

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

ANNY BEATRIZ DA SILVA

**O EFEITO DE DISSULFETOS DE DIARILA SOBRE AS FORMAS
EPIMASTIGOTAS E TRIPOMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi***

CAMPO GRANDE – MS
FEVEREIRO - 2023

ANNY BEATRIZ DA SILVA

**O EFEITO DE DISSULFETOS DE DIARILA SOBRE AS FORMAS
EPIMASTIGOTAS E TRIPOMASTIGOTAS DE *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
FEVEREIRO – 2023

TERMO DE APROVAÇÃO

ANNY BEATRIZ DA SILVA

**O EFEITO DE DISSULFETOS DE DIARILA SOBRE AS FORMAS
EPIMASTIGOTAS E TRIPOMASTIGOTAS DE *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).

24 de Março de 2023

Comissão Examinadora:

Prof^a Dr^a Alda Maria Teixeira Ferreira
UFMS

Prof^o Dr Malson Neilson de Lucena
UFMS

Prof^a Dr^a Maria Carolina Silva Marques
UFMS

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luzinete e Harley, que sempre incentivaram e apoiaram meus objetivos, especialmente aqueles relacionados a busca por uma educação de qualidade. Que acompanharam minha trajetória desde o início da vida escolar, até o momento da pós graduação. Agradeço por todos os momentos que aliviaram minha jornada até aqui, com palavras de incentivo e colo sempre que precisei, se hoje realizo meu sonho de ser pesquisadora e professora saiba que devo tudo a vocês! O meu título de mestre a vocês eu dedico.

Ao meu namorado, Ramon, que nos últimos 5 anos vem sendo meu companheiro, dedicado e compreensivo, que sempre busca maneiras de adoçar nossa rotina, me tirando sorrisos nos dias mais turbulentos. Que comemora cada conquista minha e sempre faz tudo ter um toque especial, se o destino existe, não existem agradecimentos suficientes a ele pelo nosso reencontro, obrigada por tudo até aqui.

Ao meu irmão, Bruno, por ser um de meus principais amigos desde que nasceu, por nossas sessões de lazer e conversas mesmo em meio a correria do dia a dia. Por todas as “pirraças” e alegrias compartilhadas, obrigada por ser meu “mani” e por continuar aqui.

A minha orientadora, professora Alda, que vem me orientando para além da bancada, obrigada por toda a paciência e dedicação com nossa pesquisa e com a minha pessoa, pelo apoio e pelo abraço quando mais precisei, por orientar com tanto amor e carinho. Obrigada por ser essa pessoa maravilhosa e me ajudar a desenvolver o amor pela pesquisa!

Aos meus queridos amigos Alexandra, Arthur, Sâmella e Matheus por todos os momentos de refúgio compartilhados, a família que achei sozinha, é pequena e incompleta, mas é boa. É, é boa.

A minha tia e madrinha Maria, que sempre demonstrou apoio e admiração em minhas lutas e conquistas, saiba que tenho imenso carinho pela senhora e sua família, também é recíproca toda admiração.

Aos meus colegas de laboratório Bruna, Daniel, Carlos e Carla por cada momento de aflição e alegria compartilhado, pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho, além das distrações dos problemas cotidianos, obrigada!

Aos inúmeros seres de luz, que alegram todos os meus dias e minha existência nesse mundo, aos que se foram ou permanecem aqui, amo vocês.

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

A UFMS e Fundect pelo financiamento para o desenvolvimento desse trabalho, obrigada!

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo a avaliação do efeito dos compostos sintéticos dissulfetos de diarila em formas replicativas e infectivas do agente etiológico da Doença de Chagas (DC), o protozoário *Trypanosoma cruzi*. A DC é uma enfermidade endêmica da América Latina, representando um problema grave de saúde pública, pois acomete cerca de 6 milhões de pessoas no mundo. Nessa perspectiva, destaca-se a importância de mais pesquisas serem desenvolvidas a fim de evidenciar novos compostos com atividades anti-*Trypanosoma* que apresentem baixa citotoxicidade e possam representar uma nova alternativa interessante para o tratamento dessa doença. Há relatos na literatura de compostos de dissulfetos de diarila com atividade antiproliferativa contra células tumorais, assim como ação sobre protozoários. Sendo assim, este estudo propõe avaliar o efeito *in vitro* de compostos dissulfetos de diarila, sobre as formas replicativa e infectiva de *T. cruzi*. Foram realizados ensaios biológicos de viabilidade, crescimento, análise morfológica para formas epimastigotas e viabilidade de formas tripomastigotas. Foi realizado também o ensaio *in silico* para análise das propriedades ADMET dos compostos. Durante a análise das propriedades ADMET foi observado que os compostos apresentam boa absorção e não apresentam hepatotoxicidade ou mutagenicidade. No ensaio de viabilidade foi observado que os compostos possuem atividade biológica sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi*, sendo os compostos D e E os mais ativos (3,124 e 5,091 μ M, respectivamente). A curva de crescimento demonstrou que a partir de 24h de exposição o composto D causou uma inibição de 50% e em 96h de exposição, essa inibição foi de 19,64%, demonstrando uma redução de atividade conforme o tempo de exposição. O ensaio de recuperação realizado com os compostos B, C e D mostrou que após 96h os valores de inibição estavam entre 26% e 40%, indicando uma ação tripanostática. A análise morfológica realizada com os compostos B e D, indicou que esses compostos causam alterações morfológicas que afetam a viabilidade do parasito. O ensaio de viabilidade com formas tripomastigotas tratadas com o composto D, indicou que o composto possui ação sobre a forma infectante do parasito, com uma CI_{50} de 10,90 μ M.

Palavras-chave: Disulfetos de Diarila, *Trypanosoma cruzi*, doença de Chagas.

ABSTRACT

This work aims to evaluate the effect of synthetic compounds diaryl disulfides in replicative and infective forms of the etiological agent of Chagas Disease (CD), the protozoan *Trypanosoma cruzi*. CD is an endemic disease in Latin America, representing a serious public health problem, as it affects about 6 million people worldwide. In this perspective, the search for new compounds with anti-*Trypanosoma* activities that present low cytotoxicity and may represent an alternative for the treatment of this disease has been the objective of numerous research groups. There are reports in the literature of compounds of diaryl disulfides with antiproliferative activity against tumor cells, as well as action on protozoa. Therefore, this study proposes to evaluate the *in vitro* effect of Diaryl Disulfide compounds on the replicative and infective forms of *T. cruzi*. Biological assays of viability, growth, morphological analysis for epimastigotes and viability of trypomastigotes were carried out. The *in silico* analysis was also carried out to evaluate the ADMET properties of the compounds. During the analysis of the ADMET properties it was observed that the compounds present good absorption and do not present hepatotoxicity or mutagenicity. In the viability assay, it was observed that the compounds have biological activity on the epimastigotes forms of *T. cruzi*, with compounds D and E being the most active (3.124 and 5.091 μM , respectively). The growth curve showed that from 24h of exposure, compound D caused a 50% inhibition and at 96h of exposure, this inhibition was 19.64%, demonstrating a reduction of activity according to the time of exposure. The recovery test was performed with compounds B, C and D showed that after 96h the inhibition values were between 26% and 40%, indicating a trypanostatic action. The morphological analysis performed with compounds B and D indicated that these compounds cause morphological changes that affect the viability of the parasite. The viability assay with trypomastigotes treated with compound D indicated that the compound has action on the infective form of the parasite, with an IC_{50} of 10.90 μM .

Keywords: Diaryl Disulfides, *Trypanosoma cruzi*, Chagas Disease.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	10
2.	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	Taxonomia e Formas evolutivas de <i>T. cruzi</i>	11
2.2	Ciclo de Vida do Parasito.....	11
2.3	Morfologia de <i>T. cruzi</i>	14
2.4	Doença de Chagas (DC)	15
2.5	Alternativas Para o Tratamento da Doença de Chagas	16
3.	OBJETIVOS	20
3.1	Objetivos Gerais	20
3.2	Objetivos Específicos.....	20
4.	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1	Característica do estudo.....	21
4.2	Análise das propriedades farmacocinéticas e de toxicidade <i>in silico</i>	21
4.3	Cultura de <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
4.4	Dissulfetos de Diarila – os compostos sintéticos.....	22
4.5	Ensaio de viabilidade por contagem	23
4.6	Ensaio de curva de crescimento de formas epimastigotas	24
4.7	Ensaio de recuperação de formas epimastigotas	24
4.8	Avaliação da morfologia das formas epimastigotas	24
4.9	Ensaio com formas tripomastigotas	25
4.10	Análise estatística.....	25
5.	RESULTADOS	26
5.1	Análise das propriedades farmacológicas e de toxicidade <i>in silico</i>	26
5.2	Ensaio de Viabilidade das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	28
5.3	Curva de crescimento de formas epimastigotas	29
5.4	Ensaio de Recuperação de viabilidade das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	30
5.5	Avaliação da morfologia das formas epimastigotas.....	33
5.6	Ensaio com formas tripomastigotas	35
6.	DISCUSSÃO	37
7.	CONCLUSÃO.....	40
8.	REFERÊNCIAS.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formas evolutivas de <i>T. cruzi</i>	11
Figura 2. Ciclo de vida heteroxênico do parasito <i>T. cruzi</i>	13
Figura 3. Representação esquemática de epimastigota do <i>T. cruzi</i>	14
Figura 4. Curva de crescimento compostos D	30
Figura 5. Curva de recuperação composto C	31
Figura 6. Curva de recuperação composto B e D	32
Figura 7. Representação gráfica do efeito do composto Dissulfeto de Diarila D sobre a viabilidade de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	35
Figura 8. Representação gráfica do efeito do Benznidazol sobre a viabilidade de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Dados dos compostos sintéticos.....	22
Tabela 2 - Predição <i>in silico</i> (ADMET) dos dissulfetos de diarila e Benznidazol	26
Tabela 3- CI ₅₀ /24h dos compostos contra formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	28
Tabela 4 - Efeito da CI ₉₀ /24h dos compostos Dissulfeto de Diarila D e B sobre a alteração de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMET	Absorção Distribuição Metabolismo Excreção Toxicidade
CaCo-2	células de linhagem de adenocarcinoma colorretal (do inglês: <i>Cancer colon</i>)
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50%
CI ₉₀	Concentração inibitória de 90%
DC	Doença de Chagas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DTN	Doença Tropical Negligenciada
LIT	Meio de cultura de <i>T. cruzi</i> (do inglês: <i>Liver Infusion Tryptose</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAINS	Interferência de compostos pan-ensaio (do inglês: <i>Pan-assay interference compounds</i>)
PBS	Tampão fosfato-salina (do inglês: <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
Pdcd4	Morte celular programada 4 (do inglês: <i>Programmed cell death 4</i>)
SBF	Soro Bovino Fetal
µg	Microgramas
µM	Micromolar

1. INTRODUÇÃO

O protozoário *Trypanosoma cruzi* inicialmente descoberto e descrito em 1909 por Carlos Chagas, pertence a ordem Kinetoplastida família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma*.

É o parasito conhecido por ser o agente etiológico da Doença de Chagas (DC) (CHAGAS, 1909).

A DC é uma moléstia endêmica da América Latina, podendo ocorrer em outros continentes com clima tropical ou similar em menor número, sendo considerada uma Doença Tropical Negligenciada (DTN), segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). No Brasil, a DC é um problema grave de saúde pública e econômica, visto que essa doença possui tratamento oneroso. Além disso, indivíduos acometidos pela Doença de Chagas, durante a fase crônica, podem apresentar alterações cardíacas e/ou digestórias, que causam prejuízos (limitações) em suas atividades laborais (MONTEIRO et.al, 2015).

Segundo os dados da OMS estima-se que aproximadamente de 6 a 7 milhões de pessoas estejam acometidas pela DC. Estima-se que cerca de 75 milhões de pessoas estão sob risco da doença, devido ao alto número de pessoas não diagnosticadas ou não tratadas (WHO, 2020).

