



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – PPGCS

DIOGO BRANDÃO

**POTENCIAL LEISHMANICIDA DE EXTRATOS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE
LIQUENS DA ANTÁRTICA**

MACEIÓ - AL

2022

DIOGO BRANDÃO

**POTENCIAL LEISHMANICIDA DE EXTRATOS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE
LIQUENS DA ANTÁRTICA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Magna Suzana
Alexandre Moreira

MACEIÓ - AL

2022

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

B817p Brandão, Diogo.

Potencial leishmanicida de extratos de bactérias isoladas de líquens da Antártica / Diogo Brandão. – 2022.

109 f. : il., grafs., tabs. color.

Orientadora: Magda Suzana Alexandre Moreira.

Dissertação (mestrado em ciências da saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 71-87.

Apêndices: f. 88-109

1. Leishmanicida. 2. *Leishmania*. 3. Bactérias Antárticas. 4. Drogas em investigação. I. Título.

CDU: 616.993.161

DIOGO BRANDÃO

**POTENCIAL LEISHMANICIDA DE EXTRATOS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE
LIQUENS DA ANTÁRTICA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Magna Suzana Alexandre Moreira – (UFAL)

Prof.^a Dr.^a Aline Cavalcanti de Queiroz – (UFAL)

Prof.^a Dr.^a Mariana Da Silva Santos – (CESMAC)



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPEP)
Av. Lourival Melo Mota, S/N, Tabuleiro do Martins, Maceió - AL, Cep: 57072-970
(82) 32141069 EMAIL: cpq@propep.ufal.br

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO
DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU***

ATA Nº 195

Ata da sessão referente à defesa intitulada **POTENCIAL LEISHMANICIDA DE EXTRATOS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE LIQUENS DA ANTÁRTICA**, para fins de obtenção do título em Mestrado, área de concentração Ciências da Saúde e linha de pesquisa Fisiopatologia de Doenças Humanas e Terapêutica Experimental, pelo discente DIOGO BRANDÃO (início do curso em março de 2019) sob orientação da Prof.^a Dr.^a MAGNA SUZANA ALEXANDRE MOREIRA.

Aos vinte e seis dias do mês de maio do ano de 2022 às 09:00 horas, via videoconferência, reuniu-se a Banca Examinadora em epígrafe, aprovada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação conforme a seguinte composição:

Dr.^a Presidente – MAGNA SUZANA ALEXANDRE MOREIRA (ORIENTADOR)

Dr.^a – ALINE CAVALCANTI DE QUEIROZ - UFAL

Dr.^a – MARIANA DA SILVA SANTOS - CESMAC

Tendo a senhora Presidente declarada aberta a sessão, mediante o prévio exame do referido trabalho por parte de cada membro da Banca, o discente procedeu a apresentação de seu Trabalho de Conclusão de Curso de Pós-graduação *stricto sensu* e foi submetido(a) à arguição online pela Banca Examinadora que, em seguida, deliberou sobre o seguinte resultado:

X **APROVADO CONDICIONALMENTE**, mediante o atendimento das alterações sugeridas pela Banca Examinadora, constantes do campo Observações desta Ata e/ou do parecer em anexo.

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPEP)

Av. Lourival Melo Mota, S/N, Tabuleiro do Martins, Maceió - AL, Cep: 57072-970
(82) 32141069 EMAIL: cpg@propep.ufal.br

Observações da Banca Examinadora (caso não existam, anular o campo):

Realizar as correções sugeridas pela banca examinadora, as quais estão no arquivo enviado ao discente.

Nada mais havendo a tratar, o(a) senhor(a) Presidente declarou encerrada a sessão de Defesa, sendo a presente Ata lavrada e assinada pelos(as) senhores(as) membros da Banca Examinadora e pelo(a) discente, atestando ciência do que nela consta.

INFORMAÇÕES:

- Para fazer jus ao título de mestre(a)/doutor(a), a versão final da dissertação/tese, considerada Aprovada, devidamente conferida pela Secretaria do Programa de Pós-Graduação, deverá ser tramitada para a Biblioteca Central, em Processo de Ficha Catalográfica de Dissertação/Tese, dentro do prazo regulamentar de 60 dias a partir da data da defesa. (Considerar o tempo de suspensão das atividades na Biblioteca Central) Após a entrega da versão com ficha catalográfica e folha com as assinaturas dos examinadores, o texto deverá ser enviado à Secretaria, por email para anexar à Plataforma Sucupira e ao SIGAA, para posterior solicitação de diploma.
- Esta Ata de Defesa é um documento padronizado pela Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa. Observações excepcionais feitas pela Banca Examinadora poderão ser registradas no campo disponível acima ou em documento anexo, desde que assinadas pelo(a) Presidente.
- Caso o PPG considere necessário sugerimos colocar, também, a logomarca do Programa ou Unidade Acadêmica.
- Esta Ata de Defesa somente poderá ser utilizada como comprovante de titulação se apresentada junto à Certidão da Coordenação informando que não há pendências atividades acadêmicas.

Documento assinado digitalmente
 MAGNA SUZANA ALEXANDRE MOREIRA
Data: 14/06/2022 08:37:37-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

MAGNA SUZANA ALEXANDRE
MOREIRA
Orientador

Documento assinado digitalmente
 ALINE CAVALCANTI DE QUEIROZ
Data: 14/06/2022 08:42:57-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

ALINE CAVALCANTI DE
QUEIROZ
Membro Titular

Documento assinado digitalmente
 MARIANA DA SILVA SANTOS
Data: 13/06/2022 19:43:38-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

MARIANA DA SILVA SANTOS
Membro titular

Documento assinado digitalmente
 DIOGO BRANDAO
Data: 13/06/2022 12:41:06-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Discente

As minhas mães, Maria Edleuza Brandão e Josinete Souza Cavalcante, por todos os ensinamentos transmitidos, amor, educação, valores morais, respeito e por não permitir que eu fraquejasse ao longo dessa árdua caminhada.

Aos meus irmãos, Josélio Monteiro de Melo Jr, Charles André Brandão, Rysleyne Cristina Reys, Wagner Monteiro De Melo por todo Incentivo ao longo dessa Trajetória.

À minha princesinha de luz, Stella Marrie, uma das maiores alegrias de nossas vidas.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao criador de todas as coisas do universo, o soberano **Deus** todo-poderoso, que com sua benevolência me concedeu as faculdades mentais necessárias para desenvolver este trabalho.

As minhas mães, **Maria Edleuza Brandão** e **Josinete Souza Cavalcante**, que com suas histórias de vida, me inspiraram e fizeram seguir, sempre em busca de um futuro melhor, prezando a honestidade e o respeito ao próximo.

Ao meu Genitor, **Marcelo Chagas** (*in memoriam*) que apesar de não ter cumprido suas obrigações em vida como pai, deixou-me uma família maravilhosa, no qual tenho profundo orgulho e amor.

À minha vó **Maria** (*in memoriam*) o amor que me foi dado por ti, certamente acalentaram meu espírito e alma em cada um dos momentos difíceis da minha vida. O céu ganhou uma estrela. Sei que cuida do seu neto onde quer que esteja.

Ao meu irmão, **Josélio Monteiro de Melo Jr**, certamente uma das pessoas que mais acreditaram em mim, me incentivou, e nos momentos que ousei fraquejar, me redirecionou de volta aos trilhos da vida. Meu profundo amor e gratidão por ti são incondicionais meu mano.

Ao meu tio, **José Ailton Chagas**, a figura mais próxima de um pai que já tive e tenho na vida, é o senhor. Sou grato pelo exemplo de homem que sempre se mostrou e pelo carinho e amor que demonstrou sempre para comigo. Meu amor por ti, é incondicional.

À minha família paterna, vó **Josefa**, tia **Maria**, **Quiteria**, **Karla**, e tio **Marcos** (*in memoriam*), aos primos **Lucas**, **Julyanna**, **Rafael**, **Arthur**, **Emanuela** e **Anderson**, grato por todo amor que me foi dado desde o reencontro com vocês aos vinte anos, já adulto.

À minha família materna, Vó **Aparecida**, tia **Diza**, **Del**, **Ílma** e **Vivi**, tio **Robi** e as primas **Mika** e **Lilica** meu muito obrigado por todo carinho e apoio.

As Primas **Andreia** e **Dani**, meu profundo amor e carinho por vocês é, algo inexplicável. Gratidão por fazerem parte da minha vida e família.

À minha orientadora, **Prof.^a Dr.^a Magna Suzana Alexandre Moreira** lhe agradeço por todos os ensinamentos, não só acadêmicos, principalmente os da vida. Por me fazer descobrir que podemos nos superar sempre, a dar o melhor de mim em todas as situações, vencendo as adversidades. Que nos basta querer e correr atrás dos nossos objetivos, a senhora é um espelho de pessoa em minha vida, minha mãe científica.

À minha querida, **Prof.^a Dr.^a Aline Cavalcanti de Queiroz** o meu muito obrigado, por todo cuidado e paciência para comigo durante toda minha formação no mestrado. Por cada uma das suas contribuições, por me fazer exigir sempre mais e mais, e me fazer entender que devemos ser autônomos no caminhar, porém, sempre de mãos dadas com aqueles que nos cercam, afinal, ninguém faz nada sozinho.

Ao **Prof. Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte** gratidão não só por suas contribuições e ensinamentos, mas também, pelo meu objeto de estudo, que de uma forma indireta está ligado a uma área que tenho paixão, a Bacteriologia.

À **Prof.^a Dr.^a Lara Mendes de Almeida** o meu muito obrigado, por toda contribuição em meu processo de formação. Por reforçar minhas bases na área de microbiologia, pela parceria na pesquisa e por sempre ser tão gentil em suas colocações. És um exemplo não só de profissional, mas de ser humano, que essa luz que reside em ti, jamais se apague.

Ao **Prof. Dr. Eurípedes Alves da Silva Filho** suas contribuições foram fundamentais para a realização do meu sonho, em me tornar um docente em um futuro agora mais próximo. Seus ensinamentos, seus conselhos, o acolhimento para comigo em seu

laboratório, nunca vou esquecer, lhe tenho como um exemplo de homem e caráter indubitável. Sua ética e seus valores morais certamente irei levar comigo para o resto dos meus dias. Meu pai científico, deixo registrado aqui a minha eterna gratidão.

Ao meu amigo **Anderson Brandão leite**, gratidão por tudo, principalmente no quesito exigência. Você é um exemplo de profissional, ou é certo ou errado, não existe meio termo. Valeu velhinho.

Aos meus grandes amigos **Dr. Jean Phellipe** e **Dr.^a Micaela Araújo** sua prestatividade e humildade, certamente foram os maiores ensinamentos que pude aprender com ambos. Grato por tudo.

À **prof.^a Dr.^a Camila Braga Dornelas**, que durante a minha chegada na universidade, permitiu que eu seguisse em busca do meu sonho.

À **Prof.^a Dr.^a Eliane Aparecida Campesatto**, que gentilmente me permitiu assistir as suas aulas durante o início do meu estágio de docência. Grato por todo incentivo e carinho.

À minha queriada amiga, irmã que a vida me deu **Delma Holanda de Almeida**, que também foi responsável por minha formação desde a graduação como orientadora. Um verdadeiro presente posto pelo grande pai em meu caminho, sem você certamente essas linhas aqui escritas nem sequer existiriam. Gratidão por tudo.

Aos companheiros de laboratório do BIOGEM, em especial a **Elaine Cristina** (*In memorian*), **Mirna Samile**, **Daniele**, **Isleane martins**, **Paula**, **Lidiane Rego**, **Ranieri**, **Neilma Dias**, o meu muito obrigado por todos os momentos que vivemos, e pelos ensinamentos e acima de tudo pelo companheirismo.

À Família LaFI, que foi meu alicerce durante toda essa jornada. Não tenho palavras para expressar tudo que sinto ao estar junto de cada um de vocês. Em especial aos amigos **João Kaycke**, **Camila Moura**, **Amanda Silva**, **João Flavio**, **Marcio Thomaz**, **Karoline Jatobá**, **Shakira Cavalcante**, **Lilyanna Albuquerque**, **Izabelly Maciel**, **Max**

Viana, Ana Rachel, Joice Fragoso, Gessyca Gouveia, Alyne Lima, Fabio Pacheco, José Clementino, Hilda Caroline, Mariana Santos, Suellem Albuquerque. Eternamente grato a cada um de vocês.

Ao meu querido amigo **Matheus kunn** que sempre me deu força e apoio nos momentos mais importantes da vida. Meu guri, lhe sou grato por sempre ter estado ao meu lado, principalmente nas horas mais difíceis.

À minha amiga irmã **Nathany Correia**, uma pessoa de caráter incrível, que sempre me apoiou e deu forças em tudo. Sou grato ao grande pai por você existir e fazer parte da minha vida, e ainda ter gerado as duas gotinhas de luz que tanto amo, **Maria e Pedro.**

Ao meu amigo irmão **Felipe Almeida**, falar de você é algo fácil, porém, resumir tanta coisa boa em poucas linhas é difícil, sua humildade, carinho e respeito para comigo são coisas que jamais irei esquecer. Meu negão, muito obrigado por tudo. Amo você

À minha grande amiga **Eduarda Balbino**, que sempre torceu pelas minhas conquistas e sempre esteve presente nas horas mais oportunas da minha vida. Te amo.

À minha grande amiga **Ericca Gomes**, que sempre esteve junto em vários momentos importantes da minha vida. Um verdadeiro presente que o grande pai colocou em meu caminho. Gratidão define nossa amizade.

Ao casal mais que queridos e que fazem parte da minha família **Thiago Peixoto e Whedja Ferreira**, sempre estiveram ao meu lado e me deram apoio em tudo. Amo vocês.

As minhas queridas amigas **Andreia e Raquel**, grato por sempre cuidarem tão bem da minha pessoa, foram um grande presente em minha vida nesse ano de 2020. Amo vocês.

À Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS).

Grato por tudo!

“Não são os da consaguinidade os verdadeiros laços de família e sim os da simpatia e da comunicação de idéias, os quais prendem os espíritos antes, durante e depois de suas encarnações”.

(Allan Kardec)

RESUMO

As leishmanioses são enfermidades infecto parasitárias, negligenciadas e amplamente distribuídas geograficamente, acometendo milhões de indivíduos em todos os continentes do planeta. O elenco farmacológico disponível para o tratamento de infecções ocasionadas pela leishmanias é limitado e possui toxicidade elevada. Portanto, existe uma busca incessante por novas opções terapêuticas mais seguras e eficazes para o tratamento das leishmanioses. Este estudo teve por objetivo investigar a atividade de candidatos a protótipos de fármacos leishmanicidas a base de extratos bacterianos isolados de líquens Antárticos que constituam opções terapêuticas mais seguras ao tratamento da leishmaniose. Um total de 7 isolados bacterianos produtores de pigmentos foram reativadas em meio Ágar Nutriente a 15°C por 7 dias e os inocúlos foram padronizados e semeados em 50 mL de caldo nutriente. Os metabólitos foram extraídos por centrifugação e separação do pellet o qual foi submetido a lise celular com metanol seguido de vórtex e centrifugação para obtenção de um total de 7 extratos metanólicos pigmentados. O ensaio colorimétrico de MTT foi usado para avaliar o efeito citotóxico em macrófagos de linhagem J774.A1. Os extratos 8LB19, 5LB35, 23LB3, 7LB4, 10AUVB14, 6AUVB13 não mostraram citotoxicidade aos macrófagos, exceto o 5AUVB13, que apresentou citotoxicidade à célula hospedeira com efeito máximo observado de $38,2 \pm 3,7$ %. Culturas de promastigotas de *L. chagasi* e *L. amazonensis* foram contadas diretamente em microscópio óptico para verificar a atividade leishmanicida. Dos extratos metanólicos testados em *L. chagasi*, 5AUVB13 e 6AUVB13 exibiram uma potente atividade com efeito máximo de $97,93 \pm 1,88\%$ e $96,10 \pm 0,01\%$, bem como CI50 de $18,31 \mu\text{g/mL}$ ($11,22 - 30,47$), e $22,05 \mu\text{g/mL}$ ($13,51 - 30,59$), respectivamente. 7 LB 4 e 23 LB 3 demonstraram atividade abaixo de 50%, com efeito máximo de $32,47 \pm 5,19\%$ e $16,30 \pm 1,88\%$, respectivamente. 8 LB 19, 5 LB 35 e 10 AUVB 14 não foram ativos. Contra *L. amazonensis*, 8 LB 19, 5 LB 35 e 10 AUVB 14 não foram ativos; 23 LB 3 e 7 LB 4, contudo, exibiram atividade fraca com efeito máximo de $37,50 \pm 1,80\%$ e $39,58 \pm 4,54\%$, respectivamente. 5AUVB13 e 6AUVB 13 exibiram atividade superior a 50%, com os respectivos efeitos máximo de $65,63 \pm 1,80\%$ e $60,42 \pm 1,04\%$ e CI50 de $52,72 \mu\text{g/mL}$ ($37,14 - 68,29$) e $44,63 \mu\text{g/mL}$ ($33,61-55,65$). Destaca-se que 5AUVB13 e 6AUVB13 se mostraram ativas contra promastigotas de ambas as espécies testadas. Foi realizada uma revisão sistemática, reforçando a importância da exploração de bioprodutos bacterianos e sua gama de aplicabilidades na biotecnologia.

Palavras-chave: Atividade leishmanicida, *Leishmania*, Bactérias Antárticas, Novos fármacos.

ABSTRACT

Leishmaniasis is an infectious parasitic disease, neglected and widely distributed geographically, affecting millions of individuals on all continents of the planet. The pharmacological list available for the treatment of infections caused by leishmania is limited and has high toxicity. Therefore, there is a relentless search for new, safer and more effective therapeutic options for the treatment of leishmaniasis. This study aimed to investigate the activity of candidates for prototype leishmanicidal drugs based on bacterial extracts isolated from Antarctic lichens that constitute safer therapeutic options for the treatment of leishmaniasis. The pigment-producing bacteria were reactivated in Nutrient Agar medium at 15°C for 7 days and the inocula were standardized and seeded in 50ml of nutrient broth. The metabolites were extracted by centrifugation and pellet separation, which was subjected to cell lysis with methanol followed by vortexing and centrifugation to obtain intracellular pigments. The MTT colorimetric assay was used to assess the cytotoxicity effect on J774.A1 lineage macrophages. The extracts 8LB19, 5LB35, 23LB3, 7LB4, 10AUVB14, 6AUVB13 did not show cytotoxicity to macrophages, except for 5AUVB13 which presented cytotoxicity to the host cell with maximum observed effect of $38.2 \pm 3.7\%$. Promastigote cultures of *L. chagasi* and *L. amazonensis* were counted directly under an optical microscope to verify the leishmanicidal activity. Statistical calculations were obtained using the GraphPad Prism program. Of the methanol extracts tested to date on *L. chagasi*, 5AUVB13 and 6AUVB13 exhibited potent activity with a maximum effect of $97.93 \pm 1.88\%$, $96.10 \pm 0.01\%$ and IC₅₀ of 18.31 $\mu\text{g/ml}$ (11.22 - 30.47) 22.05 $\mu\text{g/ml}$ (13.51 - 30.59), 7LB4 and 23LB3 demonstrated activity below 50%, with a maximum effect of 32.47 ± 5.19 , 16.30 ± 1.88 respectively. 8LB19, 5LB35 and 10AUVB14 were not active. Against *L. amazonensis*, 8LB19, 5LB35 and 10AUVB14 were not active; 23LB3 and 7LB4, however, exhibited moderate activity with a maximum effect of 37.50 ± 1.80 and 39.58 ± 4.54 , respectively. 5AUVB13 and 6AUVB13 exhibited activity greater than 50% with the respective maximum effects of 65.63 ± 1.80 and 60.42 ± 1.04 and IC₅₀ of 52.72 (37.14 - 68.29) and 44.63 (33.61-55.65), with emphasis on 5AUVB13 and 6AUVB13 that were active in both species.

Keywords: Leishmanicidal activity, *Leishmania*, Antarctic Bacteria, New drugs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> sp. Na figura (A) promastigota forma flagelada e (B) amastigota forma intracelular e aflagelada.	25
Figura 2- Fêmea de <i>Lutzomyia longipalpis</i> (Diptera: Psychodidae) realizando repasto sanguíneo em indivíduo humano.	26
Figura 3- Formas clínicas da Leishmaniose tegumentar. A- Leishmaniose cutânea; B- Leishmaniose cutânea difusa; C- Leishmaniose mucocutânea.....	27
Figura 4- Manifestação clínica da Leishmaniose visceral. (A) Paciente com perda de peso e presença de hepatoesplenomegalia; (B) Paciente com a presença de hepatomegalia e esplenomegalia.....	27
Figura 5- Agentes etiológicos das leishmanioses de maior importância clínica segundo forma da doença e localidade de ocorrência.....	29
Figura 6- Descrição completa do ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.	30
Figura 7- Capacidade interativa da <i>Leishmania</i> com o sistema imune bem como a produção de citocinas mediada pelas respostas do tipo Th1 e Th2 em LT.....	32
Figura 8- Capacidade interativa das interleucinas IL-17 e IL-22 na resposta imunopatogênica e imunoprotetiva em LT e LV.	34
Figura 9- Endemicidade da leishmaniose no mundo em 2019. (A) LT. (B) LV.....	35
Figura 10- Mapa do continente Antártico.	45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Caracterização das amostras de bactérias utilizadas para produção dos extratos metanólicos com código da bactéria, identificação e local de coleta dos líquens, solvente e coloração dos extratos.....	56
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito dos extratos metanólicos bacterianos de líquens da Antártica e o fármaco controle anfotericina B (100, 30, 10, 3, 1 e 0,3 µg/mL) sobre a viabilidade de macrófagos da linhagem J774.A1 (ensaio de MTT). Os valores entre parêntese correspondem ao intervalo de confiança do experimento.	58
Tabela 2 - Efeito leishmanicida dos extratos metanólicos bacterianos antárticos (5LB19, 8LB19, 10AUVB14, 7LB4, 5AUVB13, 6AUVB13, 23LB3 µg/mL) contra formas promastigotas de <i>L. chagasi</i> . Os valores entre parêntese correspondem ao intervalo de confiança do experimento.	59
Tabela 3 - Efeito leishmanicida dos extratos metanólicos bacterianos antárticos (5LB19, 8LB19, 10AUVB14, 7LB4, 5AUVB13, 6AUVB13, 23LB3 µg/ml) contra formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> . Os valores entre parêntese correspondem ao intervalo de confiança do experimento.	61
Tabela 4 - Índice de seletividade dos extratos metanólicos bacterianos antárticos (5LB19, 8LB19, 10AUVB14, 7LB4, 5AUVB13, 6AUVB13, 23LB3) para macrófagos J774.A1 x promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e promastigotas de <i>L. chagasi</i>	61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Espectrofotometria dos extratos metanólicos bacterianos antárticos que foram ativos contra promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	62
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD4+	Grupamento de diferenciação 4 ativado” do inglês “Cluster of Differentiation
DNA	Ácido desoxirribonucleico” do inglês “Deoxyribonucleic Acid”
DATASUS	Departamento de Informática do SUS
DNDI	Drugs for Neglected Diseases initiative
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
ELISA	Ensaio imunoenzimático indireto
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana” do inglês “Human Immunodeficiency Virus
IFN-γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
iNOS2	Óxido nítrico sintase induzível” do inglês “Nitric Oxide Synthase (inducible)
LDCM	Leishmaniose Cutânea Difusa
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
L	Leishmania
M1	Macrófagos ativados na via clássica 1
M2	Macrófagos ativados na via alternativa 2
MR	Receptor de manose” do inglês “Manose Receptor
MTT	brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NO	Óxido Nítrico” do inglês “Nitric Oxide
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
pH	Potencial Hidrogeniônico

PKDL	Leishmaniose Dérmica Pós Calazar
RIFI	Imunofluorescência indireta
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio” do inglês “Reactive Oxygen Species”
SbIII	Antimônio na forma trivalente
SbV	Antimônio na forma pentavalente
SINAN	Sistema de Informação de Agravos e Notificações
Th1	Resposta T auxiliar do tipo 1” do inglês “T helper response type 1
Th2	Resposta T auxiliar do tipo 2” do inglês “T helper response type 2
TNFα	Fator de Necrose Tumoral α ” do inglês “Tumor Necrosis Factor α
Treg	Células T regulatórias
μM	Micromolar
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 Leishmaniose e seus aspectos gerais	24
2.2 Classificação das leishmanioses.....	26
2.3 Ciclo evolutivo da leishmaniose	30
2.4 Imunopatogenicidade da leishmaniose	31
2.5 Epidemiologia e diagnóstico das leishmanioses	35
2.6 Farmacoterapia empregada no tratamento das leishmanioses	39
2.2.1 Potencial biotecnológico do continente antártico	43
2.2.2 Caracterização do ambiente antártico.....	45
2.2.3 Diversidade bacteriana do continente antártico	46
2.2.4 Aplicabilidade e potencial biotecnológico de organismos bacterianos no desenvolvimento de novos fármacos.....	48
3 OBJETIVOS.....	51
3.1 Objetivo geral	51
3.2 Objetivos específicos	51
4 MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1 Obtenção dos produtos naturais oriundos de líquens antárticos.....	52
4.1.1 Reativação das amostras e produção das biomassas bacterianas.....	52
4.1.2 Procedimento de extração	53
4.2 Ensaios farmacológicos	54
4.2.1 Manutenção da linhagem macrófagos	54
4.2.2 Determinação da viabilidade celular	54
4.2.3 Cultura de parasitos	54
4.2.4 Ensaio de viabilidade de promastigotas.....	55
4.3 Espectrofotometria de varredura.....	55
4.4 Análise estatística	56
5 RESULTADOS.....	56
5.1 Produção dos extratos metanólicos	56
5.2 Efeito citotóxico para a célula hospedeira.....	58
5.3 Efeito leishmanicida dos extratos bacterianos contra formas promastigotas. ...	59
5.4 Espectrofotometria de varredura dos extratos ativos contra formas promastigotas do parasito.....	62

6 DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÃO	70
8 REFERÊNCIAS.....	71
9 APÊNDICE.....	88

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença endêmica em aproximadamente 98 países, apresentando uma prevalência de 12 milhões de casos e incidência anual de 1,3 milhões de novos casos. Além disso, cerca de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas de alto risco de infecção da patologia, sendo classificada pela Organização Mundial de Saúde como uma das cinco maiores doenças parasitárias do mundo (UZUN et al., 2018; WHO, 2022).

Trata-se de uma parasitose de caráter zoonótico e vetorial, negligenciada, de espectro clínico elevado e amplamente distribuída geograficamente ao redor do planeta, ainda em franca disseminação, áreas que eram tidas como não endêmicas, atualmente são atingidas aumentando o foco de transmissão dessa enfermidade, o que a caracteriza como um problema de saúde pública global (ANVERSA et al., 2018; AKBARI et al., 2021). Os fatores clínicos causados pelas leishmanioses são determinados pela relação resposta imune do hospedeiro, fatores hereditários e parasitários, a exemplo: virulência, resistência, estirpe do parasito e espécie) envolvidas na infecção (COPELAND; ARONSON, 2015; SUNDAR; SINGH, 2016; WHO, 2022).

Os fármacos de primeira escolha para o tratamento da doença são os antimoniais pentavalentes desde a década de 50. A segunda linha de tratamento é constituída por anfotericina B (desoxicolato ou lipossomal), pentamidina e miltefosina, sendo este último o único fármaco existente no mercado que pode ser administrado por via oral (HUSEIN-ELAHMED et al., 2020; MCGWIRE, B.S; SATOSKAR, 2014). No entanto, apesar de sua importância epidemiológica, o arsenal terapêutico existente para o tratamento da leishmaniose é limitado e de elevada toxicidade, sendo considerada uma doença extremamente negligenciada pela indústria farmacêutica (AKBARI et al., 2021; JAIN; JAIN, 2018). A farmacoterapia disponível, apresenta uma série de problemas, a exemplo: via de administração invasiva e efeitos colaterais, o que contribui para o abandono do tratamento, redução da eficácia do mesmo e surgimento de estirpes resistentes do parasito. Os efeitos mais frequentes são os cardiotoxicos, nefrotóxicos e insuficiência renal (AKBARI et al., 2021; BRASIL, 2017; FERREIRA et al., 2012). Para minimizar esses agravos, novas pesquisas na

descoberta por novas drogas estão surgindo, e nesse contexto, fontes naturais têm demonstrado-se uma alternativa viável para tal proposta (GERVAZONI et al., 2020).

