

GLAUBER ARAUJO DA SILVA PEIXOTO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE LIGANTES METÁLICOS DERIVADOS DE
1,10-FENANTROLINA ASSOCIADOS À Cu^{2+} E Ag^+ EM CÉLULAS ANIMAIS LLC-MK₂
E NAS FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO/JANEIRO - 2023

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Prof^ª. Marta Helena Branquinha de Sá e coorientação do Dr. Leandro Stefano Sangenito.

FICHA CATALOGRÁFICA

P379a Peixoto, Glauber Araujo da Silva
Avaliação do efeito de ligantes metálicos
derivados de 1,10-fenantroline associados à Cu^{2+} e
 Ag^+ em células animais LLC-MK2 e em formas
tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* / Glauber
Araujo da Silva Peixoto. -- Rio de Janeiro, 2023.
61 f.

Orientadora: Marta Helena Branquinha.
Coorientador: Leandro Stefano Sangenito.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2023.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. doença de Chagas. 3.
quimioterapia. 4. compostos de coordenação. 5.
phenidone. I. Branquinha, Marta Helena, orient. II.
Sangenito, Leandro Stefano, coorient. III. Título.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Glauber Araujo da Silva Peixoto**
 DRE: 118089247

BANCA EXAMINADORA: Profª. Daniela Sales Alviano Moreira (Presidente)
 Dra. Simone Santiago Carvalho de Oliveira
 Prof. Igor de Almeida Rodrigues
 Prof. Leonardo Nimrichter (Suplente)

Título da Monografia: *“Avaliação do Efeito de Ligantes Metálicos Derivados de 1,10-fenantrolina Associados à Cu²⁺ E Ag⁺ em Células Animais LLC-MK₂ e nas Formas Tripomastigotas de Trypanosoma cruzi”*

Local: **Sala I-02/ IMPPG / CCS / UFRJ**
 Data e hora de início: **13 de janeiro de 2023 às 12:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 8,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 13 de janeiro de 2023.

NOTA

Banca Examinadora:

8,0	Profª. Daniela Sales Alviano Moreira
	<i>Simone St. de Oliveira</i>
8,0	Dra. Simone Santiago Carvalho de Oliveira
	<i>Igor Almeida Rodrigues</i>
8,0	Prof. Igor de Almeida Rodrigues
	<i>Leonardo Nimrichter</i>
	Prof. Leonardo Nimrichter

Aluno:

Glauber Araujo da Silva Peixoto
 Glauber Araujo da Silva Peixoto

Orientador:

Martha Helena Branquinha de Sá
 Profª. Martha Helena Branquinha de Sá
Leandro Stefano Sangenito
 Coorientador: Dr. Leandro Stefano Sangenito

Coordenador
 de TCC

Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho
 Profª. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

DEDICATÓRIA

Aos meus avós, Carlos e Janice. Por tudo que eu sou, fui e serei, sempre vou ser grato a vocês. Amarei vocês até meu último dia.

AGRADECIMENTOS

Primeiro, agradeço imensamente aos meus orientadores Marta Branquinha e André Santos. Vocês não só me ensinaram muito sobre a vida científica, como me fizeram sentir acolhido em uma verdadeira família. Sou muito grato por cada conversa, cada risada, puxão de orelha, cafezinho, conselho, apoio, por cada palavra... Vocês me marcaram como pessoa e como profissional e sempre os terei como meus pai e mãe científicos. Muito obrigado por tudo que representaram nesses primeiros passos da minha vida acadêmica e por terem investido tanto em mim!

Agradeço também ao meu coorientador Leandro Sangenito, por ter estado comigo todo esse tempo na bancada, me ensinando, me ajudando e tirando todas as minhas dúvidas com muita parcimônia, mesmo eu perguntando pela milésima vez. Além disso, para muito além da bancada, foi sempre um amigo e um professor muito solícito, apesar de bem estressado haha. Obrigado por todas as lições de “tiozão” e por me fazer enxergar as coisas de um jeito diferente.

Agradeço também a minha família, principalmente a minha mãe Janaina, por me darem suporte, por estarem comigo a cada passo e por fazerem de tudo pelos meus estudos. Em especial, agradeço mais ainda aos meus avós Janice e Carlos, por tudo que vocês representam na minha vida. Se eu cheguei até aqui, foi por causa de todos vocês. Amo demais todos!!!

Quero agradecer especialmente a Dirlei, minha professora, amiga, tutora, irmã mais velha e todos os melhores títulos que eu posso imaginar. Esteve comigo desde a primeira disciplina que cursei na micro e desde então não consegui largar do seu pé. É uma pessoa incrível e alguém muito especial para mim, muito obrigado por tudo e espero que esteja comigo por muito tempo. Você ainda me deve aquele café e eu vou cobrar, ein!?

Agradeço também aos meus amigos e colegas de trabalho, por todas a ajuda possível, pelas risadas e pelas noites até tarde no laboratório. Iuri, Tonny, Luka, Denise, Giovanini, Camila, Lorena, Gerla, Joice, Pedro, Rafa e a todos os outros que fazem ou já fizeram parte do meu dia a dia, muito obrigado. Agradeço também ao pessoal da pós-graduação, em especial a Thaís e a Simone, pelas ajudas e conversas, científicas ou não.

Dito isto, quero agradecer em especial à Larissa. Mesmo chegando no finalzinho, você acabou sendo uma das melhores coisas que aconteceram em um ano tão conturbado e difícil. Obrigado por cada momento, seu jeitinho parecido com o meu tornou a rotina mais fácil.

Quero agradecer com um carinho especial ao meu melhor amigo Glaucio. É de um prestígio gigantesco ter você comigo a tanto tempo, acompanhando cada passo da minha vida pessoal e profissional de perto e me apoiando incondicionalmente a todo instante. Não mereço metade do amigo que você é para mim. Muito obrigado por tudo, maninho!!! Que ainda venham muitos anos para nós nessa vida.

Agradeço também aos meus demais amigos, que estiveram em momentos de muita diversão e puderam tornar o peso da vida bem mais leve. Yan, Adriane, Daniel, Rebeca, Gabriel, João, Vick, Stu e a todos os outros, obrigado por tudo que vocês me proporcionaram e ainda proporcionam.

Agradeço aos professores Daniela Alviano, Igor de Almeida e Leonardo Nimrichter e a Dra. Simone de Oliveira, por terem aceitado fazer parte da minha banca e avaliarem esse trabalho com todo o cuidado.

A todos que de alguma forma contribuíram com a minha jornada e com esta monografia, meus agradecimentos sinceros.

Agradeço também ao CNPq, FAPERJ e CAPES pelo suporte financeiro e por tornarem esse trabalho possível.

RESUMO

GLAUBER ARAUJO DA SILVA PEIXOTO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE LIGANTES METÁLICOS DERIVADOS DE 1,10-FENANTROLINA ASSOCIADOS A Cu^{2+} E Ag^+ EM CÉLULAS ANIMAIS LLC-MK₂ E NAS FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Orientadores: Marta Helena Branquinha de Sá
Coorientador: Leandro Stefano Sangenito

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado de grande relevância na saúde pública por ser o agente etiológico da doença de Chagas. O parasito é endêmico na América Latina e infecta mais de 7 milhões de pessoas pelo mundo, causando cerca de 14.000 mortes/ano devido a complicações. O parasito é transmitido principalmente por vetor e assume diversas formas durante seu ciclo, sendo as formas tripomastigotas e amastigotas as de maior relevância clínica. O quadro clínico consiste na fase aguda, geralmente assintomática; e na fase crônica, que só apresenta sintomas específicos anos após a infecção, levando a graves danos cardíacos e digestivos. Entretanto, apesar de sua grande relevância pela alta morbidade e mortalidade, os fármacos disponíveis para tratamento da doença ainda são escassos, apresentam efetividade variável na forma crônica e possuem numerosos efeitos tóxicos relevantes. Em contrapartida, o crescente número de trabalhos na literatura envolvendo compostos de coordenação com potente efeito antimicrobiano implica em novas abordagens promissoras para o tratamento. Dentre os inúmeros complexos metálicos estudados, os compostos baseados em 1,10-fenantrolina (*phen*) e seus derivados apresentam atividade contra um grande espectro de microrganismos, especialmente os complexos com 1,10-fenantrolina-5,6-diona (*phendione*). Inúmeros dados do nosso grupo de pesquisa já demonstraram a eficácia que os complexos de *phendione* apresentam em microrganismos como *Candida* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e, principalmente, em *Leishmania* spp.. Portanto, uma vez que estes compostos são promissores antimicrobianos, inclusive contra tripanossomatídeos, o presente trabalho tem como intuito avaliar os efeitos que *phendione* associado aos íons de Cu^{2+} e Ag^+ (Cu^{2+} -*phendione* e Ag^+ -*phendione*) apresentam frente as formas tripomastigotas de *T. cruzi* e avaliar a seletividade destes compostos entre as células epiteliais LLC-MK₂ e os parasitos. Para avaliar as concentrações seguras a serem utilizadas, foram realizados ensaios de citotoxicidade com LLC-MK₂ por 24 e 72 horas através do método de MTT. No tempo de 24 h, além de Cu^{2+} -*phendione* e Ag^+ -*phendione* serem testados nos modelos, o ligante livre *phendione* também teve sua citotoxicidade aferida. Portanto, em 24h, calculou-se o CC₅₀ dos compostos como sendo 57,599 μM (Cu^{2+} -*phendione*), 23,566 μM (Ag^+ -*phendione*) e 7,985 μM (*phendione*). Já no tempo de 72 h, determinou-se o CC₅₀ dos compostos como 2,3 μM (Cu^{2+} -*phendione*) e 5,61 μM (Ag^+ -*phendione*). Os compostos Cu^{2+} -*phendione* e Ag^+ -*phendione* se mostraram altamente eficazes contra os

tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, afetando a sua viabilidade e reduzindo a população de forma dose-dependente em concentrações nanomolares. Neste caso, os valores de DL₅₀ calculados para os compostos foram 18,92 nM (Cu²⁺-*phendione*) e 15,39 nM (Ag⁺-*phendione*). A partir destas concentrações, calculou-se o IS para ambos os compostos no tempo de 24h como 3.044,339 para Cu²⁺-*phendione* e 1.531,254 para Ag⁺-*phendione*. Tais dados sugerem que compostos de *phendione* são bem promissores e, a depender da continuidade do projeto e novos ensaios no futuro, podem representar uma possibilidade de novo quimioterápico para o contexto da doença.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, doença de Chagas, quimioterapia, compostos de coordenação, *phendione*.

ABSTRACT

GLAUBER ARAUJO DA SILVA PEIXOTO

EVALUATION OF THE EFFECT OF METALLIC LIGANDS DERIVED FROM 1,10-PHENANTHROLINE AND ASSOCIATED TO Cu^{2+} AND Ag^+ IN LLC-MK₂ ANIMAL CELLS AND IN *TRYPANOSOMA CRUZI* TRYPOMASTIGOTE FORMS

Advisory: Marta Helena Branquinha de Sá

Co-advisory: Leandro Stefano Sangenito

Summary of the monography presented at the Instituto de Microbiologia Paulo de Góes from Universidade Federal do Rio de Janeiro, as part of the requeriments to obtaining a bachelor's degree in Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia and approval in the RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Trypanosoma cruzi is a flagellated protozoan parasite of great relevance in public health because it is the etiological agent of Chagas disease. The parasite is endemic in Latin America and infects more than 7 million people worldwide, causing about 14,000 deaths per year due to complications. The parasite is transmitted mainly by vectors and assumes various forms during its cycle, with the trypomastigotes and amastigotes being the most clinically relevant. The clinical picture consists of the acute phase, usually asymptomatic; and the chronic phase, which only presents specific symptoms years after infection, leading to severe cardiac and digestive damage. However, despite its great relevance due to the high morbidity and mortality, the drugs available for the treatment of the disease are still scarce, have variable effectiveness in the chronic form, and have numerous relevant toxic effects. In contrast, the growing number of studies in the literature involving coordination compounds with potent antimicrobial effect implies in new promising approaches for the treatment. Among the numerous metal complexes studied, compounds based on 1,10-phenanthroline (*phen*) and its derivatives show activity against a wide spectrum of microorganisms, especially complexes with 1,10-phenanthroline-5,6-dione (*phendione*). Numerous data from our research group have already demonstrated the efficacy of phendione complexes against microorganisms such as *Candida* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and especially *Leishmania* spp. Therefore, since these compounds are promising antimicrobials, including against trypanosomatids, the present work aims to evaluate the effects that phendione associated with Cu^{2+} and Ag^+ ions (Cu^{2+} -*phendione* and Ag^+ -*phendione*) present in *T. cruzi* trypomastigotes forms and to evaluate the selectivity of these compounds between LLC-MK₂ epithelial cells and the parasites. To evaluate the safe concentrations to be used, cytotoxicity assays were performed with LLC-MK₂ for 24 and 72 h using the MTT method. At the 24 h time point, in addition to Cu^{2+} -*phendione* and Ag^+ -*phendione* being tested in the models, the free *phendione* ligand also had its cytotoxicity measured. Therefore, in 24 h, the CC₅₀ of the compounds was calculated as being 57.599 μM (Cu^{2+} -*phendione*), 23.566 μM (Ag^+ -*phendione*), and 7.985 μM (*phendione*). At 72 h, the CC₅₀ of the compounds was determined as 2.3 μM (Cu^{2+} -*phendione*) and 5.61 μM (Ag^+ -*phendione*). The compounds Cu^{2+} -*phendione* and Ag^+ -*phendione* proved highly effective against *T. cruzi* strain Y trypomastigotes, affecting their viability and reducing their population in a dose-dependent manner at nanomolar

concentrations. In this case, the calculated LD₅₀ values for the compounds were 18.92 nM (Cu²⁺-*phendione*) and 15.39 nM (Ag⁺-*phendione*). From these concentrations, the SI for both compounds at the 24h time point was calculated as 3,044.339 for Cu²⁺-*phendione* and 1,531.254 for Ag⁺-*phendione*. Such data suggest that phendione compounds are quite promising and, depending on the continuation of the project and further assays in the future, may represent a possibility of a new chemotherapeutic for the disease context.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, chemotherapy, coordination compounds, *phendione*.

RESUMO PARA LEIGOS**GLAUBER ARAUJO DA SILVA PEIXOTO****AVALIAÇÃO DO EFEITO DE LIGANTES METÁLICOS DERIVADOS DE 1,10-FENANTROLINA ASSOCIADOS A Cu^{2+} E Ag^+ EM CÉLULAS ANIMAIS LLC-MK₂ E NAS FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*****Orientadores: Marta Helena Branquinha de Sá
Coorientador: Leandro Stefano Sangenito**

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

A doença de Chagas afeta mais de 7 milhões de pessoas no mundo inteiro matando mais de 14 mil pessoas todo ano, sendo mais de 4 mil dessas mortes apenas no Brasil. A doença é causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um parasito transmitido pela picada de besouros conhecidos como barbeiros. O parasito assume várias formas diferentes durante a sua transmissão, sendo as mais importantes as formas tripomastigotas e amastigotas por serem capazes de infectar o ser humano. As pessoas que são contaminadas com esse microrganismo geralmente costumam passar anos sem apresentar sintomas, mas a infecção costuma gerar graves problemas de coração e de intestino. Entretanto, mesmo sendo uma doença tão importante, os poucos remédios que existem para o seu tratamento não funcionam da melhor forma possível e podem gerar muitos efeitos colaterais. Isso tem relação direta com a doença de Chagas ser uma doença negligenciada. Isso significa que as empresas não têm interesse em criar mais medicamentos para tratar a doença por afetar pessoas pobres, pois elas não teriam capacidade de pagar por eles. Portanto, existe uma grande necessidade de se pesquisar novos medicamentos que sejam baratos e capazes de curar a pessoa sem gerar muitos efeitos colaterais. Por causa disso, este trabalho tem como objetivo descobrir se as moléculas Cu^{2+} -*phendione* e Ag^+ -*phendione* conseguem afetar as formas tripomastigotas ao mesmo tempo que não prejudiquem as células epiteliais LLC-MK₂. Com os testes realizados, descobrimos que ambos os compostos conseguem afetar o parasito, mesmo em pouquíssimas quantidades. Além disso, percebemos que os compostos eram pouco tóxicos para as células. Portanto, os compostos Cu^{2+} -*phendione* e Ag^+ -*phendione* são muito promissores para serem usadas no tratamento da doença, mas pesquisas mais aprofundadas são necessárias para termos certeza disso.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS – Absorbância
Ag⁺ – Íon de Prata
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BZN – Benznidazol
Ca²⁺ – Íon de Cálcio
Cu²⁺ – Íon de Cobre
CC₅₀ – Concentração Citotóxica para 50% da População Celular
CCC – Cardiomiopatia Chagásica Crônica
CDC – Centro de Controle de Doenças
DL₅₀ – Dose Letal para 50% da População de Tripomastigotas
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNDi – Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
DTN – Doenças Tropicais Negligenciadas
EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético
EUA – Estados Unidos da América
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
IC₅₀ – Concentração Inibitória para 50% da População Celular
IS – Índice de Seletividade
kDNA – DNA do cinetoplasto
MTT – Dimetiltiazoldifenil brometo tetrazólico
MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
MIC – Concentração Mínima Inibitória
Mn²⁺ - Íon de Manganês
NFX – Nifurtimox
OMS – Organização Mundial de Saúde
OPAS – Organização Panamericana de Saúde
PBS – Solução Tampão Fosfato
pH – Potencial Hidrogeniônico
Phen – 1,10-fenantrolina
SFB – Soro Fetal Bovino
TGI – Trato Gastrointestinal

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
RESUMO PARA LEIGOS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
ÍNDICE.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A biologia do <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.1.1. Definição, estrutura e morfologia do parasito.....	1
1.1.2. Ciclo biológico e interação parasito-hospedeiro.....	3
1.2. A doença de Chagas.....	5
1.2.1. Contexto epidemiológico e socioeconômico.....	5
1.2.2. Aspectos clínicos.....	8
1.2.3. Quimioterapia.....	10
1.3. Compostos de coordenação como metalofármacos.....	13
1.3.1. Compostos baseados em 1,10-fenantrolina e <i>phendione</i>	16
2. JUSTIFICATIVA.....	19
3. OBJETIVOS.....	20
4. METODOLOGIA.....	21
4.1. Parasitos.....	21
4.2. Compostos de coordenação.....	21
4.3. Manutenção da cultura de células animais.....	21
4.4. Obtenção dos tripomastigotas de cultura celular.....	22
4.5. Ensaio de citotoxicidade em células animais.....	22
4.6. Teste de viabilidade dos tripomastigotas frente aos compostos.....	23
4.7. Cálculo do Índice de Seletividade (IS).....	23
4.8. Análises Estatísticas.....	24
5. RESULTADOS.....	25
5.1. Efeito dos compostos sobre a viabilidade dos tripomastigotas.....	25
5.2. Efeito citotóxico dos compostos em células animais LLC-MK ₂	26
5.3. Cálculo do Índice de Seletividade.....	30
6. DISCUSSÃO.....	31
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	40
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

1.1: A Biologia do *Trypanosoma cruzi*.

