



MARINHA DO BRASIL
INSTITUTO DE ESTUDOS DO MAR ALMIRANTE PAULO MOREIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
PROGRAMA ASSOCIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MARINHA

LUANA PORTELLA TAVARES SANTIAGO

INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES TRIPANOCIDA E LEISHMANICIDA DE
MACROALGAS MARINHAS

ARRAIAL DO CABO / RJ

2018

LUANA PORTELLA TAVARES SANTIAGO

**INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES TRIPANOCIDA E LEISHMANICIDA
DE MACROALGAS MARINHAS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira e à Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Marinha.

Orientador(a): Prof. Dra. Daniela Bueno Sudatti

Co-orientadora(a): Dra. Danielle Pereira Cavalcanti

ARRAIAL DO CABO / RJ

2018

LUANA PORTELLA TAVARES SANTIAGO

**INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES TRIPANOCIDA E LEISHMANICIDA
DE MACROALGAS MARINHAS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira e à Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Marina.

COMISSÃO JULGADORA:

**Profa. Dra. Daniela Bueno Sudatti – Presidente da Banca
UFF**

**Profa. Dra. Angélica R. Soares – Titular interno
UFRJ**

**Dra. Aline Araujo Zuma – Titular externo
UFRJ**

**Prof. Dr. Renato Crespo – Suplente interno
UFF**

**Dra. Danielle Pereira Cavalcanti – Suplente externo
INMETRO**

Arraial do Cabo, 23 de Julho de 2018.

Dedico este trabalho aos meus maiores incentivadores,
meu marido e meus pais.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Daniela Sudatti, primeiramente pela oportunidade, por abraçar uma aluna de uma área completamente diferente e ter aceitado esse desafio. Agradeço pelo conhecimento compartilhado, toda ajuda, paciência e disponibilidade durante todo esse processo.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Danielle Cavalcanti, por ter me acolhido novamente como aluna e ter embarcado em uma ideia inusitada mesmo com todos os desafios, por estar sempre disposta a ajudar e por todos os ensinamentos e conselhos.

Agradeço aos meus pais, pelo apoio incondicional, por me incentivarem a lutar mesmo quando o cansaço e as dificuldades se faziam fortemente presentes. Por fazerem dos meus sonhos seus próprios objetivos e não medirem esforços para que eu conseguisse realizá-los.

Ao meu marido, Gustavo, por ter me dado tanta força nos momentos mais difíceis. Pela compreensão em todo esse tempo de ausência. Pelo companheirismo, dedicação, carinho e por ser minha fonte de energia para que eu tivesse forças para retornar às viagens todas as semanas.

Agradeço a todos que ajudaram na identificação das algas, principalmente minha orientadora e Prof. Dr. Renato Crespo.

A todos que disponibilizaram seu tempo para me ajudar no trabalho pesado: minha orientadora e a Juliana Ferrrari que pegaram estrada para me ajudar nas coletas e nas triagens; a Sara Cantarino por ter me ajudado até tarde da noite sempre que me via sozinha triando as algas; e a Isis Ribeiro por madrugar para ir para os locais mais distantes me ajudar nas coletas.

A todos da equipe do Laboratório Hertha Meyer, especialmente a Dra. Aline Zuma e a Ma. Camila Gonçalves por me ajudarem nos dias em que não era possível pegar estrada para fazer pequenas coisas no laboratório. Agradeço ainda por todas as dicas, ensinamentos, paciência e por estarem sempre dispostas a me ajudar.

Às minhas amigas da graduação Fernanda Geraldo pela ajuda no processo de impressão e entrega da dissertação e a Thais Silva por me ceder artigos e materiais de referência. Obrigada a todas pelo apoio e amizade.

Aos amigos da Pós, principalmente a Fernanda, Luana e Simone, pela amizade, companheirismo em todas as disciplinas e por todo apoio. Foram presentes da Pós que vou levar para vida.

Aos professores que gentilmente aceitaram o convite de compor a banca avaliadora deste trabalho de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela concessão da bolsa de mestrado, o que permitiu dedicação exclusiva ao trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de pesquisa (CNPq) pelo financiamento de projetos ao qual este trabalho está vinculado.

“A persistência é o menor caminho do êxito.”
(Charles Chaplin)

RESUMO

A doença de Chagas e as leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas (DTN) com importante impacto na saúde pública. Os fármacos utilizados para o tratamento dessas doenças têm severos efeitos colaterais e baixa eficácia, levando à busca por novas drogas mais eficazes e seguras para seus tratamentos. Embora as macroalgas marinhas tenham sido reconhecidas como fonte de diversas substâncias biologicamente ativas, poucas pesquisas focaram na atividade contra os parasitas causadores dessas doenças, principalmente no Brasil. No presente estudo, foi realizada uma varredura utilizando extratos isolados de 48 macroalgas coletadas na Região dos Lagos, no Estado do Rio de Janeiro, a fim de identificar atividade contra epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Os extratos foram preparados com uma mistura de diclorometano:metanol (2:1). Na triagem inicial, a viabilidade dos parasitas testados foi avaliada pelo ensaio do MTT. O CI_{50} foi determinado por contagem de células em citômetro de fluxo e o CC_{50} dos extratos testados em células LLCMK₂ foi avaliado pelo ensaio do MTT. Para determinação do efeito dos extratos sobre a integridade da membrana plasmática, foi utilizado o marcador iodeto de propídeo. O trabalho testou, pela primeira vez, o efeito tripanocida e leishmanicida de vinte espécies de macroalgas, que nunca foram avaliadas anteriormente. Do total de quinze extratos que inibiram a viabilidade de *T. cruzi* e quatro de *L. amazonensis*, as espécies com maior atividade tripanocida e leishmanicida foram *Laurencia dendroidea* e *Canistrocarpus cervicoris*, entretando, apresentaram alta citotoxicidade contra células LLCMK₂. Cinco espécies exibiram efeito inibitório inédito contra *T. cruzi*: *Acanthophora spicifera*, *Codium intertextum*, *Codium taylori*, *Dasya ocellata* e *Plocamium brasiliense*. Entretanto, *Plocamium brasiliense* se mostrou mais promissora por apresentar um dos maiores efeitos inibitórios agregado à baixa citotoxicidade em células LLCMK₂. Assim, destaca-se a potencialidade do extrato de *Plocamium brasiliense*, que deve ser prioridade para caracterização química e realização de novos ensaios biológicos na busca de fármacos com atividade antiparasitária.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis*, Macroalgas Marinhas, leishmanicida, tripanocida, Doenças Tropicais Negligenciadas, *Plocamium brasiliense*.

ABSTRACT

The Chagas disease and leishmaniasis are neglected tropical diseases (NTDs) with a significant impact on public health. The drugs used to treat these diseases have severe side effects and low efficacy, leading to the search for new drugs that are more effective and safer for their treatments. Although seaweeds have been recognized as a source of several biologically active compounds, few studies have focused on the activity against the parasites that cause these diseases, mainly in Brazil. In the present study, a screening was carried out using 48 seaweed collected in the Região dos Lagos, in the State of Rio de Janeiro, in order to identify activity against *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and *Leishmania amazonensis* promastigotes. The extracts were prepared with a dichloromethane: methanol (2: 1) mixture. At initial screening, the viability of the treated parasites was evaluated by the MTT assay. The IC₅₀ was determined by flow cytometry and the CC₅₀ of the extracts in LLC MK2 cells was evaluated by the MTT assay. To determine the effect of the extracts on the integrity of the plasma membrane of the parasites, the propidium iodide marker was used. The work tested, for the first time, the trypanocidal and leishmanicidal effect of twenty species of seaweed, which were never evaluated before. Fifteen seaweed extracts were able to impair the proliferation of *T. cruzi*, while only four extracts were effective in reducing the growth of *L. amazonensis*. *Laurencia dendroidea* and *Canistrocarpus cervicoris* were the species that presented higher trypanocidal and leishmanicidal activity among the seaweed tested. However, the extracts from these two were high cytotoxicity against LLCMK2. Five species of seaweed exhibited an unprecedented effect against *T. cruzi*: *Acanthophora spicifera*, *Codium intertextum*, *Codium taylori*, *Dasya ocellata* and *Plocamium brasiliense*. However, *Plocamium brasiliense* was more promising because it had one of the greatest inhibitory effects among trypanosomatids tested and low cytotoxicity in LLCMK2 cells. Thus, we highlight the potential of *Plocamium brasiliense* extract, which should be a priority for chemical characterization and performance of new biological assays using other developmental forms of *T. cruzi* and *L. amazonensis*, are fundamental in the search for new drugs for neglected diseases.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis*, Seaweeds, Leishmanicidal, Tripanocidal, Neglected Tropical Diseases, *Plocamium brasiliense*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AC – Arraial do Cabo

AIDS - *Acquired immunodeficiency syndrome* (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)

BU – Búzios

CC₅₀ – Coeficiente de citotoxicidade em 50%

CF – Cabo Frio

CI₅₀ – Coeficiente ou concentração que inibe em 50% a proliferação ou viabilidade celular

DMSO – Dimetilsulfóxido

IgG – Imunoglobulina G

IP – Iodeto de propídio

IS – Índice de seletividade

LC – Leishmaniose cutânea

LIT – *Liver Infusion Tryptose*

LM – Leishmaniose mucocutânea

LV – Leishmaniose visceral

LTA – Leishmaniose tegumentar americana

MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,4-difeniltetrazolio

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – *Phosphate-buffered saline* (Solução salina tamponante com fosfato)

pH – potencial hidrogeniônico

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute medium* (Meio do Instituto Roswell Park Memorial)

SDS – Duodecil sulfato de sódio

SFB – Soro fetal bovino

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS.....	12
1.2. DOENÇA DE CHAGAS.....	13
1.2.1. Epidemiologia.....	13
1.2.2. Vias de transmissão do <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
1.2.3. Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
1.2.4. Tratamentos.....	19
1.3. LEISHMANIOSES.....	20
1.3.1. Epidemiologia.....	22
1.3.2. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	25
1.3.3. Tratamentos.....	26
1.4. MACROALGAS MARINHAS.....	28
1.4.1. Macroalgas com atividade contra <i>T. cruzi</i> e <i>L. amazonensis</i>	29
2. OBJETIVOS.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1. MACROALGAS.....	35
3.1.1. Coleta das Macroalgas.....	35
3.1.2. Preparo dos extratos.....	35
3.2. PARASITAS E LINHAGENS CELULARES.....	36
3.2.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	36
3.2.2. <i>Leishmania amazonensis</i>	36
3.2.3. Células de mamífero: fibroblastos da linhagem LLCMK ₂	36
3.3. ENSAIO BIOLÓGICO PARA DETECÇÃO DE ATIVIDADE TRIPANOCIDA E LEISHMANICIDA.....	37
3.4. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO ENSAIO DO MTT.....	38
3.5. ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO MÉTODO DO IODETO DE PROPÍDIO UTILIZANDO A TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO.....	39
3.6. DETERMINAÇÃO DO CI ₅₀ DOS EXTRATOS EM <i>T. CRUZI</i> E <i>L. AMAZONENSIS</i>	40
3.7. EFEITO CITOTÓXICO DOS EXTRATOS EM CELULAS LLCMK ₂	40
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
4. RESULTADOS.....	42
4.1. COLETA E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS.....	42
4.1. EFEITO INIBITÓRIO DOS EXTRATOS SOBRE EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i> POR MTT.....	44
4.2. EFEITO INIBITÓRIO DOS EXTRATOS SOBRE EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i> POR MARCAÇÃO COM IP.....	47

4.3. DETERMINAÇÃO DO CI_{50} DOS EXTRATOS SOBRE EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i>	49
4.4. EFEITO INIBITÓRIO DOS EXTRATOS SOBRE PROMASTIGOTAS DE <i>L. AMAZONENSIS</i> POR MTT.....	51
4.5. EFEITO INIBITÓRIO DOS EXTRATOS SOBRE PROMASTIGOTAS DE <i>L. AMAZONENSIS</i> POR MARCAÇÃO COM IP.....	51
4.6. DETERMINAÇÃO DO CI_{50} DOS EXTRATOS SOBRE PROMASTIGOTAS DE <i>L. AMAZONENSIS</i>	54
4.7. CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS LLCMK ₂	55
5. DISCUSSÃO.....	56
6. CONCLUSÃO.....	63
7. PERSPECTIVAS.....	64
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS

Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN's), segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde), são doenças infecciosas que se disseminam e se perpetuam em meios com precária estrutura sanitária, de moradia e alimentação, além da dificuldade de acesso ao sistema de saúde (Vasconcelos *et al.*, 2016). São endêmicas em populações de baixa renda que vivem principalmente em regiões em desenvolvimento com clima tropical ou subtropical, como a África Subsaariana, Ásia e América Latina (De Souza, 2010; WHO, 2018c). As DTN's podem ser causadas por agentes parasitas (helmintos e protozoários), bactérias, fungos, ectoparasitas ou vírus (Lindoso & Lindoso 2009).

O adjetivo “negligenciadas” surgiu pelo fato dessas doença não despertarem interesse das empresas farmacêuticas multinacionais, que não veem nos acometidos por essas doenças compradores potenciais de novos medicamentos, e por isso, as pesquisas dessas doenças vem sendo pouco financiadas pelas agências de fomento (De Souza, 2010). Estudos mostram que no período entre 1975 e 2004, apenas 1% dos 1535 novos fármacos registrados foram destinados às doenças negligenciadas, dados que comprovam que o investimento em pesquisa e desenvolvimento (P&D) de fármacos para DTN's é insuficiente frente à necessidade de tratamentos mais eficientes e com menos efeitos colaterais (Oliveira, 2009).

Atualmente, a OMS classifica vinte enfermidades como doenças tropicais negligenciadas (WHO, 2018c) e, várias das principais DTN's do mundo ocorrem no Brasil. O número de pessoas afetadas é mais elevado em regiões com maior pobreza, ocorrendo especialmente no norte e noroeste do país. Existe uma relação direta entre a prevalência dessas doenças e o índice de desenvolvimento humano (IDH). Doença de Chagas, leishmanioses, esquistossomose, dengue, hanseníase, oncocercose e filariose linfática são DTN's com maior prevalência (Lindoso & Lindoso 2009). No que se refere ao nível de financiamento internacional para pesquisa, doenças como AIDS, tuberculose e malária têm recebido investimentos significativos, não podendo ser mais

consideradas como “negligenciadas” se levarmos em consideração apenas o nível de financiamento (De Souza, 2010).

Entre as principais doenças negligenciadas que ocorrem no Brasil, a doença de Chagas e as leishmanioses são causadas por protozoários da família Trypanosomatidae. Ambas enfermidades acometem milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente América Latina e Brasil, causando incapacidade e morte de milhares de indivíduos todos os anos (WHO, 2018c).

1.2. DOENÇA DE CHAGAS

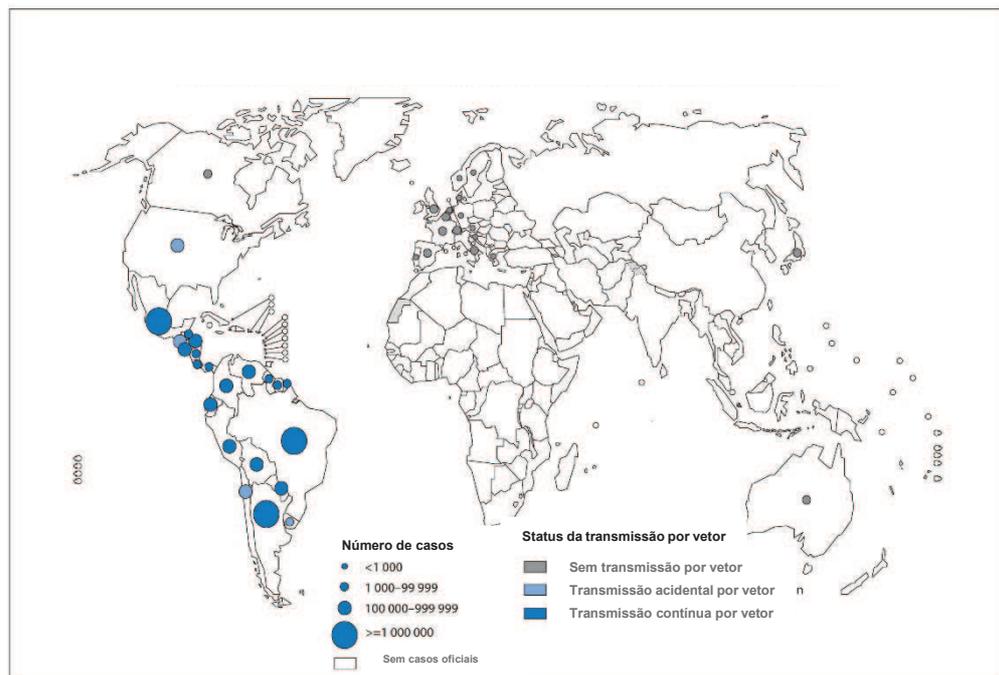
A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma doença potencialmente fatal, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). É classificada como uma antropozoonose, ou seja, é uma doença primária de animais que pode ser transmitida aos humanos. Apresenta o curso clínico bifásico, com uma fase aguda, por vezes assintomática, que perdura por 4 a 8 semanas. Essa fase é reconhecida pela replicação parasitária detectável por exame microscópico de sangue fresco (Bern, 2011; Ministério da Saúde, 2015). A fase aguda pode evoluir para a crônica, que é caracterizada pela redução parasitêmica (Rodrigues *et al.*, 2009). A fase crônica pode apresentar-se de duas formas: indeterminada, caracterizada por ausência de danos orgânicos demonstráveis por diagnóstico sorológico laboratorial (anticorpos IgG) (Rassi *et al.*, 2007); ou determinada, caracterizada por cardiomegalia, mega-esôfago, megacólon e dano ao sistema nervoso parassimpático (Bern *et al.*, 2011). A gravidade dos casos está relacionada à cepa infectante, à via de transmissão e à existência de outras patologias concomitantes (Ministério da Saúde, 2015).

1.2.1. Epidemiologia

Estima-se que 8 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo, principalmente na América Latina (Figura 1) e que mais de 10 mil pessoas morram todos os anos de manifestações clínicas da doença (WHO, 2018a). O aumento no número de casos registrados no mundo e a presença da doença de Chagas em países como Europa, Estados Unidos, Canadá e Japão, tem gerado grande preocupação dos setores de saúde pública (Gascon *et al.*, 2010), especialmente no que diz respeito aos

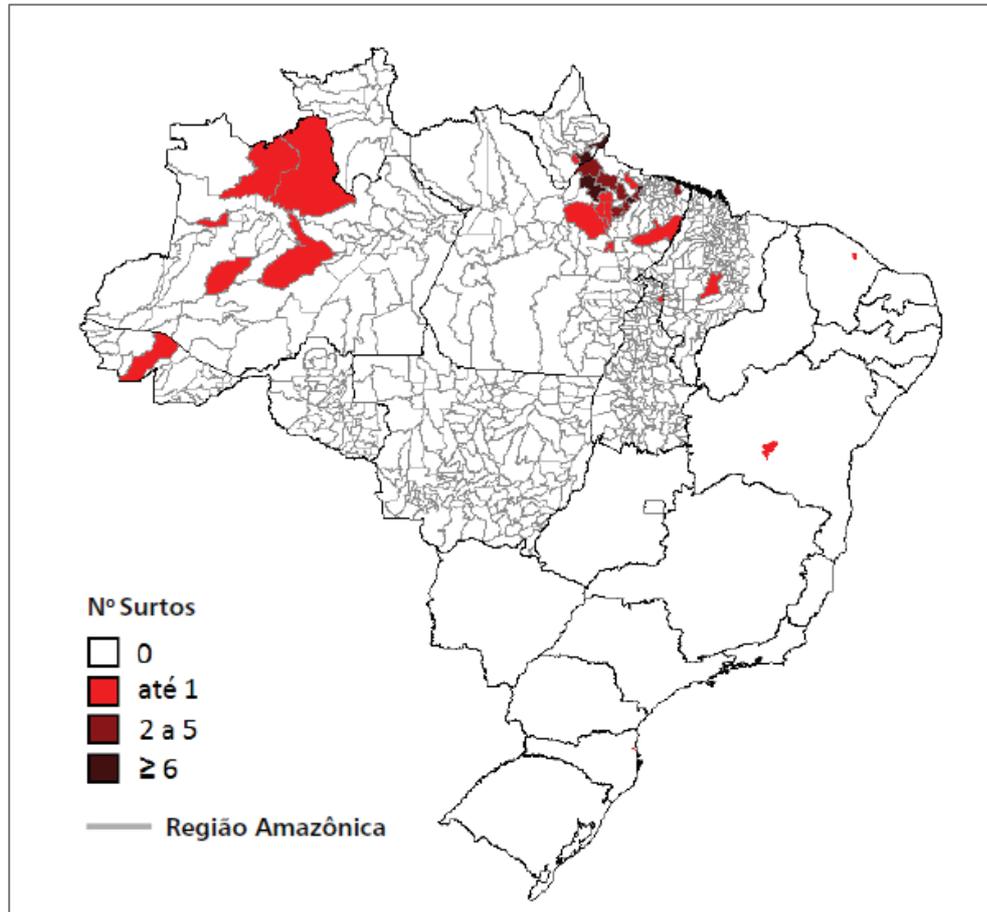
investimentos financeiros com tratamento (WHO, 2018a). O aparecimento em tais países depende, principalmente, da proporção de imigrantes vindos de áreas endêmicas (Ortí-Lucas *et al.*, 2014). Além disso, a doença gera elevados gastos, nos países acometidos.

