-*T. cruzi* assay.

PROTEIN ESTIMATION OF CRUDE EXTRACTS

Total protein content in crude extract was determined using protein test kit BCA (BCATM Protein Assay Kit, Thermo SCIENTIFIC).

CELL LINES

For *T. cruzi* and cytotoxicity *in vitro* tests, Vero cell culture was used. Cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 100 $\mu\text{g/ml}$ of streptomycin, 10% of fetal bovine serum

and kept at 37 °C in 5% of CO₂. After 5 days of growth, cells were trypsinized and centrifuged at 2500 xg for 5 min.

CYTOTOXICITY ASSAY

Cell suspension was seeded at 1×10^6 cells.ml⁻¹ concentration on a 96-well microplate with RPMI 1640 medium. The assay was performed by Mosmann et al. (1983) with some modifications. VERO cells were treated with crude extracts at different concentrations, that was 100, 50, 25, 12.5, 6.25 and 3.15 µg/ml. The plates were incubated at 37 °C, 5 % of CO₂ for 24 hours. Cytotoxicity activity of *C. vulgaris* and *Scenedesmus* sp. was performed by MTT colorimetric method (MTT; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide) at 570 nm. DMSO and RPMI were determined with negative controls and RPMI 1640 medium was the positive control. The percentage of cell viability was determined according Esperadim et al. (2013), using the formula: % cell viability = $1 - [(Y-N)/(N-P)] * 100$, where Y is absorbance of wells containing Vero cells and *C. vulgaris* and *Scenedesmus* sp. aqueous extracts; N is the negative control and P the positive control. Toxicity degree was determined according Osorio et al. (2007), classified as highly toxic, toxic and moderately toxic. Cytotoxicity assay was performed in two independent experiments, in triplicate.

ANTIPARASITIC ASSAY

Y strain of *Trypanosoma cruzi* (1×10^7) was kept at VERO cells cultivated in RPMI 1640 medium supplemented with fetal bovine serum at 10%. Trypomastigotes forms of *T. cruzi* were obtained after 5 days of infection, and cells were counted in a Neubauer hemocytometer, in which the parasite concentration was adjusted to 1×10^6 . The assay was performed in 96-well microdilution plates and in anti-*T.cruzi* trial, *C. vulgaris* and *Scenedesmus* sp. extracts were evaluated in triplicate at concentrations of 100, 50, 25, 12.5, 6.25 and 3.15 µg/ml. Benzonidazol, in the concentrations of 2.1, 0.5, 0.25 and 0.12 µg/ml, was the positive control. Microplate was incubated at 37 °C, 5% of CO₂ for 24 hours. The results were quantitatively verified by Rashed et al. (2016) method, in which parasite lyses percentage was determined by comparison of the control group and treatment. Anti-*T.cruzi* action of *C. vulgaris* and *Scenedesmus* sp. was determined according Osorio et al. (2007), classified as highly active, active, moderately active and inactive. Two independent experiments were performed, in triplicate.

STATISTICAL ANALYZES

Determination of cytotoxic concentrations (CC_{50}) and the half maximal concentration (LC_{50}) of *C. vulgaris* and *Scenedesmus* sp extracts antiparasitic activity was carried out by non-linear regression curves of GraphPad Prism 8.0 version Windows Software and ANOVA statistical software. The Selective Index (SI) was determined by the formula: Selective Index (SI) = LC_{50} Vero cells / LC_{50} Trypomastigotes forms.

ETHICAL CONSIDERATIONS

The present study was approved by the Research Ethics Committee of IAM/Fiocruz (CAAE: 07511612.2.0000.5190).

RESULTS

Figures 11 and **13** shows the results about cytotoxic activities of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. crude extracts, respectively. *Scenedesmus* sp. demonstrated a considerable toxicity in Vero cells in the highest concentrations (100 $\mu\text{g/ml}$), causing the death of 52,9% of those cells. Low concentrations of the extract demonstrated reduced toxicity, in which the survival rate was 74,6% at 6 $\mu\text{g/ml}$ and 68% at 3 $\mu\text{g/ml}$. CC_{50} of *Scenedesmus* sp. was 82,85 $\mu\text{g/ml}$. *C. vulgaris* was not toxic at any concentration tested, with CC_{50} estimated at 254,2 $\mu\text{g/ml}$.

Both microorganisms were effective against trypomastigotes forms of *T. cruzi*. At 100 $\mu\text{g/ml}$, *Scenedesmus* sp. and *C. vulgaris* extracts showed considerable inhibition percentages of parasite viability, that was 84% and 86,5%, respectively. In low concentrations, specifically at 3 $\mu\text{g/ml}$, the extracts demonstrated small effects against *T. cruzi*, in wich *Scenedesmus* sp inhibited 26% of trypomastigote viability and *C. vulgaris* reduced viability only 20%.

IC_{50} of *Scenedesmus* sp. and *C. vulgaris* was 36,4 $\mu\text{g/ml}$ and 32,9 $\mu\text{g/ml}$, respectively (**Fig. 12 and 14**), but *C. vulgaris* extract was most selective (IC_{50} = 32,9 $\mu\text{g/ml}$, SI = 7,7) than *Scenedesmus* sp. (LC_{50} = 36,4 $\mu\text{g/ml}$, SI = 2,45) (**Table 1**). Benzonidazole was very effective against the parasite in all concentrations tested, with LC_{50} at 1.8 $\mu\text{g/ml}$.

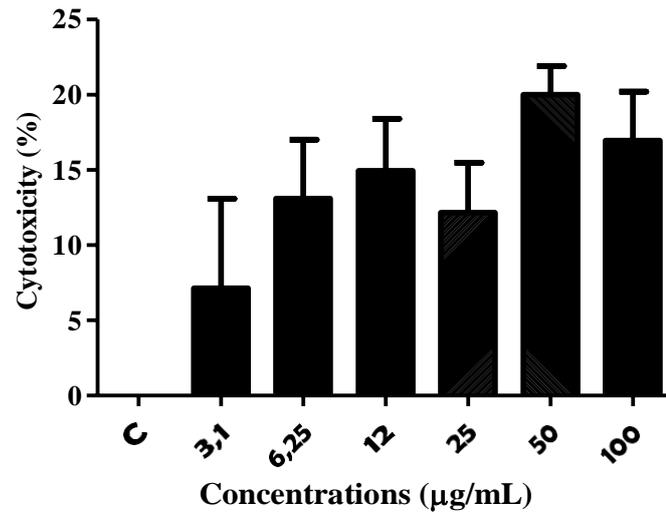


Figure 11. Cytotoxic activity of *Chlorella vulgaris* crude extract in Vero Cells mean SD (\pm) of two independent experiments. ANOVA tests, $p < 0,1015$. CC_{50} estimated at 254,2 µg/ml.

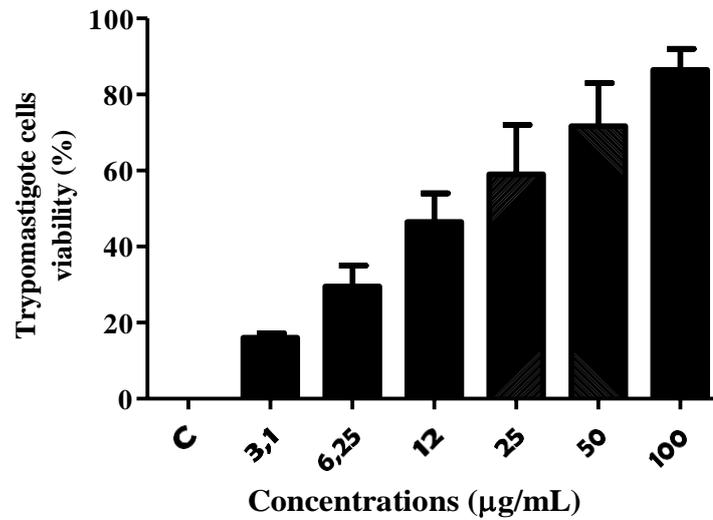


Figure 12. Antiparasitic activity of *Chlorella vulgaris* crude extract against trypomastigotes forms of *Trypanosoma cruzi*, mean SD (\pm) of two independent experiments. ANOVA tests, $p < 0,001$. LC_{50} at 32,9 µg/ml.