1.1.1: Definição, estrutura e morfologia do parasito

O *Trypanosoma cruzi* é um importante protozoário hemoflagelado do grupo dos tripanosomatídeos que são taxonomicamente alocados com base em sua morfologia, ciclo de vida e ultraestrutura, representando um extenso grupo de protistas flagelados. Sua relevância se dá por ser o agente etiológico da doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase Americana, uma parasitose de grande impacto na saúde pública e no contexto socioeconômico da América Latina (Longo e Bern, 2015; Mosqueira *et al.*, 2021). O *T. cruzi* é um parasito intracelular do supergrupo Excavata, filo Sarcomastigophora (subfilo Mastigophora, que representa os flagelados. *Mastigo/flagellum* = chicote, em latim), classe Kinetoplastea, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae (que constitui o grupo dos tripanossomatídeos), possuindo assim forte relação filogenética com outros parasitos de gêneros relevantes como *Leishmania* spp. e *Phytomonas* spp. (Adl *et al.*, 2005; Siqueira, 2006; Maslov *et al.*, 2013; Mosqueira *et al.*, 2021).

O parasito apresenta 3 formas biológicas bem distintas baseadas no seu formato celular, a posição em que o cinetoplasto está em relação ao próprio núcleo e ao flagelo. Estas formas são encontradas em diferentes estágios do seu ciclo de vida e possuem diferentes funções (Tyler e Engman, 2001; Lana e Tafuri, 2006). As formas conhecidas do *T. cruzi*, baseadas nestes critérios, são tripomastigota, epimastigota e amastigota (**Figura 1**). O tripomastigota é a forma flagelada do parasito existente no hospedeiro vertebrado, forma esta que possui grande potencial infectivo, porém incapaz de se replicar e com o cinetoplasto encontrado na extremidade posterior e afastado do núcleo e do flagelo proeminente. Já epimastigota é a forma flagelada presente no trato intestinal do inseto vetor hematófago e capaz de se replicar, cujo cinetoplasto se apresenta anteriormente ao núcleo, se colocando entre este e o flagelo do parasito. E o amastigota é a forma que se apresenta na fase intracelular do parasito, dentro do hospedeiro vertebrado, sendo esta arredondada e com o flagelo invaginado na bolsa flagelar, não visível em microscopia óptica (de Souza, 1984; Tyler e Engman, 2001; Lana e Tafuri, 2006).

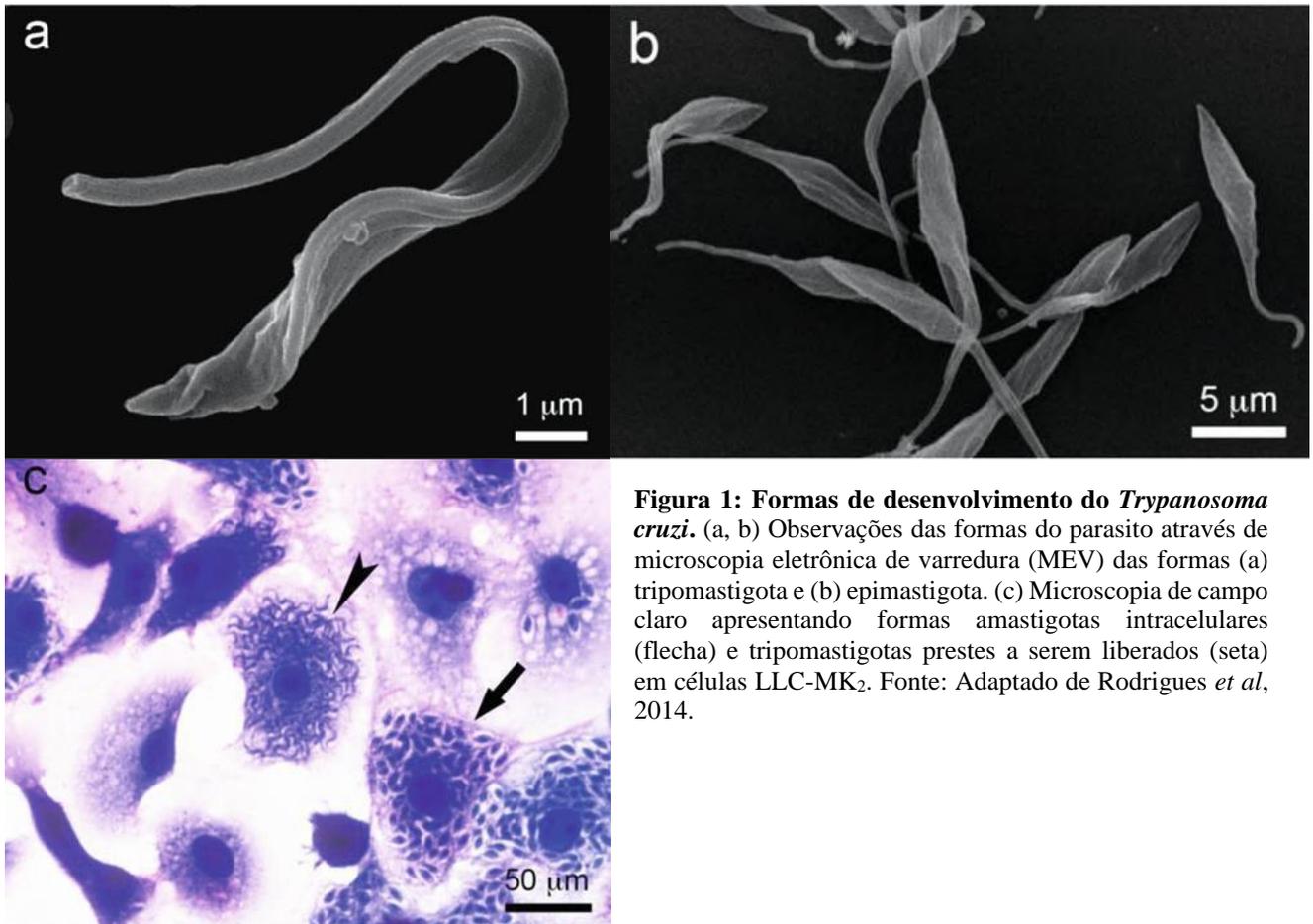


Figura 1: Formas de desenvolvimento do *Trypanosoma cruzi*. (a, b) Observações das formas do parasito através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das formas (a) tripomastigota e (b) epimastigota. (c) Microscopia de campo claro apresentando formas amastigotas intracelulares (flecha) e tripomastigotas prestes a serem liberados (seta) em células LLC-MK₂. Fonte: Adaptado de Rodrigues *et al.*, 2014.

O *T. cruzi*, diferente de outros eucariotos, possui uma única mitocôndria que se prolonga para várias regiões do corpo celular visível apenas em microscopia eletrônica de transmissão (MET). Entretanto, o parasito possui apenas um único centro elétron-denso, o qual é visível em microscopia de campo claro, conhecido como cinetoplasto. É nesta região elétron-densa que se concentra o kDNA mitocondrial (que representa 30% do genoma celular) responsável pela fosforilação oxidativa, diversas vias metabólicas, morte celular programada, entre outras atividades (Rodrigues, Godinho e Souza, 2014; de Souza *et al.*, 2017).

Também é relevante comentar outra estrutura essencial para a motilidade do protozoário, o flagelo. A estrutura flagelar é composta pela formação de axonemas microtubulares posicionados perpendicularmente ao cinetoplasto pelo seu eixo (de Souza, 2002; Rodrigues, Godinho e Souza, 2014). A estabilidade e ondulação do flagelo único é permitida pelas hastes paraflagelares, que por sua vez exercem suas funções a partir da sinalização de Ca²⁺ intracelular regulada (Portman e Gull, 2010; Rodrigues, Godinho e Souza, 2014). O flagelo é embolsado por uma membrana flagelar cuja disposição varia nas diferentes

formas do parasito, gerando no tripomastigota o que chamamos de membrana ondulante (de Souza *et al.*, 2017). Algumas das estruturas que compõem o flagelo são praticamente exclusivas dos tripanossomatídeos e desempenham importantes funções na fisiologia e ciclo biológico do *T. cruzi* (de Souza, 2002; Portman e Gull, 2010; Rodrigues, Godinho e Souza, 2014; de Souza *et al.*, 2017).

1.1.2: Ciclo biológico e interação parasito-hospedeiro

O *T. cruzi* é um parasito cujo ciclo biológico é heteroxênico e com reprodução assexuada, assim como ocorre em outros gêneros dos Trypanosomatidae (Lana e Tafuri, 2006; Lidani *et al.*, 2019). Isto significa que o parasito possui a capacidade de transitar e se multiplicar em diferentes hospedeiros durante o seu ciclo, um hospedeiro vertebrado (diversas espécies de mamíferos, incluindo o homem) e um hospedeiro invertebrado (inseto vetor hematofágico, seu transmissor natural) (Tyler e Engman, 2001; Lana e Tafuri, 2006; Lidani *et al.*, 2019). O *T. cruzi* é capaz de infectar centenas de espécies de hospedeiros invertebrados triatomíneos (família Reduviidae, insetos hemípteros), sendo mais de 60 destas espécies parte da fauna brasileira (Zingales, 2018; Lidani *et al.*, 2019; Abreu *et al.*, 2021). Algumas das espécies de triatomíneos em destaque são dos gêneros *Triatoma* spp. (*T. infestans* sendo a espécie mais representativa do gênero), *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* devido a sua importância epidemiológica (Zingales, 2018; Lidani *et al.*, 2019; Abreu *et al.*, 2021). Ainda assim, o ciclo silvestre envolvendo outras espécies de triatomíneos e diversos hospedeiros reservatórios também são bastante relevantes por alimentarem os ciclos domésticos e perpetuarem a circulação do parasito (Lana e Tafuri, 2006; Zingales, 2018; Lidani *et al.*, 2019; Abreu *et al.*, 2021).

O ciclo se inicia através da hematofagia obrigatória do inseto vetor, onde estes precisam realizar o repasto sanguíneo em um possível hospedeiro infectado para a postura de ovos e desenvolvimento. Este é um hábito marcante nos triatomíneos e fundamental para perpetuar a circulação do parasito (Garcia e Azambuja, 1991; Lana e Tafuri, 2004; Catalá *et al.*, 2017). Uma vez ocorrendo o repasto, o inseto irá realizar a sucção de uma população de parasitos presentes na circulação periférica que irá alcançar o intestino médio, onde irão se diferenciar em epimastigotas e se replicar (Garcia e Azambuja, 1991; Lana e Tafuri, 2004; Rodrigues, Godinho e Souza, 2014). Estes epimastigotas irão migrar para a ampola retal e sofrerão mudanças morfológicas e metabólicas no processo até se tornarem tripomastigotas metacíclicos altamente

infectivos (Garcia e Azambuja, 1991; Lana e Tafuri, 2004; Rodrigues, Godinho e Souza, 2014). Uma vez ocorrendo novo repasto, o parasito irá defecar conforme se alimenta e liberar os parasitos que entrarão em contato com lesão na pele ou mucosa. Assim, os parasitos alcançarão células susceptíveis e serão capazes de infectar o novo hospedeiro (Garcia e Azambuja, 1991; Lana e Tafuri, 2004; Rodrigues, Godinho e Souza, 2014; Mosqueira *et al.*, 2021).

Uma vez estando o tripomastigota metacíclico dentro do hospedeiro, este será altamente capaz de invadir células presentes na região de inoculação como fibroblastos, células epiteliais e macrófagos teciduais (Tyler e Engman, 2001; Rodrigues, Godinho e Souza, 2014). Como o *T. cruzi* é um parasito intracelular obrigatório, ele irá penetrar as células do hospedeiro, será internalizado dentro do vacúolo parasitóforo e irá escapar, ganhando o citoplasma celular. Nesta etapa, o parasito irá se diferenciar em formas amastigotas intracelulares e irá se proliferar intensamente na célula (Lana e Machado, 2014; Rodrigues, Godinho e Souza, 2014). Quando os amastigotas alcançam uma alta densidade populacional, iniciam sua diferenciação em tripomastigotas sanguíneos e a célula irá se romper, liberando-os no interstício. Os parasitos liberados poderão então se disseminar por via hematogênica e alcançar outros sítios aos quais possuam maior tropismo tecidual (embora possam infectar praticamente qualquer célula nucleada) e poderão então recomeçar o ciclo replicativo (**Figura 2**) (Lana e Tafuri, 2004; Lana e Machado, 2014; Rodrigues, Godinho e Souza, 2014). Por fim, quando um novo hospedeiro invertebrado realizar sua hematofagia no hospedeiro infectado, este realizará a sucção da população de parasitos no sangue e o ciclo biológico do *T. cruzi* terá continuidade (Tyler e Engman, 2001; Lana e Tafuri, 2004; Lana e Machado, 2014).

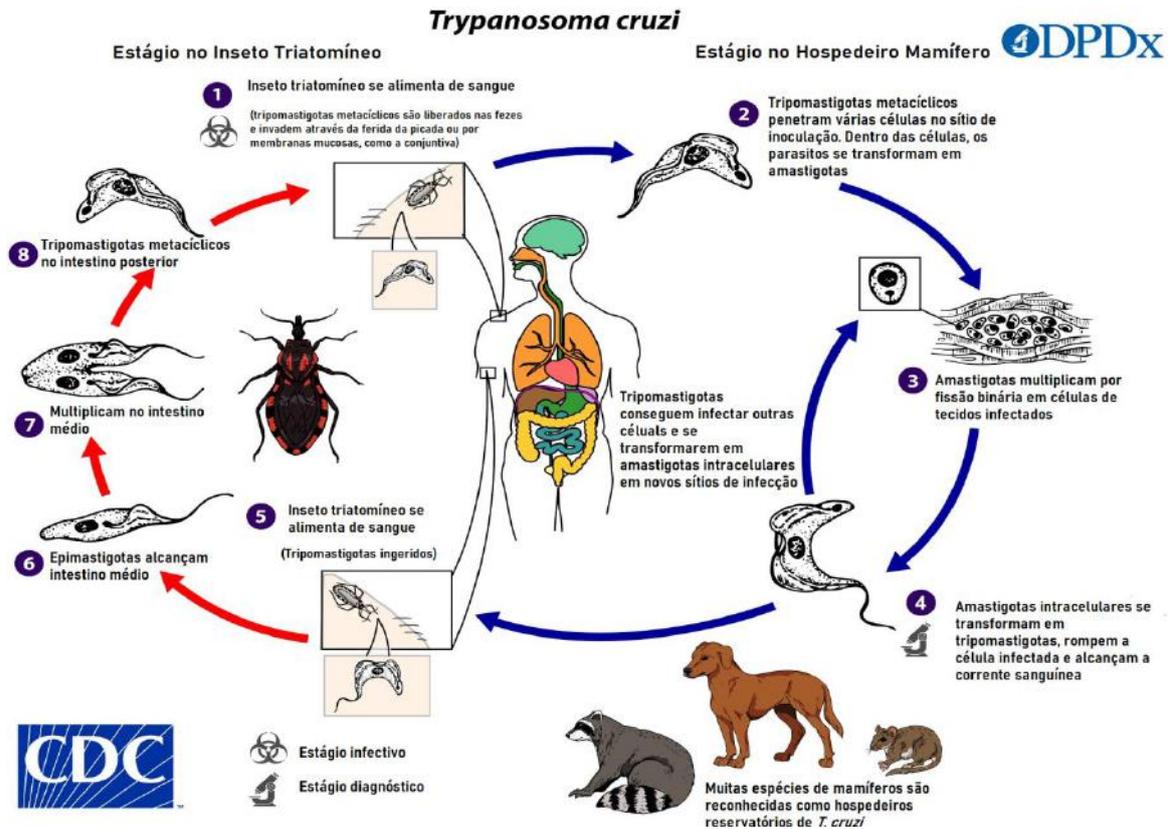


Figura 2: Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*. O ciclo elucida as suas diversas etapas, tanto no hospedeiro invertebrado (inseto vetor) quanto no hospedeiro vertebrado (mamíferos). Fonte: CDC, 2021.