Figura 1 – Distribuição mundial dos casos de doença de Chagas, incluindo os transmitidos por vetor, entre os anos de 2006 e 2009. Fonte: WHO, 2018a.



No Brasil, há cerca de dois a três milhões de pessoas infectadas. Estima-se que os casos fatais no país representem 43% do número total de indivíduos acometidos pela enfermidade na América Latina (Martins-Melo *et al.*, 2012). A região Norte é aquela que contribui com a maior proporção de casos no país (91,1%), principalmente o estado do Pará, que registrou 75% de todos os casos ocorridos no Brasil (Figura 2; Ministério da Saúde, 2015).

Figura 2 – Distribuição dos surtos de doença de Chagas no Brasil. Fonte: Ministério da Saúde, 2015.



1.2.2. Vias de transmissão do *Trypanosoma cruzi*

A principal forma de transmissão do *T. cruzi* é a via vetorial que ocorre através do inseto triatomíneo, popularmente conhecido como “barbeiro” (WHO, 2018a). Este inseto pode ser classificado em três principais gêneros: *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (Silveira, 2000). Os triatomíneos são hematófagos, possuem hábitos noturnos e apresentam em sua saliva substâncias anestésicas anticoagulantes, fazendo com que sua picada seja indolor (Garcia & Azambuja, 1991). Ao realizar o repasto sanguíneo, o inseto libera formas tripomastigotas de *T. cruzi* através de suas fezes. O hospedeiro, ao coçar o local da picada, gera pequenas lesões por onde o parasita pode penetrar. Tais formas também são capazes de penetrar no hospedeiro

através do contato com mucosas e ferimentos na pele (Garcia & Azumbuja, 1991; Coura, 2015).

Durante a década de 50, o início da industrialização do Brasil trouxe consigo imigrantes do campo, muitos deles chagásicos. A presença de doadores infectados nos bancos de sangue do país introduziu essa via de transmissão da doença. Décadas seguintes, a alta prevalência de doadores chagásicos, juntamente com a inexistência de programas de controle, fez com que a via transfusional se tornasse um dos principais meios de transmissão da doença. Com o controle gradativo da transmissão natural, através de vetores, a transfusão passou a ser o principal mecanismo de disseminação da doença em áreas endêmicas ao longo das décadas de 80 e 90 (Moraes-Souza & Ferreira-Silva, 2011). Atualmente, a triagem sorológica dos doadores vem reduzindo o índice de transmissão da doença de Chagas através dessa via. Porém, falhas na triagem clínica e sorológica ainda apresentam um risco para transmissão da doença (Silva, 2010).

Outra via de transmissão que tem se destacado nos últimos anos é a via oral, que ocorre pela ingestão de alimentos contendo formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Pereira *et al.*, 2009). Esse índice vem aumentando principalmente pela popularização do consumo do açaí, alimento considerado essencial na dieta da população da Região Norte. Esse alimento, assim como o caldo de cana, estão associados ao maior número de casos da doença, seja pela contaminação dos frutos ou da polpa por meio de dejetos do barbeiro contaminado com o protozoário (Ferreira *et al.*, 2014).

Existem ainda outras vias de transmissão como a vertical, a partir da mãe para o feto no útero ou durante o parto (Coura *et al.*, 2015), manipulação de animais infectados, transplante de órgãos e acidentes laboratoriais. Porém estas vias são responsáveis por índices muito baixos quando comparados com as vias oral e vetorial (Ministério da Saúde, 2015). A tabela 1 traz uma evolução das formas de transmissão no período de 2000 até 2013, no Brasil.

Tabela 1 – Casos confirmados de doença de Chagas aguda, ano de notificação e forma de transmissão. Brasil, 2000 a 2013. Fonte: Ministério da Saúde, 2015.

Forma de transmissão	Ano de notificação														Total	%
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013		
Oral	31	18	64	47	51	27	106	92	68	169	68	117	127	96	1.081	68,9
Ignorada*	10	6	11	8	9	3	8	59	24	34	36	61	49	54	372	23,7
Vetorial	-	-	-	1	1	-	4	4	11	16	25	10	8	20	100	6,4
Outras**	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	3	4	11	0,7
Vertical	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	2	6	0,4
Total	41	24	75	56	61	30	118	156	104	220	131	190	188	176	1.570	100,0

1.2.3. Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*

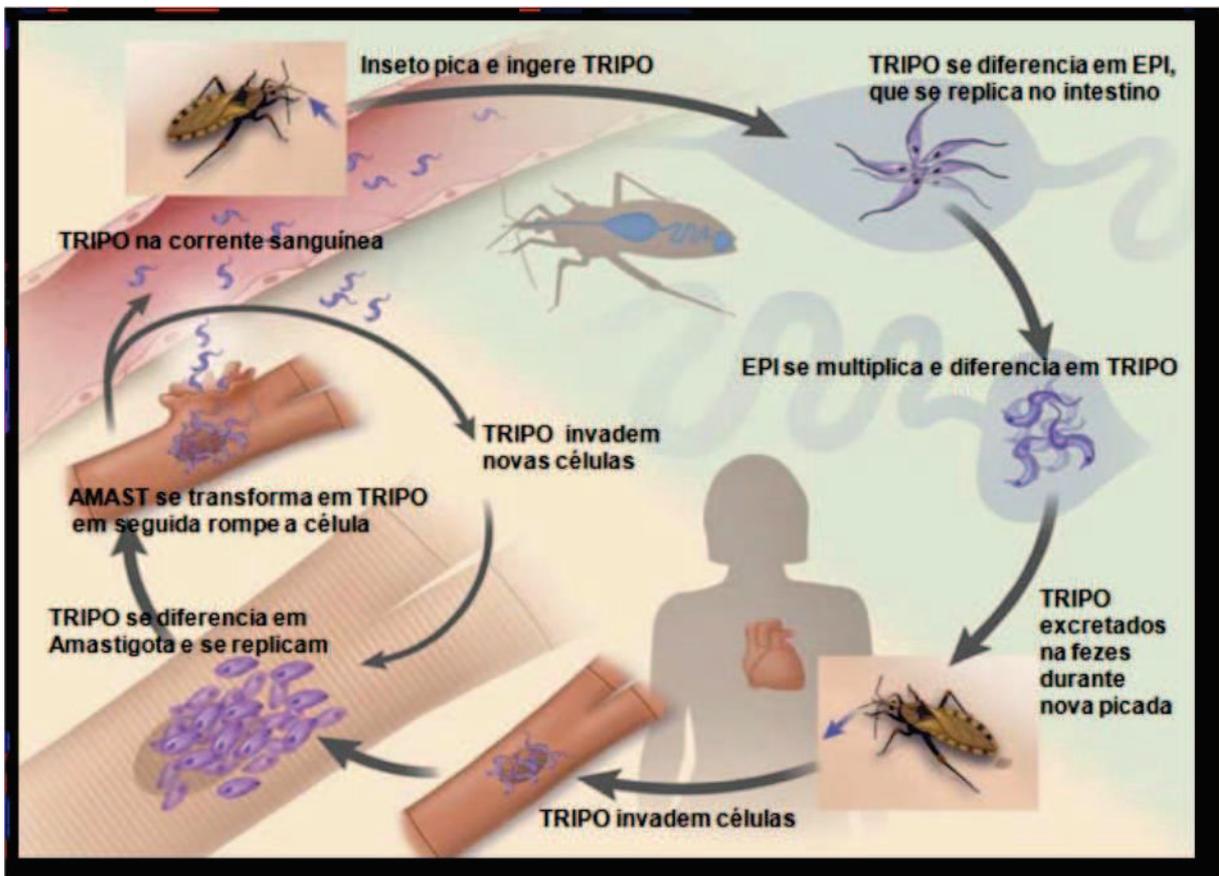
O *T. cruzi* é um protozoário flagelado da família Trypanosomatidae, pertencente à Ordem Kinetoplastea (Ald *et al.*, 2012). Apresenta ciclo de vida heteroxênico, ou seja, com hospedeiros vertebrados mamíferos (que inclui o homem) e insetos hemípteros (triatomíneo). Em seu ciclo, o *T. cruzi* apresenta três formas de desenvolvimento, que são caracterizadas morfológicamente pela posição do cinetoplasto em relação ao núcleo da célula e o local de emergência do flagelo. As formas epimastigotas estão presentes no intestino do inseto, são formas multiplicativas, de intensa mobilidade e possuem cinetoplasto localizado anteriormente ao núcleo e próximo a bolsa flagelar, de onde emerge o flagelo (Tyler & Engman, 2001). As formas tripomastigotas não são replicativas e correspondem à forma infectante extracelular. São encontradas tanto em hospedeiros invertebrados (tripomastigota metacíclico) quanto em vertebrados (tripomastigota sanguíneo). Apresentam um núcleo grande e central, cinetoplasto arredondado localizado na extremidade posterior do corpo do parasita, o flagelo emerge lateralmente à bolsa flagelar, aderido ao longo do corpo (De Souza, 2002). A forma amastigota, é intracelular e está presente em tecidos do hospedeiro vertebrado. Entre suas principais características morfológicas destacam-se o flagelo reduzido, corpo arredondado e cinetoplasto posicionado anteriormente ao núcleo (Brenner *et al.*, 2000).

A contaminação do triatomíneo ocorre quando ele se alimenta do sangue de um mamífero infectado, ingerindo formas tripomastigotas sanguíneas. Essas formas chegam no estômago do inseto onde se diferenciam em epimastigotas. Algumas epimastigotas e formas de transição são digeridas, os parasitas sobreviventes chegam ao intestino. Neste local, as formas epimastigotas começam a se multiplicar

por divisão binária. Chegando no intestino posterior, essas formas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, que são eliminados junto com as fezes e urina do inseto (Figura 3) (Brener *et al.*, 2000; Bern, 2011).

A contaminação do hospedeiro vertebrado ocorre durante a alimentação do inseto vetor. Neste processo, ele normalmente defeca enquanto realiza o repasto sanguíneo, depositando sob a pele ou mucosa do mamífero a forma tripomastigota metacíclica. O ato de coçar o local, estimulado por uma substância irritante liberada pelo vetor, provoca lesões na pele que resultam na inoculação do parasita. No organismo do hospedeiro, os tripomastigostas invadem uma gama de células nucleadas, como macrófagos, células musculares e epiteliais. Inicialmente os parasitas são fagocitados pelos macrófagos, onde há a formação do vacúolo parasitóforo. No interior do vacúolo ocorre a diferenciação para a forma replicativa amastigota e, ao mesmo tempo, a lise do vacúolo parasitóforo. Após vasta replicação no citoplasma, ocorre a diferenciação dos amastigostas em tripomastigotas que lisam a célula e rotornam à circulação para infectar outras células (Figura 3) (De Souza, 2013).

Figura 3 – Ciclo biológico do *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado (inseto) e no hospedeiro mamífero (homem) e suas formas de desenvolvimento. Fonte: Bern, 2011.



1.2.4. Tratamentos

Os fármacos mais utilizados no tratamento da doença de Chagas são Nifurtimox e Benzonidazol. O tratamento com Benzonidazol apresenta uma taxa de eficácia de aproximadamente 80% na fase aguda e 20% na fase crônica, sendo mais efetivo em indivíduos menores de 16 anos (Rassi *et al.*, 2009). Os efeitos colaterais produzidos por esse medicamento, como dermatite alérgica, parestesias, trombocitopenia e leucopenia, levam à interrupção do tratamento em 7 a 13% dos casos (Bern, 2011).

O Nifurtimox foi retirado do mercado brasileiro devido aos seus efeitos secundários, que podem ser: desconforto abdominal, cefaléia, vertigem, insônia, mialgia e diminuição da memória a curto prazo. Esses efeitos levavam a interrupção do tratamento em aproximadamente 40% dos pacientes (Bezerra *et al.*, 2012). Assim,

o Benzonidazol tornou-se a única opção para o tratamento da doença, apesar dos seus efeitos secundários e eficácia limitada em casos crônicos.

Ambos fármacos produzem anorexia, náuseas, êmese, perda de peso e neuropatia periférica (Bern, 2011). É importante ressaltar que além desses efeitos indesejados, existem pacientes chagásicos que não podem receber o tratamento porque estas drogas são contraindicadas para pacientes com disfunção renal e/ou hepática grave, mulheres grávidas, pessoas com problemas de deglutição, ou pessoas com hemopatias, infecções sistêmicas, insuficiência respiratória e neoplasias (Coura *et al.*, 2002). Além disso, diferentes cepas de *T. cruzi* exibem diferentes níveis de susceptibilidade a essas drogas, o que pode explicar a variabilidade na eficácia quimioterápica (Bezerra *et al.*, 2012).

1.3. LEISHMANIOSES

As leishmanioses são antropozoonoses de grande importância médica e veterinária. Essas patologias acometem o homem e algumas espécies de mamíferos sinantrópicos, silvestres e domésticos, os quais alguns são considerados como hospedeiros reservatórios (REY, 2001). Os agentes etiológicos são protozoários do gênero *Leishmania* que, de acordo com sua espécie e estado imunológico do hospedeiro, podem produzir três diferentes manifestações clínicas: cutânea, mucocutânea ou visceral (WHO, 2018b). As formas cutânea e mucocutânea da doença pertencem à classe da leishmaniose tegumentar americana (LTA) que é de baixa gravidade quando comparada à leishmaniose visceral e sua cura é geralmente espontânea ou após tratamento específico (Ministério da Saúde, 2017).

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum de leishmaniose e causa lesões cutâneas, principalmente úlceras em diversas partes do corpo (Figura 4a). Deixa cicatrizes e pode deixar graves incapacidades (Ministério da Saúde, 2017; WHO, 2018b).

A leishmaniose mucocutânea (LM) atinge as mucosas do nariz, boca e garganta, levando à destruição parcial ou total das membranas mucosas destes tecidos (Figura 4c) (Murray *et al.*, 2005; Ministério da Saúde, 2017; WHO, 2018b).

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é caracterizada por crises irregulares de febre, perda de peso, aumento do baço e do fígado e anemia (Figura 4b). Se não for tratada, é fatal em mais de 95% dos casos. (Ministério da Saúde, 2014; WHO, 2018b).

No Brasil, já foram identificadas sete espécies do parasita, seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*, sendo as três principais causadoras de LTA: *L. (V.) brasiliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. No Novo Mundo, a *L. (L.) chagasi* é a espécie comumente isolada em pacientes com LV (Lainson, 2010).

Sabe-se que mais de 90 espécies são transmissores do parasita *Leishmania*, no entanto, apenas dois gêneros de vetores são realmente importantes para a epidemiologia das leishmanioses no mundo: *Lutzomyia*, que são os vetores nas Américas; e *Phlebotomus*, que são os transmissores de leishmaniose na África, na Europa e na Ásia (Alvar *et al.*, 2012).

Figura 4 – Formas clínicas das leishmanioses. a – leishmania cutânea, b – leishmania visceral, c – leishmania mucocutânea. Fonte: WHO, 2018b.



1.3.1. Epidemiologia

As leishmanioses são consideradas endêmicas nos cinco continentes. Estima-se que aproximadamente 1,3 milhões de novos casos e 70.000 mortes ocorram anualmente, além de 350 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção no mundo (Torres-Guerreiro *et al.*, 2017). Segundo a OMS, em 2014 mais de 90% de novos casos de leishmaniose foram registrados em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2018b). É uma doença que afeta principalmente as regiões mais pobres e os países em desenvolvimento.

A leishmaniose tegumentar representa um problema de saúde pública em 85 países, distribuídos em quatro continentes (América, Europa, África e Ásia), com registro anual de 0,7 a 1,3 milhão de novos casos (Ministério da Saúde, 2017). Cerca de 95% dos casos de LC ocorre nas Américas, principalmente Brasil. Ocorrências também são comuns na Bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central (Figura 5). Mais de 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem na Bolívia, no Brasil, na Etiópia e no Peru (PAHO, 2018). O Brasil é um dos países de maior incidência das formas de manifestações da LTA que estão presentes em praticamente todos os estados brasileiros (Figura 6). Segundo o Ministério da Saúde, no período entre 1995 e 2014, verificou-se uma média anual de 25.763 novos registros no país.

Estima-se que 200.00 a 400.000 novos casos de LV ocorram anualmente no mundo, sendo que a maioria dos casos ocorre na Índia, Bangladesh, Etiópia, Quênia, Sudão e Brasil (Alvar *et al.*, 2012) (Figura 7). No Brasil, apesar de ocorrer a predominância da LTA, a leishmaniose visceral está presente com alta taxa de mortalidade e sua ocorrência se dá principalmente na região Nordeste (Figura 8). Dados do Ministério da Saúde mostram que houve incidência de 3.156 casos novos no país entre 2004 e 2014 (Ministério da Saúde, 2014).

Figura 5 – Distribuição dos casos de leishmaniose cutânea no mundo, no ano de 2015. Fonte: WHO, 2018b.

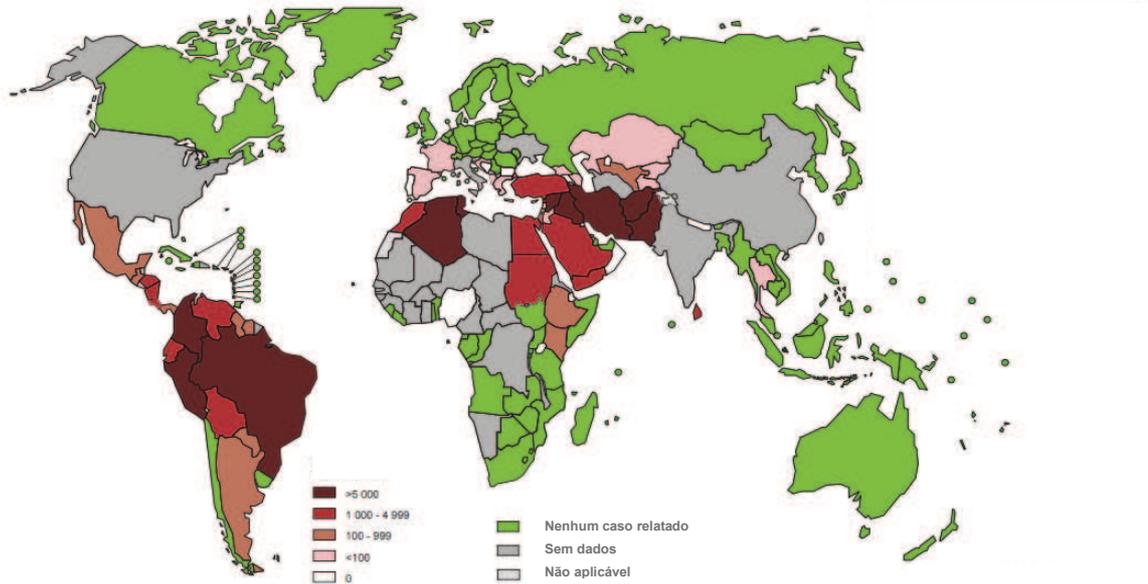


Figura 6 – Distribuição dos casos de leishmaniose tegumentar americana no Brasil, no ano de 2015. Fonte: Ministério da Saúde, 2017.



Figura 7 – Distribuição dos casos de leishmaniose visceral no mundo, no ano de 2015. Fonte: WHO, 2018b.