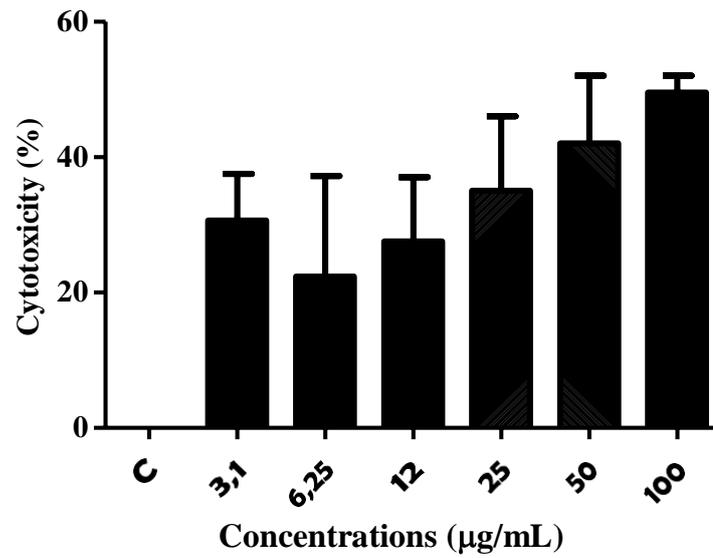


Figure 13. Cytotoxic activity *Scenedesmus* sp crude extract in Vero Cells mean SD (\pm) of two independent experiments. ANOVA tests, $p < 0,007$. CC_{50} at 82,85 $\mu\text{g/ml}$.

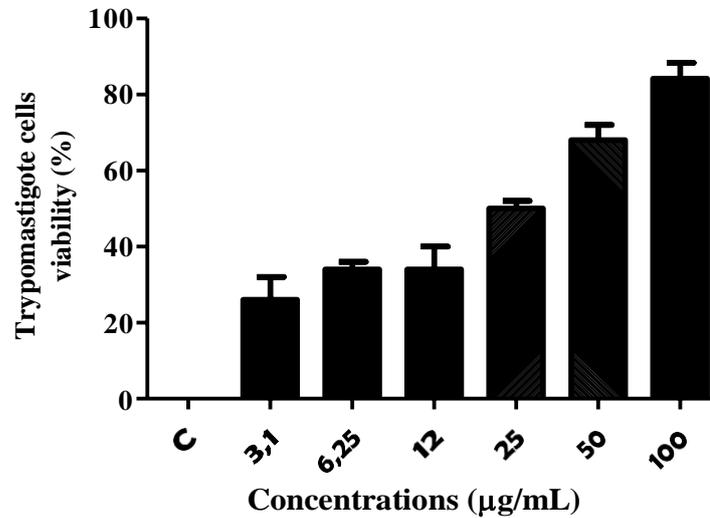


Figure 14. Antiparasitic activity of *Scenedesmus* sp. crude extract against trypomastigotes forms of *Trypanosoma cruzi*, mean SD (\pm) of two independent experiments. ANOVA tests, $p < 0,0001$. LC_{50} at 36,4 $\mu\text{g/ml}$.

| Extracts | Concentration $\mu\text{g/mL}$ | | Selectivity index (SI) Trypomastigote |
|---------------------------|---|---|--|
| | Cytotoxic activity (CC_{50}) | Antiparasitic activity (LC_{50}) | |
| <i>Scenedesmus</i> sp. | 89,4 | 36,4 | 2,45 |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | 254,2 | 32,9 | 7,70 |

Table 2. Effects and Selectivity index (SI) of *Scenedesmus* sp. and *Chlorella vulgaris* extracts on the viability of VERO cells and trypomastigotes forms of *Trypanosoma cruzi*.

DISCUSSION

In this study, *Scenedesmus* sp. and *C. vulgaris* aqueous extracts showed different effects in Vero cell line. According Osorio et al. (2007), compounds can be classified as highly toxic ($\text{CC}_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$), toxic ($\text{CC}_{50} > 10 < 100 \mu\text{g/ml}$), moderately toxic ($\text{CC}_{50} > 100 < 1000 \mu\text{g/ml}$) and potentially non-toxic ($\text{CC}_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$). Therefore, *Scenedesmus* sp. was classified with a toxic compound (CC_{50} of 82,85 $\mu\text{g/ml}$) while *C. vulgaris* was moderately toxic (CC_{50} of 254,2 $\mu\text{g/ml}$).

Some species of microalgae were evaluated for their cytotoxicity action. Methanolic extracts of *Chlorella vulgaris* and *Chlorella pyrenoidosa* showed 50% inhibition (IC_{50}) of WRL68 cells of 92 $\mu\text{g/ml}$ and 87 $\mu\text{g/ml}$, respectively, after 72 hours of treatment (Raikar et al., 2018). These organic compounds of *C. vulgaris* and *C. pyrenoidosa* were more toxic to WRLS68 cells, when compared to cytotoxic activity of *C. vulgaris* aqueous extract in Vero cells. However, *Scenedesmus* sp. aqueous extract demonstrated similar cytotoxic effects of *C. vulgaris* and *C. pyrenoidosa* methanolic extracts, in Vero cells.

Studies carried by Sib et al. (2016) demonstrated the cytotoxicity effects of methanolic, hexane and chloroform extracts of *Chlorella vulgaris* in RAW 264,7 cells. As well in our studies performed in Vero cells, organic compounds of *C. vulgaris* inhibited RAW 264,7 cell growth in a dose-dependent manner, in which CC_{50} was 125 $\mu\text{g/ml}$ to methanolic extract and 250 $\mu\text{g/ml}$ to hexane and chloroform extracts.

Similar cytotoxic effects of *C. vulgaris* obtained in this study were found in other species of microalgae, such as ethanolic extracts of *Chaetoceros calcitrans* in PBMC cells (Nigjeh et al., 2013) and protein extracts of *Scenedesmus obliquus*, in HEp-2 cells (Afify et al., 2018). However, *Scenedesmus* sp. was more toxic to Vero cells, compared with these studies.

C. vulgaris and *Scenedesmus* sp. presents a biochemical composition constituted by proteins, minerals, phenols etc. *Chlorella* supplements based on fibers, proteins and carbohydrates are marketed in several countries, such Japan and Brazil, being a nontoxic product, which can be tolerated by cells (Dineshkumar et al., 2017). Therefore, according those analyzes, microalgae cytotoxic effects are related to extraction method and concentrations of compounds, as well the cell line studied.

A series of biological properties of compounds obtained by microalgae were related, such as antibacterial, immuno-modulators, anti-cancer and antioxidant (Manirafasha et al., 2016). However, few studies report antiparasitic activity of these organisms, especially anti-protozoal action. Lorena et al. (2009) affirm that microalgae can have bioactive compounds previously identified in other organisms with trypanocidal potential, and some authors attribute this effect to different molecules, such as alkaloids, peptides, tannins, saponins, triterpenes and phenols (Molera and Semesi, 1996) as well as proteins (Athbi et al., 2011).