1.2: A doença de Chagas

1.2.1: Contexto epidemiológico e socioeconômico

O *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, foi descoberto no início do século XX pelo infectologista e pesquisador brasileiro Carlos Chagas em viagens pelo interior do Brasil. Ainda assim, mais de um século depois da primeira observação do *T. cruzi*, a doença de Chagas continua sendo um grave problema de saúde pública internacional (Chagas, 1909; Lidani *et al.*, 2019). De acordo com a OMS (Organização Mundial da Saúde), atualmente existem entre 7 e 10 milhões de pessoas no mundo infectadas pela doença de Chagas em todo o mundo, sendo o principal foco na América do Sul e em algumas outras regiões do continente americano. Contudo, pelos problemas socioeconômicos da doença, estes números são imprecisos e provavelmente subestimados (WHO, 2010; WHO, 2015; Dias e Schofield, 2017; Sangenito, Branquinha e Santos, 2020). Devido a dinâmica epidemiológica e o modo de vida precário observado nas áreas rurais da América Latina, a doença se mantém fortemente

endêmica nestas regiões. Cerca de 21 países são considerados endêmicos para a Tripanossomíase Americana devido à manutenção local do parasito (transmissão vetorial alimentada pelo ciclo silvático), como Argentina, Colômbia, Bolívia e Brasil (**Figura 3**) (WHO, 2010; WHO 2015; Dias e Schofield, 2017; Lidani *et al.*, 2019).

Segundo dados divulgados pela OPAS (Organização Pan-Americana de Saúde), aproximadamente 14.000 mortes ocorrem anualmente pela doença de Chagas, onde em torno de 4.500 destas mortes anuais ocorrem apenas no Brasil. Ainda de acordo com a OPAS, estima-se que a incidência anual seja de 30.000 novas infecções nas regiões endêmicas e que aproximadamente 70-90 milhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção (WHO, 2010; WHO, 2015; Lidani *et al.*, 2019; Sangenito, Branquinha e Santos, 2020; PAHO, 2022). Considerando morbidade e mortalidade, a doença gera altos custos para os países aos quais afeta, sendo estes custos totais calculados em torno de USD 7,2 bilhões/ano no mundo inteiro (aproximadamente USD 1,5 bilhão apenas no Brasil) (Dias e Schofield, 2017; Lidani *et al.*, 2017; Sangenito, Branquinha e Santos, 2020). Tais dados configuram a doença de Chagas como uma das mais importantes doenças parasitárias do continente americano, gerando grande impacto na saúde pública e no contexto socioeconômico de toda a região (WHO, 2010; WHO, 2015; Dias e Schofield, 2017; Lidani *et al.*, 2019; Sangenito, Branquinha e Santos, 2020).

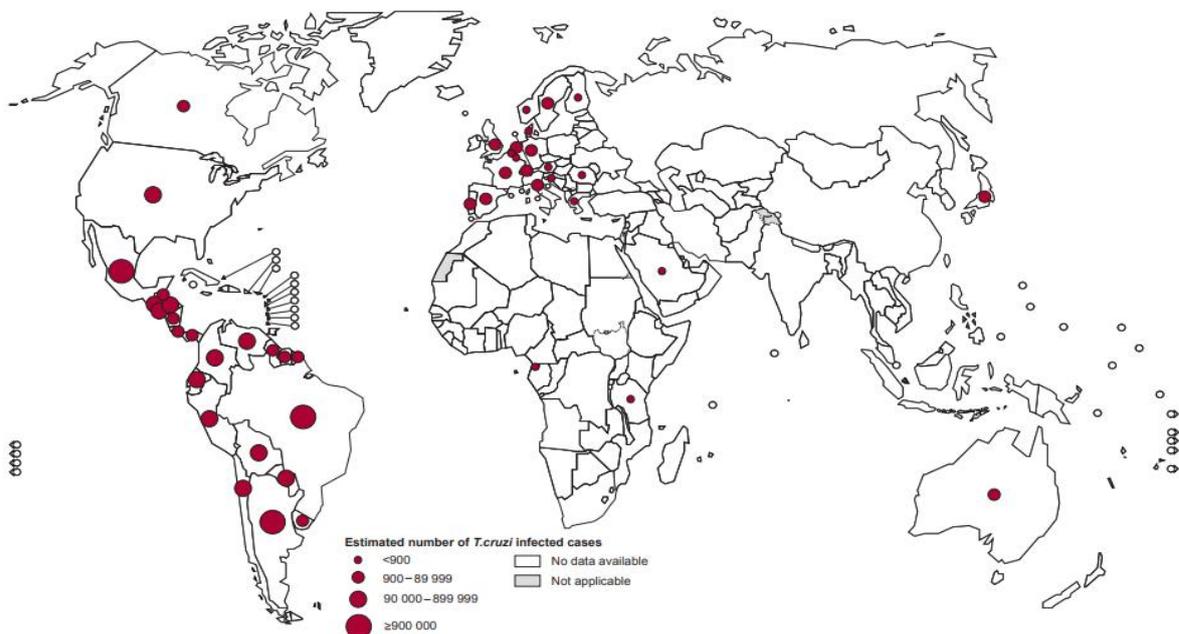


Figura 3: Distribuição mundial dos casos de infecção por *Trypanosoma cruzi*. Distribuição de acordo com dados de 2018, onde apesar da maioria dos casos se concentrarem na América Latina, existem numerosos relatos de casos nos EUA, Europa, Austrália e Japão. Fonte: WHO, 2018.

A doença de Chagas está entre as 20 Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) destacadas pela OMS, assim como leishmaniose, dengue e hanseníase. As DTNs fazem parte de um abrangente grupo comum a países tropicais/subtropicais que é historicamente negligenciado pela indústria farmacêutica e pelas autoridades governamentais (Dias e Dessoay; 2013; Mackey *et al.*, 2014; Sengenito, Branquinha e Santos, 2020). Não diferente das demais DTNs, a doença de Chagas afeta principalmente a população mais pobre, em condições sanitárias mais precárias e acesso limitado a programas de saúde, ocasionando na escassez de investimentos e políticas destinados para a doença de Chagas (Mackey *et al.*, 2014; Dias e Schofield, 2017; Sengenito, Branquinha e Santos, 2020). Ao compararmos os investimentos nas doenças negligenciadas, percebe-se que enquanto a tríade malária, tuberculose e HIV receberam cerca de USD 25 bilhões em 10 anos (cerca de 71% do total destinado para DTNs), a doença de Chagas recebeu apenas USD 236 milhões (correspondente a 0,67% do investimento total), o que reforça o estigma quanto à enfermidade (Sengenito, Branquinha e Santos, 2020).

Com o decorrer dos esforços para controlar a enfermidade, a doença de Chagas mudou sua epidemiologia consideravelmente. Inicialmente a doença era restrita a áreas rurais e carentes dos países endêmicos, mas o fluxo migratório de pessoas para as grandes cidades fez com que a doença gradativamente se estabelecesse nos centros urbanos (Dias, 2000; Dias e Schofield, 2017; Lidani *et al.*, 2019). Da mesma forma, milhões de pessoas migraram das regiões endêmicas para países da América do Norte, Europa e Ásia como resultado da globalização também vista nas últimas décadas (**Figura 3**). Apenas nos EUA, um dos países não-endêmicos mais afetados, estima-se que cerca de 300.000 residentes imigrantes das regiões endêmicas estejam infectados, com maior prevalência na Califórnia (70 mil casos) (Dias, 2000; Manne-Goehler *et al.*, 2016; Dias e Schofield, 2017; Lidani *et al.*, 2019). Estes novos dados fizeram com que a doença de Chagas se tornasse um problema de saúde global e com implicações em diversos continentes (Dias, 2000; WHO, 2010; WHO, 2015; Manne-Goehler *et al.*, 2016; Lidani *et al.*, 2019).

Apesar da transmissão vetorial ser a principal forma nos países endêmicos (80% dos casos), existem outras formas relevantes. Casos associados à transmissão oral têm insurgido no Brasil, onde o parasito é adquirido através do consumo de alimentos contaminados, sendo associados a casos em que a fase aguda é mais severa (Prata, 2001; Andrade, Gollob e Dutra, 2014; Rassi Jr. *et al.*, 2015). Em locais com o sistema de saúde precário ou despreparados para diagnóstico, também são relatados casos de infecções congênitas. A infecção congênita é uma importante forma de transmissão fora das áreas endêmicas devido à dificuldade de diagnóstico,

cujo risco é de 4,7% (apesar de o risco ser maior em áreas endêmicas) (Longo e Bern, 2015; Rassi Jr *et al.*, 2015; Manne-Goehler *et al.*, 2016). Contudo, a transmissão mais frequente fora das regiões endêmicas é através de transfusão de sangue/doação de órgãos (10% dos casos relatados). Apesar de já ser relatada há muitos anos tal transmissão nos países endêmicos, a detecção sorológica do parasito conseguiu restringi-la (Prata, 2001; Rassi Jr. *et al.*, 2015; Moncayo e Silveira, 2017; Lidani *et al.*, 2019). Em contraponto, o parasito geralmente se mantém indetectado em regiões não endêmicas, tornando esta transmissão bem frequente fora da América Latina. Acredita-se que o risco de contrair o *T. cruzi* de bolsas de sangue contaminadas nestes países seja de 20% (Prata, 2001; Longo e Bern, 2015; Rassi Jr. *et al.*, 2015; Lidani *et al.*, 2019).

1.2.2: Aspectos clínicos

A doença de Chagas é uma patologia cujo desenvolvimento é bastante variável a depender de uma série de fatores como, a carga parasitária, a condição imunológica do hospedeiro infectado, o tropismo, dentre outros (Andrade *et al.*, 2010; Rassi Jr *et al.*, 2015, Dias *et al.*, 2017). A partir do período de incubação (1-2 semanas), ocorre uma alta parasitemia na circulação e se inicia a fase aguda. Na grande maioria dos casos, esta fase ocorre de forma assintomática. Este fato dificulta o diagnóstico precoce da doença por geralmente passar despercebida. Entretanto, quando esta fase é sintomática, os sintomas envolvem: febre, linfadenite, mal-estar, entre outros (Prata, 2001; Andrade, Gollob e Dutra, 2014; Rassi Jr *et al.*, 2015). Alguns sintomas estão envolvidos com a via de transmissão, onde infectados por transmissão vetorial podem apresentar edema subcutâneo na região da inoculação (chagoma) ou nas pálpebras (sinal de Romana) quando a inoculação ocorre na conjuntiva (Prata, 2001; Rassi Jr *et al.*, 2015). Em casos mais severos (cerca de 1% dos casos), que ocorrem em imunossuprimidos ou infectados por via oral, podem surgir quadros de miocardite aguda, meningoencefalite e óbito (Andrade, Gollob e Dutra, 2014; Longo e Bern, 2015; Rassi Jr *et al.* 2015).

Contudo, cerca de 90% dos casos acabam em resolução espontânea dos sintomas e a parasitemia entra em queda cerca de 4-8 semanas pós-infecção (Lidani *et al.*, 2019). Já a fase crônica se caracteriza por uma baixa parasitemia, de forma que a infecção se manterá latente e assintomática por 10-30 anos antes de se manifestar novamente e podendo se manter indetectada por toda a vida (forma indeterminada - 70-80% dos casos) (Prata, 2001; Longo e

Bern, 2015). Contudo, após este tempo, 20-30% dos casos evoluem para uma das formas sintomáticas, sendo as principais as formas: cardíaca (65%); digestiva (35%); e mista (5%) (Rassi Jr *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2021). Em casos mais raros, principalmente em situações de imunocomprometimento, é possível que se desenvolva a forma neurológica da doença, mais danosa e fatal. Acredita-se que a variedade de formas clínicas se dá por diferentes aspectos como tropismo das cepas, dano tecidual e a imunocompetência do infectado (Andrade *et al.*, 2010; Longo e Bern, 2015; Rassi Jr *et al.*, 2015; Libisch *et al.*, 2021).

Dentre as formas clínicas mais comuns, a forma cardíaca é com certeza a mais impactante e lesiva para o paciente infectado devido ao seu dano, incidência, consequências e morbidade. O quadro clínico, chamado de Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC), se caracteriza por uma cardiomiopatia inflamatória progressiva intensa causada por danos ao tecido cardíaco, levando a forte desequilíbrio nas funções cardíacas e no sistema circulatório e isquemia devido à fibrose do miocárdio (Prata, 2001; Punukollu *et al.*, 2007; Rassi Jr *et al.*, 2015; Lidani *et al.*, 2019). Tal progressão leva a manifestações de tromboembolismo, arritmias, taquicardia e falhas congestivas, levando a graves efeitos como infartos, parada cardíaca e óbito em casos mais severos. Com isso, considera-se que a CCC é uma das maiores causas de mortalidade pela doença de Chagas (Prata, 2001; Punukollu *et al.*, 2007; Longo e Bern, 2015; Rassi Jr *et al.*, 2015; Dias *et al.*, 2017).

Por sua vez, a forma digestiva da doença de Chagas é o segundo quadro clínico mais comum entre os sintomáticos. Neste quadro, observa-se danos ao esôfago, cólon, duodeno, entre outros, e leva a sérios problemas digestivos que podem variar conforme a gravidade do dano, como motilidade, secreção e absorção do trato gastrointestinal (TGI) (Prata, 2001; Matsuda *et al.*, 2009; Longo e Bern, 2015). Geralmente, o dano das lesões que surgem pode acarretar desordens no trânsito do TGI, acalasia e síndromes de hiperplasia do esôfago (megaesôfago) e do cólon intestinal (megacólon). Tais síndromes acarretam disfagia, distúrbios alimentares, dor abdominal, desnutrição, úlceras, constipação, entre outras manifestações no TGI (Prata, 2001; Matsuda *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2021; Rassi Jr *et al.*, 2015). As formas cardíaca e digestiva podem ocorrer independentemente uma da outra, assim como podem ocorrer ao mesmo tempo no paciente, gerando a forma cardiodigestiva ou mista da doença. Todas as formas reduzem drasticamente a qualidade de vida do paciente e sua expectativa de vida (Prata, 2001; Matsuda *et al.*, 2009; Longo e Bern, 2015; Rassi Jr *et al.*, 2015; Lidani *et al.*, 2019).

1.2.3: Quimioterapia

Desde os anos 70, uma série de compostos foram testados como possíveis fármacos para tratamento da doença de Chagas, principalmente os nitrofuranos e derivados. A partir de numerosos estudos de triagem para selecionar os melhores compostos, foram enfim aprovados dois para uso clínico: Benznidazol (BZN) e Nifurtimox (NFX), até hoje os únicos disponíveis na quimioterapia contra o *T. cruzi* (**Figura 4**). Ambos demonstraram alta eficácia na fase aguda em modelos experimentais e se tornaram, respectivamente, os fármacos de primeira e segunda linha no tratamento específico (Pinheiro *et al.*, 2017; Guedes *et al.*, 2011; Sangenito *et al.*, 2019). O BZN é um derivado de nitroimidazol (*N*-benzil-2-nitro-1-imidazol acetamida) inicialmente comercializado pela Roche em diversos países com os títulos de Rochagan® (Brasil) e Radanil®, mas atualmente é distribuído pelos sistemas de saúde em alguns países (Guedes *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 2017; Sangenito *et al.*, 2019). Seu tratamento discorre por 60 dias (doses de até 10 mg/kg, 2/3 vezes ao dia) sendo BZN o único tratamento para a doença de Chagas aprovada no Brasil pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (Guedes *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 2017). Já o NFX é um derivado de 5-nitrofurano comercializado pela Bayer em um número limitado de países como Lampit®, mas não é aprovado no Brasil por consequência das controvérsias acerca de sua eficácia e efeitos debilitantes (Cavalli *et al.*, 2009; Guedes *et al.*, 2011; Murcia *et al.*, 2012; Pinheiro *et al.*, 2017). Sua administração ocorre através de doses orais diárias de 8-10 mg/kg que aumentam conforme a idade (12-15 mg/kg em adolescentes, 15-20 mg/kg em crianças de 1 a 10 anos), 3 vezes ao dia durante 120 dias (Guedes *et al.*, 2011; Murcia *et al.*, 2012; Pinheiro *et al.*, 2017).

