



Universidade Federal de Ouro Preto

Escola de Farmácia



MARINA GONÇALVES CAETANO DE ANDRADE

**TRIAGEM DE ATIVIDADE ANTI *TRYPANOSOMA CRUZI* E DESENVOLVIMENTO
DE FORMULAÇÕES NANOESTRUTURADAS DE COMPOSTOS SINTÉTICOS
DERIVADOS DO SRPIN340 COM NÚCLEO 1,2,3-TRIAZOL**

Ouro Preto

2023

MARINA GONÇALVES CAETANO DE ANDRADE

**Triagem De Atividade Anti *Trypanosoma Cruzi* e Desenvolvimento De
Formulações Nanoestruturadas De Compostos Sintéticos Derivados Do SRPIN
340 Com Núcleo 1,2,3-Triazol**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia do Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Silva Araújo

Coorientadora: Dra. Fernanda Karoline Vieira da Silva Torchelsen

Ouro Preto

2023

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

A553t Andrade, Marina Goncalves Caetano de.

Triagem de atividade anti trypanosoma cruzi e desenvolvimento de formulações nanoestruturadas de compostos sintéticos derivados do Srp340 com núcleo 1,2,3-triazol. [manuscrito] / Marina Goncalves Caetano de Andrade. - 2023.

46 f.: il., , gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Araújo.

Coorientadora: Dra. Fernanda Torchelsen.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Doença de Chagas. 2. Trypanosoma cruzi. 3. Nanotecnologia. I. Araújo, Raquel. II. Torchelsen, Fernanda. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 616.937

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



FOLHA DE APROVAÇÃO

Marina Gonçalves Caetano de Andrade

Triagem de atividade anti trypanosoma cruzi e desenvolvimento de formulações nanoestruturadas de compostos sintéticos derivados do Srp340 com núcleo 1,2,3-triazol.

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutica.

Aprovada em 06 de setembro de 2023

Membros da banca

Dra. Raquel Silva Araújo - Orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Fernanda Karoline Vieira da Silva Torchelsen - coorientadora- Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Luana Cristina Faria Carvalho Milagre - Universidade Federal de Ouro Preto
Msc. Márcia Célia Pacheco Fialho - Universidade Federal de Ouro Preto

Raquel Silva Araújo, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 21/11/2023



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Silva Araujo, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 21/11/2023, às 16:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0627951** e o código CRC **AF79C0DE**.

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho representa o término de uma jornada repleta de desafios, aprendizados e, principalmente, de apoio inestimável. Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos às orientadoras, colaboradores do LADOC, familiares e amigos que estiveram ao meu lado durante todo esse processo, além daqueles que de alguma forma contribuíram para conclusão desta etapa.

Às minhas orientadoras, que compartilharam seu conhecimento, tempo e experiência para me ajudar a dar vida a este trabalho, estou profundamente grata. Suas contribuições foram fundamentais para a pesquisa e desenvolvimento deste projeto. Cada conversa, cada conselho e cada revisão crítica foram valiosos para o meu crescimento acadêmico e profissional. Obrigado por aceitarem e acreditarem neste projeto.

À minha família, quero agradecer por ser a base sólida que sustentou meu caminho durante toda a jornada da graduação. Vocês sempre estiveram ao meu lado, me apoiando nos momentos difíceis e comemorando comigo nos momentos de conquista. A paciência, amor e compreensão foram a força motriz que me impulsionou a alcançar este objetivo.

Aos meus amigos, que me apoiam e incentivam ao longo de todos esses anos, quero dizer que não teria sido o mesmo sem vocês. Suas palavras de encorajamento, o apoio e a alegria que trouxeram aos meus dias tornaram essa jornada mais leve e mais significativa.

Este TCC representa mais do que um simples trabalho acadêmico. Ele é o resultado de muitos desafios superados, noites em claro e determinação. Cada um de vocês desempenhou um papel crucial nessa realização, e sou eternamente grata por isso. Levarei comigo o apoio e o carinho que recebi de todos vocês nesse tempo. Espero poder retribuir, de alguma forma, toda a generosidade ao longo desta jornada. Mais uma vez, obrigado! Esta é uma vitória que compartilhamos, e cada um de vocês tem um lugar especial nela.

RESUMO

A doença de Chagas, uma doença parasitária negligenciada causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Os tratamentos convencionais incluem medicamentos antiparasitários, como o nifurtimox e o benznidazol, mas a eficácia desses medicamentos é limitada devido à disseminação do parasita em diversos órgãos do hospedeiro. Além disso, os efeitos colaterais decorrentes da quimioterapia levam muitos pacientes à interrupção do tratamento. Dado o cenário desafiador no tratamento da doença de Chagas, há necessidade de novos compostos, formulações ou tratamentos. Uma vertente é a pesquisa de novos compostos oriundos de síntese que sejam facilmente transponíveis para a escala industrial. Outra vertente é o uso de nanoformulações para obter liberação prolongada, menos efeitos colaterais e melhorar a biodisponibilidade de fármacos. Este trabalho realizou um teste de atividade anti-*T. cruzi* *in vitro* e *in vivo* de dois novos compostos (SM-5H e SM-5E), derivados do SRPIN 340 com núcleo 1,2,3-triazol; além disso, também foram desenvolvidas formulações de nanocápsulas para cada composto. Os resultados da avaliação atividade anti-*T. cruzi* *in vitro* mostrou que ambos compostos foram ativos, com IC₅₀ 6,96 e 6,38 µM para SM-5H e SM-5E respectivamente, frente a amastigotas de cepa Y. O CC₅₀ dos compostos em células VERO foi de 69,18 µM (SM-5H) e 33,88 µM (SM-5E), que quando comparado a dados da literatura do medicamento benznidazol, apresentaram maior citotoxicidade. Em experimentos com camundongos *Swiss* infectados com cepa Y de *T. cruzi*, os tratamentos resultaram em redução da parasitemia quando usando SM5H ou SM-5E, sendo o desempenho do composto SM-5H não diferente do tratamento feito com benznidazol. As formulações desenvolvidas para os compostos resultaram em formulações coloidais com características de tamanho médio (~180 nm) e carga superficial ao redor de -43,5 mV compatíveis com sistemas do tipo nanocápsulas. Com a descoberta desses compostos ativos *in vivo* e formulações desenvolvidas, serão avaliados futuramente os efeitos dos tratamentos com nanocápsulas contendo SM-5H ou SM-5E na eficácia do tratamento da doença de Chagas experimental em modelo camundongo.

Palavras chave: Doença de Chagas, Tratamento, *T. cruzi*, Formulações Nanoestruturadas.

ABSTRACT

Chagas disease, a neglected parasitic disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, affects millions of people around the world. Conventional treatments include antiparasitic medications such as nifurtimox and benznidazole, but the effectiveness of these medications is limited due to the spread of the parasite to various organs of the host. Furthermore, side effects resulting from chemotherapy lead many patients to interrupt treatment. Given the challenging scenario in the treatment of Chagas disease, there is a need for new compounds, formulations or treatments. One aspect is the search for new synthetic compounds that are easily transposable to an industrial scale. Another aspect is the use of nanoformulations to obtain prolonged release, fewer side effects and improve the bioavailability of drugs. This work performed an anti-*T. cruzi* in vitro and in vivo of two new compounds (SM-5H and SM-5E), derived from SRPIN 340 with a 1,2,3-triazole nucleus; Furthermore, nanocapsule formulations were also developed for each compound. The results of the anti-*T. cruzi* in vitro showed that both compounds were active, with IC₅₀ 6.96 and 6.38 μ M for SM-5H and SM-5E respectively, against strain Y amastigotes. The CC₅₀ of the compounds in VERO cells was 69.18 μ M (SM-5H) and 33.88 μ M (SM-5E), which when compared to literature data for the drug benznidazole, showed greater cytotoxicity. In experiments with Swiss mice infected with strain Y of *T. cruzi*, the treatments resulted in a reduction in parasitemia when using SM5H or SM-5E, with the performance of the SM-5H compound being no different from the treatment with benznidazole. The formulations developed for the compounds resulted in colloidal formulations with medium-sized characteristics (~180 nm) and surface charge around -43.5 mV compatible with nanocapsule-type systems. With the discovery of these active compounds in vivo and developed formulations, the effects of treatments with nanocapsules containing SM-5H or SM-5E on the efficacy of treating experimental Chagas disease in a mouse model will be evaluated in the future.

Keywords: Chagas Disease, Treatment, *T. cruzi*, Nanostructured Formulations

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do Benznidazol (1) e do Nifurtimox (2)	7
Figura 2: Estrutura química SRPIN 340	9
Figura 3: Estrutura química dos compostos inspirados no SPIN 340.....	11
Figura 4: Citotoxicidade em função da concentração dos compostos SH-5H e SH-5E e valor do CC ₅₀ obtidos a partir do ensaio por MTT em 24 horas e 72 horas.	21
Figura 5: Viabilidade parasitária em função da concentração, e determinação da concentração inibitória mínima (IC ₅₀) dos compostos SM5H e SM5E.....	22
Figura 6: Curvas de parasitemia média do teste rápido com os compostos SM-5H e SM-5E e benznidazol em camundongos infectados com cepa Y de <i>T. cruzi</i> e tratados pela via oral por cinco dias consecutivos durante a fase aguda da infecção.	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Componentes e quantidades para formulação nanoestruturada	19
Tabela 2: Características físico-químicas das formulações de NC-SM-5H, NC-SM-5E na concentração de 1 mg/mL e NC-BR.....	24

LISTA DE SIGLAS

ATP	Adenosine Triphosphate
BZ	Benznidazol
CC50	Concentração da substância ativa que reduz o número de células ou em 50%
CCA	Centro de Ciência Animal
CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CYP51	Enzima Esterol 14alfa-desmetilase
DC	Doença de Chagas
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsilfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ESF	Exame de Sangue a Fresco
FDA	U.S. Food and Drug Administration
IC50	Concentração da substância ativa que reduz o número de células ou amastigotas em 50%
IE	Índice Endocítico
INT	Grupo de animais Infectado Não Tratado
IS	Índice de Seletividade
LYC	Lactona Sesquiterpênica Licnofolida
LYC-NC	Nanocápsulas Com Lactona Sesquiterpênica Licnofolida
MTT	Solução de Brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazol)
NC-BR	Nanocápsulas Branca