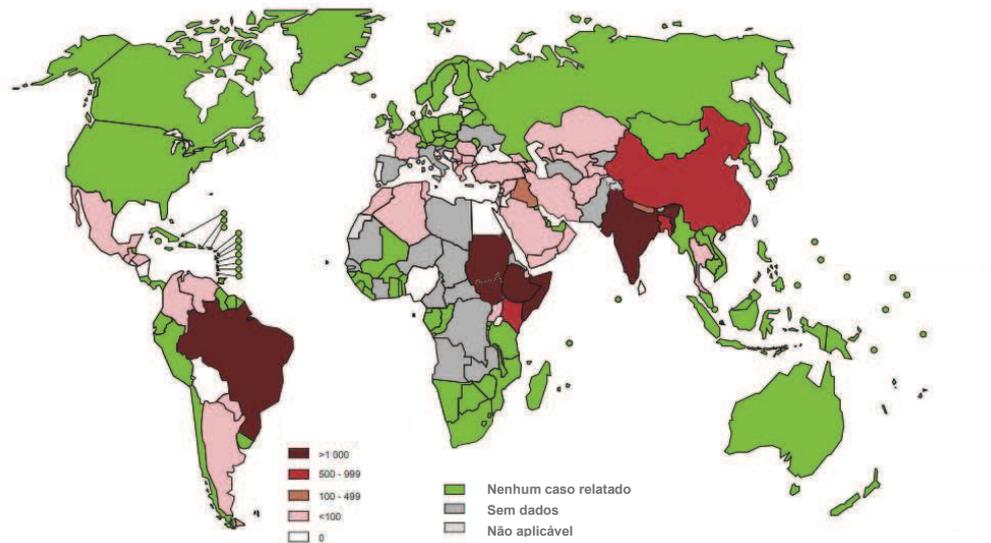
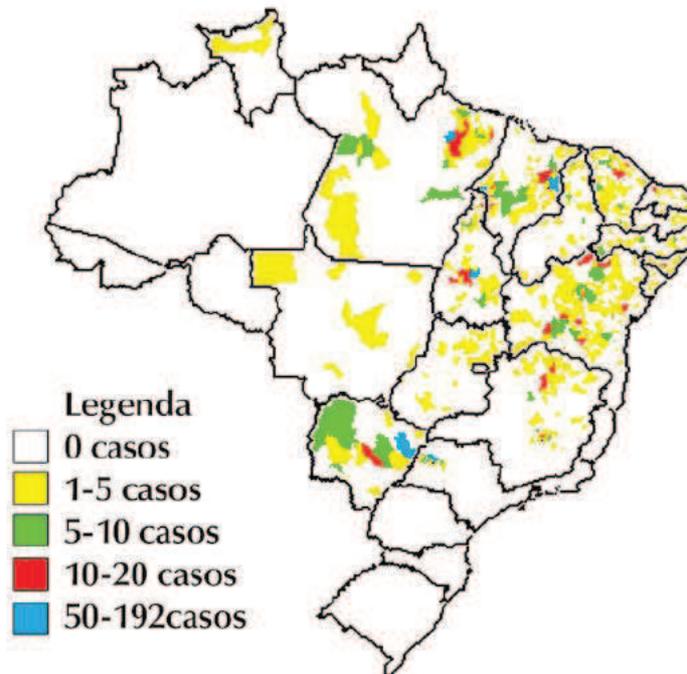


Figura 8 - Distribuição dos casos de leishmaniose visceral no Brasil, no ano de 2002. Fonte: Ministério da Saúde, 2014.

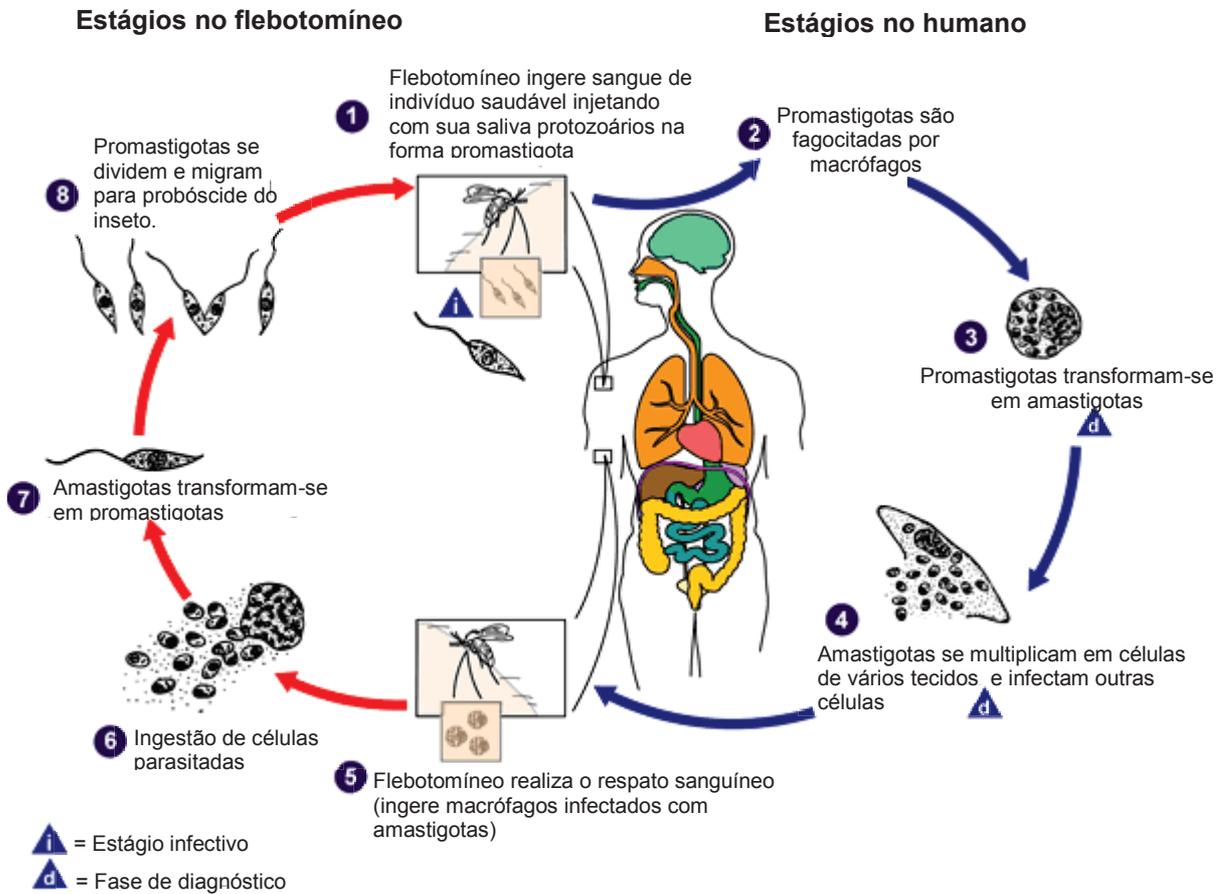


1.3.2. Ciclo biológico de *Leishmania*

Os parasitas do gênero *Leishmania*, assim como o *Trypanosoma cruzi*, pertencem a Ordem Kinetoplastea e a mesma família, ou seja, também são tripanossomatídeos. Possuem ciclo de vida na forma intracelular não móvel (amastigota) em hospedeiros vertebrados e, extracelular com motilidade flagelar (promastigota) nos hospedeiros invertebrados (Lainson, 2010).

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas realizam repasto sanguíneo em mamíferos infectados e ingerem macrófagos parasitados com amastigotas. No tubo digestivo do vetor estes macrófagos se rompem e liberam os parasitas, que se diferenciam em formas promastigotas procíclicas, passam por sucessivas divisões binárias e, posteriormente, outras formas intermediárias se diferenciam em formas promastigotas metacíclicas infectantes. Ao realizar um novo repasto sanguíneo, as formas metacíclicas são regurgitadas e transmitidas ao hospedeiro reiniciando o ciclo (Sacks & Kamhawi 2001, Bates *et al.* 2015). No hospedeiro vertebrado, as promastigotas são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear (neutrófilos e macrófagos) iniciando a fase de desenvolvimento intracelular do parasita no interior do vacúolo parasitóforo, onde se diferenciam em amastigotas. As amastigotas não se multiplicam no interior de neutrófilos. No entanto, multiplicam-se por divisão binária em macrófagos, que podem se romper e assim o parasita reinfecta mais células (Figura 9) (Kaye & Scott, 2011).

Figura 9 - Ciclo biológico da *Leishmania* no interior do inseto vetor e do hospedeiro mamífero. Fonte: Adaptado de CDC, 2018.



1.3.3. Tratamentos

Os fármacos utilizados para o tratamento das leishmanioses são divididos em duas categorias: fármacos de primeira escolha ou primeira linha e, os de segunda escolha ou segunda linha. Dentre os fármacos de primeira escolha estão os antimoniais pentavalentes, desenvolvidos há mais de 60 anos, o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®). Estes fármacos são conhecidos por terem vários efeitos secundários notáveis como náuseas, cólicas abdominais, diarreia, erupções cutâneas, hepatotoxicidade e cardiotoxicidade. Além disso, a resistência aos antimoniais têm sido um problema crescente por aproximadamente quatro décadas e, também estão associados com alta taxa de mortalidade, especialmente em pacientes coinfectados com HIV (Croft *et al.*, 2006).

Entre os agentes quimioterápicos utilizados como tratamento de segunda linha para a leishmaniose está o antibiótico anfotericina B, que pode ser encontrado também com formulação lipídica. Esses fármacos são utilizados contra LV (Balasegaram *et al.*, 2012). A anfotericina B, embora seja altamente eficaz, mesmo em pacientes que não respondem ao antimônio, tem restrições devido à sua toxicidade renal e à administração intravenosa lenta, o que é muito inconveniente ao paciente (Bhandari *et al.*, 2012). A anfotericina B lipossomal é preferida em relação à anfotericina B convencional devido seu perfil de toxicidade mais suave, entretanto, o seu uso permanece muito limitado devido ao elevado custo (Dorlo *et al.*, 2012).

A pentamidina é geralmente utilizada como fármaco de segunda escolha nos casos LC refratária aos tratamentos com antimoniais. Entretanto, esse medicamento possui efeitos tóxicos de 30 a 50% dos pacientes tratados, apresentando efeitos adversos graves, incluindo diabetes mellitus, hipoglicemia, miocardite e toxicidade renal, e por isso seu uso é limitado (Croft & Olliaro, 2011).

A miltefosina, registrada em 2001, foi a primeira droga a ser utilizada e continua a ser o único agente oral utilizado no tratamento de todos os tipos de leishmaniose (Dorlo *et al.*, 2012), embora tenha efeitos colaterais gastrointestinais (anorexia, náuseas, vômitos e diarréia), de hepatotoxicidade e insuficiência renal (Torres *et al.*, 2014).

Apesar de todos os esforços para combater a doença e permitir o uso de novas formulações, a quimioterapia em muitos países endêmicos, incluindo o Brasil, ainda é baseada em antimoniais pentavalentes ou anfotericina B convencional, independentemente da toxicidade aos pacientes e da via complexa de administração (Torres *et al.*, 2014).

Considerando-se as falhas apresentadas nos tratamentos disponíveis para essas doenças, a busca por novas substâncias que sejam mais eficazes no combate a estes protozoários é de fundamental importância.

1.4. MACROALGAS MARINHAS

Em geral, as macroalgas marinhas possuem hábitos bentônicos, são multicelulares e crescem, em sua maioria, aderidas ao substrato. A capacidade metabólica e fisiológica das macroalgas em lidar com variações dos fatores ambientais (bióticos e abióticos), tais como: herbivoria, competição, luz, temperatura, salinidade, períodos de imersão e submersão e disponibilidade de nutrientes, resultou na evolução de várias vias metabólicas secundárias responsáveis por produzir substâncias que apresentam uma alta diversidade química e estrutural, além de importantes funções ecológicas. Diversos metabólitos são conhecidos pela capacidade de inibir a herbivoria, outros possuem função reprodutiva ou mesmo de proteção contra radiação ultravioleta (Oliveira, 2013; Pereira *et al.*, 2017). Dentre os metabólitos isolados a partir de algas marinhas destacam-se: terpenóides, policetídeos, esteróis, ácidos graxos, carotenóides, polissacarídeos, aminoácidos, peptídeos e proteínas (Bhakuni & Rawat, 2005; Cardozo *et al.*, 2007). Além de serem utilizadas para nutrição, fabricação de cosméticos e produção de combustível, muitas destas substâncias possuem aplicação na saúde humana (Kolanjinathan *et al.*, 2014). Moléculas bioativas com atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiviral, antifúngica, antiparasitária, anticâncer vêm sendo isoladas a partir de espécies de algas marinhas (Cardozo *et al.*, 2007; Kolanjinathan *et al.*, 2014; Ruan *et al.*, 2018).

As macroalgas estão taxonomicamente organizadas em três divisões: Chlorophyta (algas verdes), Ochrophyta (algas pardas) e Rhodophyta (algas vermelhas) (Graham & Wilcox, 2000). As clorófitas possuem as clorofilas *a* e *b* como pigmentos mais abundantes, mas também possuem carotenos e xantofilas. A química de algas verdes marinhas é pouco estudada quando comparada às outras divisões. Os isoprenóides são a principal classe de metabólitos secundários produzidos por estas algas. Dentre outros metabólitos produzidos estão substâncias halogenadas, carboidratos e acetogeninas (Blunt *et al.*, 2014).

As algas pardas por sua vez, possuem clorofila *a* e *c*, mas os carotenóides são os seus pigmentos mais abundantes, incluindo a fucoxantina, que proporciona a cor marrom escura ou verde oliva aos representantes deste grupo. As algas pardas

constituem o grupo mais bem estudado no Brasil. Os principais produtos do seu metabolismo secundário são derivados do isopreno. Também são comumente capazes de produzir polifenóis, substâncias halogenadas, alcalóides e esteróis sulfatados (Pereira *et al.*, 2011; Teixeira, 2013)

Já as algas vermelhas possuem clorofila *a* e os pigmentos acessórios compostos de carotenos (como betacaroteno) e ficobilinas (ficoeritrina, ficocianina e aoficocianina), conferindo-lhes à coloração avermelhada. Apesar do nome, muitas rodofíceas podem ter outras colorações, dependendo do tipo e da quantidade de pigmento acessório (Silva, 2010; Teixeira, 2013). Estas algas formam o grupo mais rico em diversidade e abundância de metabólitos secundários. Dentre os diversos metabólitos produzidos, os principais correspondem a substâncias halogenadas como terpenos, policetídeos, fenóis e hidrocarbonetos voláteis (McClintock & Backer, 2011; Teixeira, 2013).

1.4.1 Macroalgas com atividade contra *T. cruzi* e *L. amazonensis*

A macroalgas despertaram interesse para o estudo de novas drogas com ação antiparasitária, com base em sua utilização pela medicina tradicional¹ para tratamento de doenças parasitárias desde 300 A.C. A espécie *Digenea simplex*, por exemplo é utilizada por suas propriedades anti-helmínticas e inseticidas em países do leste asiático há mais de 1000 anos (Nitta *et al.*, 1958). Além disso, a medicina tradicional chinesa possui registros em manuscritos antigos sobre o uso medicinal de espécies de *Sargassum* (Liu *et al.*, 2012). Desde então, diversos trabalhos com extratos de espécies de algas do mundo inteiro investigaram algum efeito contra os tripanosomatídeos causadores da doença de Chagas e leishmanioses (Torres *et al.*, 2014).

Nas tabelas 2 e 3 estão apresentados trabalhos de diversas partes do mundo com investigação de extratos de diversas espécies de macroalgas que apresentaram inibição da proliferação de *T. cruzi* e *Leishmania*. A maioria dos trabalhos que

¹ Segundo a OMS, medicina tradicional é a soma de conhecimentos, habilidades e práticas baseadas nas teorias, crenças e experiências indígenas em diferentes culturas, explicáveis ou não, usadas na manutenção da saúde, bem como na prevenção, diagnóstico, melhoria ou tratamento de doença física ou mental (WHO, 2018d).

avaliaram atividade leishmanicida, testou também atividade tripanocida, porém não obtiveram resultados de inibição com as concentrações de extrato estudadas.

Tabela 2 – Extratos de espécies de macroalgas com atividade contra formas tripomastigotas de *T. cruzi*. *Teste contra epimastigota.

Localidade	Referência	Espécies
Turquia	Süzgeç-Selçuk <i>et al.</i> , 2011	<i>Dasya pedicellata</i>
Golfo do México	León-Deniz <i>et al.</i> , 2009	<i>Gracilaria caudata</i> , <i>Gracilaria cervicornis</i> , <i>Laurencia microcladia</i> , <i>Dictyota caribaea</i> , <i>Lobophora variegata</i> , <i>Turbinaria turbinata</i> , <i>Halimeda incrassata</i> , <i>Rhipocephalus phoenix</i> f. <i>brevifolius</i>
Inglaterra e Irlanda	Spavieri <i>et al.</i> , 2010a	<i>Cladophora rupestris</i> , <i>Ulva lactuca</i>
	Spavieri <i>et al.</i> , 2010b	<i>Cystoseira baccata</i> , <i>Cystoseira tamariscifolia</i> , <i>Bifurcaria bifurcata</i> , <i>Halidrys siliquosa</i> , <i>Sargassum muticum</i> .
Brasil	Bianco <i>et al.</i> , 2014	<i>Dictyota</i> sp.

Tabela 3 – Extratos de espécies de macroalgas com atividade contra diferentes formas e espécies de *Leishmania*.

Localidade	Referência	Espécies
Paquistão	Sabina <i>et al.</i> , 2005	Promastigotas <i>L. major</i>
		<i>Caulerpa racemosa</i> , <i>Ulva fasciata</i> , <i>Caulerpa faridii</i> , <i>Codium flabellatum</i> , <i>Codium iyengarii</i> , <i>Ulva reticulata</i> , <i>Ulva rigida</i> , <i>Laurencia pinnatifida</i> , <i>Melanothamnus afaqhusainii</i> , <i>Gracilaria corticata</i> , <i>Scinaia hatei</i> , <i>Scinaia indica</i> , <i>Centroceras clavulatum</i> , <i>Botryocladia leptopoda</i> .
Turquia	Orhan <i>et al.</i> , 2006	Amastigotas <i>L. donovani</i> <i>Dictyota dichotoma</i> , <i>Posidonia oceanica</i> , <i>Scinia furcellata</i> , <i>Sargassum natans</i> e <i>Ulva lactuca</i>
	Süzgeç-Selçuk <i>et al.</i> , 2011	Amastigotas <i>L. donovani</i> <i>Ceramium rubrum</i> e <i>Gelidium crinale</i> , <i>Cystoseira barbata</i> , <i>Caulerpa racemosa</i> , <i>Codium bursa</i> , <i>Cystoseira barbata</i> , <i>Cystoseira crinata</i> , <i>Corallina granifera</i> , <i>Jania rubens</i> , <i>Gracilaria verrucosa</i> , <i>Dasya pedicellata</i>
	Freile-Pelegrin <i>et al.</i> , 2008	Amastigotas <i>L. mexicana</i> <i>Laurencia microcladia</i> , <i>Dictyota caribaea</i> , <i>Turbinaria turbinata</i> and <i>Lobophora variegata</i>
Inglaterra e Irlanda	Allmendinger <i>et al.</i> , 2010	Amastigotas <i>L. donovani</i> <i>Boergeseniella fruticulosa</i> ; <i>Calliblepharis jubata</i> ; <i>Ceramium virgatum</i> , <i>Chylocladia verticillata</i> , <i>Claviconium ovatum</i> , <i>Corallina officinalis</i> , <i>Cryptopleura ramosa</i> , <i>Cystoclonium purpureum</i> , <i>Dumontia incrassata</i> , <i>Furcellaria lumbricalis</i> , <i>Gelidium pulchellum</i> , <i>Gracilaria gracilis</i> , <i>Halopitys incurvus</i> , <i>Jania rubens</i> , <i>Lomentaria articulata</i> , <i>Mastocarpus stellatus</i> , <i>Osmundea hybrida</i> , <i>Osmundea pinnatifida</i> , <i>Plocamium cartilagineum</i> , <i>Polyides rotundus</i> , <i>Porphyra linearis</i>
	Spavieri <i>et al.</i> , 2010a	Amastigota <i>L. donovani</i> <i>Cladophora rupestris</i> , <i>Codium fragile</i> ssp. <i>tomentosoides</i> , <i>Ulva intestinalis</i> and <i>Ulva lactuca</i>
	Spavieri <i>et al.</i> , 2010b	Amastigota <i>L. donovani</i> <i>Pylaiella littoralis</i> , <i>Chorda filum</i> , <i>Leathesia difformis</i> , <i>Dictyota dichotoma</i> , <i>Ascophyllum nodosum</i> , <i>Fucus ceranoides</i> , <i>Fucus serratus</i> , <i>Fucus spiralis</i> , <i>Fucus vesiculosus</i> , <i>Pelvetia canaliculata</i> , <i>Himantalia elongata</i> , <i>Laminaria digitata</i> , <i>Saccorhiza polyschides</i> , <i>Cystoseira baccata</i> , <i>Cystoseira tamariscifolia</i> , <i>Bifurcaria bifurcata</i> , <i>Halidrys siliquosa</i> , <i>Sargassum muticum</i> , <i>Colpomenia peregrina</i> , <i>Scytosiphon lomentaria</i> , <i>Stypocaulon scoparium</i> .
França	Vonthron-Senecheau <i>et al.</i> , 2011	Amastigotas <i>L. donovani</i> <i>Bifurcaria bifurcata</i> , <i>Dictyopteris polypodioides</i> , <i>Dictyota dichotoma</i> , <i>Dilsea carnosa</i>
Brasil	Bianco <i>et al.</i> , 2014	Promastigota <i>L. brasiliensis</i> <i>Anadyomene saldanhae</i> , <i>Canistrocarpus cervicornis</i> , <i>Caulerpa cupressoides</i> , <i>Dictyota</i> sp., <i>Ochtodes secundiramea</i> , <i>Padina</i> sp.
		Amastigota <i>L. brasiliensis</i> <i>Anadyomene saldanhae</i> e <i>Padina</i> sp.
		Promastigota <i>L. amazonensis</i> <i>Caulerpa racemosa</i> , <i>Osmundaria obtusiloba</i> , <i>Stypopodium zonale</i> , <i>Dictyota ciliolata</i> , and <i>Dictyota menstrualis</i>
	Lira <i>et al.</i> , 2016.	