Com o passar do tempo e os avanços na tecnologia, estudos por candidatos a fármacos ou princípios ativos que apresentem potencial terapêutico, passaram a ter destaque dentro da indústria farmacêutica em especial aqueles que são obtidos diretamente de fontes naturais, promovendo avanços surpreendentes para a biomedicina (GERVAZONI et al., 2020; RAVELO; BRAUN, 2009; SEKUROVA et al., 2019). O continente Antártico por ser um ambiente hostil a toda e qualquer forma de vida, apresenta um alto potencial biotecnológico devido a suas condições ambientais extremas. A bioprospecção de microrganismos nesses ambientes passou a ser uma das áreas mais exploradas por pesquisadores, em especial por organismos psicrófilos ou psicotolerantes. Tais organismos, desenvolveram capacidades adaptativas únicas, capazes de manter sua sobrevivência em meio as adversidades impostas por esses ambientes extremos, podendo fornecer biomoléculas exploráveis para a indústria e com ampla aplicação biotecnológica (JOSHI; SATYANARAYANA, 2013; SILVA et al., 2018; TOSI et al. 2010; ZUCCONI et al., 2020).

Uma pesquisa realizada com bactérias antárticas, relatou que estes organismos apresentam uma elevada atividade antimicrobiana e também demonstraram atividade antiparasitária, mostrando-se promissores para a biotecnologia em virtude de suas moléculas bioativas altamente versáteis metabolicamente, ainda pouco exploradas (SILVA et al., 2018).

A pressão seletiva imposta pelas regiões polares, termina culminando em um ecossistema que apresenta um potencial biotecnológico elevado e de sucesso devido a sua alta atividade biológica. Esses organismos por sua vez, apresentam uma vantagem ambiental, devido a produção de suas moléculas naturais, por vias metabólicas específicas, o que é interessante para a indústria farmacêutica, no que se refere à produção de biofármacos (JOZALA et al., 2016; TIAN et al., 2017).

A franca disseminação da doença, bem como a limitação dos fármacos utilizados no tratamento, estes por sua vez, apresentam uma série de efeitos tóxicos aos pacientes, somados aos altos valores agregados na fabricação destes medicamentos que em sua totalidade são escassos e desde o início de sua implementação no tratamento em décadas anteriores, não houve mudanças significativas para resolver seus problemas relacionados aos efeitos indesejáveis

ocasionados pelos mesmos e tampouco na descoberta de uma nova farmacoterapia eficaz no combate as leishmanioses. Frente ao exposto, faz-se necessário a busca por novas alternativas terapêuticas que possam contribuir para o combate dessas enfermidades zoonóticas.

Por isso, o presente estudo busca encontrar moléculas que sejam possíveis candidatas a protótipos de fármacos extraídas de bactérias oriundas de líquens antárticos, tornando-se uma opção terapêutica mais eficaz e segura para os pacientes acometidos pela leishmaniose. Tendo em vista o potencial desses organismos antárticos como produtores de moléculas bioativas e sua capacidade de sobreviver em ambientes de condições extremas do planeta terra.

2 REVISÃO DE LITERATURA

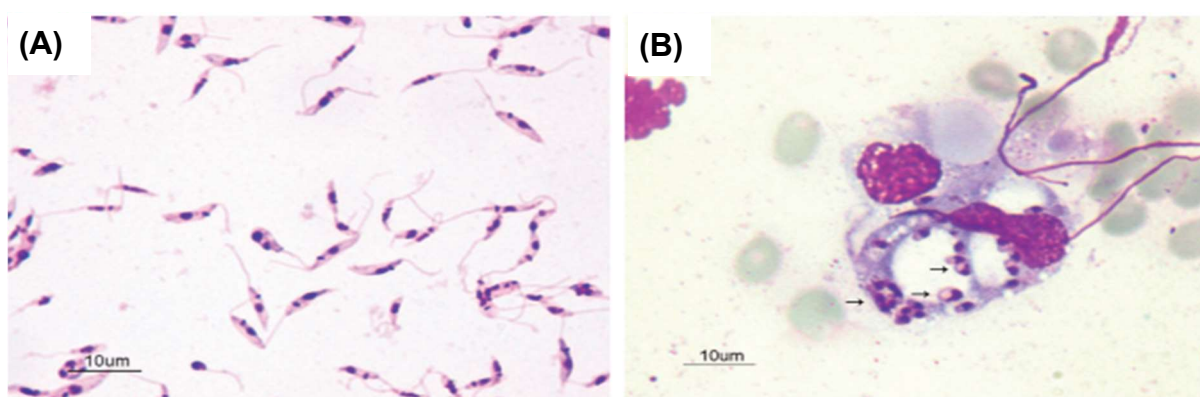
2.1 Leishmaniose e seus aspectos gerais

Existe uma grande diversidade de parasitos capazes de provocar doenças infecciosas, aumentando os riscos de morbidade e mortalidade em indivíduos humanos em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, onde o acesso a farmacoterapia é limitada (GIGLEY et al., 2012; HORTA et al., 2020). Dentre eles, o gênero *Leishmania* constitui um grupo de protozoários conhecidos por serem os responsáveis em causar uma enfermidade zoonótica denominada leishmaniose, que é dividida em leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV) (LIU; UZONNA, 2012; WHO, 2022). O protozoário apresenta a seguinte organização taxonômica: Reino: Protozoa, filo: Euglenozoa, classe: Cinetoplastia, ordem: Trypanosomatida, família: Trypanosomatidae, gênero: *Leishmania* e subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (LAINSON, 2010).

Já são reportadas no mundo pouco mais de 50 espécies de *Leishmania*, entretanto, somente uma totalidade de 20 destas, são clinicamente relevantes para seres humanos (AKHOUNDI, 2016; WHO, 2022). As espécies circulantes no Brasil com maior frequência são *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania chagasi*, todavia, vale ressaltar que em território brasileiro um total de 8 espécies distintas já são relatadas (RANGEL et al., 2018; SHAW, 2006).

As promastigotas e amastigotas são as duas formas em que o parasito apresentam. As que possuem morfologia flagelada e alongada encontrada nos vetores em seu trato digestivo correspondem as promastigotas (Figura 1 A). As que variam morfologicamente entre ovais e arredondadas com ausência flagelar, encontradas no interior de células mononucleadas do sistema fagocítico imunitário tendo como hospedeiros os mamíferos, representam a forma amastigota (Figura 1 B). (KIMA,2007; SUNTER; GULL,2017).

Figura 1- Formas evolutivas de *Leishmania* sp. Na figura (A) promastigota forma flagelada e (B) amastigota forma intracelular e aflagelada.



Fonte: Adaptado de PAHO (2019).

Em todo mundo as espécies de *Leishmania* spp. são transmitidas por insetos vetores denominados flebotomíneos, demonstrado na figura 2, estes são pertencentes a ordem díptera e família *Psychodidae*, onde as espécies mais relevantes pertencem a subfamília *Phlebotominae*, que abrigam os agentes vetoriais de maior importância, encarregados da disseminação da LT e LV. *Lutzomyia* e o *Phlebotomus*, são os principais gêneros de flebotomos, vetores encarregados pela disseminação do parasito no novo e velho mundo, respectivamente (BATES et al., 2015).

Encontram-se em torno de 1000 espécies reconhecidas mundialmente de flebotomíneos, sendo que, 530 são reportadas por circular nas Américas e um total de 260 são encontrados na fauna brasileira (SHIMABUKURO; GALATI, 2011; SHIMABUKURO et al. 2017).

Os flebotomíneos apresentam uma ampla distribuição em todo o mundo, entretanto estes insetos são extremamente vulneráveis a fatores ambientais, principalmente aqueles que estão relacionados ao clima, o que termina promovendo um controle natural biológico destes vetores (BATES et al., 2015; GALATI,2018). As

fêmeas são naturalmente os únicos agentes vetoriais comprovados capazes de transmitir as várias espécies de *Leishmania*, contudo, é importante salientar que transfusões sanguíneas, o transplante de órgãos ou ainda de forma congênita pode gerar a transmissão da doença (BATES et al., 2015; PAVLI; MALTEZOU, 2010).

Figura 2- Fêmea de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) realizando repasto sanguíneo em indivíduo humano.



Fonte: Adaptado de PAHO (2019).

Encontram-se em torno de 1000 espécies reconhecidas mundialmente de flebotomíneos, sendo que, 530 são reportadas por circular nas Américas e um total de 260 são encontrados na fauna brasileira (SHIMABUKURO; GALATI, 2011; SHIMABUKURO et al. 2017).

Os flebotomíneos apresentam uma ampla distribuição em todo o mundo, entretanto estes insetos são extremamente vulneráveis a fatores ambientais, principalmente aqueles que estão relacionados ao clima, o que termina promovendo um controle natural biológico destes vetores (BATES et al., 2015; GALATI, 2018). As fêmeas são naturalmente os únicos agentes vetoriais comprovados capazes de transmitir as várias espécies de *Leishmania*, contudo, é importante salientar que transfusões sanguíneas, o transplante de órgãos ou ainda de forma congênita pode gerar a transmissão da doença (BATES et al., 2015; PAVLI; MALTEZOU, 2010).

2.2 Classificação das leishmanioses

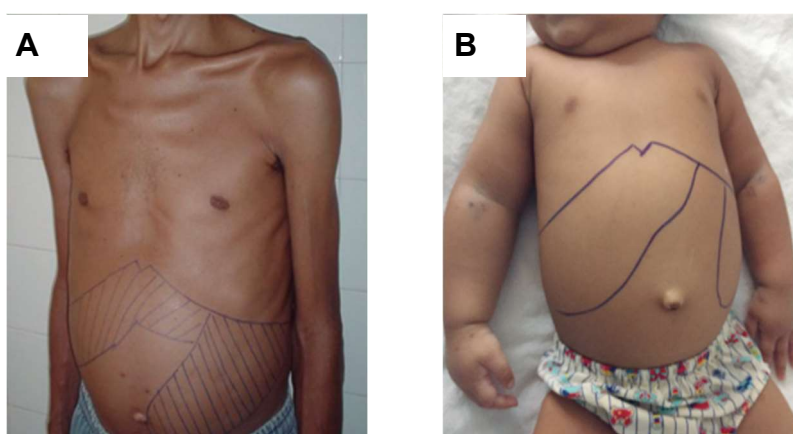
As formas de leishmaniose cutânea (LC); leishmaniose cutânea difusa (LCD); leishmaniose mucocutânea (LMC); representam uma subdivisão da LT, conforme demonstra a Figura 3, juntamente com a LV figura 4, representam o grupo principal da doença (ALVAR et al., 2012; BURZA et al., 2018; WHO, 2022).

Figura 3- Formas clínicas da Leishmaniose tegumentar. A- Leishmaniose cutânea; B- Leishmaniose cutânea difusa; C- Leishmaniose mucocutânea.



Fonte: Adaptado de PAHO (2019).

Figura 4- Manifestação clínica da Leishmaniose visceral. (A) Paciente com perda de peso e presença de hepatoesplenomegalia; (B) Paciente com a presença de hepatomegalia e esplenomegalia.



Fonte: Adaptado de PAHO (2019).

Fatores hereditários, estirpe do parasito, vetores e interação da resposta imunológica do hospedeiro acometido, são fatores imprescindíveis para determinar o quadro de manifestações clínicas dessa patologia, podendo ser desde uma lesão cutânea até uma visceração, forma mais grave da doença conhecida como

leishmaniose visceral, onde está última, apresenta altos índices de letalidade quando não tratada (MURBACK et al., 2011; WHO, 2022).

O aparecimento de nódulos cutâneos, com a possibilidade de evoluir para lesões ulcerosas com delimitação de suas bordas é característico da LC. Entretanto quando esses nódulos aparecem de forma gradativa e não ulcerosa, ocasionando a desfiguração da derme, sem visceração, é característico de sua variante LCD, que por sua vez, apresenta quadros frequentes de resistência a farmacoterapia utilizada no tratamento dessa enfermidade (PAHO,2019; REITHINGER et al., 2007; VERMA et al., 2012). Pela capacidade agressiva em destruir os tecidos das áreas mucosas devida a uma exacerbada resposta imunopatológica, a LMC é considerada a forma mais grave dentre as 3 variantes da LC. As lesões apresentam infiltrações cutâneas e nódulos, apresentando quadro metastático, seja por via hematogênica ou linfática, sendo as regiões da traqueia e do palato mole geralmente são as mais acometidas. *L. braziliensis* é o parasito mais frequentemente associado nas Américas a este tipo de manifestação clínica. Vale ressaltar que a ocorrência de LMC é rara, representa 4% de todos os casos reportados nessas regiões (BURZA et al., 2018; SILVEIRA, 2019; PAHO,2019).

Em hindi Kala-azar tem o significado de febre negra, que também é uma das nomenclaturas que denominam a LV (GUPTA, 1947), podendo permanecer de forma assintomática, ou apresentar manifestações clínicas após incubação variando de 2 a 4 meses. Amastigotas passam a afetar células do sistema reticulo endotelial visceral, onde pode ocorrer o acometimento de outros órgãos, a exemplo: fígado, baço, linfonodos e intestino consequentemente ocasionando a visceração. Febre, anemia, protusão abdominal decorrente do aumento de tamanho principalmente do fígado e do baço são características clínicas típicas desse tipo de leishmaniose. (ALVAR et al., 2012; MURRAY et al., 2005; WHO, 2022).

Pacientes indianos e do Sudão que recebem tratamento para a forma mais grave da doença (LV), podem apresentar leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL), que é uma variação crônica dessa patologia e o principal agente etiológico envolvido nesses quadros é *L. donovani*. O Quadro imunológico do infectado bem como os fatores de virulência do parasito relacionado à infecção, irão determinar a sua gravidade bem como os índices de letalidade (PAHO,2019; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012). Pacientes que apresentam quadro de coinfeção por *Leishmania* e o vírus da

imunodeficiência humana (HIV) apresentam maiores chances de desenvolver a forma mais grave da doença e consequentemente apresentam quadros clínicos mais severos, como esplenomegalia e hepatomegalia (PAHO, 2019).

Sabe-se que mais de 20 espécies de *Leishmania* são capazes de infectar organismos humanos, conforme abaixo figura 5, no entanto 11 destas apresentam maior relevância clínica (BURZA, 2018; PAHO, 2019). As espécies responsáveis pelos quadros infecciosos mais preocupantes da doença são: *L. donovani* e *L. chagasi* (PAHO, 2019).

Figura 5- Agentes etiológicos das leishmanioses de maior importância clínica segundo forma da doença e localidade de ocorrência.

SUBGÊNERO				
<i>Leishmania</i>				<i>Viannia</i>
NOVO MUNDO		VELHO MUNDO		NOVO MUNDO
TEGUMENTAR	VISCERAL	TEGUMENTAR	VISCERAL	TEGUMENTAR
<i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. aethiopica</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. guyanensis</i>

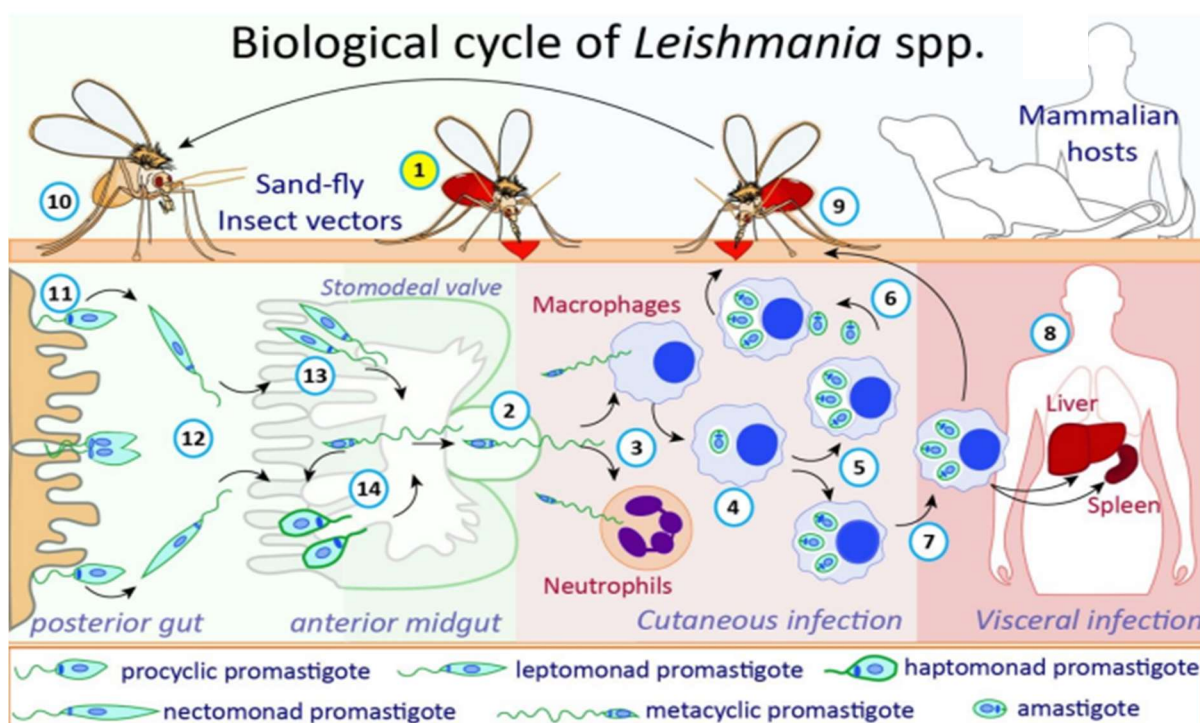
Fonte: Adaptado de BATES (2007); PAHO (2019).

O Brasil e as Américas possuem endemicidade para ambas as formas clínicas da doença, no território brasileiro os agentes etiológicos relacionados para sintomas clínicos associados a LT são causados por *L. (Viannia) braziliensis* e *L. (Leishmania) amazonensis*, e para LV, também conhecida como Calazar, seu agente causador é *L. (Leishmania) infantum*, *L. donovani* é relacionada ao continente europeu e asiático (ALVAR et al., 2012; BURZA, 2018).

2.3 Ciclo evolutivo da leishmaniose

Categorizada como uma antroponose, a leishmaniose pode afetar diversos hospedeiros, o homem e outros vertebrados podem ser acometidos, incluindo os cães domésticos, considerados os principais reservatórios da LV em áreas urbanas por sua aproximação e convivência direta com seres humanos nessas áreas. O ciclo evolutivo é denominado heteroxênico, pois existe a necessidade de mais de um hospedeiro para que o mesmo esteja completo, como mostra a figura 6:

Figura 6- Descrição completa do ciclo biológico de *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado de MULE et al., (2020) (1) fêmea de flebotomíneo infectada realizando o repasto sanguíneo, inoculando promastigotas metacíclicos; (2) essas formas evolutivas flageladas não são replicativas, porém, infecciosas nos mamíferos, sendo fagocitadas principalmente por macrófagos e neutrófilos; (3) no interior das células fagocíticas, os parasitos se transformam em amastigotas infectantes; (4) estas se multiplicam por fissão binária; (5) após promoverem a lise celular, os parasitos passam a infectar as células adjacentes; (6) as espécies relacionadas à infecção visceral podem acometer vários órgãos, como fígado e o baço por macrófagos infectados ou amastigotas liberados; (7) nas células hospedeiras, os parasitos irão replicar-se e estabelecer a infecção; (8) um novo inseto vetor pode realizar um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero infectado; (9) assim, as células circundadas contendo amastigotas ou amastigotas livres liberadas serão ingeridas, chegando ao intestino do inseto; (10) no intestino posterior do vetor as amastigotas vão transformasse em promastigotas procíclicos; (11) essas formas evolutivas que vão se multiplicar; (12) e, posteriormente,

estas vão migrar (12) para o intestino médio anterior (válvula estomadeal) do inseto; (13) nesse local há a diferenciação para formas infecciosas metacíclicas, estabelecendo o processo de metaciclogênese; (14) por fim, as promastigotas metacíclicas que são regurgitadas durante o repasto sanguíneo sofrem rediferenciação em promastigotas retro leptomonas, que se replicam dentro do vetor, ficando anexados no intestino anterior do inseto. Reiniciando o ciclo. (BATES, 2018; MULE et al., 2020; SRIVASTAVA et al., 2016).

2.4 Imunopatogenicidade da leishmaniose

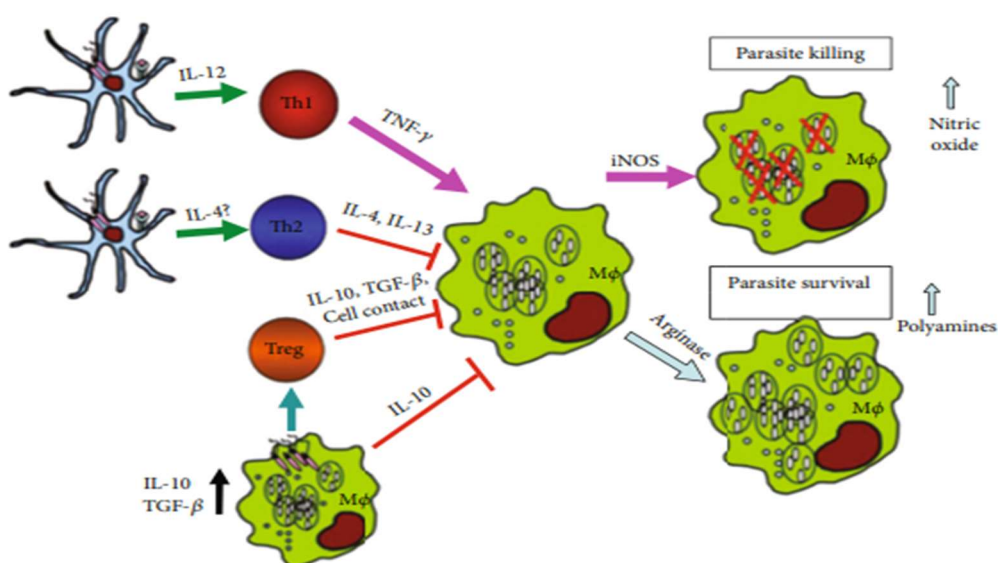
Os parasitos causadores dessa patologia desenvolveram vias de escape para driblar o sistema imune, podendo permanecer internalizados em macrófagos por períodos extensos, para uma melhor compreensão acerca de uma resposta imunológica eficiente e protetora é imprescindível um melhor entendimento da imunogênica das leishmanioses (ELMAHALLAWY et al., 2021; TEWARY et al., 2004). Uma vez detectada a infecção pelo sistema complemento, o mesmo inicia o combate tentando ocasionar a lise das formas promastigotas inoculadas, tanto por via clássica ou alternativa, com intuito de erradicar o quadro infeccioso no organismo acometido, entretanto, esse mesmo sistema pode favorecer a proliferação e sobrevivência da *Leishmania*, pois pode facilitar o processo fagocítico dos parasitos executado pelos macrófagos (BICHIOU H et al., 2021; MOSSER et al., 1986).

Neutrófilos, monócitos, células natural killers (NK) e macrófagos são as primeiras células recrutadas após o quadro infeccioso ser instaurado no organismo acometido. NK são dotados de um amplo arsenal de defesa seja na liberação de citocinas, montagem de armadilhas extracelulares e produção de espécies reativas para combater as infecções, contudo, podem regular de forma inversa a resposta imunológica o que é denominado regulação negativa de neutrófilos favorecendo a instauração dessas infecções (AMULIC et al., 2012; DA FONSECA-MARTINS et al., 2021; NORDENFELT; TAPER H., 2011; ROSALES, 2018). Os receptores inatos destas células conhecidos como *tol like receptors* (TLR), reconhecem moléculas presentes nas áreas de superfície das células do parasito, como, lipofosfoglicano (LGP), e glicoproteína-63 (gp63), induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias. Esse processo vai aumentar o número de células infectadas com *Leishmania*, produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO), substâncias bastante eficazes no combate e controle da doença, desempenhando um papel crucial

para montagem de uma resposta efetiva contra o parasito da *Leishmania*. (BADIRZADEH et al., 2017; CARNEIRO et al., 2016; HORTA et al., 2012).

Os macrófagos apresentam um perfil de resposta imune dicotômico, pois podem apresentar os polimorfismos do tipo M1 e M2 sendo fundamentais para o desfecho da doença, seja na cura ou replicação e sobrevivência dos parasitos em hospedeiros infectados (SAQIB et al., 2018). São considerados como padrões de resposta imunoprotetiva para os indivíduos infectados com LC, a ativação das respostas do tipo Th1, representado na figura 7, estando relacionada à polarização de macrófagos com polimorfos do tipo M1 (Clássico), estes, se ligam as células parasitárias via dependente do receptor do tipo Toll 9 (TLR-9), produzindo interleucina 12 (IL-12), estimulando a ativação de NK, posteriormente interferon gama (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (ATRI et al., 2018; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018).

Figura 7- Capacidade interativa da *Leishmania* com o sistema imune bem como a produção de citocinas mediada pelas respostas do tipo Th1 e Th2 em LT.



Fonte: Adaptado de LIU; UZONA (2012).

Citocinas oriundas de células NK e capazes de regular a resposta imune do hospedeiro, ativando macrófagos infectados e células dendríticas (CDs). A primeira citocina produzida durante a infecção é a IL-12, crucial para polarização da imunoresposta tipo Th1, e ainda é capaz de evitar apoptose celular. As CDs e

macrófagos são responsáveis em produzi-la (GLENNIE et al., 2017; GOLLOB et al., 2014; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018).

IFN- γ e TNF- α podem ser produzidos por linfócitos CD4⁺ ativados em Th1. Células infectadas com o parasito são capazes de gerar Intermediários Reativos de Oxigênio (ROI) e também Intermediários Reativos de Nitrogênio (RNI), mecanismos principais para a morte intracelular do parasito da *Leishmania* em macrófagos e CDs. Macrófagos ativos produzem em larga escala as citocinas IL-12, TNF- α e IFN- γ , estes capazes de ativar outras células do sistema imune (SCOTT; NOVAIS, 2016). O TNF- α opera de forma sinérgica com a citocina IFN- γ , estimulando a produção de NO, mediada por ação enzimática da sintetase de óxido nítrico induzível (iNOS). NO é uma molécula com capacidade citotóxica eficiente, desempenhando um papel importante no combate a patógenos intracelulares, incluindo os do gênero *Leishmania*, promovendo um controle dessa enfermidade por exercer atividade leishmanicida, ocasionando a morte intracelular dos parasitos (NYLÉN; GAUTAM 2010; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018).

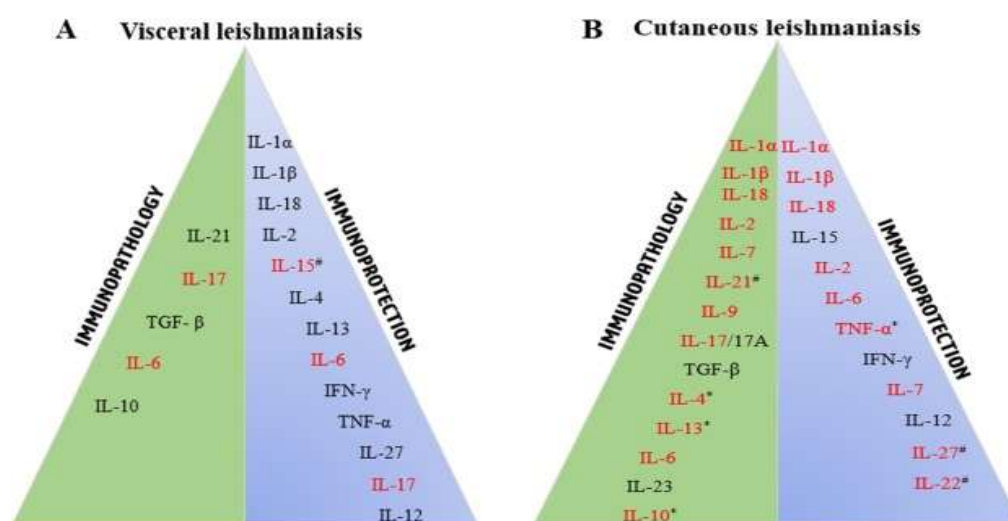
Contudo, a resposta imune do tipo Th2 é favorável a replicação do parasito, quando ocorre a polarização de macrófagos com perfil M2 (alternativa). As citocinas do tipo IL-4, IL-10 e TGF- β , produzidas por essa resposta, atuam regulando negativamente a produção de NO dos macrófagos (BADIRZADEH et al., 2017; MATOS et al., 2007). Tais citocinas possuem a capacidade de inibição da diferenciação dos linfócitos T para o fenótipo tipo Th1, conseqüentemente a produção de IFN- γ e TNF é inibida e o NO passa a não ser estimulado (BADIRZADEH et al., 2017; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018).