NC-SM-5E	Nanocápsulas Com Composto SM-5E
NC-SM-5H	Nanocápsulas Com Composto SM-5H
NF	Nifurtimox
OMS	Organização mundial da saúde
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PCL	Poli (ϵ -caprolactona)
PEG	Polietilenoglicol
PLA	Poli (D, L -láctido)
RNA	Ácido Ribonucleico
SFB	Soro Fetal Bovino
SM-5H	Composto Sintético Derivado Do SRPIN 340 Com Núcleo 1,2,3-Triazol
SM-5E	Composto Sintético Derivado Do SRPIN 340 Com Núcleo 1,2,3-Triazol
SRPIN 340	Lead compound
SRPKs	serine arginine protein kinases
SUS	Sistema Único de Saúde
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
WHO	"World Health Organization"

Sumário

Introdução	3
1. Revisão da literatura	5
1.1 A doença de Chagas	5
1.2 Quimioterapia da doença de Chagas	7
1.2.1. <i>Lead compound</i> SRPIN 340.....	9
1.3 Nanotecnologia no tratamento da DC.....	11
1.4. Justificativa	12
2. Objetivos	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. Materiais e Métodos	15
3.1 Avaliações <i>in vitro</i>	15
3.1.1. Cultivo celular.....	15
3.1.2 Avaliação da citotoxicidade por método MTT.....	15
3.1.3 Avaliação da atividade em amastigota	16
3.2 Cálculo de CC ₅₀ e IC ₅₀	18
3.3. Índice de Seletividade.....	18
3.4 Atividade tripanocida <i>in vivo</i>	18
3.4.1 Avaliação de atividade tripanocida	18
3.5 Preparo das Nanocápsulas.....	19
3.6 Caracterização das nanoestruturas	19
3.7 Análise estatística.....	20
4. Resultados	21
4.1 Avaliação da citotoxicidade em células VERO	21
4.2 Avaliação anti- <i>T. cruzi</i> em formas amastigotas em células VERO	22
4.3 Avaliação da atividade <i>in vivo</i>	22

4.4 Caracterização das nanocápsulas	23
5. Discussão	25
6. Conclusão	28
7. REFERÊNCIAS	29

Introdução

A doença de Chagas (DC) foi descoberta por Carlos Chagas em 1909. É considerada uma doença negligenciada, e é responsável por altas taxas de mortalidade e morbidade nas regiões endêmicas, como a América Latina (WHO, 2021). Causada pelo protozoário *T. cruzi*, essa doença acomete cerca de 8 milhões de pessoas pelo mundo e pode ser transmitida de forma vetorial, de forma congênita, por transfusão de sangue ou órgãos, ou por alimentos contaminados (WHO, 2021). A transmissão vetorial, através das fezes contaminadas do barbeiro após sua picada, é a maneira clássica de contaminação da doença (PRATA, 2001), porém, atualmente a principal responsável pela ocorrência de casos agudos é contaminação por via oral (SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012). A DC é um desafio mundial devido à expansão de seus casos para regiões não-endêmicas como países da Europa, Estados Unidos, Japão e Austrália. Essa expansão é resultado da migração de indivíduos infectados das regiões endêmicas para esses países (SCHMUNIS; YADON, 2010).

Os únicos tratamentos disponíveis para a DC utilizam os fármacos nifurtimox (NF) e benznidazol (BZ) (COURA e CASTRO, 2002). Na fase aguda, o objetivo principal do tratamento é eliminar o parasita do organismo, já na fase crônica, é evitar a progressão da doença. Ambos os medicamentos (NF e BZ) são administrados por via oral e podem ser utilizados tanto na fase aguda como na fase crônica da doença (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012), sendo preconizado no Brasil o tratamento utilizando BZ (BRASIL, 2018). A duração do tratamento é de cerca de 60 dias e pode variar de acordo com o estágio da infecção e a gravidade dos sintomas (BERN, 2015; BRASIL, 2018). Embora sejam eficazes na fase aguda, os medicamentos antiparasitários, especialmente o BZ, têm sua efetividade reduzida na fase crônica da DC. Isso ocorre porque, nessa fase, o parasita se encontra em menor quantidade e alojado principalmente nos tecidos do hospedeiro de forma disseminada, o que dificulta sua eliminação completa. Além disso, estes medicamentos tripanocidas causam efeitos colaterais significativos, como náuseas, vômitos e reações alérgicas, que podem levar à interrupção do tratamento ou à diminuição da adesão do paciente à terapia (COURA; CASTRO, 2002; CONSENSO, 2015).

Visto que atualmente não existe um fármaco ideal usado no tratamento da DC, e que existem de cepas do *T. cruzi* resistentes aos medicamentos usados atualmente

(FILARDI; BRENER, 1987), que o alcance da terapia atual aos amastigotas intracelulares é limitado, e por isso requerem altas doses, gerando mais efeitos adversos (GUEDES *et al.*, 2006; MAZETTI *et al.*; 2014), além das altas taxas de abandono do tratamento por efeitos adversos causados pelo BZ e NF (COURA; DE CASTRO, 2002; PÉREZ-MOLINA;MOLINA, 2017), a busca por compostos como novas formas de tratamento se torna necessária.

Na busca de novos fármacos ou tratamentos para a DC são propostas o reposicionamento de fármacos, a associação de ativos ao BZ ou NF, dentre outros (COURA; CASTRO, 2002). Diversos trabalhos exploraram o reposicionamento de fármacos, em especial dos antifúngicos para a DC, como o itraconazol (MOREIRA DA SILVA *et al.*,2012), e outros fármacos contendo núcleo triazólico. Outros trabalhos focados em associação de fármacos, centraram-se redução na dose utilizada de BZ quando combinado com os inibidores da biossíntese de ergosterol (CUNHA *et al.*,2019; MAZZETI *et al.*,2021). Dentre as pesquisas que avaliaram novos compostos ativos entre substâncias naturais, destaca-se o trabalho de Branquinho *et al.* (2014), que obteve cura *in vivo* em fases aguda e crônica da DC em camundongos. Porém, substâncias naturais possuem um entrave quanto à quantidade de ativo disponibilizado ao final da extração e purificação, o que os torna menos interessantes quando comparados a produtos oriundos de síntese, que por sua vez podem ser mais facilmente transponíveis à escala industrial. Dentre os produtos obtidos por síntese e avaliados em DC, tem-se os compostos derivados do SRPIN 340). Na sua maioria são compostos lipofílicos o que dificulta sua formulação e ação *in vivo*.

Para contornar o problema de baixa solubilidade aquosa de fármacos, outra vertente que cresce na busca de novas terapias em DC é a de formulações nanoestruturadas (MAZETTI *et al.*, 2021). As nanocápsulas são sistemas vesiculares poliméricos que além de proteger o ativo veiculado de degradação, podem melhorar sua biodisponibilidade e prolongar sua liberação no organismo (FESSI *et al.*, 1989; BRAQUINHO *et al.*, 2017).

Dessa forma, com o objetivo de identificar novas substâncias ativas contra *T. cruzi*, este trabalho avaliou *in vitro* e *in vivo* dois compostos sintéticos (SM-5H e SM-5E) derivados do SRPIN340 contendo em sua estrutura núcleo 1,2,3-triazol. Além disso, também desenvolveu formulações de nanocápsulas destes compostos.

1. Revisão da literatura

1.1 A doença de Chagas

O parasita *T. cruzi* é o causador da DC. Seu ciclo de vida é complexo, envolve diferentes tipos de hospedeiros e variações morfológicas. As formas replicativas são a amastigota intracelular encontrada nos tecidos dos mamíferos, e a epimastigota, presente no tubo digestivo do inseto vetor. Os tripomastigotas metacíclicos, encontrados nas fezes e na urina do vetor triatomíneo, são a principal forma não replicativas e infectante. Também são formas infectantes os tripomastigotas sanguíneos, que são encontrados no sangue de mamíferos, que transmite a doença por meio de transfusões de sangue ou verticalmente. (FIOCRUZ, 2015).

O ciclo de vida do parasito se inicia quando o vetor, infectado com o parasita, excreta próximo ao local da picada ao se alimentar do sangue de um hospedeiro vertebrado. Os tripomastigotas metacíclicos presentes nas fezes, infectam o hospedeiro ao serem levados a região de mucosa ou a ferida aberta no repasto sanguíneo do vetor. No interior do hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas invadem células, se transformam em amastigotas e replicam. Quando as células hospedeiras estão saturadas de parasitas, esses protozoários passam por uma transformação à forma de tripomastigotas. Quando essa superlotação ocorre, as células hospedeiras se rompem, liberando os protozoários na corrente sanguínea (tripomastigotas sanguíneo), a partir da qual podem se disseminar para outros órgãos do corpo e podem infectar vetores triatomíneos durante uma nova alimentação sanguínea. No intestino do vetor, os tripomastigotas sanguíneos se transformam em epimastigotas, se multiplicando ativamente. Essas formas se diferenciam novamente, se tornando tripomastigotas metacíclicos. Quando o triatomíneo defeca durante uma nova alimentação, os tripomastigotas metacíclicos são eliminados nas fezes, reiniciando o ciclo (TEIXEIRA *et al.*, 2006).

A infecção pelo *T. cruzi* pode ocorrer de diferentes formas. A forma vetorial, é a forma mais comum de contaminação e ocorre pela picada do vetor triatomíneo, popularmente conhecido como barbeiro, infectado como parasita (COURA; DIAS, 2009). A forma congênita varia, podendo representar até 5 % dos casos em mulheres infectadas durante a gravidez. A contaminação por transfusão sanguínea ou por transplante de órgãos é baixa, podendo atingir 1% dos casos (TEIXEIRA *et al.*, 2006).