Entre os metabólitos secundários produzidos por algas, halogenados terpenóides e acetogeninas têm mostrado atividade leishmanicida (Torres *et al.*, 2014).

Os terpenos elatol, triquinano e obtusol, isolados da alga vermelha *Laurencia dendroidea*, mostraram atividade antiparasitária, com baixa toxicidade para células de mamífero. O elatol foi o que mostrou maior atividade biológica contra *T. cruzi* e *L. amazonensis*. Para *T. cruzi*, apresentou CI_{50} igual a 45,4, 1,38 e 1,01 μM contra epimastigota, tripomastigota e amastigota, respectivamente e, CC_{50} de 27 μM em células LLCMK₂ (Veiga-Santos *et al.*, 2010). Contra as formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, apresentou CI_{50} de 4 μM e 0,45 μM , respectivamente, e CC_{50} de 1,4 μM em macrófagos peritoneais (dos Santos *et al.*, 2010). Obtusol apresentou atividade contra promastigota (CI_{50} = 6,2 $\mu g/mL$) e amastigota intracelular (CI_{50} = 3,9 $\mu g/mL$) de *L. amazonensis* e baixa citotoxicidade em macrófagos (CC_{50} = 133,5 $\mu g/mL$). Já o triquinano, apesar de ter apresentado a menor atividade contra promastigota (CI_{50} = 43,8 $\mu g/mL$) e amastigota intracelular (CI_{50} = 48,7 $\mu g/mL$) de *L. amazonensis*, foi o que exibiu menor citotoxicidade em macrófagos (CC_{50} = 160,2 $\mu g/mL$) (Machado *et al.*, 2011).

O diterpeno dolabelladienetriol isolado de *Dictyota pfaffi* exibiu CI_{50} de 43,9 μM contra amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* (Soares *et al.*, 2012). E o diterpeno secodolastaino obtido da alga *Canistrocarpus cervicornis* mostrou CI_{50} de 2,0 e 4,0 $\mu g/mL$ contra as formas promastigota e amastigota intracelular de *L. amazonensis*, respectivamente. O ensaio de citotoxicidade em macrófagos J774G8 exibiu CC_{50} de 186,0 $\mu g/mL$ (dos Santos *et al.*, 2011).

Frações de n-hexano e diclorometano do extrato de *Bostrychia tenella* mostrou potencial tripanocida (CI_{50} de 16,8 e 19,1 $\mu g/mL$ contra *T. cruzi*, respectivamente). Subfrações do diclorometano chegaram a apresentar CI_{50} de 1,5 $\mu g/mL$ contra *L. amazonensis* (Felício *et al.*, 2010).

Fucosterol extraído da alga parda *Lessonia vadosa* foi capaz de inibir o crescimento de *L. infantum* e *L. amazonensis*, exibindo CI_{50} < 10 μM contra amastigota intracelular da segunda espécie (Becerra *et al.*, 2015).

Polissacarídeos sulfatados das espécies *Soleria filiformis* e *Botryocladia accidentalis* apresentaram moderada atividade anti-leishmanial (CI_{50} de 63,7 $\mu\text{g/mL}$ e 137,4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) contra promastigotas de *L. amazonensis*. A substância extraída de *Caulerpa racemosa* foi a mais potente, com CI_{50} de 34,5 $\mu\text{g/mL}$. Em ensaios de citotoxicidade, nenhuma das substâncias estudadas reduziram o crescimento de macrófagos peritoneais, porém apresentaram CC_{50} de 99,8, 27,3, 49,3 e $\mu\text{g/mL}$ (*S. filiformis*, *B. accidentalis* e *C. racemosa*) contra macrófagos J774 (Pires *et al.*, 2013).

Minicante e colaboradores (2016) investigaram efeito de ficoloides de diversas macroalgas contra promastigotas de *L. infantum* e tripomastigotas de *T. cruzi* e também citotoxicidade nas linhagens de DH82, VERO, L929, MDCK e U937. Com as concentrações utilizadas, nenhuma espécie de macroalga foi ativa contra *T. cruzi* e não tiveram efeito citotóxico. A maioria foi capaz de inibir o crescimento de *L. infantum*, com destaque para espécie *Undaria pinnatifida* que apresentou viabilidade de 15,16% com a concentração mínima estudada (20 $\mu\text{g/mL}$). As espécies *Chaetomorpha linum*, *Gracilaria viridis*, *Hypnea cornuta*, *Gracilaria bursa-pastoris* e *Sargassum muticum* também causaram inibição no crescimento de *L. infantum* (Minicante *et al.*, 2016).

Extrato de *Dictyota mertensii* mostrou significativo efeito inibitório no crescimento de promastigota de *L. amazonensis* ($CI_{50} = 71,6 \mu\text{g/mL}$) e baixa toxicidade contra macrófagos ($CC_{50} = 233,1 \mu\text{g/mL}$). Contra amastigota, o extrato apresentou CI_{50} de 81,4 $\mu\text{g/mL}$ (Aliança *et al.*, 2014).

Sabe-se que a costa do Brasil possui alta riqueza em táxons de macroalgas bênticas, sendo a região de Cabo Frio e arredores, no estado do Rio de Janeiro, uma das mais importantes áreas de diversidade de algas marinhas do Brasil (Brasileiro *et al.*, 2009). Apesar disso, existem poucos trabalhos que avaliam o potencial de macroalgas para produção de substâncias contra protozoários de interesse médico e, nenhum produto natural marinho ou qualquer derivado entrou para avaliação pré-clínica para doenças causadas por tripanosomatídeos (Torres *et al.*, 2014).

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a atividade tripanocida e leishmanicida de diferentes espécies de macroalgas marinhas da Região dos Lagos, no estado do Rio de Janeiro.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade dos extratos, em diferentes concentrações, contra os tripanosomatídeos *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*.
- Avaliar a citotoxicidade em linhagens de células de mamífero LLCMK₂ de todos os extratos que apresentarem inibição da viabilidade dos parasitas, superior à 50%.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MACROALGAS

3.1.1. Coleta das Macroalgas

Os espécimes de macroalgas foram coletados através de mergulho livre, na região entre-marés e infralitoral, ao longo da Costa da Região dos Lagos, no estado do Rio de Janeiro, especificamente nas praias: Rasa (22°43'58.99"S; 41°57'26.19"W), Armação (22°44'58.06"S; 41°52'55.11"W), Ossos (22°44'40.11"S; 41°52'54.14"W), Geribá (22°46'54.46"S; 41°54'45.82"W), Ferradurinha (22°46'53.68"S; 41°54'0.37") no Município de Armação dos Búzios; Prainha (22°57'35.18"S; 42° 1'9.05"W) e Forno (22°58'4.20"S; 42° 0'53.64"W), no Município de Arraial do Cabo e, Conchas (22°52'4.71"S; 41°58'51.45"W), no Município de Cabo Frio.

O material coletado foi triado para retirada de epífitas, sedimentos e outros organismos associados. Após remoção do excesso de água em papel toalha, as algas foram pesadas (peso úmido – p.u.) e colocadas para secar em temperatura ambiente e protegidas do sol para evitar fotodegradação. Uma parte do material foi separado em formaldeído (5% em água do mar) para identificação taxonômica, preparo de exsicata e depósito em herbário. A outra parte foi destinada a obtenção dos extratos.

3.1.2. Preparo dos extratos

As algas secas foram pesadas e trituradas em cadinho até obtenção de um pó. Posteriormente, foram submetidas a duas extrações sequenciais de 24 h cada, com uma mistura de diclorometano:metanol (CH₂Cl₂: MeOH; PA, Tedia) na proporção de 2:1. Visando padronizar a relação de massa/solvente, foram estabelecidas classes de peso seco e proporção de volume de solvente de acordo com a biomassa de cada amostra, conforme tabela abaixo (Tabela 4). O solvente foi reduzido por evaporação em capela e o rendimento da extração foi calculado através de pesagem do extrato. Os extratos foram armazenados sob refrigeração (- 4 °C). Para a realização dos ensaios de atividade tripanocida, leishmanicida e citotoxicidade, os extratos foram diluídos em DMSO (dimetilsulfoxide; Sigma-Aldrich) a uma concentração inicial de 50 mg/mL. A solução estoque foi guardada sob refrigeração e protegida da luz.

Tabela 4. Relação biomassa/solvente (g/ml) utilizada para obtenção dos extratos das macroalgas.

Peso Seco	0 - 2g	2 - 5 g	5 - 10 g	10 - 15 g	15 - 20 g	20 - 25 g	25 - 30 g	30 - 35 g	35 - 40 g
Volume de Solvente	20 mL	25 mL	40 mL	60 mL	80 mL	100 mL	120 mL	140 mL	160 mL

3.2. PARASITAS E LINHAGENS CELULARES

3.2.1. Trypanosoma cruzi

As formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) foram cultivadas em garrafa de cultura celular de 25 cm² contendo meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (Camargo, 1964) suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino; Gibco) inativado. Os parasitas foram mantidos a 28 °C em estufa incubadora B.O.D (Demanda Bioquímica de Oxigênio), e repicados a cada três dias. Parasitas na fase exponencial de crescimento foram utilizados em todos os experimentos.

3.2.2. Leishmania amazonensis

Culturas de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (cepa MHOM/BR/75/Josefa) foram mantidas a 25°C em garrafas de cultura celular de 25 cm² contendo meio Warren (Warren, 1960) suplementado com 10% de SFB inativado. Os repiques da cultura foram realizados a cada três dias. Parasitas na fase exponencial de crescimento até, no máximo, a quinta passagem, foram utilizados para os experimentos.

3.2.3. Células de mamífero: fibroblastos da linhagem LLCMK₂

Fibroblastos da linhagem LLCMK₂ foram cultivados em garrafa de cultura celular (25 cm² ou 75 cm²) em meio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*; Gibco), suplementado com 10% de SFB inativado. A cultura foi mantida em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Para manutenção das células, o meio de cultivo das garrafas confluentes foi removido e as células lavadas com PBS (tampão fosfato salino) estéril, pH 7,4. A garrafa foi incubada com tripsina-EDTA (0,05: 0,02%) durante 3 minutos

para liberar as células do substrato. Para inativação da tripsina-EDTA, RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB foi adicionado e homogeneizado vigorosamente com a pipeta para total desprendimento das células aderidas. As alíquotas das suspensões celulares obtidas foram transferidas para novas garrafas com meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB.

3.3. ENSAIO BIOLÓGICO PARA DETECÇÃO DE ATIVIDADE TRIPANOCIDA E LEISHMANICIDA

Foi realizada uma varredura inicial da atividade dos extratos das macroalgas sobre os tripanosomatídeos. Para avaliar o efeito desses extratos sobre a viabilidade de epimastigotas de *T. cruzi*, os parasitas em fase exponencial de crescimento foram coletados e ajustados à concentração de 10^7 células/mL em meio LIT suplementado com 10% de SFB, totalizando 1 mL. Após 24 h acrescentou-se os extratos na concentração fixa de 100 µg/mL, com concentração final de DMSO de 1%. Como controle, os protozoários foram incubados somente em meio de cultura acrescido de SFB com DMSO 1%, para avaliar se o DMSO utilizado como diluente dos extratos não promovia qualquer inibição da viabilidade dos parasitas. As células foram incubadas a 28 °C por 48 h. Após esse período, a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT (item 3.4). As leituras foram normalizadas para porcentagem de viabilidade em relação ao controle.

Para avaliar o efeito dos extratos sobre a viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis*, os parasitas em fase exponencial de crescimento foram contados em câmara de Neubauer e ajustados para 10^7 células/mL em meio Warren suplementado com 10% de SFB para um volume final de 1 mL. Os parasitas foram incubados por 48 h a 25 °C na presença dos extratos à concentração de 100 µg/mL com concentração final de DMSO de 1%. Como controle foi utilizado DMSO 1% em meio de cultura com SFB. A viabilidade foi avaliada pelo ensaio do MTT (item 3.4).

Os ensaios de ambos parasitas foi realizado em tubo plástico com tampa (Eppendorf®) de 1,5 mL a fim de evitar evaporação do conteúdo líquido, pois quando feito em placas de 96 poços, após 48h de incubação foi observada a redução do volume por evaporação, comprometendo a concentração testada.

Após essa varredura inicial, os extratos capazes de inibir acima de 50% a viabilidade dos tripanosomatídeos, foram selecionados para os ensaios de viabilidade por iodeto de propídio, determinação do CI_{50} e ensaio de citotoxicidade em células LLCMK₂.

3.4. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO ENSAIO DO MTT

O ensaio do MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) é um método colorimétrico utilizado na medição de proliferação celular. Este método baseia-se na redução dos sais amarelos de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Formam-se intracelularmente cristais de formazan azuis que são solubilizados e posteriormente analisados por espectrofotometria de raios ultravioleta e visível (UV-Vis). Deste modo, quanto menor for a viabilidade celular, menor será a redução do MTT e menor sinal espectrofotométrico (Mosmann, 1983).

O MTT (M2128; Sigma) foi dissolvido em PBS estéril à 5 mg/mL e filtrado. A cultura dos parasitas com os extratos de macroalgas foi transferida para placa de 96 poços, posteriormente a solução estoque foi adicionada à cultura (10 μ L de MTT por 100 μ L de cultura). O material foi incubado por 3 h, protegido da luz, nas mesmas condições de temperatura descritas no item 3.3 para cada espécie de protozoário. Em seguida foi adicionado à cultura 20 μ L de SDS 20% e incubado por 1 h, para rompimento e liberação dos cristais de formazan das células. Para total solubilização dos cristais foi adicionado 80 μ L de DMSO e incubado por mais 1 h. Todas as soluções adicionadas foram homogeneizadas até total mistura dos componentes. A placa contendo os controles e as culturas de protozoários tratadas com diferentes extratos foi lida em espectrofotômetro SpectraMax M2e a 570 nm de comprimento de onda. Como controle negativo² da leitura no espectrofotômetro, adicionou-se 0,4% de formaldeído em alguns poços contendo os parasitas, causando a morte dos mesmos.

Nas placas contendo células LLCMK₂, o meio foi totalmente retirado vertendo-se a placa. Adicionou-se-se 100 μ L de tampão de eletroporação (21 mM HEPES, 137

² No ensaio do MTT, somente células metabolicamente ativas são capazes de converter o MTT em cristais de formazan, que quando solubilizados causam mudança de coloração no meio, gerando diferentes leituras de absorvância de acordo com a intensidade da coloração. Nos poços com células mortas não há mudança de coloração, e por isso eles são chamados de controle negativo do método.

mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM NaH₂PO₄, 6 mM glucose e pH 7,4) e 10 µL da solução de MTT a 5 mg/mL. As placas foram incubadas no escuro sob as mesmas condições de temperatura descritas no item 3.2.3 por 4 h. Posteriormente o tampão com MTT foi retirado e adicionado 100 µL de DMSO sob intensa homogeneização para solubilização dos cristais. A placa foi lida em espectrofotômetro SpectraMax M2e a 570 nm de comprimento de onda. Foi utilizado formaldeído a 0,4% como controle negativo do método.

Todos os ensaios foram realizados em pelo menos três experimentos independentes em duplicata.

Foram feitos testes pilotos para estabelecer a faixa de concentração dos extratos a serem utilizados nos experimentos subsequentes. As concentrações testadas nos ensaios pilotos variaram de 5 até 500 µg/mL.

3.5. ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO MÉTODO DO IODETO DE PROPÍDIO UTILIZANDO A TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO

O iodeto de propídio (IP) é uma molécula capaz de se intercalar ao DNA de células que estejam com a membrana permeável. Como o IP não consegue atravessar uma membrana citoplasmática saudável, este composto é utilizado para avaliar a integridade da membrana plasmática e, por conseguinte, a viabilidade da célula. Assim, células marcadas com IP são células mortas ou em processo de morte celular e que por isso não são mais capazes de se dividir (Novo *et al.*, 2000). Através da técnica de citometria de fluxo utilizando equipamento BD[®] Accuri C6 é possível quantificar células de uma amostra de volume conhecido, bem como identificar células marcadas com compostos fluorescentes, como o IP.

Parasitas foram cultivados conforme o item 3.3. e tratados após 24 h com diversas concentrações de extratos: *T. cruzi* (100, 250 e 500 µg/mL) e *L. amazonensis* (50, 100 e 250 µg/mL). Células incubadas somente com DMSO a 1% foram utilizadas como controle para avaliar se, na concentração utilizada neste trabalho, o diluente DMSO apresentava toxicidade para os parasitas. As soluções estoque de todos os extratos (na concentração de 50 mg/mL) foram diluídas em meio de cultura a fim de viabilizar que a concentração final de DMSO não ultrapassasse 1%. Após 48 h de

incubação, os parasitas foram diluídos 10 x em PBS estéril pH 7,4, incubados com IP a uma concentração final de 2,5 µg/mL por 5 minutos e analisados em citômetro de fluxo BD® Accuri C6 utilizando-se o filtro FL3. Foi utilizado como parâmetro de leitura do citômetro, o volume de 10 µL. Como controle positivo³ do método, as células foram tratadas com etanol 70% resfriado (-1 a -4 °C) na proporção de 1:1. As contagens de células viáveis e mortas (marcadas com IP) foram obtidas através do software BD® Accuri C6. Os valores foram normalizados para porcentagem em relação ao controle do experimento. Os cálculos foram feitos com auxílio o software Excel. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.6. DETERMINAÇÃO DO CI_{50} DOS EXTRATOS EM *T. CRUZI* E *L. AMAZONENSIS*

O coeficiente de inibição (CI_{50}) equivale à concentração de um composto (substância ou extrato) capaz de inibir 50% da proliferação ou viabilidade celular. Novo ensaio biológico foi realizado, de acordo com o item 3.2.2, utilizando-se agora 4 concentrações dos extratos: 50, 100, 250 e 500 µg/mL, nos tempos de 24, 48 e 72 h de crescimento. A viabilidade foi determinada pela contagem de células não marcadas com IP conforme o item 3.5. O CI_{50} foi determinado por análise de regressão logarítmica, pelo software Excel. Triplicatas foram utilizadas para cada concentração.

