

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL – UFMS
Campus de CAMPO GRANDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR – PMBqBM - SBBq

BRUNA MIGLIORINI MELO SILVA

EFEITO DE DISSULFETOS DE DIARILA SOBRE *Trypanosoma cruzi*

CAMPO GRANDE - MS
MARÇO - 2021

BRUNA MIGLIORINI MELO SILVA

EFEITO DE DISSULFETOS DE DIARILA SOBRE *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular - PMBqBM - SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Alda Maria Teixeira Ferreira

CAMPO GRANDE - MS
MARÇO - 2021

TERMO DE APROVAÇÃO

BRUNA MIGLIORINI MELO SILVA

EFEITO DE DISSULFETOS DE DIARILA SOBRE *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular - PMBqBM - SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular).

_____ de _____ de 2021

Comissão Examinadora:

Prof^a Dr^a Alda Maria Teixeira Ferreira
UFMS

Prof^o Dr Edson Dos Anjos Dos Santos
UFMS

Prof^a Dr^a Fabiana Fonseca Zanoelo
UFMS

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, que me deu energia nas horas mais difíceis e nunca me desamparou;

Agradeço à UFMS por toda a infraestrutura;

Agradeço à minha orientadora, Prof^a Dr^a Alda Maria Teixeira Ferreira, por toda paciência e dedicação destinados a pesquisa e a mim;

Agradeço ao Prof^o Dr. Edson dos Anjos por ceder os compostos para que esse trabalho fosse realizado e à doutoranda Rejane Gonçalves Diniz Khodyuk, que produziu os compostos;

Agradeço aos meus colegas de laboratório que me ajudaram muito durante todo o processo até aqui;

Agradeço a todos os meus professores que influenciaram na minha visão de pesquisa;

Agradeço aos meus pais por toda a paciência e compreensão.

RESUMO

Trypanosoma cruzi é um protozoário flagelado, considerado o agente etiológico da doença de Chagas. No Brasil, estima-se que mais de três milhões de pessoas sofrem com esta moléstia e que apesar dos investimentos em saneamento básico e ações preventivas para o seu controle, este ainda é um problema sério de saúde, afetando as pessoas mais pobres, que vivem em áreas rurais e com baixas condições de moradia. Os medicamentos atualmente utilizados são pouco eficazes na fase crônica da doença e apresentam uma série de efeitos colaterais. Algumas classes de compostos orgânicos representam alternativas potenciais para o desenvolvimento de novos fármacos. É o caso da classe dos dissulfetos de diarila, cujos compostos apresentam propriedades interessantes que vêm sendo exploradas em diversas áreas da química sintética, farmacêutica e também na produção de polímeros. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo a avaliação de cinco compostos sintéticos dessa classe quanto à atividade sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*. A metodologia utilizada envolveu ensaios biológicos para avaliação da viabilidade metabólica e do crescimento dos parasitas, além de ensaio de citotoxicidade em células *Vero*. Com base nos resultados foi observado que todos os compostos possuem atividade biológica sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*. Os compostos **A** e **D** foram os mais ativos no tratamento *in vitro* durante 72h, apresentando valores de CI_{50} de 3,5 μ M e 3,7 μ M, respectivamente. No entanto, após o tratamento dos parasitos por 24h, os compostos mais ativos foram o **D** e **E**, com valores de CL_{50} de 0,7 μ M e 0,9 μ M, respectivamente. Quanto à avaliação de citotoxicidade sobre células *Vero*, os compostos **A**, **C** e **E** apresentaram os maiores valores de CC_{50} (34,1 μ M; 32,0 μ M e 30,5 μ M, respectivamente), enquanto o composto **D** mostrou ser o mais citotóxico dentre os cinco testados. Na curva de recuperação, todos os compostos foram capazes de inibir o crescimento dos parasitas em até 96h após a retirada da droga. Observou-se também que o alvo de ação no parasito depende, provavelmente, da posição do ligante em relação à ligação dissulfeto na estrutura dos compostos. Tais resultados indicam a ação dos compostos dissulfetos de diarila sobre mecanismos que influenciam na proliferação celular de *T. cruzi*, revelando dados promissores para futuras pesquisas.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; atividade biológica; dissulfetos de diarila.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is a flagellated protozoan, considered the etiologic agent of Chagas disease. In Brazil, it is estimated that more than three million people suffer from this disease that despite investments in basic sanitation works and preventive actions for its control is still a serious health problem, affecting the most vulnerable people, especially those who live in rural areas and have poor housing conditions. The drugs currently used are not very effective in the chronic phase of the disease and have a series of side effects, in addition to mutagenic and carcinogenic activities. Some classes of organic compounds represent potential alternatives for the development of new drugs. This is the case of the diaryl disulfide class, whose compounds have interesting properties explored in several areas of synthetic and pharmaceutical chemistry and in the production of polymers. Therefore, this work aimed to evaluate five synthetic compounds of this class regarding the activity on *T. cruzi* epimastigotes. The methodology used involved biological tests to evaluate the metabolic viability and the growth of the parasites, in addition to the cytotoxicity test on Vero cells. Based on the results, it was observed that all compounds have biological activity on epimastigote forms of *T. cruzi*. Compounds A and D were the most active in *in vitro* treatment for 72h, with IC₅₀ values of 3.5 μ M and 3.7 μ M, respectively. However, after 24 hours of parasite treatment, the most active compounds were D and E, with LC₅₀ values of 0.7 μ M and 0.9 μ M, respectively. Regarding the evaluation of cytotoxicity on Vero cells, compounds A, C and E showed the highest CC₅₀ values (34.1 μ M; 32.0 μ M and 30.5 μ M, respectively), while compound D was shown to be the most cytotoxic among the five tested. In the recovery curve, all compounds were able to inhibit the growth of the parasites within 96 hours after the drug was withdrawn. It was also observed that the target of action in the parasite probably depends on the position of the ligand in relation to the disulfide bond in the structure of the compounds. Such results indicate the action of diaryl disulfide compounds on mechanisms that influence the proliferation of *T. cruzi*, revealing promising data for future research.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; biological activity; diaryl disulfides.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Biologia do <i>T. cruzi</i> :	11
2.2 Ciclo de vida do parasita :	12
2.3 Doença de Chagas :	14
2.4 Tratamento da doença de Chagas :	16
2.5 Dissulfetos de diarila :	18
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo geral :	19
3.2 Objetivos específicos :	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Cultura de <i>Trypanosoma cruzi</i> :	19
4.2 Dissulfetos de diarila - compostos sintéticos :	19
4.3 Ensaio de viabilidade com MTS :	21
4.4 Ensaio de citotoxicidade em células <i>Vero</i> :	21
4.5 Ensaio de viabilidade das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> por contagem :	22
4.6 Curva de recuperação de formas epimastigotas :	22
4.7 Análise estatística :	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 Ensaio de viabilidade das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> pelo método do MTS :	23
5.2 Ensaio de viabilidade das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> por contagem :	24
5.3 Ensaio de citotoxicidade em células <i>Vero</i> e Índice de Seletividade (IS) :	25
5.4 Curva de recuperação de formas epimastigotas :	26
6. CONCLUSÕES	29
REFERÊNCIAS	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura celular das formas evolutivas de <i>T. cruzi</i>.....	12
Figura 2 - Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>.....	13
Figura 3 - Incidência mundial da doença de Chagas.....	15
Figura 4 - Esquema dos possíveis mecanismos de ação do Benzonidazol.....	17
Figura 5 - Gráfico da Curva de Recuperação de formas epimastigotas.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos dissulfeto de diarila testados frente às formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>.....	20
Tabela 2 - $CI_{50}/72h$ dos compostos dissulfeto de diarila frente às formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>.....	23
Tabela 3 - $CL_{50}/24h$ dos compostos dissulfeto de diarila frente às formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>.....	24
Tabela 4 - Citotoxicidade (CC_{50}) dos compostos sobre células <i>Vero</i> e Índice de Seletividade (IS).....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CC ₅₀	Concentração Citotóxica de 50%
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
CI ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
IS	Índice de Seletividade
CL ₉₀	Concentração letal de 90% dos parasitas
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i> (triptose de infusão hepática)
MTS	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt</i>
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (salina tamponada fosfatada)
PMS	<i>Phenazine Methosulfate</i> (metossulfato de fenazina)
SBF	Soro Bovino Fetal

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma infecção causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909), pertencente à família Trypanosomatidae e ao gênero *Trypanosoma* (DUMAS, 2000; MOREIRA et al., 2009). A enfermidade é considerada pela *World Health Organization* (WHO) como negligenciada. Acomete cerca de 6 a 7 milhões de pessoas pelo mundo, considerada endêmica em 21 países da América Latina, onde a principal via de transmissão é dada por meio do contato com fezes ou urina de insetos triatomíneos (vetor), conhecidos como “barbeiros”. Outras vias de transmissão incluem transmissão oral (alimentos contaminados), transfusão de sangue, transmissão congênita, transplante de órgãos ou mesmo por acidente de laboratório (WHO,2018).