A contaminação oral ocorre quando as pessoas ingerem alimentos ou bebidas contaminadas com fezes ou urina de triatomíneos infectados, ou até mesmo com o próprio parasita presente em alimentos, como frutas não higienizadas adequadamente. Essa via de infecção tem sido associada a surtos da doença em regiões como a região Amazônica (JUNQUEIRA *et al.*, 2005). Além disso, a relevância nas diferentes formas de transmissão pode variar significativamente dependendo da região (PRATA, 2001).

O indivíduo infectado com a doença geralmente não apresenta sintomas na fase inicial ou apresenta sintomas inespecíficos, porém, um terço dos infectados evoluem para forma sintomática ou fase crônica da doença. (DURAN-REHBEIN *et al.*, 2014).

A DC pode apresentar duas fases, com características distintas. A fase aguda, que é o período após a infecção pelo protozoário, e a fase crônica, que se caracteriza pela persistência do parasita no organismo do paciente, mesmo que em quantidades reduzidas, podendo durar toda a vida do indivíduo. A fase aguda, quando sintomática, geralmente apresenta os primeiros sinais que incluem febre, mal-estar, fadiga, dor de cabeça e perda de apetite, além de linfadenopatia regional, hepatomegalia e/ou esplenomegalia, miocardite, e, em alguns casos pode haver a resolução espontânea dos sintomas da fase aguda, e a doença evolui para a fase crônica. (COURA; CASTRO, 2002; SCHMUNIS; YADON, 2010). Além desses sintomas, ainda podem ocorrer manifestações na porta de entrada do protozoário na pele e mucosa do indivíduo infectado, conhecidas como sinal de Romaña, uma manifestação clínica que se relaciona com a infecção através da mucosa ocular, e o chagoma de inoculação, uma lesão inflamatória e edematosa que surge no local de entrada do parasita no corpo do hospedeiro em resposta à picada do inseto vetor (ROMAÑA, 1935; PRATA, 2001; COURA; DIAS, 2009). Quando a fase aguda é assintomática, na maioria das vezes, a infecção por *T. cruzi* é subdiagnosticada (CANÇADO, 2002).

A fase crônica da doença evolui progressivamente e pode ser subdividida em 4 formas, a forma indeterminada, a cardíaca, digestiva ou mista. Na forma indeterminada o paciente apresenta sorologia positiva, mas não possui manifestação clínica. A forma indeterminada pode durar até 20 anos após a infecção, ou até mesmo a vida toda, assintomática, sem alterações radiológicas, eletrocardiográficas, ou

manifestações de distúrbios digestivo. A forma cardíaca ocorre em aproximadamente 30% dos casos, e é caracterizada por sintomas como alterações em eletrocardiograma e insuficiência cardíaca. Esta forma é a mais grave da doença, com maior número de óbitos. Já na forma digestiva, o paciente apresenta alterações morfológicas e funcionais no esôfago e no cólon. Na forma mista o indivíduo infectado apresenta sintomas das formas cardíacas e digestivas simultaneamente (PRATA, 2001; RASSI *et al.*, 2010).

1.2 Quimioterapia da doença de Chagas

Os fármacos BZ e o NF (figura 1) são os medicamentos usados no tratamento da DC atualmente, esses medicamentos não apresentam resultados completamente satisfatórios no tratamento da DC, podendo variar de acordo com o tempo de tratamento, a fase da doença, idade do paciente, e origem geográfica (COURA; CASTRO, 2002; CONITEC, 2015). Os dois medicamentos apresentam altas taxas de cura parasitológica na fase aguda da doença, mas na fase crônica essas taxas decaem devido à dificuldade do alcance às amastigotas intracelulares (COURA, 2002; BORGES-PEREIRA, 2012).

O BZ e NF pertencem à classe dos compostos nitro heterocíclicos, esses medicamentos foram introduzidos no mercado entre os anos 60-70. Ambos os medicamentos ainda não possuem o mecanismo de ação totalmente elucidados (FIOCRUZ, 2015), mas são considerados pró-fármacos, que passam por biotransformações para se tornarem a forma farmacologicamente ativa, levando a um estresse oxidativo responsável por danos ao DNA e outras estruturas celulares do *T. cruzi*, resultando em sua morte e impedindo a replicação e a disseminação no organismo do hospedeiro (URBINA, 2010).

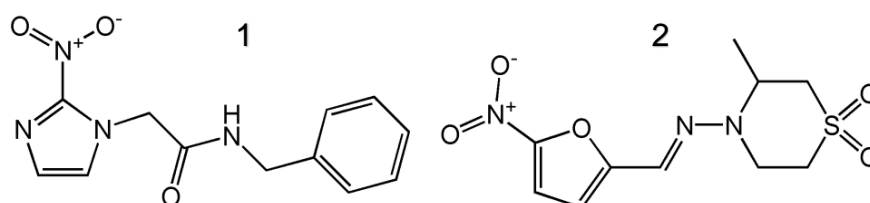


Figura 1: Estrutura química do Benznidazol (1) e do Nifurtimox (2)

BZ é o único medicamento fornecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS), para

tratamento da DC no Brasil (BRASIL, 2014). Embora haja diferenças quanto ao percentual de cura parasitária nas diferentes fases da doença, existem evidências que defendem a utilização deles no tratamento tanto na fase aguda, quanto na fase crônica da DC, e em todas as formas (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012. CONITEC, 2015). Usado tanto no tratamento infantil, como no tratamento para adultos (CONITEC, 2015), as crianças demonstram tolerância a doses mais elevadas (CARLIER *et al.*, 2011). A dosagem média para adultos é de 5mg/kg/dia, administrada via oral em duas ou três doses diárias, ao longo de um período de 60 dias. Utilizada na mesma frequência e duração, o tratamento para crianças é de 10 mg/kg/dia. É importante ressaltar que a dose diária não deve ultrapassar 300 mg em nenhum caso. No Brasil, as apresentações de 100 mg e 12,5mg estão disponíveis na rede SUS. Em casos de intolerância ao BZ, o NF é uma opção terapêutica, e deve ser solicitado à OMS (CONITEC, 2015). Atualmente, NF é utilizado em países da América Latina como Argentina, Uruguai e Chile (COURA; DE CASTRO, 2002).

Os efeitos adversos conhecidos já descritos para BZ são hipersensibilidade, dermatite com erupção cutânea, dores musculares e articulares, febre, depressão da medula óssea, agranulocitose e púrpura trombocitopenia, além de polineuropatia periférica. Já os efeitos adversos causados por NF são perda de peso, sonolência, além de alguns distúrbios digestivos, como náuseas, vômitos e cólicas intestinais (COURA; CASTRO, 2002; CASTRO *et al.*; 2006).

Apesar dos grandes avanços na pesquisa e nos estudos sobre o *T. cruzi*, por se tratar de uma doença negligenciada, o fomento na busca de novas terapias para o combate à DC é pequeno, devido ao pouco interesse por parte das indústrias farmacêuticas (SCARIM *et al.* 2018). Diante dos problemas apresentados na terapia da DC com os fármacos disponíveis atualmente, diferentes alternativas para terapia medicamentosa podem ser usadas. São elas:

- A associação de fármacos em uma terapia combinada entre BZ e NF (COURA, 2009; MAZZETI *et al.*; 2021);
- O reajuste de dose e/ou tempo do tratamento, a fim de obter maiores taxas de cura em tempo reduzido de tratamento, evitando o abandono dos pacientes, e, conseqüentemente menos efeitos adversos, (MARTINS *et al.*; 2015)

- O reposicionamento de fármacos, que é utilizar fármacos com perfil farmacocinético e toxicológico conhecido, cujos mecanismos de ação possam ser usados em outros tratamentos além dos já conhecidos (ASHBURN; THOR, 2004; KAISER *et al.*; 2015);
- O desenvolvimento de novas formas farmacêuticas com os medicamentos usados atualmente, buscando melhor biodisponibilidade e biodistribuição (MAZZETI *et al.*,2021);
- A busca por novos fármacos que podem ser de origem natural ou sintética com características promissoras (COURA; CASTRO, 2002)

Baseando na proposta da busca por novos fármacos existem os chamados “lead compounds”, moléculas com boas propriedades farmacológicas e que podem ser usados como estrutura base para o desenvolvimento de novos fármacos. (SHARMA *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2018).

1.2.1. Lead compound SRPIN340

O SRPIN340 é um inibidor ATP-competitivo que atua na inibição de quinases ricas em serina e arginina (SRPKs, *serine arginine protein kinases*) (SRPK1 e SRPK2), que são cruciais para o recrutamento na maquinaria de transcrição do RNA mensageiro, sendo capaz de inibir a proliferação celular. Sendo assim, o SRPIN340 se torna promissor para o desenvolvimento de novos fármacos anti-infecciosos de proliferação intracelular como o *T. cruzi*. Diferentes estudos sobre essa molécula têm sido realizados para avaliar seu potencial efeito farmacológico em diferentes doenças, como doenças causadas por infecção viral e câncer (SIQUEIRA *et al.*, 2017). Neste trabalho o SRPIN340 foi utilizado como modelo para desenvolvimento para novos fármacos, combinando-o a radicais 1,2,3-triazol1,4- dissustituído (SOUSA, 2020).

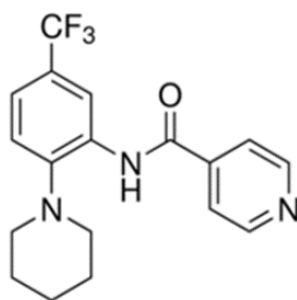


Figura 2: Estrutura química SRPIN 340

1.2.1.1 Derivados do SRPIN340

60 derivados de SRPIN340 (Sara Sousa, Tese, 2020) foram avaliados por triagem *in vitro* no Instituto de Pesquisa René Rachou/Fiocruz Minas. Nesse processo de triagem 2 compostos foram selecionados e indicados para novas avaliações contra *T. cruzi*. Os compostos SM-5H e SM-5E são moléculas com núcleo 1,2,3-triazol, que se diferem estruturalmente por um átomo de bromo ligado ao anel aromático e por um oxigênio em posição “para” com o nitrogênio do anel (Figura 3).