Esta via regula positivamente a arginase (ARG). A proliferação dos parasitos depende da disponibilidade de poliaminas, que ocorrem a partir da ação catabólica da L-arginina e atividade enzimática da ARG do parasito e seus hospedeiros vertebrados. Esta enzima converte o substrato L-arginina em L-ornitina e ureia. L-ornitina é o substrato crucial para biossíntese das poliaminas, sendo este último um nutriente essencial para a proliferação das células da *Leishmania*. Os parasitos ativam parcialmente a ARG e inativam a produção de NO em células hospedeiras, aumentando a sobrevivência do parasito por depleção do substrato iNOS (L-arginina) reduzindo os níveis de NO (BADIRZADEH et al., 2017; BOHLSON et al., 2014; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018).

Vários estudos sobre o entedimento dos modelos de resposta Th1 e Th2 na leishmaniose são aceitos, porém, estes ainda não são capazes de elucidar os fatores agravantes da doença. Com relação aos perfis de susceptibilidade e resistência nas leishmanioses, outras subpopulações celulares englobando as células T reguladoras (Treg) e Th17 vem demonstrando papeis importantes nesses quesitos, pois estão amplamente ligadas no estímulo ou no controle de respostas inflamatórias (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017; LEE et al., 2009; SAQIB et al., 2018).

A pele e as áreas mucosas apresentam grande importância no combate a microorganismos extracelulares e enfermidades mais graves do sistema imune, pois a resposta do tipo Th17 é mediada pelas mesmas. Recrutamento, migração e capacidade de ativar neutrófilos são funções que estas células estão relacionadas. Th17, NK e Th1 também tem a capacidade de ativar a via da IL-22, entretanto essas 2 últimas em níveis menores (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017; KORN et al. 2009). As citocinas IL-17 e IL-22 são do tipo inflamatórias e apresentam um papel antagônico, atuando de forma imunoprotetora ou imunopatogênica contra parasitos intracelulares, incluindo os do gênero *Leishmania* para ambas as formas clínicas da doença como exemplificado na figura 8.

Figura 8- Capacidade interativa das interleucinas IL-17 e IL-22 na resposta imunopatogênica e imunoprotetiva em LT e LV.



Fonte: Adaptado de OZERO et al (2020).

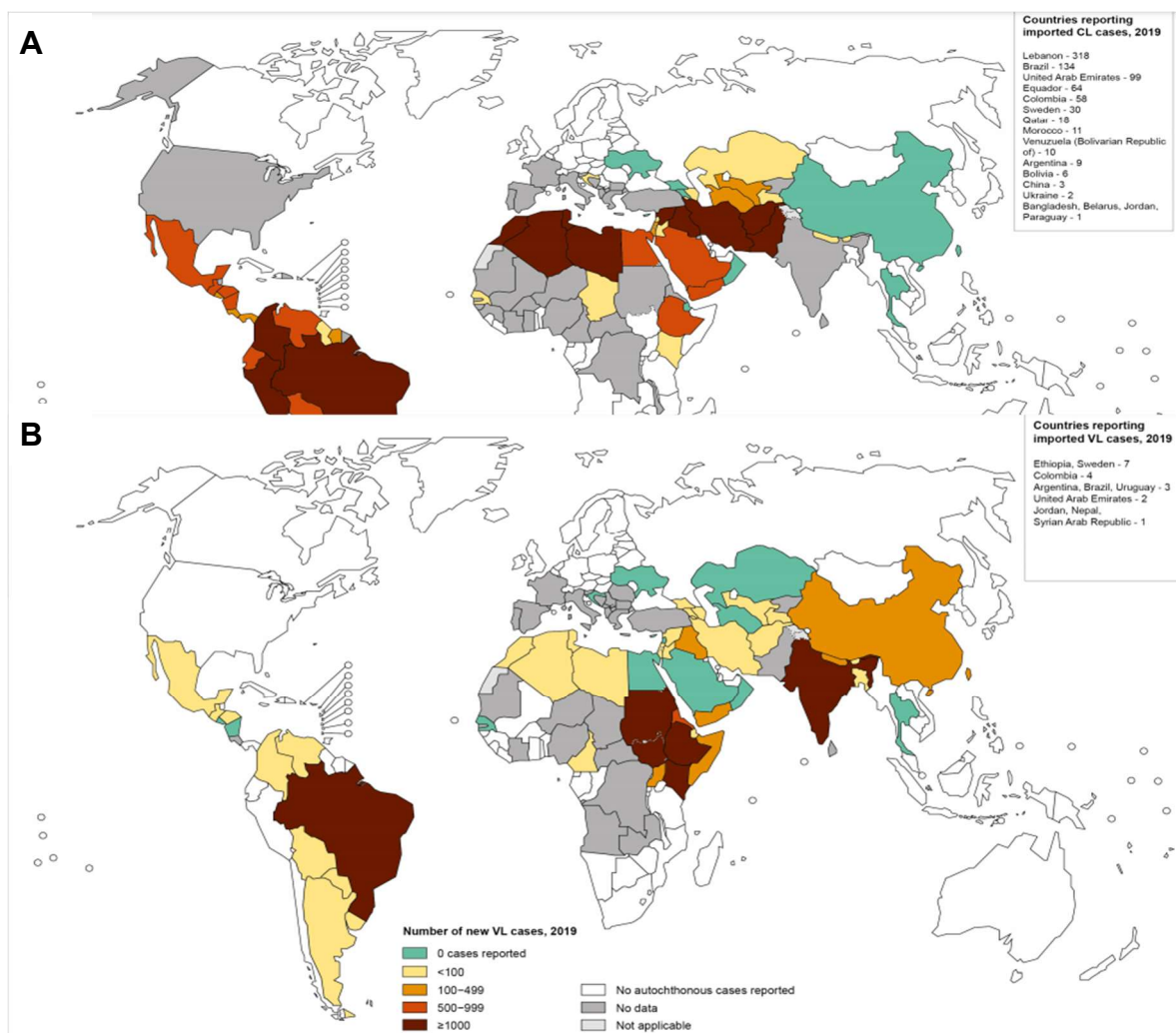
Porém, durante os quadros infecciosos, as vias IL-17 e IL-22 ainda não são totalmente elucidadas em relação ao seu verdadeiro papel nesse processo (GONZALEZ-LOMBANA et al., 2013; OZERO et al., 2020). Em contrapartida, as células do tipo *Treg* tem a capacidade em modular respostas inibitórias em outras populações celulares do tipo T, a exemplo: células T CD8+ citotóxicas e Th17 efectoras, que beneficiam o parasito, pois o mesmo permanece vivo no interior das células (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017 ; KATARA et al., 2013).

As formas promastigotas são beneficiadas na sua capacidade infectiva por seus vetores, uma vez que esses insetos têm a habilidade de produzir junto com sua saliva substâncias vasodilatadoras. Estas, por sua vez, apresentam aptidão imunossupressora, atuando na inibição de apresentação antigênica do parasito aos macrófagos. Apresentando um perfil imunomodulador, regulando negativamente a resposta do tipo Th1, favorecendo a progressividade da infecção, devido a inibição na produção secretora de citocinas IL-12 e IFN- γ (TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018).

2.5 Epidemiologia e diagnóstico das leishmanioses

As leishmanioses são amplamente bem distribuídas geograficamente, afetando os cinco maiores continentes do planeta (África, América, Ásia, Europa e Oceania), os casos prevalentes chegam a acometer mais de 1 milhão de pessoas, onde aproximadamente 350 milhões destas vivem em áreas de risco da doença, estimando-se que 700.000 a 1 milhão de novos casos ocorram anualmente (ALVAR et al., 2012; WHO, 2022). A figura 9 exemplifica geograficamente as regiões ao redor do mundo acometidas pela LT Figura 9A e LV Figura 9B até o ano de 2019 segundo a *World Health Organization* (WHO).

Figura 9- Endemicidade da leishmaniose no mundo em 2019. (A) LT. (B) LV.



Fonte: WHO (2022).

A figura 8 exemplifica geograficamente as regiões ao redor do mundo acometidas pela LT Figura 8A e LV Figura 8B até o ano de 2019 segundo a *World Health Organization* (WHO). Apesar de ser encontrada em diversos continentes, a LT é considerada a forma mais comum desta patologia, podendo causar lesões cutâneas e úlceras nas áreas mais expostas do corpo, e deixar cicatrizes por toda vida. As Américas, Bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central concentram aproximadamente 95% dos casos de LT reportados no mundo. Para os casos de leishmaniose mucocutânea (LMC), mais de 90% estão restritos ao estado Plurinacional da Bolívia, Brasil e Peru. Para a forma mais letal dessa enfermidade, seis países concentram 90% dos casos de LV no planeta, sendo eles: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia (ALVAR et al., 2012; WHO,2022).

Avaliando o número de casos entre os períodos de 2007 a 2019 em relação a LTA no Brasil, foram registrados, 270.361 casos em território nacional levando-se em conta uma média de 8,6 casos a cada 100.000 habitantes até o ano de 2019 (SINAN/DATASUS, 2019). Predominantemente o maior número de casos está concentrado nas regiões Norte e Nordeste, com 117,264 e 80,784 casos respectivamente registrados até aquele ano, entretanto, sem menosprezar os dados das regiões centro-oeste e sudeste que também apresentam números expressivos (SINAN/DATASUS, 2019).

Em relação aos casos de LV no país, avaliando os mesmos períodos de 2007 a 2019 foram registrados um total de 47,882 notificações, as regiões norte e nordeste se mantem com maior número de casos. Contudo, a região Nordeste é majoritária para essa forma mais grave da doença, com um total de 25,367 casos notificados, concentrando mais de 50% dos casos registrados no país, o que lhe confere o status de região endêmica para ambas as formas dessa enfermidade. Os menores registros estão concentrados na região Sul para ambas as formas doença com 5,341 e 120, LT e LV nessa ordem respectivamente. (SINAN/DATASUS, 2019).

No estado de Alagoas, avaliando os mesmos períodos de 2007 a 2019 todos os municípios tiveram pelo menos uma notificação para casos de LT e LV, o que demonstra endemidade do estado alagoano para a doença. Entretanto, vale ressaltar que, dos 896 casos notificados para LT no estado, algumas cidades são mais afetadas, com destaque para: Maceió, União dos Palmares, Colônia Leopoldina e Novo Lino, 326, 170, 176, 96 casos notificados, nessa ordem, representado mais de 70% de todos os casos reportados em relação aos demais municípios no estado até aquela data (SINAN/DATASUS, 2019).

Para os registros de LV em Alagoas, foram confirmados um total de 559 casos. Maceió é a cidade alagoana com maior número de notificações, com 493 casos reportados até o ano de 2019, o que representa mais de 85% dos registros comparando com os demais municípios do estado. É importante ressaltar, que em 2015 foi notificado um surto para ambas as formas da doença na cidade, registrando 43 casos de cada uma delas, e nos anos de 2018 e 2019 houve um aumento significativo no número de casos referentes a LV, 96, 66 notificações respectivamente (SINAN/DATASUS, 2019).

Pelo fato de ser um caso de saúde pública global de caráter negligenciado, várias estratégias vêm sendo traçadas, visando a contenção dessa enfermidade. Medidas preventivas podem minimizar os riscos de contágio por parte dos agentes vetoriais, o uso de repelentes, aplicação de telas em janelas, limpeza de quintais, uso de mosquiteiros e poda de árvores são algumas medidas profiláticas que podem auxiliar no combate a proliferação dos vetores e consequentemente a não disseminação da doença (BRASIL, 2017; PAHO, 2019).

É de suma importância o diagnóstico inicial, pode auxiliar em um controle precoce da doença. A observação das manifestações clínicas aparente nos indivíduos infectados, associação à anamnese, informações epidemiológicas e métodos laboratoriais são extremamente relevantes para auxiliar no combate as leishmanioses. Entretanto alguns métodos são invasivos e nenhum deles apresenta 100% de sensibilidade ou especificidade apesar dos avanços tecnológicos (ANVERSA, 2018; SRIVASTAVA et al., 2016).

Os métodos laboratoriais são os mais eficazes para um diagnóstico mais preciso, considerados o padrão ouro para detecção do agente etiológico. O teste parasitológico é realizado através da extração direta do parasito de tecidos acometidos, (medula óssea, pele ou áreas mucosas), o grau de sensibilidade varia de 50 a 90% a depender do tecido utilizado no teste (SRIVASTAVA et al., 2016). Existem também os ensaios imunológicos, capazes de detectar a presença de anticorpos do tipo anti-*Leishmania*, em um hospedeiro infectado ao desencadear a resposta imunocelular para tentar combater a infecção. Os mais conhecidos são: Ensaio Imunoenzimático (ELISA), Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Teste de Aglutinação Direta (DAT) (SAVOIA, 2015; SRIVASTAVA et al., 2016).

ELISA é um teste que apresenta sensibilidade elevada, permitindo a detecção de alguns anticorpos. É considerado como bastante moderno pelo fato de permitir a realização de múltiplos exames ao mesmo tempo e usado principalmente no imunodiagnóstico da forma mais grave da doença, LV (CAÑAVATE et al., 2011). O problema da RIFI, apesar de ter uma sensibilidade considerável, é a reação cruzada com outras doenças, o que muitas vezes resulta em um diagnóstico errôneo (CAÑAVATE et al., 2011). O DAT apresenta baixa especificidade e consiste na reação de aglutinação direta de anticorpos do tipo anti-*Leishmania* encontrados no soro, que

reagem com as formas promastigotas, resultando na aglutinação dessas células do parasito (CAÑAVATE et al., 2011).

E por fim, existem alguns testes rápidos do tipo imunocromatográficos (IC) e as ferramentas moleculares, em especial a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Dos testes do tipo IC, o mais popular utiliza um antígeno recombinante denominado rK39, este tem a capacidade de reconhecimento de anticorpos pontuais do complexo *L. donovani* (CAÑAVATE et al., 2011; READY, 2014). Ferramentas moleculares mostram-se bastante eficazes no diagnóstico da doença, com destaque para a reação em cadeia da polimerase (PCR), pelo seu alto grau de sensibilidade apresentado, possibilitando a identificação a nível de gênero dos agentes etiológicos envolvidos na doença (SAVOIA, 2015).

2.6 Farmacoterapia empregada no tratamento das leishmanioses

Os fármacos empregados no tratamento das leishmanioses exibem alta toxicidade, gerando uma série de efeitos adversos e não existe a disponibilidade de medicamentos profiláticos ou vacinais para contenção da doença (CHARLTON et al., 2018; ZULFIQAR, 2017). A linha de medicamentos utilizados em primeira instância para o tratamento dessa enfermidade é composta pelos antimoniais pentavalentes, em segundo caso, a escolha é constituída por anfotericina B, pentamidina, pentoxifilina, recomendados pelo Ministério da Saúde (MS), e que compõem o protocolo terapêutico no Brasil (BURZA et al., 2018; BRASIL, 2017; HUSEIN-ELAHMED et al., 2020).

As medidas de tratamento tiveram início no ano de 1912, implementadas pelo médico Gaspar de Vianna, onde o mesmo administrava o tártaro emético, um antimônio que estava em sua forma estrutural química trivalente (Sb^{3+}). Contudo este fármaco foi clinicamente suspenso, devido à alta toxicidade apresentada. Finalmente em 1947, os antimônios foram reintroduzidos, agora em sua forma pentavalente (Sb^{5+}) esses, com toxicidade reduzida (CARVALHO et al., 2019).

Na atualidade, o antimonioato de meglumina é um dos fármacos de primeira linha estabelecidos no Brasil para tratamento das leishmanioses. Todavia, vários fatores considerados importantes, como localização geográfica, espécies do gênero *Leishmania* circulantes, bem como a viabilidade de resposta no tratamento,

ocasionaram várias alterações no protocolo terapêutico empregado para tratar esta patologia. Antimoniato de meglina e anfotericina B lipossomal são efetivos no tratamento para a grande maioria das espécies encontradas em território nacional, com exceção para os quadros infecciosos de indivíduos acometidos por *Leishmania guyanensis*, onde o fármaco escolhido é a pentamidina (BRASIL, 2017; AN et al., 2019).

Estipula-se que exista um comportamento de pró-fármaco por parte do antimônio em sua forma pentavalente (Sb^{5+}), havendo sua conversão para a forma trivalente (Sb^{3+}), pela oxido-redução da glutatona reduzida induzindo Sb^{5+} a ser reduzido, demonstrando atividade leishmanicida (ZULFIQAR et al., 2017). Contudo, os antimoniatos pentavalentes, apesar de empregados desde a década de 50 e exibir uma menor toxicidade que as formas trivalentes, também podem estimular uma gama de efeitos indesejáveis, como hepatotoxicidade, toxicidade cardíaca e renal, bem como dores abdominais (AN et al., 2019). A medicação é totalmente contraindicada para pacientes em estágio gestacional e a frequência de hepatotoxicidade nos pacientes em tratamento pode chegar em até 50% dos casos (BRASIL, 2017; FRANKE et al., 1990).

Muitos debates já foram levantados acerca do antimoniato de meglina para tratar LT, utilizando dosagens mais baixas para reduzir os efeitos colaterais e aumentar a adesão dos pacientes ao tratamento (OLIVEIRA-NETO et al., 1996). Indivíduos que apresentam contraindicação por administração via sistêmica, o recomendado é optar por via intralesional (IL), preconizado pela Organização Panamericana de Saúde (PAHO) em suas diretrizes, usar o antimoniato pentavalente (PAHO, 2018).

Tendo a capacidade de promover mudanças na permeabilidade celular e desbalançamento iônico, a anfotericina B é categorizada como um antibiótico polieno interativo com ergosterol membranoso das células do parasito, promovendo a desestruturação e posterior morte das mesmas (SANGSHETTI et al., 2015; TIUMAN et al., 2011). Sendo este, o fármaco recomendado como de primeira escolha para as gestantes, tendo eficácia para ambas as formas do parasito da *Leishmania* (PAHO, 2018). Contudo, vale deixar claro que, pacientes que apresentem cardiopatias, hepatopatias e nefropatias, seu uso é totalmente contraindicado. Os efeitos adversos

mais corriqueiros são: febre, náusea, vômito, hipopotassemia (hipocalcemia) e flebite nas áreas de infusão (BRASIL, 2017).

Fosfatidilcolina, colesterol e disterolfosfatidilglicerol são os constituintes da forma farmacêutica de anfotericina B em sua forma lipossomal. Podendo atingir níveis plasmáticos maiores nessa formulação, mostrando-se superior ao desoxicolato de anfotericina B. Medicamento este, protocolado e indicado para o tratamento da LV, podendo também ser utilizado para tratar LT quando os fármacos do tratamento não apresentam resposta ou seus usuários apresentem alguma contraindicação (BRASIL, 2017).

Aqui no Brasil o isetionato de pentamidina é um fármaco de segunda escolha. Trata-se de um composto orgânico que está inserido no grupamento das amidinas, onde sua administração ocorre por via intramuscular e sua eliminação ocorre de forma vagarosa. O fígado e os rins são os principais órgãos no qual esse fármaco depositasse (BRASIL, 2017).

Vários questionamentos acerca dos mecanismos de ação da pentamidina ainda são discutidos. As hipóteses mais aceitas são, perturbação e deslocamento de aminoácidos, interferência na captação ou função das poliaminas, interferência na biossíntese de DNA, RNA, proteica, fosfolipídica, culminando na inibição da capacidade respiratória, seja aeróbica ou anaeróbica das células parasitárias (GALE; FOLKES, 1967; CHALABI; GUTTERID, 1977; BASSELIN et al., 2012; BRASIL, 2017). Vômito, mialgia, hipotensão, síncope, hipoglicemia e dores localizadas nas regiões de aplicação são os efeitos colaterais frequentemente relatados (BRASIL, 2017).

Categorizado como vasodilatador periférico e apresentando características hemorreológicas, a pentoxifilina é um fármaco que pode ser utilizado por via oral, prescrito pelo Ministério da Saúde para tratar LMC, de forma combinada com antimoníato de meglumina, pois não existe registro de uso dele isoladamente, sendo necessário sua combinação com outros medicamentos. Vários estudos com pentoxifilina como agente auxiliar (imunomodulador) para tratamento da LMC, tem se mostrado eficaz, pois os efeitos adversos gerados pelo antimônio pentavalente foram diminuídos, resultando na cura dos doentes em um período reduzido se comparado a farmacoterapia convencional empregada, poupando a necessidade de mais um ciclo estabelecido na terapia de primeira instância (BRASIL, 2017).

Sua aplicação em dosagens elevadas pode estimular uma série de efeitos indesejáveis sendo os mais comuns náuseas e vômitos. O uso do medicamento é contraindicado em pacientes com idade inferior a 12 anos, pacientes gestantes, lactantes dentre outros. Contudo, mesmo as pesquisas acerca do seu uso serem escassas, já foi estabelecida uma PORTARIA (Nº 67, DE 19 DE NOVEMBRO DE 2015), que consiste em quando o paciente deve ou não receber a aplicação de pentoxifilina 400 mg combinada ao antimônio na esfera do SUS, para tratar LTM (BRASIL, 2015; BRASIL, 2017).

Outro medicamento relevante no tratamento da LV, apesar de no início ter sido criada para ser um agente antineoplásico é a miltefosina, (SUNYOTO et al., 2018). Esse medicamento é administrado por via oral, aplicado para tratar a forma mais grave desta enfermidade na Índia. Em contrapartida, o Brasil utiliza o mesmo, para tratar a forma mais comum e menos grave da doença em em âmbito veterinário (BRASIL, 2018; BRASIL, 2020; SUNYOTO et al., 2018).

É incitado a associação da miltefosina em sinergia com outros medicamentos, a fim de potencializar seus efeitos farmacológicos. O uso concomitante, com pentamidina por via intralesional para tratar um paciente infectado por *L. braziliensis*, observou-se uma eficácia terapêutica de aproximadamente 92% na Bolívia (SOTO et al., 2018; SUNYOTO et al., 2018). Apesar disso, seus mecanismos ainda permanecem não elucidados, podendo estar correlacionado a interferência metabólica fosfolipídica, sinais de transdução, equilíbrio do cálcio e produção de RNA, levando ao falecimento celular (ALONSO et al., 2019; SUNYOTO et al., 2018).

Classificada como um antibiótico aminoglicosídico, a paromomicina é obtida a partir de *Streptomyces* e possui espectro de ação elevado contra bactérias gram-negativas e gram-positivas (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2019; DAVIDSON et al., 2009; POKHAREL et al., 2021). Contudo, também é utilizado para o tratamento das leishmanioses em ambas as formas clínicas e apesar de mais eficaz para LT, em alguns países como a Índia é utilizada para o tratamento da LV devido a alta taxa de cura relatada nessa população e seu baixo custo. Sua administração é feita de forma intramuscular e podem ser observado alguns efeitos adversos a exemplo: hepatotoxicidade, ototoxicidade os nefrotóxicos são raros. O seu mecanismo de ação está relacionado diretamente a inibição da síntese de proteínas, pois, as unidades

ribossômicas do parasito são afetadas por este fármaco (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2019; DAVIDSON et al., 2009; POKHAREL et al., 2021).

A sitamaquina surge como uma proposta promissora para o tratamento da LV, podendo ser administrada por via oral. Classificada como uma droga da classe 8-aminoquinolina, possui meia vida baixa, esse fármaco está em fase clínica de testes avançados (LOUISEAU et al., 2011; WASUNNA et al., 2005). Porém, ainda são necessários maiores estudos para compreensão do seu real mecanismo de ação e eficácia contra os parasitos do gênero *Leishmania*. Um estudo realizado em promastigotas de *L. chagasi* demonstra que o possível alvo desse fármaco é a enzima Succinato desidrogenase, devido ao estresse oxidativo observado nas células do parasito (CARVALHO et al., 2011; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

O Ministério da Saúde recomenda o uso desses fármacos que apresentam inconsistência em sua eficácia, bem como custo elevado para tratar essa patologia, o que termina limitando a aquisição desses medicamentos na maioria dos casos para os usuários em tratamento. Mesmo com o advento tecnológico, e o conhecimento acerca das leishmanioses ter avançado significativamente. A mesma, ainda é um dos maiores problemas de saúde pública global, o que reforça a importância das pesquisas na busca por novas estratégias e formulações medicamentosas, visando conter esta enfermidade que continua em franca disseminação geográfica de forma alarmante, principalmente em áreas antes não afetadas (BERBERT et al., 2018).

2.2.1 Potencial biotecnológico do continente antártico

A Antártica apresenta um elevado potencial para biotecnologia, seus biomas, microambientes e, acima de tudo, suas particularidades climáticas, limitam os diversos nichos ecológicos residentes nesse ambiente (SILVA et al., 2021). Uma alta biodiversidade a ser explorada, seja nos solos, mares, vegetação e nas próprias geleiras, fontes naturais para a exploração de compostos bioquimicamente ativos, em especial, aqueles desenvolvidos para proteção contra as baixas temperaturas, que em sua maioria exibem pigmentação (ATALAH et al., 2020; DIESER et al., 2010; SILVA et al., 2021). As constantes e variadas adversidades ambientais do continente gelado, culminam em grandes obstáculos para todas as formas de vida perdurarem, necessitam adaptar-se metabolicamente e fisiologicamente para enfrentar essas

condições extremas constantemente impostas (DIESER., et al.,2010; MARTORELL et al., 2017; SILVA et al., 2021).

A bioprospecção de microrganismos extremofílos tornou-se uma crescente por diversos grupos de pesquisa, visando à exploração de seus metabólitos pigmentados para a utilização dentro da biotecnologia, uma vez que esses organismos residem em ambientes extremos e são oriundos de fontes naturais, gerando grande expectativa para a indústria em virtude de suas moléculas bioativas (CARRASCO et al., 2012; RUISI et al., 2007; SILVA et al., 2021). Existem relatos de grupos de pesquisa trabalhando na identificação de bioprodutos oriundos de organismos antárticos avaliando seu potencial antiparasitário, focados principalmente em doença de chagas e leishmaniose (CLEMENTINO et al.,2020; RANGEL et al., 2019; SANTIAGO et al., 2012). Entretanto, ao que tudo indica, fungos e algas são os seres vivos mais explorados e a atividade com metabólitos bacterianos das regiões polares para essa temática ainda é pouco explorada ou inexistente (VARRELLA et al.,2021).

Diante o exposto, as regiões polares, isoladas geograficamente, com características ambientais bastante singulares quando comparadas a outras áreas do globo, demonstram ser um local propício a investigação de substâncias bioativas e um vasto acervo biológico ainda a ser investigado (DANILOVICH et al., 2018; SILVA et al., 2021). Uma vez que esse continente exerce influência ambiental em todo o globo terrestre, isso se deve ao fato de mudanças no próprio continente alteram outras regiões de forma imprevisível, fica evidente a importância da preservação dos seus biomas (RIETBROEK et al., 2016; SINGH; POLVANI, 2020).

A ilha Rei George, situada geograficamente a noroeste da região peninsular Antártica, quando relacionada com a presença de humanos em exercício de suas atividades nesse continente, é conhecida por ser uma das mais frequentadas. Datada a primeira investigação no ano de 1908 pela segunda Expedição Antártica Francesa no local (SICIŃSKI et al., 2011). O Brasil estabeleceu sua base em 1984, comandada por Ferraz, considerada uma estação mediana, podendo acomodar até 50 indivíduos no verão (IAATO., 2022; NAKAYAMA et al., 2011).