No Brasil, mais de 80% dos casos agudos de doença de Chagas no Brasil resultam da transmissão por via oral, devido a ingestão de alimentos contaminados, e esse novo padrão vem se refletindo no agravo da apresentação clínica. Ademais, atualmente, a transmissão materno-fetal é uma das principais vias de infecção, considerando que pelo menos dois milhões de mulheres em idade fértil, no mundo, estejam infectadas pelo *T.cruzi*.

Com isso, a doença de Chagas também se tornou um problema econômico, pois os indivíduos infectados cronicamente podem apresentar complicações cardíacas e digestórias que os incapacitam de realizar algumas atividades, inclusive laborais (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Sendo assim, os gastos com tratamento e o ônus relacionado à incapacidade laboral de alguns indivíduos atingem valores altos para o Sistema de Saúde.

Atualmente, para o tratamento da doença de Chagas, apenas um fármaco é utilizado no Brasil, o Benzonidazol. Contudo, é eficaz apenas na fase aguda da infecção e apresenta extensos efeitos tóxicos (BRENER; ANDRADE; BARRAL-NETO, 2000; SOUZA; NAKAMURA; CORRÊA, 2012). Este fator justifica a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos mais eficientes e menos tóxicos para o organismo humano.

Por isso, a investigação de novas drogas a partir de compostos sintéticos é de grande valor. Por serem sintetizados em laboratório, podendo sofrer modificações e melhorias a partir dos estudos, guiando as pesquisas na busca de novos agentes terapêuticos contra a doença de Chagas.

Sendo assim, esta proposta tem por objetivo a utilização de bioensaios para a investigação de atividades biológicas de dissulfetos de diarila como novas fontes de ação anti-*T. cruzi*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biologia do *T. cruzi*:

O protozoário flagelado, conhecido por *Trypanosoma cruzi*, pertencente à ordem Kinetoplastea, família Trypanosomatidae e ao gênero *Trypanosoma* (REY, 2008; VERONESI, 2009). Apresenta uma série de estruturas específicas de sua família como o cinetoplasto, os glicossomos, a estrutura paraflagelar, os microtúbulos subpeliculares, e os reservossomos (GELORMINI, 1967; LANA; TAFURI, 2005).

Diversas são as funções dessas estruturas, sendo notadamente importantes para a sobrevivência desse protozoário. Seu citoesqueleto, por exemplo, é composto pelos microtúbulos subpeliculares, que conferem estabilidade e resistência, enquanto o cinetoplasto é uma estrutura onde está armazenado o DNA mitocondrial e encontra-se na única mitocôndria do parasita. Os glicossomos, por sua vez, são um tipo especializado de peroxissomo, relacionado com as vias da glicólise e da beta-oxidação (HANNAERT et al., 2003; MICHELS et. al., 2006; MICHELS; HANNAERT; BRINGAUD, 2000; MICHELS; OPPERDOES, 1991; GELORMINI, 1967; LANA; TAFURI, 2005).

Os reservossomos apresentam funções de armazenamento de proteínas e lipídios, e principalmente reciclagem de metabólitos celulares através de proteases importantes (SOUZA; SANT'ANNA; CUNHA-E-SILVA, 2009). Já a estrutura paraflagelar tem sido caracterizada por um complexo arranjo filamentososo de proteínas associadas ao flagelo (DEFLOREN; RUDOLF; SEEBECK, 1994; KOHL; GULL, 1999).

Formado por nove pares de microtúbulos periféricos e um par central associado ao corpúsculo basal, o flagelo emerge de diferentes localizações conforme o estágio de vida do protozoário (SOTO e CAPPÀ, 2019). Sua principal função é motilidade celular e reconhecimento sensorial do meio (CALDERANO et al., 2017).

O *T. cruzi* é mais conhecido por ser o agente etiológico da doença de Chagas, que apresenta várias complicações, com consequências sociais e econômicas severas (REZENDE; RASSI, 1994; NETO; YASUDA; AMATO, 1997; VERONESI, 2009). Este protozoário é capaz de infectar várias espécies de vertebrados, desde animais silvestres a domésticos, sendo importantes reservatórios do parasita (BARRETTO, 1968; TEIXEIRA, 1987; LEVINE, 1978; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2007).

Este parasita pode se apresentar em três principais formas (Figura 1) e sua distinção é feita com base em três critérios de classificação: posição do cinetoplasto em relação ao núcleo; morfologia celular e região onde o flagelo emerge (HOARE, 1972; SOUZA, 1984).

Portanto, o *T. cruzi* apresenta três formas evolutivas: amastigota, epimastigota e tripomastigota (COELHO, 2005; CORREA; SIQUEIRABATISTA; SIQUEIRA-BATISTA, 2007).

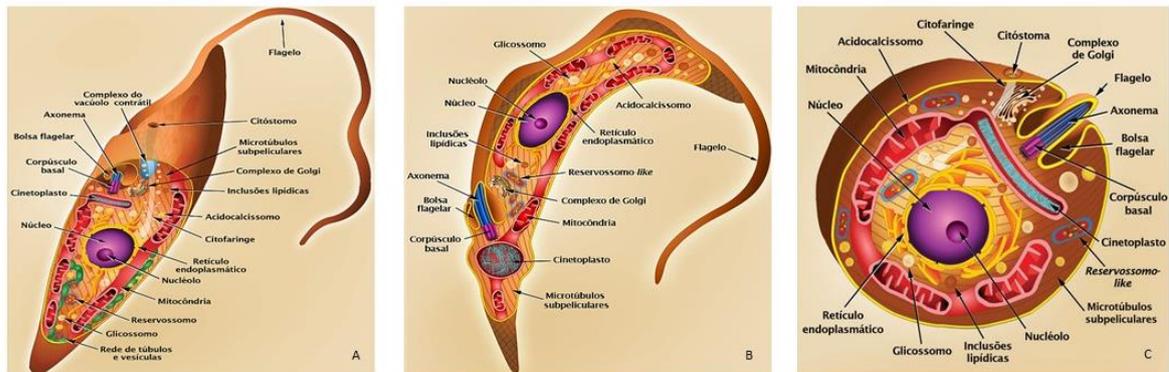


Figura 1: Estrutura celular das formas evolutivas de *T. cruzi*. A) Epimastigota, B) Tripomastigota, C) Amastigota. (Fonte: <http://chagas.fiocruz.br/organizacao-estrutural/>).

A forma epimastigota apresenta o cinetoplasto anterior ao núcleo e membrana ondulante pouco desenvolvida, medindo entre 20 e 40 μm , incluindo o flagelo livre. Possui nucleólo esférico que ocupa, na maioria das vezes, uma posição central no núcleo. É bastante móvel e apresenta intensa atividade replicativa por divisão binária longitudinal, havendo, em diversas ocasiões, a formação de rosetas. Estas formas não são capazes de penetrar nas células do hospedeiro vertebrado (LEVINE, 1978; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2007; REY, 2008). Neste trabalho foi utilizado formas epimastigotas de *T. cruzi* cepa Dm28c, pois pode ser cultivada *in vitro* em meio axênico, além de ser um clone populacional, reduzindo assim variabilidade nos ensaios.

2.2 Ciclo de vida do parasita:

O ciclo de vida do *T. cruzi* (figura 2) é complexo e heteroxênico, possuindo vários estágios de desenvolvimento, observados tanto no hospedeiro vertebrado quanto no invertebrado (GELORMINI, 1967; SOUZA, 1984; REY, 2008; VERONESI, 2009).