Moléculas com núcleo 1,2,3-triazol, constituem uma classe de substâncias heterocíclicas, que contém um ou mais átomos de nitrogênio e que podem ou não apresentar substituintes (MELO, 2006). Diversas atividades biológicas são atribuídas a substâncias heterocíclicas, como ação antitumoral, antituberculose, antimicrobiana, anti-inflamatória e antiviral (GALLARDO *et al.*;2007; DA CRUZ *et al.*; 2014; DHEER *et al.*; 2017; TEIXEIRA *et al.*;2012).

Medicamentos da classe azol, como Posaconazol, Ravuconazol, Itraconazol e Fluconazol são utilizados para tratamento de infecções causadas por fungos, e possuem atividade satisfatória contra *T. cruzi*. Eles atuam na enzima estero1 14alfa-desmetilase (CYP51), que é necessária para a biossíntese do ergosterol. Estudos demonstraram que assim como fungos e leveduras, o *T. cruzi* utiliza esteróis para sua proliferação celular no seu ciclo de vida, pois constituem a membrana celular desse organismo, assim, inibidores da biossíntese de ergosterol apresentam atividade supressiva, com potencial curativo, da DC (URBINA, 2010; URBINA e DOCAMPO, 2003). Ademais, esses fármacos mostraram segurança metabólica após administração e produziram menos efeitos colaterais em testes *in vivo* (URBINA *et al.* 1998).

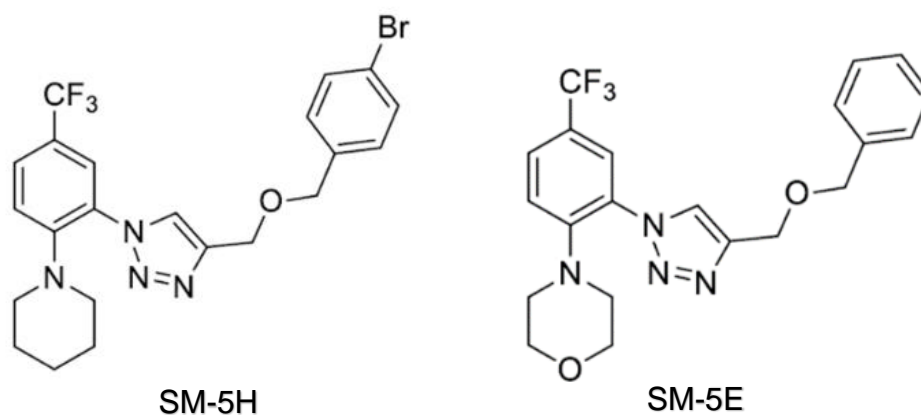


Figura 3: Estrutura química dos compostos inspirados no SPIN 340

1.3 Nanotecnologia no tratamento da DC

As nanocápsulas poliméricas (NC) são carreadoras de ativos formadas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso (GALLARDO *et al.*, 2007). Elas podem ser constituídas por polímeros naturais ou sintéticos. A escolha do polímero para as NC deve levar em conta características como a biodegradabilidade, disponibilidade, biocompatibilidade e ausência de toxicidade. Esse sistema de entrega de fármacos pode reduzir limitações de dissolução de fármacos pouco solúveis em água, o que permite alterar a farmacocinética e distribuição (MAZZETI *et al.*, 2021; BRAQUINHO *et al.*, 2017).

Em comparação com outros sistemas nanoestruturados destinados à administração oral, as NC oferecem diversas vantagens. Uma dessas vantagens reside na sua maior estabilidade dentro do trato gastrointestinal, algo que não é tão evidente em lipossomas e micelas (SIQUEIRA *et al.*, 2022). Além desse aspecto, as NC têm a vantagem adicional de poderem ser produzidas a partir de uma variedade de materiais poliméricos. Isso proporciona a oportunidade de ajustar as propriedades físico-químicas das nanopartículas, tais como sua hidrofobicidade, carga superficial, eficiência de encapsulamento e padrão de liberação. O objetivo subjacente a essa estabilidade é melhorar o desempenho dos sistemas nanoestruturados quando administrados no organismo, com foco na melhoria de seu comportamento *in vivo*. Esses pontos foram discutidos em estudos como os de Galindo-Rodriguez *et al.* (2005), Paplied *et al.* (2011) e Le Droumaguet *et al.* (2012), demonstrando a relevância

e o potencial das nanopartículas como veículos eficazes para administração oral de fármacos.

Tratando-se especificamente da infecção pelo protozoário *T. cruzi*, os alvos do tratamento são as formas tripomastigotas sanguíneas, e as formas amastigotas presente nas células de qualquer tecido do indivíduo infectado (ROMERO; MORILA, 2010). O uso da nanotecnologia contra infecção experimental da DC, possui resultados promissores (MAZZETI *et al*, 2021), pois as formulações nanoestruturadas, por possibilitarem melhoria dos parâmetros farmacocinéticos citados anteriormente, os ativos ou fármacos apodem alcançar os alvos da DC de forma mais eficaz. O trabalho de Branquinho *et al.* (2017) mostrou que um fármaco encapsulado em NC biodegradáveis de poli (D, L -lático) (PLA), polietilenoglicol (PEG) e poli (ε-caprolactona) (PCL) exibem meia-vida plasmática maior e assim aumentaram a eficácia no tratamento da fase aguda da infecção em modelo murino. Além disso, essas NC podem se acumular nas células cardíacas, onde o parasita pode causar graves danos na fase crônica da doença (BRANQUINHO *et al.*,2017). Outro estudo pré-clínico realizado com formulações de NC poliméricas, demonstraram redução da parasitemia e diminuição da cardiomiopatia inflamatória (SIQUEIRA *et al.*, 2022). Essas estratégias demonstram algumas das abordagens mais promissoras até o momento utilizando nanotecnologia, das quais destaca-se o trabalho de Branquinho *et al.* (2020), envolvendo a nanoformulação da lactona sesquiterpênica, Licnofolida (LYC) em matrizes de polietileno glicol-polilactídeo, assim como em nanocápsulas fabricadas a partir de poli-ε-caprolactona (LYC-NC), pois obtiveram elevadas taxas de cura da DC experimental em comparação ao BZ ou composto livre.

Dessa forma, considerando a potencialidade dos sistemas nanoestruturados ao controlar a biodisponibilidade e liberação do fármaco, além da diminuição dos possíveis efeitos colaterais, a nanoencapsulação é uma boa estratégia para fármacos promissores no tratamento da DC. Por se tratarem de moléculas lipofílicas SM-5H (clog P 5,01) e SM-5E (clog P 4,32) a encapsulação destes compostos pode levar a bons resultados no que tange a busca de novos tratamentos da DC.

1.4. Justificativa

Diante das dificuldades no tratamento atual da DC, a baixa eficácia terapêutica do tratamento existente, particularmente durante a fase crônica da doença, e a toxicidade

dos fármacos ativos existentes contra o parasito, se faz necessária a busca por novas alternativas de tratamento como o uso de novas substâncias derivadas do SRPIN340 que é capaz de inibir a proliferação celular. Além disso, possuem núcleo 1,2,3-triazol ao qual são atribuídas diversas atividades como como ação antitumoral e antimicrobiana. Mas, ainda não foi evidenciada ação anti-*T. cruzi*. Assim, este trabalho avaliou a ação conta *T. cruzi* de dois novos compostos derivados do SRPIN340, SM-5H e SM-5E, *in vitro* e *in vivo*. Além disso, desenvolveu nanoformulações contendo esses novos ativos a fim de obter uma melhora no futuro tratamento para a DC.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar atividade *in vitro* e *in vivo* dos compostos sintéticos derivados do SRPIN340 com núcleo 1,2,3-triazol por teste rápido em fase aguda da DC em animais infectados por *T. cruzi*, e desenvolver formulações nanoestruturadas para os compostos ativos.

2.2 Objetivos específicos

- I. Avaliar a citotoxicidade dos compostos SM-5H e SM-5E em células da linhagem VERO;
- II. Avaliar a atividade dos compostos SM-5H e SM-5E em amastigotas de cepa Y de *T. cruzi*, parcialmente resistente ao tratamento;
- III. Avaliar a atividade *in vivo* dos compostos SM-5H e SM-5E em infecção experimental da fase aguda da DC por teste rápido em camundongos *Swiss*;
- IV. Desenvolver e caracterizar quanto ao tamanho, potencial zeta e índice de polidispersão (PDI) nanocápsulas contendo os compostos SM-5H e SH-5E;

3. Materiais e Métodos

3.1 Avaliações *in vitro*

3.1.1. Cultivo celular

Para este trabalho foram utilizadas células da linhagem VERO, que são células renais de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*). As células VERO foram cultivadas em garrafas de cultura 75 cm² (Starstedt, Numbrecht, Alemanha), em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB). As células foram incubadas em condições de atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. E foram subcultivadas a cada 3 dias.

3.1.2 Avaliação da citotoxicidade por método MTT

O teste de citotoxicidade *in vitro* utilizando a técnica MTT é considerado um padrão-ouro na avaliação biológica de dispositivos médicos pelo FDA (*Food and Drug Administration*). Essa abordagem consiste na capacidade das enzimas mitocondriais presentes em células vivas e metabolicamente ativas de converterem o composto MTT, que é originalmente uma solução aquosa de cores amarelas, em um produto cristalino chamado formazan. O formazan apresenta uma cor azul-escuro/roxo e não é solúvel em água. A quantidade de formazan gerada é diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes no ensaio (MOSMANN, 1983). O método adotado neste trabalho segue a descrição de Mosmann (1983).

Para a realização do teste, foram utilizadas placas com 96 poços de fundo chato. Para o preparo de placas teste, as células contidas nas garrafas de cultura foram lavadas com PBS estéril, seguidas por adição de 3 mL de Tripsina e incubadas a 37°C por 5 minutos. Ao conteúdo resultante da tripsinização foram adicionados 6 mL de meio DMEM F12, seguido de centrifugação a 1700 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi então descartado e o sedimento ressuspendido em meio DMEM F12. Foi realizada então a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer, utilizando o Azul de Trypan®. Cerca de 10⁴ células da linhagem VERO foram adicionadas em cada poço da placa de 96 poços, em um volume de 150 µl de meio de cultivo. A placa então foi incubada em estufa por 24 horas a 37°C para a adesão celular.