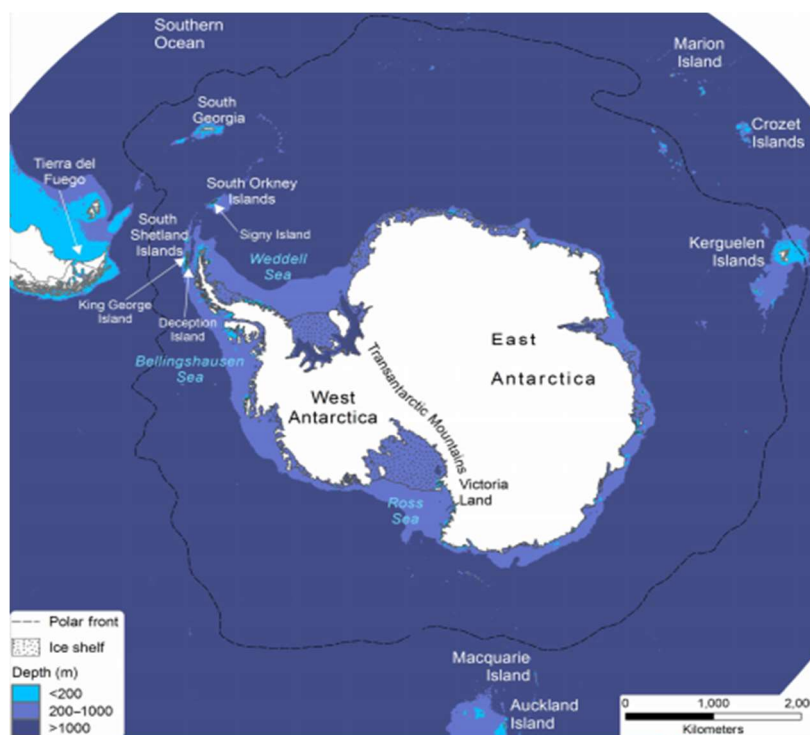
Na vasta diversidade de biomas distribuídos na Antártica, as comunidades microbianas são dominantes, estes por sua vez, apresentam uma alta versatilidade metabólica com infinitas possibilidades a serem aplicadas na biotecnologia, em virtude de suas características adaptativas únicas desenvolvidas (SILVA., et al 2021),

garantindo sua sobrevivência nos ambientes mais desafiadores e remotos do planeta terra (SILVA, T.R., et al 2018).

2.2.2 Caracterização do ambiente antártico

O continente Antártico é conhecido por ser um dos locais mais remotos e desafiadores do planeta para a sobrevivência de qualquer forma de vida, devido a fatores ambientais extremos e sua localização no globo terrestre. Apresentando uma extensa área coberta por gelo em torno de 13,8 milhões km² que representa mais de 95% de uma totalidade de 14 milhões de km². As camadas de gelo do continente abrigam o maior reservatório de água doce do planeta (KITA., et al 2022; SMITH, 2020). Sua posição geográfica está situada no polo sul, contornado pelo Oceano Antártico, que sofre influência tanto pelo Oceano Pacífico quanto o Atlântico, sendo dividido geograficamente em Antártica Oriental e Ocidental (HERZFELD, 2004) (Figura 10).

Figura 10- Mapa do continente Antártico.



Fonte: Adaptado de CONVEY; PECK (2019).

Dentre os fatores ambientais adversos e frequentes no continente, predominam as temperaturas negativas, escassez de água em sua forma líquida, nutrientes, níveis elevados de luz ultravioleta (UV), bem como, eventos sucessivos de congelamento e degelo (SELBY, 1987; SILVA et al., 2021). Porém, os eventos climáticos no continente apresentam-se de forma distinta em várias de suas regiões; por mais que uma extensa faixa do continente esteja recoberta por calotas polares de gelo, as áreas terrestres descobertas compreendem ínfimos 0,4% da área como um todo, subdivididas especialmente nas margens costeiras descontinuamente (CARY et al., 2010).

Intervenções antrópicas exercem influência negativa em decorrência de suas ações no continente gelado, o que culminou em 1959 a criação do Tratado Antártico (TA), sendo este, um documento de discussão primordial na busca por medidas resolutivas, ressaltando a importância em proteger esses habitats, restringindo e limitando a exploração humana estabelecendo medidas normativas (ORHEIM et al., 2011; IAATO, 2022). Inicialmente, 12 países assinaram este termo, regulamentando a exploração antrópica (política, econômica e fins científicos) nestas áreas, reconhecendo a importância e vulnerabilidade de seus ecossistemas, visando conter os agravos desta exploração em decorrência da presença humana nas regiões do continente (ARONSON et al., 2011; IAATO, 2022). Em 1975, o Brasil passou a integrar o TA, e no ano de 2008 o número de nações aderentes ao documento aumentou exponencialmente (IAATO, 2022).

2.2.3 Diversidade bacteriana do continente antártico

Os ecossistemas nas regiões polares apresentam-se de forma bastante diversificada, por mais paradoxal que possa ser. Suas áreas costeiras nos períodos de verão podem atingir temperaturas acima de 5 graus, a água com boa disponibilidade é encontrada, o que não ocorre nas áreas mais centralizadas, onde as temperaturas são mantidas abaixo de -10 °C durante todo ano, a água em seu estado líquido é escassa (DUCKLOW et al., 2013). A constante pressão ambiental permite que as formas de vida encontradas nessas regiões se adaptem e consequentemente sobrevivam.

Como constatado em outras regiões do planeta, a massa predominante de seres vivos consiste em bactérias e fungos, encontrados de forma bastante

diversificada no continente Antártico, sendo os psicrófilos aqueles bem adaptados a estes ambientes (GODINHO et al., 2015; PURVES et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2013). Psicrófilo é uma designação atribuída a qualquer organismo biológico capaz de desenvolver-se em temperaturas entre 0 e 20 °C, estabelecido no ano de 1902 por Schmidt-Nielsen (MORITA, 1975; PESCIAROLI et al., 2011). Foster é o pioneiro em pesquisas com organismos bacterianos no ano de 1887, ao realizar estudos observacionais de ações simbióticas entre bactérias e peixes em temperatura próximas a 0 °C (HOYOUX et al., 2004).

Os parâmetros filogenéticos dos microrganismos bacterianos são estabelecidos nos elementos genéticos codificantes de RNA ribossômico das subunidades menores (SSU – *Small Subunit*), estabelecidas na década 1970 por Carl Woese (WOESE; FOX, 1977). O gene rRNA 16S representam as subunidades dos procariotos, enquanto a rRNA 18S corresponde a dos eucariotos. Esses marcadores moleculares específicos e universais e de tamanhos distintos, são distribuídos ao longo dos processos evolutivos e se mantem conservados em todas as formas de vida (WOESE, 1987; WOESE et al., 1990; YILMAZ et al., 2014; PARKS et al., 2018).

É sabido que as populações de bactérias oriundas das regiões polares, apresentam-se abundantemente no filo Actinobactéria, legitimado como produtores de biomoléculas ativas, e que as áreas rizosféricas exercem grande ação biológica para selecionar e diversificar esses micróbios metabolicamente funcionais (MENDES et al., 2013; MALARD; PEACE, 2018; DASTOGEER et al., 2020).

Nas regiões polares a taxonomia dessas populações microbianas, tende a ser diversificada por conta dos habitats. Flavobacteriia dos gêneros *Polaribacter*, *Psychrobacter*, *Psychroflexus* e *Flavobacterium*, são os grupos dominantes nas áreas de geleiras provenientes de águas marítimas do continente, e dos gêneros *Polaribacter*, *Psychrobacter*, *Psychroflexus* e *Flavobacterium* estão presentes também, porém, substancialmente em menor número (COWIE et al., 2014; LAKATOS et al., 2004).

Devido a sua alta capacidade adaptativa, organismos denominados simbióticos, composto por algas, cianobactérias e fungos, estão amplamente distribuídos nos habitats da terra, sejam regiões tropicais ou até mesmo nas regiões polares. Contudo, a associação de líquens com outros organismos, incluindo

bactérias, já é relatada. (BATES et al., 2011; GRUBE; BERG, 2009; LAKATOS et al., 2004).

Os líquens são capazes de biossintetizar vários compostos químicos, desde antraquinonas, naftoquinonas, compostos fenólicos, dentre outros, sua produção metabólica é bastante diversificada. Esses organismos apresentam metabólitos secundários distintos em sua maioria daqueles produzidos por plantas, e quimicamente mais complexos; Efeitos anti-inflamatório, antiproliferativo, antiviral, antimicrobiano e antibacteriano, são algumas das várias outras atividades biológicas que os líquens apresentam (MOLNÁR; FARKAS, 2010; ZANG et al., 2020).

Líquens geralmente consistem na associação entre fungos e algas (algas verdes ou cianobactérias), graças aos avanços das pesquisas, outros organismos já são identificados (SPRIBILLE et al., 2016; WILKINSON et al. 2015) microrganismos bacterianos (ASCHENBRENNER et al. 2016) observados harmonicamente em talos líquênicos (ASPLUND; WARDLE 2017). A grande maioria dos ecossistemas do continente é predominantemente formado por musgos e líquens (INOUE 1995; RAI et al. 2011).

Nos habitats antárticos os filos das comunidades fúngicas predominantes são: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Glomeromycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota* (DE MENEZES et al., 2017; RUISI et al., 2007). Um total de aproximadamente mil espécies de fungos não liquenizados são encontrados nas regiões da Antártida (DE MENEZES et al., 2017; RUISI et al., 2007).

2.2.4 Aplicabilidade e potencial biotecnológico de organismos bacterianos no desenvolvimento de novos fármacos

Uma infinidade de pesquisas por diversos autores já relatou o uso de microrganismos na biotecnologia em diversas áreas, porém, seu uso na indústria farmacêutica é um destaque (DA CUNHA et al., 2021; DANILOVICH, 2018 ; NOBRE, 2013). Microrganismos extremófilos, têm expressado características bastante singulares, que por sua vez, podem ser empregadas em diversas áreas biotecnologicamente falando (BHADURY et al., 2006). Nesse contexto, o ambiente antártico mostra-se promissor para a aplicabilidade das ferramentas da biotecnologia

em bactérias que vivem em condições extremas do planeta (ACUÑA-RODRÍGUES et al., 2019; SILVA et al., 2018).

Biologicamente, a utilidade de microrganismos oriundos de ambientes hostis, principalmente os de baixas temperaturas vem tornando-se amplamente estudados. Nesse âmbito, a capacidade enzimática adaptativa nesses habitats gelados, são tradicionalmente caracterizados por sua elevada atividade biológica, onde os microrganismos constantemente submetidos a pressão seletiva ambiental, principalmente a temperaturas negativas são responsáveis em produzir essas biomoléculas ativas. Tais particularidades enzimáticas as tornam de suma importância para a exploração em diversos processos biotecnológicos mais eficazes e de menor custo (BARROCA et al., 2017).

Em bactérias da Antártica é observada a síntese de proteínas recombinantes, o que reforça o elevado potencial desses organismos bacterianos adaptados ao frio e produtores de biomoléculas ativas (RICCIARDELLI et al. 2019). Outra utilidade a partir de microrganismos antárticos em processos biotecnológicos está fortemente relacionada a criação de novos antimicrobianos. Deixando claro que, estes organismos psicrófilos constituem uma matriz de biomoléculas com infinitas aplicações ainda pouco exploradas (DA CUNHA et al., 2021; DANILOVICH, 2018; SILVA et al. 2018). Já foi relatada atividade antiparasitária por metabolitos produzidos por bactérias antárticas (SILVA et al. 2018).

Os agentes biofarmacológicos são aqueles em que os próprios organismos vivos são responsáveis pela síntese ou extração da matéria prima necessária para fabricação de medicamentos, onde seus princípios ativos têm como fonte seres vivos, na maioria das ocasiões microrganismos. Procedimentos biotecnológicos são realizados ou modificações gênicas muitas vezes são necessárias para obtenção dos produtos naturais e sua síntese geralmente ocorre *in vivo* (DA CUNHA et al., 2021; PERKINS et al., 2016).

Segundo a *world health organization* estão categorizadas como doenças tropicais negligenciadas (DTN)s aquelas que estão intimamente relacionadas as populações mais vulneráveis do globo, configurando um problema socioeconômico de grande magnitude, onde todos os principais continentes são afetados. Pouco mais de 18 enfermidades constituem essas DTNs, distribuídas em grupos que variam entre infecções helmínticas, bacterianas e virais, onde as leishmanioses estão inseridas

nesse contexto (WHO, 2016). Ainda somadas a fatores que agravam ainda mais esse cenário, seja pela farmacoterapia limitada e baixa efetividade dos mesmos no tratamento destas doenças, efeitos indesejáveis frequentes e ainda o aparecimento de cepas resistentes (GUIDO et al., 2008; GUIDO et al., 2010). A negligência da indústria farmacêutica tornasse evidente por sua falta de interesse em investimentos para inovação nos programas de pesquisa e desenvolvimento (P&D), destinados a pesquisa de busca em novas alternativas terapêuticas resolutivas para DTNs, impulsionando as mesmas no ranking das patologias ditas como caso de saúde pública (ALVAR et al., 2012; DNDI, 2022).

Estudos com enfoque em P&D para obtenção de fármacos com finalidade para as DNTs entre 1975 e 1999, apontaram que apenas 13 destes foram regulamentados, o que infimamente tem uma representatividade em torno de 0,9% das drogas deferidas naquele período, reforçando o desleixo das indústrias farmacêuticas (PECOUL, 1999). A partir de 2003 esta realidade passou a ter uma mudança positiva para o cenário das DNTs em especial, as leishmanioses ganharam foco, principalmente no exterior, pois foi criado o (DNDi), voltado para busca medicamentosa focada em P&D, suas carências e especificidades contemplando um fundo de negócios (DNDi, 2022).

A crescente busca por novos agentes farmacológicos envolve fatores de alta complexidade, bem como recursos de alto valor agregados e encontram-se intrinsecamente ligados as inovações e as tecnologias atualmente disponíveis (DNDI, 2022; GUIDO et al., 2008). As DTNs representam as causas marcadas pelos contextos sociais e econômicos, retratando o reflexo das populações mais humildes e desfavorecidas no globo terrestre (DNDI, 2022; WHO, 2020). Tais fatores contribuem significativamente para que as leishmanioses se mantenham como negligenciadas ao redor do planeta. Novas alternativas têm sido amplamente exploradas por pesquisadores nas mais diversas áreas, visando conter esta enfermidade. Dada a crescente busca por moléculas bioativas na biotecnologia para o desenvolvimento de novas terapias, bem como, à investigação de biomoléculas com potencial leishmanicida. Mostrando-se uma alternativa promissora para compor uma nova farmacoterapia mais eficiente e segura aos acometidos por esta patologia.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a atividade de candidatos a protótipos de fármacos leishmanicidas a base de extratos bacterianos isolados de líquens da Antártica, que constituam opções terapêuticas mais seguras ao tratamento da leishmaniose.

3.2 Objetivos específicos

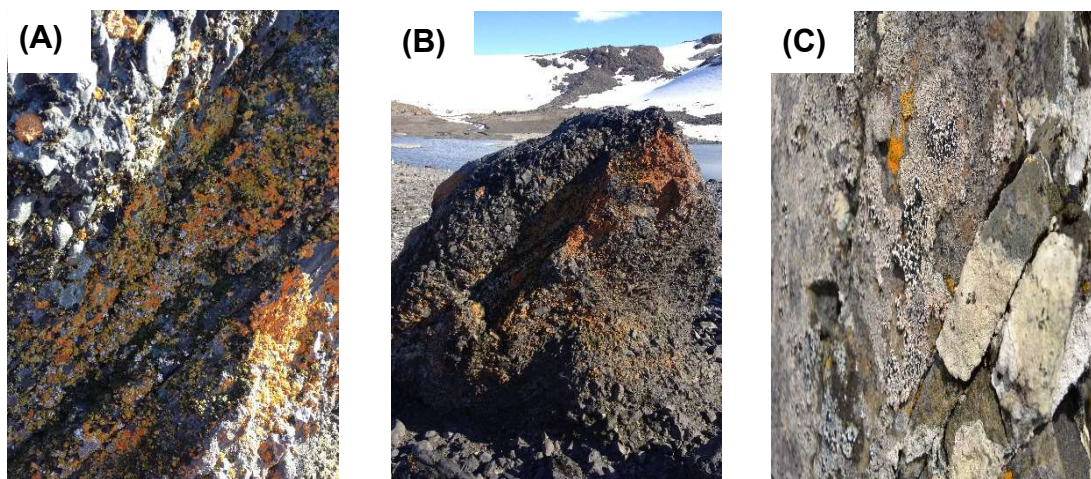
- Produzir extratos metanólicos de bactérias isoladas de líquens Antárticos;
- Determinar a citotoxicidade dos produtos naturais para a célula hospedeira (macrófagos);
- Avaliar o efeito dos extratos metanólicos bacterianos sobre formas promastigotas de *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis in vitro*;
- Identificar a seletividade dos produtos naturais para diferentes espécies do gênero *Leishmania*;
- Selecionar e submeter os extratos metanólicos bacterianos ativos contra *Leishmania* a espectrofotometria de varredura.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos produtos naturais oriundos de líquens antárticos

As bactérias Antárticas foram cedidas pelo Prof. Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte (Figura 11) (Campus Arapiraca/UFAL), participante do projeto MyconAntar: Diversidade e Bioprospecção de Fungos da Antártica. Os microrganismos testados no presente estudo foram isolados de líquens e coletados no Continente Antártico em duas Expedições ao polo Sul pela Equipe Brasileira de Pesquisa (OPERANTAR XXXIV e XXXV, verões de 2015/2016 e 2016/2017, respectivamente).

Figura 11- Líquens da ilha Deception onde foram extraídas as bactérias antárticas. A e B); *Polycauliona candelaria* C) *Lecania brialmontii*.



Fonte: Duarte (2017).

4.1.1 Reativação das amostras e produção das biomassas bacterianas

As bactérias estavam armazenadas em freezer -80°C , foram localizadas e separadas para serem reativadas. Foi preparado o meio de cultura ágar nutriente: glicose, extrato de carne. O meio foi preparado em Erlenmeyer estéril, depois os mesmos foram fechados e autoclavados por 15 minutos, para garantir que não houvesse contaminação por conta de microrganismos invasores. Após a retirada da autoclave, o meio vertido em placas de vidro, 80mL aproximadamente do meio era colocado em cada placa, após sua solidificação, as amostras que estavam fora do -

80°C, foram estriadas em suas respectivas placas. Cada uma delas identificadas com o código correspondente dos isolados a serem reativados. Feito isso, as mesmas foram armazenadas na incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) por 7 dias a 15°C para aguardar o crescimento.

Após 7 dias de incubação, as placas foram retiradas para verificação do crescimento bacteriano e confirmação da pureza das colônias. Após a confirmação de crescimento bacteriano e pureza delas, as placas foram levadas a câmara de biossegurança para serem abertas e passarem pelo processo de padronização do inóculo no espectrofotômetro. Tubos do tipo Falcon de 15mL estéreis contendo solução salina a 0,85% foram usados para colocar uma pequena quantidade das culturas acrescidas no meio. Assim, com uma alça metálica, uma pequena porção era colocada junto com a solução salina, homogenizada até solubilizar totalmente a amostra. No espectrofotômetro uma porção da amostra homogênea foi colocada para verificar se está no padrão a ser inoculado. O padrão de absorbância ideal para este experimento, a leitura deve variar de 900 a 1000 de absorbância a 600 nm de comprimento de onda. Após essa etapa, acrescentou-se 5mL do inóculo em Erlenmeyer contendo o meio de cultura líquido caldo nutriente e, posteriormente, as culturas foram incubadas na shaker por 7 dias a 15°C sob agitação mecânica.

Havendo o crescimento da biomassa e constatada a não contaminação, as amostras foram centrifugadas até a formação do *pellet* e armazenadas no freezer - 80°C, para aguardar o procedimento de extração. Os tubos Falcon contendo o *pellet* foram cobertos com papel alumínio para evitar ação da luz nas amostras, pois elas são fotossensíveis.

4.1.2 Procedimento de extração

Posteriormente, 10mL de metanol foram adicionados aos Falcons contendo as biomassas bacterianas. Em seguida, eles foram agitados no vórtex, para garantir a homogeneização completa da amostra. Depois as amostras foram submetidas a três ciclos em banho de ultrassom, cada ciclo com duração de 30 minutos, para potencializar a extração. Após a finalização dos ciclos de ultrassom, os Falcons foram centrifugados a 3.500 rpm e 4°C por 10 min. Esta etapa foi realizada por várias vezes até a formação do *pellet* descorado, o que sinalizava que a extração estava completa.

Posteriormente, as soluções extrativas metanólicas bacterianas foram transferidas a garrafas de vidro de 10 mL e secas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, com o auxílio de um dessecador acoplado à bomba de vácuo, obtendo-se assim os extratos metanólicos bacterianos.

4.2 Ensaios farmacológicos

4.2.1 Manutenção da linhagem macrófagos

Macrófagos da linhagem J774.A1 mantidos em garrafas de cultura em 5 ml de meio RPMI com soro. No momento do uso, as células foram contadas, ajustadas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB na concentração de 1×10^5 células/mL e 100 μ L dessa suspensão distribuída em placa de 96 poços (Nunc, Denmark).

4.2.2 Determinação da viabilidade celular

Macrófagos da linhagem J774.A1 foram cultivados em triplicatas em placas de 96 poços, na concentração de 1×10^5 células/poço e incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 1 hora, para adesão dos macrófagos ao plástico. Em seguida, os poços foram lavados para remoção das células não aderentes e posteriormente acrescentadas as diferentes concentrações das substâncias a serem testadas. Os poços controles continham células cultivadas somente com meio de cultura e 10% de SFB (Roche) ou células cultivadas na presença do diluente das substâncias (DMSO, Sigma). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de redução de MTT (MOSMANN et al., 1993). A viabilidade celular das culturas tratadas com as substâncias foi comparada ao padrão de morte obtido nas culturas controle.

4.2.3 Cultura de parasitos

Culturas de promastigotas de *L.chagasi* (MCAN/BR/89/BA262) foram cedidas pela Dra. Valéria de Matos Borges do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – Fiocruz-BA e de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) foram cedidas por o Dr.

Eduardo Caio Torres dos Santos do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz - RJ. As formas promastigotas do parasito foram mantidas *in vitro* em meio Schneider's, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 2% urina humana masculina a 27°C em BOD. No momento do uso, os parasitos foram colocados em tubos tipo Falcon e centrifugados a 3500 rpm durante 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspensão em meio Schneider's. Fez-se, então, a contagem dos parasitos em câmara de Neubauer, para posterior plaqueamento e realização dos experimentos.

4.2.4 Ensaio de viabilidade de promastigotas

Promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* foram cultivadas numa concentração de 1×10^5 parasitos/poço e volume de 100 µL/poço em placa de 96 poços com meio Schneider suplementado com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina e 2% de urina humana. Foram adicionadas em triplicatas diferentes concentrações (100, 30, 10, 3, 1 e 0,3 µg/ml) dos sete extratos metanólicos bem como os controle positivo, anfotericina B, Sigma (fármaco padrão) aos poços contendo as formas promastigotas até a obtenção do volume final de 200 µL. A placa foi incubada em estufa BOD a 27°C por 48 horas. Após esse período, os parasitos de *L. amazonensis* e *L. chagasi* foram homogeneizados e o número de parasitos foi determinado utilizando câmara de Neubauer e microscopia óptica em aumento de 400x (Nikon Eclipse Ci) (TIUMAN et al., 2005).

4.3 Espectrofotometria de varredura

Amostras de 100 microlitros de cada solução estoque dos extratos metanólicos de 5AUVB13 e 6AUVB13 foram colocadas em placas de 96 poços e submetidas à varredura por espectrofotometria óptica, sendo realizada a leitura da absorbância de ultravioleta na faixa de 200 nm a 1000 nm em leitora de microplaca, para avaliar as características do espectro correspondente aos constituintes que compõem os extratos.

4.4 Análise estatística

A tabulação de dados foi realizada com o auxílio do software estatístico GraphPad Prism. Os níveis de significância entre os grupos experimentais e o controle, considerados significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Produção dos extratos metanólicos

Inicialmente foi realizada a produção da biomassa bacteriana oriundas de líquens antárticos. Os organismos bacterianos foram reativados em laboratório, inicialmente em meio sólido para verificar e garantir a pureza dos isolados e posteriormente em meio líquido. Após incubação em estufa por 7 dias sob agitação magnética. A biomassa dos microrganismos produtores de metabólitos pigmentados foi obtida. Na etapa final foi realizada a extração dos metabólitos por centrifugação e finalmente a secagem foi realizada com auxílio de um dessecador e uma bomba de sucção. Os produtos naturais obtidos estão representados no quadro 1.

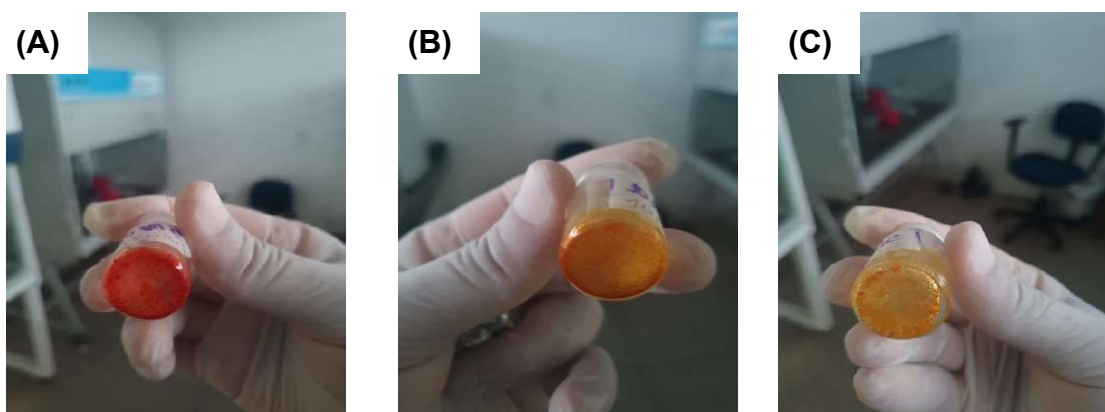
Quadro 1- Caracterização das amostras de bactérias utilizadas para produção dos extratos metanólicos com código da bactéria, identificação e local de coleta dos líquens, solvente e coloração dos extratos.

Código da amostra	Identificação do líquen	Local de coleta	Solvente	Pigmento /coloração
8 LB 19	<i>Lecania brialmonti</i>	Ilha Dee 62°25.461'S 059°46.117'W	Metanol	Amarelo
5 LB 35	<i>Usnea aurantiacoater</i>	Refúgio 2 – Ilha Rei George 62°04'34"S 58°25'15"W	Metanol	Amarelo

23 LB 3	<i>Usnea aurantiacoater</i>	Refúgio Ipanema Ilha Rei George 62°05.342"S 058°24'.632"W	Metanol	Amarelo
7 LB 4	<i>Polyscauliona candelaria</i>	Península Antártica 60°24.234"S 057°00.059"W	Metanol	Amarelo
10 AUV B14	Não identificado	Ilha Rei George Sem dados de GPS	Metanol	Amarelo
5 AUV B13	Não identificado	Ilha Cecília 62°24.616"S 058°44.024"W	Metanol	Vermelho
6 AUV B13	Não identificado	Ilha Cecília 62,24.616S 058°44,024W	Metanol	Vermelho

Um total de 7 extratos foram obtidos, apresentando pigmentação e espécie de líquens variados, onde os em tonalidade de amarelo $n=5$ foram majoritários comparado aos de tonalidade avermelhada $n=2$. Dois solventes inicialmente foram utilizados para realizar a extração, etanol e metanol, contudo este último foi o único que se mostrou efetivo durante a etapa de extração. O aspecto dos extratos metanólicos após a secagem figura 13.

Figura 12- Característica dos extratos metanólicos de bactérias isoladas de líquens da Antártica após o processo de secagem e seus respectivos códigos. A) 5AUVB13, B) 10AUVB14 e C) 7LB4.



Fonte: Próprio autor (2022).