3.7. EFEITO CITOTÓXICO DOS EXTRATOS EM CELULAS LLCMK₂

Culturas de células LLCMK₂ confluentes foram cultivadas em placa de 96 poços, a uma concentração de 2×10^5 células por poço em meio RPMI-1640 suplementado com 2% de SFB. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 h, o meio foi completamente retirado e substituído por meio fresco suplementado com 0,5% de SFB. A esse novo meio foram adicionados os extratos nas concentrações de 5, 25, 50 e 100 µg/mL em uma concentração final de DMSO de 1%. Como controle utilizou-se DMSO a 1% em meio de cultura com SFB. Após 96 h da adição dos extratos, a viabilidade celular foi avaliada através do teste do MTT (item

³ Controle positivo do método: Apenas as células com a membrana permeável irão incorporar o iodeto de propídio e emitir fluorescência detectável pelo filtro FL3 no citômetro de fluxo. Ao fixar as células com etanol, suas membranas tornam-se permeáveis ao IP e vão gerar o sinal de fluorescência que será lido pelo citômetro. Por isso, essas células mortas (fixadas com etanol), que geram o sinal de fluorescência, são um controle positivo da leitura no citômetro.

3.4). Os valores das leituras foram normalizados para porcentagem em relação ao controle. O CC_{50} (coeficiente de citotoxicidade) foi determinado por análise de regressão logarítmica utilizando-se o software Excel.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação de dados entre as células totais e mortas do item 3.5, foi analisada pelo teste T não pareado de Student através do software Excel. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. COLETA E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

As coletas foram realizadas durante o mês de julho de 2017, na Região dos Lagos, no estado do Rio de Janeiro. Búzios foi a cidade que apresentou maior número de espécimes coletados, totalizando 19 na praia Rasa, 6 na Ferradurinha, 4 na praia da Armação, 2 na Praia de Geribá e 1 na dos Ossos. Em Arraial do Cabo foram amostradas 10 macroalgas na Prainha e 2 na Praia do Forno. Na cidade de Cabo Frio foram coletadas 4 amostras de macroalgas na Praia das Cochas. Do total de 48 espécimes, 28 corresponderam a algas vermelhas; 10 a algas verde e 10 algas pardas. Foram identificadas 37 espécies diferentes.

As amostras foram numeradas de 1 a 48 de acordo com a ordem do local e data de coleta. Essas numerações posteriormente foram utilizadas para identificar os extratos. Dessa maneira, extratos de espécies iguais possuem numerações diferentes pois as algas foram coletados em locais distintos. A identificação das algas, locais de coleta, numeração e rendimento dos extratos brutos são apresentados na Tabela 5. Devido a morfologia esponjosa das espécies do gênero *Codium*, o processo de secagem foi mais lento, favorecendo a proliferação de fungos e insetos. Por isso 2 amostras tiveram que ser descartadas, uma coletada em Búzios e outra em Cabo Frio, amostras 32 e 45, respectivamente.

Tabela 5 - Amostragem de macroalgas coletadas. Espécie, numeração dos extratos, local de coleta, peso úmido (PU), peso seco (PS) e rendimento dos extratos.

Espécie	Extratos	Local	PU (g)	PS (g)	Rendimento (%)
Divisão Chlorophyta					
<i>Caulerpa racemosa</i>	3	Rasa	119,05	10,12	1,64
<i>Caulerpa racemosa</i>	47	Conchas	156,1	5,18	9,76
<i>Chaetomorpha antennina</i>	4	Rasa	25,51	6,2	2,33
<i>Codium decortcatum</i>	32	Ossos	206,58	x	x
<i>Codium decortcatum</i>	7	Rasa	27,54	2,75	1,55
<i>Codium intertextum</i>	21	Prainha	76,47	8,13	6,37
<i>Codium taylorii</i>	6	Rasa	13,6	1,64	2,08
<i>Codium taylori</i>	20	Prainha	92,1	7,75	6,09
<i>Codium sp.</i>	5	Rasa	89,9	15,36	1,06
<i>Codium sp.</i>	45	Conchas	213,44	x	x

Espécie	Extratos	Local	PU (g)	PS (g)	Rendimento (%)
Divisão Ochrophyta					
<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	9	Rasa	17,41	2,85	5,92
<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	22	Prainha	61,66	8,9	8,92
<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	41	Geribá	50,83	6,48	11,04
<i>Chnoospora minima</i>	26	Prainha	19,51	4,12	2,82
<i>Colpomenia sinuosa</i>	10	Rasa	12,79	1,38	1,31
<i>Colpomenia sinuosa</i>	30	Armação	34,42	2,49	3,55
<i>Padina sp.</i>	2	Rasa	36,65	10,5	2,79
<i>Padina sp.</i>	23	Prainha	8,81	2,35	8,37
<i>Sargassum vulgare</i>	16	Rasa	69,6	22,83	2,27
<i>Sargassum vulgare</i>	28	Prainha	73,33	15,39	2,62
Divisão Rhodophyta					
<i>Acanthophora spicifera</i>	12	Rasa	33,41	4,81	1,25
<i>Asparagopsis taxiformis.</i>	46	Conchas	29,45	3,08	6,64
<i>Athrocladia sp.</i>	43	Ferradurinha	15,59	4,72	0,35
<i>Champia sp.</i>	27	Prainha	10,66	0,76	11,51
<i>Chondracanthus acicularis</i>	13	Rasa	5,45	2,05	0,25
<i>Cryptonemia seminervis</i>	38	Ferradurinha	51,21	10,1	2,76
<i>Dasya ocellata</i>	18	Rasa	14,98	2,7	3,97
<i>Dasya sp.</i>	19	Rasa	48,9	11,95	1,87
<i>Gelidium pusillum</i>	11	Rasa	14,96	5,35	1,16
<i>Gracilaria sp.</i>	14	Rasa	7,71	1,55	0,82
<i>Hypnea pseudomusciformes</i>	25	Prainha	6,5	0,97	4,00
<i>Hypnea spinella</i>	24	Prainha	6,1	0,66	13,20
<i>Hypnea sp.</i>	33	Armação	57,09	7,75	16,33
<i>Hypnea sp.</i>	44	Geribá	3,39	0,56	4,90
<i>Laurencia dendroidea.</i>	34	Armação	57,32	5,65	7,66
<i>Laurencia dendroidea</i>	36	Forno	39,79	3,2	9,88
<i>Laurencia sp.</i>	48	Conchas	13,8	1,17	4,64
<i>Osmundaria obtusiloba</i>	17	Rasa	64,55	18,9	7,40
<i>Plocamium brasiliense</i>	1	Rasa	39,49	8,84	1,89
<i>Plocamium brasiliense</i>	40	Ferradurinha	28,73	3,58	2,71
<i>Pterocladia capillacea</i>	39	Ferradurinha	157,1	37,59	1,77
<i>Pterocladia capillacea</i>	42	Ferradurinha	17,38	7,11	3,12
<i>Rhodymenia pseudopalmata</i>	15	Rasa	10,18	3,18	1,15
<i>Rhodymenia pseudopalmata</i>	37	Ferradurinha	29,1	5,25	6,43
<i>Spyridia clavata</i>	35	Forno	142,33	18	5,04
<i>Spyridia sp.</i>	29	Prainha	212,56	21,77	5,26
<i>Spyridia sp.</i>	31	Armação	5,36	0,78	11,49
<i>Wurdemanni miniata</i>	8	Rasa	13,23	3,39	0,86

4.1. EFEITO INIBITÓRIO DOS EXTRATOS SOBRE EPIMASTIGOTAS DE *T. CRUZI* POR MTT

Com objetivo de avaliar atividade dos extratos contra formas epimastigotas de *T. cruzi*, foi realizada uma triagem utilizando uma concentração de 100 µg/mL para todos os extratos. Após 48 h de crescimento na presença dos extratos, as amostras controle e tratadas foram submetidas à análise pelo método do MTT, que determina a viabilidade celular através da redução de sais de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais de células metabolicamente ativas (Figura 10).

De 46 extratos testados, 42 foram capazes de diminuir a viabilidade de *T. cruzi*. Apenas 4 (menos de 10%) não diminuíram a viabilidade celular deste protozoário, foram os extratos de: *Osmudaria obtusiloba* (Rasa, BU), *Hypnea spinella* (Prainha, AC), *Laurencia dendroidea* (Forno, AC) e *Athrocladia sp* (Ferradurinha, BU). Frente à grande quantidade de extratos com atividade (91%), foram selecionados aqueles que apresentaram inibição acima de 50% para os ensaios de viabilidade celular através do iodeto de propídio, determinação de CI_{50} e citotoxicidade. As amostras que promoveram inibições acima de 90 % foram das espécies *Canistrocarpus cervicornis* (Prainha, BU), *Laurencia dendroidea* (Armação, BU), *C. cervicornis* (Geribá, BU) e *Laurencia sp.* (Conchas, CF).

Na tabela 6 estão listadas espécies de macroalgas que foram coletadas em diferentes localidades e a inibição do extrato de cada local. Houve diferença na inibição de *T. cruzi* entre extratos de mesmas espécies. *Laurecia dendroidea* foi a espécie que apresentou maior diferença, promovendo 93% de inibição com o extrato da alga coletada na Armação (BU) e nenhuma atividade (0 %) com o extrato do Forno (AC). *Sargassum vulgare* e *Rodymenia pseudopalmata* não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os extratos das macroalgas coletadas em locais distintos.

Figura 10 - Viabilidade celular por MTT de *T. cruzi* tratado com 100 µg/mL dos extratos das macroalgas por 48h. (*) Representa inibição em mais de 50% da viabilidade dos protozoários. As barras representam as médias e erro-padrão. O ensaio foi feito em triplicata.

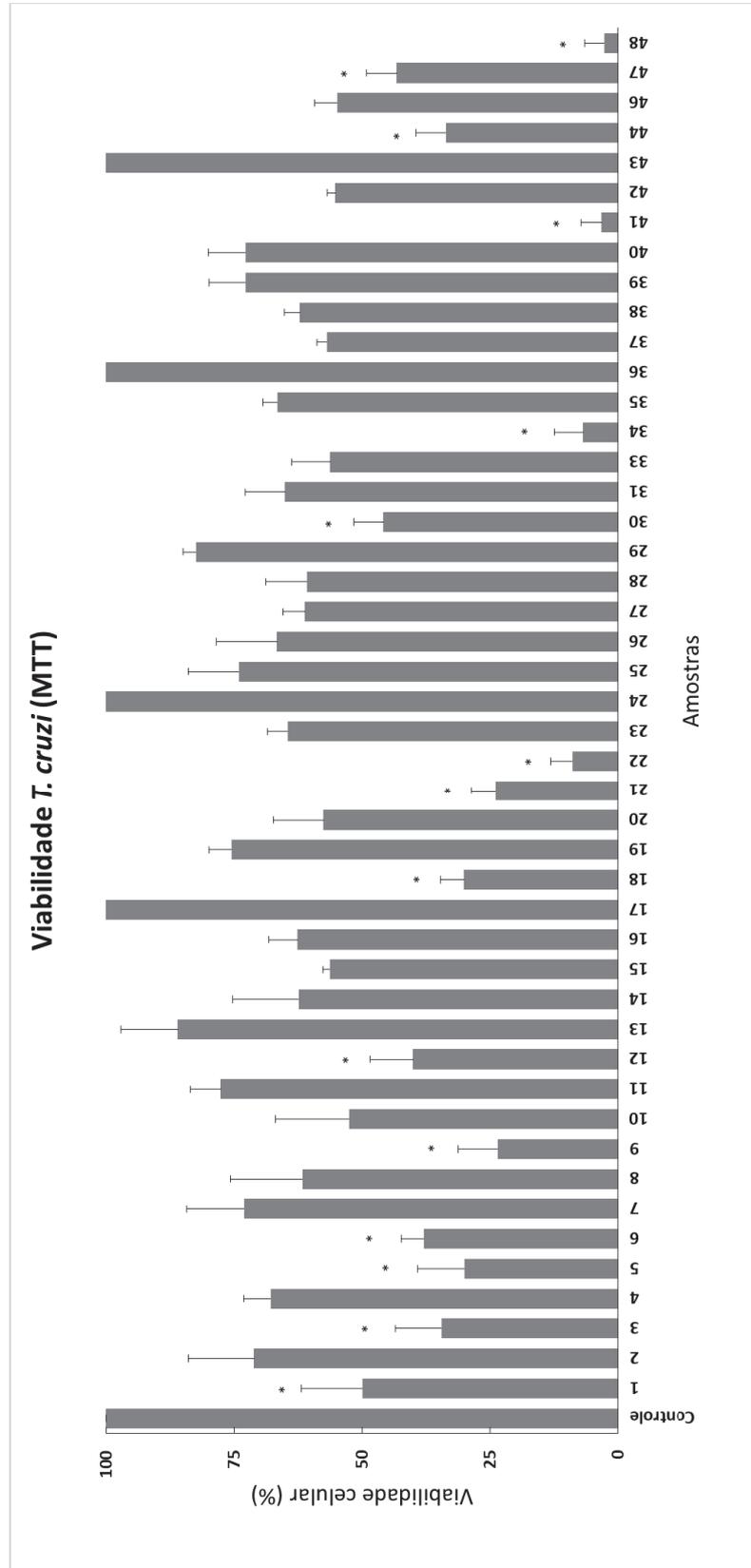


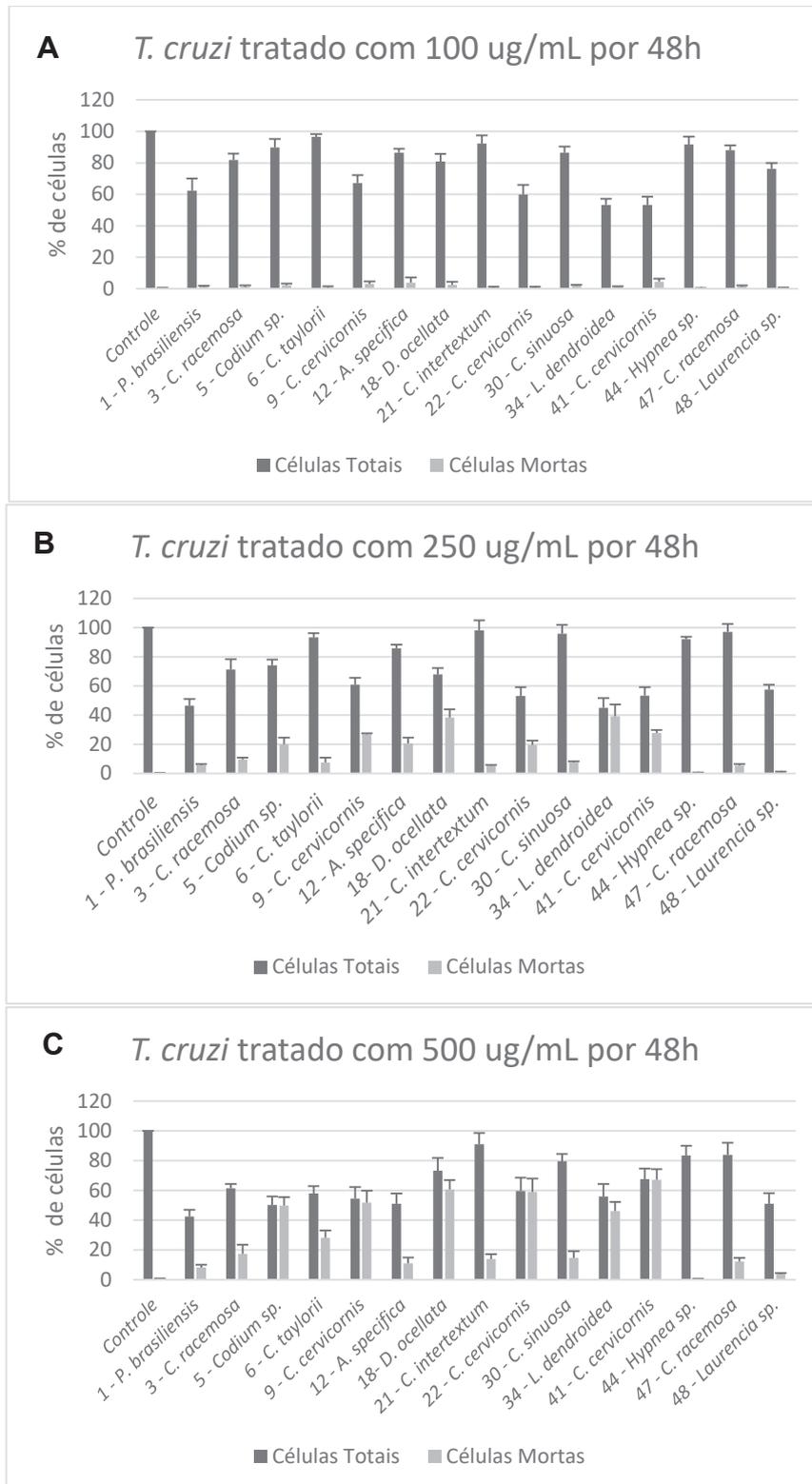
Tabela 6 – Porcentagem de inibição da viabilidade celular por MTT dos extratos de espécies comuns de algas coletadas em locais diferentes sobre *T. cruzi* e *L. amazonensis*.

Espécie	Extrato	Local de Coleta	Inibição <i>T.cruzi</i>	Inibição <i>L.</i> <i>amazonensis</i>
<i>Caulerpa racemosa</i>	3	Rasa, BU	56%	43%
	57	Conchas, CF	67%	31%
<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	9	Rasa, BU	77%	23%
	22	Prainha, AC	91%	57%
	41	Geribá, BU	97%	53%
<i>Codium taylorii</i>	6	Rasa, BU	62%	6%
	20	Prainha, AC	43%	12%
<i>Colpomenia sinuosa</i>	10	Rasa, BU	47%	22%
	30	Armação, BU	54%	7%
<i>Laurencia dendroidea</i>	34	Armação, BU	93%	74%
	36	Forno, AC	0%	0%
<i>Plocamium brasiliense</i>	1	Rasa, BU	50%	27%
	40	Ferradurinha, BU	27%	14%
<i>Rodymenia pseudopalmata</i>	15	Rasa, BU	44%	1%
	37	Ferradurinha, BU	43%	11%
<i>Sargasum vulgare</i>	16	Rasa, BU	37%	4%
	28	Prainha, AC	39%	18%

4.2. EFEITO INIBITÓRIO DOS EXTRATOS SOBRE EPIMASTIGOTAS DE *T. CRUZI* POR MARCAÇÃO COM IP

A viabilidade de *T. cruzi* foi avaliada através do uso do iodeto de propídio (IP) e expressa em % de células totais e % de células mortas (células com aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática e marcadas com IP) (Figura 11). Foi possível observar aumento na permeabilidade da membrana de maneira dose-dependente. Com a maior concentração utilizada (Figura 11 C), seis extratos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o total de células e células mortas, ou seja, todas as células presentes na amostra estavam mortas. Foram eles: *Codium sp.* (Rasa, BU), *D. canistrocarpus* (Rasa, BU), *D. ocellata* (Rasa, BU), *D. canistrocarpus* (Prainha, AC), *L. dendroidea* (Armação, BU) e *C. cervicornis* (Geribá, BU). Sendo que *L. dendroidea* (Armação, BU) apresentou seu efeito máximo já com a concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$. As espécies *Hypnea sp.* (Geribá, BU) e *Laurencia sp.* (Conchas, CF) tiveram menos de 5% das células marcadas com IP, em todas as concentrações.

Figura 11 – Porcentagem de células totais e mortas de *T. cruzi* tratado com extratos de macroalgas no ensaio de integridade de membrana (marcação com IP). A- Concentração de 100 µg/mL; B - 250 µg/mL e C – 500 µg/mL. Os ensaios foram realizados em triplicata.



4.3. DETERMINAÇÃO DO CI_{50} DOS EXTRATOS SOBRE EPIMASTIGOTAS DE *T. CRUZI*

Foram estabelecidos os CI_{50} , com base no ensaio de viabilidade celular por iodeto de propídio, para 15 amostras de extratos apresentadas na Tabela 7. Os valores de CI_{50} de onze extratos diminuíram conforme o aumento do tempo de tratamento. Não foi possível calcular o CI_{50} dos extratos de quatro espécies, com as concentrações utilizadas ($CI_{50} > 500 \mu\text{g}/\text{mL}$).

No menor tempo de tratamento (24 h), os únicos extratos que apresentaram CI_{50} inferiores a $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ foram aqueles das espécies *Laurencia dendroidea* ($CI_{50} = 151,4 \mu\text{g}/\text{mL}$) e *Canistrocarpus cervicornis* ($CI_{50} = 199,5 \mu\text{g}/\text{mL}$).