Anti-*T.cruzi* activity of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. is described by this paper for the first time. The extracts were classified as highly active ($LC_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$) active ($LC_{50} > 10 < 50 \mu\text{g/ml}$) moderately active ($LC_{50} > 50 < 100 \mu\text{g/ml}$) and inactive ($LC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$) (Osorio et al., 2007). In this case, *C. vulgaris* and *Scenedesmus* sp. extracts were active against trypomastigotes forms of *T. cruzi* (IC_{50} of 32,9 and 36,4 $\mu\text{g/ml}$, respectively).

Literature describes many natural compounds with trypanocidal action, especially the obtained by plants and algae, in some cases. De Felício et al. (2010) demonstrated that *n*-hexane and dichloromethane fractions of *Bostrychia tenella* (Rodophyta) showed activity against *T. cruzi* trypomastigotes, and IC_{50} values were 16,8 to *n*-hexane fraction and 19,1 $\mu\text{g/ml}$ to dichloromethane fraction. Those compounds were more effective against *T. cruzi* than *C. vulgaris* and *Scenedesmus* sp. aqueous extracts, in low concentrations. However, cytotoxic effects were not reported in the study, as well the compounds selectivity.

Estevam et al. (2017) evaluated the effects of essential oils of *Protium ovatum* (Burceraceae) leaves against *T. cruzi* trypomastigotes. They observed an increase in the lysis of trypomastigotes forms in high concentrations, with IC_{50} values of 28,55 $\mu\text{g/ml}$ and a selective index of 5,2. Similar effects were observed in this study, but *C. vulgaris* was more selective than *P. ovatum* ($SI = 7,7$), while *Scenedesmus* sp. was less selective ($SI = 2,45$).

Huertas et al. (2018) showed the trypanocidal action of *Piper jericóense*, a pantropical group of plants with nearly 2000 species. Benzimidazole was used as a control, in which showed IC_{50} of 20 $\mu\text{g/ml}$ against *T. cruzi* and was toxic to Vero cells (CC_{50} of 57,49 $\mu\text{g/ml}$). A furofuran lignan of *P. jericóense* was isolated and their cytotoxic and trypanocidal effects were evaluated.

As well as the aqueous extract of *C. vulgaris*, *P. jericoense* furofuran showed moderate toxicity in Vero cells, with CC_{50} value of 263,6 $\mu\text{g/ml}$. However, *C. vulgaris* was more effective than *P. jericoense* (LC_{50} of 97,6 $\mu\text{g/ml}$ and $SI = 2,7$) against *T. cruzi* trypomastigotes in low concentrations, being, therefore, more selective. *Scenedesmus* sp. demonstrated higher trypanocidal activity compared with *P. jericoense*, but was more toxic to Vero cells (CC_{50} of 82,85 $\mu\text{g/ml}$) and less selective ($SI = 2,45$).

Considering the existence of many compounds presents in *C. vulgaris* and *Scenedesmus* sp. extracts, a more detailed biochemical study is necessary, specifically the identification of compounds with anti-*T. cruzi* action, as well the action mechanism of these against the parasite.

CONCLUSION

This study revealed that aqueous extracts of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. demonstrated effects against trypomastigotes forms of *Trypanosoma cruzi*. *C. vulgaris* extract was the most selective, causing a moderately toxicity in Vero cells line and inhibition percentages of parasite viability in different concentrations. *Scenedesmus* sp extract, although it has been effective in trials against the parasite, was less selective and more toxic than *C. vulgaris*. A more detailed search is necessary to identify the antiparasitic compounds presents in both extracts and their action mechanisms.

3.2 PATENTE: ANTICHAGÁSICO OBTIDO DE MICRORGANISMO FOTOSSITETIZANTE E SUA FORMULAÇÃO

RELATÓRIO DESCRITIVO

CAMPO DA INVENÇÃO

[01] Esta invenção refere-se ao processo de obtenção de um novo produto anti-chagásico natural e atóxico, obtido do extrato aquoso da microalga *Chlorella vulgaris*. Uma característica do presente invento é a utilização de crioprotetores ao produto durante o processo de formulação, podendo esse ser uma alternativa viável, eficaz e de baixo custo no controle de infecções ocasionadas pelo *Trypanosoma cruzi*. Esta invenção situa-se no campo da Biotecnologia.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[02] A doença de Chagas tem como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*, protozoário hemoflagelado que pode ser transmitido a seres humanos e animais principalmente pela ação vetorial, podendo essa transmissão ocorrer, também, pela ingestão de alimentos contaminados, transfusão sanguínea e de forma congênita. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2018) a doença de Chagas é endêmica em 21 países da América Latina. No entanto, casos da doença estão sendo registrados em países economicamente desenvolvidos, como Estados Unidos, Canadá e alguns da Europa, e isso ocorre, principalmente, devido ao intenso processo migratório que vem aumentando nos últimos anos (CHATELAIN et al., Computational and Structural Biotechnology Journal, 15, 98-103, 2017). Vale ressaltar que atualmente cerca de 8 milhões de pessoas no mundo estão infectadas com o *T. cruzi* (WHO, 2018).

[03] Atualmente, existem dois medicamentos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas, que são o benzonidazol e nifutrimox (MARIN-NETO et al., Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 104, 319-324, 2008). No entanto, estudos relatam que essas drogas podem ocasionar sérios efeitos colaterais, o que algumas vezes acarreta no abandono do tratamento. No Brasil, apenas o benzonidazol é comercializado, e ensaios experimentais *in vitro* realizados com ambos os medicamentos evidenciaram elevada neurotoxicidade, danos testiculares,

toxicidade ovariana, além de efeitos deletérios na adrenal, cólon e tecido mamário; e no caso do benzonidazol, além dos efeitos maléficos ocasionados na adrenal e cólon, também mostrou-se como inibidor de vários xenobióticos biotransformados pelo sistema do citocromo P450. Vale ressaltar que tanto o benzonidazol quanto nifutrimox são considerados agentes mutagênicos, podendo ocasionar a formação de tumores (SALAS et al., *Current Medicinal Chemistry*, 18, 144-161, 2011). Logo, a busca de novos compostos eficazes contra o *T. cruzi* é necessária, preferencialmente atóxicos para mamíferos, que sejam de baixo custo e eficazes no tratamento da enfermidade, visto que, por se tratar de uma doença negligenciada, há um grande desinteresse por parte da indústria farmacêutica em produzir novos fármacos dessa natureza.

[04] Métodos de obtenção de moléculas bioativas com ação anti-*T. cruzi* já são descritos na literatura, em especial extratos metanólicos oriundos de vegetais como plantas, sementes e, em alguns casos, macroalgas (GAZA et al., *Acta Tropica*, 136, 14-18, 2014). Extratos etanólicos de *Eugenia uniflora*, por exemplo, apresentaram resultados relevantes em testes contra a forma epimastigota de *T. cruzi*, no qual a 100 µg/mL constatou-se inibição de 80% do crescimento do parasita, com EC₅₀ de 62,76 µg/mL (SANTOS et al., *Experimental Parasitology*, 131, 130-132, 2012). Felício et al. (2010) relataram que frações de *n*-hexano e diclorometano obtidas de *Bostrychia tenella* foram eficazes em ensaios *in vitro* frente a formas tripomastigotas, com IC₅₀ de 16,8 e 19,1 µg/mL, respectivamente, enquanto Estevam et al. (2017) relataram efeitos promissores de óleos essenciais extraídos da espécie *Protium ovatum* contra formas tripomastigotas do parasita, com índice de seletividade de 5,2. O presente invento, diferente dos estudos aqui apresentados, propõe a utilização de solventes aquosos na extração de moléculas com ação tripanocida, sendo mais viável industrialmente, além de não provocar danos ao ambiente.