Após este período, os meios foram retirados dos poços com auxílio de uma pipeta multicanal e adicionado meio contendo composto teste diluído em meio de

cultivo celular. Para isso, os compostos foram diluídos em DMSO e essa solução adicionada a DMEM F12, a partir dessa solução estoque (2mg/mL) foram preparadas 7 concentrações (2mg/mL; 666,66 µg/mL; 222,22 µg/mL; 74,07 µg/mL; 24,69 µg/mL; 8,23 µg/mL; 1 µg/mL) obtidas por diluição seriada. O experimento foi realizado com no mínimo duas repetições, em triplicata. Os poços controle não receberam nenhum tratamento, somente 150 µl do meio DMEM.

Após o período de tratamento de 24h ou 72h foram retiradas todas as soluções (DMEM F12 + ativo) e realizada lavagem das células com DMEM F12 fresco para retirar resquícios dos ativos e *debris* celulares. Em seguida, foi adicionado 150 µl da solução 0,5mg/mL de MTT em DMEM. As placas foram incubadas em estufa novamente a 37°C por 4 horas. Após este período, as placas foram centrifugadas a 600 g por 15 min, após a centrifugação, todo conteúdo dos poços foi substituído por 150 µL de DMSO (*Dimethyl sulphoxide*), homogeneizados e incubados a 37°C por 10 minutos para a solubilização dos cristais de formazan. A leitura da absorbância das amostras foi feita utilizando um espectrofotômetro (Bio-Rad 680, CA, EUA) a 570 nm.

O cálculo da viabilidade celular em porcentagem foi realizado através da fórmula:

$$\text{Viabilidade} = 100 \times (MA - Br) / (MC - Br)$$

MA: média da absorbância da amostra em cada concentração do ativo;

Br: média da absorbância do branco;

MC: média da absorbância dos poços com controle positivo.

3.1.3 Avaliação da atividade em amastigota

Foram coletadas tripomastigotas sanguíneos de camundongos *Swiss* previamente infectados com cepa Y de *T. cruzi*. A coleta foi realizada através de punção cardíaca no dia de maior parasitemia (CEUA nº2015/50). Essas tripomastigotas foram utilizadas para se obter quantidade suficiente de formas análogas, as tripomastigotas de cultivo celular a partir de células VERO.

Para isto $1,0 \times 10^4$ células foram semeadas sobre lamínulas circulares de 13mm de diâmetro, dispostas em placas de 24 poços e mantidas em meio DMEM por 24 horas a 37° C para adesão. Após as 24 horas, as culturas celulares foram infectadas

com as tripomastigotas análogas às sanguíneas, sendo mantidas assim por 24 horas a uma temperatura de 37°C. A proporção utilizada foi de 10 tripomastigotas para cada célula hospedeira. Todas as culturas celulares foram mantidas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ e ar. Cada ensaio foi repetido pelo menos três vezes, com duplicatas em cada repetição, garantindo resultados consistentes.

Para avaliar os efeitos das drogas sobre as amastigotas intracelulares, após o período inicial de contato entre células e parasitas (24 horas), as culturas foram submetidas a lavagem com meio DEMEM para eliminar os parasitas livres. Em seguida, as culturas foram tratadas por 24 horas a 37°C com concentrações definidas a partir de experimentos preliminares com MTT dos compostos SM-5H e SM-5E, e mantidas com ou sem tratamento (somente o meio DEMEM) a 37°C em um ambiente contendo 5% de CO₂ e ar por 24 horas. Então, as lamínulas contendo as células foram lavadas com PBS estéril, fixadas com metanol por cinco minutos e em seguida coradas com solução de Giemsa (10% em água destilada). Após secagem das lamínulas e montagem em lâmina com Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi determinada a porcentagem de células infectadas em uma contagem aleatória ao microscópio óptico (aumento de 100x) de no mínimo 200 células. É importante destacar que apenas os parasitas exibindo características e forma de amastigotas foram considerados. A avaliação da eficácia do medicamento foi realizada através do cálculo do índice endocítico (IE), que representa a porcentagem de células infectadas em relação ao número médio de parasitas por células infectadas. Utilizando estes dados, foi calculado o percentual de inibição da infecção das células tratadas em relação àquelas infectadas e não tratadas.

O percentual de inibição da infecção pelos compostos foi calculado pela fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = 100 - (IE_{\text{tratado}} / IE_{\text{controle}}) \times 100$$

IE_{tratado}: Índice endocítico das células infectadas tratadas

IE_{controle}: Índice endocítico das células infectadas não tratadas

3.2 Cálculo de CC50 e IC50

A partir dos dados de viabilidade celular e atividade anti-*T. cruzi* foi possível plotar as curvas de dose efeito e calcular valores de CC50 e IC50 dos compostos SM-5H e SM-5E através do software *GraphPad Prism 9.0*.

3.3. Índice de Seletividade

O índice de seletividade (IS) foi calculado pela fórmula: CC50 (concentração citotóxica que afeta 50% das células) das células Vero divididas pelo CI50 (concentração inibitória que afeta 50% das amastigotas) do parasita. Esse cálculo revela quantas vezes o agente testado é mais seletivo em relação ao parasita do que em relação às células Vero. Logo, valores maiores representam compostos mais seletivos.

3.4 Atividade tripanocida *in vivo*.

Neste estudo, utilizamos camundongos da linhagem Swiss, fêmeas com idade entre 3 a 4 semanas, obtidas do Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Esses animais tiveram acesso à água filtrada e receberam ração comercial balanceada à vontade. Todas as atividades realizadas neste experimento seguiram a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFOP, registrada sob o número CEUA nº 2157041219.

A infecção dos animais foi realizada por via intraperitoneal, utilizando 1×10^4 tripomastigotas sanguíneas provenientes de animais que mantinham a cepa Y (CEUA nº 2015/50). A confirmação da infecção dos animais foi feita por meio de exame de sangue a fresco (ESF) realizado quatro dias após a inoculação.

Após a confirmação da infecção, iniciamos o tratamento dos animais por via oral, durante cinco dias consecutivos. As dosagens utilizadas neste estudo foram selecionadas com base em resultados obtidos em experimentos anteriores realizados em nosso laboratório, embora esses resultados não tenham sido divulgados publicamente. Paralelamente, um grupo de animais infectados não recebeu tratamento (grupo INT) como grupo controle.

3.4.1 Avaliação de atividade tripanocida

A parasitemia, que é a quantidade de parasitas presentes no sangue ou em outros fluidos biológicos de um hospedeiro infectado, foi feita diariamente por meio do

ESF durante os 5 dias consecutivos de tratamento. A curva de parasitemia foi plotada utilizando a média diária da parasitemia dos animais em relação com os dias do tratamento.

3.5 Preparo das Nanocápsulas

As nanocápsulas foram preparadas pelo método de deposição interfacial de um polímero pré-formado seguido da remoção do solvente (Fessi et al., 1989) A fase orgânica constituiu-se de poli- ϵ -caprolactona (PCL), óleo, tensoativo e acetona (Tabela 1). Esta fase foi vertida na fase aquosa contendo tensoativo e água na proporção de 1:2 (Tabela 1) e homogeneizadas (modelo *PC-200, Corning, EUA*) por 10 minutos a 500 rpm. As formulações tiveram volume reduzido para 1 mL com auxílio de rotavapor (*Laborota 4000/4001 Heidolph Instruments, Alemanha*). No caso das formulações contendo os ativos (SM-5H e SM-5E), estes foram adicionados na fase orgânica para obtenção de 1 mg/mL no volume final.

Tabela 1: Componentes e quantidades para formulação nanoestruturada

Fase Orgânica	Quantidade
Lipoid	5 mg
PCL	10 mg
Migliol	25 μ L
Acetona	2 mL

Fase Aquosa	Quantidade
Pluronic F68	6 mg
Água	4 mL

3.6 Caracterização das nanoestruturas

Para a determinação do tamanho e índice de polidispersão, as formulações foram diluídas em água ultrapura, e, para a determinação do potencial zeta as amostras foram diluídas em solução de NaCl 1 mM.

As partículas foram identificadas utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS da (*Malvern Instrument, UK*). Para avaliar o tamanho e a uniformidade das partículas,

utilizou-se o método de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), com detecção a um ângulo de retroespalhamento de 173°. Adicionalmente, o potencial zeta foi indicado utilizando a técnica de microeletroforese com o auxílio do laser Doppler. Todas as análises foram conduzidas a uma temperatura de 25°C, sendo repetidas três vezes em alíquotas da mesma amostra de cada composto. Os resultados obtidos foram apresentados na forma de média \pm desvio padrão.

3.7 Análise estatística

Para todos os dados foram realizados testes de normalidade seguido então da análise estatística. Para os dados *in vitro* realizados Testes de t, enquanto para os dados do estudo *in vivo* realizado One-way ANOVA com múltiplas comparações feitas por teste de Kruskal-Wallis.

4. Resultados

4.1 Avaliação da citotoxicidade em células VERO

A avaliação da citotoxicidade dos compostos SM-5H e SM-5E foi realizada em 24 e 72 horas nas concentrações 2 mg/mL; 666,66 µg/ml; 222,22 µg/mL; 74,07 µg/mL; 24,69 µg/mL; 8,23 µg/mL; 1 µg/mL. Pôde-se observar que o composto SM-5H apresentou citotoxicidade (CC50) quase duas vezes maior (69,18 µM) que o composto SM-5E (33,88 µM), além disso, observou-se uma relação entre da citotoxicidade e o tempo de contato com os compostos. Foi observado que as concentrações de 24,69 µg/mL, 8,23 µg/mL e 1 µg/mL não foram citotóxicas a 50% das células da linhagem VERO no tempo de 24 horas. Porém, no ensaio de 72 horas essas concentrações se mostraram mais citotóxicas, principalmente o composto SM-5E.