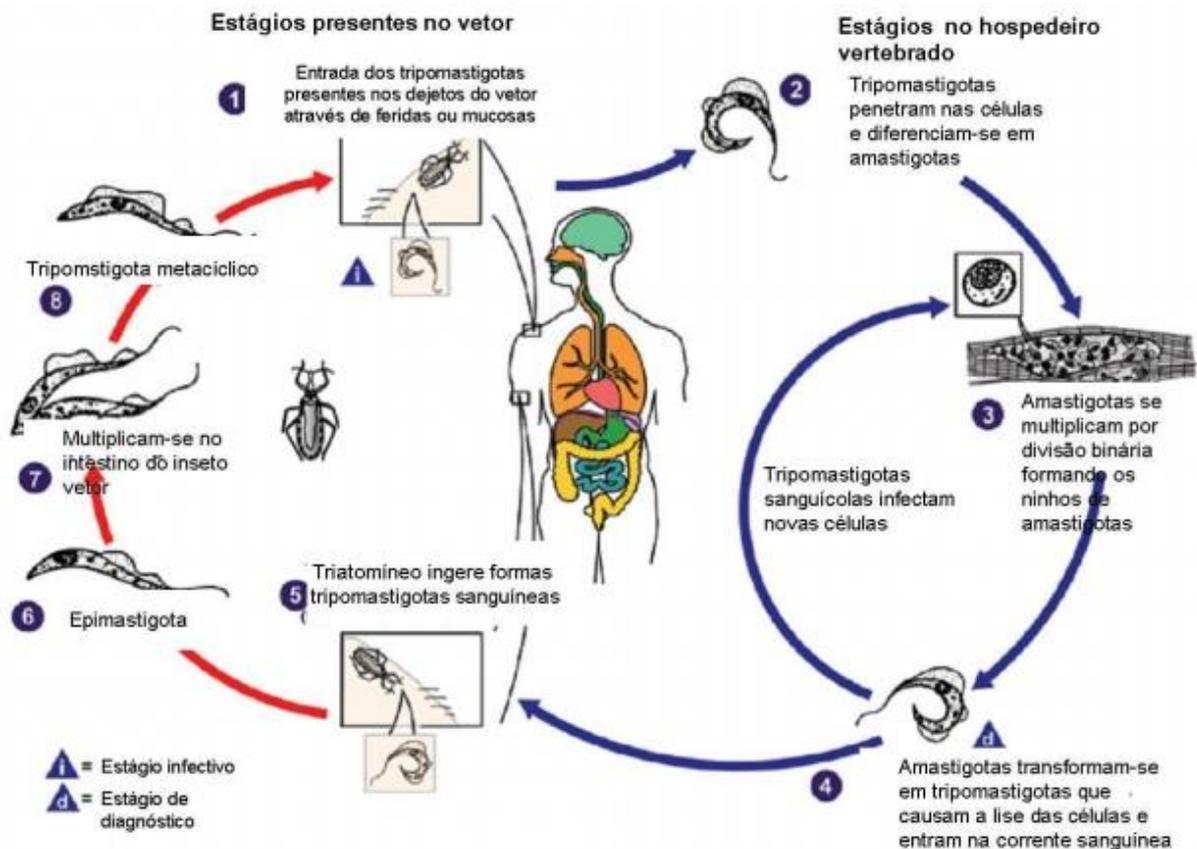


Figura 2 - Ciclo de vida do *T. cruzi*. Fonte: adaptado de CDC

O ciclo no vetor inicia-se com a aquisição de formas tripomastigotas sanguíneas, durante a alimentação em um vertebrado infectado. Após serem ingeridos, os parasitas são levados ao estômago, onde ocorre uma significativa morte dos protozoários, porém os que sobrevivem chegam ao intestino e se estabelecem na região. Nesse estágio, as formas infectantes se diferenciam em epimastigotas, que sofrem constantes divisões no intestino, sendo alguns deslocados para a região posterior do intestino. Nesta porção, ocorre a fixação do parasita na parede do intestino, pelo flagelo, acontecendo a diferenciação para as formas tripomastigotas metacíclicas (BRENER; ANDRADE, 1979; DIAS; COURA, 1997; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2007).

Os principais vetores são insetos hemípteros da família Reduviidae, subfamília Triatominae, principalmente *Rhodnius prolixus* e *Triatoma infestans*, mais comumente conhecidos como barbeiros. O parasita é transmitido aos seres humanos por contato com as fezes e a urina desses insetos (BRIONES et al., 1999; COURA, 2007).

Durante outro repasto sanguíneo, o vetor infectado poderá eliminar as formas tripomastigotas metacíclicas do parasita, que poderão penetrar no hospedeiro vertebrado, por meio de uma solução de continuidade no epitélio ou mucosas (HOEDEN, 1964; REY, 2008). Depois de infectado, o triatomíneo portará os parasitas para o resto de sua vida, que dura de 1 a 2 anos (LANA; TAFURI, 2005; VERONESI, 2009).

Após a entrada das formas tripomastigotas metacíclicas no vertebrado, iniciam-se os focos primários de infecção nas células do tecido conjuntivo ou muscular adjacente a região da picada do vetor (TEIXEIRA, 1987; BRENER; ANDRADE, 1979; COELHO, 2005).

A entrada do parasita na célula do hospedeiro vertebrado ocorre devido à fagocitose induzida, em que tanto o parasita quanto a célula alvo participam. Após esse processo, o parasita permanece nos vacúolos da célula hospedeira, onde se diferencia em amastigota (BRENER, 1997; LANA; TAFURI, 2005; REY, 2008; SOUZA; CARVALHO; SOUTO-PADRÓN, 2013).

A forma amastigota é capaz de escapar dos fagossomos pela produção de substâncias semelhantes às perforinas, que em pH ácido rompem o vacúolo. Este processo permite a realocação da forma amastigota no citoplasma da célula onde começa seu ciclo de divisões binárias. Este ciclo reprodutivo repete-se cerca de nove gerações, sendo que pouco antes do rompimento da célula hospedeira, as formas amastigotas são transformadas novamente em tripomastigotas sanguíneas. Este ciclo dura em torno de 5 a 6 dias (BRENER; ANDRADE, 1979; SCHMUNIS, 1997; BRENER, 1997; NEVES, 2005).

As formas tripomastigotas sanguíneas adentram nos vasos sanguíneos, migrando para vários tecidos do hospedeiro, produzindo focos secundários de infecção, no fígado, baço e gânglios. Os ciclos de infecção levam a um rápido aumento dessas formas infectivas no sangue periférico, onde vivem por alguns dias, servindo de fonte de infecção para novos vetores (TEIXEIRA, 1987; COELHO, 2005).

O parasita se estabelece em vários tecidos do hospedeiro vertebrado, como músculo liso do esôfago e intestino, além do músculo cardíaco e até mesmo no tecido nervoso. Os órgãos afetados variam de acordo com os focos da infecção, que podem mudar devido às características das cepas de *T. cruzi* (TEIXEIRA, 1987; BRENER, 1997; REY, 2008).

2.3 Doença de Chagas:

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, era considerada inicialmente apenas uma zoonose autóctone de animais silvestres, porém, com o crescimento populacional,

a doença passou a ser considerada uma zoonose de animais domésticos e uma endemia humana (GELORMINI, 1967; HOEDEN, 1964; REZENDE; RASSI, 1994; SCHMUNIS, 1997; COURA; VIÑAS, 2010).

Possui esse nome em homenagem ao seu descobridor, o pesquisador brasileiro Carlos Chagas, que em 1909 encontrou uma jovem infectada pelo *T. cruzi*, comprovando a patogenicidade do protozoário por ele descoberto no inseto conhecido “barbeiro”. Dessa maneira, ele conseguiu descrever o ciclo de vida completo do protozoário, tanto no hospedeiro invertebrado quanto no vertebrado (KROPF, 2017).

Ainda continua sendo mais frequente em áreas rurais, com infraestrutura precária e sem saneamento básico, a incidência da infecção apresenta seu pico no verão quente, devido a maior atividade dos vetores (HOEDEN, 1964; SCHMUNIS, 1997; MONCAYO, 2003; COURA; VIÑAS, 2010). É considerada uma parasitose grave, pois causa sérios reflexos para a saúde pública, devido a sua expressiva morbidade e mortalidade e alta prevalência, portanto os esforços públicos para seu controle são imprescindíveis (VERONESI, 2009).

Mesmo sendo endêmica na América Latina, a doença de Chagas não encontra mais barreiras continentais (Figura 3). Por conta da urbanização e globalização, a maioria das pessoas infectadas vive em ambientes urbanos e tem sido detectada cada vez mais nos Estados Unidos, Canadá, países europeus, países africanos, países do Pacífico ocidental e do mediterrâneo oriental (WHO, 2020).