[05] Também são descritos na literatura o potencial de compostos semi-sintéticos frente a formas evolutivas do *T. cruzi*. Lignanas como a cubebina e seus derivados semi-sintéticos foram letais para formas tripomastigotas, com IC₅₀ variando de 86,3 µg/mL (O-metil-cubebina) a 0,9 µg/mL (hinokinin) (US 7521569B2). Substâncias sintetizadas a partir de derivados tiazolidínicos e imidazolidínicos também são fontes promissoras no combate à infecção pelo *T. cruzi*, e são menos tóxicas para linhagem de células de camundongo comparadas a drogas como benzonidazol e nifurtimox. Estudos experimentais *in vitro* constataram que boa parte dos derivados foram letais para formas tripomastigotas em concentrações variando de 3,62 a 33,5 µg/mL (PI 1101273-0 A2).

[06] A patente MX 2016017175 A demonstra a ação tripanocida da ketanserina, podendo esta ser administrada preferencialmente de forma oral, em cápsula, comprimido ou

xarope, assim como por via parenteral em forma de dissolução, suspensão ou emulsão estéril. A substância apresentou IC₅₀ de 13.6 µg/mL frente a cepa NINOA de *T. cruzi*.

[07] Extratos hidroalcoólicos de folhas da espécie *Arrabidaea brachypoda*, especialmente a partição diclorometano, foram purificados por cromatografia líquida a média pressão, conforme o documento (BR 102013031927-9 A2). Esses compostos foram letais para formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi*, assim como em cepas de *Leishmania amazonensis* e *Plasmodium falciparum*, em concentrações de 100 a 10 µg/mL. Também não apresentaram efeitos citotóxicos em linhagens de macrófagos obtidos de camundongos BALB.

[08] Mediante o exposto, a presente invenção apresenta-se como inovadora em relação às demais pelo fato de propor a utilização de microrganismos fotossintetizantes para obtenção de compostos com ação tripanocida, visto que podem ser cultivados em ambientes diversos e submetidos à diferentes condições físico-químicas, como luminosidade, temperatura e aeração. Dependendo das condições de cultivo, a biomassa pode ser obtida em larga escala e em curto espaço de tempo, especialmente os que são suplementados com fontes orgânicas (GAO et al., *Bioresource Technology*, 282, 118-124, 2019).

[09] A maioria dos compostos com ação anti-*T.cruzi* descritos na literatura são provenientes de organismos vegetais, em especial os superiores. No entanto ainda há muitos grupos desse tipo que não foram bem explorados quanto aos seus respectivos efeitos anti-*t.cruzi*, a exemplo dos microrganismos fotossintetizantes. A obtenção de compostos bioativos provenientes de microrganismos fotossintetizantes, especificamente as microalgas e cianobactérias, também vem ocorrendo com frequência nos últimos anos, visto que esses organismos possuem uma diversidade de atividades biológicas, sendo as antibacterianas, antifúngicas, anti-cancerígenas, imuno-moduladoras e anti-hipertensivas (GHASEMI et al., 2007; DAUVILEE et al., 2010).. São várias as vantagens da utilização desses microrganismos na prospecção de compostos bioativos para obtenção de produtos farmacêuticos e/ou nutracêuticos. Necessitam, basicamente, de luz, CO₂ e minerais para se desenvolverem, e ao serem cultivadas em fotobiorreatores, a produção de biomassa e consequente obtenção moléculas biologicamente ativas aumenta consideravelmente, além de não apresentarem efeitos nocivos ao meio ambiente (BR 102016025616-0).

[10] *Chlorella vulgaris* é uma dessas microalgas, estruturalmente simples, de rápido crescimento e constituída por elementos que a caracterizam como agente de interesse industrial, visto que já demonstrou eficácia em diversos ensaios in vitro e in vivo em atividades antioxidantes, imuno-moduladoras e anti-câncer e antibacterianas (SIB et al, *Pharmacognosy Research*, 8, 118-122). Também é frequente a busca de compostos de valor nutricional oriundos

dessa microalga. O documento WO2018178214 (A1), por exemplo, relata que espécies de *Chlorella* e de várias outras microalgas são fontes promissoras quando se trata da formulação de produtos nutracêuticos, em especial os de alto teor proteico. Vale ressaltar que *Chlorella* já é comercializada como suplemento alimentar à base de proteínas, fibras, vitaminas, carboidratos e outros nutrientes essenciais ao bom funcionamento do metabolismo, o que a caracteriza como produto desprovido de toxicidade e que pode ser ingerido por seres humanos sem riscos à saúde, de acordo com a avaliação de órgãos competentes (ANVISA, Suplementos, documento de 2017).

[12] Apesar de já existirem estudos que demonstram modelos de formulação de novos produtos com ação anti-chagásica, em especial através do uso de elementos presentes em medicações como benzonidazol e nifutrimox, não há relatos da ação antiparasitária das espécies de *Chlorella*, especificamente quando se trata da eficácia frente a protozoários como *Trypanosoma cruzi*. Portanto, diante do que foi exposto no estado da técnica, não foram encontrados documentos que mencionem os elementos essenciais preteridos na presente invenção, o que a caracteriza como nova.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[13] A presente invenção propõe um modelo de formulação de um composto com ação anti-*T.cruzi* proveniente do extrato oriundo da biomassa de microrganismos fotossintetizantes, apresentando elementos desejáveis como baixa toxicidade em células de mamíferos e ação eficaz contra o parasita.

[14] O presente invento apresenta um produto anti-chagásico à base do extrato líquido obtido da biomassa de *Chlorella vulgaris* através de um processo relativamente simples e rápido quando comparado à obtenção de compostos quimicamente sintetizados, ou até mesmo de vegetais superiores.

[15] O extrato bruto pode conter conservantes, co-solventes, tensoativos não iônicos e/ou adjuvantes com função crioprotetora a base de sais e carboidratos simples ou complexos, muitos deles permitidos por órgãos reguladores e já utilizados em medicamentos como benzonidazol.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[16] Na preparação do formulado anti-chagásico, foi realizado, inicialmente, a obtenção de biomassa da microalga mediante cultivo autotrófico, ocorrendo, posteriormente, a extração dos compostos bioativos e formulação do produto.

[17] Na obtenção de biomassa, *Chlorella vulgaris* deve ser cultivada em meios de cultura líquidos que contenham vários sais minerais e o pH variando de 6,8 a 7,0 no máximo. O Bold (BISCHOFF & BOLD, University of Texas Publications number 6318. pp. 1-95, 1963) é o meio que deve ser usado, preferencialmente, nesse processo, no entanto, a microalga também se adapta a meios como BG-11 (Qian et al., Environm Poll. Rev. 242:171-181, 2018), B3N (Yeh, et al., Bioresour. Technol. 105:120-127) e Brostol's solution (Zhao et al., RSC Adv, 5:32615-25, 2015). Em seguida, o mesmo deverá ser esterilizado durante 15 minutos e também por outros processos físicos, tais como ionização, filtração e radiação.

[18] Os cultivos podem ser realizados em fotobiorreatores ou lagoas abertas, desde que as condições ideais de simulação do ambiente natural do microrganismo sejam mantidas. São elas iluminância de 45 a 50 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, temperatura de 28 a 30°C e aeração constante até o fim do cultivo.