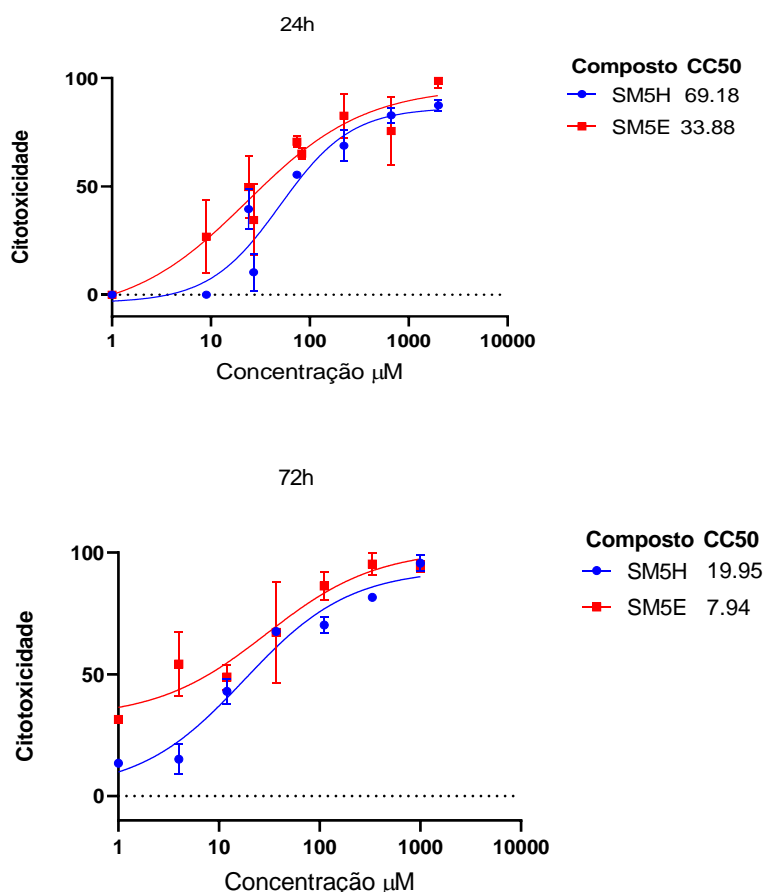


Figura 4: Citotoxicidade em função da concentração dos compostos SH-5H e SH-5E e valor do CC50 obtidos a partir do ensaio por MTT em 24 horas e 72 horas.

4.2 Avaliação anti-*T. cruzi* em formas amastigotas em células VERO

A partir do índice endocítico foi possível calcular a concentração capaz de inibir 50% do patógeno (IC50) dos compostos SM-5H e SM-5E, 6,96 μM e 6,36 μM respectivamente. As concentrações dos compostos utilizados no ensaio foram 1,25; 2,5; 5; 10; 20 μM . Não há diferença significativa no valor de IC50 obtido dos compostos SM-5H e SH-5E, porém, o composto SH-5E apresentou uma curva com maior linearidade. Esse composto demonstrou sugestivo com maior atividade ao inibir 50% das amastigotas em menor concentração que o composto SM-5H.

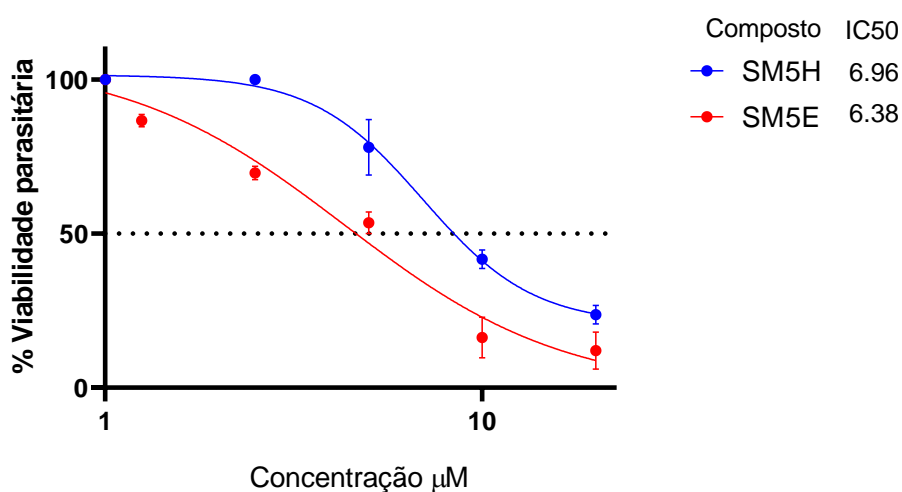


Figura 5: Viabilidade parasitária em função da concentração, e determinação da concentração inibitória mínima (IC50) dos compostos SM5H e SM5E.

4.3 Avaliação da atividade *in vivo*

Para a realização do teste *in vivo* em camundongos fêmeas da linhagem Swiss foram usadas duas concentrações 50mg/kg/dia e 250 mg/kg/dia dos compostos SM-5H e SM-5E. Foi observado uma redução significativa da parasitemia nos animais tratados com os dois compostos em ambas as dosagens, quando comparado com a parasitemia do grupo controle INT. Além disso, não houve diferença estatística na redução da parasitemia entre os dois compostos testados na dose de 250 mg/kg/dia. Também, observamos uma ação dose dependente do composto SM-5E quando comparamos os resultados obtidos na redução da parasitemia nas duas doses testadas. Os animais tratados com BZ 100 mg/kg/dia, negativaram a parasitemia (Figura 6).

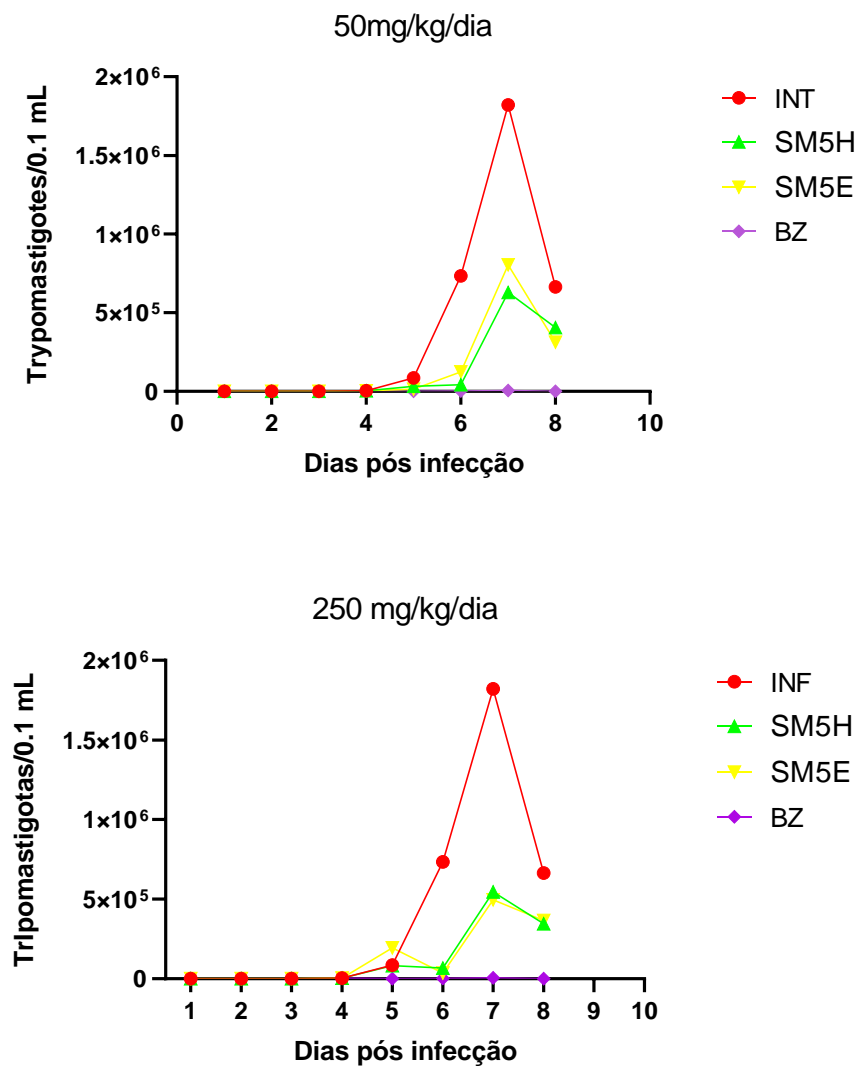


Figura 6: Curvas de parasitemia média do teste rápido com os compostos SM-5H e SM-5E e benznidazol em camundongos infectados com cepa Y de *T. cruzi* e tratados pela via oral por cinco dias consecutivos durante a fase aguda da infecção.

4.4 Caracterização das nanocápsulas

As formulações de nanocápsulas mostraram um aspecto leitoso característico de suspensões coloidais nanométricas. O tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das nanocápsulas, contendo 1 mg/mL dos compostos SM-5H (NC-SM-5H), SM-5E (NC-SM-5E) e nanocápsulas branca (NC-BR) foram avaliados e os resultados encontram-se na Tabela 2. Os tamanhos médios apresentam dimensões

inferiores a 200 nm como demonstrado na Tabela 2 para todas as NC. A formulação NC-SM-5E apresentou um tamanho inferior à NC branca, indicando que este composto pode ter uma leve ação tensoativa, fenômeno já observado em NC encapsulando outro fármaco (ARAÚJO *et al.*, 2019). Os valores de potencial zeta tanto das NC dos compostos SM-5H, SM-5E e das NC-BR apresentaram carga negativa, variando de – 44,7 a – 48,8 mV. Além disso, os resultados dos índices de polidispersão das formulações foram 0,113; 0,131; 0,126 para NC-SM-5H, NC-SM-5E e NC-BR respectivamente, demonstrando serem formulações com tamanhos de partículas relativamente uniformes, considerando PDI <0,3 (GAUMET *et al.*, 2008).

Tabela 2: Características físico-químicas das formulações de NC-SM-5H, NC-SM-5E na concentração de 1 mg/mL e NC-BR.