5.2 Efeito citotóxico para a célula hospedeira

Posteriormente, foi investigada a citotoxicidade dos extratos metanólicos bacterianos em macrófagos da linhagem J774.A1. O fármaco padrão a anfotericina B exibiu um efeito citotóxico máximo de $90,0 \pm 1,1\%$ e concentração inibitória celular (CI_{50}) de 17,9 (6,0 – 8,3). Dentre os produtos naturais testados, apenas 5AUVB13 apresentou citotoxicidade para a célula hospedeira, com um efeito citotóxico máximo de $38,2 \pm 3,7\%$. A CI_{50} de 5AUVB13 não pode ser calculada em virtude do efeito citotóxico não ultrapassar 50% até a máxima concentração testada (100 $\mu\text{g/ml}$). Para os demais extratos metanólicos bacterianos testados, 6AUVB13, 7LB4, 23LB3, 10AUVB14, 5LB35 e 8LB19 não foram observados efeitos deletérios aos macrófagos. Assim, não foi possível calcular a CI_{50} ($>100 \mu\text{g/ml}$) para todos os extratos testados. Não foi observado efeito citotóxico significativo nas células tratadas apenas com o veículo usado para solubilizar as soluções extrativas (DMSO 0,2%) quando comparada àquelas tratadas apenas com meio de cultura, utilizado como controle negativo. como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1 - Efeito dos extratos metanólicos bacterianos de líquens da Antártica e o fármaco controle anfotericina B (100, 30, 10, 3, 1 e 0,3 $\mu\text{g/mL}$) sobre a viabilidade de macrófagos da linhagem J774.A1 (ensaio de MTT).

Substância	CI_{50} (IC 95%) ^a	Efeito máximo ($\pm$ E.P.M) ^b
Anfotericina B	17,9 $\mu\text{g/mL}$ (6,0 – 8,3)	$90,0 \pm 1,1\%^{**}$
5AUVB13	> 100	$38,2 \pm 3,7\%^{*}$
6AUVB13	> 100	NA
7LB4	> 100	NA
23LB3	> 100	NA
10AUVB14	> 100	NA
5LB35	> 100	NA

8LB19

> 100

NA

^a Concentração inibitória 50%, calculada a partir da curva dose-resposta, µg/ml; os valores entre parênteses correspondem ao Intervalo de Confiança 95% (IC 95%). ^b Média ± erro padrão da média do efeito máximo sobre a viabilidade de J774.A1, em triplicata. Diferenças com *p < 0,05, **p < 0,01, foram consideradas significativas em relação ao grupo DMSO 0.2%. NA: não ativos na faixa de concentração máxima testada.

É importante ressaltar que, a temática de estudo desenvolvida nessa pesquisa dissertativa é pioneira em investigar o potencial leishmanicida de produtos naturais de bactérias oriundas de líquens antárticos. Até o presente momento, não foram encontrados na literatura trabalhos científicos abordando o presente tema. Existem trabalhos avaliando atividade leishmanicida, porém com outros organismos biológicos encontrados na Antártica, como algas e fungos, o que reforça o ineditismo desta pesquisa científica.

Com relação à célula hospedeira, todos os produtos naturais apresentam o perfil esperado, no quesito citotoxicidade, para um protótipo de fármaco, uma vez que, a CI₅₀ observada foi (>100 µg/ml), mostrando-se promissores e comprovando que não foram constatados efeitos deletérios nos macrófagos.

5.3 Efeito leishmanicida dos extratos bacterianos contra formas promastigotas.

Para averiguar a provável atividade leishmanicida, o efeito máximo e a potência por meio da CI₅₀ dos extratos metanólicos e da anfotericina B contra formas promastigotas de *L. chagasi* e *L. amazonensis*. Os resultados obtidos nas culturas de *L. chagasi* evidenciaram efeito leishmanicida para o fármaco padrão anfotericina B, onde o efeito citotóxico observado foi de 100% com CI₅₀ de 0,02 (0,01-0,04). Dentre os 7 extratos avaliados, 7LB4, 23LB3, 10AUVB14, 5LB35 e 8LB19 não exibiram atividade leishmanicida nas concentrações testadas. 5AUVB13 e 6AUVB13 demonstraram atividade superior a 50% com os efeitos máximos de 97,93 ± 1,88% e 96,10 ± 0,01%, além de apresentar CI₅₀ de 18,31 µg/mL (11,22 – 30,47) e 22,05 µg/mL (13,51 - 30,59), respectivamente (tabela 2).

Tabela 2 - Efeito leishmanicida dos extratos metanólicos bacterianos antárticos (5LB19, 8LB19, 10AUVB14, 7LB4, 5AUVB13, 6AUVB13, 23LB3 µg/mL) contra formas promastigotas de *L. chagasi*.

Tratamento	CI ₅₀ (IC 95%) ^a	Efeito Máximo ± E.P.M ^b
Anfotericina B	0,02 µg/mL (0,01-0,04)	100 ± 0,00%***
5AUVB13	18,31 µg/mL (11,22 – 30,47)	97,93 ± 1,88%****
6AUVB13	22,05 µg/mL (13,51 - 30,59)	96,10 ± 0,01%***
7LB4	>100	NA
23LB3	>100	NA
10AUVB14	>100	NA
5LB35	>100	NA
8LB19	>100	NA

^a Concentração inibitória 50%, calculada a partir da curva dose-resposta, µg/mL; os valores entre parênteses correspondem ao Intervalo de Confiança 95% (IC 95%). ^b Média ± erro padrão da média do efeito máximo sobre a viabilidade de *L. chagasi*, em triplicata. Diferenças com ***p < 0.001, ****p < 0.0001 foram consideradas significativas em relação ao grupo DMSO 0.2%. NA: não ativos na faixa de concentração máxima testada.

Foi observada atividade leishmanicida da anfotericina B contra promastigotas de *L. amazonensis*, cujo o efeito máximo foi de 100% e CI₅₀ de 0,13 µg/mL (0,08-0,18). Os extratos metanólicos bacterianos 5AUVB13 e 6AUVB13 demonstraram atividade leishmanicida superior a 50%, com efeitos máximos de 65,63 ± 1,80% e 60,42 ± 1,04%, além de CI₅₀ de 52,72 µg/mL (37,14 - 68,29), 44,63 µg/mL (33,61-55,65), respectivamente. Os demais extratos 7LB4, 23LB3, 10AUVB14, 5LB35 e 8LB19 não exibiram atividade leishmanicida nas concentrações testadas, conforme demonstra a tabela 3. O veículo usado para solubilizar as soluções extrativas (DMSO 0,2%) e tratar as culturas de parasitos não exibem efeitos significativos quando comparadas com as culturas tratadas somente em meio de cultura (controle negativo). Desse modo, atividade observada não pode ser atribuída a presença do DMSO nas culturas.

Tabela 3 - Efeito leishmanicida dos extratos metanólicos bacterianos antárticos (5LB19, 8LB19, 10AUVB14, 7LB4, 5AUVB13, 6AUVB13, 23LB3 $\mu\text{g/ml}$) contra formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Tratamento	CI ₅₀ (IC 95%) ^a	Efeito Máximo $\pm$ E.P.M ^b
Anfotericina B	0,13 $\mu\text{g/mL}$ (0,08-0,18)	100 $\pm$ 00% ***
5AUVB13	52,72 $\mu\text{g/mL}$ (37,14 - 68,29)	65,63 $\pm$ 1,80% ***
6AUVB13	44,63 $\mu\text{g/mL}$ (33,61- 55,65)	60,42 $\pm$ 1,04% ***
7LB4	>100	NA
23LB3	>100	NA
10AUVB14	>100	NA
5LB35	>100	NA
8LB19	>100	NA

^a Concentração inibitória 50%, calculada a partir da curva dose-resposta, $\mu\text{g/ml}$; os valores entre parênteses correspondem ao Intervalo de Confiança 95% (IC 95%). ^b Média $\pm$ erro padrão da média do efeito máximo sobre a viabilidade de *L. amazonensis*, em triplicata. Diferenças com *** $p < 0.001$, foram consideradas significativas em relação ao grupo DMSO 0.2%. NA: não ativos na faixa de concentração máxima testada.

Posteriormente, foi calculado o índice de seletividade (IS) dos extratos metanólicos bacterianos contra promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, que são apresentados na tabela 4. Dessa forma, os extratos 5AUVB13 e 6AUVB13 apresentaram um IS superior a 1,9 e 2,2 para *L. amazonensis*, tendo uma seletividade maior que 5,5 e 4,5 para *L. chagasi*. A anfotericina B foi bastante seletiva com IS de 137,8 e 895,5 contra as promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, respectivamente.

Tabela 4 - Índice de seletividade dos extratos metanólicos bacterianos antárticos (5LB19, 8LB19, 10AUVB14, 7LB4, 5AUVB13, 6AUVB13, 23LB3) para macrófagos J774.A1 x promastigotas de *L. amazonensis* e promastigotas de *L. chagasi*.

Tratamento	¹ IS para <i>L.amazonensis</i>	² IS para <i>L.chagasi</i>
Anfotericina B	137,8	895,5
5AUVB13	>1,9	>5,5
6AUVB13	>2,2	>4,5
7LB4	NA	NA
23LB3	NA	NA
10AUVB14	NA	NA
5LB35	NA	NA
8LB19	NA	NA

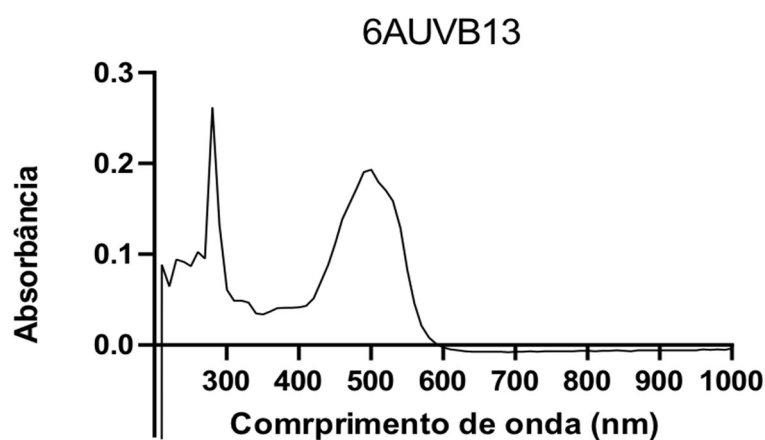
1 Índice de seletividade calculado pela razão entre CC50 (J774.A1) e CI50 (promastigotas de *L. amazonensis*). 2 Índice de seletividade calculado pela razão entre CC50 (J774.A1) e CI50 (promastigotas de *L. chagasi*). NA: não ativos

5.4 Espectrofotometria de varredura dos extratos ativos contra formas promastigotas do parasito.

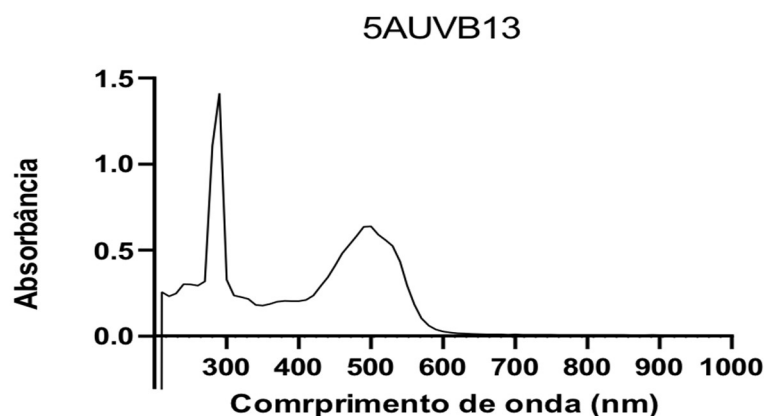
Dentre todos os extratos testados, aqueles que exibiram atividade leishmanicida acima de 50% foram submetidos à técnica de espectrofotometria de varredura, afim de verificar os componentes da mistura. Os extratos se enquadram no perfil citado anteriormente foram 6 AUVB 13 e 5 AUVB 13 (gráfico 1).

Gráfico 1- Espectrofotometria dos extratos metanólicos bacterianos antarticos que foram ativos contra promastigotas de *L. amazonensis* e promastigotas de *L. amazonensis*.

(A)



(B)



Baseado nos gráficos dos espectros, ambos os extratos exibiram valores de absorvância na faixa de 500 nm. Baseado na literatura, o mais provável dos seus constituintes pertencem a classe dos carotenoides (GALANAKIS, 2017; VÍTEK et al., 2015).

6 DISCUSSÃO

Um total de 7 soluções extrativas metanólicas foram obtidas a partir de bactérias recuperadas de líquens da Antártica. Uma pesquisa realizada com microrganismos extremófilos ressaltou a importância da bioprospecção para a biotecnologia, principalmente em virtude desses organismos residirem em áreas

pouco acessíveis e, em sua maioria, inexploradas. A alta versatilidade das biomoléculas produzidas por estes organismos passou a ser alvo de interesse das indústrias farmacêuticas (DA CUNHA et al., 2021; DANILOVICH, 2018). O presente trabalho está enquadrado nessa proposta, pois contribui com informações sobre o potencial de metabólitos bacterianos de líquens antárticos no enfrentamento a uma enfermidade que persiste como um grave problema de saúde pública global.

Uma revisão da literatura realizada por DA CUNHA e colaboradores (2021) entre os períodos de 1999 a 2021, relata que foram incluídos em seu estudo um total de 39 artigos; onde a proposta central era demonstrar a importância da utilização de metabolitos microbianos para combater os parasitos do gênero *Leishmania*. E seu estudo é enfático nessa questão, deixando claro a abertura de precedentes na exploração desses organismos biológicos para compor novas farmacoterapias uteis ao tratamento das leishmanioses. Partindo dessa ideia, o presente estudo dissertativo está enquadrado na proposta, contudo do ponto de vista experimental.

Bactérias antárticas dispõem de mecanismos adaptativos protetores contra os fatores ambientais adversos REIS-MANSUR et al. (2019). SILVA e colaboradores (2019a), em seu estudo, demonstram que um número exponencial de metabólitos pigmentados é produzido por organismos antárticos, estes em sua maioria demonstram resistência à radiação UV. Ainda em outro estudo de SILVA et al. (2019b), é demonstrado que organismos bacterianos da Antártica exibem elevada produção de pigmentos intracelulares com atividade antioxidante. NÚÑEZ-MONTERO; BARRIENTOS (2018) em sua pesquisa associa a grande versatilidade e singularidade dos metabólitos produzidos por bactérias antárticas, deve-se ao rigor das condições ambientais polares extremas do continente antártico, o que culmina a uma adaptação constante por parte desses seres microscópicos. Em seu estudo foi investigada a capacidade antimicrobiana dos produtos naturais produzidos por bactérias antárticas no combate a um outro grande problema de saúde pública, que é a resistência bacteriana, reforçando a ampla aplicabilidade dessas biomoléculas nas mais diversas áreas da biotecnologia bem como a sua viabilidade como fonte a serem exploradas.

Os achados de SILVA e colaboradores 2019b corroboram os dados presentes na pesquisa desenvolvida nessa dissertação no que se refere ao grande potencial de

bactérias Antárticas em produzir pigmentos. Os isolados apresentaram a produção de pigmentos intracelulares em tonalidade amarelo ouro e vermelho.

Uma pesquisa realizada por ZERAIK; YARIWAKE (2008) relata que as colorações em tons de vermelho, laranja e amarelo são típicos de pigmentos que compreendem a classe dos carotenoides. Esses padrões de cores são observados nos extratos obtidos no presente estudo. Na literatura já é reportado que dentre as atividades biológicas exercidas pelos carotenoides, antimicrobiana, antitumoral, antioxidante e antiviral são algumas das mais frequentes associadas a esta classe de substâncias químicas pigmentadas (PEREIRA et al., 2021; YIM et al., 2021; KHAVARI et al., 2021). O que justificaria os achados relatados nessa dissertação, referindo-se à atividade antiparasitária em espécies distintas do gênero *Leishmania*, conforme demonstrado nos resultados. Contudo, este dado só poderá ser validado após a caracterização dos produtos naturais testados nessa pesquisa, referindo-se a presença de carotenoides nos extratos metanólicos aqui avaliados.

Carotenoides podem ser encontrados em microrganismos presentes na natureza a exemplo: bactérias, fungos, leveduras e principalmente em vegetais (SINGH et al., 2015). Classificados como um conjunto de biomoléculas naturais pigmentadas, os carotenoides já possuem mais de 700 representantes descritos na literatura variando em tonalidade amarela, laranja e vermelho, contudo alguns podem apresentar-se de forma incolor, que é o caso do fitoeno e fitoflueno (MESQUITA et al., 2017). Baseando-se nesses aspectos colorimétricos relatados, é mais um forte indício corroborativo que dentre os bioprodutos identificados no presente estudo dissertativo, sejam realmente pertencentes a classe dos carotenoides. Corroborando dados dessa dissertação e dos achados de ZERAIK; YARIWAKE (2008) citados anteriormente.

Um total de oito isoprenos de forma reversa, unidos a átomos de 40 carbonos formam as biomoléculas de carotenos de cadeia longa (KUCZYNSKA et al., 2017). A distribuição de ligações duplas em suas moléculas determina os comprimentos de onda observados e refletidos pelas técnicas espectroscópicas, dessa forma, definindo o constituinte presente na molécula em questão, em virtude da coloração exibida (CHOKSI; JOSHI et al., 2017). Na espectroscopia para visualizar a presença de carotenoides, a absorção máxima é definida em 3 picos diferentes que alternam entre 400 – 510 nm (GALANAKIS, 2017). A extração de carotenoides é realizada por meio da utilização de solventes orgânicos em virtude de suas características hidrofóbicas

(CHEN et al., 2005; GIUFFRIDA et al., 2013). E esse fato é de suma importância, no presente estudo inicialmente para todos os extratos metanólicos bacterianos foram utilizados dois solventes orgânicos, etano e metanol, contudo, este último foi o único eficaz durante o procedimento extrativo. Os dados de espectroscopia também estão de acordo com o observado nesta pesquisa.

Bactérias possuem grande capacidade na produção de carotenoides, contudo, estes são metabólitos secundários e estão intimamente relacionados com fatores adaptativos e protetivos para a célula desses organismos; principalmente contra danos celulares por radiação UV e processos oxidativos (KRINSKY et al., 1978; MILLER et al., 1996). A natureza dos tipos de carotenoides podem ser achados, aqueles que em sua estrutura possuem moléculas de carbono e hidrogênio, denominados carotenos e as xantofilas que estruturalmente são constituídos de átomos de oxigênio e carbono (MESQUITA; TORQUILHO, 2017).

Essas biomoléculas pigmentadas em decorrência de sua provitamina A, auxiliam no combate a doenças cancerígenas e degenerativas e ainda desempenham uma gama de outras atividades biológicas principalmente antioxidante, absorção de radiação UVB, eliminação de radicais livres e afetam espécies reativas de oxigênio (ROS) (CHEN et al., 2017; GRANADO-LORENCIO et al., 2017; MATA-GÓMEZ et al., 2014; PONKA, et al., 2015). O fato de carotenos exibirem atividade contra ROS, seria um dos possíveis indícios a explicar por qual motivo, dois dos extratos produzidos a partir de bactérias de líquens da Antárticas 5AUVB13 e 6AUVB13 do presente estudo dissertativo; foi observada atividade leishmanicida em promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*; já é bem aceito na literatura que a produção de espécies reativas é prejudicial para a sobrevivência dos parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania*. A comprovação dos constituintes presentes nos extratos se de fato há carotenoides, só poderá ser validada por HPLC.

SILVA et al. (2021), reporta atividade biológica em seu estudo por bactérias associadas à líquens. Dois gêneros de líquens reportados em seu trabalho, estão presentes nessa pesquisa dissertativa, sendo eles *Usnea auratiacoatra* e *Xanthoria candelaria*, estes são pertencentes as regiões polares. A hipótese do presente trabalho foi que, dentre os extratos metanólicos pigmentados bacterianos testados, houvessem biomoléculas capazes de inibir a replicação do parasito do gênero *Leishmania*. Os resultados obtidos comprovam que a hipótese estava correta, pois,

os produtos naturais obtidos exibiram atividade leishmanicida contra promastigotas do parasito. A perspectiva final é a caracterização dos constituintes presentes nos extratos metanólicos bacterianos por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), através de uma colaboração de pesquisa com a Profa. Tânia Maria Sarmento da Silva (UFRPE) finalizando a pesquisa e consequentemente submetendo o artigo dos dados experimentais. O possível efeito de citotoxicidade dos extratos metanólicos foi investigado em macrófagos (linhagem J774.A1), células hospedeiras de parasitos do gênero *Leishmania*.

Até o presente momento, não foram encontrados estudos com bactérias isoladas de líquens antárticos para investigar sua possível atividade leishmanicida, o que reforça o pioneirismo e o potencial inovador do presente estudo, contudo, vale deixar claro que, apesar de ínfimas as pesquisas na Antártica, outros organismos encontrados no continente já são reportados com essa finalidade em explorar seus produtos naturais contra *Leishmania* sp. Tendo em vista o pouco acervo literário disponível para discutir os dados do presente estudo desenvolvido nessa dissertação, as algas e fungos do continente polar são majoritárias como objeto de estudo para essa finalidade na busca por biomoléculas com possível atividade leishmanicida. Aqui descrevemos pela primeira vez, o efeito citotóxico dos produtos naturais produzidos por bactérias oriundas de líquens antárticos testados em macrófagos de linhagem J774.A1. Foi observado que nenhum dos extratos metanólicos apresentou citotoxicidade aos macrófagos até a máxima concentração testada de 100 µg/mL, com exceção de 5AUVB13.

SANTIAGO et al. (2012) em seu estudo descreve a capacidade que fungos endofíticos associados às angiospermas antárticas *Deschampsia antarctica* e *Colobanthus quitensis* possuem, em produzir bioprodutos com atividade antitumoral e antiparasitária. Foram extraídos das angiospermas antárticas um total de 564 isolados fúngicos pertencentes à diferentes táxons, onde destes, 25 apresentaram atividade biológica, dentre eles: 19 exibiram atividade leishmanicida e 6 exibiram atividade antitumoral em pelo menos uma linhagem de câncer; o potencial tripanocida também foi avaliado, contudo, nenhum dos extratos testados demonstrou tal atividade. Foram testados apenas extratos brutos, não havendo identificação de seus constituintes; dentre todos os extratos fúngicos testados o que apresentou melhor atividade foi aquele isolado de *Phaeosphaeria herpotrichoides*, testado em formas amastigotas *L.*

amazonensis, onde o efeito máximo observado foi de $85,1 \pm 0,5 \%$ e CI50 de $(0,2 \pm 0,8) \mu\text{g/mL}$, anfotericina B foi usada como controle e seus respectivos valores de efeito máximo de $71 \pm 0,3\%$ a CI50 não foi apresentada em seu estudo. No presente estudo dissertativo, os extratos metanólicos foram testados contra promastigotas de *L. amazonensis*. Os extratos 6AUVB13 e 5AUVB13 exibiram atividade leishmanicida contra as promastigotas da mesma espécie do estudo citado anteriormente.

Um estudo para verificar o potencial leishmanicida de extratos produzidos a partir da alga marrom da Antártica, *Ascoseira mirabilis*, foi realizado por (CLEMENTINO et al., 2020). Foram testadas frações que foram enumeradas de F1 a F7 e o extrato bruto em macrófagos murinos. As frações F3 e F6 exibiram atividade contra o promastigota de *L. amazonensis* com CI50 = $(61,3 \pm 1,9 \mu\text{g/mL})$ e $(73,4 \pm 0,4 \mu\text{g/mL})$, respectivamente. No presente estudo, os extratos 5AUVB13 e 6AUVB13 demonstraram CI50 igual a $52,72 (37,14 - 68,29 \mu\text{g/mL})$ e $44,63 (33,61-55,65 \mu\text{g/mL})$, bem como efeitos máximo de $(65,63 \pm 1,80\%)$ e $(60,42 \pm 1,04\%)$, respectivamente nessa ordem, o que configura esses extratos como equipotentes para esta forma evolutiva e espécie do parasito. O extrato bruto exibiu CI50 igual a $(46,1 \pm 10,4 \mu\text{g/mL})$, comparando-o com os dados da presente pesquisa, dos 7 extratos testados que foram obtidos, não foi possível calcular os valores de CI50 para a célula hospedeira, pois foram superiores a concentração máxima testada de $100 \mu\text{g/mL}$; contudo, o extrato 5AUVB13 testado no presente trabalho exibiu uma moderada toxicidade, onde seu efeito máximo observado foi de $(38,2 \pm 3,7 \%)$, equiparando-se ao extrato bruto da alga marrom. Com relação às frações F3 e F6 que apresentaram $(\text{CI50} > 100 \mu\text{g/mL})$, corroboram os dados dessa dissertação, uma vez que, o perfil de citotoxicidade observado é o mesmo, os extratos 23LB3, 6AUVB13, 8LB19, 5LB35, 10AUVB14, 5AUVB13, 7LB4 demonstraram $(\text{CI50} > 100 \mu\text{g/mL})$, vale ressaltar que os macrófagos utilizados no presente estudo pertencem a linhagem J774.A1.

RANGEL et al. (2019), em seu estudo com a alga vermelha *Iridaea cordata*, também verificou a atividade biológica contra formas promastigotas de *L. amazonensis*, onde 2 frações foram ativas, sendo elas IC-FE e IC-FF as respectivas CI50 observadas foram $(17,4 \pm 0,2 \mu\text{g/mL})$ e $(24,3 \pm 2,9 \mu\text{g/mL})$ respectivamente, quando comparadas com os extratos 5AUVB13 e 6AUVB13 dessa dissertação, seus valores já foram descritos anteriormente em relação a CI50, também são equipotentes entre si. Em outro estudo, com a alga *Desmarestia antarctica* de COLEPICOLO et al.

(2020), também em promastigota de *L. amazonensis*, foram observados os valores de CI50 de $(53.8 \pm 4.4 \text{ } \mu\text{g/mL})$ para a fração DA-FE (hexano: acetato de etila, 4:6), que quando comparados aos extratos ativos do presente estudo dissertativo 5AUVB13 e 6AUVB13 também apresentam equipotência.

SILVA et al. (2018) em sua pesquisa com moléculas bioativas associadas a microrganismos bacterianos antárticos, relataram haver atividade antiparasitária contra *Trypanosoma cruzi*, que pertence à mesma família dos parasitos do gênero *Leishmania*, podendo indicar que haja uma possível via ou alvo farmacológico que também esteja presente em *Leishmania*. Para investigar o potencial leishmanicida dos metabólitos in vitro, os extratos metanólicos foram avaliados em diferentes espécies do gênero *Leishmania* em formas promastigotas. A atividade antiparasitária foi confirmada, entretanto ainda serão realizados experimentos em amastigotas do parasito para as espécies utilizadas no presente estudo. Após a constatação da atividade leishmanicida para ambas as formas evolutivas será verificado o índice de seletividade dos produtos naturais em relação a célula hospedeira e o parasito.

VÍTEK e colaboradores (2017) desenvolveram uma pesquisa com cianobactérias endofíticas, oriundas de rochas do deserto do Atacama. Os microrganismos avaliados em seu estudo foram submetidos à espectrofotometria, e foi constatado que o perfil dos pigmentos apresentava tonalidade avermelhada e o pico da faixa de absorbância em torno de 514 nanômetros. Corroborando dados do presente estudo dissertativo e, também de ZERAIK; YARIWAKE (2008) no que se refere aos aspectos colorimétricos. Os extratos metanólicos bacterianos antárticos ativos 6AUVB13 e 5AUVB13 foram submetidos à técnica espectroscópica, o pico de absorbância observada é de 500 nanômetros. Ambos os estudos e seus respectivos resultados espectroscópicos estão próximos na absorbância observada, reforçando a presença de carotenoides. Ao que tudo indica, a presença de carotenoides produzidos por organismos bacterianos, está associada a parâmetros fotoprotetores; o continente antártico e as regiões desérticas, ambos são ambientes hostis e apresentam elevados níveis de raios ultra violeta.

O resultado que finalizará o presente estudo dissertativo será a HPLC, para confirmar os constituintes dos extratos metanólicos bacterianos que demonstraram atividade contra os parasitos de *Leishmania*, sendo eles 6AUVB13 e 5AUVB13. Após o resultado dos mesmos, o artigo com todos os dados experimentais obtidos será

submetido à publicação. O manuscrito com todos os dados obtidos até o presente momento encontra-se em preparação.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados, foi constatado que as bactérias Antárticas estudadas foram produtoras de pigmentos intracelulares variando em tonalidades amarelas e vermelho. Os extratos metanólicos bacterianos apresentam atividade leishmanicida para espécies distintas do parasito do gênero *Leishmania*. O continente antártico mostrasse como um ecossistema único e de sucesso com um acervo biológico ainda a ser explorado, com inúmeras possibilidades para a biotecnologia. Os gêneros de líquens descritos neste trabalho, já possuem relatos na literatura de sua associação com bactérias. Além disso, conclui-se que todos os extratos testados não apresentaram citotoxicidade para as células hospedeiras testadas (macrófagos da linhagem JJ74.A1), com exceção de 5AUVB13. O presente estudo é inédito com a temática investigativa em explorar o potencial leishmanicida de bioprodutos oriundos de bactérias extraídas de líquens do continente antártico. A pesquisa é pioneira também na utilização de macrófagos de linhagem J774.A1 avaliando a citotoxicidade nessas células. Destaque para os extratos 5 AUVB 13 e 6 AUVB13, ambos exibiram potente atividade leishmanicida, sendo que 6 AUVB 13 não é citotóxico para a célula hospedeira.