[19] A biomassa deve ser obtida quando o microrganismo chegar à fase exponencial de crescimento, através de processos físicos como centrifugação, sedimentação e filtração. Posteriormente, a biomassa é liofilizada e utilizada na extração dos compostos bioativos, podendo utilizar tampões como solvente, preferencialmente em pH básico, a exemplo do Tris HCl a 0,2 M e pH 7.2. A extração pode ser realizada através de métodos como sonicação, que consiste na lise da parede celular do microrganismo por ondas ultrassônicas, no geral de 10 a 20 pulsos de um minuto com intervalo de 30 a 60 segundos entre cada pulso, e agitação magnética, por um período de 3 a 9 horas. Em ambos os processos de extração.

[20] A formulação do produto é realizada com o extrato bruto líquido, na concentração de 0,015% p/v (1,5 mg/mL), mediante a utilização de crioprotetores. Os principais são celulose, sacarose, estearato de magnésio, amido e lactose (MX 2017001766 A). O produto deve ser armazenado no congelador, podendo também ser liofilizado, para maior tempo de armazenamento. Em caso de liofilização, dissolver o produto em meio aquoso para aplicação.

EXEMPLO 1. CONDIÇÕES DE CULTIVO E OBTENÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL

[21] A cepa de *Chlorella vulgaris* (UTEX 1803) foi adquirida de uma coleção da Universidade do Texas (Austin, TX). A microalga foi cultivada em condições autotróficas, utilizando o meio Bold (BISCHOFF & BOLD, University of Texas Publications number 6318. pp. 1-95, 1963), que contém uma variedade de sais minerais e o pH a 6,8. Frascos de Erlenmeyers de 1 L foram utilizados, com um volume final de 400 mL, à temperatura de 30°C e intensidade luminosa de 48 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A biomassa foi obtida por centrifugação, a 10 000 rpm, 4°C e 15 minutos, quando o microrganismo atingiu a fase exponencial de crescimento.

EXEMPLO 2. OBTENÇÃO DO EXTRATO

[22] A biomassa liofilizada de *Chlorella vulgaris* foi dissolvida em tampão Tris HCl a 0,2 M e de pH 7.2 na proporção de 10% p/v (100 mg/mL) e homogeneizado por agitação magnética por 9 horas. Em seguida, a solução foi centrifugada a 8000 rpm, 4 °C por 10 minutos, sendo o extrato utilizado no processo de formulação. A concentração do extrato foi de 1,5 mg/mL, determinada em mg de proteína através da utilização do Kit BCA (BCATM Protein Assay Kit, Thermo SCIENTIFIC).

EXEMPLO 3. DETERMINAÇÃO DO PROCESSO DE FORMULAÇÃO

[23] Em 1,5 mg/mL de concentração proteica do extrato bruto líquido, foram adicionados 138 mg de lactose e 120.6 mg de amido como crioprotetores, sendo os conteúdos dissolvidos no extrato por métodos físicos, preferencialmente por homogeneização através de agitação magnética, durante duas horas, visto que o amido possui baixa solubilidade e deve ser adicionado em pequena quantidade em vários intervalos. Após esse processo, o produto pode ser liofilizado para obtenção do pó e distribuído em cápsula, assim como injetável, na forma de dissolução.

EXEMPLO 4. CONDIÇÕES ESTABELECIDAS NA CULTURA DE CÉLULAS ANIMAIS

[24] Linhagens de célula Vero foram utilizadas nos testes descritos daqui em diante. As células, armazenadas à -80°C, foram descongeladas e lavadas 3 vezes seguidas com RPMI incompleto (com vermelho de fenol). Após a lavagem, foram adicionadas, inicialmente, em meio RPMI (com vermelho de fenol) suplementado com 10 a 15 % de soro fetal bovino e cultivadas por 7 dias em estufa de CO₂, 37 °C. Após esse período, foi adicionada tripsina à

cultura, visto que se trata de linhagens aderentes, e centrifugadas a 2500 rpm, 4°C por 5 minutos, no qual o sobrenadante foi descartado e o conteúdo celular foi diluído em 1 mL de RPMI incompleto (com vermelho de fenol).

EXEMPLO 5. DETERMINAÇÃO DOS ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE.

[25] As células obtidas da cultura, do processo descrito anteriormente, foram contadas em câmara de Neubauer, sendo a concentração ajustada à 1×10^6 células/mL. O conteúdo celular foi distribuído em placa de 96 poços de fundo chato (específicas para cultura de células) com um volume final de 100 μ L. Após 24 horas de incubação, em estufa de CO₂, 37 °C, a cultura foi observada no microscópio invertido. Em seguida foi lavada com RPMI incompleto (com vermelho de fenol) e foi iniciado o tratamento do composto. As concentrações testadas no ensaio de citotoxicidade foram de 100 μ g/mL a 3,15 μ g/mL, A solução contendo o composto e meio de cultura foi filtrada em membrana de 0,22 μ M, no qual 100 μ L da solução de cada concentração foi adicionada à placa, em triplicata. 2 controles positivos foram estabelecidos. A placa foi incubada em estufa de CO₂, a 37 °C, por 24 horas. Após esse período, a cultura foi novamente observada no microscópio invertido e lavada com RPMI incompleto (com vermelho de fenol) e em seguida foram adicionados 100 μ L de solução contendo MTT () + RPMI (sem vermelho de fenol). A placa foi coberta com papel alumínio, incubada em estufa de CO₂, 37 °C, por 3 horas. Os cristais foram observados em microscópio invertido, e o conteúdo foi retirado, cuidadosamente para adição de 100 μ L de DMSO, a fim de promover a solubilização dos cristais. Os resultados foram determinados através de leitura em espectrofotômetro a 570 nm.

EXEMPLO 6. CULTURA E OBTENÇÃO DAS FORMAS TRIPOMASTIGOTAS

[26] Formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Cepa Y criopreservada com DMSO) foram descongeladas em banho-maria, preferencialmente a 37 °C, e inoculadas em garrafas de 75cm² contendo cultura de células Vero confluentes (10^7 tripomastigotas/mL). As garrafas foram observadas em microscópio invertido durante os 5 dias de infecção, sendo o material centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos e os tripomastigotas diluídos em 1 mL de RPMI completo (com soro fetal bovino preferencialmente a 5%) e contados em câmara de Neubauer.

EXEMPLO 7. AVALIAÇÃO *In vitro* DA ATIVIDADE ANTI-TRYPANOSOMA

[27] As formas tripomastigotas obtidas no processo descrito anteriormente foram ajustadas à concentração de 10^6 parasitas por célula. 133 μ L do extrato bruto de *Chlorella*

vulgaris foi adicionado em 867 μL de RPMI incompleto (com vermelho de fenol), filtrado em membrana e 0,22 μM , tendo a concentração inicial de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e distribuído em placa de 96 poços de fundo chato (específica para cultura de células) em triplicata, até a concentração de 3,15 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 10 μL da solução contendo as formas tripomastigotas a 10^6 foram adicionados. Foram estabelecidos dois controles positivos, contendo RPMI completo (com soro fetal bovino preferencialmente a 5%) e 10 μL da alíquota contendo o parasita. Após 24 horas de incubação, em estufa de CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$, a placa foi observada em microscópio invertido e o resultado quantificado através da contagem de tripomastigotas viáveis tanto no controle quanto nos tratados.

EXEMPLO 8. DETERMINAÇÃO DA CC_{50} , LC_{50} E ÍNDICE DE SELETIVIDADE (ISE)

[28] Foram realizados dois experimentos independentes, tanto para a determinação da CC_{50} quanto a LC_{50} do composto. As análises estatísticas foram determinadas através de programas como ANOVA e GraphPad Prism. Em relação aos ensaios de citotoxicidade, constatou-se que o composto foi atóxico em todas as concentrações testadas, não havendo diferença estatística significativa com o controle. O valor estimado da CC_{50} foi 254.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Os mesmos parâmetros e programas estatísticos foram utilizados também na determinação da LC_{50} , que foi de 32,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O índice de seletividade (ISE) foi de 7.7, estabelecido por meio da razão entre a CC_{50} e LC_{50} .