Atualmente existem dois medicamentos aprovados para o tratamento da DC, o Nifurtimox e Benznidazol. Ambos medicamentos possuem mecanismos de ação ainda não elucidados e não são eficazes no tratamento do estágio crônico da doença, além de apresentarem efeitos citotóxicos contra as células hospedeiras (BRENER, Z.; ANDRADE, Z. & BARRAL- NETTO, M, 2000). Em decorrência disso, pesquisas em busca de novos fármacos efetivos no controle de *T. cruzi* são necessárias.

Nesse cenário, a experimentação com compostos sintéticos possui vantagem de possibilitar a criação de novas moléculas e a modificação das existentes para aumentar a atividade biológica de interesse, de maneira a evitar o surgimento de efeitos colaterais (WERMUTH,2008).

A proposta deste trabalho é investigar o efeito do uso de compostos sintéticos denominados dissulfetos de diarila, sobre *T. cruzi* por meio de bioensaios contendo estágios específicos de desenvolvimento do parasito.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Taxonomia e Formas evolutivas de *T. cruzi*

T. cruzi é um protozoário flagelado, conhecido por ser o agente etiológico da DC pertencente à ordem Kinetoplastida família Trypanosomatidae, gênero Trypanosoma (CHAGAS, 1909).

De acordo com a organização estrutural do protozoário, são reconhecidos três estágios de vida distintos: amastigota, epimastigota e tripomastigota. Para a categorização destes estágios são utilizados os seguintes critérios: posição do cinetoplasto em relação ao núcleo; forma celular e região onde o flagelo emerge (CARVALHO, 2017).

A forma amastigota é arredondada, possui um flagelo curto não emergente da bolsa flagelar, cinetoplasto localizado na região anterior ao núcleo e é encontrada no interior das células de hospedeiros vertebrados (Figura 1A). A forma epimastigota é alongada, possui cinetoplasto localizado anteriormente ao núcleo, um flagelo emergindo da bolsa flagelar e pode ser encontrado no intestino dos hospedeiros invertebrados (Figura 1B). A forma tripomastigota é uma forma alongada, com flagelo emergindo da bolsa flagelar, cinetoplasto localizado na região posterior ao núcleo, a forma tripomastigota sanguínea pode ser encontrado na corrente sanguínea dos hospedeiros vertebrados, enquanto a tripomastigota metacíclica é encontrada nas fezes do hospedeiro invertebrado (Figura 1C) (BRENNER, 1997; SILVA, 2019).

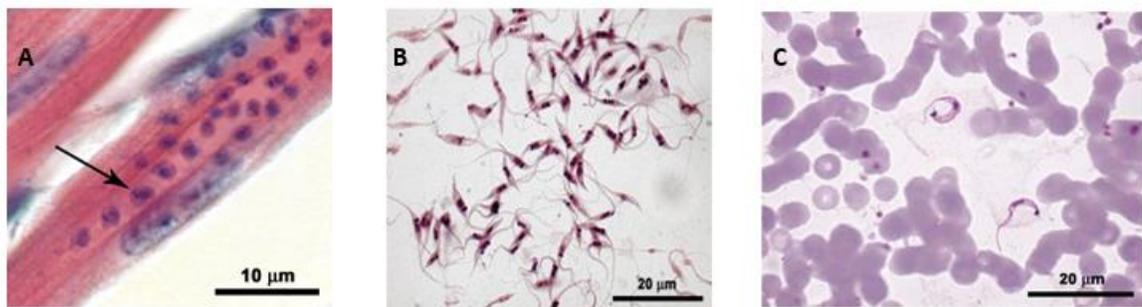


Figura 1. Formas evolutivas de *T. cruzi*. A) Amastigotas em células musculares, B) Epimastigotas, C) Tripomastigotas sanguíneas em meio a hemácias. (Fonte: Fiocruz, acesso: <http://chagas.fiocruz.br/organizacao-estrutural/>).

2.2 Ciclo de Vida do Parasito

T. cruzi apresenta um ciclo de vida heteroxênico, infectando hospedeiros vertebrados e

invertebrados ao longo do seu ciclo de vida (AGUIAR, 2013). Os hospedeiros invertebrados são os vetores do protozoário, insetos da ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae, principalmente as espécies *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans* e *Panstrongylus spp*, que são insetos hematófagos, conhecidos popularmente como barbeiros. Esses vetores, quando infectados, transmitem em suas fezes e urina esse parasito para hospedeiros vertebrados, mamíferos (COURA, 2007).

O vetor infectado, poderá, durante seu repasto sanguíneo infectar animais vertebrados mamíferos, tais como os seres humanos. Esse processo ocorre durante a eliminação de fezes e urina do vetor, que possuem as formas tripomastigotas metacíclicas que entram em contato com a pele do hospedeiro, e podem adentrar a mesma por meio de fissuras que ocorrem devido ao prurido ocasionado pela picada do vetor, bem como mucosas conjuntivas ou pelo orifício da picada (ARGOLO et.al,2008; NEVES et.al,2005; REY,2008).

Após a entrada das formas tripomastigotas metacíclicas no hospedeiro vertebrado, ocorrem os focos de infecção primária nas células do tecido adjacente ao local da picada do vetor (BRENER, 1973). O parasito então poderá adentrar à célula hospedeira por meio do processo de fagocitose induzida, sendo alocado no vacúolo da célula hospedeira, onde irá começar a se diferenciar em formas amastigotas (REY, 2008; BRENER, 1997).

Os parasitos começam a secretar enzimas que levam ao rompimento do vacúolo parasitóforo, permitindo sua realocação em todo o citoplasma, onde irão se reproduzir por meio de divisão binária. Pouco antes do rompimento da célula hospedeira, as formas amastigotas se diferenciam alcançando a corrente sanguínea, recebendo o nome de tripomastigotas sanguíneos (SILVA, 2019; LEY et.al, 1988). Os parasitos então migram para outros tecidos e órgãos, estabelecendo focos secundários de infecção, tais como o fígado, baço e gânglios linfáticos. Os tripomastigotas circulantes no sangue servem de fonte de infecção para novos vetores ao realizarem seu repasto sanguíneo (BRENNER & ANDRADE, 1979).

Um novo vetor pode então ser infectado durante o repasto sanguíneo, ingerindo a forma evolutiva tripomastigota presente na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. Após serem ingeridas, as formas tripomastigotas se direcionam ao estômago do vetor, onde ocorre a morte de uma porção significativa desses protozoários. Os que sobrevivem se alojam na porção inicial do

intestino do vetor. Nesse momento ocorre a diferenciação da forma tripomastigota para epimastigota que se multiplicam por divisão binária simples, se fixam à parede intestinal por meio do flagelo, e então, na porção posterior do intestino irão posteriormente diferenciar em formas tripomastigotas metacíclicas, dando continuidade ao seu ciclo de vida (Figura 2). Depois de infectado o inseto vetor porta o parasito por toda a sua vida, em média de 1 a 2 anos, não sendo capaz de infectar seus descendentes (REY, 2008; COURA, 2007; NEVES et.al, 2005).

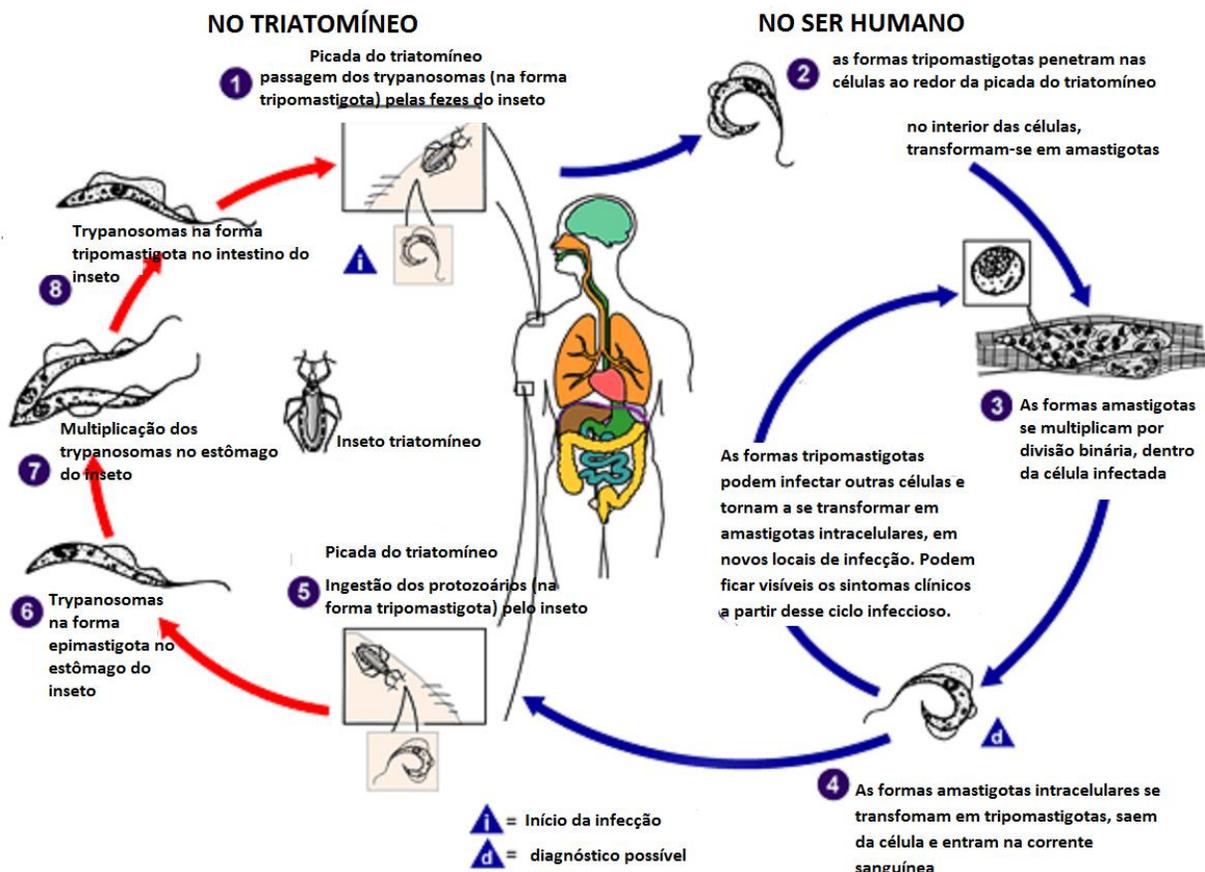


Figura 2. Ciclo de vida heteroxênico do parasito *T. cruzi*. (Fonte: CDC, acesso: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>).

Outras formas de transmissão menos comuns incluem transfusão de sangue ou transplante de órgãos contaminados com o parasito e acidentes de laboratório. A infecção por via oral ocorre pela ingestão de alimentos contaminados com fezes e urina do vetor, que possuem a forma tripomastigota metacíclica, responsável pela maioria dos casos da DC aguda no Brasil nos

últimos anos (AGUIAR, 2013; PASSOS et.al, 2012).