Figura 3 - Incidência mundial da doença de Chagas. Fonte: modificado de <https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/> de 2019.

Dados mostram que o custo dos tratamentos das doenças secundárias causadas pela infecção pelo *T. cruzi* no Brasil, como as cardiopatias, ultrapassam os valores de 46 milhões de reais por ano para os cofres públicos. Esta quantia eleva-se para mais de 250 milhões de reais por ano se somada aos tratamentos de doenças digestivas avançadas na fase crônica da doença. Os custos exclusivos com a fase aguda da doença podem variar de 215 mil a mais de 2 milhões de dólares por ano, dependendo do país avaliado. Considerando apenas os gastos referentes ao absenteísmo laboral consequente da doença, os valores aproximados chegam a 625 milhões de dólares (TEIXEIRA, 1987; LUQUETTI; PORTO, 1997; SCHMUNIS, 1997; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2007; VERONESI, 2009). Dados da Organização Mundial da Saúde indicam que o ônus econômico da doença de Chagas continua a ser substancial (WHO, 2016).

2.4 Tratamento da doença de Chagas:

Os principais grupos químicos que têm sido descritos como eficazes no combate ao *T. cruzi* são derivados nitrofuranos, imidazolicos, arsenobenzóis sulfurados, piperazínicos e aminoquinonas. Contudo, a maioria desses compostos são altamente tóxicos para o organismo humano tornando seu uso impróprio (HOEDEN, 1964; BRENER, 1979; REZENDE; RASSI, 1994; CANÇADO, 1997; REY, 2008).

Somente dois medicamentos foram distribuídos para o tratamento da doença, o Nifurtimox (Lampit[®]), utilizado desde 1965, e o Benzonidazol (Rochagam[®]) (*N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida*) utilizado desde 1971, mesmo ambos apresentando toxicidade para o organismo humano e com efeitos colaterais extensos. Este fato levou a retirada do Nifurtimox do mercado, desde 1980 (PRATA, 1997; LANA; TAFURI, 2005; QUINTAS et al., 2007; REY, 2008; BEZERRA; MENEGUETTI; CAMARGO, 2012; SOUZA; CARVALHO; SOUTOPADRÓN, 2013). Porém, em situações específicas, como resistência ao medicamento ou graves efeitos adversos associados ao Benzonidazol, o Nifurtimox pode ser solicitado à Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde (MS), que obtém a droga a partir a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) (SOUSA, 2017).

Os dados indicam que não há um medicamento eficaz contra o *T. cruzi*, pois o Benzonidazol é capaz apenas de erradicar os parasitas sanguíneos, com pouca eficiência durante a fase crônica da doença, onde apresenta um efeito inferior a 20% (CANÇADO, 1997; COELHO, 2005; QUINTAS et al., 2007; REY, 2008).

Pelo fato do mecanismo de ação do Benzonidazol ainda não ser bem elucidado, acredita-se que seu efeito se deve a sua capacidade de ser metabolizado por várias enzimas celulares, liberando derivados metabólicos nitroreduzidos ativos capazes de se ligar a lipídios e proteínas celulares, tanto do parasita quanto do hospedeiro, explicando sua alta toxicidade e efeitos colaterais para os pacientes. Existem, também, estudos que mostram a capacidade desses metabólitos de interagir e modificar o DNA das células, levando a danos mutagênicos e carcinogênicos já visualizados em testes laboratoriais *in vivo* (QUINTAS et al., 2007).

Alguns dos possíveis mecanismos de ação do Benzonidazol estão esquematizados na figura 4:

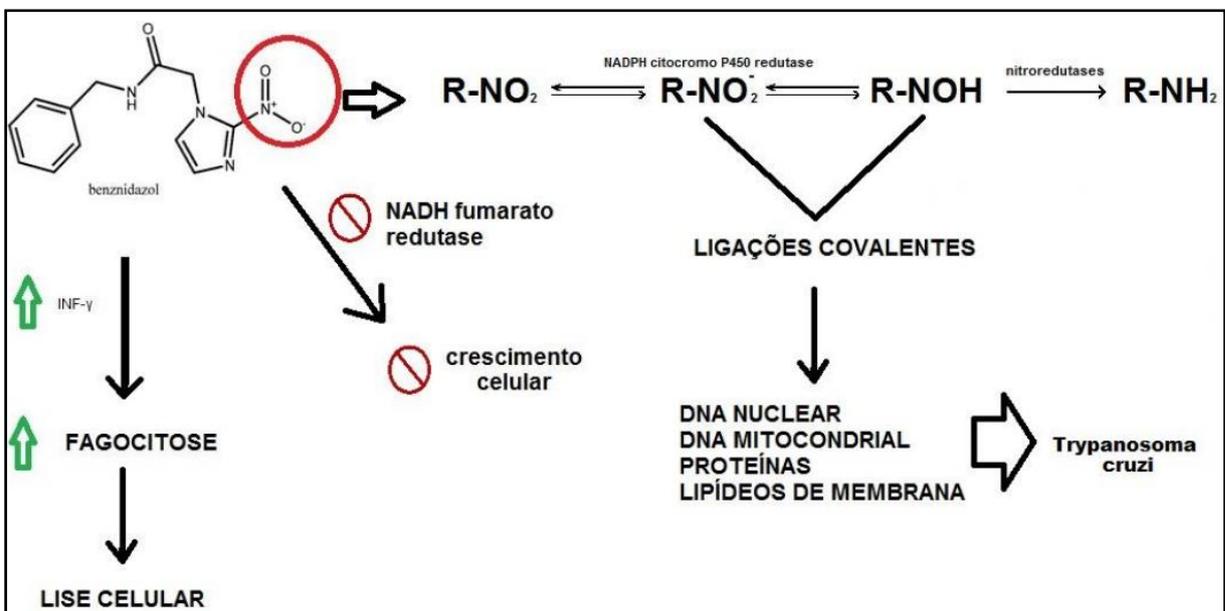


Figura 4 – Esquema de possíveis mecanismos de ação do Benzonidazol. Fonte: Davanço, 2015

Devido à alta reatividade do Benzonidazol, sabe-se que seus mecanismos de ação não atuam somente na célula parasitária, mas, também, na hospedeira, o que provoca muitos efeitos adversos (CASTRO; MECCA; BARTEL, 2006; DAVANÇO, 2015).

Além da relevância médica e econômica, *T. cruzi* desperta grande interesse de estudo como modelo biológico, o que tem gerado novos avanços na compreensão da biologia e bioquímica desse parasita. Inúmeras vias metabólicas e estruturas celulares têm sido estudadas com vistas à identificação de alvos promissores, como por exemplo, o estudo de vias metabólicas de biossíntese de esteróis e isoprenoides, metabolismo redox tiol-

dependente, vias de transporte e metabolismo de poliaminas, vias de salvamento de purinas, dentre outros (DUSCHAK & COUTO, 2007).

Em face a esse panorama e considerando a grande versatilidade dos compostos produzidos por síntese química, observa-se o surgimento de amplas possibilidades no que se refere a pesquisas que busquem novos compostos ativos para o controle de doenças reemergentes, como o caso da doença de Chagas.

Os processos de modificação molecular têm sido empregados com o objetivo de melhorar características físico-químicas de compostos já testados, visando melhorias nas suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Além disso, estratégias de modificação molecular são ainda uma das melhores alternativas quando se quer obter informações sobre a relação estrutura-atividade de produtos naturais em que o alvo terapêutico ainda não é conhecido (WERMUTH, 2008).

2.5 Dissulfetos de diarila:

Algumas classes de compostos sintéticos representam alternativas potenciais para a síntese de novos compostos com atividades biológicas. É o caso da classe dos dissulfetos de diarila, cujos compostos apresentam propriedades interessantes que vêm sendo exploradas em diversas áreas da química sintética, farmacêutica e também na produção de polímeros (LIU e ZHANG *et al.*, 2003).

Há relatos do seu uso como análogo do produto de origem natural, a combretastatina A-4 (CA-4), reconhecidamente um potente inibidor da polimerização da tubulina (SANTOS, 2012). Diversos análogos sintéticos da CA-4 apresentaram considerável atividade antitubulínica, apresentando atividade moderada em pelo menos uma linhagem de células tumorais (PEREIRA, 2017).