EXEMPLO 10. AÇÃO ANTI-CHAGÁSICA DO PRODUTO

[29] Após a formulação, o produto foi armazenado em baixa temperatura, preferencialmente em congelador, na ausência de luz e utilizado na avaliação frente a formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. As concentrações testadas foram 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eficácia do produto foi estatisticamente semelhante à do extrato bruto, sendo letal para o parasita nas maiores concentrações e menos eficaz nas concentrações mais baixas. A maior taxa de inibição foi de 94%, a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e a menor foi de 30% a 3,15 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

REIVINDICAÇÕES

1. ANTI-CHAGÁSICO OBTIDO DE MICRORGANISMO FOTOSSINTETIZANTE E SUA FORMULAÇÃO, **caracterizado pela** utilização de microrganismos fotossintetizantes na obtenção e produção de agentes anti-chagásicos;
2. ANTI-CHAGÁSICO OBTIDO DE MICRORGANISMO FOTOSSINTETIZANTE E SUA FORMULAÇÃO, de acordo com a primeira reivindicação, **caracterizado por** um produto em líquido com ação anti-*T.cruzi* à base de extrato bruto de *Chlorella vulgaris* contendo carboidratos complexos como crioprotetores;
3. ANTI-CHAGÁSICO OBTIDO DE MICRORGANISMO FOTOSSINTETIZANTE E SUA FORMULAÇÃO, de acordo com a primeira reivindicação, **caracterizado pelos** adjuvantes adicionados corresponderem ao amido e à lactose;
4. ANTI-CHAGÁSICO OBTIDO DE MICRORGANISMO FOTOSSINTETIZANTE E SUA FORMULAÇÃO, de acordo com a primeira reivindicação, **caracterizado pelo** produto anti-chagásico proveniente da biomassa de *Chlorella vulgaris* poder ser utilizado como agente terapêutico em indivíduos acometidos pela doença de Chagas.

RESUMO

“FORMULAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE EXTRATOS OBTIDOS DE MICRORGANISMO FOTOSSINTETIZANTE COM ATIVIDADE ANTI-*Trypanosoma cruzi*”

A presente invenção refere-se ao processo de formulação e uso de um produto obtido da biomassa de *Chlorella vulgaris* com ação anti-chagásica, através da utilização de carboidratos complexos como adjuvantes. A formulação foi composta pelo extrato bruto a 1,5 mg/mL de proteína acrescido de 120,6 mg de amido e 138 mg de lactose, sendo o produto testado quanto a sua ação citotóxica em linhagem de célula de mamífero e antiparasitária frente a formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

4 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que extratos obtidos de microrganismos fotossintetizantes como *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus* sp. são eficazes em ensaios *in vitro* realizados com o *Trypanosoma cruzi*, protozoário causador da doença de Chagas. Os extratos provenientes de ambas as espécies, em baixas concentrações, foram letais para as formas tripomastigotas do parasita. No entanto, *Scenedesmus* sp. apresentou efeitos tóxicos em célula de mamífero, enquanto *C. vulgaris* não foi letal para as células em nenhuma concentração testada, possuindo maior índice de seletividade e posteriormente foi utilizada em processo de formulação mediante utilização de crioprotetores correspondendo a carboidratos complexos. Um novo produto com ação anti-chagásica foi elaborado, mostrando-se como alternativa eficaz e promissora para possível aplicação na terapia de indivíduos portadores da doença.

REFERÊNCIAS

REFERENCIAL TEÓRICO

AFIFY, A. E. M. R. et al. *Scenedesmus obliquus* : Antioxidant and antiviral activity of proteins hydrolyzed by three enzymes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v. 16, p. 399–408, 2018.

AL-NASIRI. Isolation and identification of some active compounds from the green algae *Cladophora crispata* with their bioactivity test. College of Education, University of Basrah, 2010.

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.

ATHBI, A. M.; MAYAH, S. H. A.; KHALAF, A. K. Antiparasitic activity of the microalgae *Cladophora crispata* the protoscolis of hydatid cysts compared with albendazole drug. *African Journal of Biotechnology*, v. 13, n. 30, p. 3068-3080, 2014.

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.

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.

BRASIL, B. D. S. A. F.; DE SIQUEIRA, F. G.; SALUM, T. F. C.; ZANETTE, C. M.; SPIER, M. R. Microalgae and cyanobacteria as enzyme biofactories. *Algal Research*, v. 25, p. 76-89, 2017.

CHATELAIN E. Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v.15, p. 98–103, 2017.

CHU, CY.; HUANG, R.; LIN, LP. Purification and characterization of a novel haemagglutinin from *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 33, p. 967–973, 2006.

CHU, W.L. Biotechnological applications of microalgae. *Int. e-J. Sci. Med. Edu*, v.6, p. 24-37.

COHEN, J. P.; STURGEON, G.; COHEN, A. Measuring progress in neglected disease drug development. *Clinical therapeutics*, v. 36, n. 7, p. 1037–42, 2014.

CONSERVA, G. A. A. et al. Butenolides from *Nectandra oppositifolia* (Lauraceae) displayed anti-*Trypanosoma cruzi* activity via deregulation of mitochondria. *Phytomedicine*, v. 54, p. 302–307, 2019.

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.

CUCUNUBÁ, Z. M.; OKUWOGA, O.; BASÁÑEZ, M. G.; NOUVELLET, P. Increased mortality attributed to Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors*, v. 9, p.42, 2016.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M. & FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*. v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

E.B.B., E. et al. In vitro antiparasitic activity and chemical composition of the essential oil from *Protium ovatum* leaves (Burceraceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 89, n. 4, p. 3005–3013, 2017.

FENICAL, W.; PAUL, V. Antimicrobial and cytotoxic terpenoids from tropical green algae of the family Udoteaceae *Hydrobiologia*. v. 116, p. 135-140, 1984.

FRAGATA-FILHO, A. A., FRANÇA, F. F., FRAGATA, C. DA S., LOURENÇO, A. M., FACCINI, C. C., & COSTA, C. A. de J. Evaluation of Parasiticide Treatment with Benznidazol in the Electrocardiographic, Clinical, and Serological Evolution of Chagas Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 3, p. 1–12, 2016.

GOULART, M. O. F.; ZANI, C. L.; TONHOLO, J.; FREITAS, L.R.; ABREU, F. C.; OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S.; STARLING, S.; CHIARI, E. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*, v. 7, p. 2043, 1997.

GUPTA, P.; SINHA, D.; BANDOPADHYAY, R. Isolation and screening of marine microalgae *Chlorella* sp. for anticancer activity. *Innovare Academic Sciences*, v. 6, n. 10, p. 10–12, 2014.

GUEDES, C. et al. Microalgal and cyanobacterial cell extracts for use as natural antibacterial additives against food pathogens”. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 46, n. 4, p. 862-870.

HABIBI, Z.; J, I. N.; RAMEZANPOUR, Z. Evaluation of antimicrobial activities of microalgae *Scenedesmus dimorphus* extracts against bacterial strains. v. 16, n. 1, p. 25–36, 2018.

HALL, B. S.; WILKINSON, S.R. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 1, p. 115-123, 2012.

HIGUCHI, M.L.; BENVENUTI, L.A.; MARTINS REIS, M. & METZGER, M. - Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovascular Research*, v. 60, p. 96-107, 2003.

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.

ISHAQ, A. G. et al. Antibacterial activity of freshwater microalga *Scenedesmus* sp. on foodborne pathogens *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* sp. *Journal of Science and Technology*, v. 7, n. 2, p. 858–871, 2015.