Com 48 h de tratamento, todos os extratos de *Canistrocarpus cervicornis* apresentaram baixos CI_{50} quando comparados às outras espécies. As algas coletadas em Geribá (BU), Prainha (AC) e Rasa (BU) apresentaram CI_{50} de $100 \mu\text{g}/\text{mL}$, $134,2 \mu\text{g}/\text{mL}$ e $162,2 \mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. *Laurencia dendroidea* (34) foi a segunda espécie com maior atividade contra *T. cruzi* ($CI_{50} = 102,3 \mu\text{g}/\text{mL}$). *Plocamium brasiliense* (1) com $169,8 \mu\text{g}/\text{mL}$ e *Dasya ocellata* (18) com $186,2 \mu\text{g}/\text{mL}$ também se destacaram como espécies tripanocidas. Todos os outros apresentaram CI_{50} acima de $200 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Com o tempo máximo de tratamento avaliado (72 h), *Laurencia dendroidea* (34) foi a espécie com menor CI_{50} de $89,1 \mu\text{g}/\text{mL}$, seguido das espécies *Canistrocarpus cervicornis* (22) com $93,3 \mu\text{g}/\text{mL}$, *Dasya ocellata* (18), com $102,3 \mu\text{g}/\text{mL}$, *Canistrocarpus cervicornis* (22 e 9) com $104,7 \mu\text{g}/\text{mL}$ e $114,8 \mu\text{g}/\text{mL}$ e *Plocamium brasiliense* com $151,4 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Tabela 7 – CI₅₀ de extratos de macroalgas em *T. cruzi*. (Valores em µg/mL).

CI ₅₀ - <i>T. cruzi</i>				
Extratos	Espécies	24h	48h	72h
34	<i>Laurencia dendroidea</i>	151,4	102,3	89,1
41	<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	199,5	100,0	93,3
1	<i>Plocamium brasiliense</i>	257,0	169,8	151,4
22	<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	269,2	134,9	104,7
5	<i>Codium sp.</i>	281,8	275,4	263,0
9	<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	323,6	162,2	114,8
6	<i>Codium taylorii</i>	426,6	407,4	354,8
18	<i>Dasya ocellata</i>	>500	186,2	102,3
48	<i>Laurencia sp.</i>	>500	363,1	263,0
12	<i>Acanthophora spicifera</i>	>500	416,9	398,1
3	<i>Caulerpa racemosa</i>	>500	436,5	416,9
21	<i>Codium intertextum</i>	>500	>500	>500
30	<i>Copomenia sinuosa</i>	>500	>500	>500
44	<i>Hypnea sp.</i>	>500	>500	>500
47	<i>Caulerpa racemosa</i>	>500	>500	>500

4.4. EFEITO INIBITÓRIO DOS EXTRATOS SOBRE PROMASTIGOTAS DE *L. AMAZONENSIS* POR MTT

Para avaliar a atividade leishmanicida, os extratos extraídos das macroalgas foram testados a uma concentração inicial de 100 µg/mL. A viabilidade das formas promastigotas de *L. amazonensis* avaliadas pelo ensaio de MTT evidenciaram que apenas 8 amostras de extratos não inibiram (menos de 20%) a viabilidade do parasita: *Padina sp.*, *Chaetomorpha antennina*, *Rhodymenia sp.*, *Sargassum vulgare*, *Dasya sp.*, coletadas na Praia Rasa (BU); *Padina sp.* e *Hypnea spinella*, coletadas da Prainha (AC) e *Laurencia dendroidea*, coletada no Forno (AC) (Figura 12).

Assim como em *T. cruzi*, apenas os extratos capazes de inibir em 50% ou mais a proliferação de *L. amazonensis*, foram utilizados para os próximos experimentos de viabilidade por iodeto de propídio, determinação do CI₅₀ e citotoxicidade. Foram eles: *Canistrocarpus cervicornis* (Prainha, AC), *Laurencia dendroidea* (Armação, BU), *Canistrocarpus cervicornis* (Geribá, BU) e *Laurencia sp.* (Conchas, CF).

A maioria dos extratos de mesma espécie apresentaram diferenças entre os locais coletados no quesito inibição da viabilidade de *L. amazonensis*. A alga *Laurencia dendroidea* apresentou a maior diferença, exibindo atividade no extrato da Armação (BU) e nenhuma atividade no extrato da alga coletada no Forno (AC) (Tabela 7).

4.5. EFEITO INIBITÓRIO DOS EXTRATOS SOBRE PROMASTIGOTAS DE *L. AMAZONENSIS* POR MARCAÇÃO COM IP

Diferente de *T. cruzi*, para *L. amazonensis* as concentrações utilizadas foram um pouco mais baixas, pois com a menor concentração de 50 µg/mL, os extratos já foram capazes de causar alterações na permeabilidade da membrana de mais de 5 % da população total. Por isso, as concentrações escolhidas foram 50, 100 e 250 µg/mL (Figura 13).

Assim como em *T. cruzi*, conforme houve o aumento da concentração dos extratos, a porcentagem de células marcadas com IP aumentou.

Figura 12 – Viabilidade celular por MTT de *L. amazonensis* tratado com 100 µg/mL dos extratos das macroalgas por 48h. (*) Representa inibição em mais de 50% da viabilidade dos protozoários. As barras representam as médias e erro-padrão. O ensaio foi feito em triplicata.

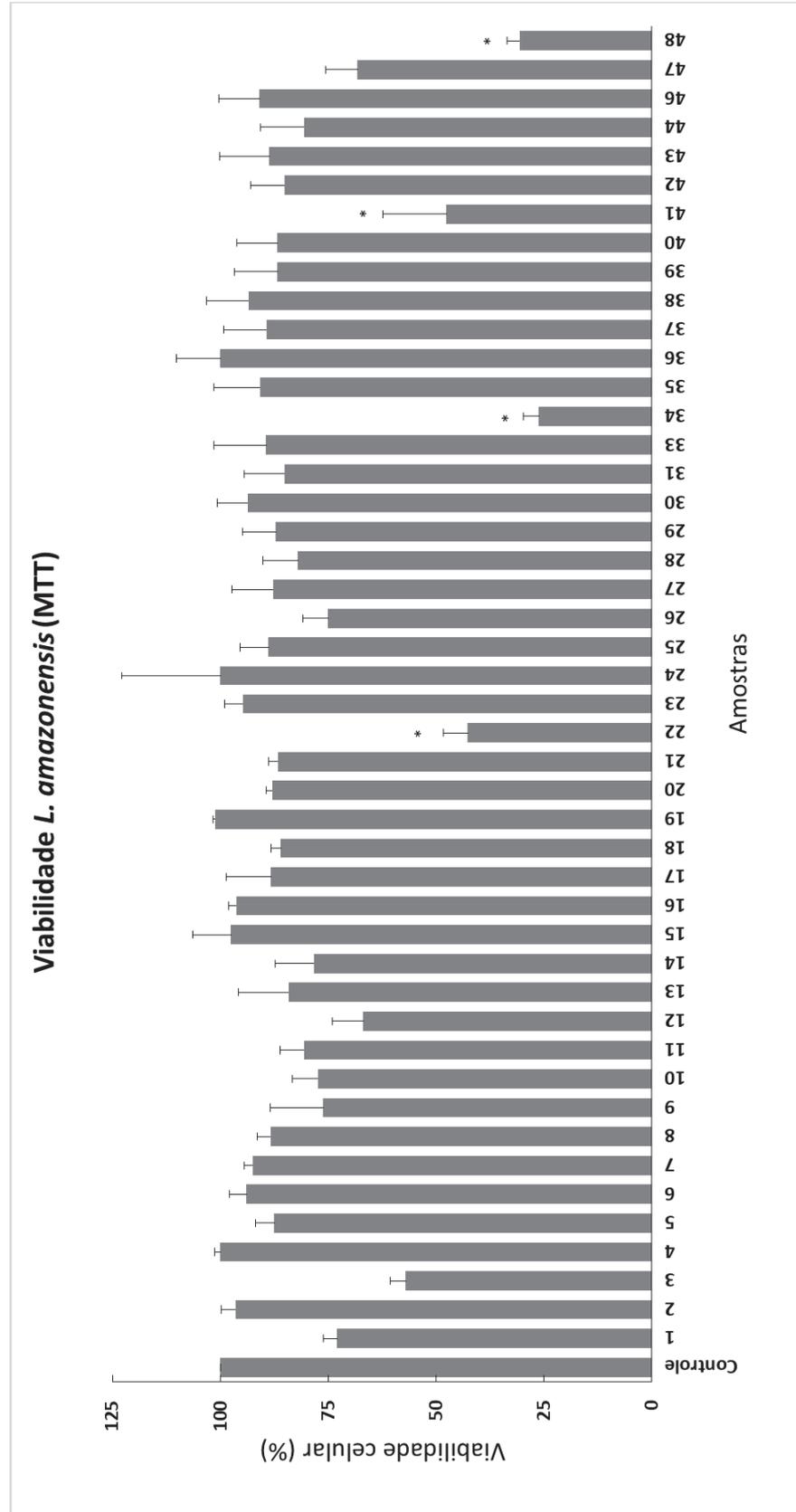
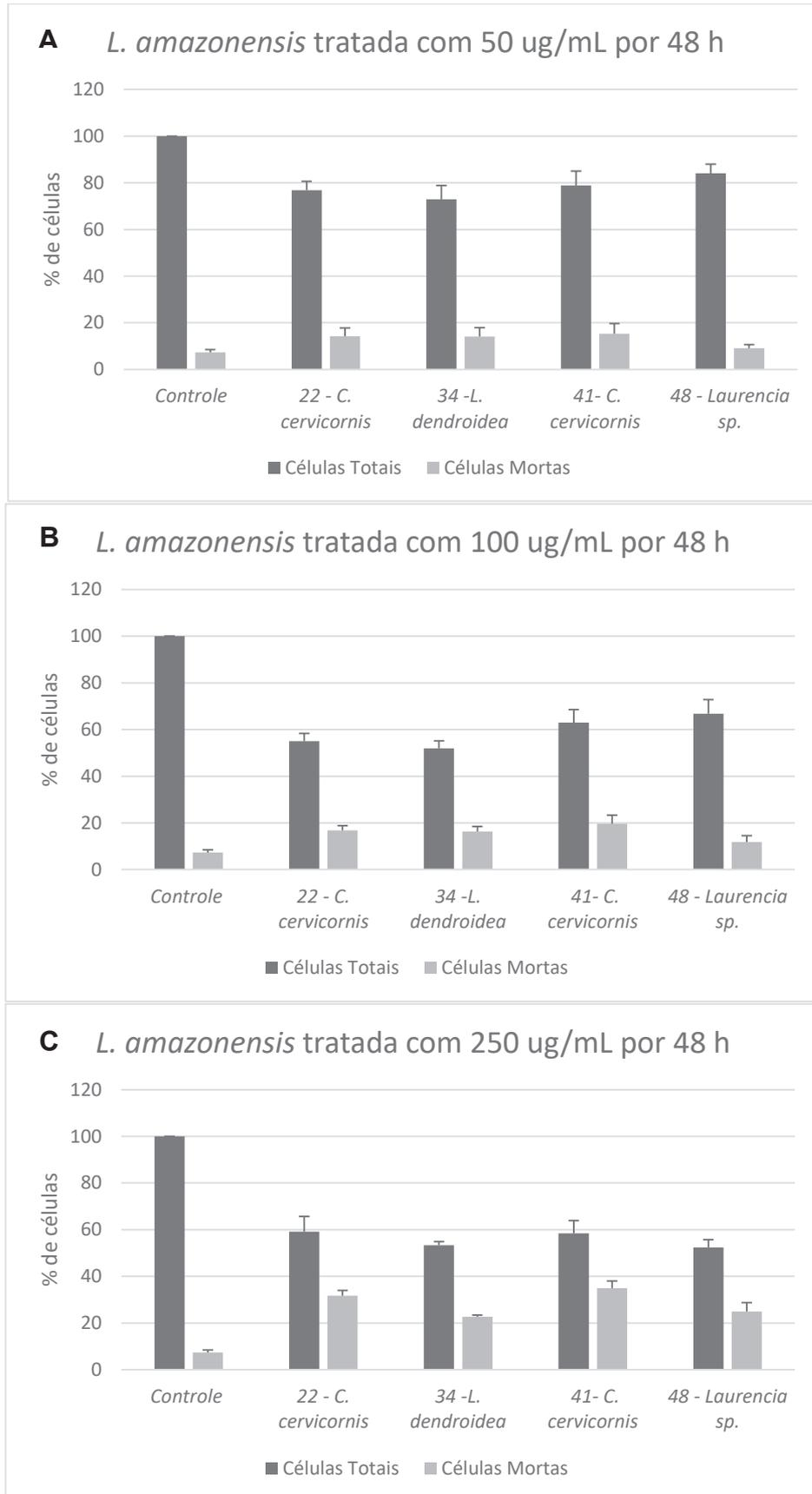


Figura 13 - Porcentagem de células totais e mortas de *L. amazonensis* tratada com extratos de macroalgas, no ensaio de integridade de membrana (marcação com IP). A- Concentração de 50 µg/mL; B - 100 µg/mL e C - 250 µg/mL. Os ensaios foram realizados em triplicata.



4.6. DETERMINAÇÃO DO CI_{50} DOS EXTRATOS SOBRE PROMASTIGOTAS DE *L. AMAZONENSIS*

Foram estabelecidos os CI_{50} para 4 amostras de extratos capazes de inibir em 50% ou mais a viabilidade celular de *L. amazonensis* apresentadas na Tabela 8. Com 24 h de tratamento, *Laurencia dendroidea* (34), apresentou o menor CI_{50} (81,3 $\mu\text{g/mL}$), seguida de *Canistrocarpus cervicornis*, amostras 22 e 41, ambas com 100 $\mu\text{g/mL}$. Após 48 h, o mesmo padrão de inibição se manteve para tais espécies. No entanto, depois de 48 h da adição dos extratos, *Canistrocarpus cervicornis* (41) foi a espécie que apresentou menor CI_{50} , de 60,3 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 8 - CI_{50} de extratos de macroalgas em *L. amazonensis*. (Valores em $\mu\text{g/mL}$).

CI_{50} – <i>L. amazonensis</i>				
Extrato	Espécies	24h	48h	72h
34	<i>Laurencia dendroidea</i>	81,2	67,6	63,1
22	<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	100,0	74,1	61,7
41	<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	100,0	91,2	60,3
48	<i>Laurencia sp.</i>	162,2	128,8	117,5

4.7. CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS LLCMK₂

A tabela 9 mostra os resultados de citotoxicidade dos extratos das macroalgas em células LLCMK₂, expressos como coeficiente de citotoxicidade (CC₅₀). O extrato que apresentou maior citotoxicidade após 96h foi o da espécie *Laurencia dendroidea* (34), com CC₅₀ inferior à 5 µg/mL; seguido por *Canistrocarpus cervicornis* (41), com 14,8 µg/mL de CC₅₀. Ambos extratos de *Canistrocarpus cervicornis* (9 e 22) demonstraram alta citotoxicidade, com 19,5 µg/mL e 19,9 µg/mL, respectivamente. *Acanthophora spicifera* (12) e *Hypnea sp.* (44) expressaram menor citotoxicidade entre todas as espécies, com 97,01 µg/mL e 85,11 µg/mL, seguido de *Plocamium brasiliense* (1) e *Codium intertextum* (21), ambos com 63,1 µg/mL de CC₅₀.

Tabela 9 – Citotoxicidade de extratos de macroalgas em células LLCMK₂

LLCMK ₂ - 96h		
Extrato	Espécies	CC ₅₀ (µg/mL)
34	<i>Laurencia dendroidea</i>	<5
41	<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	14,8
9	<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	19,5
22	<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	19,9
6	<i>Codium taylorii</i>	29,5
5	<i>Codium sp.</i>	35,5
48	<i>Laurencia sp.</i>	36,3
18	<i>Dasya ocellata</i>	40,7
3	<i>Caulerpa racemosa</i>	42,7
47	<i>Caulerpa racemosa</i>	56,2
30	<i>Copomenia sinuosa</i>	60,3
1	<i>Plocamium brasiliense</i>	63,1
21	<i>Codium intertextum</i>	63,1
44	<i>Hypnea sp.</i>	85,1
12	<i>Acanthophora spicifera</i>	97,01

5. DISCUSSÃO

A doença de Chagas e as leishmanioses têm importante impacto na saúde pública do Brasil. As limitações apresentadas nos tratamentos disponíveis para essas doenças, como os efeitos colaterais e baixa eficiência de determinadas drogas, fazem com que a busca por alternativas mais eficazes seja necessária (Coura & Castro, 2002; França *et al.*, 2017). As macroalgas marinhas produzem substâncias com vasta diversidade química e, por isso representam uma importante fonte de substâncias bioativas (Cardozo *et al.*, 2007). Apesar do Brasil possuir alta riqueza de táxons de macroalgas bênticas, especialmente na região estudada (Brasileiro *et al.*, 2009), poucos são os trabalhos que focam na prospecção de diferentes espécies contra *T. cruzi* e *L. amazonensis* (Torres *et al.*, 2014).

No presente trabalho, diversas espécies de macroalgas de diferentes localidades da Região dos Lagos, no estado do Rio de Janeiro, foram testadas em epimastigota de *T. cruzi* e promastigota de *L. amazonensis*. Cinquenta por cento das espécies de clorófitas testadas foram ativas para *T. cruzi*, 33% das ocrófitas e 24% das rodófitas. Estes dados tornam-se revelantes visto que a divisão Chlorophyta é o menos representativo na química de produtos naturais do ambiente marinho (Oliveira *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2011). Por outro lado, nenhuma clorófitas foi capaz de inibir mais de 50% da viabilidade de *L. amazonensis*.

A varredura inicial utilizando 100 µg/mL de cada um dos 48 extratos de macroalgas mostrou que quinze extratos foram capazes de inibir acima de 50% da viabilidade de *T. cruzi* e quatro de *L. amazonensis*. Além disso, enquanto quatro extratos inibiram acima de 90% a viabilidade de *T. cruzi*, nenhum extrato foi capaz de inibir acima de 74% a viabilidade de *L. amazonensis*. Portanto, a análise pelo método do MTT mostrou que houve uma tendência dos extratos serem mais efetivos contra *T. cruzi*. Porém, quando determinado o CI_{50} através da viabilidade pelo uso do IP, os valores de *T. cruzi* foram superiores à *L. amazonensis*, condizendo com os resultados da literatura que apontam uma sensibilidade maior de *L. amazonensis* (Ohan *et al.*, 2006; Süzgeç-Selçuk *et al.*, 2011; Spavieri *et al.*, 2010a; Spavieri *et al.*, 2010b; Allmendinger *et al.*, 2010; Vonthron-Sénécheau *et al.*, 2011).

A diferença entre as análises por MTT e IP sugerem que os extratos são mais eficazes em promover alterações metabólicas que alterações estruturais, uma vez que o primeiro método foca na atividade metabólica mitocondrial e, o segundo na integridade de membrana. Em estudos de varredura de compostos com atividade antiparasitária, o uso de dois métodos para avaliar a viabilidade celular não é usual, no entanto se mostrou importante devido a complementariedade das técnicas. A aplicação dos ensaios de IP e MTT permitiu mensurar o efeito dos extratos com maior refinamento, sinalizando o mecanismo de ação dos extratos e proporcionando maior confiabilidade aos resultados obtidos.

Além disso, neste trabalho a citometria de fluxo foi utilizada como ferramenta para contagem de protozoários, uma abordagem recente e pouco aplicada em estudos como este. Este método substituiu a contagem convencional em câmara de Neubauer com a vantagem de ser muito mais rápido, já que é uma técnica automatizada, e mostrou-se ideal para os testes com múltiplos extratos como aplicados neste estudo. Outro diferencial da técnica é a capacidade de contar células e detectar fluorescência simultaneamente.