8 REFERÊNCIAS

- ACUÑA-RODRÍGUEZ, Ian S.; HANSEN, Hermann; GALLARDO-CERDA, Jorge; *et al.* Antarctic Extremophiles: Biotechnological Alternative to Crop Productivity in Saline Soils. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2019.00022>>. Acesso em: 18 mar. 2022.
- AKBARI, Maryam; ORYAN, Ahmad; HATAM, Gholamreza. Immunotherapy in treatment of leishmaniasis. **Immunology Letters**, v. 233, p. 80–86, 2021.
- AKHOUNDI, Mohammad; KUHLS, Katrin; CANNET, Arnaud; *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.
- ALONSO, Lais; CARDOSO, Éder Jeferson Souza; GOMES, Rodrigo Saar; *et al.* Antileishmanial and cytotoxic activities of ionic surfactants compared to those of miltefosine. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v. 183, p. 110421, 2019.
- ALVAR, Jorge; VÉLEZ, Iván D.; BERN, Caryn; *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLOS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- AMULIC, Borko; CAZALET, Christel; HAYES, Garret L.; *et al.* Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 459–489, 2012.
- AN, Isa; HARMAN, Mehmet; ESEN, Mustafa; *et al.* The effect of pentavalent antimonial compounds used in the treatment of cutaneous leishmaniasis on hemogram and biochemical parameters. **Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 38, n. 3, p. 294–297, 2019.
- ANVERSA, Laís; TIBURCIO, Monique Gomes Salles; RICHINI-PEREIRA, Virgínia Bodelão; *et al.* Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, p. 281–289, 2018.
- ARONSON, Richard B.; THATJE, Sven; MCCLINTOCK, James B.; *et al.* Anthropogenic impacts on marine ecosystems in Antarctica. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1223, n. 1, p. 82–107, 2011.
- ASCHENBRENNER, Ines A.; CERNAVA, Tomislav; BERG, Gabriele; *et al.* Understanding Microbial Multi-Species Symbioses. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00180>>. Acesso em: 19 mar. 2022.
- ASPLUND, Johan; WARDLE, David A. How lichens impact on terrestrial community and ecosystem properties. **Biological Reviews**, v. 92, n. 3, p. 1720–1738, 2017.
- ATALAH, Joaquin; BLAMEY, Lotsé; MUÑOZ-IBACACHE, Sebastian; *et al.* Isolation and characterization of violacein from an Antarctic *Halobacter*: a non-pathogenic psychrotolerant microorganism. **Extremophiles: Life Under Extreme Conditions**, v. 24, n. 1, p. 43–52, 2020.

ATRI, Chiraz; GUERFALI, Fatma Z.; LAOUINI, Dhafer. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1801, 2018.

BADIRZADEH, Alireza; TAHERI, Tahereh; TASLIMI, Yasaman; *et al.* Arginase activity in pathogenic and non-pathogenic species of Leishmania parasites. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005774, 2017.

BARROCA, Mário; A. SANTOS, Gustavo; GERDAY, Charles; *et al.* Biotechnological Aspects of Cold-Active Enzymes. *In*: **Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology: Second Edition**. [s.l.: s.n.], 2017, p. 461–475.

BASSELIN, Mireille; DENISE, Hubert; COOMBS, Graham H.; *et al.* Resistance to Pentamidine in Leishmania mexicana Involves Exclusion of the Drug from the Mitochondrion. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 12, p. 3731–3738, 2002.

BATES, Paul A. Revising Leishmania's life cycle. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 529–530, 2018.

BATES, Paul A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 2007.

BATES, Paul A.; DEPAQUIT, Jérôme; GALATI, Eunice AB; *et al.* Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 131, 2015.

BATES, Scott T.; CROPSEY, Garrett W. G.; CAPORASO, J. Gregory; *et al.* Bacterial communities associated with the lichen symbiosis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 1309–1314, 2011.

BERBERT, Taisa Rocha Navasconi; DE MELLO, Tatiane França Perles; WOLF NASSIF, Priscila; *et al.* Pentavalent Antimonials Combined with Other Therapeutic Alternatives for the Treatment of Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review. **Dermatology Research and Practice**, v. 2018, p. 9014726, 2018.

BHADURY, Punyasloke; MOHAMMAD, Balsam T.; WRIGHT, Phillip C. The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 33, n. 5, p. 325–337, 2006.

BICHIOU, Haifa; RABHI, Sameh; BEN HAMDA, Cherif; *et al.* Leishmania Parasites Differently Regulate Antioxidant Genes in Macrophages Derived From Resistant and Susceptible Mice. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 748738, 2021.

BOHLSON, Suzanne S.; O'CONNER, Sean D.; HULSEBUS, Holly Jo; *et al.* Complement, C1q, and C1q-Related Molecules Regulate Macrophage Polarization. **Frontiers in Immunology**, v. 5, 2014. Disponível em:

<<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00402>>. Acesso em: 18 mar. 2022.

BURZA, Sakib; CROFT, Simon L.; BOELAERT, Marleen. Leishmaniasis. **Lancet (London, England)**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.

CAÑAVATE, Carmen; HERRERO, Merce; NIETO, Javier; *et al.* Evaluation of Two rK39 Dipstick Tests, Direct Agglutination Test, and Indirect Fluorescent Antibody Test for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in a New Epidemic Site in Highland Ethiopia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 1, p. 102–106, 2011.

CARNEIRO, Pedro Paulo; CONCEIÇÃO, Jacilara; MACEDO, Michael; *et al.* The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0148084, 2016.

CARRASCO, Mario; ROZAS, Juan Manuel; BARAHONA, Salvador; *et al.* Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 251, 2012.

CARVALHO, Luis; LUQUE-ORTEGA, Juan Román; LÓPEZ-MARTÍN, Carmen; *et al.* The 8-Aminoquinoline Analogue Sitamaquine Causes Oxidative Stress in *Leishmania donovani* Promastigotes by Targeting Succinate Dehydrogenase γ . **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 9, p. 4204–4210, 2011.

CARVALHO, Sílvia H.; FRÉZARD, Frédéric; PEREIRA, Neila P.; *et al.* American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment. **Tropical medicine & international health: TM & IH**, v. 24, n. 4, p. 380–391, 2019.

CARY, S. Craig; MCDONALD, Ian R.; BARRETT, John E.; *et al.* On the rocks: the microbiology of Antarctic Dry Valley soils. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 129–138, 2010.

CHAKRAVARTY, Jaya; SUNDAR, Shyam. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 10, p. 1251–1265, 2019.

CHALABI, K. A.; GUTTERIDGE, W. E. Presence and properties of thymidylate synthase in trypanosomatids. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 481, n. 1, p. 71–79, 1977.

CHARLTON, Rebecca L.; ROSSI-BERGMANN, Bartira; DENNY, Paul W.; *et al.* Repurposing as a strategy for the discovery of new anti-leishmanials: the-state-of-the-art. **Parasitology**, v. 145, n. 2, p. 219–236, 2018.

CHEN, C.-Y. Oliver; SMITH, Avi; LIU, Yuntao; *et al.* Photoprotection by pistachio bioactives in a 3-dimensional human skin equivalent tissue model. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 68, n. 6, p. 712–718, 2017.

CHEN, Feng; LI, Hua-Bin; WONG, Ricky Ngok-Shun; *et al.* Isolation and purification of the bioactive carotenoid zeaxanthin from the microalga *Microcystis aeruginosa* by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography. A**, v. 1064, n. 2, p. 183–186, 2005.

CHOKSI, Pratik M.; JOSHI, Vishal Y. A Review on Lycopene—Extraction, Purification, Stability and Applications. **International Journal of Food Properties**, v. 10, n. 2, p. 289–298, 2007.

CLEMENTINO, Leandro; ODA, Fernando; RODRIGUES, Thaiz; *et al.* The antileishmanial activity of the antarctic brown alga *Ascoseira mirabilis* Skottsberg. **Natural Product Research**, v. 35, p. 1–5, 2020.

COLEPICOLO-NETO, Pio; DEBONSI, Hosana Maria; SANTOS, Gustavo Souza dos; *et al.* GC-MS Analysis, Bioactivity-based Molecular Networking and Antiparasitic Potential of the Antarctic Alga *Desmarestia antarctica*. **Planta Medica International Open**, v. 07, n. 03, 2020. Disponível em:

<<https://scholar.archive.org/work/mlmulz6zgbfzbe4jb5p7t3xzrq>>. Acesso em: 26 ago. 2022.

CONVEY, Peter; PECK, Lloyd S. Antarctic environmental change and biological responses. **Science Advances**, v. 5, n. 11, p. eaaz0888, 2019.

COPELAND, Nathaniel K.; ARONSON, Naomi E. Leishmaniasis: treatment updates and clinical practice guidelines review. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 28, n. 5, p. 426–437, 2015.

COWIE, Rom; WILLIAMS, Gareth; MAAS, Ew; *et al.* Antarctic sea-ice microbial communities show distinct patterns of zonation in response to algal-derived substrates. **Aquatic Microbial Ecology**, 2014.

DA CUNHA, Ana F. S.; DI C OLIVEIRA, Yvanna L.; DOLABELLA, Silvio S.; *et al.* Anti-leishmanial compounds from microbial metabolites: a promising source. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 21–22, p. 8227–8240, 2021.

DA FONSECA-MARTINS, Alessandra M.; DE SOUZA LIMA-GOMES, Phillipe; ANTUNES, Máisa Mota; *et al.* Leishmania Parasites Drive PD-L1 Expression in Mice and Human Neutrophils With Suppressor Capacity. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 598943, 2021.

DANILOVICH, Mariana Elizabeth; SÁNCHEZ, Leandro Arturo; ACOSTA, Federico; *et al.* Antarctic bioprospecting: in pursuit of microorganisms producing new antimicrobials and enzymes. **Polar Biology**, v. 41, n. 7, p. 1417–1433, 2018.

DASTOGEER, Khondoker M. G.; TUMPA, Farzana Haque; SULTANA, Afruja; *et al.* Plant microbiome—an account of the factors that shape community composition and

diversity. **Current Plant Biology**, v. 23, p. 100161, 2020. (Plant Interactions with Microbes and Environment).

DAVIDSON, Robert N.; DEN BOER, Margriet; RITMEIJER, Koert. Paromomycin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 7, p. 653–660, 2009.

DE MENEZES, Graciéle C. A.; GODINHO, Valéria M.; PORTO, Bárbara A.; *et al.* *Antarctomyces pellizariae* sp. nov., a new, endemic, blue, snow resident psychrophilic ascomycete fungus from Antarctica. **Extremophiles: Life Under Extreme Conditions**, v. 21, n. 2, p. 259–269, 2017.

DIESER, Markus; GREENWOOD, Mark; FOREMAN, Christine M. Carotenoid Pigmentation in Antarctic Heterotrophic Bacteria as a Strategy to Withstand Environmental Stresses. **Arctic, Antarctic, and Alpine Research**, v. 42, n. 4, p. 396–405, 2010.

DUCKLOW, Hugh; FRASER, William; MEREDITH, Michael; *et al.* West Antarctic Peninsula: An Ice-Dependent Coastal Marine Ecosystem in Transition. **Oceanography**, v. 26, n. 3, p. 190–203, 2013.

ELMAHALLAWY, Ehab Kotb; ALKHALDI, Abdulsalam A. M.; SALEH, Amira A. Host immune response against leishmaniasis and parasite persistence strategies: A review and assessment of recent research. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 139, p. 111671, 2021.

FERREIRA, Claudinária Cardoso; MAROCHIO, Geisi Gabrieli; PARTATA, Anette Kelsei. ESTUDO SOBRE A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA COM ENFOQUE NA FARMACOTERAPIA. p. 9, 2012.

FRANKE, E. D.; WIGNALL, F. S.; CRUZ, M. E.; *et al.* Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. **Annals of Internal Medicine**, v. 113, n. 12, p. 934–940, 1990.

GALANAKIS, Charis M. (Org.). **Nutraceutical and functional food components: effects of innovative processing techniques**. London, United Kingdom: Academic Press, 2017.

GALATI, Eunice A. B. Phlebotominae (Diptera, Psychodidae): Classification, Morphology and Terminology of Adults and Identification of American Taxa. *In*: RANGEL, Elizabeth F.; SHAW, Jeffrey J. (Orgs.). **Brazilian Sand Flies : Biology, Taxonomy, Medical Importance and Control**. Cham: Springer International Publishing, 2018, p. 9–212. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1_2>. Acesso em: 17 mar. 2022.

GALE, E.F.; FOLKES, J.P. Actions of pentamidine on the metabolism of *Staphylococcus aureus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 144, n. 2, p. 467–470, 1967.

GERVAZONI, Luiza F. O.; BARCELLOS, Gabrielle B.; FERREIRA-PAES, Taiana; *et al.* Use of Natural Products in Leishmaniasis Chemotherapy: An Overview. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, p. 579891, 2020.

GIGLEY, Jason P.; BHADRA, Rajarshi; MORETTO, Magali M.; *et al.* T cell exhaustion in protozoan disease. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 377–384, 2012.

GIUFFRIDA, Daniele; TORRE, Germana; DUGO, Paola; *et al.* Determination of the carotenoid profile in peach fruits, juice and jam. **Fruits**, v. 68, p. 39–44, 2013.

GLENNIE, Nelson D.; VOLK, Susan W.; SCOTT, Phillip. Skin-resident CD4+ T cells protect against *Leishmania major* by recruiting and activating inflammatory monocytes. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 4, p. e1006349, 2017.

GODINHO, Valéria M.; GONÇALVES, Vivian N.; SANTIAGO, Iara F.; *et al.* Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica. **Extremophiles: Life Under Extreme Conditions**, v. 19, n. 3, p. 585–596, 2015.

GOLLOB, K. J.; VIANA, A. G.; DUTRA, W. O. Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 8, p. 367–376, 2014.

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, Suênia da C.; PESSOA-E-SILVA, Rômulo; TRAJANO-SILVA, Lays A. M.; *et al.* The Equivocal Role of Th17 Cells and Neutrophils on Immunopathogenesis of Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1437, 2017.

GONZALEZ-LOMBANA, Claudia; GIMBLET, Ciara; BACELLAR, Olivia; *et al.* IL-17 mediates immunopathology in the absence of IL-10 following *Leishmania major* infection. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 3, p. e1003243, 2013.

GRANADO-LORENCIO, F.; BLANCO-NAVARRO, I.; PÉREZ-SACRISTÁN, B.; *et al.* Biomarkers of carotenoid bioavailability. **Food Research International (Ottawa, Ont.)**, v. 99, n. Pt 2, p. 902–916, 2017.

GRUBE, Martin; BERG, Gabriele. Microbial consortia of bacteria and fungi with focus on the lichen symbiosis. **Fungal Biology Reviews**, v. 23, n. 3, p. 72–85, 2009.

GUIDO, Rafael V. C.; ANDRICOPULO, Adriano D.; OLIVA, Glaucius. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, p. 81–98, 2010.

GUIDO, Rafael V. C.; OLIVA, Glaucius; ANDRICOPULO, Adriano D. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 37–46, 2008.

GUPTA, P. C. Sen. History of Kala-Azar in India *Sir U. N. Brahmachari Memorial Lecture, Royal Asiatic Society of Bengal. **The Indian Medical Gazette**, v. 82, n. 5, p. 281–286, 1947.

HERZFELD, Ute Christina. References. In: HERZFELD, Ute Christina (Org.). **Atlas of Antarctica: Topographic Maps from Geostatistical Analysis of Satellite Radar Altimeter Data**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2004, p. 343–354. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-18515-1_8>. Acesso em: 19 mar. 2022.

HORTA, Maria Fátima; ANDRADE, Luciana Oliveira; MARTINS-DUARTE, Érica Santos; *et al.* Cell invasion by intracellular parasites - the many roads to infection. **Journal of Cell Science**, v. 133, n. 4, p. jcs232488, 2020.

HORTA, Maria Fátima; MENDES, Bárbara Pinheiro; ROMA, Eric Henrique; *et al.* Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, p. 203818, 2012.

HOYOUX, Anne; BLAISE, Vinciane; COLLINS, Tony; *et al.* Extreme Catalysts from Low-Temperature Environments. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 98, p. 317–30, 2004.

HUSEIN-ELAHMED, H.; GIELER, U.; STEINHOFF, M. Evidence supporting the enhanced efficacy of pentavalent antimonials with adjuvant therapy for cutaneous leishmaniasis: a systematic review and meta-analysis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV**, v. 34, n. 10, p. 2216–2228, 2020.

IGIELSKA-KALWAT, Joanna; GOŚCIAŃSKA, Joanna; NOWAK, Izabela. [Carotenoids as natural antioxidants]. **Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej (Online)**, v. 69, p. 418–428, 2015.

INOUE, M. The lichen flora and habitats of the Syowa region, continental Antarctica. 1995.

JAIN, Vineet; JAIN, Keerti. Molecular targets and pathways for the treatment of visceral leishmaniasis. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 1, p. 161–170, 2018.

JOSHI, Swati; SATYANARAYANA, Tulasi. Biotechnology of Cold-Active Proteases. **Biology**, v. 2, n. 2, p. 755–783, 2013.

JOZALA, Angela Faustino; GERALDES, Danilo Costa; TUNDISI, Louise Lacalendola; *et al.* Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. Suppl 1, p. 51–63, 2016.

KATARA, Gajendra Kumar; RAJ, Anand; KUMAR, Rajesh; *et al.* Analysis of localized immune responses reveals presence of Th17 and Treg cells in cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. **BMC Immunology**, v. 14, p. 52, 2013.

KHAVARI, Fatemeh; SAIDIJAM, Massoud; TAHERI, Mohammad; *et al.* Microalgae: therapeutic potentials and applications. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 5, p. 4757–4765, 2021.

KIMA, Peter E. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1087–1096, 2007.

KITA, Daniela M.; GIOVANELLA, Patricia; YOSHINAGA, Thaís T.; *et al.* Antarctic fungi applied to textile dye bioremediation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, 2022. Disponível em:

<<http://www.scielo.br/j/aabc/a/9TRn4JfyJjVG4FJzGLZTZsf/>>. Acesso em: 21 ago. 2022.

KORN, Thomas; BETTELLI, Estelle; OUKKA, Mohamed; *et al.* IL-17 and Th17 Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 485–517, 2009.

KRINSKY, N. I. Non-Photosynthetic Functions of Carotenoids. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 284, n. 1002, p. 581–590, 1978.

KUCZYNSKA, Paulina; JEMIOLA-RZEMINSKA, Malgorzata; STRZALKA, Kazimierz. **Characterisation of Carotenoids Involved in the Xanthophyll Cycle**. [s.l.]: IntechOpen, 2017. Disponível em:

<<https://www.intechopen.com/chapters/undefined/state.item.id>>. Acesso em: 26 ago. 2022.

LAINSON, Ralph. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 13–32, 2010.

LAKATOS, Michael; LANGE-BERTALOT, Horst; BÜDEL, Burkhard. Diatoms Living Inside the Thallus of the Green Algal Lichen Coenogonium Linkii in Neotropical Lowland Rain Forests1. **Journal of Phycology**, v. 40, n. 1, p. 70–73, 2004.

LEE, Yun Kyung; MUKASA, Ryuta; HATTON, Robin D.; *et al.* Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 3, p. 274–280, 2009.

LIMA, Igor G. O.; BISPO, James R. S.; AGOSTINHO, Adson Y. H.; *et al.* Antarctic environments as a source of bacterial and fungal therapeutic enzymes. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, 2022. Disponível em:

<<http://www.scielo.br/j/aabc/a/wXyHcFWHSVP3nDgZpwQSJ3F/>>. Acesso em: 18 mar. 2022.

LIU, Dong; UZONNA, JUDE. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, 2012. Disponível em:

<<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2012.00083>>. Acesso em: 17 mar. 2022.

LOISEAU, P. M.; COJEAN, S.; SCHRÉVEL, J. Sitamaquine as a putative antileishmanial drug candidate: from the mechanism of action to the risk of drug resistance. **Parasite (Paris, France)**, v. 18, n. 2, p. 115–119, 2011.

LUKEŠ, Julius; SKALICKÝ, Tomáš; TÝČ, Jiří; *et al.* Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 2, p. 115–122, 2014.

MALARD, Lucie A.; PEARCE, David A. Microbial diversity and biogeography in Arctic soils. **Environmental Microbiology Reports**, v. 10, n. 6, p. 611–625, 2018.

MARTORELL, María Martha; RUBERTO, Lucas Adolfo Mauro; FERNÁNDEZ, Pablo Marcelo; *et al.* Bioprospection of cold-adapted yeasts with biotechnological potential from Antarctica. **Journal of Basic Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 504–516, 2017.

MATA-GÓMEZ, Luis Carlos; MONTAÑEZ, Julio César; MÉNDEZ-ZAVALA, Alejandro; *et al.* Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. **Microbial Cell Factories**, v. 13, p. 12, 2014.

MATOS, Guilherme; COVAS, Cláudia; BITTAR, Rita; *et al.* IFNG +874T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence Leishmania induced IFN- γ production. **BMC infectious diseases**, v. 7, p. 33, 2007.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM: monthly journal of the Association of Physicians**, v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014.

MENDES, Rodrigo; GARBEVA, Paolina; RAAIJMAKERS, Jos M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 634–663, 2013.

MESQUITA, Grazielle F. de; TORQUILHO, Helena de S. O uso dos carotenóides para promoção da saúde. **Revista Eletrônica Perspectivas da Ciência e Tecnologia - ISSN: 1984-5693**, v. 8, n. 2, p. 1, 2017.

MESQUITA, Sabrina da S.; TEIXEIRA, Cláudia M. L. L.; SERVULO, Eliana F. C. Carotenoids: Properties, Applications and Market. **Revista Virtual de Química**, p. 672–688, 2017.

MILLER, N. J.; SAMPSON, J.; CANDEIAS, L. P.; *et al.* Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. **FEBS letters**, v. 384, n. 3, p. 240–242, 1996.

MOLNÁR, Katalin; FARKAS, Edit. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. **Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences**, v. 65, n. 3–4, p. 157–173, 2010.

MORITA, R. Y. Psychrophilic bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 39, n. 2, p. 144–167, 1975.

MOSSER, D. M.; BURKE, S. K.; COUTAVAS, E. E.; *et al.* Leishmania species: mechanisms of complement activation by five strains of promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 62, n. 3, p. 394–404, 1986.

MULE, Simon Ngao; SAAD, Joyce Silva; FERNANDES, Livia Rosa; *et al.* Protein glycosylation in Leishmania spp. **Molecular Omics**, v. 16, n. 5, p. 407–424, 2020.

MURBACK, Nathalia Dias Negrão; HANS FILHO, Günter; NASCIMENTO, Roberta Ayres Ferreira do; *et al.* Leishmaniose tegumentar americana: estudo clínico, epidemiológico e laboratorial realizado no Hospital Universitário de Campo Grande,

Mato Grosso do Sul, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, p. 55–63, 2011.

MURRAY, Henry W.; BERMAN, Jonathan D.; DAVIES, Clive R.; *et al.* Advances in leishmaniasis. **Lancet (London, England)**, v. 366, n. 9496, p. 1561–1577, 2005.

NAKAYAMA, C. R.; KUHN, E.; ARAÚJO, A. C. V.; *et al.* Revealing archaeal diversity patterns and methane fluxes in Admiralty Bay, King George Island, and their association to Brazilian Antarctic Station activities. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 58, n. 1–2, p. 128–138, 2011.

NOBRE, Fernando Suzigan. **Atividade lipolítica e biodiversidade de fungos filamentosos derivados da Antártica**. text, Universidade de São Paulo, 2013. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-27062013-093541/>>. Acesso em: 18 mar. 2022.

NORDENFELT, Pontus; TAPPER, Hans. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 90, n. 2, p. 271–284, 2011.

NÚÑEZ-MONTERO, Kattia; BARRIENTOS, Leticia. Advances in Antarctic Research for Antimicrobial Discovery: A Comprehensive Narrative Review of Bacteria from Antarctic Environments as Potential Sources of Novel Antibiotic Compounds Against Human Pathogens and Microorganisms of Industrial Importance. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 4, p. E90, 2018.

NYLÉN, Susanne; GAUTAM, Shalini. Immunological perspectives of leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 135–146, 2010.

OLIVEIRA-NETO, M. P.; SCHUBACH, A.; ARAUJO, M. L.; *et al.* High and low doses of antimony (Sb v) in American cutaneous leishmaniasis: a five years follow-up study of 15 patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 207–209, 1996.

ORHEIM, Olav; PRESS, Anthony; GILBERT, Neil. Managing the Antarctic Environment: The Evolving Role of the Committee for Environmental Protection. *In*: **Science Diplomacy. Antarctica Science the Governance of International Spaces**. [s.l.: s.n.], 2011, p. 209–221.

OSERO, Bernard Ong'ondo; ARULEBA, Raphael Taiwo; BROMBACHER, Frank; *et al.* Unravelling the unsolved paradoxes of cytokine families in host resistance and susceptibility to Leishmania infection. **Cytokine: X**, v. 2, n. 4, p. 100043, 2020.

PARKS, Donovan H.; CHUVOCHINA, Maria; WAITE, David W.; *et al.* A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 10, p. 996–1004, 2018.

PAVLI, Androula; MALTEZOU, Helena C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. **International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 14, n. 12, p. e1032-1039, 2010.

PÉCOUL, B.; CHIRAC, P.; TROUILLER, P.; *et al.* Access to essential drugs in poor countries: a lost battle? **JAMA**, v. 281, n. 4, p. 361–367, 1999.

PEREIRA, Antia G.; OTERO, Paz; ECHAVE, Javier; *et al.* Xanthophylls from the Sea: Algae as Source of Bioactive Carotenoids. **Marine Drugs**, v. 19, n. 4, p. 188, 2021.

PERKINS, Carrie; SIDDIQUI, Sana; PURI, Munish; *et al.* Biotechnological applications of microbial bioconversions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 1050–1065, 2016.

PESCIAROLI, Chiara; CUPINI, Francesco; SELBMANN, Laura; *et al.* Temperature preferences of bacteria isolated from seawater collected in Kandalaksha Bay, White Sea, Russia. **Polar Biology**, v. 35, n. 3, p. 435, 2011.

POKHAREL, Pashupati; GHIMIRE, Rakesh; LAMICHHANE, Pratik. Efficacy and Safety of Paromomycin for Visceral Leishmaniasis: A Systematic Review. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2021, p. 8629039, 2021.

PONKA, Roger; FOKOU, Elie; KANSCI, Germain; *et al.* Amino acids, major carotenoids and vitamin A activity of some traditional sauces consumed in the Far North Region of Cameroon. **Subtropical plant science**, 2015. Disponível em: <<https://10.1016/j.jfca.2015.05.005>>. Acesso em: 26 ago. 2022.

PURVES, Kevin; MACINTYRE, Lynsey; BRENNAN, Debra; *et al.* Using Molecular Networking for Microbial Secondary Metabolite Bioprospecting. **Metabolites**, v. 6, n. 1, p. E2, 2016.

RAI, Himanshu; KHARE, Roshni; NAYAKA, Sanjeeva; *et al.* Lichen synusia in East Antarctica (Schirmacher Oasis and Larsemann Hills): substratum and morphological preferences. **Czech Polar Reports**, v. 1, n. 2, p. 65–77, 2011.

RANGEL, Elizabeth F.; LAINSON, Ralph; CARVALHO, Bruno M.; *et al.* Sand Fly Vectors of American Cutaneous Leishmaniasis in Brazil. In: RANGEL, Elizabeth F.; SHAW, Jeffrey J. (Orgs.). **Brazilian Sand Flies : Biology, Taxonomy, Medical Importance and Control**. Cham: Springer International Publishing, 2018, p. 341–380. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1_7>. Acesso em: 17 mar. 2022.