2.3 Morfologia de *T. cruzi*

Além das organelas típicas da maioria das células eucarióticas, como núcleo, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi e mitocôndria, os tripanossomatídeos apresentam algumas estruturas peculiares, como os microtúbulos subpeliculares, a estrutura paraflagelar, o cinetoplasto, os glicossomos e os acidocalcissomos (Figura 3). Essas estruturas conferem ao parasito uma série de características, sendo importantes para sua sobrevivência e patogenicidade (DE SOUZA; SANT'ANNA & CUNHA-E-SILVA, 2009).⁹

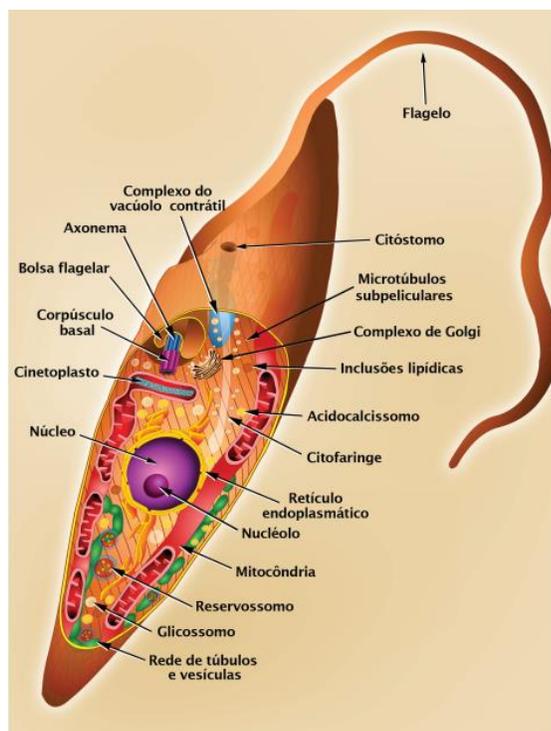


Figura 3. Representação esquemática de epimastigota do *T. cruzi*. (Fonte: Fiocruz, acesso: <http://chagas.fiocruz.br/organizacao-estrutural/>)

O flagelo presente em todos os estágios de desenvolvimento desse parasito, de forma característica em cada estágio, permite a motilidade do mesmo, com exceção da forma amastigota. O vacúolo desses parasitos contém substâncias ácidas, que permitem o rompimento do vacúolo parasitóforo, permitindo que o *T. cruzi* atinja o citoplasma da célula hospedeira e inicie sua diferenciação e reprodução (SOUZA, 2009; ZUMA.et al, 2021).

Os reservossomos são estruturas que possuem em seu interior enzimas como proteases, principalmente cruzipaina, e proteínas ingeridas oriundas da bolsa flagelar e do crisóstomo. Acredita-se que os reservossomos sejam compartimentos pré-lisossomais e que estejam associados com a reserva de proteínas e lipídios, além de estarem relacionados com a via endocítica desse protozoário (SOARES et al, 1992; SOUZA, 1999; SOUZA, 2009).

A superfície celular dos tripanossomatídeos é composta pela membrana plasmática, que apresenta um grande número de macromoléculas ligadas através de âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Imediatamente abaixo dela está presente uma camada de microtúbulos subpeliculares, os quais conferem estabilidade e resistência à célula. Eles se encontram distribuídos por todo o corpo do protozoário, exceto na região de ligação do flagelo e na região da bolsa flagelar. Os microtúbulos subpeliculares são componentes importantes do citoesqueleto do parasito, constituídos principalmente por tubulina, que mantém a conformação celular, e está também diretamente relacionado com a divisão celular (DE SOUZA, 1984, 2000, 2002; SANTOS et.al, 2013).

T. cruzi, assim como todos os membros da classe Kinetoplastida, apresenta uma mitocôndria única e ramificada que se estende por toda a célula. O material genético mitocondrial, encontra-se concentrado em uma determinada região da mitocôndria, denominada de cinetoplasto (ou kinetoplasto), que está localizada logo abaixo do corpúsculo basal. Portanto, dando origem a uma estrutura denominada de DNA cinetoplasto (kDNA) (SHAPIRO & EGLUND, 1995; DE SOUZA, 2002).

2.4 Doença de Chagas (DC)

Embora a descoberta do vetor e do agente etiológico da DC, bem como a caracterização de seu ciclo de vida tenha ocorrido em 1909 (CHAGAS, 1909), nos dias atuais essa enfermidade ainda acomete muitas pessoas na América Latina, representando umas das quatro principais endemias da região (ARGOLO et al. 2008).

Estima-se que existam de 11 a 12 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* na América Latina sendo aproximadamente um milhão no Brasil. Em relação aos casos confirmados no Brasil de 2010 a 2019, 84% se encontravam na região Norte, sendo portanto, a região mais atingida, onde a principal forma de transmissão é a oral (BRASIL, Ministério da Saúde, 2020; VIEIRA,

2017).

Essa protozoose se mostra mais frequente em áreas rurais, precárias e com pouco ou nenhum saneamento básico, mostrando uma prevalência em pessoas de baixa renda (SOUZA; NAKAMURA & CORRÊA, 2012). Apresenta alta gravidade e relevância devido aos seus impactos na saúde pública, pois apresenta uma grande taxa de mortalidade, visto que nos últimos 10 anos foram registrados em média 4.000 mortes a cada ano no Brasil, em decorrência dessa enfermidade, representando uma das 4 maiores causas de morte por doenças infecciosas e parasitárias no país, em razão disso o seu controle é extremamente necessário (BRASIL, Ministério da Saúde, 2022; MARTINS et al., 2016; VERONESI, 2009).

A DC pode ser dividida em dois principais fases de acordo com as manifestações clínicas, a DC aguda e a DC crônica. Na fase aguda, o indivíduo infectado pode apresentar quadros de febre, mal-estar, falta de apetite, uma leve inflamação no local da picada (transmissão vetorial), enfartamento de gânglios linfáticos, aumento do baço e do fígado e distúrbios cardíacos. Esses sintomas duram em média de 4 a 10 dias, e nessa fase a doença pode ser eficientemente tratada, porém muitas vezes esses sintomas passam despercebidos ou a procura por orientação médica ocorre tardiamente, permitindo que a doença evolua para a fase crônica. Na fase crônica, a DC pode evoluir para complicações graves que acometem o miocárdio, músculo liso do trato digestório, o fígado e o sistema linfático. Nessa fase não há tratamento eficiente (REY, 2008; NEVES et al. 2005; ARGOLO et al. 2008).

O expressivo crescimento populacional e a constante invasão de áreas silvestres pelo ser humano, fez com que a DC passasse da categoria de zoonose autóctone de animais silvestres a uma zoonose de animais domésticos e uma endemia humana (MENDES, 2008; WHO, 2020).

2.5 Alternativas Para o Tratamento da Doença de Chagas

Atualmente, existem apenas dois medicamentos utilizados no tratamento da DC, sendo eles o Nifurmitox e o Benzonidazol. Ambos apresentam efeitos tóxicos para as células de mamíferos, sendo que o Nifurmitox foi retirado do mercado por apresentar efeitos colaterais como anorexia, perda de peso, náuseas e neuropatia periférica e atualmente só é disponibilizado para utilização em

casos específicos onde existe uma resistência ao Benzonidazol (BRASIL, Ministério da Saúde, 2020; FERREIRA, 1990).

Embora sejam utilizados há aproximadamente 5 décadas, ambos os medicamentos não possuem mecanismos de ação totalmente elucidados, sendo eficazes apenas na fase aguda da doença, apresentando baixa ou nenhuma ação no tratamento da fase crônica (REY, 2008; FERREIRA, 1990; CASTRO & SOEIRO, 2017).

Pesquisas a respeito de compostos ativos contra *T. cruzi* mostram que uma das principais abordagens de estudo tem como alvo enzimas envolvidas na biossíntese de microtúbulos. Microtúbulos subpeliculares constituem o citoesqueleto de *T. cruzi*, fundamentais no processo de divisão e estruturação da célula. A α -tubulina, β -tubulina e γ -tubulina são as proteínas que compõem esses microtúbulos. As tubulinas de mamíferos e de Tripanossomatídeos apresentam uma similaridade estrutural de aproximadamente 18%, representando um possível alvo para fármacos (SOUZA, 2009; ZUMA, 2021; MELOS & ECHEVARRIA, 2012).

Outra estratégia amplamente estudada é voltada à identificação de alvos específicos em vias metabólicas ou estruturas essenciais para o parasito, para as quais não haja semelhança no hospedeiro vertebrado, como a enzima tripanotino redutase, exclusiva dos tripanossomatídeos, responsável por processos antioxidantes essenciais para a sobrevivência do parasito (MELOS & ECHEVARRIA, 2012; GENESTRA et al., 2006; SIEGEL, BOUER & SCHIMER, 2005).

A cruzipaina também se mostra um alvo interessante, pois além de não ser observada em mamíferos, é uma cisteína protease de alta importância para o parasito, visto que está envolvida na interação entre o parasito e o intestino de *R. prolixus* e em etapas de invasão celular, diferenciação e multiplicação do parasito em mamíferos (UEHARA et al., 2012; DUSCHAK & COUTO, 2009).

A síntese química de compostos tem sido amplamente utilizada como uma estratégia racional para o desenho de novas drogas para o tratamento da DC, tais como derivados de benzotropolona, de nitroimidazol, de diamidinas aromáticas e debenzofuroxano (DUSCHAK & COUTO, 2007; SALAS et al., 2011). Os compostos sintéticos são interessantes, considerando sua versatilidade para modificações de sua estrutura afim de obter-se melhorias em sua atividade biológica e/ou redução de sua citotoxicidade (WERMUTH, 2008).

Na busca por compostos com ação antitumoral, Pereira (2017) sintetizou quimicamente compostos estruturalmente semelhantes à Combretastatina A-4 (CA-4), um potente inibidor natural da síntese de tubulina (LIN et al., 1988; PETTIT et al., 1989; PETTIT et al., 1995).

Duas classes de compostos denominados de sulfeto de diarila e dissulfetos de diarila foram produzidos e observou-se a capacidade de inibirem a síntese de tubulina em diversas linhagens de células neoplásicas humanas (SANTOS et.al., 2013).

Com relação aos compostos sulfeto de diarila, há diversos relatos que indicam características interessantes a serem abordadas no combate ao *T. cruzi*, pois tais compostos apresentaram a capacidade de inibir a enzima tripanotona redutase de *Leishmania infantum in vitro* (SACCOLITI et.al, 2017). Dados de modelagem molecular apontaram para a possível inibição da mesma enzima em *Trypanosoma brucei*, o agente etiológico da Tripanossomíase Africana, e em *T. cruzi* (STUMP et.al, 2008).

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 (do inglês: *Programmed cell death 4*), sugerindo uma contribuição nas propriedades antiproliferativas (SCHMID, 2016).

A classe dos compostos dissulfetos de diarila, apresentam então diversas propriedades interessantes que tem sido exploradas em diversas áreas da química sintética, farmacêutica e na produção de polímeros (LIU & ZHANG, 2003).

Recentemente, ao estudar o efeito *in vitro* de dissulfetos de diarila sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi* cepa Dm28c, Migliorini (2021) verificou uma excelente atividade inibitória, sendo capaz de manter a inibição do crescimento do parasito na fase epimastigota, além de um reduzido efeito citotóxico sobre células de mamífero.

Os ensaios *in vitro* tem contribuído grandemente com o avanço na área de pesquisa para a busca de novos compostos ativos contra organismos vivos, principalmente microrganismos, pois representam uma ferramenta de elevada reprodutibilidade, baixa complexidade e viabilidade econômica, caracterizando-se como uma das principais formas de investigação em ensaios biológicos. Com o avanço da bioinformática essas atividades foram complementadas pela análise

in silico. Essa estratégia utiliza *softwares* que capturam, analisam e integram dados biológicos e médicos disponíveis nas variadas bases de dados de acesso livre da internet ou de outras fontes. Utilizando essa abordagem é possível sugerir hipótese e contribuir para o avanço na área médica e farmacêutica (EKINS et al., 2011; ANDRADE & BRAGA, 2014; EKINS et al., 2007).

Diante do exposto e impulsionados pelos resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa, este trabalho tem por finalidade a avaliação do efeito dos compostos de dissulfetos de diarila sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar o efeito de dissulfetos de diarila sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

3.2 Objetivos Específicos:

- Determinar a Concentração Inibitória 50% (CI₅₀) dos compostos dissulfetos de diarila sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi*, por meio do ensaio de viabilidade.
- Analisar o crescimento das formas epimastigotas de *T. cruzi*, tratados com a CI₅₀ dos compostos que mais afetaram a viabilidade do parasito;
- Determinar o efeito tripanocida ou tripanostático dos compostos por meio de ensaio de recuperação com formas epimastigotas;
- Analisar a morfologia de formas epimastigotas de *T. cruzi* durante o ensaio de recuperação;
- Avaliar o efeito dos compostos mais ativos contra formas epimastigotas, sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Característica do Estudo

Este estudo propõe avaliar a atividade biológica dos compostos Dissulfeto de Diarila sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas *T. cruzi*. Com base nos resultados obtidos em trabalho recentemente realizado em nosso laboratório, por Bruna Migliorini (2021), verificou-se que os referidos compostos apresentaram atividade inibitória frente às formas epimastigotas de *T. cruzi*, cepa Dm28c, com baixa citotoxicidade sobre células de mamíferos nas condições *in vitro*. Tais resultados impulsionaram o interesse do grupo de pesquisa em dar continuidade aos estudos com esta classe de compostos.