Outros estudos mostram os dissulfetos de diarila como inibidores da proliferação e da viabilidade de células tumorais em concentrações onde estabilizaram o supressor de tumor Pcd4, sugerindo uma contribuição nas propriedades antiproliferativas (SCHMID, 2016).

Com base no exposto, este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade biológica de compostos sintéticos da classe dos aril dissulfetos sobre *Trypanosoma cruzi*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Avaliar a atividade biológica *in vitro* de dissulfetos de diarila sobre *Trypanosoma cruzi*.

3.2 Objetivos específicos:

- Determinar a concentração dos compostos capaz de inibir 50% da viabilidade celular (CI₅₀) de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*;
- Analisar o crescimento de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, tratados com a Concentração Letal de 90% (CL₉₀) dos compostos ativos;
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos ativos sobre células *Vero* e determinar o Índice de Seletividade (IS).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultura de *Trypanosoma cruzi*:

Formas epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c foram mantidas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*), suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF), a 28 °C, com repiques periódicos. Para os experimentos foram utilizados parasitas de culturas em fase exponencial de crescimento.

4.2 Dissulfetos de diarila - compostos sintéticos:

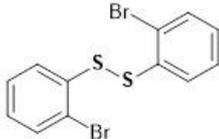
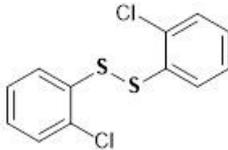
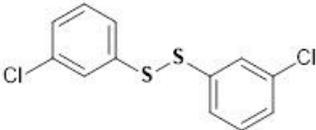
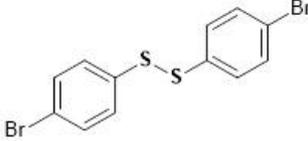
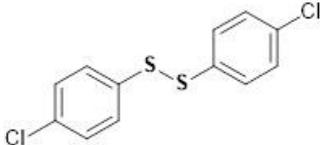
Os compostos sintéticos utilizados neste trabalho foram produzidos pela doutoranda Rejane Gonçalves Diniz Khodyuk e fornecidos pelo Dr Edson dos Anjos, ambos pesquisadores vinculados ao Laboratório SINTMOLB-UFMS (*Synthesis and Transformation of Organic Molecules with Biological Roles*). A metodologia utilizada para síntese dos compostos é de Khodyuk (2020). Os compostos foram mantidos sob refrigeração até o

momento do uso, no Laboratório de Imunologia, Biologia Molecular e Bioensaios (LabImunoBio) da UFMS.

Todos os compostos utilizados nos ensaios foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos no próprio meio de cultura, no momento da realização dos ensaios, de modo que a concentração de DMSO não ultrapassasse 1% (v/v), concentração que não afeta o crescimento do parasita.

Os 5 compostos sintéticos testados foram nomeados de **A** a **E** para facilitar a leitura. Todos os compostos dissulfetos de diarila estão descritos na Tabela 1:

Tabela 1 – Compostos dissulfeto de diarila testados frente à formas epimastigotas de *T.cruzi*

Composto	Dissulfeto de diarila	Peso molecular	Estrutura química
A	1-Bromo-2 - [(2-bromofenil) dissulfanil] benzeno	373,843416 g/mol	
B	1-Cloro-2-[(2-clorofenil) dissulfanil] benzeno	285,944450g/mol	
C	1-Cloro-3-[(3-clorofenil) dissulfanil] benzeno	285,944450g/mol	
D	1-Bromo-4-[(4-bromofenil) dissulfanil] benzeno	373,843416 g/mol	
E	1-cloro-4-[(4-clorofenil) dissulfanil] benzeno	285,944450g/mol	

Fonte: Khodyuk, 2020

4.3 Ensaio de viabilidade com MTS:

O efeito dos compostos sintéticos sobre a viabilidade de formas epimastigotas do parasita foi determinado pelo ensaio do MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt).

Esse método é baseado na avaliação quantitativa de células metabolicamente ativas, após a exposição ao composto testado, pela incubação com o composto tetrazólio (MTS) em associação com um agente acoplador de elétrons PMS (*phenazine methosulfate*). O MTS é biorreduzido pelas células viáveis a um produto que é solúvel no meio de cultura (formazan), cuja concentração é medida por análise espectrofotométrica (Taddei *et al*, 2007).

Para isso, células de parasitas, em fase exponencial, foram quantificadas em câmara de Neubauer e ajustadas para a concentração de 1×10^6 parasitas/mL, sendo um volume de 90 μ L aplicado em cada poço de placas de 96 poços. Estas células foram incubadas a 28°C por 72h na presença de seis concentrações dos compostos (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,5625 μ g/mL). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Após incubação inicial, foram adicionados, em cada poço, 20 μ L de MTS/PMS (proporção 20/1 na concentração de 2mg/mL), sendo as placas, em seguida, incubadas novamente por 4h.

Após este procedimento, a densidade óptica (absorbância) foi lida a 450nm em um leitor μ Quant. Como controle negativo, foram utilizados parasitas tratados com PBS pH 7,0 (*Phosphate Buffered Saline*).

4.4 Ensaio de citotoxicidade em células Vero:

Células *Vero* de linhagem (ATCC CCL-81) em densidade de aproximadamente 2×10^5 células/mL foram semeadas em placas de 96 poços (2×10^4 células/poço) em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) com 10% SBF e mantidas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. Após 24 horas as células foram incubadas com diferentes concentrações dos compostos ativos (25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,57 μ g/mL), por mais 24h. A integridade do tapete celular foi observada em microscópio óptico invertido. Após essa avaliação, realizou-se o ensaio colorimétrico com MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), a fim de determinar a concentração citotóxica de 50% (CC₅₀). O cálculo do valor CC₅₀ foi realizado a partir da porcentagem de inibição média, em relação ao controle não tratado, obtida através de triplicata.

O Índice de Seletividade foi obtido pela razão entre o valor da CC_{50} em células *Vero* e o CI_{50} de cada composto ativo, respectivamente.

4.5 Ensaio de viabilidade das formas epimastigotas de *T. cruzi* por contagem:

Os parasitas não tratados foram inoculados em uma concentração inicial de 1×10^6 células/mL em placas de cultura de 24 poços, contendo 900 μ L de meio LIT e 100 μ L do composto em concentrações acima e abaixo de sua $CI_{50}/72h$, totalizando um volume de 1mL por poço. Para a realização deste ensaio, os pontos da concentração de cada composto foram determinados com base nos valores de CI_{50} obtido no ensaio do MTS. Para os compostos **A**, **C**, **D** e **E** foram testadas concentrações de 1; 1,5; 2; 3; 4 e 6 μ g/mL e para o composto **B** as concentrações testadas foram 1; 1,5; 2; 3; 4; 6 e 8 μ g/mL, pois sua $CI_{50}/72h$ foi maior. Após a adição dos compostos, as placas foram incubadas a 28°C e as contagens foram realizadas em câmara de Neubauer após 24h. O experimento foi realizado em triplicata. Controle negativo foi feito com PBS.

4.6 Curva de recuperação de formas epimastigotas:

As formas epimastigotas foram adicionadas a 1mL de meio LIT em placas de 24 poços, a uma concentração de 1×10^6 parasitas/mL. Os compostos foram adicionados aos poços na concentração de suas respectivas CL_{90} (**A**: 45 μ g/mL; **B**: 20 μ g/mL; **C**: 15 μ g/mL; **D**: 35 μ g/mL e **E**: 30 μ g/mL). Após 4h de tratamento, os parasitas foram retirados do meio, incluindo os do controle, e ressuspendidos em meio LIT suplementado com 10% de SBF, a 28 °C. O crescimento celular foi avaliado a cada 24h, durante 96h, por meio de contagem celular em câmara de Neubauer. O experimento foi realizado em triplicata. Como controle negativo foi utilizado PBS. Os resultados obtidos neste ensaio possibilitaram a definição quanto a ação tripanostática ou tripanocida dos compostos.