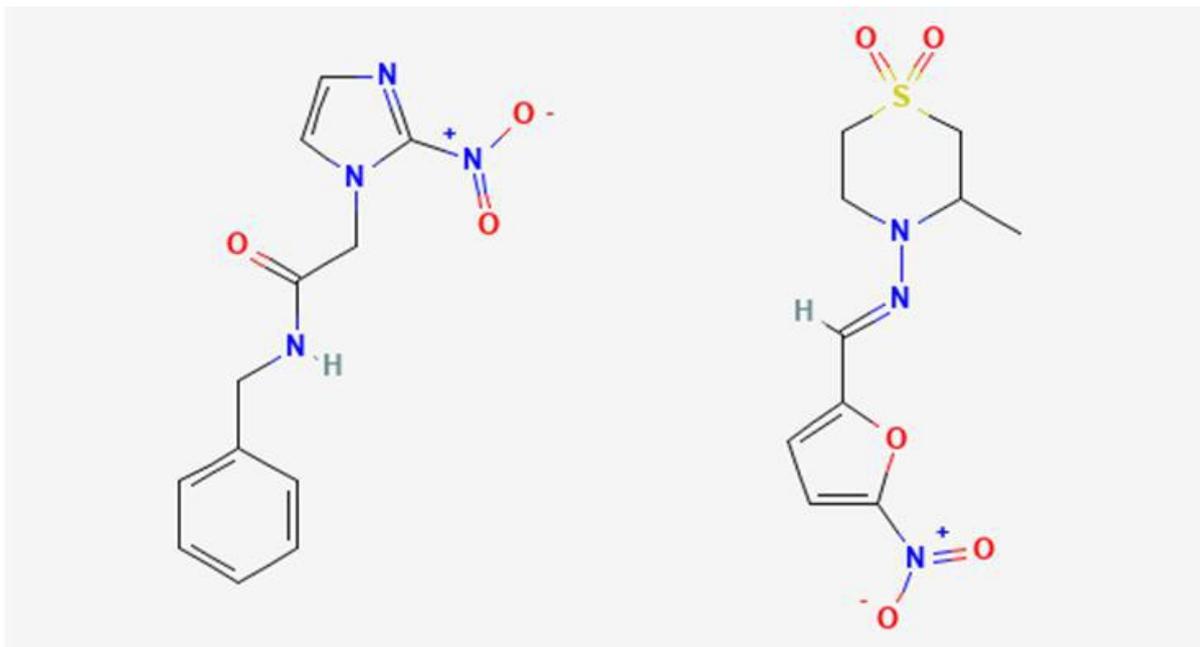


Figura 4: Fórmula estrutural dos fármacos utilizados na quimioterapia contra o *T. cruzi*. Benznidazol à esquerda, Nifurtimox à direita. Fonte: PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benznidazole>; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nifurtimox>).

Ambos os fármacos, principalmente o BZN, apresentam uma grande eficácia na fase aguda da doença em adultos. O BZN, por exemplo, chega a alcançar mais de 80% de eficácia no tratamento da fase aguda e reduz significativamente a severidade dos sintomas (Guedes *et al.*, 2011; Longo e Bern, 2015). Inclusive, pelo seu sucesso e por ser mais tolerado por crianças, recomenda-se o tratamento de casos agudos em crianças utilizando a formulação infantil do BZN recentemente desenvolvida (Viotti *et al.*, 2009; Longo e Bern, 2015; Sangenito *et al.* 2019). Contudo, o sucesso do tratamento é limitado apenas à fase aguda, já que a eficácia na fase crônica é muito questionável em decorrência dos casos clínicos relatados que demonstram eficácia menor que 20%. Este acaba sendo um grande agravante, uma vez que a maioria dos infectados se encontra na fase crônica e sequer descobre sua condição na fase aguda (Guedes *et al.*, 2011; Longo e Bern, 2015; Rassi Jr *et al.*, 2015). Adicionalmente, alguns estudos já demonstraram que pacientes tratados ou não com BZN ou NFX apresentam persistência do parasito e alterações no ECG semelhantes, demonstrando assim que os fármacos não apresentam efeitos protetores significativos na patogênese da CCC, a mais relevante dentre as manifestações (Guedes *et al.*, 2011; Longo e Bern, 2015). Estes e outros dados inconclusivos impedem a existência de um consenso se deve ou não ocorrer o tratamento específico na fase crônica (Dias, 2000; Cavalli e Bolognesi, 2009; Guedes *et al.*, 2011; Longo e Bern, 2015).

Um fator problemático também relevante a se comentar na quimioterapia contra a doença de Chagas, talvez até mais importante que o da eficácia, é o grande número de efeitos colaterais de ambos os fármacos. Uma vez surgindo em pacientes durante o tratamento e que já estejam na fase crônica, tais efeitos reduzem ainda mais a qualidade de vida dos pacientes e ocasionalmente são interrompidos devido à gravidade destes (até 40% dos tratamentos são descontinuados por efeitos tóxicos) (Guedes *et al.*, 2011; Longo e Bern, 2015; Rassi Jr *et al.*, 2015). No caso do BZN, os efeitos colaterais costumam ser focados em manifestações dermatológicas relativamente graves e hipersensibilidade (frequência de 30-50%), como dermatite alérgica esfoliativa. Contudo, também existem casos de neuropatias, e parestesia reversíveis (ambas as frequências de 0-30%) em fases mais tardias do tratamento, geralmente levando um longo tempo para serem revertidas totalmente (Viotti *et al.*, 2009; Longo e Bern, 2015; Rassi Jr *et al.*, 2015). Alguns outros efeitos secundários também podem acometer o paciente, como anorexia e perda de peso (frequência de 5-40%), náuseas, vômitos e quadros de depressão medular e de hepatite tóxica (mais raros, menos de 1% de frequência) (Viotti *et al.*, 2009; Longo e Bern, 2015; Rassi Jr *et al.*, 2015). Já no caso do NFX, os efeitos tóxicos giram em torno de impactos gastrointestinais (70% dos pacientes em tratamento apresentam estes impactos), que costumam envolver anorexia e perda de peso, dores abdominais, vômitos e náuseas. Em casos mais severos, costuma ocorrer polineuropatia, neuropatia periférica e convulsões (2-5% dos casos) (Murcia *et al.*, 2012; Longo e Bern, 2015). Em adição a estas condições, também existem relatos relativamente frequentes de cepas de *T. cruzi* que se demonstraram refratárias ao tratamento, apresentando principalmente resistência a BZN. Contudo, os possíveis mecanismos de resistência aos fármacos são inconclusivos até o momento e ainda estão sendo estudados (Campos *et al.*, 2014).

Em suma, apesar dos tratamentos tradicionais ainda serem de grande relevância clínica, são poucas as alternativas disponíveis. As que existem apresentam baixa eficácia na fase crônica da doença e muitos efeitos colaterais relevantes. Como resultado, a divergência de dados inconclusivos e todas as dificuldades que envolvem o tratamento dos pacientes, principalmente crônicos, impedem um consenso sobre a existência de um tratamento específico para tais pacientes com BZN e NFX (Cavalli e Bolognesi, 2009; Guedes *et al.*, 2011; Longo e Bern, 2015). Portanto, mesmo sendo uma enfermidade com mais de 100 anos de descoberta, a doença de Chagas ainda hoje possui métodos de tratamento insatisfatórios e inadequados para o seu contexto clínico e epidemiológico, realçando ainda mais seu *status* como doença negligenciada (Longo e Bern, 2015; Lidani *et al.*, 2019). Portanto, a pesquisa por novos quimioterápicos para

tratamento da doença de Chagas é essencial para se alcançarem perspectivas promissoras acerca do contexto da patologia, sejam novas moléculas ou fármacos reposicionados, combinados ou não com os quimioterápicos tradicionais (Cavalli e Bolognesi, 2009; Viotti *et al.*, 2009; Guedes *et al.*, 2011; Murcia *et al.*, 2012; Campos *et al.*, 2014; Longo e Bern, 2015).

1.3: Compostos de coordenação como metalofármacos

Os complexos metálicos são compostos químicos formados por ligantes, orgânicos ou inorgânicos, ligados covalentemente a um íon metálico central, os quais também são chamados de compostos de coordenação. A depender das suas ligações covalentes dativas, os compostos de coordenação podem ser monodentados, quando apenas um átomo do ligante é capaz de se associar ao metal, enquanto os ligantes capazes de fazer duas ou mais ligações com o íon metálico são chamados de bidentados ou polidentados. Entretanto, os compostos polidentados apresentam maior estabilidade para o complexo por terem efeito quelato, ou seja, os compostos polidentados são agentes quelantes mais eficientes devido ao seu número de coordenação maior (número máximo de ligações que o ligante pode fazer com o íon metálico). Uma vez que os íons metálicos geralmente possuem alta afinidade por elétrons, eles atuam como ácido de Lewis na ligação enquanto seus ligantes atuam como bases de Lewis doando elétrons, resultando na alta polarização das moléculas coordenadas aos íons. A polarização destas moléculas as torna potencialmente reativas. Porém, a atividade do composto de coordenação também pode residir no seu íon metálico, uma vez que o quelante não seja capaz de blindar completamente o íon central (complexo metálico aberto), este íon é capaz de interagir com alguma biomolécula e, em alguns casos, consegue aumentar a interação que o íon metálico já realizava em seu estado livre. Portanto, a capacidade de interação dos complexos metálicos, principalmente a interação com biomoléculas, reside tanto no metal associado quanto no ligante dependendo do composto em questão (Haas e Franz, 2009; Flora e Pachauri, 2010).

Os complexos metálicos são amplamente presentes na clínica e atuam em diversas áreas médicas, sendo o quelante e o íon utilizados unidos ou separadamente. Como resultado, existem inúmeras classes de fármacos que são quelantes ou complexos metálicos em uso clínico atualmente e cada vez mais emergem novas formas de aplicação. Uma das principais aplicações metalofarmacológicas reside no uso de agentes quelantes (geralmente anéis heterocíclicos) que alteram a biodisponibilidade de íons metálicos nos diferentes tecidos, uma vez que diversos íons metálicos possuem um papel essencial em processos fisiológicos e patológicos (Williams

e Haldtead, 1982; Benite, Machado e Barreiro, 2007; Flora e Pachauri, 2010). Apesar de alguns metais terem tamanha importância, em grandes quantidades alguns íons possuem alta capacidade citotóxica e podem gerar forte intoxicação, principalmente metais pesados (chumbo, cádmio e mercúrio) e metais essenciais em altas concentrações (cromo, cobre, ferro, cobalto) (Benite, Machado e Barreiro, 2007; Haas e Franz, 2009; Flora e Pachauri, 2010; Sears, 2013). Nestes contextos, quelantes seletivos são utilizados para neutralizar o excesso de íons biodisponíveis e assim bloquear os efeitos onerosos, incorporando o íon metálico ao anel heterocíclico e eliminando-o na urina. Alguns exemplos de quelantes utilizados, tanto na clínica quanto na pesquisa, são os derivados de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) (**Figura 5**), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), cuprizona e fenantrolina (Benite, Machado e Barreiro, 2007; Haas e Franz, 2009; Flora e Pachauri, 2010; Sears, 2013). Por outro lado, os íons metálicos livres também são amplamente administrados na suplementação alimentar em quadros de deficiência dos mesmos, como na anemia ferropriva (Killip *et al.*, 2007). Sendo assim, fica clara a grande relevância que tanto os íons metálicos quanto os ligantes possuem (Williams e Haldtead, 1982; Benite, Machado e Barreiro, 2007; Haas e Franz, 2009; Flora e Pachauri, 2010). Apesar disso, os próprios complexos metálicos por si só possuem inúmeras propriedades relevantes que os fazem ser utilizados há décadas na clínica, como capacidade anti-inflamatória, anticâncer e antioxidante (Sadler e Guo, 1998; Haas e Franz, 2009). Uma aplicação muito explorada nas últimas décadas foi o uso de complexos de platina para tratamento contra o câncer e são atualmente os fármacos mais utilizados neste tipo de tratamento, principalmente o complexo cisplatina $[PtCl_2(NH_3)_2]$ e seus derivados, cujo função reside no seu efeito anticâncer (Sadler e Guo, 1998; Haas e Franz, 2009). Também se utiliza com sucesso alguns outros complexos na clínica, como Au(I)-tiolatos (tratamento da artrite reumatóide) (Sadler *et al.*, 1998). De qualquer forma, é fato que a atividade biológica dos ligantes é fortemente potencializada quando complexados a íons metálicos (Sadler e Guo, 1998; Haas e Franz, 2009; Rocha *et al.*, 2011; Viganor *et al.*, 2017).

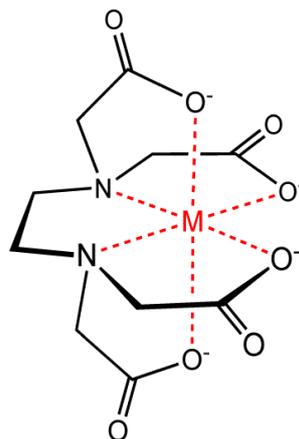


Figura 5: Fórmula estrutural do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ligado a um íon central. No esquema, é possível notar os átomos de nitrogênio e oxigênio atuando como bases de Lewis doando elétrons para o íon metálico central, causando então o dobramento da estrutura para formar um anel. Fonte: Jesús *et al.*, 2011.

Acerca dos complexos metálicos, uma das aplicações farmacológicas de maior evidência atualmente se dá pela ação antimicrobiana. Apesar de o potencial antimicrobiano ser conhecido há décadas, somente nos últimos anos o seu uso clínico vem sendo explorado de forma ampla, principalmente no contexto atual da emergente resistência a antimicrobianos (Sadler e Guo, 1998; Haas e Franz, 2009; Rocha *et al.*, 2011; Brown e Hyland, 2015). Um exemplo clássico da ação antimicrobiana são os metalofármacos de bismuto, compostos utilizados no tratamento de úlceras gástricas por *Helicobacter pylori* por dificultarem a absorção de ferro pela *H. pylori*, afetando assim a viabilidade do microrganismo no TGI (Sadler e Guo, 1998). Os complexos metálicos podem afetar microrganismos através de diversos mecanismos. Sendo os mecanismos antimicrobianos relatados bastantes variados e alguns projetos de pesquisa com os compostos de coordenação envolvem a síntese de diversos novos ligantes baseados em alvos moleculares e redução da toxicidade (Haas e Franz, 2009; Brown e Hyland, 2015). Alguns dos mecanismos de ação podem levar à despolarização da membrana, inativação do DNA microbiano por ligação, bloqueio de canais transportadores, desregulação e eliminação de biofilmes, dentre outros (Sadler e Guo, 1998; Haas e Franz, 2009; Brown e Hyland, 2015; Viganor *et al.*, 2017).

Embora dados demonstrem efeitos promissores em variados patógenos como bactérias (*Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus spp.*, etc) e fungos (*Candida albicans*, *Candida haemulonii*), os metalofármacos estão emergindo como uma importante abordagem terapêutica entre as DTNs, principalmente contra protozoários (McCann *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2010; Tella e Obaleye, 2010; Gandra *et al.*, 2017; Reddy *et al.*,

2017; Viganor *et al.*, 2017; Rigo *et al.*, 2019; Ke *et al.*, 2020; Sangenito *et al.*, 2021). Estudos relatam efeitos deletérios dos complexos de rutênio, ciprofloxacina e levofloxacina contra *T. cruzi* e *Leishmania major* (Santos *et al.*, 2012), enquanto outros dados também demonstram que complexos de paládio e ferrocenos alcalóides também apresentam atividade contra espécies viscerais de *Leishmania* (Santos *et al.*, 2012). Há dados onde complexos de levofloxacina, esparfloxacina e norfloxacina possuem importante atividade anti-*T. cruzi* (Martins *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2016). Nosso grupo de pesquisa também já demonstrou os efeitos que alguns complexos de aminopiridil possuem sobre a fisiologia de parasitos como *Leishmania amazonensis* e *T. cruzi*, em trabalhos anteriores (Reddy *et al.*, 2017. Sangenito *et al.*, 2021). Em suma, a capacidade dos compostos de afetar patógenos relevantes e a facilidade em sintetizar tais complexos os tornam muito promissores para a terapia antimicrobiana, ainda mais no contexto das DTNs (Navarro *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2012; Brown e Hyland, 2015; Gandra *et al.*, 2017; Reddy *et al.*, 2017; Ke *et al.*, 2020; Sangenito *et al.*, 2021).