4.2 Análise das propriedades farmacocinéticas e de toxicidade *in silico*

As propriedades farmacocinéticas de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) dos compostos utilizados neste estudo foi calculada por meio da plataforma *online* de acesso gratuito, o pkCSM (do inglês: *Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic*) por meio dos *softwares Tox-Prediction software, STopTox software e PAINS-remover software*) (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsml/>). Trata-se de um algoritmo utilizado para a predição de características farmacocinéticas e toxicológicas, utilizando aprendizagem de máquina em sua metodologia. Possui um conjunto testes de mais de 10 mil moléculas, visando uma predição com maior precisão (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015). Para a realização das análises utilizou-se o medicamento referência como modelo, o Benznidazol, uma vez que suas características ADMET já são amplamente conhecidas.

4.3 Cultura de *T. cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c foram mantidas em meio LIT (do inglês: *Liver Infusion Tryptose*) (CAMARGO, 1964), suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF), a 28 °C, com repiques periódicos de 3 dias. Para os experimentos foram utilizados parasitos de culturas em fase *log*, no estágio de vida epimastigota. A partir das culturas de formas epimastigotas, foram obtidas formas tripomastigotas metacíclicas, por meio do processo de diferenciação *in vitro*, sob condições quimicamente definidas (CONTRERAS et.al.,1985; BONALDO et.al., 1988)

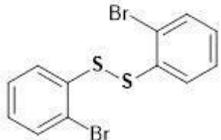
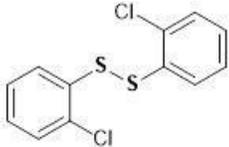
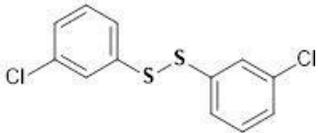
4.4 Dissulfetos de diarila - compostos sintéticos

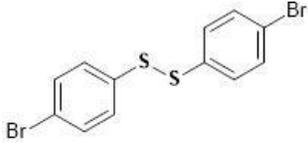
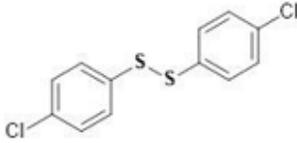
Os compostos sintéticos que foram utilizados neste trabalho foram produzidos pela Dr Rejane Gonçalves Diniz Khodyuk e fornecidos pelo Dr Edson dos Anjos, ambos pesquisadores vinculados ao Laboratório SINTMOL-UFMS (*Synthesis and Transformation of Organic Molecules*). Os compostos foram mantidos sob refrigeração até o momento do uso, no Laboratório de Imunologia, Biologia Molecular e Bioensaios (LabImunoBio) da UFMS.

Os compostos dissulfetos de diarila foram sintetizados com dois anéis fenil, contendo substituintes haletos, esses compostos foram derivados de tióis tratados com $\text{Al}(\text{H}_2\text{PO}_4)_3\text{-HNO}_3$ como catalisador para a nitração dos anéis aromáticos e acetoniato para acelerar a reação.

Todos os compostos utilizados nos ensaios foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos em PBS (do inglês: *Phosphate Buffer Saline*), no momento da realização dos ensaios, de modo que a concentração de DMSO não ultrapassasse 1% (v/v), concentração que não afeta o crescimento ou viabilidade do parasito (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

4.5 Ensaio de viabilidade por contagem

O efeito dos compostos sintéticos sobre o crescimento e a morfologia de formas epimastigotas do parasito tratados com a Concentração Inibitória 50% (CI₅₀) em 24h de tratamento com os compostos sintéticos denominados A, B, C, D e E, foi determinado por meio de análise de regressão não linear.

Os ensaios foram realizados em placas de 24 poços, utilizando-se parasitos em fase exponencial de crescimento submetidos a 6 concentrações de cada composto, sendo respectivamente 0 µg/mL(Controle), 1 µg/mL, 1,5 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL, 6 µg/mL, sendo utilizadas três réplicas para todos os tratamentos. No controle foi adicionado PBS ao invés dos compostos.

O método de contagem para a investigação de viabilidade de *T. cruzi* é utilizado em diversos trabalhos envolvendo ensaios biológicos *in vitro*, pois permite a observação de características como mobilidade e morfologia geral da célula (CASTRO, 2012; ANJOS, 2014; MIGLIORINI, 2020).

Neste trabalho foram considerados viáveis os parasitos que apresentaram motilidade característica, com flagelo aparente e morfologia fusiforme. A contagem do número de parasitos foi realizada em câmara de Neubauer.

4.6 Ensaio de curva de crescimento de formas epimastigotas

O crescimento *in vitro* dos parasitos (1×10^6 /mL) tratados com a $CI_{50}/24h$ dos compostos mais ativos no ensaio de viabilidade, em placas de 24 poços, foi monitorado durante quatro dias (96h), por meio de contagens a cada 24 horas em câmara de Neubauer, com o objetivo de verificar o efeito da $CI_{50}/24h$ em longos períodos de exposição. Para o controle, foram cultivados parasitos na presença PBS1x na mesma densidade celular do que aqueles cultivados na presença dos compostos. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.7 Ensaio de recuperação de formas epimastigotas

Com base nos valores $CI_{50}/24h$ obtidos, a $CI_{90}/24h$ aproximada foi definida como 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para todos os compostos. O ensaio de recuperação permite realizar a análise dos compostos frente ao parasito, observando se o composto possui atividade tripanocida ou tripanostática. Para a realização deste teste os parasitos em concentração 1×10^7 /mL foram expostos à concentração definida como $CI_{90}/24h$ dos compostos e mantidos a 28 °C durante 4 horas. Posteriormente as culturas foram centrifugadas a 2.000 xg/10min e lavadas 2 vezes em PBS1x, em seguida a densidade celular foi ajustada para 1×10^6 /mL em meio LIT na ausência dos compostos. Para o controle foi utilizada cultura com adição de PBS1x. O material foi mantido a 28 °C em placa de 24 poços durante 96h, com contagens a cada 24h em câmara de Neubauer, para fins de avaliar a multiplicação dos parasitos. A curva e os valores de desvio padrão foram estabelecidos utilizando Microsoft Office Excel 2016. Em paralelo a cada ponto da curva, foi realizada a análise da morfologia dos parasitos por microscopia óptica. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.8 Avaliação da morfologia das formas epimastigotas tratadas com os compostos durante o ensaio de recuperação

A fim de observar se o tratamento com os compostos provoca alguma alteração morfológica nas formas epimastigotas de *T. cruzi*, a cada ponto da curva de recuperação, foram realizadas análises da mesma por microscopia óptica. Os parasitos foram coletados por centrifugação a 2.000 xg por 10 minutos, lavados duas vezes em PBS1X e fixados com paraformaldeído a 4% por 20 minutos. Então foram aplicados 5×10^6 /mL células em 10 μL , sobre uma lâmina de microscopia e corados pelo método Panótico (ciclohexadieno 0,1%, azobenzenosulfônicos 0,1% e fenotiazina 0,1%). As lâminas foram montadas em Permount® (Fisher Scientific) e examinadas

com um microscópio Nikon E600 em aumento de 1.000x. Foi determinado o percentual de formas alteradas após a análise microscópica de 100 parasitos para cada tratamento. Nesse ensaio foram consideradas formas alteradas os parasitos que se apresentaram imóveis, sem flagelo aparente ou sem a morfologia fusiforme, característica desse estágio de desenvolvimento.

4.9 Ensaio com formas tripomastigotas

Formas tripomastigotas metacíclicas foram distribuídas em placas de 96 poços na concentração de 1×10^5 células/poço em meio TAU3AAG (*Triatomine Artificial Urine* suplementado com glicose, prolina, glutamato e aspartato de sódio) contendo o composto mais ativo no ensaio de viabilidade com formas epimastigotas, PBS1x (controle negativo) ou Benznidazol (controle positivo). Para a realização do teste foram selecionadas três concentrações do composto D, baseadas no valor de $CI_{50}/24h$ para formas epimastigotas, sendo elas $3,124 \mu M$, $6,248 \mu M$ e $12,496 \mu M$, enquanto para o controle positivo foram selecionadas duas concentrações de Benznidazol, 800 e $1.600 \mu M$.

Após 4 h de incubação, foi avaliada a atividade dos compostos, por meio de contagem em câmara de Neubauer, utilizando como critério a mobilidade dos parasitos. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.10 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 parasitos tratados e controle foi realizada por meio do teste de análise de variância de uma via (ANOVA).

5. RESULTADOS

5.1 Análise das propriedades farmacocinéticas e de toxicidade *in silico*

Os resultados obtidos com a análise *in silico* das propriedades ADMET dos compostos dissulfeto de diarila estão elencados na tabela 2 e indicam que as características farmacocinéticas dos compostos são muito semelhantes.

Tabela 2. Predição *in silico* dos parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADMET) dos dissulfetos de diarila e Benznidazol.

Predição ADMET						
Compostos	A	B	C	D	E	BNZ
Absorção						
Solubilidade em água (logP) ¹	-6.681	-6.425	-6.48	-6.645	-6.388	-2.723
Permeabilidade ao CaCo ₂ (log Papp em 10 cm ⁻⁶ /s) ¹	1.667	1.668	1.505	1.465	1.466	0.655
Absorção intestinal humana (% absorvido) ¹	89.691	89.825	90.284	89.285	89.419	75.494
Permeabilidade da pele (log Kp) ¹	-1.883	-1.852	-1.837	-1.865	-1.834	-2.735
BBB permeability (log BB) ¹	0,425	0,441	0.494	0.468	0.484	-0.863
CNS permeability (log PS) ¹	-1.301	-1.301	-1.314	-1.304	-1.304	-2.69
Metabolização						
Inibidor de CYP2D6 ¹	N	N	N	N	N	N
Inibidor de CYP3A4 ¹	N	N	N	N	N	N
Substrato de CYP2D6 ¹	N	N	N	N	N	N
Substrato de CYP3A4 ¹	S	S	S	S	S	N
Mutagenicidade (AMES) ^{1,2}	N	N	N	N	N	S
Hepatotoxicidade ^{1,2}	N	N	N	N	N	S
Sensibilização da pele ³	N	S	S	N	S	N
PAINS						
<i>Pan-assay interference compounds</i> ⁵	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

¹pkCSM *software*; ²Tox-Prediction *software*; ³STopTox *software*; ⁵PAINS-remover *software*. Abreviações: Log P- log do coeficiente de partição (P); CaCo₂-linhagem celular de adenocarcinoma colorretal epitelial humano; Papp - coeficiente de permeabilidade aparente; Kp - constante de permeabilidade da pele; AMES- método para avaliar potencial mutagênico; Neg-negativo. N-Não; S-Sim

Todos os compostos são facilmente absorvidos pela mucosa intestinal, capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e penetrar no sistema nervoso central.

A avaliação dos parâmetros de absorção dos compostos indicou uma boa predição de permeabilidade e absorção intestinal, o que poderá contribuir para sua administração por via entérica (oral, sublingual ou retal).

Conforme pode ser observado na tabela 2 todos os compostos apresentaram elevada (valor > 0,9) permeabilidade à células CaCo-2 (células de linhagem de adenocarcinoma colorretal - do inglês: *Cancer Colon*) e podem ser absorvidos pela mucosa intestinal. No entanto, o Benznidazol apresentou menor permeabilidade.