4.7 Análise estatística:

As análises foram realizadas por regressão não linear, com o auxílio dos *softwares* e *Graph Pad Prism 7* e *Microsoft Excel 2013*. A comparação entre as curvas de crescimento dos parasitas tratados e controle foi realizada por meio do teste de análise de variância de uma via (ANOVA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio de viabilidade das formas epimastigotas de *T. cruzi* pelo método do MTS:

A avaliação da atividade *in vitro* dos compostos dissulfetos de diarila sobre a viabilidade e multiplicação de formas epimastigotas de *T. cruzi* foi realizado por meio de ensaio colorimétrico do MTS e por meio de contagem celular. Com base nos dados obtidos, foi possível verificar que todos os compostos testados apresentaram atividade tanto na redução da viabilidade do parasita como de seu crescimento.

Testes colorimétricos são amplamente utilizados como ferramentas para determinação da viabilidade celular de diversos tipos de ensaios biológicos *in vitro* (MOSMANN, 1983; MUELAS-SERRANO, NOGAL-RUIZ, GOMEZ-BARRIO, 2000; HENRIQUES et al., 2011). Pelo ensaio colorimétrico de MTS, foi determinada a concentração em que cada composto foi capaz de inibir 50% da viabilidade celular (CI₅₀) de formas epimastigotas, em 72h de tratamento, por meio de análise de regressão não linear. Os valores de CI₅₀/72h obtidos para cada composto sobre formas epimastigotas de *T. cruzi* pelo método do MTS encontram-se na tabela 2:

Tabela 2 - CI₅₀/72h dos compostos dissulfeto de diarila frente às formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Compostos	CI ₅₀ (µg/mL)	CI ₅₀ (µM)	R ²
A	1,393	3,7261	0,9866
B	2,246	7,8547	0,9984
C	1,462	5,1129	0,9574
D	1,339	3,5817	0,9869
E	1,655	5,7879	0,9868

A partir do teste de viabilidade com MTS, foi observado que todos os compostos possuem atividade biológica sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*, sendo que os valores de CI₅₀ variaram de 3,5817µM até 7,8547µM.

Os compostos **A** e **D** foram os mais ativos, com valores de CI₅₀ de aproximadamente 3,5 e 3,7µM, respectivamente. O composto **B** foi o que apresentou menor atividade, em relação aos demais compostos.

Os dissulfetos de diarila mais ativos em 72h possuem o elemento Bromo (Br) como ligante. Cargnin (2017), avaliou a ação de compostos bromados contra promastigotas de *L. amazonensis* e pôde avaliar sua atividade leishmanicida *in vitro*. Embora não tenham apresentado relevante atividade frente à cepa testada, puderam concluir que as alterações conformacionais induzidas pela bromolactonização em derivados de ácido ursólico favoreceram a atividade anti-*L. amazonensis*. Considerando que *L. amazonensis* e *T. cruzi*, pertencem à mesma família, caberia a suposição de que uma possibilidade para explicar a ação dos compostos **A** e **D**, neste trabalho, teria relação com a presença de Br em sua composição.

Considerando que a CI_{50} do Benzonidazol para epimastigotas de *T. cruzi*, em ensaios *in vitro* com a cepa Dm28 (utilizada nesse trabalho), varia entre 10 e 15 μ M, todos os compostos testados foram mais ativos que o fármaco utilizado para o tratamento da doença de Chagas, no Brasil. Esses resultados se mostram promissores para futuros estudos.

5.2 Ensaio de viabilidade das formas epimastigotas de *T. cruzi* por contagem:

Com a perspectiva de realizar ensaios para avaliar o efeito dos compostos sobre o crescimento *in vitro* dos parasitas, foi realizado um ensaio para definir a $CL_{50}/24h$, utilizando o método de contagem celular.

A concentração em que cada composto foi capaz de reduzir em 50% (CL_{50}) o número de parasitas em 24h de tratamento, foi determinada a partir dos dados obtidos das contagens em câmara de Neubauer, por meio de análise de regressão não linear.

Os valores de CL_{50} obtidos pelo método de contagem, após 24h de tratamento com os compostos ativos podem ser vistos na tabela 3:

Tabela 3 - $CL_{50}/24h$ dos compostos dissulfeto de diarila frente às formas epimastigotas de *T. cruzi*

Compostos	CL_{50} (μ g/mL)	CL_{50} (μ M)	R^2
A	1,6140	4,3173	0,9351
B	0,5316	1,8591	0,9577
C	0,3722	1,3016	0,8871
D	0,2635	0,7048	0,9356
E	0,2609	0,9124	0,9757

Após 24h de tratamento, os compostos **D** e **E** apresentaram-se como os mais ativos, com valores de CL_{50} de 0,7048 μ M e 0,9124 μ M, respectivamente. Ambos compostos possuem os ligantes na posição *para* de sua estrutura. Enquanto o composto **A** foi o menos ativo.

Interessante ressaltar que os compostos **A** e **D**, apesar de possuírem o mesmo ligante, atuam de forma diferente no parasita. Enquanto os dois foram os mais ativos em 72h, o **D** foi o mais ativo em 24h e o **A** o menos ativo. A diferença estrutural entre eles se resume à posição do ligante (**A**: Br na posição *orto*; **D**: posição *para*), o que nos induz a sugerir que a posição do ligante está relacionada com a atividade do composto.

Pelo exposto, pode-se inferir que o composto **A** causa mais impacto na viabilidade metabólica do parasita, enquanto o **D** afeta o metabolismo e também causa a morte do protozoário em questão.

5.3 Ensaio de citotoxicidade em células *Vero* e Índice de Seletividade (IS):

A avaliação de citotoxicidade sobre células *Vero* foi realizado de acordo com Ceole e colaboradores (2018) e considerou o efeito dos compostos durante 24h de tratamento.

O Índice de Seletividade (IS) representa o quanto os compostos são ativos contra as formas epimastigotas do parasita em relação à atividade sobre as células de mamíferos. Quanto maior o valor do IS, menor será o dano causado à viabilidade das células hospedeiras, sendo obtido pela razão entre o valor da CC_{50} em células *Vero* e o valor de CI_{50} de cada composto ativo contra *T. cruzi*.

Os resultados da CC_{50} e o Índice de Seletividade dos compostos encontram-se na tabela 4:

Tabela 4 - Citotoxicidade (CC_{50}) dos compostos sobre células *Vero* e Índice de Seletividade (IS)

Compostos	CC_{50} (μ g/mL)	CC_{50} (μ M)	R^2	IS (CC_{50}/CI_{50})
A	11,97	32,019	0,9337	8,6
B	5,709	19,965	0,7916	2,54
C	9,740	34,063	0,9570	6,7
D	6,321	16,908	0,9115	4,7
E	8,717	30,485	0,9996	5,3

Os compostos **A**, **C** e **E** apresentaram os maiores valores de CC_{50} ($34,063\mu\text{M}$; $32,019\mu\text{M}$ e $30,485\mu\text{M}$, respectivamente), enquanto o composto **D** mostrou ser o mais ativo dentre os cinco testados, sendo, ainda assim, quase 5 vezes mais específico contra o parasita.

Os compostos **A** e **D** possuem ligante Br, porém obtiveram CC_{50} bem diferentes, sendo o **D** muito mais ativo do que o **A**. Com isso, pode-se inferir que a posição do ligante no dissulfeto de diarila interfere no alvo do parasita que o composto atinge.

5.4 Curva de recuperação de formas epimastigotas:

A curva de recuperação dos parasitas após o tratamento *in vitro*, por 4h, com alta concentração (CL_{90} : **A**: $45\mu\text{g/mL}$; **B**: $20\mu\text{g/mL}$; **C**: $15\mu\text{g/mL}$; **D**: $35\mu\text{g/mL}$ e **E**: $30\mu\text{g/mL}$.) dos compostos mostrou que houve intensa redução do crescimento dos parasitas em relação ao controle (Figura 5).

Até 48h após a retirada dos compostos, as culturas correspondentes ao tratamento com a maioria dos compostos mantiveram um número de parasitas muito próximo do inicialmente inoculado.

Com relação à cultura tratada com o composto **E**, houve uma redução de 50% no número de parasitas após 24h da retirada do composto, retornando próximo ao valor inicial, já nas 48h.

No entanto, após 96h da retirada dos compostos, foi observada uma diferença entre o comportamento dos parasitas tratados com os compostos **A**, **B**, **C** (primeiro grupo) e os compostos **D** e **E** (segundo grupo). Enquanto no primeiro grupo observou-se discreta proliferação de parasitas em relação ao controle, no segundo grupo ocorreu um declínio no número de parasitas.