1.3.1. Compostos baseados em 1,10-fenantrolina e *phendione*

Uma grande quantidade de ligantes, principalmente heterocíclicos, foram sintetizados e coordenados a diversos íons metálicos no intuito de avaliar sua ação antimicrobiana. É possível citar como exemplo alguns compostos promissores, como complexos de sulfadimidina, aminopiridil, iminopiridil, naftalimida, biperidina, entre outros (Tella & Obaleye, 2010; Martins *et al.*, 2012; Reddy *et al.*, 2017; Ke *et al.*, 2020; Sangenito *et al.*, 2021). Dentre tantos ligantes e complexos, um importante destaque são os compostos formados a partir de 1,10-fenantrolina (*phen*) (**Figura 6**). Este complexo metálico é um importante quelante metálico heterocíclico bidentado com excelente potencial antimicrobiano, muito utilizado como inibidor de metalopeptidases e como estrutura inicial para síntese de novos ligantes e complexos. O ligante *phen* deriva de moléculas de fenantreno e possui átomos de nitrogênio substituindo o carbono nas interações com os íons metálicos (posições 1 e 10), o que demonstrou aumentar a ação antimicrobiana (Bencini e Lippolis, 2010; McCann *et al.*, 2012; Viganor *et al.*, 2017). Resultados da literatura demonstram que *phen* é capaz de inibir a proliferação de cepas de *T. cruzi* (Dm28c e Y) e afetar sua viabilidade (Santos *et al.*, 2012). Entretanto, apesar do ligante e seus derivados apresentarem atividade em seu estado livre, acredita-se que a complexação destes a íons metálicos já presentes nos organismos vivos seja a responsável pela ação observada (McCann *et al.*, 2004; McCann *et al.*, 2012). Inclusive,

trabalhos do nosso grupo de pesquisa demonstraram o amplo efeito que os compostos de 1,10-fenantrolina, associados aos íons de cobre (II), manganês (II) e prata (I), apresentam contra *Candida* spp. tanto nos estudos *in vitro* quanto *in vivo* (Gandra *et al.*, 2017; Gandra *et al.*, 2020). Portanto, os complexos de *phen*, apesar de ativos em suas formas livres, apresentam atividade biológica aumentada quando coordenados a íons e apresentam um potencial significativo como antimicrobianos por apresentarem um amplo espectro, agindo como antifúngicos, antibacterianos e antiprotozoários (McCann *et al.*, 2004; Bencini e Lippolis, 2010; McCann *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2012; Gandra *et al.*, 2017; Viganor *et al.*, 2017; Gandra *et al.*, 2020).

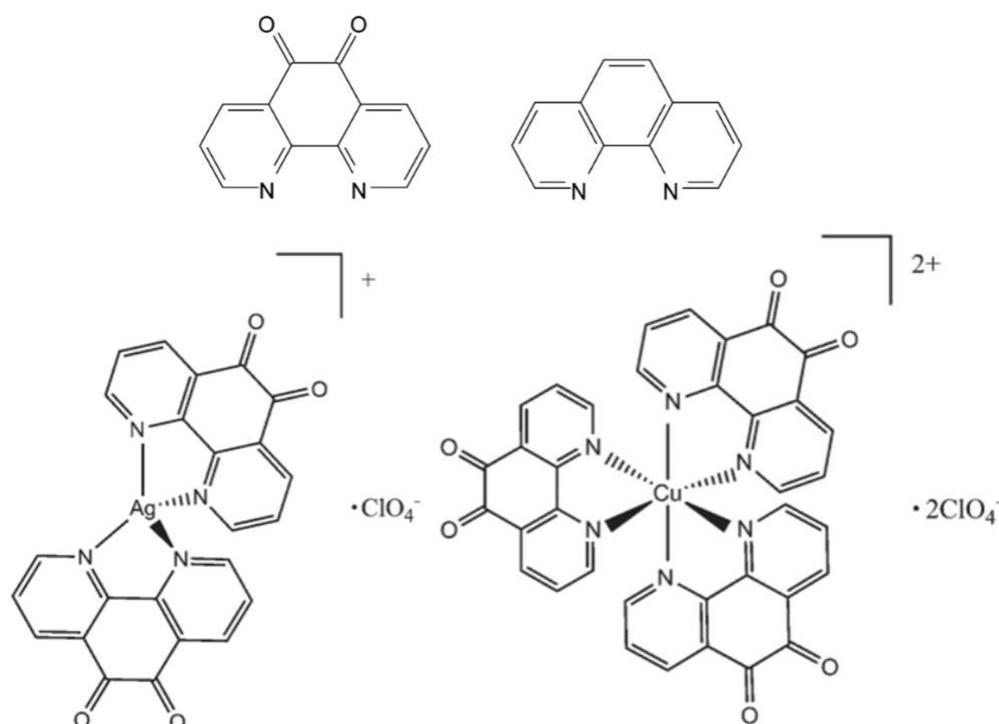


Figura 6: Fórmula estrutural de *phen*, *phendione*, Cu²⁺-*phendione* e Ag⁺-*phendione*. O ligante *phendione* (1,10-fenantrolina-5,6-diona) está representado à esquerda superior, enquanto *phen* está representado na direita superior. Os complexos metálicos estão representados, Cu²⁺-*phendione* à direita inferior e Ag⁺-*phendione* à esquerda inferior. Fonte: Adaptado de McCann *et al.*, 2012.

Levando em consideração o potencial do ligante *phen*, inúmeros derivados foram sintetizados, testados e associados a íons. Dentre os diversos ligantes, um dos maiores destaques foi 1,10-fenantrolina-5,6-quinona (*phenidone*) (**Figura 6**) (McCann *et al.*, 2004). O ligante *phendione* é um derivado heteroaromático que, diferente do ligante *phen*, apresenta dois grupamentos carbonila em seu anel central ligados aos carbonos 5 e 6. O ligante *phendione* apresenta atividade tanto na forma livre quanto complexadas a íons metálicos assim como a 1,10-fenantrolina. Contudo, estudos demonstram que os seus derivados quinônicos apresentam

maior eficácia contra diversos microrganismos, sendo o ligante *phendione* o mais eficaz dentre estes (McCann *et al.*, 2012). Por conseguinte, também foram sintetizados complexos metálicos utilizando o ligante *phendione* associados a íons, como por exemplo os compostos Ag^+ -*phendione* e Cu^{2+} -*phendione* (**Figura 6**). De acordo com dados do nosso grupo e de colaboradores, estes complexos também demonstram ação contra diversos microrganismos, ao mesmo tempo que se mostram bem tolerados por diversos modelos celulares e animais (McCann *et al.*, 2012). Viganor e colaboradores (2016) observaram que ambos os compostos foram deletérios para isolados suscetíveis e resistentes de *P. aeruginosa*, tanto em sua forma planctônica quanto em biofilme, em concentrações em torno de 5,9 $\mu\text{g/L}$ e 12,5 $\mu\text{g/L}$. Semelhantemente, em Granato *et al.* (2017) os compostos apresentaram atividade fungicida para a cepa FMC.2214 de *Phialophora verrucosa*, onde as concentrações mínimas inibitórias (MIC) de Ag^+ -*phendione* e Cu^{2+} -*phendione* eram, respectivamente, em torno de 4 μM e 5 μM . Porém, os resultados de maior destaque com os complexos de *phendione* se observam em protozoários. Na pesquisa de Rigo e colaboradores (2018) demonstraram o efeito de Cu^{2+} -*phendione* e Ag^+ -*phendione* em diferentes cepas e isolados de *Trichomonas vaginalis*, de forma que a média dos IC_{50} calculados foi de 0,87 μM e 2,84 μM , respectivamente. Ambos os compostos se mostraram mais ativos que o ligante *phendione* livre, cuja média dos IC_{50} foi 6,57 μM . Em Lima e colaboradores (2021), foi observado que os compostos Cu^{2+} -*phendione* e Ag^+ -*phendione* eram capazes de afetar consideravelmente a viabilidade de promastigotas de *L. braziliensis*, chegando a reduzir a população de parasitos em 75% e 68% respectivamente nas maiores concentrações testadas (10 $\mu\text{g/mL}$). Por sua vez, no trabalho de Santos (2019), onde os compostos foram testados em *L. amazonensis* e *Leishmania chagasi*. Neste trabalho, Ag^+ -*phendione* teve sua concentração inibitória para 50% da população de amastigotas (IC_{50}) determinada, onde o IC_{50} obtido foi de 0,0078 μM para *L. amazonensis* e de 0,024 μM para *L. chagasi*. Em Cu^{2+} -*phendione*, observou-se um IC_{50} de 0,00785 μM para *L. amazonensis* e de 0,020 μM para *L. chagasi* (Santos, 2019).

Considerando todas estas informações, os compostos de coordenação aqui abordados se apresentam como promissores metalofármacos por apresentarem efeito antimicrobiano de amplo espectro de forma segura, principalmente levando em consideração a falta de fármacos bioativos contra alguns dos microrganismos aqui citados. Por fim, considerando o grande valor dos compostos de Ag^+ -*phendione* e Cu^{2+} -*phendione* decorrentes das características apontadas, sua aplicabilidade clínica deve ser averiguada de forma mais aprofundada, principalmente como potenciais fármacos contra as DTNs, principalmente as causadas por protozoários.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar dos esforços de inúmeros pesquisadores e agentes de saúde, a doença de Chagas continua sendo uma das principais doenças tropicais negligenciadas existentes e representa um grave problema de saúde internacional, principalmente para populações mais pobres e vulneráveis da América Latina (Lidani *et al.*, 2019). Com os mais de 7 milhões de infectados por *T. cruzi* registrados e aproximadamente 14.000 mortes anuais, os impactos na saúde pública e na economia dos países afetados se expande cada vez mais, principalmente pela sua morbidade e mortalidade consideráveis (PAHO, 2022). As opções de tratamento são escassas, pouco eficientes e muito agressivas para os pacientes, colocando em evidência a grande necessidade de novos fármacos mais eficientes e menos tóxicos para uso na quimioterapia contra a doença de Chagas (Guedes *et al.*, 2011).

Neste contexto, os metalofármacos se apresentam como uma alternativa bem interessante pelo seu contínuo sucesso na clínica em diferentes abordagens, principalmente pelo potencial antimicrobiano dos inúmeros complexos metálicos testados (Sadler e Guo, 1998; Navarro *et al.*, 2010). Nos últimos anos, o nosso grupo de pesquisa vem pesquisando amplamente o efeito de variados metalocompostos em diferentes modelos microbianos, como bactérias, protozoários e fungos (Viganor *et al.*, 2017; Gandra *et al.*, 2017). Recentemente se obtiveram resultados bem interessantes utilizando o composto *phendione* (*fendiona*) demonstrando resultados em vários microrganismos, principalmente em parasitos como *Leishmania* spp., enquanto ainda apresentam boa tolerância nos modelos animais utilizados (Santos, 2019). Sendo assim, a investigação dos efeitos de *phendione*, principalmente Ag^+ -*phendione* e Cu^{2+} -*phendione*, em *T. cruzi* se mostra como uma linha de pesquisa de grande valor para o nosso grupo de pesquisa pelo seu grande potencial de eficácia e segurança quando comparados aos fármacos já aprovados para uso clínico.

3. OBJETIVOS

O presente projeto de pesquisa tem como objetivo principal o estudo dos efeitos que os complexos metálicos Ag^+ -*phendione* e Cu^{2+} -*phendione* exercem sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Os objetivos específicos são:

- ❖ Avaliar o impacto que os complexos de *phendione* associados ou não a Ag^+ e Cu^{2+} possuem na viabilidade celular das células animais LLC-MK₂;
- ❖ Avaliar o efeito dos complexos de Ag^+ -*phendione* e Cu^{2+} -*phendione* sobre a viabilidade das formas tripomastigotas;
- ❖ Estabelecer o Índice de Seletividade de ambos os metalocompostos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1: Parasito

Os parasitos da cepa Y (grupo TcII) de *T. cruzi* utilizados neste trabalho foram originalmente isolados de um caso agudo grave de doença de Chagas em São Paulo no ano de 1950 (Silva & Nussenzweig, 1953) e estão presentes em todos os ensaios que necessitarem do uso do parasito.

4.2: Compostos de coordenação

O ligante *phendione* [1,10-fenantrolina-5,6-diona] e seus respectivos complexos metálicos de Ag^+ -*phendione* ($[Ag(phendione)_2].ClO_4$) e Cu^{2+} -*phendione* ($[Cu(phendione)_3].(ClO_4)_2.4H_2O$) utilizados no presente trabalho foram sintetizados de acordo com os métodos descritos detalhadamente em McCann *et. al.* (2004), diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), armazenados em concentrações estoque de 1 mM, 100 μ M e 10 μ M, respectivamente, e resguardados de qualquer exposição luminosa por serem fotossensíveis. A partir destas soluções, foram obtidas as concentrações dos compostos utilizados no presente estudo. Os compostos de coordenação foram sintetizados e gentilmente enviados ao nosso laboratório pelo grupo de pesquisa do Dr. Malachy McCann, professor titular do Departamento de Química da *National University of Ireland*, o qual colabora ativamente com nosso projeto.

4.3: Manutenção da cultura de células animais

As células epiteliais LLC-MK₂, foram isoladas a partir do rim de um macaco *Rhesus*. Seu cultivo ocorre em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantido em estufa de cultura a 37°C e 5% de CO₂. As células são mantidas em cultura dentro de garrafas de cultura de 25 e 75 cm² para obtenção do parasito e para uso em experimentos. Para realizar a manutenção das culturas celulares, foram realizados repiques a cada 72 h. Para realizar o repique, o meio DMEM foi retirado e então se adicionou uma solução de tripsina (2,5 g/L). As culturas foram então incubadas por 5 min com a solução de tripsina para que a camada de células se desprenda da superfície interna da garrafa. Posteriormente, as células foram recolhidas e centrifugadas em 500xg (1500 rpm) por 5 min e

o sobrenadante contendo tripsina foi removido para então as células serem suspensas novamente em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e transferidas para novas garrafas de cultura para então aderirem novamente na superfície interna (Reddy *et al.*, 2017; Freshney, 1994).

4.4: Obtenção dos tripomastigotas de cultura celular

As células da linhagem LLC-MK₂ foram infectadas com os tripomastigotas da cepa Y, cuja proporção parasito-célula foi de 10:1 no momento da inoculação, realizada em meio DMEM e 2% de SFB. Depois da incubação por 24 h em estufa a 37°C e 5% CO₂, o meio de cultura foi removido e as células lavadas com DMEM para remover os tripomastigotas que não foram internalizados para então repor o meio DMEM contendo 2% de SFB. A cultura infectada foi então incubada novamente pelo tempo necessário para o parasito ser liberado no sobrenadante (cerca de 5 dias para a cepa Y). Após a liberação dos tripomastigotas, o meio contendo o parasito foi centrifugado a 500xg por 5 min para separar as formas tripomastigotas dos detritos celulares e eventuais amastigotas presentes no sobrenadante. Os tripomastigotas obtidos então foram armazenados em tubos Falcon à temperatura de 2°C durante no máximo 2 dias para serem utilizados em outras eventuais infecções. Para a realização dos experimentos, os tripomastigotas obtidos foram utilizados no máximo 1 dia após a coleta do sobrenadante (Sangenito *et al.*, 2016b; Reddy *et al.*, 2017).

4.5: Ensaio de citotoxicidade em células animais

As células da linhagem LLC-MK₂ removidas por tripsina das garrafas de cultura no item 4.3 foram ressuspensas em 1 mL e contadas em câmara de Neubauer para se obter o número total de células. Depois disso, as células foram diluídas em 10⁵ células/poço em 100 µL de meio DMEM e 10% de SFB em microplaca de 96 poços e incubadas até o dia seguinte para se aderirem ao fundo dos poços e formar uma monocamada. Após a adesão, os poços foram lavados com meio DMEM para remoção das células não aderidas, se acrescentou meio novo com 10% de SFB e as placas com as células LLC-MK₂ foram incubadas com diferentes concentrações crescentes de *phendione* (de 3,25 µM até 120 µM), Cu²⁺-*phendione* (de 0,625 µM até 160 µM) e Ag⁺-*phendione* (de 0,625 µM até 80 µM) por 24 h ou 72 h em estufa de CO₂. A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-

2-il-2,5-difeniltetrazólio) de forma que, depois do tempo de incubação, o meio DMEM foi retirado e uma solução de MTT foi adicionada (5 mg/mL em PBS, 10 µL/poço) para enfim as células serem incubadas a 37°C por mais 3 h sem exposição à luz. As células viáveis metabolizam o sal presente na solução através das desidrogenases mitocondriais, reduzindo-o em cristais de formazan que podem então ser quantificados através de espectrofotometria. Para isso, as placas foram centrifugadas a 500xg por 5 min para sedimentação dos cristais formados, que foram então diluídos em 200 µL DMSO. Uma vez diluídos os cristais, foi quantificada a absorbância em 570 nM em espectrofotômetro (SpectraMax/Molecular Devices). Os valores obtidos levaram a definir a concentração citotóxica dos compostos para 50% da população de células (CC₅₀) através de análise por regressão linear (Niles *et al.*, 2008; Sieveking *et al.*, 2014; Sangenito *et al.*, 2016a; Reddy *et al.*, 2017).