Em relação à permeabilidade à pele, ao contrário do observado para o Benznidazol, todos os dissulfetos de diarila são permeáveis, porém somente os compostos A, B e D apresentaram a propriedade de provocar sensibilização cutânea.

Corroborando os dados obtidos *in vitro*, os quais indicaram uma baixa citotoxicidade sobre células Vero, a análise *in silico* indicou que nenhum dos compostos dissulfeto de diarila apresentou hepatotoxicidade. Da mesma forma, nenhum dos compostos apresentou potencial para mutagenicidade (AMES).

O Benznidazol compartilha a maioria das características ADMET com os dissulfetos de diarila, porém verificou-se que apresenta mutagenicidade e hepatotoxicidade, propriedades amplamente conhecidas pela comunidade científica, o que inclusive justifica a busca por novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas.

Sobre as características de metabolização de fármacos, avaliou-se as propriedades que indicam para a possibilidade de determinado composto se comportar como substrato ou inibidor das enzimas do complexo enzimático Citocromo P450 (CYP450). Este complexo é composto por diversas enzimas que promovem a modificação química de várias moléculas exógenas (por exemplo medicamentos) afim de facilitar a sua excreção pelo organismo humano ou transformá-lo em sua forma farmacológica ativa. Dentre as diversas enzimas que compõem o referido complexo, as duas principais isoformas responsáveis pela metabolização ou biotransformação de fármacos são CYP2D6 e CYP3A4. Portanto se um dado fármaco é substrato para essas enzimas, significa que será metabolizado por essa via, enquanto sendo inibidor irá afetar drasticamente as propriedades do mesmo.

Nenhum dos compostos testados, inclusive o fármaco Benznidazol, apresentam propriedades de inibidores das enzimas CYP2D6 e CYP3A4, tampouco foram caracterizados como substratos para CYP2D6. Por outro lado, todos os compostos dissulfetos de diarila apresentaram propriedades de substrato para a isoforma CYP3A4.

Nenhum dos compostos avaliados, inclusive o Benznidazol, foram identificados como interferentes em ensaios biológicos, pela ferramenta PAINS (do inglês: *Pan-assay interference*

compounds), eliminando então a possibilidade de resultados falso positivos.

5.2 Ensaio de Viabilidade das formas epimastigotas de *T. cruzi*:

A avaliação da atividade *in vitro* dos compostos dissulfetos de diarila sobre a viabilidade, morfologia e reprodução de formas epimastigotas de *T. cruzi* foi realizada através do método de contagem. Com base nos dados obtidos, foi possível observar que todos os compostos testados possuem a capacidade de alterar a viabilidade e a capacidade de multiplicação dos parasitos.

Por meio desse ensaio, foi determinada a concentração em que cada composto foi capaz de inibir 50% da viabilidade celular (CI₅₀) de formas epimastigotas, em 24h de tratamento, por meio de análise de regressão não linear. Os valores de CI₅₀/24h obtidos para cada composto sobre formas epimastigotas de *T. cruzi* pelo método de contagem encontram-se na tabela 3:

Tabela 3 – CI₅₀/24h dos compostos contra formas epimastigotas de *T. cruzi*

Composto	CI ₅₀ (µg/mL-µM)	R ²	Intervalo de Confiança (95%)
A	2,271 - 6,074	0,9496	2,047 - 2,520
B	2,020 – 7,064	0,9185	1,817 – 2,246
C	1,503 – 5,274	0,9865	1,422 – 1,588
D	1,168 – 3,124	0,9543	1,025 – 1,331
E	1,456 – 5,091	0,8843	1,306 – 1,623

Por meio do teste de viabilidade, foi observado que os compostos possuem atividade biológica contra a forma replicativa epimastigota de *T. cruzi*, sendo que os valores respectivos da CI₅₀ variam de 3,124 até 7,0644 µM.

Os compostos que demonstraram uma maior atividade foram os compostos D e E, pois em uma menor concentração foram capazes de reduzir 50% do crescimento dos parasitos, os valores de CI_{50} para esses compostos foram 3,124 e 5,091 μM respectivamente.

A morfologia característica dos parasitos foi afetada, em todos os tratamentos sendo possível observar a presença de formas atípicas, mais arredondadas ou com a presença de vacúolos citoplasmáticos. Os parasitos com essas características eram móveis, embora apresentassem maior dificuldade de motilidade. Portanto não foram considerados viáveis, pelos critérios pré-estabelecidos.

Todos os compostos testados apresentaram uma CI_{50} menor do que aquela encontrada para o Benznidazol em formas epimastigotas de *T. cruzi*, em ensaios *in vitro* com a cepa Dm28, a qual variou entre 9,99 μM e 14,98 μM . Esses resultados apontam para futuros estudos envolvendo essa classe de compostos, como candidatos promissores com atividade contra *T. cruzi*.

5.3 Curva de crescimento de formas epimastigotas por contagem

Foram selecionados, os compostos D e E, para a realização da curva de crescimento, pois mostraram-se mais ativos, de acordo com os resultados de $CI_{50}/24h$. Os dados obtidos mostram uma recuperação gradual do tratamento com o composto D. A curva de crescimento está representada na figura 4.

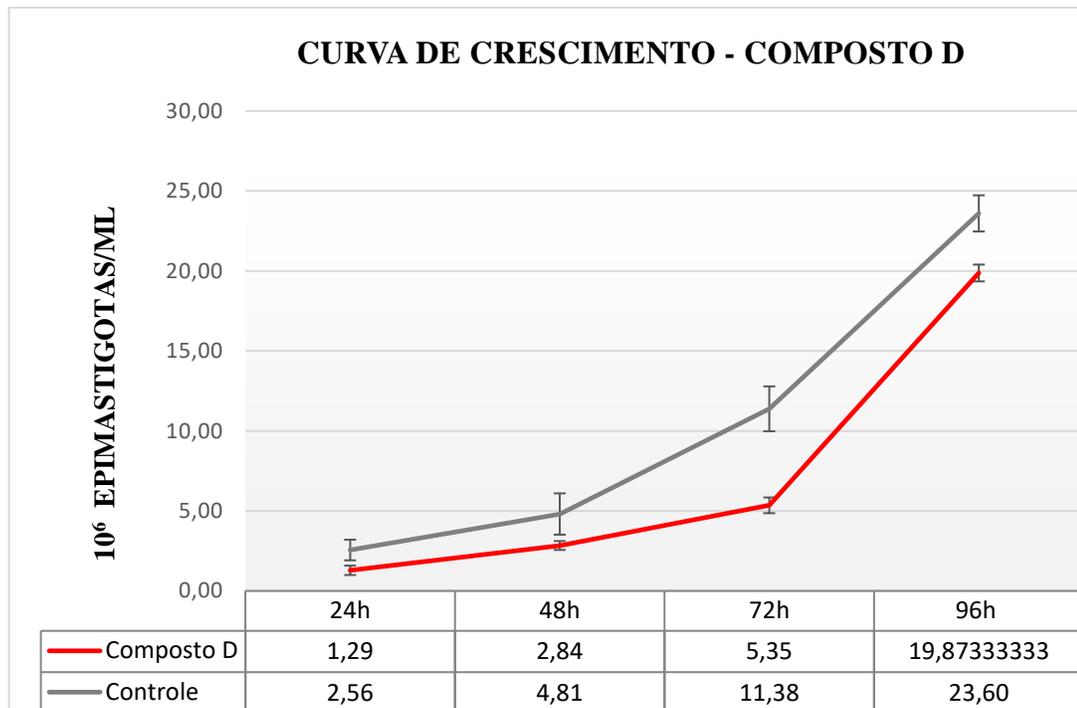


Figura 4. Efeito da $CI_{50}/24h$ dos compostos dissulfetos de diarila D sobre o crescimento de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Em todos os gráficos, cada ponto corresponde à média das triplicatas com desvio padrão.

Como pode ser observado na figura 5, houve uma redução do crescimento dos parasitos expostos à $CI_{50}/24h$ do composto D durante todo o período de crescimento, indicando que a atividade do composto se manteve por 96h, quando foi observada uma média de parasitos de $24,73 \times 10^6/mL$ para o controle e $19,87 \times 10^6/mL$ para o tratamento com composto D, o que representa uma inibição de aproximadamente 20% do crescimento. Após 72 horas de tratamento a diferença era maior, o controle apresentava uma média de $11,38 \times 10^6/mL$ enquanto para os tratados a média era $5,35 \times 10^6/mL$, o que representa inibição de 53% do crescimento.

O composto E não apresentou atividade nesse teste, apresentando densidade celular igual à do controle.

5.4 Ensaio de Recuperação de viabilidade das formas epimastigotas de *T. cruzi* por contagem

Esse ensaio foi realizado com os compostos B, C e D, os dados referentes ao crescimento dos parasitos no teste de recuperação do composto C podem ser observados na figura 5 e os dados referentes aos compostos B e D podem ser observados na figura 6.

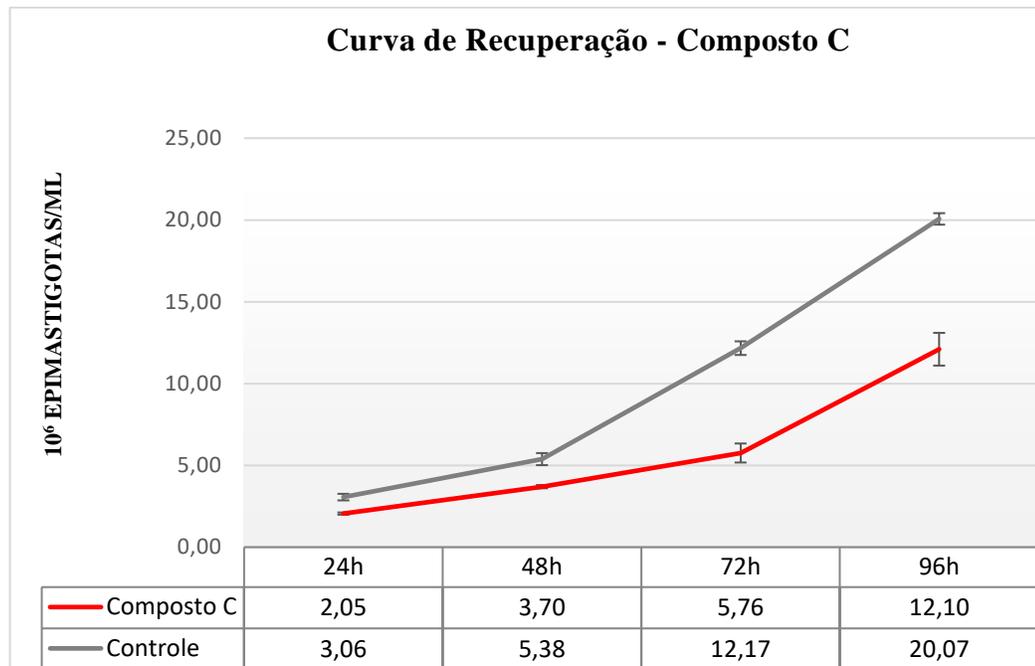


Figura 5. Efeito da $CL_{90}/24h$ do composto Dissulfeto de Diarila C sobre o crescimento de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Em todos os gráficos, cada ponto corresponde à média das triplicatas com desvio padrão.

A curva de recuperação do crescimento apresentada na figura 6 mostra que 4 horas de tratamento com uma alta concentração do composto C, com posterior incubação de parasitos livres de compostos, levou a uma redução do crescimento em relação ao controle, que se manteve durante todo o período do ensaio (96h).

Nesse ensaio foi possível observar que 24h após a retirada dos compostos, a média da densidade celular do controle foi $3,06 \times 10^6 / mL$ enquanto os parasitos tratados apresentaram uma média de $2,05 \times 10^6$ oque representa uma inibição do crescimento de 33%. Após 48 horas essa inibição caiu para 31%, visto que o controle apresentou uma densidade celular de $5,38 \times 10^6 / mL$ e os tratados $3,70 \times 10^6 / mL$. Em 72 horas a inibição subiu para 52,70%, densidade celular de $12,17 \times 10^6 / mL$ para o controle e $5,76 \times 10^6 / mL$ para tratados. No último ponto de contagem, em 96 horas a densidade celular foi $20 \times 10^6 / mL$ para o controle e $12,10 \times 10^6 / mL$ para os tratados, apresentando uma inibição de 39,71%. O último ponto de contagem apresenta uma inibição menor que em 72h porém maior que em 24h, indicando uma estabilidade na inibição do crescimento.