Estudos prévios com extratos de macroalgas mostram que as substâncias que possuem atividade antiparasitária são majoritariamente apolares (Vonthron-Sénécheau *et al.*, 2011). Neste trabalho, os extratos foram preparados com solventes de diferentes polaridades visando extrair compostos com uma ampla faixa de polaridade. Diversos trabalhos utilizam a concentração máxima de 90 µg/mL dos extratos de macroalgas para avaliar atividade leishmanicida e tripanocida. Entretanto, essa concentração não foi capaz de inibir *T. cruzi* (Süzgeç-Selçuk *et al.*, 2011; Spavieri *et al.*, 2010a; Spavieri *et al.*, 2010b; Allmendinger *et al.*, 2010). Por este motivo, foram utilizadas concentrações acima de 90 µg/mL nos ensaios.

É importante ressaltar que as diferenças na forma de processar o material (biomassa das macroalgas), tanto na secagem (biomassa úmida, seca a temperatura ambiente, liofilizada, etc) quanto na extração (polaridades de solvente), podem promover alterações no rendimento e na propriedade dos extratos, inclusive causando alterações moleculares, o que pode trazer dificuldade na comparação entre estudos. Além disso, sempre haverá diferenças nos níveis de inibição de acordo com a espécie estudada (especialmente no caso de *Leishmania* que possui mais de 20 espécies

causadores da doença), com a cepa e a forma de desenvolvimento. Porém, a análise qualitativa (presença ou ausência de atividade) é uma forma de interpretação assertiva das análises.

Em relação à varredura inicial, foi observado que os quatro extratos que promoveram as maiores inibições (> 90%) de *T. cruzi* foram os mesmos que apresentaram atividade antileishmanial, mostrando que as espécies *Canistrocarpus cervicornis* (Prainha, AC e Geribá, BU), *Laurencia dendroidea* (Armação, BU) e *Laurencia sp.* (Conchas, CF) possuem potencial contra doenças causadas por tripanosomatídeos.

A maioria dos extratos de mesma espécie, porém de localidades distintas, apresentaram diferenças na inibição da viabilidade de ambos parasitas testados (Tabela 4) sugerindo que fatores ambientais são importantes para o perfil químico das populações. *Laurencia dendroidea* chamou atenção por apresentar atividade apenas com o extrato oriundo da alga coletada na Armação (BU), o extrato coletado no Forno não promoveu inibição de *T. cruzi* nem de *L. amazonensis*. Em testes para avaliar atividade leishmanicida e tripanocida, Bianco e colaboradores (2014) obtiveram inibições baixas em ensaios com *L. dendroidea* coletadas em Arraial da Ajuda (Bahia), ao contrário de algas coletadas na Ilha de Cabo Frio, município de Cabo Frio no Estado do Rio de Janeiro, que inibiram fortemente o crescimento dos parasitas (Veiga-Santos *et al.*, 2010; Machado *et al.*, 2010). Sabe-se que populações dessa espécie possuem variações quali- e quantitativas nos teores de metabolitos secundários (Machado *et al.*, 2016). Assim, as diferenças de efeitos observados neste estudo, tanto para *L. dendroidea* como para outras espécies, *e. g.* *Plocamium brasiliense* e *Codium taylorii*, podem ser atribuídas à plasticidade fenotípica das espécies.

Todos os extratos que apresentaram atividade foram avaliados quanto à capacidade de alterar a integridade da membrana dos parasitas estudados. Uma das formas de analisar esse efeito é com a utilização de marcadores. Neste trabalho, utilizamos o iodeto de propídeo (IP), que é um marcador de ácidos nucleicos fluorescente capaz de se intercalar em qualquer DNA, desde que a membrana celular esteja permeável. Tal propriedade deve-se ao fato de seu elevado peso molecular não permitir que ele penetre células intactas em decorrência de seu tamanho. Desse modo, corar células com IP permite diferenciar células intactas (viáveis) de células

com a membrana permeável (tardiamente apoptóticas ou necróticas). Os resultados mostraram que todos os extratos promoveram aumento na permeabilidade da membrana plasmática de ambos parasitas de maneira dose-depenente. Na concentração de 500 µg/mL, seis extratos promoveram alteração na integridade da membrana de 90% ou mais da população total de *T. cruzi*, foram eles: *Codium sp.* (Rasa, BU), *C. cervicornis* (Rasa, BU), *D. ocellata* (Rasa, BU), *D. canistrocarpus* (Prainha, AC), *L. dendroidea* (Armação, BU) e *C. cervicornis* (Geribá, BU), indicando que praticamente todas as células estavam mortas ou em processo de morte celular.

Das espécies investigadas neste trabalho, *Laurencia dendroidea* (CI₅₀ = 102,3 µg/mL para *T. cruzi* e 67,6 µg/mL para *L. amazonensis*) e *Canistrocarpus cervicornis* (CI₅₀ = 100 µg/mL para *T. cruzi* e 74,1 µg/mL para *L. amazonensis*) foram as que tiveram melhor desempenho na inibição dos parasitas estudados. A primeira já possui substâncias elucidadas com atividade comprovada contra *T. cruzi* e *L. amazonensis* (Veiga-Santos *et al.*, 2010; dos Santos *et al.*, 2010). *C. cervicornis* foi testado contra *L. amazonensis* (dos Santos *et al.*, 2011). Contudo, apesar de exibirem os menores coeficientes de inibição, estes foram os extratos que apresentaram maior citotoxicidade em células LLCMK₂ (*L. dendroidea* com CC₅₀ de <5 µg/mL e *Carnistrocarpus cervicornis* com 14,8 µg/mL, respectivamente).

A alta toxicidade de *L. dendroidea* e *C. cervicornis* em células de mamífero, não foi observada em trabalhos anteriores com essas espécies. Porém, os dados não podem ser comparados rigorosamente por conta das diferenças metodológicas para obtenção dos extratos, os tipos celulares testados e os tempos de tratamento utilizados nos diversos relatos reportados na literatura. Foram encontradas descrições de uso de diferentes linhagens celulares de mamíferos, que não LLCMK₂, para os teste de citotoxicidade com extratos provenientes destas macroalgas (dos Santos *et al.*, 2010; Machado *et al.*, 2011; dos Santos *et al.*, 2011). Além disso, alguns trabalhos que utilizaram o mesmo tipo de célula de mamífero que esta dissertação, testaram substâncias isoladas das macroalgas e não o extrato bruto como nós (Veiga-Santos *et al.*, 2010). Nos estudos onde são testadas substâncias isoladas, não existe interferência de outros componentes na amostra analisada, diferente dos extratos brutos, onde é possível que exista ação conjunta de substâncias distintas que podem estar causando alta toxicidade nas células LLCMK₂. Por isso, é importante considerar a análise qualitativa nessa etapa inicial de estudo. Frente à problemática dos atuais

fármacos para tratamento dessas doenças parasitárias, nossos resultados abrem oportunidade para maiores estudos com componentes isolados dos extratos de macroalgas aqui testados e que podem ser promissores caso venham a apresentar menor citotoxicidade.

Algumas outras espécies já foram avaliadas anteriormente e exibiram alguma atividade contra *L. amazonensis*, porém não foram avaliadas contra *T. cruzi*. No presente trabalho, *Caulerpa racemosa* apresentou 66 % de inibição contra *T. cruzi* e 43% contra *L. amazonensis*, entretanto demonstrou alto coeficiente de inibição (> 400 µg/mL) contra *T. cruzi*. Em outros estudos apresentou CI_{50} de 37,5 µg/mL contra promastigotas de *Leishmania sp.* (Sabina *et al.*, 2005) e 22,66 µg/mL contra amastigotas de *L. donovani* (Süzgeç-Selçuk *et al.*, 2011). Lira e colaboradores (2016) obtiveram resultados semelhantes aos nossos, onde essa espécie não apresentou atividade significativa contra promastigotas de *L. amazonenses*. *Asparagopsis taxiformes* e *Osmundaria obtusuloba* também já foram testadas anteriormente. A primeira apresentou CI_{50} de 9 µg/mL contra amastigota de *L. infantum* (Vitale *et al.*, 2015) e a segunda 24,5 µg/mL contra promastigota de *L. amazonensis* (Lira *et al.*, 2016). *A. taxiformes* apresentou potencial somente contra *T. cruzi*, exibindo inibição de 45%. Já *O. obtusuloba* não apresentou inibição contra nenhum dos parasitas. Apesar da maioria dessas espécies terem exibido algum efeito, não promoveram inibição suficiente que justifique potencial para maiores estudos. Como mencionado anteriormente, as macroalgas podem apresentar diferenças em seu perfil químico de acordo com variações ambientais. Desta maneira, estudar espécies com atividade já conhecida também é interessante na perspectiva de encontrar populações com maior potencial.

Além das espécies citadas acima que foram testadas pela primeira vez contra *T. cruzi*, metade das espécies estudadas foram investigadas pela primeira vez quanto ao efeito contra ambos parasitas, algumas com indicativo de potencial importância farmacológica. Neste sentido, foram estudadas *Acanthophora spicifera*, *Athrocladia sp.*, *Chaetomorpha antennina*, *Chondracanthus acicularis*, *Champia sp.*, *Chnoospora minima*, *Codium decorticatum*, *Codium intertextum*, *Codium taylori*, *Cryptonemia seminervis*, *Dasya ocellata*, *Gelidium pusillum*, *Hypnea pseudomusciformes*, *Hypnea spinella*, *Plocamium brasiliense*, *Pterocladia capillacea*, *Rhodomenia pseudopalmata*, *Sargassum vulgare*, *Spyridia clavata* e *Wurdemanni miniata*. Dentre

estas, cinco revelaram potencial contra *T. cruzi*: *Acanthophora spicifera*, *Codium intertextum*, *Codium taylori*, *Dasya ocellata* e *Plocamium brasiliense*. *P. brasiliense* e *D. ocellata* foram as espécies que mais se destacaram. A partir de 48 h, exibiram os menores coeficientes de inibição, atrás apenas de *L. dendroidea* e *C. cervicornis*. *P. brasiliense* foi a espécie com maior desempenho contra *T. cruzi*, com 48 h apresentou a terceira maior inibição ($C_{50} = 169,8 \mu\text{g/mL}$) além disso, demonstrou ser o terceiro extrato menos citotóxico ($CC_{50} = 63,1 \mu\text{g/mL}$).

Estudos de investigação de atividade da espécie *Plocamium brasiliense* são escassos. Apesar disso, os monoterpenos encontrados nessa espécie demonstraram alta atividade anti-herbívora (Pereira & Vasconcelos, 2014), além de atividade antioxidante (Martinet *et al.*, 2012), contra o herpes vírus (Barros *et al.*, 2014), veneno de cobra (Claudino *et al.*, 2014) e anti-incrustante (Paradas *et al.*, 2015), que podem ser considerados como indício da presença de bioatividade farmacológica. Porém nenhum trabalho que avaliasse o efeito contra microrganismos de interesse médico, células tumorais e efeito anti-inflamatório havia sido desenvolvido até o momento. Dessa maneira, *P. brasiliense* apresentou-se como a espécie com maior potencial para elucidação de seu perfil químico e ensaios biológicos mais refinados com *T. cruzi*, como análise em amastigotas intracelulares, determinação do índice de seletividade entre o parasita e a célula de mamífero e análises de mecanismo de ação das substâncias isoladas. Mais uma vez, ressalta-se a diferença de efeito observada entre a amostra coletada na Rasa (BU) e Ferradurinha (BU), onde a primeira promoveu inibições bem maiores que a segunda. Segundo Gomes (2013), essa espécie apresenta variações quantitativas na produção de monoterpenos halogenados acíclicos bromados e clorados de acordo com o local de ocorrência que subsidiam as diferenças de inibição verificadas.

Embora neste trabalho não tenhamos usado as formas de desenvolvimento dos parasitas nas quais as drogas vão agir quando pensamos no tratamento do enfermo, optamos por utilizar as formas não infectivas e extracelulares dos tripanosomatídeos por elas apresentarem algumas vantagens: são formas proliferativas que crescem rápido, oferecem menos risco de manipulação, não é necessário utilizar animais para mantê-las em laboratório e nos dão pistas da ação dos compostos e principalmente seu alvo celular. Além disso, todas as formas de desenvolvimento são importantes para sobrevivência do parasita pois fazem parte de

seu ciclo de vida. Os ensaios com formas intracelulares (amastigotas) serão realizados numa próxima etapa de investigação, uma vez que estas formas de desenvolvimento podem apresentar maior sensibilidade aos extratos testados, apresentando menores valores de CI_{50} , o que reduziria a toxicidade destes compostos para a célula hospedeira. Por fim, vale ressaltar que a análise aprofundada do efeito dos extratos de macroalgas sobre os tripanosomatídeos pode ser uma importante ferramenta para estudar a biologia celular destes microrganismos, os quais apresentam estruturas e mecanismos celulares únicos na natureza, ajudando a compreender melhor a biologia destes seres primitivos.

6. CONCLUSÃO

Do total de 48 extratos, quinze apresentaram inibição da viabilidade de *T. cruzi* pelo método do MTT e onze foram confirmados pelo método do IP. Quatro inibiram a viabilidade de *L. amazonensis* por ambos métodos.

A maioria dos extratos de mesma espécie demonstrou diferenças de inibição entre os locais coletados, sugerindo a variabilidade de perfil químico entre as populações de macroalgas.

Os extratos da espécie *Laurencia dendroidea*, coletada na Praia Rasa em Búzios, e os extratos de *Carnistrocarpus cervicornis* de todos os pontos de coleta demonstraram os maiores efeitos contra *Trypanosoma cruzi* e *L. amazonensis*. Estes mesmos extratos foram os mais citotóxicos para LLCMK₂.

Vintes espécies foram investigadas pela primeira vez quanto ao efeito tripanocida e leishmanicida. Cinco apresentaram inibição contra *T. cruzi*, foram elas: *Acanthophora spicifera*, *Codium intertextum*, *Codium taylori*, *Dasya ocellata* e *Plocamium brasiliense*. Os resultados foram menos promissores em relação a inibição contra *L. amazonensis*, nenhuma espécie nova demonstrou potencial leishmanicida.

Plocamium brasiliense foi a espécie que mais se destacou devido sua alta inibição contra *T. cruzi* (CI₅₀ = 169,8 µg/mL) e uma das citotoxicidade mais baixas (CC₅₀ = 63,1 µg/mL), sinalizando o potencial da espécie para trabalhos futuros de determinação de perfil químico e mecanismos de ação de substâncias. *Laurencia sp.* foi a espécie mais promissora quanto à inibição de *L. amazonensis* (CI₅₀ = 128,8 µg/mL e CC₅₀ = 36,3 µg/mL), sendo necessários mais estudos que avaliem sua atividade.

7. PERSPECTIVAS

- Realização de imagens de microscopia eletrônica de transmissão dos protozoários tratados com os extratos de macroalgas que apresentaram efeito para avaliar possíveis alterações estruturais e mapear o mecanismo de ação destes extratos.
- Fracionamento e elucidação dos metabólitos das espécies mais promissoras: *Dasya ocellata*, *Plocamium brasiliense* e *Laurencia sp.*
- Realização de ensaios biológicos mais refinados utilizando as formas infectivas dos parasitas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIANÇA, A. S. S., ANJOS, K. F. L., REIS, T. N. V., HIGINO, T. M. M., BRELAZ-DE-CASTRO, M. C. A., BIANCO, E. M., FIGUEIREDO, R. C. B. Q. The *in Vitro* Biological Activity of the Brazilian Brown Seaweed *Dictyota mertensii* against *Leishmania amazonensis*. **Molecules**. v. 19, p. 14052-65, 2014.

ALLMENDINGER, A., SPAVIERI, J., KAISER, M., CASEY, R., HINGLEY-WILSON, S., LALVANI, A., GUIRY, M., BLUNDEN, G., TASDEMIR, D. Antiprotozoal, antimycobacterial and cytotoxic potential of twenty-three british and irish red algae. **Phytother. Res**. v. 24, p. 1099-1103, 2010.

ALVAR, J., I. D. VELEZ, C. BERN, M. HERRERO, P. DESJEUX, J. CANO, J. JANNIN, M. DEN BOER AND W. H. O. L. C. TEAM. "Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence." **PLoS One**. v. 7, n. 5, p. 35671, 2012.

ADL, S. M.; SIMPSON, A. G. B.; LANE, C. E.; LUKES, J.; BASS, D.; BOWSER, S. S.; BROWN, M. W.; BURKI, F.; DUNTHORN, M.; HAMPL, V.; HEISS, A.; HOPPENRATH, M.; LARA, E.; GALL, L. I.; LYNN, D. H.; MCMANUS, H.; MITCHELL, E. A. D.; MOZLEY-STANRIDGE, S. E.; PARFREY, L. W.; PAWLOWSKI, J.; RUECKERT, S.; SHADWICK, L.; SCHOCH, C. L.; SMIRNOV, A.; SPIEGEL, F. W. The revised classification of Eukaryotes. **J. of Eukaryotic Microbiology**. v. 59, n. 5, p. 429-493, 2012.

BALASEGARAM, M.; RITMEIJER, K.; LIMA, M. A.; BURZA, S.; GENOVESE, G. O.; MILANI, B.; GASPANI, S.; POTET, J.; CHAPPUIS, F. Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. **Expert. Opin. Emerg. Dr**. v. 17, p. 493-510, 2012.

BATES, P. A., J. DEPAQUIT, E. A. GALATI, S. KAMHAWI, M. MAROLI, M. A. MCDOWELL, A. PICADO, P. D. READY, O. D. SALOMON, J. J. SHAW, Y. M. TRAUB-CSEKO AND A. WARBURG. Recent advances in phlebotomine sand fly research related to Leishmaniasis control. **Parasit Vectors**. v. 8, n. 1, p. 712, 2015.

BECERRA, M.; BOUTEFNOUCHET, S.; CÓRDOBA, O.; VITORINO, G. P.; BREHU, L.; LAMOUR, I.; LAIMAY, F.; EFSTATHIOU, A.; SMIRLIS, D.; MICHEL, S.; KRITSANIDA, M.; FLORES, M. L.; GROUGNET, R. Antileishmanial activity of fucosterol recovered from *Lessonia vadosa* Searles (Lessoniaceae) by SFE, PSE and CPC. **Phytochemistry Letters**. v. 11, p. 418-423, 2015.

BERN, C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas disease. **N. Engl. J. Med.** v. 364, p. 2527-34, 2011.

BEZERRA, W. S.; MENEGUETTI, D. U. O.; CAMARGO, L. M. A. A busca de fármacos para tratamento da tripanossomíase americana: 103 anos de negligência. **Saúde (Santa Maria)**. v. 38, p. 9-20, 2012.

BHAKUNI, D. S. & RAWAT, D. S. Bioactive marine natural products. **Nova Delhi: Anamaya**, p. 328, 2005.

BHANDARI, V.; KULSHRESTHA, A.; DEEP, D.K., STARK, O., PRAIAPATI, V.; K.; RAMESH, V.; SUNDAR, S.; SCHONIAN, G.; DUJARDIN, J. C.; SALOTRA, P. Drug susceptibility in *leishmania* isolates following miltefosine treatment in cases of visceral leishmaniasis and post kala-azar dermal leishmaniasis. **Plos Neglect. Trop.** v. 6, p. 1-6, 2012.

BIANCO, E.M., DE OLIVEIRA, S.Q., RIGOTTO, C., TONINI, M.L., GUIMARAES, T.R., BITTENCOURT, F., GOUVEA, L.P., ARESI, C., ROJO DE ALMEIDA, M.T., GOULARTE MORITZ, M.I., LEAL MARTINS, C.D., SCHERNER, F., CARRARO, J.L., HORTA, P.A., REGINATTO, F.H., STEINDEL, M., OLIVEIRA SIMOES, C.M., SCHENKEL, E.P. Anti-infective potential of marine invertebrates and seaweeds from the Brazilian coast. **Molecules**. v. 18, p. 5761-5778, 2013.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.** v. 31, p. 160-258, 2014.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000.

BRASILEIRO, P.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y.; BAHIA, R. G.; REIS, R. P.; FILHO, G. M. A. Algas marinhas bentônicas da região de Cabo Frio e arredores: síntese do conhecimento. **Rodriguésia**. v. 60, n. 1, p. 39-66, 2009.

CAMARGO, E. P. Grow and differentiation in *Trypanosoma cruzi* I. Origim of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Rev. Inst. Med. Trop.** v. 6, p. 93-100, 1964.

CARDOZO, K. H. M.; GUARATINI, T.; BARROS, M. P.; FALCÃO, V. R.; TONON, A. P.; LOPES, N. P.; CAMPOS, S.; TORRES, M. A.; SOUZA, A. O.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology**. v. 146, p. 60-78, 2007.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen., s.sp. agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1: p. 159-218, 1909.