RANGEL, Karen C.; DEBONSI, Hosana M.; CLEMENTINO, Leandro C.; *et al.* Antileishmanial activity of the Antarctic red algae *Iridaea cordata* (Gigartinaceae; Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 2, p. 825–834, 2019.

RAVELO, Ángel Gutiérrez; BRAUN, Ana Estévez. RELEVANCIA DE LOS PRODUCTOS NATURALES EN EL DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS FÁRMACOS EN EL S. XXI. p. 11, .

READY, Paul D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, v. 6, p. 147–154, 2014.

REIS-MANSUR, Maria Cristina P. P.; CARDOSO-RURR, Janine S.; SILVA, Josemar V. Maiworm Abreu; *et al.* Carotenoids from UV-resistant Antarctic Microbacterium sp. LEMMJ01. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 9554, 2019.

- REITHINGER, Richard; DUJARDIN, Jean-Claude; LOUZIR, Hechmi; *et al.* Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–596, 2007.
- RICCIARDELLI, Annarita; CASILLO, Angela; VERGARA, Alessandro; *et al.* Environmental conditions shape the biofilm of the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. **Microbiological Research**, v. 218, p. 66–75, 2019.
- RIETBROEK, Roelof; BRUNNABEND, Sandra-Esther; KUSCHE, Jürgen; *et al.* Revisiting the contemporary sea-level budget on global and regional scales. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 6, p. 1504–1509, 2016.
- ROSALES, Carlos. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? **Frontiers in Physiology**, v. 9, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2018.00113>>. Acesso em: 18 mar. 2022.
- RUISSI, Serena; BARRECA, Donatella; SELBMANN, Laura; *et al.* Fungi in Antarctica. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 6, n. 1, p. 127–141, 2007.
- SANGSHETTI, Jaiprakash N.; KHAN, Firoz A. Kalam; KULKARNI, Abhishek A.; *et al.* Antileishmanial drug discovery: comprehensive review of the last 10 years. **RSC Advances**, v. 5, n. 41, p. 32376–32415, 2015.
- SANTIAGO, Iara F.; ALVES, Tânia M. A.; RABELLO, Ana; *et al.* Leishmanicidal and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. **Extremophiles: Life Under Extreme Conditions**, v. 16, n. 1, p. 95–103, 2012.
- SANTOS, Gustavo Souza dos; RANGEL, Karen Cristina; TEIXEIRA, Thaiz Rodrigues; *et al.* GC-MS Analysis, Bioactivity-based Molecular Networking and Antiparasitic Potential of the Antarctic Alga *Desmarestia antarctica*. **Planta Medica International Open**, v. 07, n. 3, p. e122–e132, 2020.
- SAQIB, Uzma; SARKAR, Sutripta; SUK, Kyoungcho; *et al.* Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation. **Oncotarget**, v. 9, n. 25, p. 17937–17950, 2018.
- SAVOIA, Dianella. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 6, p. 588–596, 2015.
- SCOTT, Phillip; NOVAIS, Fernanda O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews. Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581–592, 2016.
- SEKUROVA, Olga N.; SCHNEIDER, Olha; ZOTCHEV, Sergey B. Novel bioactive natural products from bacteria via bioprospecting, genome mining and metabolic engineering. **Microbial Biotechnology**, v. 12, n. 5, p. 828–844, 2019.

SELBY, M. J. Antarctica: Soils, weathering processes and environment, I. B. Campbell and G. G. C. Claridge, (developments in soil science 16), Elsevier, Amsterdam, 1987. No. of pages: 368. **Earth Surface Processes and Landforms**, v. 14, n. 8, p. 753–754, 1989.

SHAW, Jeffrey J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* chagasi for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 577–579, 2006.

SHIMABUKURO, Paloma Helena Fernandes; ANDRADE, Andrey José de; GALATI, Eunice Aparecida Bianchi. Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. **ZooKeys**, v. 660, p. 67–106, 2017.

SHIMABUKURO, Paloma Helena Fernandes; GALATI, Eunice Aparecida Bianchi. Lista de espécies de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. **Biota Neotropica**, v. 11, p. 685–704, 2011.

SICIŃSKI, Jacek; JAŹDŹEWSKI, Krzysztof; BROYER, Claude De; *et al.* Admiralty Bay Benthos Diversity—A census of a complex polar ecosystem. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 58, n. 1, p. 30–48, 2011. (Census of Antarctic Marine Life: Diversity and Change in the Southern Ocean Ecosystems).

SILVA, Tiago R.; CANELA-GARAYOA, Ramon; ERAS, Jordi; *et al.* Pigments in an iridescent bacterium, *Cellulophaga fucicola*, isolated from Antarctica. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 112, n. 3, p. 479–490, 2019.

SILVA, Tiago R.; DUARTE, Alysson W. F.; PASSARINI, Michel R. Z.; *et al.* Bacteria from Antarctic environments: diversity and detection of antimicrobial, antiproliferative, and antiparasitic activities. **Polar Biology**, v. 41, n. 7, p. 1505–1519, 2018.

SILVA, Tiago R.; TAVARES, Renata S. N.; CANELA-GARAYOA, Ramon; *et al.* Chemical Characterization and Biotechnological Applicability of Pigments Isolated from Antarctic Bacteria. **Marine Biotechnology (New York, N.Y.)**, v. 21, n. 3, p. 416–429, 2019.

SILVA, Tiago Rodrigues E.; SILVA, Luiz Carlos Francelino; DE QUEIROZ, Aline Cavalcanti; *et al.* Pigments from Antarctic bacteria and their biotechnological applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, n. 6, p. 809–826, 2021.

SILVEIRA, Fernando T. What makes mucosal and anergic diffuse cutaneous leishmaniasis so clinically and immunopathologically different? A review in Brazil. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 113, n. 9, p. 505–516, 2019.

SINGH, Aarti; AHMAD, Sayeed; AHMAD, Anees. Green extraction methods and environmental applications of carotenoids-a review. **RSC Advances**, v. 5, n. 77, p. 62358–62393, 2015.

SINGH, Hansi A.; POLVANI, Lorenzo M. Low Antarctic continental climate sensitivity due to high ice sheet orography. **npj Climate and Atmospheric Science**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 2020.

SMITH, Jesse. The frozen continent. **Science (New York, N.Y.)**, v. 367, n. 6484, p. 1316–1317, 2020.

SOTO, Jaime; SOTO, Paula; AJATA, Andrea; *et al.* Miltefosine Combined with Intralesional Pentamidine for Leishmania braziliensis Cutaneous Leishmaniasis in Bolivia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 5, p. 1153–1155, 2018.

SPRIBILLE, Toby; TUOVINEN, Veera; RESL, Philipp; *et al.* Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. **Science (New York, N.Y.)**, v. 353, n. 6298, p. 488–492, 2016.

SRIVASTAVA, Saumya; SHANKAR, Prem; MISHRA, Jyotsna; *et al.* Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 277, 2016.

SUNDAR, Shyam; CHAKRAVARTY, Jaya. Investigational Drugs for Visceral Leishmaniasis. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 24, n. 1, p. 43–59, 2015.

SUNDAR, Shyam; SINGH, Anup. Recent developments and future prospects in the treatment of visceral leishmaniasis. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 3, n. 3–4, p. 98–109, 2016.

SUNTER, Jack; GULL, Keith. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open Biology**, v. 7, n. 9, p. 170165, 2017.

SUNYOTO, Temmy; POTET, Julien; BOELAERT, Marleen. Why miltefosine-a life-saving drug for leishmaniasis-is unavailable to people who need it the most. **BMJ global health**, v. 3, n. 3, p. e000709, 2018.

TEIXEIRA, Lia C. R. S.; YEARGEAU, Etienne; BALIEIRO, Fabiano C.; *et al.* Plant and Bird Presence Strongly Influences the Microbial Communities in Soils of Admiralty Bay, Maritime Antarctica. **PLOS ONE**, v. 8, n. 6, p. e66109, 2013.

TEWARY, Poonam; SUKUMARAN, Bindu; SAXENA, Shailendra; *et al.* Immunostimulatory oligodeoxynucleotides are potent enhancers of protective immunity in mice immunized with recombinant ORFF leishmanial antigen. **Vaccine**, v. 22, n. 23–24, p. 3053–3060, 2004.

TIAN, Yuan; LI, Yan-Ling; ZHAO, Feng-Chun. Secondary Metabolites from Polar Organisms. **Marine Drugs**, v. 15, n. 3, p. 28, 2017.

TIUMAN, Tatiana S.; SANTOS, Adriana O.; UEDA-NAKAMURA, Tânia; *et al.* Recent advances in leishmaniasis treatment. **International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. e525-532, 2011.

- TOMIOTTO-PELLISSIER, Fernanda; BORTOLETI, Bruna Taciane da Silva; ASSOLINI, João Paulo; *et al.* Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.02529>>. Acesso em: 18 mar. 2022.
- TOSI, S.; KOSTADINOVA, N.; KRUMOVA, E.; *et al.* Antioxidant enzyme activity of filamentous fungi isolated from Livingston Island, Maritime Antarctica. **Polar Biology**, v. 33, n. 9, p. 1227–1237, 2010.
- UZUN, Soner; GÜREL, Mehmet S.; DURDU, Murat; *et al.* Clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of cutaneous leishmaniasis in Turkey. **International Journal of Dermatology**, v. 57, n. 8, p. 973–982, 2018.
- VAN GRIENSVEN, Johan; DIRO, Ermias. Visceral leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 309–322, 2012.
- VARRELLA, Stefano; BARONE, Giulio; TANGHERLINI, Michael; *et al.* Diversity, Ecological Role and Biotechnological Potential of Antarctic Marine Fungi. **Journal of Fungi (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 5, p. 391, 2021.
- VERMA, G. K.; VERMA, Santwana; SHANKER, Vinay; *et al.* A rare case of diffuse cutaneous leishmaniasis in an immunocompetent patient from sub-Himalayan India. **Tropical Doctor**, v. 42, n. 4, p. 237–239, 2012.
- VÍTEK, Petr; ASCASO, Carmen; ARTIEDA, Octavio; *et al.* Discovery of carotenoid red-shift in endolithic cyanobacteria from the Atacama Desert. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 11116, 2017.
- WASUNNA, Monique K.; RASHID, Juma R.; MBUI, Jane; *et al.* A phase II dose-increasing study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 5, p. 871–876, 2005.
- WILKINSON, David M.; CREEVY, Angela L.; KALU, Chiamaka L.; *et al.* Are heterotrophic and silica-rich eukaryotic microbes an important part of the lichen symbiosis? **Mycology**, v. 6, n. 1, p. 4–7, 2015.
- WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 2, p. 221–271, 1987.
- WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 11, p. 5088–5090, 1977.
- WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 12, p. 4576–4579, 1990.

YILMAZ, Pelin; PARFREY, Laura Wegener; YARZA, Pablo; *et al.* The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. Database issue, p. D643–D648, 2014.

YIM, Sung-Kun; KIM, Inhee; WARREN, Boyd; *et al.* Antiviral Activity of Two Marine Carotenoids against SARS-CoV-2 Virus Entry In Silico and In Vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, p. 6481, 2021.

ZERAIK, Maria Luiza; YARIWAKE, Janete Harumi. Extração de β -caroteno de cenouras: uma proposta para disciplinas experimentais de química. **Química Nova**, v. 31, p. 1259–1262, 2008.

ZHANG, Yan; TAN, Choon Yong; SPJUT, Richard W.; *et al.* Specialized metabolites of the United States lichen *Niebla homalea* and their antiproliferative activities. **Phytochemistry**, v. 180, p. 112521, 2020.

ZUCCONI, Laura; CANINI, Fabiana; TEMPORITI, Marta Elisabetta; *et al.* Extracellular Enzymes and Bioactive Compounds from Antarctic Terrestrial Fungi for Bioprospecting. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 18, p. 6459, 2020.

ZULFIQAR, Bilal; SHELPER, Todd B.; AVERY, Vicky M. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 10, p. 1516–1531, 2017.

Antioxidant enzyme activity of filamentous fungi - ProQuest. Disponível em: <<https://www.proquest.com/docview/745961573>>. Acesso em: 17 mar. 2022.

Cutaneous leishmaniasis | DNDi. Disponível em: <<https://dndi.org/diseases/cutaneous-leishmaniasis/>>. Acesso em: 21 ago. 2022.

IAATO & The Antarctic Treaty. Disponível em: <<https://iaato.org/about-iaato/the-antarctic-treaty/>>. Acesso em: 18 mar. 2022.

Leishmaniasis. Disponível em: <<https://www.who.int/westernpacific/health-topics/leishmaniasis>>. Acesso em: 16 mar. 2022.

Leishmaniasis. Disponível em: <<https://www.who.int/westernpacific/health-topics/leishmaniasis>>. Acesso em: 18 mar. 2022.

Leishmaniasis in the Americas. Treatment Recommendations. p. 60, .

Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico]. p. 191, .

Publicações | DNDi América Latina. Disponível em: <<https://www.dndial.org/comunicacao/publicacoes/>>. Acesso em: 21 ago. 2022.

TabNet Win32 3.0: LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Brasil. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/ltabr.def>>. Acesso em: 18 mar. 2022.

TabNet Win32 3.0: LEISHMANIOSE VISCERAL - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Brasil. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/leishvbr.def>>. Acesso em: 18 mar. 2022.

Visceral leishmaniasis | DNDi. Disponível em: <<https://dndi.org/diseases/visceral-leishmaniasis/>>. Acesso em: 21 ago. 2022.

9 APÊNDICE

Review research

Antitumor and antiparasitic activity using bioproducts extracted from bacteria: a systematic review.

Abstract

Background: Bacterial microorganisms have a vast collection of metabolites that are still underexplored. Bacterial bioprospecting is becoming a growing part of the search for candidate biomolecules for drug prototypes. Therefore, the present study aimed to prove, through a systematic review of the literature in electronic databases, the potential of bioproducts synthesized by bacteria and their wide application in the fight against pathologies of global importance, especially for cancer and parasites. **Methods:** Electronic searches were performed in 3 databases: PUBMED (2017 to 2022), MEDLINE (2017 to 2022), and ScienceDirect (2017 to 2022). Data extraction was performed according to the characteristics of each study. The selection of articles was performed according to inclusion and exclusion criteria. **Results:** After searching the literature and applying the eligibility criteria, 45 articles were included in the present study. The predominant bacterial genera were: *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp, *Pseudomonas* sp, *Rhodococcus* sp, and other genera were reported at a lower frequency. The most used test to assess the potential of bacterial byproducts was the MTT colorimetric assay. **Conclusion:** The data obtained in the present study reinforce the range of possibilities of these microorganisms due to their bioactive molecules and their innovative and therapeutic potential in the fight against oncological and parasitic diseases.

Keywords: Natural products, antiparasitic agents, antitumor agents, bacterial extracts, bacterial diversity.

Background

Microorganisms consist of microscopic biological beings that can vary from millimeters to nanometers in size and are distributed in all ecosystems forming diverse microenvironments that can interact or compete to establish their microbial communities in the environment are inserted (BRAGA et al. 2016). The success in inhabiting the settings of the earth, mainly those adverse to the vast majority of living beings, is primarily attributed to their high adaptive capacity and metabolic versatility, ensuring their survival in these places, especially bacteria and fungi (MAUCHLINE; MALONE. 2017). These play a crucial role in all biomes. They are responsible for several existing biogeochemical processes, including cycling of matter in soils, nutrient fixation, biodegradation, and other natural processes, ensuring the stability of ecosystems (ASHFAQ MY et al. 2022).

Biotechnological processes are increasingly being perfected aiming at the exploration of microbiomes in the most diverse places on earth, opening new paths for the discovery of viable alternatives to combat global problems, mainly in the health area (TIMMYS et al. 2020). Microorganism biotechnology is becoming a growing one, due to a range of applications in the most diverse areas (TIMMYS et al. 2020).

Currently, much is said about natural products, and it is not just now that the importance of these products has been studied for the discovery of promising drugs with pharmacological action for different diseases such as cancer, bacterial, parasitic, and viral infections, and autoimmune diseases (GULLO et al. 2005; MC CARTHY et al. 2019; TIMMIS et l. 2020). These products can come from plants, microorganisms, and animal sources that can produce bioactive compounds with potential action for parasitic agents, such as malaria and leishmaniasis, obtained from the genus *Trichoderma* (CARIACO et al. 2018; LOPES et al. 2020). Parasiticide for *Leishmania amazonensis* and immunomodulatory action were also

observed in experiments involving *Platonia insignis*, showing the importance of the study with natural products (BEZERRA et al. 2022).

Bioactive compounds from bacteria have also been researched to discover active substances with prospects for new drugs. Bioactives with potential anti-cancer action have been isolated from *Streptomyces* found in mangroves (LAW et al. 2020). This same action was also seen by Li et al. (2018) in a study with a subspecies of *Serratia marcescens*, demonstrating its antineoplastic activity on human choriocarcinoma and prostate cancer cell lines. Marine bacteria, in turn, have shown the importance of the discovery of secondary products with antibacterial action and may be promising for the treatment of infections caused by bacteria resistant to available antibiotics (SRINIVASAN et al. 2021).

The discovery of new drug prototypes is essential for several pathologies; however, as parasitic diseases, considered neglected diseases by the World Health Organization (WHO. 2020) and cancer is the second leading cause of death in the world (PAHO. 2020), associated with the fact that the drugs used in the therapeutic routine these diseases have a high degree of toxicity (PINART et al. 2020; KAWASUMI et al. 2021), it is necessary to discover new drugs, with reduced toxic action, which can be observed more frequently in compounds derived from natural products, especially for anticancer drugs. (LI et al. 2018).

The present study aimed, through a systematic review of the literature in specific databases, evidence of the effectiveness of bacterial bioproducts as a promising alternative in the fight against the various types of cancer and existing parasites.

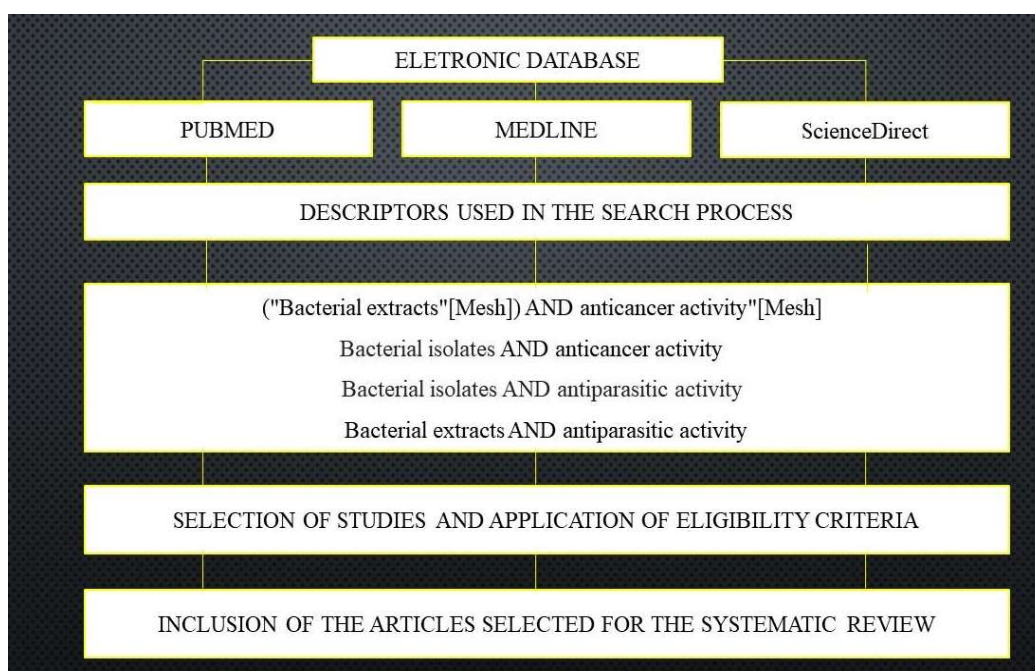
Methods

The literature review started in January and ended in February 2022 in the electronic databases: PubMed (National Library of Medicine/NLM), MEDLINE (Medical Literature Analysis and Retrieval System Online), and ScienceDirect.

The descriptors used in the review were: bacterial extracts AND antitumor activity, bacterial isolates AND antitumor activity, bacterial extracts AND antiparasitic activity, and bacterial isolates AND antiparasitic activity in english. As a time, limit, the period between 2017 and 2022 was used.

The inclusion criteria used in the search were: articles published with the keywords in the title, abstract, or full text; papers that were published in full and year and language of publication of the article, original articles with an in vitro/in vivo experimental design that tested the antitumor and antiparasitic potential of bacterial bioproducts (extracts/isolated compound) exhibiting at least one active bioproduct.

For the selection of manuscripts, two independent researchers first selected the articles according to the title, then the abstract, and then through an analysis of the publication of the full text. The resulting papers were manually reviewed to identify and exclude works duplicated that did not meet the criteria described above.



Results

Articles were selected according to inclusion and exclusion criteria. In total, 1,331 articles were found using all the descriptors: Bacterial extracts and antitumor activity, Bacterial

isolates and antitumor activity, Bacterial extracts and antiparasitic activity, and bacterial isolates antiparasitic activity in all databases researched.

PUBMED was the database with the most significant number of manuscripts, with 1,310 articles. After analyzing the title, abstract and full text and excluding duplicate articles found in the databases, articles that met the criteria were selected, totaling 45 articles (Table 1).

The articles were coded with the acronym SA- which corresponds to the initials of “Selected Articles,” followed by the article number in descending order of publication date. Articles referring to antitumor activity are summarized in (Table 2) and those referring to antiparasitic activity in (Table 3).

Table 1 - Number of articles found and selected in the systematic review using different databases and descriptors.

Database	Descriptors	Results	Selected
PUBMED	("Bacterial extracts"[Mesh]) AND anticancer activity"[Mesh]	427	34
	Bacterial isolates AND anticancer activity	385	12
	Bacterial isolates AND antiparasitic activity	351	18
	Bacterial extracts AND antiparasitic activity	147	14
MEDLINE	Bacterial extracts AND anticancer activity	13	4
	Bacterial isolates AND anticancer activity	4	1
	Bacterial isolates AND antiparasitic activity	2	0
	Bacterial extracts AND antiparasitic activity	1	0
ScienceDirect	Bacterial extracts AND anticancer activity	0	0
	Bacterial isolates AND anticancer activity	0	0
	Bacterial isolates AND antiparasitic activity	0	0
	Bacterial extracts AND antiparasitic activity	1	1
Total:		1,331	84
Total articles selected after excluding duplicates:			45

The articles were coded with the acronym SA- which corresponds to the initials of “Selected Articles,” followed by the article number in descending order of publication date. Articles referring to antitumor activity are summarized in (Table 2) and those referring to antiparasitic activity in (Table 3). The papers did not present any item suggested in the tables were added the acronyms (NR) were not reported.

Table 2 - *In vitro* studies of antineoplastic activity of natural products selected in the systematic review, summarized by year of publication.

Bacteria	Compounds	Cells line	Concentration treatment	Time of exposure	Dose or IC ₅₀	Assay	Reference
Endophytic and rhizosphere Gram-positive bacteria from <i>Ibervillea sonora</i> , <i>Micromonospora echinospora</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Methanol extracts Ethyl acetate extracts	L5178Y-R Lymphoma	15.62 µg/mL to 500 µg/mL	48h	34.41 ±1.472 26 ± 1.404	Cytotoxicity test (MTT)	[SA-1] ROMERO-ARGUELLES et al., 2022.
Gram-positive microorganisms isolated from nudibranchs	Ethyl acetate extract	Ehrlich's ascites carcinoma	500 µg/mL	2h	—	Trypan blue assay	[SA-2] ABDELRAHMAN et al., 2021.
Endophytic actinobacteria of <i>Hymenachne amplexicaulis</i>	Methanolic extracts	B16-F10	0.2 µg/mL 2 µg/mL 200 µg/mL	72h	—	Resazurin assay	[SA-3] ASSAD et al., 2021.
<i>Bacillus atrophaeus</i>	Bacterial cytoplasmic extract	MCF7 U87		24h 48h	-	Cytotoxicity test (MTT)	[SA-4] ASADI et al., 2021.
<i>Rhodococcus sp.</i>	Ethyl acetate	PC3	10 µg/mL 100 µg/mL	48h	—	Cytotoxicity test (MTT)	[SA-5] ESPOSITO et al., 2021.
<i>S. aureus</i>		CML K562 T-ALL Jurkat CEM/VCR-R CCRF-CEM HL-60 MCF-7 HepG2			—		[SA-6] MEBNER et al., 2021.

HUH7 HCC MDA-MB-231							
<i>Pantoea agglomerans</i> ZMR7	Levan-type exopolysaccharide	RD MDA-MB- 231 ATCC HTB-26	9 µg/ml 39 µg/ml 78 µg/ml 156 µg/ml 312 µg/ml 625 µg/ml 1.250 µg/ml 2.500 µg/ml	24h		Cytotoxic ity test (MTT)	[SA-7] QAYSI et al., 2021.
<i>Vibrio alginolyticus</i> 364	Exopolysaccharide EPS364	Bel-7402 Huh7.5	0.5 mg/mL	72h	–	Cytotoxic ity test (MTT)	[SA-8] WANG et al., 2021.
<i>Bacillus cereus</i> A1-5, <i>Streptomyces noursei</i> H1-1		Caco-2	3.9 µg/mL 1000 µg/mL	48h	8.9 ± 0.5 5.6 ± 3.0	Cytotoxic ity test (MTT)	[SA-9] ALSHARIF et al., 2020.
<i>Bacillus velezensis</i> SN-1	Capsular polysaccharides (CPS)	HepG-2	50–2000 µg/mL	24h 48h 72h		Cytotoxic ity test (MTT)	[SA-10] CAO et al., 2020.
<i>Bacillus toyonensis</i> BV-17	Hemolysin BL	HCT116 Hela B16-F10 A549 EC-6	10 µg/mL	48h	-	CCK-8 assay	[SA-11] CHEN et al., 2020.
[NB] HM134T	Methanolic extract	HCT-116 HepG2-A549	100 µg/mL 20 µg/mL	48h	38.4 µg/mL	CCK- 8 assay	[SA-12] FU et al., 2020.
<i>Halomonas</i> sp.		HepG2	20 µg/mL 40 µg/mL	24h	68 ± 1,8 µg/mL	Cytotoxic ity test (MTT)	[SA-13] GARAWANI et al., 2020.

<i>Lactococcus lactis</i>	Cell wall Cytoplasmic extract Nisin	SW480	50 µg/ml 2000 µg/ml	24h	NR	Cytotoxic ity test (MTT)	[SA-14] HOSSEINI et al., 2020.
<i>Rhodococcus wratislaviensis</i>	Trehalose lipid	MCF7 MDA-MB231 MCF10A	10 to 100 M	24h 48h	-	Cytotoxic ity test (MTT)	[SA-15] NIKOLOVA et al., 2020.
<i>Pseudomonas stutzeri</i> (MH191156)		HeLa cells	5 µg/mL	24h		Cytotoxic ity test (MTT)	[SA-16] RAJKUMAR et al., 2020.
<i>Streptomyces</i>	Nybomycins	A549 PC3	-	-	-	-	[SA-17] WANG XIACHANG et al., 2020.
<i>Micromonospora yangpuensis</i>	10-membered anthraquinone-fused enediynes, yangpumycin (YPM)	A549 Jurkat		24h 72h	-	Cytotoxic ity test (MTT)	[SA-18] WANG ZILONG et al., 2020.
<i>Streptomyces</i> sp. AD-3-6	Nibomycins Deoxyniboquinone α-rubromycin β-rubromycin γ-rubromycin	Lung A549 Prostate PC3		16h 48h			[SA-19] WANG et al., 2020.
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Protein, p8	DLD-1 HT-29	1 mg/kg, 10 mg/kg 20 mg/kg	120h	-	<i>In vitro</i> assay	[SA-20] AN et al., 2019.
<i>Asparagopsis armata</i> -Associated bacteria	Methanol dichloromethane	HepG2 MCF-7	1 mg/mL	24h	-	Cytotoxic ity test (MTT)	[SA-21] HORTA et al., 2019.
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Romidepsin derivatives chromopeptide A romidepsin	SW620 HL60 A549		72h	12,5, 6,7 5,7 nmol·L ⁻¹	Cytotoxic ity test (MTT)	[SA-22] LEI et al., 2019.

	valine-leucine dipeptide						
<i>Limnothrix sp</i>	C-phycocyanin (C-PC)	MCF-7 cell		24h 48h 72h	- 5,92µg/µl - 5,66µg/µl 72 h - 4,52µg/µl	Cytotoxicity test (MTT)	[SA-23] SAFAEI et al., 2019.
Bacterial endophytes from <i>Crinum macowanii</i>	Ethyl acetate extract	U87MG A549		72h		Cytotoxicity test (MTS)	[SA-24] SEBOLA et al., 2019.
Cyanobacterial strain S	Aqueous and organic cyanobacterial cell extract	MOLM-13	4µL 1µL	24h	-	-	[SA-25] SHISHIDO et al., 2019.
<i>Streptomyces nigra sp. nov</i>	452T extracts	HCT-116 A549 SF-268 HepG2	20 µg/mL 100 µg/mL 200 µg/mL	48 h	cyclo (Pro-Ala): 18.5 µg/mL cyclo (Pro-Met)27.3µg/mL cyclo (Phe-Pro) : 32.3 µg/mL cyclo (Pro-Ala) : 47.6 µg/mL	Cytotoxicity test (MTT)	[SA-26] CHEN et al., 2018.
							[SA-27] HUSSAIN et al., 2018.
<i>Pseudomonas sp.</i>		A2058 MCF7 HT29	50 µM 100 µM 150 µM	72h		MTS assay	[SA-28] KRISTOFFERS EN et al., 2018.
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Exopolissacarídeos (EPSs) EPS-1a, EPS-2a EPS-3a	HepG2	50 g/mL 100 g/mL 200 g/mL 400 g/mL	24h		Test of EPS	[SA-29] SUN et al., 2018.