4.6: Teste de viabilidade dos tripomastigotas frente aos compostos

Uma vez obtidos e purificados os parasitos, conforme descrito no item 4.4, os tripomastigotas foram contados em câmara de Neubauer e diluídos em poços de microplaca de 96 poços para a concentração de 10⁶ células viáveis/mL em meio DMEM com 2% de SFB (viabilidade esta certificada por motilidade e morfologia normais do parasito) e incubados com concentrações crescentes de Cu²⁺-*phendione* e Ag⁺-*phendione* (de 12,5 nM até 100 nM) por 24 h em estufa a 37°C. Poços não tratados com o composto serviram como controle do ensaio. Após passado o tempo de incubação, os poços com as diferentes concentrações tiveram seus parasitos viáveis contabilizados por contagem direta em câmara de Neubauer em microscopia de campo claro (aumento de 40x) e, utilizando-se dos valores obtidos na contagem, foi calculada a dose letal para 50% da população de parasitos (DL₅₀) (Adade *et al.*, 2014; Sangenito *et al.*, 2016b; Reddy *et al.*, 2017).

4.7: Cálculo do Índice de Seletividade (IS)

Após a coleta dos dados de CC₅₀ e DL₅₀ obtidos para as células LLC-MK₂ e para as formas tripomastigotas, respectivamente, foi calculado o índice de seletividade (IS). O cálculo do índice de seletividade consiste na razão entre os valores de CC₅₀ das células animais LLC-MK₂ e os valores de DL₅₀ (referente às formas tripomastigotas do parasito) no mesmo tempo de incubação (neste caso, no tempo de 24 h), de forma a identificar a capacidade do composto

testado de causar efeito deletério no parasito sem afetar o hospedeiro ($CC_{50}/DL_{50} = IS$). O valor mínimo para se considerar que a razão do IS seja satisfatória é 10 (Sieveking *et al.*, 2014).

4.9: Análises Estatísticas

Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo todos os ensaios repetidos até, no mínimo, 3 vezes. Todos os resultados foram avaliados a partir do teste ANOVA com pós teste de Dunnett, de forma que os valores de P foram considerados estatisticamente significante quando iguais ou menores que 0,05.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito dos compostos sobre a viabilidade dos tripomastigotas

Primeiramente, foram realizados ensaios expondo tripomastigotas a diferentes concentrações dos compostos por 24 h, a fim de avaliar se podem afetar a viabilidade destas formas do parasito. A susceptibilidade dos parasitos foi avaliada por contagem, utilizando a motilidade e a morfologia como critérios de viabilidade e identificando possíveis alterações morfológicas que os parasitos vivos pudessem vir a sofrer. Se tratando de Cu^{2+} -*phendione*, observou-se que a primeira concentração (0,0125 μM) não causou diferenças muito drásticas, levando a uma redução de 7,53% da população. Contudo, em 25 nM (0,025 μM) já se observava uma concentração média de aproximadamente $5,2 \times 10^5$ parasitos/ml, uma redução aproximada de 51,3%, onde já se observavam parasitos com a motilidade mais fastidiosa e morfologias anormais. Já em 50 nM (0,05 μM) do composto de cobre, observou-se uma drástica redução da população viável (92,36%), contabilizando aproximadamente apenas $0,8 \times 10^5$ parasitos/ml. Na concentração de 100 nM (0,1 μM), não foram encontrados parasitos vivos. Com os valores obtidos a partir da curva de concentração frente a população de parasitos, o valor calculado de DL_{50} foi **18,92 nM**. Tratando sobre Ag^+ -*phendione*, a concentração inicial (6,25 nM) também demonstrou uma diferença pequena na população (redução de 5,46%), onde um número ínfimo de parasitos apresentando algumas alterações morfológicas como redução do flagelo. Já na concentração seguinte de 12,5 nM (0,0125 μM), foram contabilizados em média $6,8 \times 10^5$ parasitos/ml (redução de 33,34%), sendo observado que parasitos com alterações morfológicas moderadas e motilidade reduzida e/ou anormal. Já na concentração de 25 nM (0,025 μM), foram contabilizados aproximadamente $4,1 \times 10^5$ parasitos/ml (redução de 59,72% da população) e os parasitos se encontravam fortemente debilitados tanto em motilidade quanto em morfologia. Na última concentração de 50 nM (0,05 μM), apenas $0,4 \times 10^5$ parasitos/ml foram contabilizados em média e praticamente nenhum parasito aparentava motilidade adequada, demonstrando uma redução de 95,91%. Com os valores obtidos a partir da curva de concentração do composto de prata frente aos tripomastigotas, o valor calculado de DL_{50} foi de **15,39 nM**. Nas maiores concentrações de ambos os compostos, as principais alterações morfológicas observadas em ambos os compostos foram aumento do volume celular dos tripomastigotas e redução ou perda completa do flagelo. Levando em consideração os dados apresentados, no presente estudo observou-se que tanto os resultados obtidos com Cu^{2+} -

phendione quanto os resultados obtidos com Ag^+ -*phendione* apresentaram compostos com efeito dose-dependente interessante frente as formas tripomastigotas (**Figura 7**).

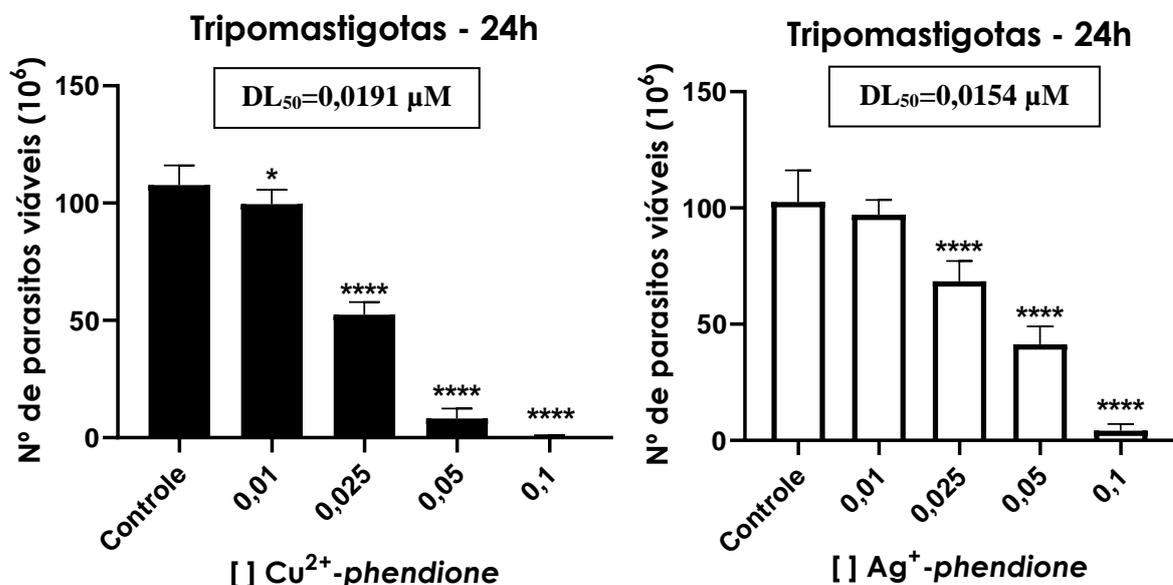


Figura 7: Efeito de Cu^{2+} -*phendione* e Ag^+ -*phendione* nas formas tripomastigotas do parasito. As formas tripomastigotas do parasito (10^6 células viváveis/mL) foram incubadas por 24 h com o composto numa faixa de concentração que varia entre 0,00625 µM e 0,1 µM. A partir dos resultados obtidos por contagem direta em microscopia de campo claro, calculou-se então a DL_{50} (dose letal para 50% da população) de ambos os compostos para o parasito, obtendo o resultado de **$DL_{50}=18,92$ nM** para o composto de cobre (barras pretas) e **$DL_{50}=15,39$ nM** para o composto de prata (barras brancas). Os dados estão expressos através da média e desvio padrão de experimentos diferentes realizados em triplicata. Os dados foram considerados significativos quando $P < 0,05$ (*) e $P < 0,0001$ (****).

5.2. Efeito citotóxico dos compostos em células animais LLC-MK₂

A suscetibilidade das células aos compostos Cu^{2+} -*phendione* e Ag^+ -*phendione* foi avaliada em dois períodos de exposição, durante 24 e 72 horas, através do método de MTT. No tempo de 24h, foi observado que o composto de Cu^{2+} -*phendione*, a partir da concentração de 80 µM, já indicava efeito citotóxico para mais da metade da população metabolicamente ativa, chegando a uma redução de 66,58%. Na maior concentração avaliada, a redução chegou em até 86,22% da população de células LLC-MK₂ (160 µM). Portanto, se utilizando dos valores observados na curva de concentração testada para Cu^{2+} -*phendione*, o valor calculado do CC_{50} para esse composto em 24h foi de **57,599 µM**. Já se tratando do composto de Ag^+ -*phendione*, é possível se observar que já na concentração de 40 µM há uma redução considerável do número

de células viáveis. A concentração em questão do composto de prata se demonstrou citotóxica para aproximadamente 79,01% da população, enquanto a maior concentração (80 μM) se mostrou citotóxica para 93,01% da população de LLC-MK₂, afetando mais as células do que o composto Cu^{2+} -*phendione*. Se utilizando dos resultados obtidos para as diferentes concentrações de Ag^{+} -*phendione* nesta faixa de tempo, foi possível se calcular o CC_{50} de **23,566 μM** . Ao compararmos os dois valores obtidos para os compostos em 24h, é possível afirmar que o Cu^{2+} -*phendione* aparenta ser melhor tolerado do que o composto de Ag^{+} -*phendione*, uma vez que o CC_{50} para Cu^{2+} -*phendione* é aproximadamente duas vezes maior do que o CC_{50} para Ag^{+} -*phendione*. Entretanto, a concentração citotóxica para ambos os compostos é bem maior nas células do que nas formas tripomastigotas do parasito. Também foi avaliada a capacidade do ligante *phendione* livre de ser bem tolerado pelas células LLC-MK₂. Desta forma, as células animais foram expostas a concentrações crescentes do ligante *phendione* livre por de 24 horas. Uma vez obtidos os valores para as diferentes concentrações, foi possível perceber que a partir de 7,5 μM já houve uma redução drástica da população de células (49,28%), sendo a última concentração (120 μM) citotóxica para aproximadamente 93,9% das células. A partir destes resultados observados, foi calculado o CC_{50} como **7,985 μM** para o ligante livre (**Figura 8**).

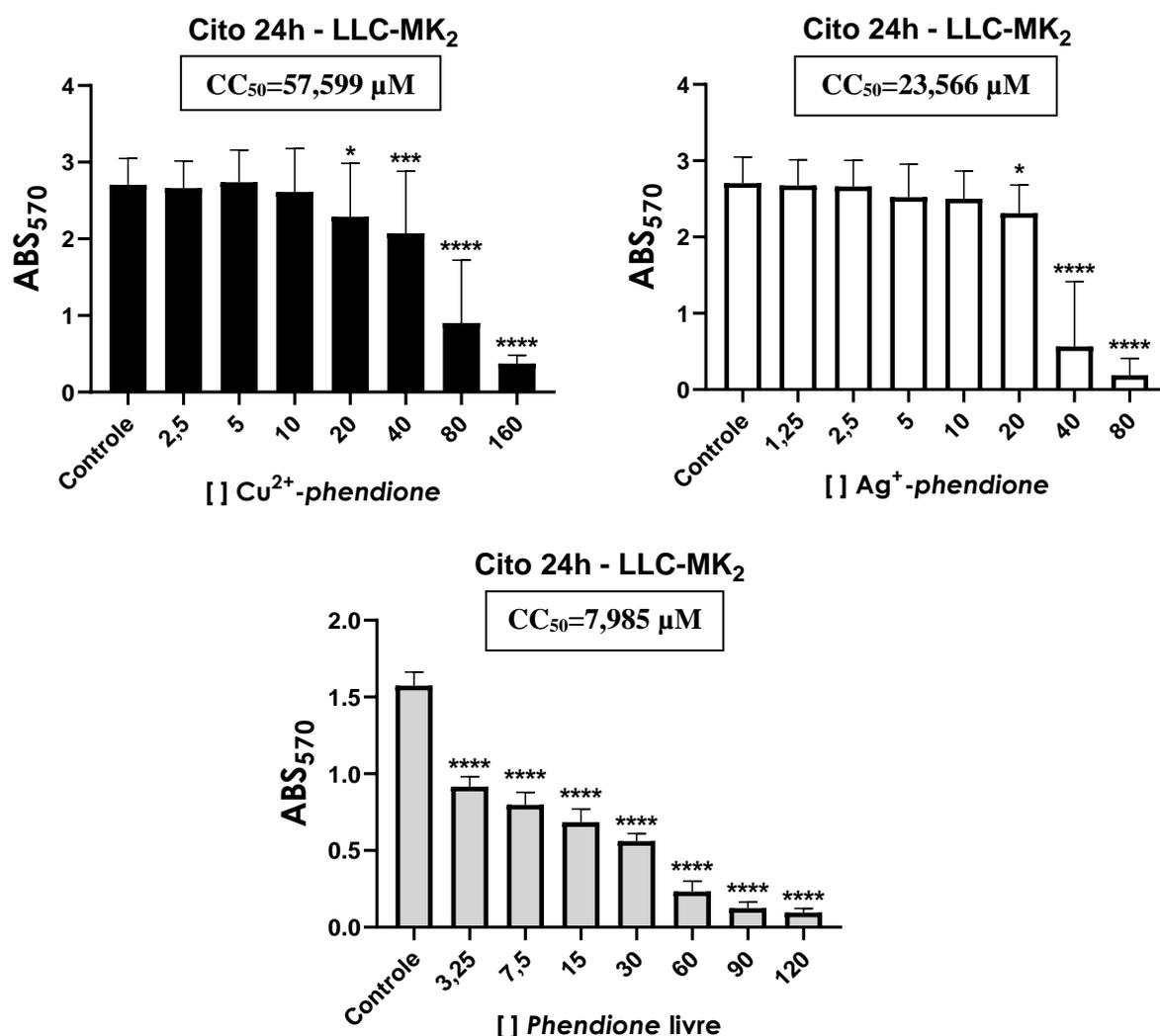


Figura 8: Citotoxicidade de Cu²⁺-phendione e Ag⁺-phendione em células epiteliais LLC-MK₂ após 24 horas. Tratamento da população de células LLC-MK₂ por 24 h na ausência (controle) e na presença de Ag⁺-phendione, numa faixa de concentração que varia entre 1,25 µM e 80 µM, de Cu²⁺-phendione, numa faixa que varia de 2,5 µM até 160 µM, e do ligante phendione livre, numa faixa de concentração que varia de 3,25 µM até 120 µM. Os resultados foram obtidos a partir do método de MTT, onde calculou-se então o CC₅₀ (concentração citotóxica para 50% da população) para ambos os compostos a partir de tais valores, de forma que Cu²⁺-phendione obteve o CC₅₀=62,79 µM e Ag⁺-phendione obteve o CC₅₀=23,56 µM. Já o ligante phendione livre teve inferido o CC₅₀=7,985 µM. Os dados estão expressos através da média e desvio padrão de experimentos diferentes realizados em quintuplicata. Os dados foram considerados significativos quando $P < 0,05$ (*) e $P < 0,0001$ (****). ABS, absorbância.

No tempo de 72 h, foram utilizadas concentrações menores das utilizadas em 24h, uma vez que provavelmente concentrações utilizadas em 24 h poderiam ser mais tóxicas. No composto de Cu²⁺-phendione, foi possível observar que desde a primeira concentração (0,625

μM) já era possível observar um efeito citotóxico considerável, vide que desde esta concentração já havia uma redução de 32,49% da população. Nas concentrações seguintes, a população de células viáveis foi reduzindo gradativamente, a ponto de que nas maiores concentrações se observou redução de 77,4% (5 μM), 88,46% (10 μM) e 92,76% (20 μM). Com isso, observou-se que o CC_{50} de Cu^{2+} -*phendione* em 72h era de **2,3 μM** . Já se tratando o composto de Ag^{+} -*phendione*, observou-se que nas primeiras concentrações ainda existia um efeito citotóxico mais leve. Desta forma, foi possível constatar que se reduziu apenas 17,85% da população de células viáveis na concentração de 0,625 μM e apenas 24,14% na concentração de 1,25 μM . Contudo, já nas maiores concentrações, o efeito citotóxico se demonstrou notório devido ao percentual de redução da população celular viável, chegando a 47,93% (5 μM), 66% (10 μM) e 94,04% (20 μM). Em decorrência disso, calculou-se o CC_{50} de Ag^{+} -*phendione* em 72h como **5,61 μM** . Portanto, tanto o composto de Cu^{2+} -*phendione* quanto o composto de Ag^{+} -*phendione* demonstram manter o efeito dose-dependente observado no tratamento realizado por 24 horas e se mantém bem mais altos que os valores observados no tempo de 24 h, corroborando em parte as observações realizadas nos ensaios em questão (**Figura 9**).