Formulação	Concentração (mg/mL)	Tamanho médio (nm) ± DP	PDI ± DP	Potencial Zeta (mV) ± DP
NC-SM-5H	1 mg/mL	185,8 ± 0,75	0,113 ± 0,03	– 44,7 ± 0,63*
NC-SM-5E	1 mg/mL	171,3 ± 0,02*	0,131 ± 0,27	– 48,7 ± 2,23
NC-BR	NA	184,4 ± 1,65	0,126 ± 0,02	– 48,8 ± 0,89

Valores médios com desvio padrão do tamanho, PDI e potencial zeta das nanocápsulas SM-5H, SM-5E (1 mg/mL) e NC-BR.

5. Discussão

A DC é responsável por um grande problema de saúde nas regiões endêmicas, como na grande parte da América Latina, afetando principalmente a população de baixa renda em áreas rurais e urbanas precárias. Também conhecida como tripanossomíase americana, é uma doença causada pelo protozoário *T. cruzi*, transmitida principalmente pelo inseto vetor conhecido como "barbeiro" (WHO, 2021).

Um dos principais problemas relacionados ao tratamento da DC é a falta de opções terapêuticas eficazes, especialmente para os casos avançados (COURA, 2009). O medicamento mais utilizado é o BZ, seguido pelo NF. Esses medicamentos são mais eficazes durante a fase aguda e têm menos sucesso na fase crônica. Além disso, esses tratamentos podem causar efeitos colaterais graves e administração prolongada, o que dificulta a adesão dos pacientes (COURA e CASTRO, 2002).

Após a administração dos dois medicamentos, BZ e NF, é comum observar resultados variados de tratamento. Essa divergência nos resultados pode ser compreendida considerando a presença de diferentes cepas do *T. cruzi* (GUEDES *et al.*, 2006) que podem demonstrar resistência aos efeitos dos medicamentos (COURA, 2009). Outros fatores que influenciam nas respostas ao tratamento incluem a fase da doença em que o paciente se encontra, a duração do tratamento, a dosagem tratada, e a idade do paciente. Todos esses fatores podem afetar a eficácia dos medicamentos e explicar as variações nos resultados observados (COURA; CASTRO, 2002).

A necessidade de novas alternativas de tratamento para a DC é crucial. Pesquisas estão sendo realizadas para identificar novos compostos terapêuticos que sejam mais eficazes, de ação mais rápida, com menos efeitos colaterais e que possam atuar tanto na fase aguda quanto na crônica da doença. Além disso, busca-se identificar novos alvos terapêuticos, como proteínas essenciais para a sobrevivência do *T. cruzi*, bem como para encontrar maneiras de melhorar a entrega dos medicamentos às células parasitárias (URBINA *et al.*, 2010).

Quando os parasitas se encontram em um processo de reprodução dentro das células hospedeiras, muitas vezes se tornam inacessíveis aos medicamentos atualmente disponíveis.

Uma das alternativas na busca de novos tratamentos para a DC são os “lead compounds”, como o SRPN340, que apresenta boas propriedades farmacológicas (SIQUEIRA *et al.*, 2017). As novas moléculas aqui estudadas (SM5-H e SM-5E) são derivadas de SRPN340 e contém núcleo triazol, que são descritos como ativos em DC experimental (DA SILVA *et al.*, 2012) e clínica (APT *et al.*, 2010). Sendo assim, nesse estudo buscamos avaliar por meio de ensaio *in vitro* e *in vivo* dois compostos com características promissoras contra a DC.

A avaliação da citotoxicidade dos compostos SM-5H e SM-5E, realizados pelo método MTT em células VERO mostrou que o composto SM-5H (CC50 69,18) possui concentração para reduzir a viabilidade das células duas vezes maior que o composto SM-5E (CC50 33,88) para as células VERO. Considerando que BZ apresenta CC50 de 147,37 µg/ml em células VERO (AZEREDO, 2013), os compostos aqui avaliados são mais citotóxicos. Porém, as concentrações mais baixas de ambos os compostos não foram capazes de eliminar 50% desta linhagem celular até a concentração de 74,07 µg/ml no tempo de 24 horas. Estes resultados não foram equivalentes para o ensaio realizado em 72 horas de incubação, em que os compostos apresentaram citotoxicidade de 50% antes da concentração de 74,07 µg/ml.

Considerando o teste de atividade em formas amastigotas, os compostos SM-5E (IC50 6,38 µM) e SM-5H (IC50 6,96 µM) foram considerados mais ativos que BZ, que em outro estudo apresentou IC50 de 132,14 µM. (TORCHELSEN, 2019). Além disso, os resultados da atividade *in vitro* dos compostos, o IS obtidos de 5,31 e 9,94 para SM-5E e SM-5H respectivamente indicam que os compostos não são indicados para teste *in vivo* (ROMANHA *et al.*, 2010). Porém, uma boa relação *in vitro-in vivo* é difícil de se obter. E ainda, encapsular esses compostos pode ser uma boa alternativa para melhorar o IS.

Para descobrir se os compostos possuíam atividade *in vivo*, foi então realizada a avaliação do tratamento em teste rápido, em camundongos *Swiss* infectados pela cepa Y de *T. cruzi*. Foi observada diminuição significativa da parasitemia com os tratamentos dos compostos SM-5H e SM-5E, em ambas as doses utilizadas quando comparado aos animais INT, demonstrando que estes compostos são ativos quando em um organismo vivo. Quando comparado com o tratamento feito com BZ, a ação de SM-5E foi significativamente menor. Também foi observada melhoria na inibição

da parasitemia com aumento da dose de SM-5E, o que é um indicativo de resposta dose dependente. O composto SM-5H não foi diferente ($p < 0,005$) de BZ em nenhuma das doses testadas, sugerindo que seja comparável a BZ, apesar da parasitemia ter sido visualmente maior. Entre os compostos SM-5E e SM-5H, o segundo teve melhor desempenho.

Em um estudo comparando a BZ e bases de Shiff, (compostos que contêm um grupo azometina) utilizando dose única de 500 mg/kg no pico da parasitemia também foi observada a negatização da parasitemia com o tratamento com o BZ, porém apenas um dos compostos testados apresentou redução da parasitemia comparável ao BZ entre as 10 moléculas utilizadas no estudo (ALMEIDA *et al*, 2018). Apesar de efeitos semelhantes entre a base de Shiff de Almeida *et al.* (2018) e SM-5H em relação ao BZ em tratamento experimental no modelo murino, o estudo aqui apresentado tratou os animais por 5 dias após confirmada infecção.

Comparando-se SM-5E e SM-5H, o segundo composto apresentou maior atividade. Novos estudos precisam ser realizados para avaliar o efeito tripanocida do composto SM-5H em teste de eficácia (BRENER, 1962) para avaliar se esses compostos têm potencial para controle, cura da infecção ou ganhos terapêuticos.

Os resultados obtidos a partir da avaliação das formulações nanoestruturadas feitas por método de deposição interfacial foram compatíveis com o esperado para NC (BRANQUINHO *et al*, 2017 ; MAZZETI *et al*, 2021; ARAÚJO *et al.*, 2019). Os tamanhos médios apresentam dimensões entre 171,3 nm a 185,8 nm, de acordo com a escala de sistemas nanoestruturados (10 e 1000nm). Além disso, os valores de potencial zeta obtidos (~ -48 mV), conferem estabilidade às formulações uma vez que quando a carga eletrostática das partículas em solução é menor que -30 mV há maior repulsão entre as partículas (AMELLER, 2003). A pequena variação do potencial zeta das formulações contendo ativos em relação às NC-BR sugere que os compostos ativos se encontram no núcleo oleoso das NC, enquanto os valores de PDI das formulações desenvolvidas ($< 0,3$ μ M), indicam uniformidade de tamanho e assim garantem uniformidade de dose (GAUMET *et al.*, 2008). Esses dados sugerem estabilidade coloidal, e que as partículas estão menos propensas a sedimentação ou aglomeração. Formulações estáveis conferem maior validade à formulação, uma característica importante para que sejam administradas como medicamentos.

6. Conclusão

Os compostos SM-5E e SM-5H demonstraram ser ativos *in vivo*, especialmente o SM-5H, apesar de não serem seletivos. Estes compostos são nanoencapsuláveis e geram formulações com boas características, o que pode elevar o potencial como ativos anti-*T. cruzi*. Assim, mais estudos são necessários para que se conheçam os efeitos dos compostos e de suas formulações nanoestruturadas, em especial quanto à eficácia terapêutica e ao perfil de toxicidade *in vivo*.

7. REFERÊNCIAS

WHO – World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis), 2021. Acessado em..., disponível em...

AMELLER, T.; MARSAUD, V.; LEGRAND, P.; GREF, R.; BARRATT, G.; RENOIR, JM. Nanopartículas de poliéster-poli(etilenoglicol) transmitidas com o antiestrogênio puro RU 58668: propriedades físico-químicas e de opsonização. PESQUISA FARMACÊUTICA, v. 20, n. 7, pág. 1063-1070, 2003. DOI: 10.1023/a:1024418524688.

APOLINÁRIO, A.; SALATA, G.; BIANCO, A.; FUKUMORI, C.; LOPES, L. Abrindo a caixa de pandora dos nanomedicamentos: há realmente muito mais 'espaço lá embaixo. Química Nova, 2020.

ARAÚJO, R.S., GARCIA, G.M., VILELA, ANDRADE, M.S., OLIVEIRA, KANO, E.K., LANGE, C.C., APARECIDA, M., HUMBERTO and CARLA, V. 2019. Cloxacillin benzathine-loaded polymeric nanocapsules: physicochemical characterization, cell uptake, and intramammary antimicrobial effect.

ASSIS, B. e PAULO, S., 2018. Universidade Presbiteriana Mackenzie Centro de Ciências Biológicas e da Saúde Curso de Farmácia Nanocosmetotecnologia: principais nanoestruturas e suas aplicações.

ASHBURN, Ted T.; THOR, Karl B. Reposicionamento de medicamentos: identificação e desenvolvimento de novos usos para medicamentos existentes. Nature reviews Drug discovery, v. 3, n. 8, pág. 673-683, 2004.

BECK, R.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A. (Ed.). Nanocosmetics and nanomedicines: new approaches for skin care. Berlin: Springer, 2011. p. 369.