Pode ser observado na figura 7, referente a curva de recuperação do crescimento dos

parasitos tratados com os compostos B e D, que houve também houve uma redução do crescimento em relação ao controle, redução que esteve presente em todos os pontos de contagem.

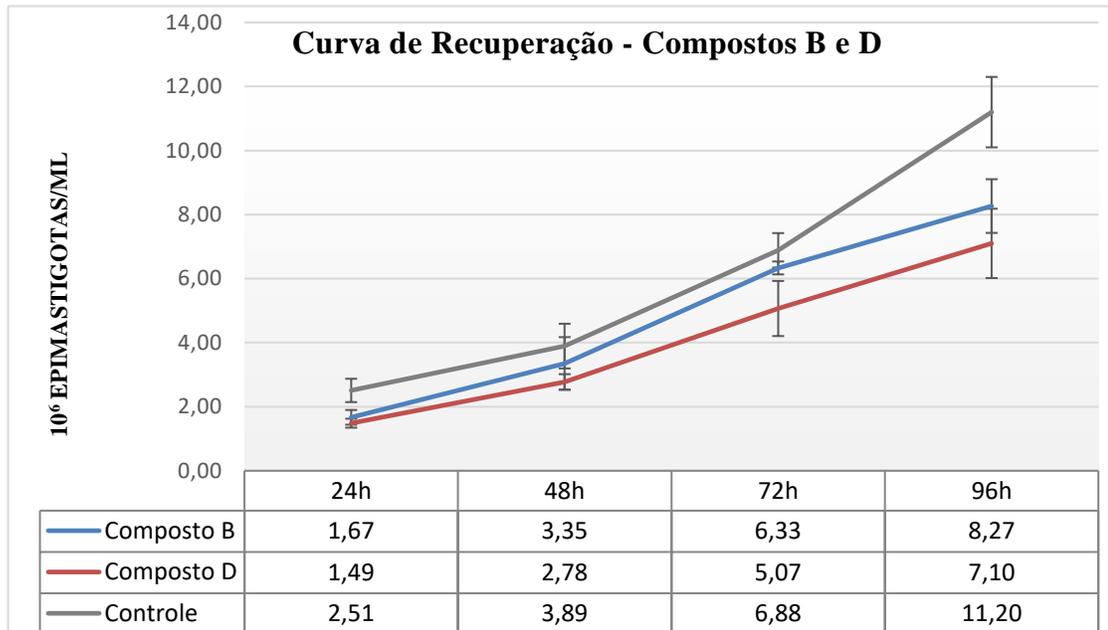


Figura 6. Efeito da $CL_{90}/24h$ do composto Dissulfeto de Diarila B e D sobre o crescimento de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Em todos os gráficos, cada ponto corresponde à média das triplicatas com desvio padrão.

Os dados apresentados mostram que os valores de densidade celular 24h após a retirada dos compostos foi de $2,51 \times 10^6/m/L$ para o controle, $1,67 \times 10^6/m/L$ para o composto B e $1,48 \times 10^6/m/L$ para o composto D. Isso indica que houve inibição de 33,60% do crescimento dos parasitos, mesmo após 24h da retirada do composto B, valor próximo ao observado para o tratamento com o composto C, no mesmo intervalo de tempo sem a presença do mesmo. Com relação ao composto D foi observada uma inibição de 40,90% no crescimento dos parasitos, nas mesmas condições. Com isso, o composto D apresentou maior capacidade de inibir o crescimento dos parasitos.

Após 48 e 72 horas os valores de inibição diminuíram para os compostos B e D, sendo assim os valores de densidade celular dos parasitos tratados se aproximaram mais do controle, sendo respectivamente $3,89 \times 10^6/mL$ para o controle, $3,35 \times 10^6/mL$ para o composto B e $2,78 \times 10^6/mL$ para o composto D 48 horas após a retirada dos compostos. Esses valores representam uma inibição de 13,88% para o composto B e 28,66% para o composto D. Após 72h

da retirada dos compostos os valores de densidade eram $6,68 \times 10^6/\text{mL}$ para o controle, $6,33 \times 10^6/\text{mL}$ para o composto B e $5,07 \times 10^6/\text{mL}$ para o composto D, o que representa uma inibição de 7,95% e 26,36% respectivamente.

No último ponto de contagem, 96 horas após a retirada dos compostos a diferença entre a viabilidade dos parasitos tratados e do controle se tornou mais evidente, os valores de densidade celular eram $11,20 \times 10^6/\text{mL}$ para o controle, $8,27 \times 10^6/\text{mL}$ para o composto B e $7,10 \times 10^6/\text{mL}$ para o composto D. Esses valores representam uma inibição de 26,19% para o composto B e 36,61% para o composto D.

Considerando os dados obtidos no ensaio de recuperação de crescimento, os compostos C e D mantiveram um valor de inibição maior do que o composto B, esse resultado está de acordo com os valores obtidos para a $CI_{50}/24\text{h}$, onde o composto B mostrou uma menor atividade em relação aos outros dois compostos.

Os resultados obtidos nesses ensaios indicam que os três compostos testados possuem valores aproximados de inibição no crescimento dos parasitos, porém existe nas formas epimastigotas de *T. cruzi* a capacidade de recuperação de crescimento, que embora não chegue a 100% de viabilidade, ultrapassa 50%. A recuperação do crescimento mediante tratamentos, revela indícios de que o efeito dos compostos, embora talvez ative mecanismos de morte, seja tripanostático e não tripanocida, pois não levou a uma inibição total.

5.5 Avaliação da morfologia das formas epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com os compostos:

A avaliação da morfologia das formas epimastigotas foi realizada para os tratamentos com o composto B e D, onde foi observado um percentual de formas alteradas presentes em cada ponto de contagem da curva de recuperação.

Foi possível observar formas atípicas no controle com PBSx1, possivelmente devido ao crescimento em poços e também do processo de produção das lâminas. Porém os tratamentos apresentaram um maior percentual de formas alteradas durante todos os pontos de contagem, apresentando ainda formas arredondadas denominadas Vacúolos (V), os dados podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4. Percentual de formas epimastigotas de *T. cruzi* com morfologia alterada após tratamento com CI₉₀/24h dos compostos Dissulfeto de Diarila D e B.

Tempo	Controle		Composto D			Composto B		
	N	A	N	A	V	N	A	V
24h	87	13	50	30	20	79	15	6
48h	85	15	56	28	16	85	13	2
72h	88	12	67	26	7	80	17	3
96h	85	15	69	16	13	80	16	4

Abreviações: N- Normal; A- Alteradas; V-Vacúolos.

O tratamento com o composto D levou ao surgimento de um maior percentual de formas alteradas, mesmo após 24h da retirada do composto, apenas 50% dos parasitos contados apresentavam a forma considerada normal, enquanto 30% apresentavam uma forma atípica e 20% foram classificados como formas com presença de vacúolos. O ponto de contagem com o menor percentual de formas alteradas para o tratamento com o composto D, foi em 96h na qual 16% era o percentual de formas alteradas e 13% de formas vacuolizadas.

O tratamento com o composto B também levou ao surgimento de mais formas alteradas em relação ao controle, sendo o maior percentual observado em 24h após a retirada do composto, onde foi observado um percentual de 15% de formas alteradas e 6% de formas vacuolizadas. O menor percentual de formas alteradas foi observado 48h após a retirada do composto, na qual 85% dos parasitos possuíam o formato compatível com formas epimastigotas características.

Os parasitos tratados com o composto B apresentaram um percentual similar de alterações em relação ao controle, no entanto, a maior diferença entre os parasitos do controle e os parasitos tratados com o composto B, foi a presença de formas vacuolizadas.

Os parasitos tratados com o composto D, após 24h da retirada do composto, apresentaram 17% a mais de formas alteradas em relação ao controle. Nos pontos sucessivos de contagem, em 48h, 72h e 96h a diferença entre os tratados e o controle diminuiu, passando a ser respectivamente 13%, 14% e 1%, além das formas vacuolizadas ausentes no controle e presentes nos parasitos tratados em todos os pontos contagem.

Em todos os pontos de contagem foi observado um percentual menor de formas alteradas e vacuolizadas para o tratamento com composto B em relação ao tratamento com o composto D,

esses dados estão de acordo com os ensaios anteriores, nos quais o composto D mostrou uma maior atividade sobre as formas epimastigotas.

O percentual de formas alteradas em ambos os tratamentos foi menor em 72h e 96h após a retirada do composto do que em 24h. Durante a observação da viabilidade, no ensaio de recuperação, foi observado que nesses mesmos intervalos de tempo, a diferença de viabilidade entre o controle e os tratamentos foi maior que nas primeiras 24h, o que poderia indicar que essas alterações morfológicas estão relacionadas com a viabilidade do parasito, prejudicando sua capacidade de multiplicação.

5.6 Ensaio com formas tripomastigotas de *T. cruzi*

Os dados obtidos para o ensaio com formas tripomastigotas, demonstram que o composto D possui atividade em concentração superior a $CI_{50}/24h$ definida para formas epimastigotas ($3,124\mu M$), os valores referentes as réplicas desse ensaio podem ser observados na figura 7.

Os dados apresentados na figura 8 mostram que parasitos tratados com a concentração de $6,248\mu M$ não apresentaram diferença de viabilidade significativa em relação ao controle, sendo assim essa concentração não demonstrou atividade sobre as formas tripomastigotas.

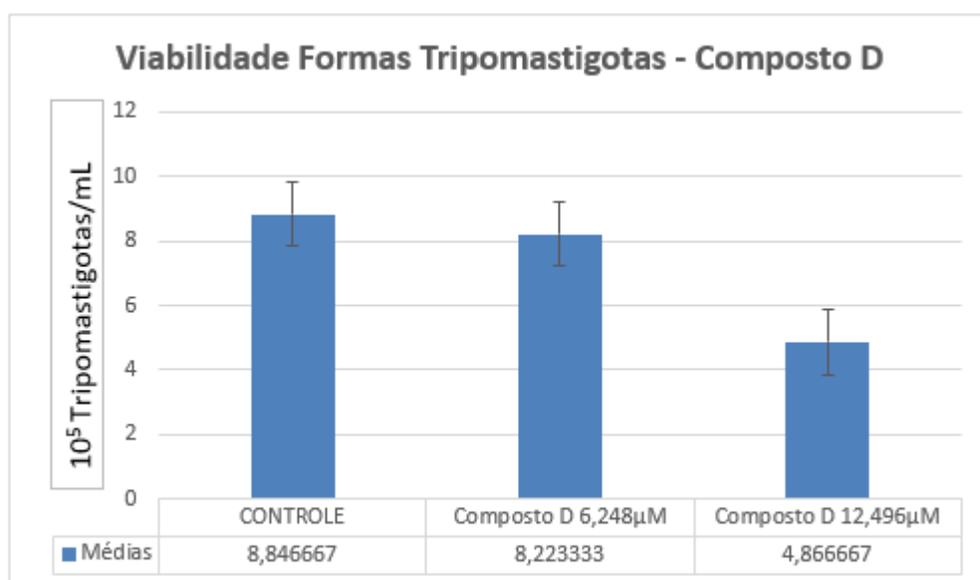


Figure 7. Efeito do composto Dissulfeto de Diarila D sobre a viabilidade de formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Em cada coluna estão as médias dos respectivos tratamentos com desvio padrão.