Com base nesses dados, podemos sugerir que os compostos **D** e **E** induziram as células à morte, porém tal efeito necessitaria de um estudo mais detalhado e aprofundado dos possíveis mecanismos de morte celular, incluindo ensaios com concentrações maiores do que CL_{90} para o tratamento. No entanto, o que se pode afirmar é que os parasitas tratados com os referidos compostos não foram capazes de recuperar o crescimento, mesmo após 96h da retirada dos mesmos.

Pode-se observar que esses compostos do segundo grupo possuem ligantes diferentes (**D** possui ligante Br e **E** possui ligante Cl), porém eles se apresentam na mesma posição em relação à ligação dissulfeto (posição para), podendo-se inferir que a posição interfere no alvo de ação do composto.

Segundo Khodyuk e colaboradores (2020), esses mesmos compostos foram os menos ativos na inibição da polimerização da tubulina de uma linhagem de células tumorais, o que leva a supor que eles atuem mais ativamente na célula do protozoário em estudo.

Com relação aos parasitas tratados com o composto **C**, foi observado que após 96h da retirada da droga, a densidade da cultura atingiu aproximadamente $0,4 \times 10^6$ parasitas/mL, ao passo que a densidade da cultura previamente tratada com os compostos **A** e **B** atingiu aproximadamente $0,3 \times 10^6$ parasitas/mL, enquanto a densidade da cultura controle atingiu $16,45 \times 10^6$ parasitas/mL (Figura 5).

É interessante observar que os compostos **A** e **B** obtiveram resultados semelhantes. Apesar de possuírem ligantes diferentes (Br e Cl, respectivamente), estes estão na mesma posição em relação à ligação dissulfeto (posição *orto*). Da mesma maneira, os compostos **D** (ligante Br) e **E** (ligante Cl) também se comportaram de forma semelhante, sendo dissulfetos de diarila com ligantes na posição *para*.

Já o composto **C** foi o que apresentou o comportamento mais destoante em relação aos outros. Apesar de possuir ligante Cl, como os compostos **B** e **E**, ele se apresenta na posição *meta*, diferente de todos os outros. O que nos leva a inferir que a posição dos ligantes nos dissulfetos de diarila podem interferir no alvo de ação do composto contra o parasita.

Tais resultados indicam a ação dos compostos dissulfetos de diarila sobre mecanismos que influenciam a proliferação celular, impedindo ou reduzindo a multiplicação dos parasitas, mesmo após a retirada das drogas e em condições ideais de cultivo.

Um aspecto interessante observado com os resultados obtidos com o ensaio de recuperação foi o comportamento dos parasitas após a retirada dos compostos, definindo claramente dois grupos de compostos de acordo com o efeito provocado sobre o crescimento celular. Dessa forma, nossos dados estimulam duas frentes para futuros estudos: a investigação da indução de morte pelos compostos **D** e **E**, e a avaliação funcional dos parasitas tratados com os compostos **A**, **B** e **C**.

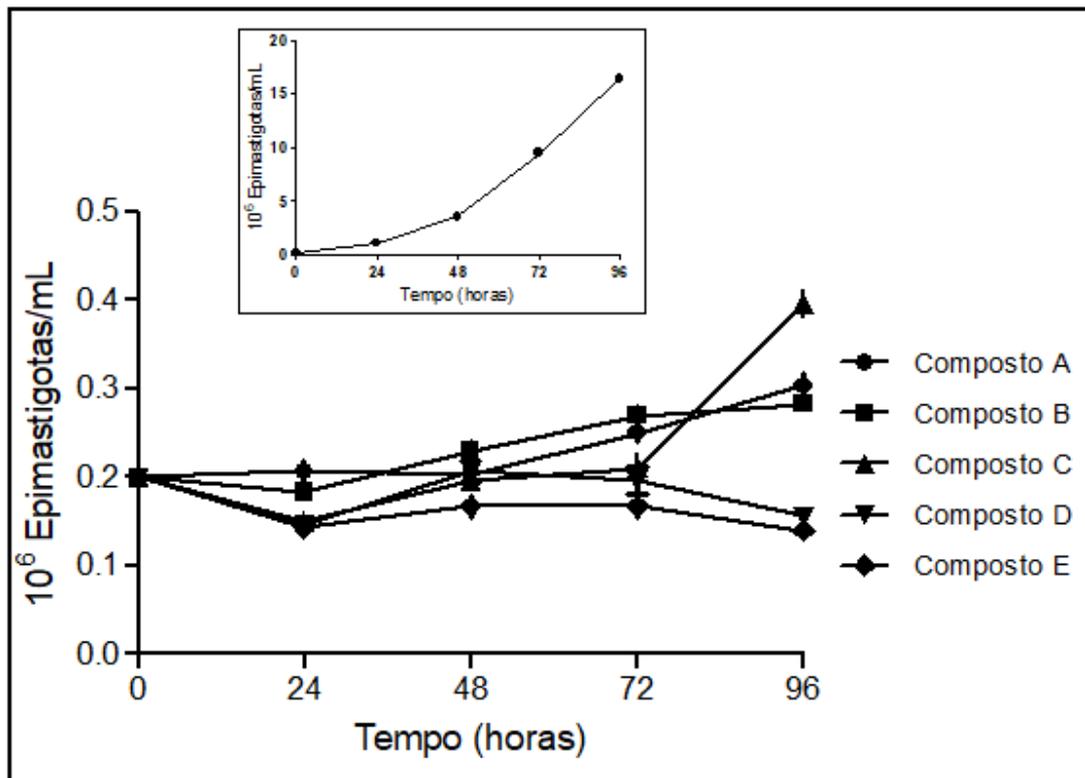


Figura 5 - Curva de recuperação de epimastigotas de *T. cruzi* após 4 horas de exposição aos dissulfetos de diarila em suas respectivas CL90 (A: 45 μ g/mL; B: 20 μ g/mL; C: 15 μ g/mL; D: 35 μ g/mL e E: 30 μ g/mL). Cada ponto experimental corresponde à média e desvio padrão da densidade celular obtida por contagem direta em câmara de Neubauer. A curva de recuperação dos parasitas da cultura controle, nas mesmas condições de ensaio, está representada no box interno da figura.

6. CONCLUSÕES

Os resultados dos ensaios realizados revelaram que:

- Todos os compostos testados possuem atividade sobre epimastigotas de *T. cruzi*;
- O composto **D** foi o mais ativo tanto em tratamento durante 72h como em 24h, com uma seletividade 4,7 vezes maior em relação ao parasita;
- O composto **A** foi o composto menos ativo no tratamento de 24h, porém com o melhor índice de seletividade dentre todos os compostos avaliados;
- O composto **E** foi um dos mais ativos em 24h e apresentou um índice de seletividade de 5,3;
- Todos os compostos testados no ensaio de recuperação afetaram o crescimento dos parasitas;

Os ensaios feitos nesse trabalho demonstram resultados significantes e promissores para futuras pesquisas de dissulfetos de diarila contra o *T. cruzi*, com vistas à busca de alternativas no tratamento da doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

BARRETTO, M. P. In: CANÇADO, J. R. **Doença de chagas**: Por um grupo de colaboradores especializados. 1. ed. Belo Horizonte: Estado de Minas Gerais, 1968. cap. 9, p. 163-188.

BEZERRA, W. S.; MENEGUETTI, D. U. O.; CAMARGO, L. M. A. A Busca de fármacos para tratamento da Tripanossomíase Americana: 103 anos de negligência. **R Saúde**, v. 38, n. 1, p. 9-20, 2012.

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

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979.

BRENER, Z. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. (org). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas**: uma abordagem prática para o clínico geral. 1. ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997. cap. 2, p.25-32.

BRIONES M. R.; SOUTO, R. P.; STOLF, B. S.; ZINGALES, B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of american mammalian faunas in the cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. **Mol Biochem Parasitol**, v. 104, p. 219-232, 1999.

CANÇADO, R. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. (org). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas**: uma abordagem prática para o clínico geral. 1. ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997. cap. 19, p.323-352.

CARGNIN, S. T. **Triterpenos obtidos de fontes naturais: semissíntese, citotoxicidade e atividade antiprotozoária**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2017.

CASTRO, J. A.; MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Human & Experimental Toxicology*, v. 25, p. 471-479, 2006. doi:[10.1191/0960327106het653oa](https://doi.org/10.1191/0960327106het653oa)

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

COELHO, C. **Manual de parasitologia humana**. 2. ed. Canoas: Ulbra, 2005.