BERN C., 2015. Chagas' Disease. The New England journal of medicine, 373(5), 456–466.

BRANQUINHO, R. T., POUND-LANA, G., MARQUES MILAGRE, M., SAÚDE-GUIMARÃES, DA, VILELA, JMC, SPANGLER ANDRADE, M., DE LANA, M., &

MOSQUEIRA, VCF., 2017. Increased Body Exposure to New Anti-Trypanosomal Through Nanoencapsulation. Scientific reports, 7(1), 8429

CAMILA MARIA OLIVEIRA DE AZEREDO. Efeito inibitório de óleos essenciais sobre Trypanosoma cruzi. Curitiba, 2013.

CARLIER Y, TORRICO F, SOSA-ESTANI S, RUSSOMANDO G, LUQUETTI A, FREILIJ H, *et al.*, 2011 Doença de Chagas Congênita: Recomendações para Diagnóstico, Tratamento e Controle de Recém-Nascidos, Irmãos e Gestantes. PLoS Negl Trop Dis 5(10): e1250.

CASTRO, J.A., DE MECCA, M.M. and BARTEL, L.C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). Hum Exp Toxicol, 25(8), 471-479, 2006.

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

COURA, J. R. e DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz, 104, 31-40, 2009.

COURA, JR, & BORGES-PEREIRA, J. 2012. Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review. Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical, 45(3), 286–296.

COUVREUR, P., BARRATT, G., FATTAL, E., LEGRAND, P., & VAUTHIER, C., 2002. Nanocapsule technology: a review. Critical reviews in therapeutic drug carrier systems, 19(2), 99–134.

ERDOĞAR, NAZLI *et al.* "Nanocapsules for Drug Delivery: An Updated Review of the Last Decade." Recent patents on drug delivery & formulation vol. 12,4., 2018: 252-266.

FARIA, RX, GONZAGA, DTG, PACHECO, PAF *et al.* Em busca de novas drogas para doenças de Chagas: análogos de triazóis apresentam alta atividade in vitro contra *Trypanosoma cruzi* e baixa toxicidade para células de mamíferos. *J Bioenerg Biomembr* **50**, 81–91., 2018.

FESSI, HPFD, PUISIEUX, F., DEVISSAGUET, JP, AMMOURY, N., & BENITA, S. Formação de nanocápsulas por deposição de polímero interfacial após deslocamento de solvente. *Revista Internacional de Farmácia*, 55 (1), R1- R4,1989.

FILARDI, L.S., BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 81, 755- 759, 1987.

FIOCRUZ, 2015. Tratamento – Portal da Doença de Chagas.

GALLARDO, H.; CONTE, G.; BRYK, F.; LOURENÇO, M. C. S.; COSTA, M. S.; FERREIRA, V. F. Synthesis and evaluation of 1-alkyl-4-phenyl- 1,2,3-triazole derivatives as 35 antimycobacterial agents. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, p. 1285-1291, 2007.

GUEDES, P.M.M., FIETTO, J.L.R., LANA, M. and BAHIA, M.T. Advancens in Chagas Disease Chemotherapy. *Antiinfect Agents Med Chem*, 5(2), 175-185, 2006.

JUNQUEIRA ACV, ALBAJAR PV, COURA JR., 2005. Doença de Chagas na Amazônia Brasileira. In JR Coura, *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 595-601.

KAISER, M.; MÄSER, P.; TADOORI, L.P.; *et al.* Antiprotozoal Activity Profiling of Approved Drugs: A Starting Point toward Drug Repositioning. *PLOS ONE*, v. 10, n. 8, p. e0135556, 2015.

LUZ, S., 2015. Estudo do Efeito Inibitório de óleos Essenciais de Pimenta de Macaco e Pimenta Longa contra *Trypanossoma Cruzi*.

LYGRE, H. *et al.* Biologic testing of leachable aromatic compounds from denture base materials. *Acta Odontologica Scandinavica*. v. 53. p. 397-40. 1995.

MAZZETI, AL, CAPELARI-OLIVEIRA, P., BAHIA, MT, & MOSQUEIRA, VCF (2021). Review on Experimental Treatment Strategies Against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of experimental pharmacology*, 13, 409–432. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS PORTARIA Nº 57, DE 30 DE OUTUBRO DE 2018.

MOSMANN, T.R., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. 65(1-2), pp.55–63.

PRATA, A., 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. 1(2), pp.92–100.

RABELO, A., BRETAS, M. and GUILLO, L. (n.d.). ENSAIO DA CITOTOXICIDADE DE CURCUMINA.

RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104 (suppl 1), 2009.

RODRIGUES, M. Diamidas inspiradas no SRPIN 340 e ésteres cinamatos: sínteses e prospecção de bioatividades. Tese do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de Doctor Scientiae, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais, Brasil. 2019.

ROMAÑA C. A area de un sintoma inicial de valor para el diagnóstico de forma aguda de la enfermedad de Chagas. *MEPRA*, 22, 16-30, 1935.

ROMANHA, AJ, CASTRO, SL DE., SOEIRO, M. DE NC, LANNES-VIEIRA, J., RIBEIRO, I., TALVANI, A., BOURDIN, B., BLUM, B., OLIVIERI, B., ZANI, C., SPADAFORA, C., CHIARI, E., CHATELAIN, E., CHAVES, G., CALZADA, JE, BUSTAMANTE, JM, FREITAS-JUNIOR, LH, ROMERO, LI, BAHIA, MT, ANDRADE, Z., 2010. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(2), 233–238.

ROMERO, E. L. e MORILLA, M. J. Nanotechnological approaches against Chagas disease. *Adv Drug Deliv Rev*, 62, 576-588, 2010.

SALES JUNIOR PA, MOLINA I, FONSECA MURTA SM, SÁNCHEZ-MONTALVÁ A, SALVADOR F, CORRÊA-OLIVEIRA R, CARNEIRO CM. Tratamento Experimental e Clínico da Doença de Chagas: Uma Revisão. *Am J Trop Med Hyg*. 2017 nov;97(5):1289-1303.

SCHMUNIS GA, YADON ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop*. Jul-Aug;115(1-2):14-21, 2010.

SILVA, CF, MEUSER, MB, DE SOUZA, EM, MEIRELLES, MNL, STEPHENS, CE, SOM, P., BOYKIN, DW, SOEIRO, MNC., 2007. Efeitos celulares de amidinas invertidas no *Trypanosoma cruzi*. *Nome da Revista*

SIQUEIRA, R. P., BARROS, M. V. A., BARBOSA, E. A. A., ONOFRE, T. S., GONCALVES, V. H. S., PEREIRA, H. S., SILVA JUNIOR, A., de OLIVEIRA, L. L., ALMEIDA, M. R., FIETTO, J. L. R., TEIXEIRA, R. R. e BRESSAN, G. C. "Trifluoromethyl arylamides with antileukemia effect and intracellular inhibitory activity over serine/arginine-rich protein kinases (SRPKs)." *Eur J Med Chem* 134: 97-109, 2017.

SIQUEIRA, RP, MILAGRE, MM, DE OLIVEIRA, MA, BRANQUINHO, RT, TORCHELSEN, FKV, DE LANA, M., MACHADO, MGC, ANDRADE, MS, BAHIA, MT, & MOSQUEIRA, VCF., 2022. In vitro interaction of polyethylene glycol-block-poly(D,L-

lactide) nanocapsule devices with host cardiomyoblasts and *Trypanosoma cruzi* infective forms. *Parasitology research*, 121(10), 2861–2874.

SOEIRO, M. N. C. e DE CASTRO, S. L. Screening of potential anti-*Trypanosoma cruzi* candidates: In Vitro and In Vivo studies. *Open Med Chem J*, 5, 21-30, 2009.

SOUSA, Sara Maria Ribeiro. Síntese de novos 1,2,3-triazóis inspirados no srpin 340 e avaliação de atividades antiparasitária e antitumoral. 2020. 336 f. Tese (Doutorado 89 Programa de Pós-Graduação em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2020. Subbiah, R., M. Veerapandian and Yun, K.S., 2023. Nanoparticles: Functionalization and Multifunctional Applications in Biomedical Sciences. *Current Medicinal Chemistry*, 17(36), pp.4559–4577.

TAMIRES CUNHA ALMEIDA, LUIS HENRIQUE GONZAGA RIBEIRO, LUIZA BRAGA FERREIRA DOS SANTOS, CLEITON MOREIRA DA SILVA, RENATA TUPINAMBÁ BRANQUINHO, MARTA DE LANA, FERNANDA RAMOS GADELHA, ÂNGELO DE FÁTIMA., Synthesis, in vitro and in vivo anti-*Trypanosoma cruzi* and oxicological activities of nitroaromatic Schiff bases, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume108,2018, Pages1703-1711.

TARANGELO, A., DIXON, S. Uma idade de ferro para a terapia do câncer. *Nature Nanotech* 11, 921–922., 2016.

TEIXEIRA, R. R.; ALVES, R. B.; BORGATI, T. F.; FREITAS, R. P. Compostos triazólicos, processo de síntese e uso como herbicida. BR 10 2012 023741 5 A2, 2012. TEIXEIRA, R. R.; GAZOLLA, P. A. R.; DA SILVA, A. M.; BORSODI, M. P. G.; BERGMANN, B. R.; FERREIRA, R. S.; VAZ, B. G.; VASCONCELOS, G. A.; LIMA, W. P. Synthesis and leishmanicidal activity of eugenol derivatives bearing 1,2,3- triazole functionalities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 146, p. 274- 286, 2018.

TEIXEIRA AR, NITZ N, GUIMARO MC, GOMES C, SANTOS-BUCH CA. Chagas disease. *Postgrad Med J*. 2006 Dec;82(974):788-98

TORCHELSEN, F. K. V. S., Avaliação da atividade anti-Trypanosoma cruzi in vitro e in vivo do composto silibinina isolado e associado ao benznidazol., 2019. Disponível em: repositorio.ufop.br

URBINA, J.A., 2010. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta tropica*, 115(1-2), pp.55–68.