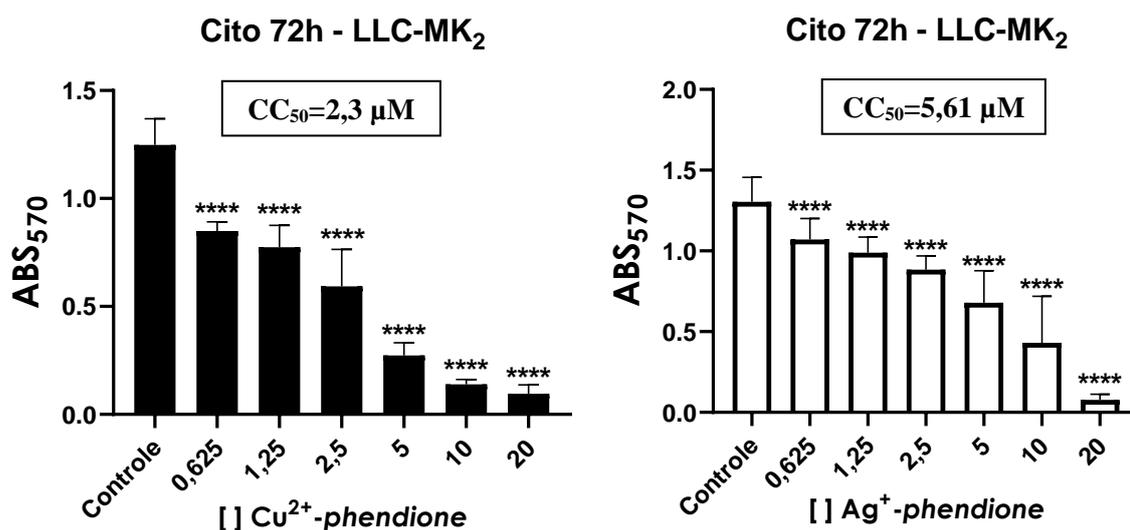


Figura 9: Citotoxicidade de Cu^{2+} -*phendione* e Ag^{+} -*phendione* em células epiteliais LLC-MK₂ após 72 horas. Tratamento da população de células LLC-MK₂ por 72 h na ausência (controle) e na presença de Cu^{2+} -*phendione* e de Ag^{+} -*phendione*, numa faixa de concentração que varia entre 0,625 μM e 20 μM . Os resultados foram obtidos a partir do método de MTT, onde calculou-se então o CC_{50} (concentração citotóxica para 50% da população) dos compostos a partir de tais valores, de forma que Cu^{2+} -*phendione* (esquerda) obteve o valor de **$\text{CC}_{50}=2,3 \mu\text{M}$** e Ag^{+} -*phendione* (direita) obteve o valor de **$\text{CC}_{50}=5,61 \mu\text{M}$** . Os dados estão expressos através da média e desvio padrão de experimentos diferentes realizados em quintuplicata. Os dados foram considerados significativos quando $P < 0,0001$ (****). ABS, absorbância.

5.3. Cálculo do Índice de Seletividade

A partir dos ensaios realizados durante 24 horas com as células animais e com as formas tripomastigotas do *T. cruzi*, foi possível evidenciar a seletividade dos compostos Cu^{2+} -phenidione e Ag^+ -phenidione em relação a ambos os modelos testados. Esta análise é importante devido a necessidade de se demonstrar que, em determinadas concentrações, os compostos de coordenação são capazes de afetar as células do parasito enquanto as células animais se mantêm tolerantes. Portanto, a partir dos valores de DL_{50} (ensaios com os tripomastigotas) e de CC_{50} (ensaios com as células LLC-MK₂) de ambos os compostos, foi possível calcular o Índice de Seletividade ($\text{IS} = \text{CC}_{50}/\text{DL}_{50}$) dos mesmos e inferir o quanto tais fármacos são seletivos mais para o parasito do que para o hospedeiro. Tratando-se de Cu^{2+} -phenidione, cujo valores foram $\text{DL}_{50}=18,92$ nM e $\text{CC}_{50}=57,599$ μM e o IS de Cu^{2+} -phenidione foi igual a **3.044,339**. Já se tratando do composto de Ag^+ -phenidione, os valores obtidos foram de $\text{DL}_{50}=15,39$ nM e $\text{CC}_{50}=23,566$ μM e o IS de Ag^+ -phenidione foi igual a **1.531,254**. De acordo com dados observados na literatura, acredita-se que os valores de um IS para um composto passam a se considerar satisfatórios quando apresentem razões iguais ou acima de 10 (**Tabela 1**).

Tabela 1: Cálculo do Índice de Seletividade (IS) para Cu^{2+} -phenidione e Ag^+ -phenidione baseado nos valores de CC_{50} (ensaios com as células animais LLC-MK₂) e nos valores de DL_{50} (ensaios de viabilidade com tripomastigotas).

Compostos (24h)	CC_{50} (μM)	DL_{50} (μM)	IS
Cu^{2+} -phenidione	57,599	0,01892	3.044,339
Ag^+ -phenidione	23,566	0,01539	1.531,254

6. DISCUSSÃO

A doença de Chagas é um dos mais importantes problemas de saúde pública globais. Apesar disso, ainda há uma grande lacuna no que tange ao tratamento da doença. Os dois únicos medicamentos disponíveis, BZN e FNX, são pouco eficazes na fase crônica e muito debilitantes (Lidani *et al.*, 2019). No atual cenário, os metalofármacos e a grande variedade de complexos e ligantes abordados na literatura estão se mostrando como ótimas opções de novas abordagens terapêuticas contra doenças negligenciadas, principalmente parasitoses. Navarro e colaboradores (2010) argumentam que os fármacos baseados em metais representam grandes oportunidades para novos compostos para uso clínico. Dados da literatura demonstram que no tratamento contra malária, complexos de cloroquina (CQ) coordenados a rutênio (II) ($[\text{RuCQCl}_2]_2$) e ouro (I) ($[\text{Au}(\text{PPh}_3)(\text{CQ})]\text{PF}_3$) se mostraram muito efetivos contra *Plasmodium berghei* e, principalmente, contra cepas resistentes à CQ de *Plasmodium falciparum* (Navarro *et al.*, 2010). A CQ é considerada uma das moléculas de maior sucesso na quimioterapia contra doenças infecciosas, já que possui alta eficácia, baixo custo de síntese e nenhum efeito tóxico muito relevante. A ferroquina (FQ), outro complexo antimalária e com estrutura semelhante à CQ, também demonstra grande eficácia através de mecanismos diferentes e já se encontra em testes clínicos de fase II. De fato, o sucesso da CQ e semelhantes e o aumento de sua eficácia ao ser coordenado a íons metálicos permite demonstrar o potencial dos mesmos enquanto metalofármaco contra parasitos (Navarro *et al.*, 2010). De forma similar, estudos em *T. cruzi* observaram efeitos promissores contra diferentes formas do parasito *in vitro* utilizando complexos de cetoconazol, clotrimazol, 5-nitrofuril e 5-nitroacroleína contendo tiosemicarbazonas (Navarro *et al.*, 2010).

Os complexos formados por ligantes derivados de fenantrolina estão emergindo entre os demais complexos como excelentes candidatos devido ao seu amplo efeito antimicrobiano. Levando em consideração este cenário, no presente trabalho foi avaliado pela primeira vez a capacidade dos complexos a base de 1,10-fenantrolina-5,6-diona, Cu^{2+} -*phendione* e Ag^+ -*phendione*, de afetarem a viabilidade do *T. cruzi*. Ambos os compostos foram testados no tempo de 24 h contra as formas tripomastigotas e se mostraram capazes de reduzir fortemente a população celular, a partir de concentrações consideravelmente baixas quando comparadas a outros compostos de coordenação relevantes na literatura contendo cobre e prata. Um dos melhores resultados de complexos associados a tais íons foi o estudo de Souza *et al.* (2023), onde prata e cobre foram coordenados a moléculas de BZN em 4 compostos diferentes. Dentre

os 4 compostos testados contra os tripomastigotas, o composto 1 obteve $IC_{50}=0,7 \mu M$ e o composto 3 obteve $IC_{50}=1,3 \mu M$, ambos coordenados à prata. Enquanto isso, os valores de IC_{50} observados nos compostos 2 e 4 (cobre) foram maiores que $3 \mu M$ (de Souza *et al.*, 2023). Se tratando de compostos de cobre, Martins e colaboradores (2012) sintetizaram compostos de fluoroquinolonas com cobre e testaram contra tripomastigotas (cepa Y), de forma que os menores IC_{50} encontrados foram equivalentes a $1,6 \mu M$ (composto 3 - levofloxacina), $4,7 \mu M$ (composto 6 - esparfloxacino) (Martins *et al.*, 2012) e $4,4 \mu M$ (composto 2 - norfloxacino) (Martins *et al.*, 2016). Curiosamente, também se observou que o complexo de fenantrolina $[CuCl_2(fen)]$ apresentou $IC_{50} = 7 \mu M$, valor tão relevante quanto ao observado em alguns complexos sintetizados (Martins *et al.* 2016). Posteriormente, Fonseca e colaboradores (2018) publicaram resultados com ligantes derivados de bis(3,5-dimetilpirazol-1-il)metano, onde o mais interessante (composto 5) apresenta $IC_{50}=176 \mu g/mL$ contra o *T. cruzi*. Já se tratando dos compostos coordenados à prata, Kordestani e colaboradores (2020) sintetizaram uma série de 8 complexos e testaram contra diversas espécies de *Trypanosoma*, onde os valores de IC_{50} em *T. cruzi* variaram $8 \mu M$ e $4,74 \mu M$, semelhante ao observado em *T. brucei*, *T. rhodesiense* e *L. infantum*. Outros resultados interessantes se encontram em Esteban-Parra *et al.* (2019), onde 3 compostos de 5,7-dimetil-1,2,4-triazol[1,5 a]pirimidina (Ag-dmtp) apresentaram $IC_{50}<1 \mu M$ contra epimastigotas de *T. cruzi*. Até o momento do presente trabalho, poucos estudos foram encontrados utilizando complexos de prata afetando a viabilidade de *T. cruzi*, sendo os complexos de cobre pesquisados mais amplamente. Entretanto, os dados observados em *phendione* ainda se mostraram como o maior destaque entre os dados encontrados com outros complexos coordenados aos mesmos íons, uma vez que praticamente nenhum resultado na literatura apresentou IC_{50} igual ou abaixo de $0,1 \mu M$.

É importante destacar que os compostos a base de *phendione* e seu efeito em *T. cruzi* não se mostraram destaque apenas entre os demais compostos à base de cobre e prata, mas também entre complexos associados a outros íons, ligantes livres e até entre compostos já aprovados na clínica. Além dos dados com cobre citados anteriormente, Fonseca e colaboradores (2018) também demonstraram resultados com compostos coordenados a cobalto frente a cepas suscetíveis e resistentes a BZN de *T. cruzi*, com valores respectivos de $IC_{50}=58,3 \mu g/mL$ e $IC_{50}=87,33 \mu g/mL$. Outros 8 compostos coordenados a paládio(II) também tiveram seu efeito contra tripomastigotas (cepa Y) determinados, com IC_{50} de metade abaixo de $1 \mu M$ ($0,53 \mu M - 0,76 \mu M$) e metade acima ($1,91 \mu M - 1,47 \mu M$) (Plutín *et al.*, 2017). Complexos associados a vanádio também apresentaram atividade contra tripomastigotas, sendo os 3

compostos de maior destaque tendo $IC_{50}=0,29 \mu M$, $IC_{50}=0,4 \mu M$ e $IC_{50}=0,47 \mu M$ (Scalese *et al.*, 2021). Complexos de difosfina coordenados a níquel, paládio e platina também foram testados contra formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, onde os compostos 2, 5 e 6 apresentaram os respectivos valores de IC_{50} em tripomastigotas como $0,72 \mu M$, $0,42 \mu M$ e $0,39 \mu M$ (Oliveira *et al.*, 2022). Já nas formas amastigotas, as concentrações de maior destaque foram dos complexos de 1 a 4, com o menor $IC_{50}=1,37 \mu M$ e o maior $IC_{50}=1,72 \mu M$ (Oliveira *et al.*, 2022). Em um estudo desenvolvido por Caballero *et al.* (2014), o complexo 1 de triazolopirimidinas coordenados a lantanídio apresentou IC_{50} menor que $10 \mu M$ em promastigota de *T. cruzi*. Já em Méndez-Arriaga *et al.* (2017) o mesmo ligante (HtfpO) em sua forma livre teve $IC_{50}=11,2 \mu M$ em epimastigotas de *T. cruzi*. De fato, diversos autores argumentam que seus respectivos complexos costumam apresentar maiores efeitos quando comparados aos ligantes livres. Santos e colaboradores (2012) observaram que complexos de tiosemicarbazonas associados a paládio e platina apresentaram efeitos mais relevantes em *T. cruzi* do que seus respectivos ligantes livres, com destaque para $[Pd(HL1)(L1)]Cl-CH_3OH$ com $IC_{50}=0,47 \mu M$, $PdCl_2(HL1)$ com $IC_{50}=1,6 \mu M$ e $[Pd(HL2)(L2)]Cl-H_2O$ com $IC_{50}=2,3 \mu M$ (Santos *et al.*, 2012). Dentre os compostos de platina, apenas $[Pt(HL1)(L1)]Cl-2CH_3OH$ teve relevância, com $IC_{50}=8,7 \mu M$ (Santos *et al.*, 2012). No trabalho de Paixão e colaboradores (2019), os ligantes *phen* e *bipy* (bipirimidinas) apresentaram respectivamente $IC_{50}=208 \mu M$ e $IC_{50}=100,5 \mu M$, valores muito maiores aos observados aos seus complexos de *phen* e *bipy* coordenados a cobre(II). Nenhum dos valores de IC_{50} aqui abordados superou os valores de DL_{50} observados no presente trabalho.

Também é importante ressaltar que os compostos *phendione* também se apresentam mais efetivos do que os compostos aprovados em clínica, BZN e NFX. O valor de BZN costuma apresentar uma variação considerável de acordo com cada trabalho, havendo trabalhos que apresentam $IC_{50}=24,2 \mu M$ em epimastigotas (Méndez-Arriaga *et al.*, 2017; Esteban-Parra *et al.*, 2019) o $IC_{50}=13 \mu M$ (Martins *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2016). Entretanto, o valor que mais demonstrado nos trabalhos em questão é em torno de $11 \mu M$ (Plutín *et al.*, 2017; Fonseca *et al.*, 2019; Aragón-Muriel *et al.*, 2021). Em Souza *et al.* (2023), BZN apresenta $IC_{50}=30,3 \mu M$ contra epimastigotas, $IC_{50}>3 \mu M$ contra tripomastigotas e $IC_{50}=4,8 \mu M$ contra amastigotas. Em Paixão e colaboradores (2019) demonstraram que o BZN apresenta nos amastigotas $IC_{50}=7 \mu M$, já no trabalho de Kordestani *et al.* (2020), o BZN apresenta $IC_{50}=2,95 \mu M$. Já se tratando de NFX, resultados da literatura apresentaram em epimastigotas $IC_{50}=7,7 \mu M$ (Santos *et al.*, 2012) e $IC_{50}=3,68 \mu M$ (Scalese *et al.*, 2021), além de $IC_{50}=20,1 \mu M$ em tripomastigotas (Scalese *et al.*,

2021). Nenhum dos valores de IC₅₀ dos fármacos aprovados se mostrou menor que os valores de *phendione* contra os tripomastigotas, igualmente para os demais compostos da literatura, coordenados ou não a cobre e prata.