KIM, M. et al. Effect of Biostimulator *Chlorella fusca* on Improving Growth and

Qualities of Chinese Chives and Spinach in Organic Farm. v. 34, n. 6, p. 567–574, 2018.

KO, S. C.; KANG, N.; LEE, S. H. et al. A novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from a marine *Chlorella ellipsoidea* and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Process Biochemistry*, v. 47, p. 2005–2011. 2016.

LEE, B. Y.; BACON, K. M.; BOTTAZZI, E.; HOTEZ, J. Global economic burden of Chagas Disease: a computational simulation model. *The lancet Infectious Diseases*. 2013.

LEE, A.K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Microalgal cell disruption by hydrodynamic cavitation for the production of biofuels. *Journal of Applied Phycology*, v. 27, p. 1881–1889, 2015.

LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, v. 31, p. 1043-9, 2009.

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

MAADANE, A.; MERGHOUB, N.; ANIANE, T.; ARROUSSI, EL H.; BENHIMA, R.; AMZAZI, S.; BAKRI, Y.; WAHBY, I. Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content. *Journal of Biotechnology*, v. 215, p. 13-19, 2015.

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.

MAYER, A. M. S.; RODRÍGUEZ, A. D.; BERLINCK, R. G. S.; HAMANN, M. T. Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1790, p. 283-308, 2009.

MORILLO, C.A.; MARIN-NETO, J.A.; AVEZUM, A.; SOSA-ESTANI, S.; RASSI, A. Jr et al. Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' Cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine*, v. 373, p. 1295-1306, 2015.

MOSTAFA, S.S.M. *Microalgae Biotechnology: Prospects and Applications*. 2012.

NEVES, D.; P.; MELO, A.; L.; ALMEIDA, R.; W.; V. *Parasitologia Humana*. Vol. 11.; 2005.

NIGJEH, S.; E.; YUSOFF, F.; M.; ALITHEEN, N.; B.; M.; RASOLI, M.; KEONG, Y.; S.; OMAR, A.; R. Cytotoxic effect of ethanol extract of microalga, *Chaetoceros calcitrans*, and Its mechanisms in inducing apoptosis in human breast cancer cells line. *BioMed Research International*, v. 2013, 2012.

OLIVEIRA, M. et al. Unlocking the in vitro anti-*Trypanosoma cruzi* activity of halophyte plants from the southern Portugal. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicina*, v. 9, n. 8, 2016.

PAGLIERO, R. J.; LUSVARGHI, S.; PIERINI, A. B.; BRUN, R.; MAZZIERE, M.R. Synthesis, stereoelectronic characterization and antiparasitic activity of new 1-benzenesulfonyl-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines. *Bioorganic & Medical Chemistry*, v.18, n. 1, p. 142-50, 2010.

PARNIAKOV, O.; APICELLA, E.; KOUBAA, M.; BARBA, F. J.; GRIMI, N.; LEBOVKA, N.; PATARO, G.; FERRARI, G.; VOROBIEV, E. Ultrasound-assisted green solvent extraction of high-added value compounds from microalgae *Nannochloropsis* spp. *Bioresource Technology*, v. 198, p. 262-267, 2015.

PINTO, A. V.; CASTRO, S. L. *Molecules* v. 14, p. 4570, 2009.

PLAZA, M.; SANTOYO, S.; JAIME, L.; AVALO, B.; CIFUENTES, A.; REGLERO, G.; REINA, G.; G-B.; SEÑORÁNS, F.; J.; IBÁÑEZ. Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*. *LWT - Food Science and Technology*, v. 46, p. 245-253, 2012.

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.

PRIBYL, P.; CEPÁK, V.; ZACHLEDER, V. Production of lipids and formation and mobilization of lipids bodies in *Chlorella vulgaris*. *Journal of Applied Phycology*, v. 25, p. 545-53, 2013.

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

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

SACAN, E. P.; BRAUN, A. E.; RAVELO, A. G.; YAPU, D. G.; TURBA, A. G. *Chemistry & Biodiversity*, v. 2, p. 264.

SAFI, C.; ZEBIB, B.; MERAH, O.; YVES, P. P.; GARCIA, C. V. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris* : A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 35, p. 265-278, 2014.

SALAS, C.; TAPIA, R. A.; CIUDAD, K.; ARMSTRONG, V.; ORELLANA, M.; KEMMERLING, U.; FERREIRA, J.; MAYA, J. D.; MORELLO, A. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*, v.16, p. 668, 2008.

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.

SCARIM, C. B.; CHIN, C. M. Current challenges and obstacles to drug development for Chagas disease. *Drug Designing & Intellectual Properties Int. Journal*. 2018.

SEYFABADI, J.; RAMEZANPOUR, Z.; KHOEYI, Z. A. Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. *Journal of Applied Phycology*, v. 23, p. 721-6, 2011.

SIGAMANI, S.; RAMAMURTHY, D.; NATARAJAN, H. A Review on Potential Biotechnological applications of Microalgae. v. 6, n. 08, p. 179–184, 2016.

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.

PAIXÃO, D. A. et al. *In vitro* anti-Trypanosoma cruzi activity of ternary copper(II) complexes and in vivo evaluation of the most promising complex. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 109, p. 157–166, 2019.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. *The Lancet*, v. 391, p.82-94, 2018.

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.

TABARSA, M.; SHIN, S. I.; LEE, J. H.; UTOOMPORN, S.; PARK, W. J.; YOU, S. G. An immune-enhancing water-soluble alpha-glucan from *Chlorella vulgaris* and structural characteristics. *Food Science and Biotechnology*, v. 24, n. 6, p. 1933-1941, 2015.

TARLETON, R. L.; CURRAN, J. W. Is Chagas disease really “The new HIV/AIDS of the Americas?”. *Neglected Tropical Disease*, v. 6, n.10, 2012.

TORRICO, F.; GASCON, J.; ORTIZ, L.; VEGA, C. A.; PINAZO, M. J.; SCHIJMAN, A.; ALMEIDA, I. C.; ALVES, F.; WOURGAFT, N. S.; RIBEIRO, I. Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet Infectious Disease*, v. 18, n. 4, p. 419-430, 2018.

URSU, A. V.; MARCATI, A.; SAYD, T.; LHOUTELLIER, S. V.; DJELVEH, G.; MICHAUD, P. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Thecnology*, v. 157, p. 134-9, 2014.

VIJAYAVEL, K.; ANBUSELVAM, C.; BALASUBRAMANIAN, M. P. Antioxidant effect of the marine algae *Chlorella vulgaris* against naphthalene-induced oxidative stress in the albino rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 303, p. 39-44, 2007.

World and Health Organization (WHO) (2018) Neglected tropical diseases.

ZHANG, K.; MIYACHI, S.; KURANO, N.; Evaluation of a vertical flat-plate photobioreactor for outdoor biomass production and carbon dioxide bio-fixation: effects of reactor dimensions, irradiation and cell concentration on the biomass productivity and irradiation utilization efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 55, p. 428-33, 2001.

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.

ARTIGO CIENTÍFICO

Afify, A.M.R., Baroty, G.S.E., Baz, F.E., Baky, H.H.A., Murad, S.A., 2018. *Scenedesmus obliquus*: antioxidant and antiviral activity of proteins hydrolyzed by three enzymes. *J. of Gen. Eng. and Biotech*, 16, 399-408.

Athbi, A.M., Ali, D., Salman, A.L., Noory, A., 2011. Determination of total proteins and some amino acids in green algae *Chlorella vulgaris*. *J. Thi-Qar. Edu*, 5, 224-234.