Entre o controle e parasitos tratados com a concentração de 12,496 μM , foi observada uma diferença significativa, onde a média do controle foi $8,84 \times 10^5 \text{m/L}$ e a média dos parasitos tratados foi de $4,86 \times 10^5 \text{m/L}$. Esses valores representam uma viabilidade de 55% para os parasitos tratados, ou ainda uma inibição de 45% da viabilidade, sendo definida uma CI_{50} de 4,078 $\mu\text{g/mL}$ (10,90 μM) para formas tripomastigotas utilizando esse composto ($R^2 = 0,92$).

Os dados obtidos a partir das réplicas do tratamento com benznidazol podem ser observados na figura 8.

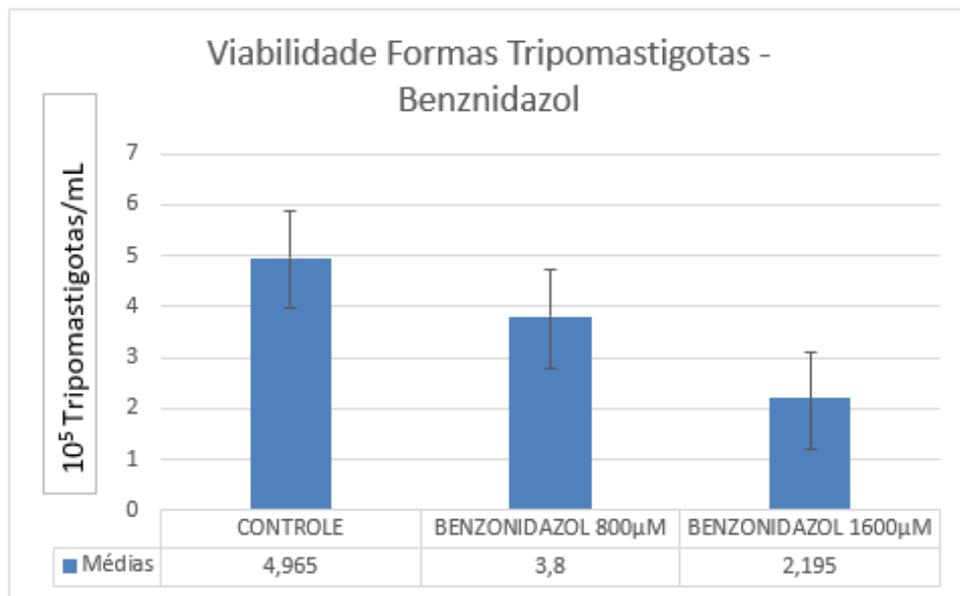


Figure 8. Efeito do Benznidazol sobre a viabilidade de formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Em cada coluna estão as médias dos respectivos tratamentos com desvio padrão.

O Benznidazol (controle positivo) também demonstrou atividade contra a forma infectiva do parasito, porém em concentrações superiores aquelas utilizadas para o composto D, como esta demonstrado no gráfico da figura 9, a viabilidade dos parasitos foi consideravelmente afetada na concentração de 1600 μM , onde houve uma inibição de 51,50% dos parasitos em relação ao controle. Nesse ensaio o composto D demonstrou uma melhor atividade em relação ao Benznidazol, que tem uma $\text{CI}_{50}/24\text{h}$ de 1028 μM ($R^2=0,92$).

6. DISCUSSÃO

A análise das propriedades ADMET indica que todos os compostos dissulfetos de diarila testados possuem capacidade de absorção intestinal, o que significa que poderiam ser administrados como fármacos por via oral, os compostos denominados A (Br na posição *orto*) e D (Br na posição *para*) possuem ainda capacidade de permeabilidade da pele, com ausência de sensibilização, sugerindo uma administração via transdérmica. Os compostos ainda apresentaram um resultado negativo para mutagenicidade e hepatotoxicidade, enquanto o Benznidazol foi positivo para as duas características, indicando para além de sua citotoxicidade, a potencial capacidade de atuar como agente cancerígeno (PIRES, BLUNDELL & ASCHER, 2015).

Os compostos dissulfetos de diarila, testados neste trabalho, apresentaram atividade contra formas epimastigotas de *T. cruzi*, causando alterações morfológicas nos parasitos e afetando sua viabilidade.

Khodyuk e colaboradores (2020) relataram a ação de diaril dissulfetos como inibidores da ação da tubulina em células da linhagem MCF-7 (Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano). A ação antitubulínica foi atribuída a ligação ao sítio da colchicina ou a inibição da montagem da tubulina, no entanto, não apresentou nessa linhagem celular uma inibição do crescimento.

Os compostos dissulfetos de diarila mais ativos na inibição do crescimento de *T. cruzi*, aqui denominados composto D (Br na posição *para*) e composto E (Cl na posição *para*) foram os menos ativos na inibição da montagem de tubulina na linhagem de células neoplásicas no trabalho de Khodyuk e colaboradores (2020), enquanto o composto A (Br na posição *orto*) e composto B (Cl na posição *orto*) foram os menos ativos na inibição do crescimento do parasito e mais ativos na inibição da montagem de tubulina em células neoplásicas.

Isso indica que os compostos D e E atuam mais ativamente na célula do protozoário em estudo, a não inibição do crescimento das células neoplásicas após o tratamento com dissulfetos de diarila pode indicar uma seletividade entre células de mamífero e do parasito, como observado também por Migliorini (2021).

Migliorini (2021) atribuiu uma ação inibitória de crescimento em *T. cruzi* aos compostos citados, porém os compostos apresentaram valores de CI_{50} inferiores do que aqueles obtidos nesse trabalho, sendo eles respectivamente A= 4,317 μ M; B= 1,8591 μ M; C= 1,3016 μ M ;D= 0,7048 μ M; E= 0,9124 μ M. Esse achado indica que talvez os compostos sofram uma perda de efeito, durante sua manutenção em temperatura de congelamento.

Os compostos B, C e E apresentaram diferentes valores de CI_{50} embora sejam estruturalmente semelhantes, possuindo como diferença apenas a posição do substituinte cloro, (B- *orto*, C - *meta*, E - *para*). O mesmo ocorre para os compostos A e D, que possuem o substituinte bromo em posições distintas (A- *orto*; D-*para*), Nesse ensaio os compostos com substituintes na posição *para* demonstraram maior atividade que os demais. Esses resultados indicam que a localização dos substituintes influenciem mais significativamente na atividade dos compostos quanto a inibição do crescimento em formas epimastigotas.

Os dados obtidos no ensaio de recuperação mostram que os compostos C e D (C= cl na posição *meta*, D= br na posição *para*) mantiveram valores semelhantes de inibição do crescimento, mesmo após 96h da retirada dos compostos, enquanto o composto B (B= cl na posição *orto*) apresentou um menor valor de inibição nesse mesmo ponto. O composto C teve o menor valor de inibição do crescimento 24h após a retirada do composto e o maior valor de inibição 72h após a retirada do composto. Os compostos B e D apresentaram um comportamento semelhante, com maior valor de inibição 24h após a retirada dos compostos, e menor valor de inibição 72h após a retirada dos compostos que volta a subir em 96h. Esse comportamento pode indicar que esses dois compostos sejam capazes de suprimir a fase exponencial de crescimento do parasito.

Diversos trabalhos relatam alterações morfológicas em *T. cruzi* decorrente do tratamento com diferentes compostos que afetam vias distintas. Nosso grupo de pesquisa já relatou anteriormente alterações morfológicas causadas pelo tratamento com isoobtusilactona A, onde foi observado o arredondamento e baixa mobilidade da célula do parasito, consequências associadas ao dano mitocondrial (DE ALMEIDA, et al. 2021).

Nathaly Gregório (2021) relatou em seu trabalho o surgimento de formas esféricas e de flagelo encurtado após o tratamento com Dosomorfina um potente inibidor AMPK (Proteína

Quinase Ativada pelo Aumento de AMP), em formas epimastigotas.

Veiga Santos e colaboradores (2012) registraram o aparecimento de formas semelhantes as formas vacuolizadas encontradas nesse trabalho, por meio do tratamento com amiodarona, que leva a interrupção da homeostase de Ca^{2+} do parasito e inibição da biossíntese de ergosterol.

Neste trabalho foram observadas alterações morfológicas em formas epimastigotas em todos os ensaios, os resultados do ensaio de análise morfológica associado aos resultados do ensaio de recuperação sugerem que as alterações causadas pelo tratamento com altas doses dos compostos B e D interferiram na capacidade de multiplicação dos parasitos.

Há relatos na literatura de diversos compostos sintéticos apresentam atividade contra formas tripomastigotas de *T. cruzi* (ANJOS, 2014; CASTRO, 2012). Neste trabalho o composto sintético Dissulfeto de Diarila denominado composto D apresentou também atividade contra formas tripomastigotas, apresentando um valor de CI_{50} menor do que aquele encontrado para o Benznidazol durante o ensaio de viabilidade. A atividade desse composto sobre a forma infectiva do parasito, associada a suas propriedades ADMET que indicam a ausência de mutagenicidade, hepatotoxicidade e uma boa absorção intestinal, o tornam um bom candidato para o desenvolvimento de um novo fármaco.

Os resultados obtidos neste estudo indicam a ação dos compostos dissulfetos de diarila sobre formas epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi*, revelando atividade biológica que subsidia futuros estudos para a elucidação do possível mecanismo de ação dos referidos compostos.

7. CONCLUSÕES

Os resultados dos ensaios demonstram que todos os compostos possuem ação sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*.

O composto D foi o mais ativo no tratamento de 24h, enquanto o composto A foi o menos ativo para o mesmo tratamento.

O tratamento das formas epimastigotas de *T. cruzi* com a $CI_{50}/24h$ do composto D causou a redução da multiplicação dos parasitos em 20% em relação ao controle, após 96h de tratamento.

Os resultados obtidos no ensaio de recuperação do crescimento dos parasitos tratados com os compostos B, C e D indicam que a ação dos compostos sobre *T. cruzi* seja tripanostática e não tripanocida, visto que mesmo sendo tratados com a CI_{90} dos compostos, o seu crescimento não foi completamente inibido.

A análise da morfologia dos parasitos tratados com os compostos B e D demonstra que esses compostos são capazes de causar alterações morfológicas que possivelmente dificultam a multiplicação dos parasito.

O tratamento das formas tripomastigotas com o composto D, indicou que o composto possui efeito sobre a forma infectiva do parasito, com um valor de CI_{50} menor que o Benznidazol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AGUIAR, PHN. 2013. Estresse oxidativo e lesões no DNA: papel da 8-oxoguanina naviabilidade do *Trypanosoma cruzi*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciências Biológicas. Tese de Doutorado Departamento de Bioquímica eImunologia do Instituto de Ciências Biológicas 117 p.

ANDRADE, CH.; SILVA, DC.; BRAGA, RC. 2014. *In silico* Prediction of Drug Metabolism by P450. Current Drug Metabolism. v. 15, n. 5, p. 514-525.

ANJOS, DO. 2014 dos Avaliação do efeito do derivado de β -lapachona R72 em formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e na infecção de macrófagos pelo *T. cruzi in vitro*. 99 f. il. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador.

ARGOLO, AM.; FÉLIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J. 2008. Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil. 1. ed. Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio.

BRASIL, Ministério da Saúde. 2020. Doença de Chagas. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/d/doenca-de-chagas#:~:text=> Acesso em 09 de Abril de 2021

BRASIL, Ministério da Saúde. 2022. Territorialização e Vulnerabilidade para a doença de Chagas crônica. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2022/boletim-especial-de-doenca-de-chagas-numero-especial-abril-de-2022#:~:text=> Acesso em 03 de Abril de 2023.

BRENER, Z. 1973 Biology of *Trypanosoma cruzi*. Annu Rev Microbiol. Departamento de Parasitologia I.C.B, Universidade Federal de Minas Gerais and Instituto e Endemias Rurais. Belo Horizonte: Brasil. p. 347-378.

BRENER, Z. & ANDRADE, Z.A. 1979. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.431 p.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. 2000. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. v. 43, n. 5, p. 431.

BRENER, Z. 1997. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, ISBN 85-85676- 31-0. p. 25-31. Disponível em <http://books.scielo.org>.