Endophytic bacteria	Methanolic extract	–	-	-	Protein kinase inhibition assay	[SA-32] RAHMAN et al., 2017.
---------------------	--------------------	---	---	---	---------------------------------	------------------------------

Unidentified matches the NI abbreviations in the table. articles included in the study that report new bacterial organisms are represented in the table by the abbreviation [NB = new bacteria].

Table 3 - *In vitro* studies of antiparasitic activity of natural products selected in the systematic review, summarized by year of publication.

Bacteria	Compounds	Parasite	Dose or IC ₅₀	Reference
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactin	<i>Meloidogyne incognita</i>	35 ppm surfactin	[SA-36] NADEEM et al., 2021.
Bacterial symbionts isolated from marine sponges of the <i>Erylus</i> genus	Acetone extract	<i>T. cruzi</i> Tulahuen C4	-	[SA-37] SANTOS et al., 2020.
<i>Streptomyces</i> species	Ethyl acetate extracts	<i>T. gondii</i> <i>P. falciparum</i>	122,2 ng/ml 163,8 ng/ml.	[SA-38] PAGMADULA M et al., 2020.
<i>Photorhabdus luminescens</i> <i>Xenorhabdus nematophila</i>	Crude bacterial extract	<i>Trypanosoma cruzi</i>	1,0 mg/mL 0,34 mg/mL	[SA-39] ANTONELLO et al., 2019.
<i>Actinomycetales</i>	Methanolic extract	<i>T. cruzi</i> Tulahuen C4	5 mL	[SA-40] SANTOS et al., 2019.
River Nile derived-microorganisms	Ethyl acetate extracts	<i>L. donovani</i> <i>P. falciparum</i> D6 <i>P. falciparum</i> <i>Trypanosoma brucei</i>	0.8 and 0.96 µg/mL, 25,94 and 27,28 µg/mL 25.94 and 27.28 µg/mL.	[SA-41] LOTFY et al., 2019.

<i>Chromobacterium violaceum</i>	Violacein	<i>T. cruzi</i> Y	24 h 51.39± 10 48h 104.7± 11 72 h 67.78± 14	[SA-42] CANUTO et al., 2019.
Bacterial endophytes	Ethyl acetate extracts	<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	-	[SA-43] PONPANDIAN et al., 2019.
<i>Xenorhabdus innexi</i>	Rhabdopeptide/ Xenortide-like peptides (RXPs)	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Leishmania donovani</i> <i>Plasmodium falciparum</i>	0,07-6,25 µM. 5.49 - 4.31 µM) 0,091-3,16 µM.	[SA-44] ZHAO et al., 2018.
<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Brevibacterium</i> <i>Bacillus</i>	Chitinases Collagenases Proteases Lipase.	<i>Meloidogyne ethiopica</i> <i>Xiphinema index</i>	NI	[SA-45] ABALLAY et al., 2017.

Unidentified matches the NI abbreviations in the table. articles included in the study that report new bacterial organisms are represented in the table by the abbreviation [NB = new bacteria]

4.1 Antitumor potential of bacterial metabolites

The spontaneous regression of cancer after an infectious process is a phenomenon that has been described for many centuries, however the exploration of microbial products for the development of the anticancer intervention was only indeed recognized in the 1890s, from the studies carried out by the surgeon William B. Coley, who used the combination of heat-inactivated *Streptococcus pyogenes* and *Serratia marcescens* in the treatment of patients with inoperable malignant tumors, successfully reducing tumor mass (LOU et al., 2021; WIEMANN; STARNES, 1994). Recent research reveals that the success of bacterial-mediated oncotherapy is mainly due to enhanced activation of the immune system but also involves the release of bioactive bacterial compounds such as antibiotics (Actinomycin D, Bleomycin, Doxorubicin, and mitomycin), bacteriocins (Nisin A, Pediocin, Plantaricin A and Pyocin S2), enzymes (Arginine deiminase and L-Asparaginase) and toxins (Botulinum neurotoxin type A, Diphtheria toxin, Exotoxin A, Listeriolysin O) (LALIANI et al., 2020; MOHAN et al., 2021).

According to the references, of the 30 studies included in this review, six studies used bioproducts extracted from bacteria belonging to the genus *Bacillus* sp. (representing 20% of the total), four used bioproducts from *Streptomyces* sp. (about 13.33% of the total), two studies used *Pseudomonas* sp. and two studies used *Rhodococcus* sp. (each gender representing 6.66% of the total). The other studies used bioproducts extracted from different genera of bacteria (16, representing 53.33% of the total of evaluated studies), especially endophytic bacteria.

Tumor cell lines were also distinct among the 30 studies. Most studies evaluated the antitumor activity of bacterial bioproducts from liver tumor cells (HepG2, Bel-7402 and Huh7.5), about 10 studies (33.33% of the total). Nine studies (30% of the total) evaluated antitumor activity in colorectal cancer cells, eight studies included lung tumor cells (26.66% of the total), six studies evaluated cytotoxic activity against breast cancer cells (20% of the total), three studies evaluated antineoplastic activity against melanoma, three against leukemia

(representing 10% of the total, each), two studies assessed the activity against prostate tumor cell lines and two against cervical cancer cell lines (6.66% of the total). The antitumor activity was also evaluated against other cancers, such as lymphoma, rhabdomyosarcoma, and ascitic carcinoma of Ehrlich.

Among the articles analyzed in this work, 12 of them (about 40%) performed the antitumor evaluation from crude extracts or fractions in most of the studies. Regarding the production of extracts, the primary solvents used were ethyl acetate, methanol, and dichloromethane. In addition, it was observed that the researchers sought to establish distinct prospecting strategies to enhance the discovery of active metabolites from bacteria, such as the use of endophytic bacteria, nanoparticles, and exopolysaccharides (EPSs).

EPSs or extracellular polysaccharides are complex biopolymers characterized by high molecular weight and their composition of sugars and other substances such as proteins, lipids, humic substances, or extracellular DNA (RANA; UPADHYAY, 2020). Many microorganisms can synthesize EPSs with new chemical compositions and with a high potential for discovering active metabolites, which are helpful for the pharmaceutical industry (ANDREW; JAYARAMAN, 2020). In the study developed by AI-QAYSI et al. (2021) [SA-7] the exopolysaccharide levan produced by *Pantoea agglomerans* ZMR7 was characterized and evaluated by the MTT colorimetric assay at concentrations from 19 to 2,500 µg/ml for 24h. the following cancer cell lines were tested: BGC-823 (human gastric cancer), A549 (human lung adenocarcinoma), HepG2/C3A (human liver hepatocellular carcinoma), AGS (human gastric adenocarcinoma) and MCF-7 (human breast adenocarcinoma). Their findings revealed potent inhibitory activity in the tested strains.

ABDELNASSER et al. (2017) [SA-30] investigated the antitumor potential of exopolysaccharides synthesized by marine bacteria from Egypt. The bacterial byproducts were submitted to HPLC, and uronic acids and ennoph functional groups were evidenced. The

extracts were tested by the MTT assay at concentrations between 125 to 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for 24h and HepG2 hepatocellular carcinoma. *Bacillus* sp. producing EPS-6 showed the highest cytotoxicity with IC_{50} (218 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and the highest percentage of sulfur (46%) compared to the other extracts produced. In the study by CAO et al. (2022) [SA-10] the ability of capsular polysaccharides (CPS) produced by *Bacillus velezensis* to inhibit the proliferation of HepG-2 cancer cells was evaluated. The MTT colorimetric assay was used for evaluation at 24,48,72h at concentrations ranging from 50–2000 $\mu\text{g/mL}$.

SUN et al. (2018) [SA-29] reported that EPSs from *Streptococcus thermophilus* showed antitumor activity against HepG2 human liver cancer cells *in vitro* through cell apoptosis, causing typical morphological changes in the cell lineage. WANG et al. (2021) [SA-8] describes the antitumor activity of EPS purified from *Vibrio alginolyticus* via induction of apoptosis, and dissipation of mitochondrial membrane potential (MMP) and generation of reactive oxygen species (ROS) in Huh7.5 liver cancer cells. HASSAN et al. (2017) [SA-31] evidenced the antitumor activity of exopolysaccharides from marine *Bacillus subtilis* SH1 in cells of different MCF-7, HCT-116 and HepG2 lineages.

ARGUELLES et al. (2022) [SA-1] demonstrated the anticancer activity of extracts of gram-positive endophytic bacteria and the rhizosphere of *Ibervillea sonoe*. The bacterial extracts from strains ISE-B22, ISE-B26, ISE-B27, ISS-A01, ISS-A06, and ISS-A16 showed significant ($p < 0.05$) L5178Y-R cell growth inhibition, compared with an untreated control. *Micromonospora echinospora* isolate ISS-A16 showed the highest (90.48%) percentage of lymphoma cells growth inhibition and SI (19.1) for PBMC. Furthermore, *Bacillus subtilis* ISE-B26 isolate caused growth inhibition (84.32%) and a SI of 5.2. In another similar study, SEBOLA et al. (2019) [SA-24] with bacterial endophytes, the antitumor activity against U87MG, A549 cell lines was evaluated using the cytotoxicity assay (MTS) at concentrations

of 3.13 to 12.5 $\mu\text{g/mL}$ for 4 days. The extracts were produced with ethyl acetate and showed 50% cell inhibition.

Based on the results described so far, endophytic bacteria prove to be strong candidates for producing active biomolecules with a range of possibilities. ASSAD et al. (2021) [SA-3] produced methanolic extracts of endophytic actinobacteria and tested them in B16-F10 murine melanoma using a resazurin cytotoxic assay at a concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$ for 72h. The bacterial extracts were found to be active for cancer cells.

CHEN et al. (2020) [SA-11] in their research evaluated bacterial isolates from the microbiota of healthy patients and individuals with colorectal cancer (CRC). A new *Bacillus toyonensis* BV-17 was isolated from fecal samples from healthy patients. The tumor cell lines HCT116, Hela B16-F10, A549, and EC-6 were tested by the CCK-8 assay at a 10 $\mu\text{g/mL}$ concentration for 48 hours. *Bacillus* in healthy donors is common but absent in patients with CRC. The bacterial supernatant containing a hemolysin BL (HBL), tested *in vitro*, could kill several tumor cells in a short time, suggesting a model for future chemotherapeutic agents. HASSAN's research; IBRAHIM. (2017) [SA-31] sought the optimization of EPS by *Bacillus subtilis* SH1 from marine regions and the characterization and investigation of different applications. The HPLC chromatogram showed that EPS was a heteropolysaccharide consisting of maltose and rhamnose. EPS demonstrated an antitumor effect on tumor cell lines (MCF-7, HCT-116 and HepG2) using the ELIZA test at concentrations from 1.56 to 50 $\mu\text{g/mL}$ in 24h.

FU et al. (2020) [SA-12] in their research isolated a new bacterial strain, designated HM134T, from *Avicennia marina*, a sample collected in Chinese mangrove soil. The phylogeny based on the 16s rRNA indicates belonging to the genus *Micromonospora zhangzhouensis*. The extract produced was tested by CCK-8 viability assay at concentrations from 20 to 100 $\mu\text{g/mL}$ for 48h, and cytotoxicity was found against human cancer cell lines HepG2, HCT-116 and

A549. The most significant cytotoxic effect was observed in HCT-116 cells, with an IC₅₀ of 38.4 µg/mL.

KRISTOFFERSEN et al. (2018) [SA-28] in their research with fractionated or purified extracts, produced from secondary metabolites of *Pseudomonas* sp. Arctic marine, evaluated the anticancer activity on human melanoma cells A2058, human carcinoma MCF7 and human colon carcinoma HT29. The MTS assay was used to assess the viability of these cells at concentrations ranging from 50 to 150 µM, the results showed that bacterial byproducts exposed for 72h exhibited antitumor activity.

The research by HORTA et al. (2019) [SA-21] with bacteria associated with *Asparagopsis armata* aimed to verify the antitumor and antimicrobial potential of the metabolites from these microorganisms. Several extracts were produced using methanol and dichloromethane as solvents, several bacterial genera were evaluated *in vitro* in human cell lines derived from hepatocellular cells (HepG-2) and breast carcinoma (MCF-7) by the MTT method at a concentration of 1 mg/ mL for 24h. Extracts produced from *Shewanella* sp. and titled ASP 26 and ASP 101 had the highest percentage of antitumor inhibition and exhibited an IC₅₀ of 22.63 µg/mL (18.24-28.07) and 10.10 µg/mL (8.40-12.14), respectively.

4.2 Antiparasitic potential of bacterial metabolites

In their study, VIVERO et al. (2019) [SA-X] evaluated the antimicrobial and antiparasitic activity of 12 bacterial strains isolated from the gut microbiota of *Lutzomyia evansi*. It was observed that the methanolic extract of *Enterobacter hormaechei* showed leishmanicidal activity against *Leishmania braziliensis* promastigote with EC-50 of 47.7 + 3.8µg/ml. However, none of the sections of the isolated bacteria showed activity against *Leishmania chagasi*.

Bioactive compounds from bacteria also show activity against other protozoa. The work carried out by SANTOS et al. (2020) [SA-37] was isolated from the genus *Corylus*'s marine

sponges, twelve strains of the phylum Firmicutes, and thirty-four lineages of the phylum Proteobacteria. When the extracts from the medium-sized extraction were tested against the parasite *T. cruzi* Tulahuen C4, it was observed that only two sections of the *E. faecalis* strain #118_3 (IN-CRY) had 81% inhibition. In addition, the work conducted by the same author in 2019[SA-40] showed that extracts from Berg 02-78 proved to be bioactive against *T. cruzi* Tulahuen C4 (SANTOS et al., 2019) [SA-37]. Another study also evaluated the activity against the protozoan *T. cruzi* Y strain. CANUTO et al. (2019) [SA-42] demonstrated the antichagasic activity of violacein, a bacterial pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. This pigment shows action against all evolutionary forms of the parasite and induces cell death by apoptosis.

LOFTY et al. (2019) [SA-41] evaluated the antiprotozoal activity of ethyl acetate extracts from microorganisms isolated from the Nile River. It was observed that the sections did not show leishmanicidal action against promastigotes and axenic amastigotes of *L. donovani*. However, RN-205 (*S. Indians* At5) and RN-011 (*Bacillus* sp. RN-011) extracts showed high antitrypanosomal activity with IC₅₀ between 0.8 and 0.96 µg/mL, respectively. As for antimalarial activity, extracts of isolate RN-003 (*Bacillus safeness* NBRC 100820) exhibited moderate antiplasmodial activity against *P. falciparum* D6 and *P. falciparum* W2 (IC₅₀ = 25.94 and 27.28 µg/mL), respectively.

PAGMADULAM et al. (2020) [SA-38] Produced ethyl acetate extracts of actinomycetes extracted from Mongolian soil and evaluated their antiparasitic activity. It was observed that the crude extract of *S. bacillaris* (N18) and *S. canus* (N25) exhibited significant activities against *T. gondii* (RH-GFP) and *P. falciparum* (3D7), respectively. Furthermore, fractions 8 and 9 of the crude extract of *S. canis* showed activity against *T. gondii* and *P. falciparum*,

respectively. Fraction 9 had a higher activity against *T. gondii* (IC₅₀:122.2 ng/ml, SI: 239.7) and *P. falciparum* (IC₅₀:163.8 ng/ml, SI: 178.8).

ZHAO; KAISER; BODE (2018) [SA-44] tested seven new rhabdopeptides/xenortides-like peptides (RXPs) with putrescine or ammonia as the C-terminal amines against *T. brucei rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, and *Plasmodium falciparum*. All compounds tested showed strong against *T. brucei rhodesiense* and *P. falciparum*, with IC₅₀s of 0.07-6.25 and 0.091-3.16 μ M, respectively.

In addition to fighting human parasites, bacterial extracts and isolates are also effective against plant parasites. ABALLAY et al. (2017) [SA-45] evaluated the nematicidal activity of rhizobacteria against *Meloidogyne ethiopia* and the *Xiphinema index*. For the experiment, bacterial filtrates were used against the mobile stages of the *X. index* and J2 of *M. ethiopia*. The *P. fluorescens* PF805PU filtrate showed nematicidal activity from 24 hours on in *X. index* and after 72 hours on *M. ethiopia* larvae, reaching 75.8 and 93.7%, respectively. The filtrate of *B. weihenstephanensis* FB25M showed activity for both species. Already the filtrate FB25M affected the hatching of eggs with a value of 66.4%. *Brevibacterium frigoritolianos* FB37BR showed the lowest mortality value of the parasites when compared to the others.

NADEEM et al. (2021) [SA-36] used surfactin molecules from *Bacillus subtilis* against *Meloidogyne incognita*. In the study, a mortality of 85% of nematode eggs was observed after 96 hours of exposure to 35 ppm of surfactin. After the same period, the ovicidal activity of 83.97% was observed after incubation at 35 ppm of surfactin. In addition, a reduction in the mass of nematode eggs and root galling was observed. Thus, the study showed that cell suspensions are great allies in the fight against nematodes.

DUONG et al. (2021) [SA-35] showed that endophytic bacteria isolated from coffee roots and seeds of *Coffea canephora* and *Coffea liberica* from Vietnam can exert activity against nematodes. The molecular identification of microorganisms belonging to the phyla was

performed; *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* and genera; *Nocardia*, *Bacillus* and *Burkholderia*. Five isolates belonging to the genus *Bacillus* led to 100% mortality in 24 h in both *R. audiophiles* and *P. coffee*.

Conclusion

Based on the findings of the literature used for this systematic review, the pharmacological potential of byproducts from bacteria is evident, especially in the fight against cancer and parasitic diseases. The reported data open new precedents for the exploration of bacterial metabolites by the pharmaceutical industry and in the service of biotechnology with a gram of applications. Bacteria have a wide metabolic range, and in many cases, these bioactive compounds are potentiated due to association with other organisms, such as plants and algae and contributed significantly to a high metabolic versatility to be explored. The present study provided a broad view regarding the exploration of bioproducts synthesized by bacteria and their possible applications against the most diverse types of cancer and parasites. However, there is still a long way to go. The exploitation of these microorganisms is still very low, and the research, in short is still being carried out in vitro studies. The findings of this review and the consulted literature reinforce the importance of using active bioproducts from bacteria as a viable alternative in the fight against cancer and parasitic diseases.

References

- Aballay, E et al. "Nematicidal effect of rhizobacteria on plant-parasitic nematodes associated with vineyards." *World journal of microbiology & biotechnology* vol. 33,7 (2017): 131. doi:10.1007/s11274-017-2303-9.
- Abdelnasser, Salma M et al. "Antitumor Exopolysaccharides Derived from Novel Marine Bacillus: Isolation, Characterization Aspect and Biological Activity." *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP* vol. 18,7 1847-1854. 27 Jul. 2017, doi:10.22034/APJCP.2017.18.7.1847
- Al-Qaysi, Safaa A S et al. "Bioactive Levan-Type Exopolysaccharide Produced by *Pantoea agglomerans* ZMR7: Characterization and Optimization for Enhanced Production." *Journal of microbiology and biotechnology* vol. 31,5 (2021): 696-704. doi:10.4014/jmb.2101.01025
- Andrew, M., & Jayaraman, G. (2019). Structural features of microbial exopolysaccharides in relation to their antioxidant activity. *Carbohydrate Research*, 107881. doi:10.1016/j.carres.2019.107881.
- Assad, Beatriz M et al. "Endophytic actinobacteria of *Hymenachne amplexicaulis* from the Brazilian Pantanal wetland produce compounds with antibacterial and antitumor activities." *Microbiological research* vol. 248 (2021): 126768. doi:10.1016/j.micres.2021.126768
- Bray, Freddie et al. "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." *CA: a cancer journal for clinicians* vol. 68,6 (2018): 394424. doi:10.3322/caac.21492.
- Canuto, J A et al. "Antichagasic effect of violacein from *Chromobacterium violaceum*." *Journal of applied microbiology* vol. 127,5 (2019): 1373-1380. doi:10.1111/jam.14391.
- Cao, Chengxu et al. "Purification, characterization and antitumor activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus velezensis* SN-1." *International journal of biological macromolecules* vol. 156 (2020): 354-361. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.04.024.
- Chen, Can et al. "*Streptomyces nigra* sp. nov. Is a Novel Actinobacterium Isolated From Mangrove Soil and Exerts a Potent Antitumor Activity *in Vitro*." *Frontiers in microbiology* vol. 9 1587. 18 Jul. 2018, doi:10.3389/fmicb.2018.01587
- Dong, J., Zhang, Q., Wang, Z., Huang, G., & Li, S. (2018). *Recent Advances in the Development of Indazole-based Anticancer Agents*. *ChemMedChem*, 13(15), 1490–1507. doi:10.1002/cmdc.201800253.
- Duong, Benoit et al. "Identification and characterization of Vietnamese coffee bacterial endophytes displaying in vitro antifungal and nematicidal activities." *Microbiological research* vol. 242 (2021): 126613. doi:10.1016/j.micres.2020.126613.

Falzone, Luca et al. "Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium." *Frontiers in pharmacology* vol. 9 1300. 13 Nov. 2018, doi:10.3389/fphar.2018.01300.

Fu, Geyi et al. "Micromonospora zhangzhouensis sp. nov., a Novel Actinobacterium Isolated from Mangrove Soil, Exerts a Cytotoxic Activity in vitro." *Scientific reports* vol. 10,1 3889. 3 Mar. 2020, doi:10.1038/s41598-020-60677-0

GCO - GLOBAL CANCER OBSERVATORY, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 2022. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>, Acesso em: 29 fev. 2022.

Hassan, Sahar W M, and Hassan A H Ibrahim. "Production, Characterization and Valuable Applications of Exopolysaccharides from Marine Bacillus subtilis SH1." *Polish journal of microbiology* vol. 66,4 (2017): 449-461. doi:10.5604/01.3001.0010.7001.

Horta A, Alves C, Pinteus S, et al. Identification of Asparagopsis armata-associated bacteria and characterization of their bioactive potential. *Microbiologyopen*. 2019;8(11):e00824. doi:10.1002/mbo3.824

Kristoffersen, Venke et al. "Characterization of Rhamnolipids Produced by an Arctic Marine Bacterium from the Pseudomonas fluorescence Group." *Marine drugs* vol. 16,5 163. 14 May. 2018, doi:10.3390/md16050163

Holohan, Caitriona et al. "Cancer drug resistance: an evolving paradigm." *Nature reviews. Cancer* vol. 13,10 (2013): 714-26. doi:10.1038/nrc3599.

Kawada, Manabu et al. "Novel approaches for identification of anti-tumor drugs and new bioactive compounds." *The Journal of antibiotics*, 10.1038/ja.2017.97. 30 Aug. 2017, doi:10.1038/ja.2017.97.

Laliani, G., Ghasemian Sorboni, S., Lari, R., Yaghoubi, A., Soleimanpour, S., Khazaei, M., ... Avan, A. (2020). *Bacteria and cancer: Different sides of the same coin. Life Sciences*, 246, 117398. doi:10.1016/j.lfs.2020.117398.

Lotfy, Momen M et al. "Chemical Profiling and Biological Screening of Some River Nile Derived-Microorganisms." *Frontiers in microbiology* vol. 10 787. 12 Apr. 2019, doi:10.3389/fmicb.2019.00787.

Lou, X., Chen, Z., He, Z., Sun, M., & Sun, J. (2021). Bacteria-Mediated Synergistic Cancer Therapy: Small Microbiome Has a Big Hope. *Nano-micro letters*, 13(1), 37. <https://doi.org/10.1007/s40820-020-00560-9>.

Mohan, C. D., Rangappa, S., Nayak, S. C., Jadimurthy, R., Wang, L., Sethi, G., ... Rangappa, K. S. (2021). *Bacteria as a treasure house of secondary metabolites with anticancer potential. Seminars in Cancer Biology*. doi:10.1016/j.semcancer.2021.05.0.

Romero-Arguelles, Ricardo et al. "In Vitro Antitumor Activity of Endophytic and Rhizosphere Gram-Positive Bacteria from *Ibervillea sonora* (S. Watson) Greene against

L5178Y-R Lymphoma Cells.” *International journal of environmental research and public health* vol. 19,2 894. 14 Jan. 2022, doi:10.3390/ijerph19020894.

Sun, Naxin et al. “Purification, Preliminary Structure and Antitumor Activity of Exopolysaccharide Produced by *Streptococcus thermophilus* CH9.” *Molecules (Basel, Switzerland)* vol. 23,11 2898. 6 Nov. 2018, doi:10.3390/molecules23112898.

Sebola, Tendani E et al. “Evaluating antibacterial and anticancer activity of crude extracts of bacterial endophytes from *Crinum macowanii* Baker bulbs.” *MicrobiologyOpen* vol. 8,12 (2019): e914. doi:10.1002/mbo3.914

WHO - World Health Organization (2020) - Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030. Overview. 2020.

Nadeem, H et al. “Bacterial strains integrated with surfactin molecules of *Bacillus subtilis* MTCC441 enrich nematocidal activity against *Meloidogyne incognita*.” *Plant biology (Stuttgart, Germany)* vol. 23,6 (2021): 1027-1036. doi:10.1111/plb.13301.

Pagmadulam, Baldorj et al. “Isolation and characterization of antiprotozoal compound-producing *Streptomyces* species from Mongolian soils.” *Parasitology international* vol. 74 (2020): 101961. doi:10.1016/j.parint.2019.101961.

Santos, José D et al. “Bioactivities and Extract Dereplication of *Actinomycetales* Isolated From Marine Sponges.” *Frontiers in microbiology* vol. 10 727. 9 Apr. 2019, doi:10.3389/fmicb.2019.00727.

Vivero, Rafael J et al. “Enzymatic, antimicrobial, and leishmanicidal bioactivity of gram-negative bacteria strains from the midgut of *Lutzomyia evansi*, an insect vector of leishmaniasis in Colombia.” *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)* vol. 24 e00379. 18 Sep. 2019, doi:10.1016/j.btre.2019.e00379

Zhao, L., Kaiser, M., & Bode, H. B. (2018). *Rhabdopeptide/Xenortide-like Peptides from Xenorhabdus innexi with Terminal Amines Showing Potent Antiprotozoal Activity*. *Organic Letters*. doi:10.1021/acs.orglett.8b01975.

Wang, Y., Liu, G., Liu, R., Wei, M., Zhang, J., & Sun, C. (2021). EPS364, a Novel Deep-Sea Bacterial Exopolysaccharide, Inhibits Liver Cancer Cell Growth and Adhesion. *Marine drugs*, 19(3), 171. <https://doi.org/10.3390/md19030171>

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer. Geneva: World Health Organization, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>, Acesso em: 29 fev. 2022.

Wiemann, B, and C O Starnes. “Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective.” *Pharmacology & therapeutics* vol. 64,3 (1994): 529-64. doi:10.1016/0163-7258(94)90023-x