CORRÊA, A. D.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; SIQUEIRA-BATISTA, R. Aspectos Históricos. In: **Moléstia de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2007. Cap. 1, p.1-17.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed. A background article. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 113-122, 2007.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 24, p. 465, 2010.

DAVANÇO, MARCELO GOMES. **Farmacocinética do benznidazol administrado em coelhos na forma de comprimidos de liberação imediata e comprimidos de liberação prolongada**. Orientadora: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini. 2015. 153 f. Dissertação (Mestrado) – Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2015.

DEFLOLIN, J.; RUDOLF, M.; SEEBEC, T. The major components of the paraflagellar rod of *Trypanosoma brucei* are two similar, but distinct proteins which are encoded by two different gene loc. **J Biological Chemistry**, v. 269, n. 46, p. 28746-28751, 1994.

DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. (org). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. 1. ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997. cap. 3, p.33-66.

DUMAS, M. Sleeping sickness, a reemerging sickness. **Bull Acad Natl Med**, v. 184, p. 1867-1885, 2000.

DUSCHAK, V.G.; COUTO, A.S..An insight on targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov**, v. 2, p. 19-51, 2007.

GELORMINI, N. Enfermedades parasitarias em veterinária. 1. ed. Buenos Aires: El Ateneo, 1967.

GULL, K. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. **Annu Rev Microbiol**, v. 53, p. 629–55, 1999.

HANNAERT, V.; BRINGAUD, F.; OPPERDOES, F. R.; MICHELS, P. A. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. **Kinetoplastid Biol Dis**, v. 2, n. 11, 2003.

- HOARE, C. A. **The Trypanosomes of Mammals: A Zoological Monograph**. Oxford: Blackwell, 1972.
- HOEDEN, J. V. D. **Zoonoses**. 1. ed. London: Elsevier, 1964.
- KHODYUK, R. G. D.; BAI, R.; HAMEL, E.; LOURENÇO, E. M. G.; BARBOSA, E. G.; BEATRIZ, A.; SANTOS, E. A.; LIMA, D. P. Diaryl Disulfides and Thiosulfonates as Combretastatin A-4 Analogues: Synthesis, Cytotoxicity and Antitubulin Activity, *Bioorganic Chemistry*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104017>
- KOHL, L.; GULL, K. Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 93, p. 1-9, 1999.
- KROPF, SIMONE. Descoberta. **FIOCRUZ**, 2017. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/a-descoberta/>. Acesso em: 17 mar. 2021.
- LANA, M.; TAFURI, W. L. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. cap.11, p.85-108.
- LEVINE, N. D. **Tratado de parasitologia veterinária**. 1. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1978.
- LIU, Y.; ZHANG, Y.; Temperature-controlled selective reduction of arenesulfonyl chlorides promoted by samarium metal in DMF. *Tetrahedron Letters*, v. 44, p. 4291-4294, 2003.
- LUQUETTI, A. O.; PORTO, C. C. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. (org). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. 1. ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997. cap. 20, p.353-364.
- MICHELS, P. A.; BRINGAUD, F.; HERMAN, M.; HANNAERT, V. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. **Biochim Biophys Acta**, v. 1763, p. 1463-1477, 2006.
- MICHELS, P. A. M.; HANNAERT, V.; BRINGAUD F. Metabolic Aspects of Glycosomes in Trypanosomatidae – New Data and Views. *Parasitology Today*, v. 16, 2000.
- MICHELS, P. A.; OPPERDOES, F. R. The evolutionary origin of glycosomes. *Parasitology Today*, v. 7, p. 150-109, 1991.
- MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 577–91, 2003.

MOREIRA, D. R. M.; LEITE, A. C. L.; SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P.; Approaches for the development of new anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Current Drug Targets*, v. 10, p. 212-231, 2009.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUELAS-SERRANO, S., NOGAL-RUIZ, J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotas, **Parasitol Res**, v. 86, p. 999–1002, 2000.

NANTES, C. I.; PEREIRA, I. D.; BAI, R.; HAMEL, E.; BURNETT, J. C.; OLIVEIRA, R. J.; MATOS, M. F. C.; BEATRIZ, A.; YONEKAWA, M. K. A.; PERDOMO, R. T.; LIMA, D. P.; BOGO, D.; SANTOS, E. A. S-(4-Methoxyphenyl)-4-methoxybenzenesulfonothioate as a Promising Lead Compound for the Development of a Renal Carcinoma Agent. **ChemMedChem**, 15, 449–458, 2020.

NETO, V. A.; YASUDA, M. A. S.; AMATO, V. S. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. (org). **Clínica e terapêutica da doença de chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. 1. ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997. cap. 8, p.127-134.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

PEREIRA, I. D. SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE COMPOSTOS DIARÍLICOS CONTENDO ÁTOMOS DE SELÊNIO OU ENXOFRE. Disponível em <<https://posgraduacao.ufms.br/portal/trabalho-arquivos/download/4622>>. Acesso em: 03/06/2019

PRATA, A. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. (org). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. 1. ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997. cap. 7, p.115-126.

QUINTAS, L. E. M.; MARTINS, W. A.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; CARNEIRO, M. C.; OLIVEIRA, L. B.; ANTONIO, V. E.; LOPES, D. V. S.; POÇAS, E. S. C. In: SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; CORREA, A. D.; GELLER, M.; **Moléstia de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2007. cap. 8, p.125-146.

- RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v.375, p.1388-1402, 2010.
- REY, L. **Parasitologia**: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2008.
- REZENDE, J. M.; RASSI, A. In: CASTRO, L. P.; CUNHA, A. S.; REZENDE, J. M. **Protozooses humanas**. 1. ed. São Paulo: Fundação BYK, 1994. cap. 3, p.38-72.
- SANTOS, E. D. A. D.; GONÇALVES, F. H. M.; PRADO, P. C.; SASAKI, D. Y., DE LIMA, D. P. e MACEDO, M. L. R.; Synthesis Method for Thiosulfonate and Report of Its Insecticidal Activity in *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **International Journal of Molecular Sciences**, 13, p. 15241-15251, 2012.
- SCHMID T, BLEES JS, BAJER MM, WILD J, PESCATORI L, CUZZUCOLI CRUCITTI G, SCIPIONE L, COSTI R, HENRICH CJ, BRÜNE B, COLBURN NH, DI SANTO R.; Diaryl Disulfides as Novel Stabilizers of Tumor Suppressor Pcd4. **PLoS One**. 2016 Mar 16;11(3):e0151643.
- SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; CORREA, A. D.; GELLER, M.; **Moléstia de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2007.
- SOUSA, A. S. **Tratamento etiológico da doença de Chagas na fase crônica**. Disponível em <<http://chagas.fiocruz.br/tratamento/>>. Acesso em 12/09/2020.
- SOUZA, W. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Int Ver Citol**, v. 86, p. 197-283,1984.
- SOUZA, W.; CARVALHO, T. M. U.; SOUTO-PADRÓN, T. In: SOUZA, W. **Protozoologia médica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2013. cap. 6, p. 63-124.
- SOUZA, V. A.; NAKAMURA, C. V.; CORRÊA, A. G. Atividade Antichagásica de Lignanas e Neolignanas. **Rev Virtual Quim**, v. 4, p. 197-207, 2012.
- SOUZA, W.; SANT'ANNA, C.; CUNHA-E-SILVA, N. L. Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 44, p. 67-124, 2009.
- SCHMUNIS, G. A. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. (org). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas**: uma abordagem prática para o clinico geral. 1. ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997. cap. 1, p.11-24.

TADDEI, E. B; HENRIQUES, V. A. R.; SILVA, C. R. M.; CAIRO, C. A. A.; BOTTINO, M. C. Ensaio de Citotoxicidade e Influência do Tratamento de Solubilização na Microestrutura da Liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta para Potenciais Aplicações Ortopédicas. *Rev Matéria*, v. 12, p. 120 – 127, 2007.

TEIXEIRA, A. R. L. **Doença de chagas e outras doenças por tripanossomos**. 1. ed. Brasília: Universidade de Brasília, 1987.

VERONESI, R. **Tratado de infectologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

WERMUTH, C. G. **The Practice of Medicinal Chemistry**. 3rd ed. London: Academic Press, 2008.

WHO, World Health Organization. **World Health Statistics**, 2018.

WHO, World Health Organization. **World Health Statistics**, 2020.