Athbi, A.M., Mayah, S.H.A., Khalaf, A.K., 2014. Antiparasitic activity of the microalgae *Cladophora crispata* against the Protoscolices of hydatid cysts compared with albendazole drug. *Af. J. of Biotechn.* 13, 3068-3080.

Bermejo, R.R., Talavera, E.M., Alvarez-Pez, J.M., 2001. Chromatographic purification and characterization of b-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. Semipreparative HPLC separation and characterization of its subunits. *Journal of Chromatography A*, 917, 135– 45.

Bi, B., Wang, X., Wu, H., Wei, Q., 2011. Purification and characterization of a novel protease from *Cordyceps sinensis* and determination of the cleavage site motifs using oriented peptide library mixtures. *Food chemistry*. 126, 46-53.

Bischoff, H. W.; Bold, H. C., 1963. *Phycological Studies. IV. Some Algae from Enchanted Rock and Related Algae Species*. University of Texas Publications. 6318, 1-95.

Chatelain, E., 2017 Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? *Comp. and Struct. Biotec. J.* 15, 98–103.

Chu, C.Y., Huang, Lin, L.P.R., 2006. Purification and characterization of a novel haemagglutinin from *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33, 967–973.

Cucunubá, Z. M., Okuwoga, O., Basáñez, M. G., Nouvellet, P., 2016. Increased mortality attributed to Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors*. 9, 1-13.

Dineshkumar, R., Narendran, R., Jayasingam, P., Sampathkumar, P., 2017. Cultivation and chemical composition of microalgae *Chlorella vulgaris* and its antibacterial activity against human pathogens. *Aquac. & Mar. Biol*, 5, 1-8.

Esperandim V., et al. 2013. *In vitro* antiparasitic activity and chemical composition of the essential oil obtained from the fruits of *Piper cubeba*. *Planta Med* 79, 1653-1655.

Estevam, et al., 2017. *In vitro* antiparasitic activity and chemical composition of the essential oil from *Protium ovatum* leaves (Burceraceae). *An. Acad. Bras. de Cien*, 89, 3005-3013.

Felício, de R., Albuquerque, de S., Young, M.C., Yokoya, N.S., Deboni, H.M., 2010. Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales). *J. Pharm Biomed Anal*, 52, 763-769.

Ghasemi, Y., Moradian, A., Mohagheghzadeh, A., 2007. Antifungal and antimicrobial activity of the microalgae collected from Paddy Fields of Iran: Characterization of antimicrobial activity of *Chroococcus disperses*. *J. of Biol. Sc*, 7, 904-910.

Guerin, M., Huntley, M. E., Olaizola, M., 2003. *Haematococcus astaxanthin*: Applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*, 21, 210-216.

- Huertas, P.G., Olmo, F., Moreno, M.S., Dominguez, Rachid, C., Chávez, O.T., 2018. Activity *in vitro* and *in vivo* against *Trypanosoma cruzi* of a furofuran lignan isolated from *Piper jericense*. *Experimental Parasitology*, 189, 34-42.
- Ishaq, A.G., Matias-Peralta, H.M., Basri, H., 2016. Bioactive compounds from green microalga – *Scenedesmus* and its potential applications: A brief review. *Trop. Agric. Sc*, 39, 1-16.
- Justo, G.Z., M.R. Silva, Queiroz, M.L.S., 2001. Effects of the green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal Ehrlich ascites tumor transplantation in mice. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 23, 119-132.
- Lee, B.Y., Bacon, K.M., Bottazzi, M.E., Hotez, P.J., 2013. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect Dis*, 13, 342-348.
- Lorena, V. León-Deniz., Dumonteil, E., Rosa, M.P., Yolanda F.P., 2009. Antitrypanosomal *in vitro* activity of tropical marine algae extracts. *Pharmaceut. Biol*, 47, 864-871.
- Mayer, A.M.S., Rodríguez, A.D., Berlinck, R.G.S., Hamann, M.T., 2009. Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790, 83-308.
- Mohamed, A.G., Abo-El-Khair, B.E., Shalaby, S.M., 2013. Quality of novel healthy processed cheese analogue enhanced with marine microalgae *Chlorella vulgaris* biomass. *World App. Sc. J*, 23, 914-925.
- Mohan, N., Rao, P.H., Kumar, R.R., Sivasankaran, S., Sivasubramanian, V., 2009. Studies on mass cultivation of *Chlorella vulgaris* and effective harvesting of bio-mass by low-cost methods. *J Algal Biomass Utiln*, 1, 29-39.
- Molera, M. Semesi, A., (1996). Antimicrobial activity of extracts from six green algae from Tanzania. *Curr. Trends. Mar. Bot. Res. East Afr. Reg.* 211-217.
- Morillo, C.A., Marin-Neto, J.A., Avezum, A., Sosa-Estani, S., Rassi, A. Jr et al., (2015) Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med* 373, 1295-1306.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.
- Osorio, E., Arango, G.J., Jiménez, N., Alzate, F., Ruiz, G., Gutiérrez, D., Paco, M.A., Gimenez, A., Robledo, S., 2007. Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. *J Ethnopharmacol* 111, 630-635.
- Nigjeh, S.E., Yusoff, F.M., Alitheen, M.R., Keong, Y.S., Omar, A.R., 2013. Cytotoxic effect of ethanol extract of microalga, *Chaetoceros calcitrans* and its mechanisms in inducing apoptosis in human breast cancer cell line. *BioMed Res. Int*, 1-8.
- Pradhan, J., Kumar, B., Sahu, S., Marhual, N. P., Swain, A.K., Mishra, B.K., Eknath, A.E., 2012. Traditional antibacterial activity of fresh water microalga *Spirulina platensis* to aquatic pathogens. *Aquaculture Research*. 43, 1287-1295.
- Raikar, S.M., Kalebar, V.U., Adhoni, S.A., 2018. Screening of pharmacological and cytotoxic activities of fresh water lake isolated microalgae *Chlorella vulgaris* AS-13 and *Chlorella pyrenoidosa* AS-6. *Int. J. of Bio-tech*, 8, 1-8.
- Rashed K., Ferreira, D.S., Esperandim, V.R., Marçal, M.G., Sequeira, B.M., Flauzino, L.G.B., Cunha, W.R., 2016. *In vitro* trypanocidal activity of the Egyptian plant *Schinopsis*

lorentizii against trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *J Appl Pharm Sci* 6, 055-060.

Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. W., Herdman, M., Stanier, R. G., 1979. Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. *J.Gen. Microbiol*, 111, 1-61.

Salas, C. O., Faúndez, M., Morello, A., Maya, J. D., Tapia, R., A., 2011. Natural and synthetic naphthoquinones active against *Trypanosoma cruzi*: An initial step towards new drugs for Chagas disease. *Curr. Medicinal Chem.* 18, 144-161.

Sib, G., Rabina, S., 2016. Inhibition of pro-inflammatory mediators and cytokines by *Chlorella vulgaris* extracts. *Pharmacognosy Res*, 8, 118-122.

World and Health Organization (WHO) (2018). Neglected tropical diseases.

**ANEXO A - DADOS REFERENTES À APROVAÇÃO DA PESQUISA PELO
COMITÊ DE ÉTICA**

- ✓ Aprovado pelo CPqAM/Fiocruz (CAAE: 07511612.2.0000.5190).

**ANEXO B - INFORMAÇÕES SOBRE A REVISTA ESCOLHIDA PARA SUBMISSÃO
DO ARTIGO**

- ✓ Food and Chemical Toxicology;
- ✓ Fator de Impacto: 3,977;
- ✓ Qualis A2, de acordo com avaliação da CAPES, 2016-2017.