CLAUDINO, M. M., DOMINGOS, T. F. S., DA SILVA, G. A., FONSECA, R. R., CAVALCANTI, D. N., SANCHEZ, E. F., TEIXEIRA, V. L. & FULY, A. L. Inhibitory effect of the red seaweed *Plocamium brasiliense* against the toxic effects of *Lachesis muta* snake venom. **J. Appl. Phycol.** v. 26, p. 2047-2054, 2014.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 97, p. 3-24, 2002.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 110, n. 3, p. 277–282, 2015.

CROFT, S. L. & OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy challenges and opportunities. **Clin. Microbiol. Infec.** v. 17, p. 1478-83, 2011.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Reistance in Leishmaniasis. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 19, p. 111-126, 2006.

DA SILVA MACHADO, F.L., PACIENZA-LIMA, W., ROSSI-BERGMANN, B., DE SOUZA GESTINARI, L.M., FUJII, M.T., DE PAULA, J.C., COSTA, S.S., LOPES, N.P., KAISER, C.R., SOARES, A.R. Antileishmanial sesquiterpenes from the brazilian red alga *Laurencia dendroidea*. **Planta Med.** v. 77, p. 733-735, 2011.

DELMONDES, G. A.; FIGUEIREDO, F. R. S. D. N.; TINTINO, S. R.; OLIVEIRA, L. R.; MONTEIRO, A. B.; SALES, V. S.; RODRIGUES, C. K. S.; NASCIMENTO, E. P.; GOMEZ, M. C. V.; CORONEL, C.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; FELIPE, C. F. B.; MENEZES, I. R. A.; KERNTOPF, M. R. Avaliação da citotoxicidade e atividade leishmanicida e tripanocida de extratos de *Passiflora cincinnata* mast L. **Caderno de Cultura e Ciência.** v. 13, n. 1, p. 31-38, 2014.

DE SOUZA, W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, p. 269-285, 2002.

SOUZA, W. Doenças negligenciadas. **Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, 2010.

DE SOUZA, W. **Protozoologia Médica**, Editora Rubio Ltda, Rio de Janeiro - RJ, Brasil, 2013.

DORLO, T. P. C; BALASEGARAM, M.; BEIJNEN, J. H; DE VRIES, P. J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **J. Antimicrob. Chemoth.** v. 67, p. 2576-97, 2012.

DOS SANTOS, A.O., BRITTA, E.A., BIANCO, E.M., UEDA-NAKAMURA, T., FILHO, B.P., PEREIRA, R.C., NAKAMURA, C.V. 4-Acetoxydolastane diterpene from the Brazilian brown alga *Canistrocarpus cervicornis* as antileishmanial agent. **Mar. Drugs.** v. 9, p. 2369-2383, 2011.

DOS SANTOS, A.O., VEIGA-SANTOS, P., UEDA-NAKAMURA, T., SUDATTI, D.B., BIANCO, E.M., PEREIRA, R.C., NAKAMURA, C.V. Effect of elatol, isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*, on *Leishmania amazonensis*. **Mar. Drugs.** v. 8, p.2733-2743, 2010.

FELÍCIO, R.; ALBUQUERQUE, S.; YOUNG, M. C. M.; YOKOYA, N. S.; DEBONSI, H. M. Tripanocidal, leishmanicidal and antifungal potencial from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceremiales). **Journal of Pharm. And Biomed. Analysis.** v. 52, p. 763-769, 2010.

FERREIRA, R. T. B.; BRANQUINHO, M. R.; LEITE, P. C. Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açafá: um desafio para a Vigilância Sanitária. **Vig. Sanit. Debate.** v. 2, n. 4, p. 4-11, 2014.

FOLMER, F., JASPARS, M., DICATO, M., DIEDERICH, M. Photosynthetic marine organisms as a source of anticancer compounds. **Phytochemical Reviews.** v. 9, p. 557-559, 2010.

FREILE-PELEGRIN, Y., ROBLEDO, D., CHAN-BACAB, M.J., ORTEGA-MORALES, B.O. Antileishmanial properties of tropical marine algae extracts. **Fitoterapia.** v. 79, p. 374-377, 2008.

GARCIA, E. S.; AZAMBUJA P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. **Parasitol Today.** v. 7, n. 9, p. 240-4, 1991.

GASCON, J., BERN, C., PIZANO, M-J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Tropica,** n. 115, p. 22-27, 2010.

GRAHAM, L. E. & WILCOX, L. W. Algae. Prentice Hall, Michigan, EUA, 2000

HELLIO, C.; BREMER, G.; PONS, A. M.; LE GAL, Y.; BOURGOUGNON, N. Inhibition of the development of microorganisms (bacteria and fungi) by extracts of marine algae from Brittany, France. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 54, p. 543-549, 2000.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology,** v. 11, n. 9, p.604-615, 2011.

LAINSON, R. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde,** v. 1, p. 13-32, 2010.

LEÓN-DENIZ, L. V., DUMONTEIL, E., MOO-PUC, R., FREILE-PELEGRIN, Y. Antitrypanosomal *in vitro* activity of tropical marine algae extracts. **Pharmaceutical Biology**. v. 47, n. 9, p. 864-71, 2009.

LINDOSO, J. A. L. & LINDOSO, A. A. B. P. Neglected tropical diseases in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**. v. 51, n. 5, p. 247-253, 2009.

LIRA, M. L. F., LOPES, R., GOMES, A. P., BARCELLOS, G., VERÍCIMO, M., OSAKO, K., ORTIZ-RAMIREZ, F. A., RAMOS, C. J. B., CAVALCANTI, D. N., TEIXEIRA, V. L., AMARAL, V. Anti-leishmanial activity of Brazilian green, brown, and red algae. **J. Appl. Phycol.** v. 18, p. 591-98, 2016.

LIU, L., HEINRICH, M., MYERS, S., DWORJANYN, S.A. Towards a better understanding of medicinal uses of the brown seaweed *Sargassum* in Traditional Chinese Medicine: A phytochemical and pharmacological review. **J. Ethnopharmacol.** v. 142, p. 591-619, 2012.

MACHADO, F. L. Diversidade química e atividade farmacológica em algas da espécie *Laurencia dendroidea* j. agardh. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. 2014.

MACHADO F.L.S.; GESTINARI, L. M. S.; CASSANO, V.; DUARTE, H. M.; KAISER, C. R.; SOARES, A. R. Geographic Distribution of Natural Products Produced by the Red Alga *Laurencia dendroidea* J. Agardh. **Chemistry & Biodiversity (Print)**, v. 13, p. 845-851, 2016.

MARINI, M. B.; FREITAS, W. R.; MACHADO F. L. S.; SOARES, A. R.; KANASHIRO, M. M.; MUZITANO, M. F. . Cytotoxic Activity of Halogenated Sesquiterpenes from *Laurencia dendroidea*. **Phytotherapy Research**, v. 1, p. 1-7, 2018.

MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS, A. N. Jr.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Mortality due to Chagas disease in Brazil from 1979 to 2009: trends and regional differences. **J Infect Dev Ctries**, v. 6, n. 11, p.817-24, 2012.

MAYER, A. M. S.; GLASSER, K. B.; CUEVAS, C.; JACOBS, R. S., KEM, W., LITTLE, R. D., McINTOSH, J. M., NEWMAN, D. J., POTTS, B. C., SHUSTER, D. E. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 31, p. 255-65, 2010.

MCCLINTOCK, J. B.; BAKER, B. J. **Marine Chemical Ecology**. CRC Press, USA, 2001.

MINICANTE, S. A.; MICHELET, S.; BRUNO, F.; CASTELLI, G.; VITALE, F.; SFRISO, A.; MORABITO, M.; GENOVESE, G. Bioactivity of Phycocolloids against the Mediterranean Protozoan *Leishmania infantum*: An Inceptive Study. **Sustainability**. v. 8, n. 1131, p. 1-9, 2016.

MINISTERIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico doença de Chagas**. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. v. 46, n. 21, 2015.

MINISTERIO DA SAÚDE. **Manual da Vigilância da Leishmaniose Tegumentar**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância da Saúde.. 1ª Edição, 2017.

MINIISTERIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância da Saúde. 1ª Edição, 2014.

MORAES-SOUZA, H.; FERREIRA-SILVA, M. M. O controle da transmissão transfusional. **Rev. História sobre a Doença de Chagas no Brasil**, v. 44, supl. II, p. 64-67, 2011.

MOREIRA, D.; LOPEZ-GARCIA, P.; VICKERMAN, K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 54, n. 5, p. 1861-75, 2004.

MOO-PUC, R.; ROBLEDO, D.; FREIRE-PELEGRIN, Y. Evaluation of selected tropical seaweeds for *in vitro* anti-trichomonal activity. **J. Ethnopharmacol**. v. 120, p. 92-97, 2008.

NARA, T., KAMEI, Y., TSUBOUCHI, A., ANNOURA, T., HIROTA, K., IIZUMI, K., DOHMOTO, Y., ONO, T., AOKI, T. Inhibitory action of marine algae extracts on the *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase activity and on the protozoan growth in mammalian cells. **Parasitol. Int.** v. 54, p. 59-64, 2005.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. London, v. 4, n. 366(9496), p. 1561-1577, 2005.

NETO, O. ; GOMES, S. ; SOARES, A. R. ; MACHADO F.L.S. ; SAMUELS, R. ; FONSECA, R. N. ; MENEZES, J. ; MORAES, J. ; CAMPOS, E. ; MURY, F. ; SILVA, J. R. . Larvicidal Potential of the Halogenated Sesquiterpene (+)-Obtusol, Isolated from the Alga *Laurencia dendroidea* J. Agardh (Ceramiiales: Rhodomelaceae), against the Dengue Vector Mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae). **Marine Drugs**, v. 14, p. 20-34, 2016.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 12 ed. São Paulo. Atheneu, 2012.

NITTA, I.; WATASE, H.; TOMMIE, Y. Structure of kainic acid and its isomer, allokainic acid. **Nature**. v. 181, p. 761-762, 1958.

NOVO, D. J., PERLMUTTER, N. G., HUNT, R. H., SHAPIRO, H. M. Multiparameter Flow Cytometric Analysis of Antibiotic Effects on Membrane Potential, Membrane Permeability, and Bacterial Counts of *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 40, n. 4, p. 827-834, 2000.

OLIVEIRA LSS. As Doenças Negligenciadas e Nós [editorial]. **Saúde Coletiva**. v. 28, p. 40-1, 2009.

OLIVEIRA, A. L. L. Algas e micro-organismos marinhos como fonte de substâncias bioativas: química e biologia de *Bostrychia radicans* e fungos endofíticos associados. **Tese**. USP - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Ribeirão Preto, 2013.

OLIVEIRA, E. C.; Horta, P. A.; AMANCIO, C. E.; SANT'ANNA, C. L. Algas e angiospermas marinhas bênticas do litoral brasileiro. In: Workshop sobre Avaliação e

ações prioritárias para a conservação da Biodiversidade das zonas costeira e marinha. Relatório Técnico. Brasília, **Ministério do Meio Ambiente**. 2002.

ORHAN, I., SENER, B., ATICI, T., BRUN, R., PEROZZO, R., TASDEMIR, D. Turkish freshwater and marine macrophyte extracts show *in vitro* antiprotozoal activity and inhibit FabI, a key enzyme of *Plasmodium falciparum* fatty acid biosynthesis. **Phytomedicine**. v. 13, p. 388-393, 2006.

ORTÍ-LUCAS, R. M.; PARADA-BARBA, M. C.; DE LA RUBIA-ORTÍ, J. E.; CARRILLO-RUIZ, A.; BESO-DELGADO, M.; BOONE, A. L. Impact of Chagas Disease in Bolivian immigrants living in Europe and the risk of stigmatization. **J of Parasitol Res**, 2014.

PAHO, ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. "Leishmaniasis." Disponível em: <http://www.paho.org/Leishmaniasis>. Visitado em Junho 2018.

PEREIRA, K. S.; SCHMIDT, F. L.; GUARALDO, A. M. A.; FRANCO, R. M. B.; DIAS, V. L.; PASSOS, L. A. C. Chagas disease as a foodborne illness. **J Food Prot**. v. 72, n. 2, p. 441-6, 2009.

PEREIRA, R. C.; OLIVEIRA, A. S.; SUDATTI, D. B. Ecologia Química Marinha: Origem, evolução e perspectivas no Brasil. **Oceologia Australis**. v. 15, n. 2, p. 412-435, 2011.

PEREIRA, R. C.; COSTA, E. S.; SUDATTI, D. B.; DA GAMA, B. A. P. Inducible defenses against herbivory and fouling in seaweeds. **Journal of Sea Research**. v. 122, p. 25-33, 2017.

PEREIRA, R. C. & VASCONCELOS, M. A. Chemical defense in the red seaweed *Plocamium brasiliense*: spatial variability and differential action on herbivores. **Braz. J. Biol.** v. 74, p. 545–52, 2014.

PIRES, C. L.; RODRIGUES, S. D.; BRISTOT, D.; GAETA, H. H.; TOYAMA, D. O.; FARIAS, W. R. L.; TOYAMA, M. H. Evaluation of Macroalgae Sulfates Polysaccharides on the *Leishmania (L.) amazonensis* Promastigote. **Marine Drugs**. v. 11, p. 934-943, 2013.

RASSI, A. JR, RASSI, A.; RASSI, S. G. Predictors of Mortality in Chronic Chagas Disease. **Circulation**, v. 115, p. 1101–1108, 2007.

RASSI, A.; DIAS, J. C. P.; MARIN-NETO, J. A. Challenges and opportunities for primary, secondary and tertiary prevention of Chagas disease. **Heart**. v. 95, p. 524-34, 2009.

REIS, A. C. S.; BORGES, D. P. L.; D'ÁVILA, V. G. F. C.; BARBOSA, M. S.; TERNES, Y. M. F.; SANTIAGO, S. B.; SANTOS, R. S. O Cenário de Políticas Públicas do Brasil diante do Quadro das doenças negligenciadas. **Rev. Acad. Inst. Ciênc. Saúde**. v. 3, n. 1, p. 99-107, 2017.

REY, L. O complexo *Leishmania brasiliensis* e a leishmaniose tegumentar americana. Parasitologia. 3 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. p. 182-192, 2001.

RODRIGUES, M. M.; ALENCAR, B. C. G.; CLASER, C.; TZELEPSIS, F. Immunodominance: A new hypothesis to explain parasite escape and host/parasite equilibrium leading to the chronic phase of Chagas' disease. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, p. 220 –223, 2009.

RUAN, B.; GE, W. LIN, M.; LI, Q. A Review of the Components of Seaweeds as Potential Candidates in Cancer Therapy. **Bentham Science Publishers**. v. 18, n. 3, p. 354-366, 2018.

SABINA, H., TASNEEM, S., SAMBREEN KAUSAR, Y., CHOUDHARY, M.I., ALIYA, R. Antileishmanial activity in the crude extract of various seaweed from the coast of Karachi, Pakistan. **Pak. J. Bot**. v. 37, p. 163-168, 2005.

SACKS, D. AND S. KAMHAWI. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. **Annu Rev Microbiol**. v. 55, p. 453-483, 2001.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. Nature Reviews Immunology, London, v. 2, p. 845-858, 2002.

SALOMON C. J. First century of Chagas disease: an overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. **J Pharm Sci**, v. 3, p. 888-94, 2012.

SILVA, L. H. V. Estudo do efeito inibitório dos óleos essenciais de pimenta de macaco (*Piper aduncum*) e pimenta longa (*Piper hispidinervum*) contra *Trypanosoma cruzi*. Dissertação. FIOCRUZ – Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia. Curitiba, 2015.

SILVA, V. L. C. Subsídios ao processo de certificação do Brasil como área livre da transmissão transfusional da doença de Chagas. **Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva)** – Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. São Paulo. 2010.

SILVEIRA, A. C.; Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas na Américas. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 16, p. 35-42, 2000.

SOARES, D.C., CALEGARI-SILVA, T.C., LOPES, U.G., TEIXEIRA, V.L., DE PALMER PAIXAO, I.C.N., CIRNE-SANTOS, C., BOU-HABIB, D.C., SARAIVA, E.M. Dolabelladienetriol, a compound from *Dictyota pfaaffii* algae, inhibits the infection by *Leishmania amazonensis*. **Plos Neglect. Trop. D.** 6, e1787 DOI: 10.1371/journal.pntd.0001787, 2012.

SPAVIERI, J., ALLMENDINGER, A., KAISER, M., CASEY, R., HINGLEY-WILSON, S., LALVANI, A., GUIRY, M.D., BLUNDEN, G., TASDEMIR, D. Antimycobacterial, antiprotozoal and cytotoxic potential of twenty-one brown algae (Phaeophyceae) from British and Irish waters. **Phytother. Res.** v. 24, p. 1724-1729, 2010a.

SPAVIERI, J., KAISER, M., CASEY, R., HINGLEY-WILSON, S., LALVANI, A., BLUNDEN, G., TASDEMIR, D. Antiprotozoal, antimycobacterial and cytotoxic potential of some british green algae. **Phytother. Res.** v. 24, p. 1095-1098, 2010b.

SÜZGEÇ-SELÇUK, S., MERICLI, A.H., GUVEN, K.C., KAISER, M., CASEY, R., HINGLEY-WILSON, S., LALVANI, A., TASDEMIR, D. Evaluation of Turkish seaweeds for antiprotozoal, antimycobacterial and cytotoxic activities. **Phytother. Res.** v. 25, p. 778-783, 2011.

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; CREPALDI, P. H.; SOUZA, W. Atlas didático: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. **Fundação CECIERJ**. Rio de Janeiro, 1ª Edição, 2011.

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; CREPALDI, P. H.; SOUZA, W. Atlas didático: Ciclo de vida da LEISHMANIA. **Fundação CECIERJ**. Rio de Janeiro, 1ª Edição, 2013.

TEIXEIRA, V. L. Produtos Naturais de Algas Marinhas Bentônicas. **Ver. Virtual de Quim.** v. 5, n. 3, p. 343-362, 2013.

TORRES, F.; JASPARS, M.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Photosynthetic marine organisms as a source of anticancer compounds. **Phytochemical Reviews.** v. 9, p. 557-79, 2010.

TORRES, F. A. E.; PASSALACQUA, T. G.; VELÁSQUEZ, A. M. A.; SOUZA, R. A.; PIO COLEPICOLA; GRAMINHA, M. A. S. New drugs with antiprotozoal activity from marine algae: a review. **Ver. Bras. Farmacogn.** v. 24, p. 265-76, 2014.

TORRES-GUERREIRO, E. M. R., QUINTANILHA CEDILO, J., RUIZ-ESMENJAUD, ARENAS, R. Leishmaniasis: a review. **F1000Res**, v. 6, p. 750, 2017.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology.** v. 31, p. 472-481, 2001.

VASCONCELOS, RS, KOVALESKI, DF, TESSER JUNIOR, ZC. Doenças Negligenciadas: Revisão da Literatura sobre as Intervenções Propostas, **Sau, & Transf. Soc.**, v.6, n.2, p.114-131, 2016.

VEIGA-SANTOS, P., PELIZZARO-ROCHA, K.J., SANTOS, A.O., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS FILHO, B.P., SILVA, S.O., SUDATTI, D.B., BIANCO, E.M., PEREIRA, R.C., NAKAMURA, C.V. *In vitro* antitrypanosomal activity of elatol isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*. **Parasitology.** v. 137, p. 1661-1670, 2010.

VONTHRON-SENECHEAU, C., KAISER, M., DEVAMBEZ, I., VASTEL, A., MUSSIO, I., RUSIG, A.M. Antiprotozoal activities of organic extracts from French marine seaweeds. **Mar. Drugs.** v. 9, p. 922-933, 2011.

WARREN, L. G. Metabolism of *Schizotrypanum cruzi* Chagas. I. Effect of Cultura Age and Substrate Concentration on Respiratory Rate. **The Journal of Parasitology**. v. 46, n. 5, p. 529-539, 1960.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. "Chagas disease (American trypanosomiasis)". Disponível em: <http://www.who.int/chagas/disease/en/>. Visitado em Junho de 2018a.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. "Leishmaniasis". Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Visitado em Junho de 2018b.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. "Neglected tropical diseases." Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/. Visitado em Junho de 2018c.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. "Traditional, complementary and integrative medicine". Disponível em: <http://www.who.int/traditional-complementary-integrative-medicine/about/en/>. Visitado em Agosto de 2018d.