BONALDO, MC.; SOUTO-PADRON, T.; de SOUZA, W. 1988 Goldenberg, S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. J. Cell. Biol. 106: 1349-1358.

CAMARGO, EP. 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi* I. Origin of metacyclic trypomastigotes in liquid media. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 6, n. 3, p. 93-100.

CARVALHO, TU. Organização Estrutural de *Trypanosoma cruzi*. Fiocruz. 2017. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/organizacao-estrutural/>. Acesso em: 09 de Abril de 2021.

CASTRO, MF. de. Avaliação da atividade anti-*trypanosoma cruzi* *in vitro* e *in vivo* de derivados de vitamina K. 2012. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador.

CASTRO, SL. & SOEIRO NC. 2017. Drogas Tripanossomicidas: Estudos pré-clínicos da doença de Chagas. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/tratamento/>. Acesso em 09 de Abril de 2021.

CHAGAS, C.1909. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Memórias Instituto Oswaldo Cruz, v. 1, n. 2, p. 159-218.

CHAVEZ, MR. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1. Acesso em 23 de Abril de 2021.

CONTRERAS, VT.; SALLES, JM.; THOMAS, N.; MOREL, CM.; GOLDENBERG,S. 1985. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. Mol. Biochem. Parasitol. 16: 315-327.

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

DE ALMEIDA, JM.; NUNES, FO.; CEOLE, LF.; KLIMECK, TDMF.; DA CRUZ, LA., TÓFOLI, D.; FERREIRA, AMT. 2021. Synergistic effect and ultrastructural changes in *Trypanosoma cruzi* caused by isoobtusilactone A in short exposure of time. Plos one, v. 16, n. 1, p. 6-12.

DE SOUZA, W.; SANT'ANNA, C.; CUNHA-E-SILVA, NL. 2009. Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. Progress in Histochemistry and Cytochemistry. v. 44, p.67-124.

DE SOUZA, W. 2009. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 104, p. 89-100.

DUSCHAK, VG.; COUTO, AS. 2007. An insight on targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease. Recent Pat Antiinfect Drug Discov, v. 2, n. 1, p. 19-51.

DUSCHAK, VG.; COUTO, AS. 2009. Cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi*: a sulfated glycoprotein antigen as relevant candidate for vaccine development and drug target. A review. Curr Med Chem 16(24): 3174-202 doi: 10.2174/092986709788802971.

EKINS, S.; MESTRES, J.; TESTA, B. 2007. In Silico Pharmacology For Drug Discovery: Methods For Virtual Ligand Screening and Profiling. British Journal of Pharmacology. v. 154, p. 9-20.

EKINS, S.; WILLIAMNS, AJ.; KRASOWSKI, MD.; FREUNDLICH, JS. 2011. *In Silico* Repositioning of Approved Drugs For Rare And Neglected Diseases. Drug Discovery Today. v. 16, Issues 7- 8, p. 298 – 310.

FERREIRA, HO. 1990. Tratamento da Forma Intermediária da Doença de Chagas Com Nifurmitox e Benzonidazol. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical v. 23, p. 209 – 211.

GENESTRA, M.; Guedes-Silva, D.; Souza WJ.; Cysne-Finkelstein L.; Soares-Bezerra RJ.; Monteiro FP.; Leon LL. 2006. Nitric oxide synthase (NOS) characterization in *Leishmania*

amazonensis axenic amastigotes. Arch Med Res, v. 37 p. 328-333.

GREGÓRIO, Nathaly Renata Henrique. 2021. Papel Da Proteína Quinase Ativada Por AMP (AMPK) Em *Trypanosoma cruzi*. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação em Biologia Estrutural e Funcional, UNIFESP, São Paulo -SP.

KHODYUK, RGD.; BAI, R.; HAMEL, E.; LOURENÇO, EMG.; BARBOSA, EG; BEATRIZ, A.; SANTOS, EA.; LIMA, DP. 2020. Diaryl Disulfides and Thiosulfonates as Combretastatin A-4 Analogues: Synthesis, Cytotoxicity and Antitubulin Activity, Bioorganic Chemistry. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104017>

LEY, V.; ANDREWS, NW.; ROBBINS, ES.; NUSSENZWEIG, V. 1988. Amastigotes of *Trypanosoma Cruzi* Sustain Na Infective Cycle In Mammalian Cells. In: The Rockefeller University Press v. 168, p. 649-659.

LIN, CM.; SINGH, SB.; CHU, PS.; DEMPCY, RO.; SHMIDT, JM.; PETTIT, GR.; HAMEL, E. 1988. Interactions of tubulin with potent natural and synthetic analogs of the antimitotic agent combretastatin: a structure-activity study. Molecular pharmacology, v. 34, n. 2, p. 200-208.

LIU, Y.; ZHANG, Y. 2003. Temperature-controlled selective reduction of arenesulfonyl chlorides promoted by samarium metal in DMF. Tetrahedron Letters, v. 44, p. 4291-4294.

MATOS, CS. 2014. Doença de Chagas em Bambuí: Estado Atual e Vigilância. Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz Centro de Pesquisas René Rachou. Tese de Doutorado Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. 136 p.

MELOS, JLR & ECHEVARRIA, A. 2012. Sistemas Enzimáticos de Tripanossomatídeos como Potenciais Alvos Quimioterápicos. Rev. Virtual Quím. v. 4, n. 4 p. 374-392.

MIGLIORINI, BMS. 2021. Efeito de Dissulfetos de Diarila sobre *Trypanosoma cruzi*. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Dissertação de Mestrado Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq. p. 33.

MONTEIRO, ACB.; DORIGATTI, DH.; RODRIGUES, AG.; SILVA, JBM, 2015. Doença de Chagas Uma Enfermidade Descoberta Por Um Brasileiro. *Saúde em Foco*, v. 7, p. 63-76.

NEVES, DP. 2005. *Parasitologia humana*. 11. ed. São Paulo: Atheneu. p. 85- 108.

PASSOS, LAC.; GUARALDO, AMA.; BARBOSA, L.; DIAS, VL.; PEREIRA, KS.; SCHMIDT, FL.; FRANCO, RMB.; ALVES, DP. 2012. Sobrevivência e infectividade do *Trypanosoma cruzi* na polpa de açaí: estudo *in vitro* e *in vivo*. *Revs. Online: Epidemiologia e Serviços de Saúde Revista do Sistema Único de Saúde do Brasil*. v. 21, n. 2.

PEREIRA, ID. 2017. Síntese e avaliação de compostos diarílicos contendo átomos de selênio ou enxofre. Campo Grande: Universidade Federal de Mato grosso do Sul. Dissertação de Mestrado em Química 95 p.

PETTIT, GR.; TEMPLE JR, C.; NARAYANAN, VL.; VARMA, R.; SIMPSON, MJ.; BOYD, MR.; RENER, GA.; BANSAL, N. 1995. Antineoplastic agents 322. synthesis of combretastatin A-4prodrugs. *Anti-cancer drug design*, v. 10, n. 4, p. 299-309.

PETTIT, GR.; SINGH, SB.; HAMEL, E.; LIN, CM.; ALBERTS, DS.; GARCIA-KENDALL, D; 1989. Isolation and structure of the strong cell growth and tubulininhibitor combretastatin A-4. *Experientia*, v. 45, n. 2, p. 209-211.

PIRES, DEV.; BLUNDELL, TL.; ASCHER, DB. 2015. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *Journal of Medicinal Chemistry*. v. 58, n. 9, p. 4066-4072. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00104

REY, L. 2008. *Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicosocidentais*. 4. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan.

SACCOLITI, F.; ANGIULLI, G.; PUPO, G.; PESCAROTI, L.; MADIA, VN.; MESSORE, A.; COLOTTI, G.; FIORILLO, A.; SCIPIONE, L.; GRAMICCIA, M.; MUCCIO, TD.; SANTO, RD.; COSTI, R; ILARI, A. 2017. Inhibition of *Leishmania infantum* trypanothione reductase by diaryl

sulfide derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 32, n. 1, p. 304–310.

SALAS, CO.; FAÚNDEZ, M.; MORELLO, A.; MAYA, JD.; TAPIA, RA. 2011. Natural and Synthetic Naphthoquinones Active Against *Trypanosoma cruzi*: An Initial Step Towards New Drugs for Chagas Disease. *Current Medicinal Chemistry*, v. 18, n. 1, p. 144-161.

SANTOS, EA.; HAMEL, E.; BAI, R.; BURNETT, JC.; TOZATTI, CSS.; BOGO, D.; PERDOMO, RT.; ANTUNES, AMM.; MARQUES, MM.; MATOS, MFC.; LIMA, DP. 2013. Synthesis and evaluation of diaryl sulfides and diaryl selenide compounds for antitubulin and cytotoxic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 23, n. 16, p. 4669-4673.

SANOTS, VP.; BARRIAS, ES.; SANTOS, JFC.; MOREIRA, TLB.; CARVALHO, TMU.; URBINA, JA.; DE SOUZA, W. 2012. Effects of amiodarone and posaconazole on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Antimicrobial Agents* v. 40, p. 61–71.

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. 2016. Diaryl Disulfides as Novel Stabilizers of Tumor Suppressor Pcd4. *PLoS One*. 2016 Mar 16;11(3):e0151643. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151643>. Acesso em 23 de Abril de 2021.

SHAPIRO, TA.; ENGLUND, PT. 1995. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu. Rev. Microbiol*, v. 49, p. 117-143.

SILVA, GH. 2019. Moléculas envolvidas na invasão de células de mamíferos por *Trypanosoma cruzi*: uma revisão de literatura. Minas Gerais: Universidade Federal de Uberlândia Instituto de Biologia Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas Laboratório de Tripanossomatídeos. Trabalho de Conclusão de Curso 28 p.

SIEGEL, RLK.; BAUER, H.; SCHIRMER, RH. 2005. Dithiol Proteins as Guardians of the Intracellular Redox Milieu in Parasites: Old and New drug Targets in Trypanosomes and Malaria – Causing Plasmodia. *Angewandte Chemie*, as journal of the German Chemical Society (GDCh).

v. 44, p. 690-715. <https://doi.org/10.1002/anie.200300639>

SOARES MJ, SOUTO-PADRÓN T, DE SOUZA W, 1992. Identification of a large pre- lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*. Journal of Cell Science, v. 102, p. 157–167.

SOARES, M.J, 1999. The reservosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 94, p. 139-141.

SOUZA, VA.; NAKAMURA, CV.; CORRÊA, AG. 2012. Atividade Antichagásica de Lignanás e Neolignanás. Rev Virtual Quim, v. 4, n. 3, p. 197-207.

STUMP, B.; EBERLE, C.; KAISER, M.; BRUN, R.; SEIGELC, RLK.; DIEDERICH, F. 2008. Diaryl sulfide-based inhibitors of trypanothione reductase: inhibition potency, revised binding mode and antiprotozoal activities. This journal is The Royal Society of Chemistry, v.6, p. 3935–3947.

UEHARA, LA.; MOREIRA, OC.; OLIVEIRA, AC.; AZAMBUJA, P.; LIMA APCA.; BRITTO, C.; SANTOS, ALS.; BRANQUINHA, MH.; D’AVLIA-LEVY, CM. 2012. Cruzipain Promotes *Trypanosoma cruzi* Adhesion to *Rhodnius prolixus* Midgut. PLoS Negl Trop Dis 6(12): e1958. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001958>

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

VIEIRA, JL. 2017 *Trypanosoma cruzi*: Doença. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/sessao/doenca/>. Acesso em 09 de Abril de 2021.

WERMUTH, CG. 2008. The practice of medicinal chemistry 3rd. ed. Amsterdam: ELSEVIER, Academic Press, 942p. ISBN 9780123741943 Número de Chamada: 54:615.1 P895 n.3.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2020. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1. Acesso em 4 de abril 2023.

ZUMA, AA.; BARRIAS, ES.; SOUZA, W. 2021. Basic Biology of *Trypanosoma cruzi*. Current Pharmaceutical Design, v. 27, n. 0.