Semelhantemente ao observado nos tripomastigotas de *T. cruzi*, também se observam resultados de *phendione* com grande relevância em outros parasitos e microrganismos no geral. Estudos do nosso grupo de pesquisa mostram que Cu²⁺-*phendione* e Ag⁺-*phendione* possuem impactos, por exemplo, na viabilidade de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, cuja média geométrica dos MICs (concentração mínima inibitória) de 50% e de 90% das cepas resistentes ou não para Cu²⁺-*phendione* era de 7,76 µM e para Ag⁺-*phendione* era de 14,05 µM (Viganor *et al.*, 2016). Já com fungos patogênicos do complexo *Candida* spp., Cu²⁺-*phendione* e Ag⁺-*phendione* apresentam resultados promissores em *Candida albicans* (MIC [cobre] = 1,3 µM; MIC [prata] = 0,47 µM) (McCann *et al.*, 2012) e em *Candida haemulonii* (MIC [cobre] = 9,65 µM; MIC [prata] = 2,16 µM) (Gandra *et al.*, 2017). Entretanto, os resultados de *phendione* com maior destaque se encontram contra protozoários patogênicos. Já no trabalho de Santos e colaboradores (2022) os promastigotas de *L. braziliensis* apresentaram IC₅₀=0,5 µM para Cu²⁺-*phendione* e IC₅₀=6,1 µM para Ag⁺-*phendione*. Por fim, os resultados de maior destaque entre os tripanossomatídeos se encontram em Santos (2019), onde Cu²⁺-*phendione* apresentou IC₅₀=0,00785 µM contra *L. amazonensis* e IC₅₀=0,020 µM contra *L. chagasi*. Por outro lado, Ag⁺-*phendione* apresentou IC₅₀=0,00780 µM contra *L. amazonensis* e IC₅₀=0,024 µM contra *L. chagasi* (Santos, 2019). Os dados com os demais parasitos reafirmam ainda mais os valores de DL₅₀ observados em *T. cruzi*, uma vez que os resultados com menores valores foram encontrados principalmente em *Leishmania* spp..

Ressalta-se ainda que, quando comparados a outros metalocompostos, *phendione* também se mostra mais eficiente frente a outros patógenos. Complexos de isotiocianato L-argininato coordenados a cobre se mostraram ter MIC >15 µM em *P. aeruginosa* e *C. albicans*, afetando geralmente bactérias gram negativas em valores de MIC próximos a 1 µM (Wojciechowska *et al.*, 2021). Complexos de Ag⁺ associados a complexos de imidotiazolidina-2-tiona tiveram seu efeito antimicrobiano determinado contra *L. amazonensis* e *L. chagasi*, onde os menores valores de IC₅₀ foram observados em promastigotas de *L. chagasi* (IC₅₀ = 3,22 µM – 9,35 µM) e em amastigotas de *L. amazonensis* (IC₅₀ = 1,88 µm – 10,92 µM) (Espuri *et al.*, 2019). Kordestani e colaboradores (2020) testaram diversos complexos de Ag⁺ contra *L. infantum*, onde 6 dos compostos obtiveram IC₅₀=8,11 µM, o composto Ag3 obteve IC₅₀=6,01

μM e Ag7 foi o mais potente, com $\text{IC}_{50}=2,38 \mu\text{M}$. Nenhum dos resultados observados na literatura obtiveram IC_{50} menores que $0,1 \mu\text{M}$ como foi observado no presente estudo.

Não apenas os compostos de Cu^{2+} -*phendione* e Ag^{+} -*phendione* são muito efetivos contra diversos patógenos de relevância clínica, como também podem não ser citotóxicos para as células nas concentrações utilizadas contra estes patógenos. No presente trabalho, observou-se que os compostos de *phendione* foram tolerados por modelos celulares LLC-MK₂ em concentrações bem maiores do que as testadas nos parasitos. Em McCann e colaboradores (2012), foi obtido o valor de CC_{50} em LLC-MK₂ para Cu^{2+} -*phendione* ($\text{CC}_{50}=7 \mu\text{M}$) e Ag^{+} -*phendione* ($\text{CC}_{50}=14,5 \mu\text{M}$) no tempo de 24 h, enquanto o IC_{50} para conídios de *Pseudallescheria boydii* eram de $0,1 \mu\text{M}$ (Cu^{2+} -*phendione*) e $0,18 \mu\text{M}$ (Ag^{+} -*phendione*). Estudos com compostos isoméricos coordenados a cobre(II) também demonstraram em células LLC-MK₂ valores semelhantes, com $\text{CC}_{50}=35,64 \mu\text{M}$ para o composto A e $\text{CC}_{50}=38,04 \mu\text{M}$ para o composto B, ao passo que afetavam formas de *Toxoplasma gondii* em concentrações de $\text{IC}_{50}=0,78 \mu\text{M}$ e $\text{IC}_{50}=3,57 \mu\text{M}$, respectivamente (Portes *et al.*, 2017). Apesar dos dados apresentados aqui, até o presente trabalho não foram encontrados dados recentes relativos à viabilidade de LLC-MK₂ frente a complexos de prata. Azevedo-França e colaboradores (2021) avaliaram o CC_{50} de compostos de zinco (1 e 3) em LLC-MK₂ após 48 h, de forma que no composto 1 o $\text{CC}_{50}=20 \mu\text{M}$ e no composto 2 o $\text{CC}_{50}=15 \mu\text{M}$, enquanto o IC_{50} para *C. albicans* na mesma faixa de tempo foram de $0,06 \mu\text{M}$ (composto 1) e $0,03 \mu\text{M}$ (composto 3). Igualmente se observou em *Cryptococcus neoformans*, que em 24h apresentou $\text{IC}_{50} < 0,004 \mu\text{M}$ para ambos os compostos (Azevedo-França *et al.*, 2021). Levando em consideração apenas o efeito na viabilidade de LLC-MK₂, Babgi e colaboradores (2021) demonstraram que o complexo de cobre $[\text{CuBr}(\text{PPh}_3)_2(4,6\text{-Dimethyl-2-Thiopyrimidine-}k\text{S})]$ apresentava CC_{50} maior que $100 \mu\text{M}$ no modelo de LLC-MK₂. Isso coloca em voga a possibilidade de tais compostos não apenas serem altamente letais para os patógenos testados, como também permite inferir um nível considerável de segurança para seu uso. Contudo, vale ressaltar que os compostos se mostraram relativamente mais tóxicos que os demais observados na literatura no tempo de 72 h. Ainda assim, o valor de Cu^{2+} -*phendione* e Ag^{+} -*phendione* não são prejudicados, uma vez que os resultados afetando os parasitos ainda se mostram muito menores ainda no tempo de 24 h.

Ademais, também é possível observar que complexos a base de *phendione* são pouco tóxicos de forma semelhante a outros compostos testados com diversos outros modelos celulares. Em Souza e colaboradores (2023), os compostos de Cu^{2+} e de Ag^{+} coordenados a BZN mostraram ser bem tolerados por HFF1 após 72 h, onde os compostos 2 e 4 (Cu^{2+})

obtiveram respectivamente, $CC_{50}=9,6 \mu\text{M}$ e $CC_{50}=11,4 \mu\text{M}$ em HFF1 e $CC_{50}=12,6$. Já com os compostos 1 e 3 (Ag^+), os valores foram $CC_{50}=28,6 \mu\text{M}$ em HFF1 e $CC_{50}=27,3 \mu\text{M}$ em HFF1 (Souza *et al.*, 2023). Compostos de isotiocianato coordenados à cobre(II) se mostraram bem tolerados por A549 durante 24 e 48 horas, onde o composto 1 apresentou $CC_{50}(24\text{h})=123,3 \mu\text{M}$ e $CC_{50}(48\text{h})=50,2 \mu\text{M}$, enquanto o composto 2 apresentou $CC_{50}(24\text{h})=74 \mu\text{M}$ e $CC_{50}(48\text{h})=49,8 \mu\text{M}$ (Wojciechowska *et al.*, 2021). Em McCann *et al.* (2012), Cu^{2+} -*phen*dione e Ag^+ -*phen*dione também foram testados em diversos outros modelos celulares no período de 24h. Destaca-se aqui os valores encontrados em A549 (Cu^{2+} -*phen*dione – $CC_{50}=8,5 \mu\text{M}$; Ag^+ -*phen*dione – $CC_{50}=15,9 \mu\text{M}$), RAW 264.7 (Cu^{2+} -*phen*dione – $CC_{50}=6,3 \mu\text{M}$; Ag^+ -*phen*dione – $CC_{50}=15,9 \mu\text{M}$) e MRC-5 (Cu^{2+} -*phen*dione – $CC_{50}=7,9 \mu\text{M}$; Ag^+ -*phen*dione – $CC_{50}=11,8 \mu\text{M}$) (McCann *et al.*, 2012).

É possível que os compostos de *phen*dione associados a cobre e prata também possam se mostrar menos tóxicos que outros complexos baseados em ligantes semelhantes, mesmo quando associados aos mesmos íons. Ng e colaboradores (2018) observaram o IC_{50} de compostos baseados em *phen* e associados a íons de cobre, rutênio e platina em linhagens celulares renais e ovarianas. Tais dados demonstraram que ligantes contendo *phen* e 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina (TMP) associados a rutênio(II) foram bem tolerados em modelos HK-2 ($CC_{50}=>60 \mu\text{M}$). Em contrapartida, complexos de *phen*, TMP e 4,7-dipiridil-1,10-fenantrolina (DIP) associados a cobre(II) se mostraram mais tóxicos que os de rutênio(II), apresentando CC_{50} entre 1,6 e 2,3 μM (Ng, Wu e Aldrich-Wright, 2018). Já nos compostos de platina, praticamente nenhum conseguiu valores de IC_{50} maiores dos que os valores de CC_{50} observados para Cu^{2+} -*phen*dione e Ag^+ -*phen*dione nas mesmas linhagens. Em exceção, o único IC_{50} que se destacou foi TMPRR em linhagem HK-2 ($CC_{50}=25 \mu\text{M}$ em resazurina; $CC_{50}=>85 \mu\text{M}$ em sulforodamina B). Entretanto, todos os valores de IC_{50} encontrados já eram, por si só, considerados pouco tóxicos para as células, ficando na faixa entre 0,2 μM e 12,5 μM (Ng *et al.*, 2018). Contudo, em McCann *et al.* (2012) observou-se valores de CC_{50} de Cu^{2+} -*phen*dione e Ag^+ -*phen*dione em HK-2 através da técnica de vermelho neutro, onde Cu^{2+} -*phen*dione $CC_{50}=0,5 \mu\text{M}$ e Ag^+ -*phen*dione $CC_{50}=0,8 \mu\text{M}$. Em comparação, também se observou-se valores distintos de CC_{50} para as células LLC-MK₂ através da mesma técnica, conforme já discutido anteriormente (Cu^{2+} -*phen*dione - $CC_{50}=7 \mu\text{M}$; Ag^+ -*phen*dione - $CC_{50}=14,5 \mu\text{M}$) (McCann *et al.*, 2012). Uma vez que cada projeto tenha avaliado as células em técnicas distintas (inclusive no presente trabalho), forma-se uma lacuna nos dados disponíveis para comparar quais compostos se mostram melhor tolerados nas diferentes linhagens. Ainda assim, é possível

afirmar que os derivados de *phen* costumam ter concentrações bem toleradas e são bem maiores que as observadas em *T. cruzi*.

Além da segurança dos compostos de coordenação aqui testados, o presente trabalho também demonstrou que no modelo LLC-MK₂, a coordenação dos compostos de *phendione* a Cu²⁺ e Ag⁺ passou a ser mais tolerado quando comparado ao ligante *phendione* livre no tempo de 24 h. Curiosamente, alguns dados indicam o oposto uma vez que a complexação de alguns ligantes a íons aumentou não somente seu efeito antimicrobiano, como também ampliou seu efeito citotóxico. Em Paixão e colaboradores (2019), por exemplo, o ligante livre *phen* apresenta CC₅₀=386,4 µM após 24h em modelo L929, mas alguns complexos de *phen* associados a cobre se mostraram mais tóxicos, como [Cu(2-MH)(phen)]²⁺ com CC₅₀=3 µM e [Cu(4-MH)(phen)]²⁺ com CC₅₀=1,4 µM (Paixão *et al.*, 2019). Além disso, em McCann *et al.* (2004) também se indica que *phendione* com os íons de Cu²⁺ e Ag⁺ aumentaram seu potencial citotóxico, inclusive em modelo de LLC-MK₂ (Ligante *phendione* livre – CC₅₀=35,2 µM). Contudo, os valores de CC₅₀ para Cu²⁺-*phendione* e Ag⁺-*phendione* em 72 h já se aproxima bem mais dos valores observados no trabalho em questão.

Levando em consideração a grande diferença entre os valores de DL₅₀ obtidos nos tripomastigotas e os valores de CC₅₀ obtidos nas células LLC-MK₂, o presente trabalho observou um índice de seletividade extremamente alto para os compostos Cu²⁺-*phendione* e Ag⁺-*phendione* no período de 24 h. Em Paixão e colaboradores (2017), mesmo os compostos de cobre se mostrando altamente eficazes contra o parasito, o IS calculado para a diferença entre o IC₅₀ calculado para os amastigotas de *T. cruzi* e o CC₅₀ calculado para L929 se mostrou relativamente baixo. Neste caso, os maiores valores encontrados foram para IS [Cu(2-CH)(phen)]²⁺ = 15,2 e IS [Cu(4-MH)(dmb)]²⁺ = 12,9 (Paixão *et al.*, 2017).

Já em Souza *et al.* (2023), os compostos de Ag-BZN afetaram fortemente o *T. cruzi* e bem tolerados por HFF1, com IS=124,4 para Ag-BZN (1) e IS=78 para Ag-BZN (3) (Souza *et al.*, 2023). O IS de maior destaque encontrado foram os calculados para Ag-dmtp (2), onde a diferença entre o CC₅₀ das células J774.2 e o IC₅₀ de *Leishmania* spp. resultaram um IS >1000, demonstrando uma enorme seletividade (Esteban-Parra *et al.*, 2019). Mesmo com um IS tão grande, os compostos de *phendione* conseguiram mostrar seletividade ainda maior que os melhores compostos da literatura (**Tabela 2**), apresentando IS (Cu²⁺-*phendione*) = 3044,4 e IS (Ag⁺-*phendione*) = 1531,2. Tais valores indicam enorme seletividade destes compostos em relação ao parasito e se mostram extremamente promissores, uma vez que na literatura o valor de IS para que o composto seja minimamente relevante é 10 (Sieveking *et al.*, 2014).

Tabela 2: Comparativo entre os índices de seletividade (IS) de Cu^{2+} -*phendione* e Ag^{+} -*phendione* e dos demais compostos de coordenação observados na literatura. É levado em consideração o modelo celular, o CC_{50} (μM) obtido em cada modelo e o microrganismo utilizado no cálculo do IS (tabela do autor).

Compostos	IS	Modelo	CC_{50} (μM)	Patógeno	Referência Bibliográfica
Cu^{2+} - <i>phendione</i>	<u>3044,4</u>	LLC-MK ₂	57,599	<i>T. cruzi</i> (tripo)	-
Ag^{+} - <i>phendione</i>	<u>1531,2</u>	LLC-MK ₂	23,566	<i>T. cruzi</i> (tripo)	-
Ag-BZN (1)	124,4	HFF1	28,6	<i>T. cruzi</i> (ama)	Souza <i>et al.</i> , 2023
Ag-BZN (3)	78	HFF1	27,3	<i>T. cruzi</i> (ama)	Souza <i>et al.</i> , 2023
Ag-dmtp (1)	>101,5	Vero	101,5	<i>T. cruzi</i> (epi)	Esteban-Parra <i>et al.</i> , 2019
Ag-dmtp (2)	>293,8	Vero	293,8	<i>T. cruzi</i> (epi)	Esteban-Parra <i>et al.</i> , 2019
Ag-dmtp (3)	>223,9	Vero	223,9	<i>T. cruzi</i> (epi)	Esteban-Parra <i>et al.</i> , 2019
[CuCl ₂ (<i>phen</i>)(LEV)]	19	CM	~30,4	<i>T. cruzi</i> (tripo)	Martins <i>et al.</i> , 2012
[Cu(2-CH)(<i>phen</i>) ²⁺	15,2	L929	9,1	<i>T. cruzi</i> (ama)	Paixão <i>et al.</i> , 2019
NFX	49,6	Vero	998,5	<i>T. cruzi</i> (tripo)	Scalese <i>et al.</i> , 2021
BZN	22,01	RAW 264.7	123,5	<i>T. cruzi</i> (ama)	Oliveira <i>et al.</i> , 2022
[Ni(L ₂)(dppe)].BF ₄ (1)	23,53	RAW 264.7	35,53	<i>T. cruzi</i> (ama)	Oliveira <i>et al.</i> , 2022
[V ^V O(IN-2H)(L ₂ -H)]	109	Vero	31,54	<i>T. cruzi</i> (tripo)	Scalese <i>et al.</i> , 2021
Ag-dmtp (1)	>60,2	J774.1	60,2	<i>Leishmania</i> spp.	Esteban-Parra <i>et al.</i> , 2019
Ag-dmtp (2)	>1000	J774.1	>1000	<i>Leishmania</i> spp.	Esteban-Parra <i>et al.</i> , 2019
Ag-dmtp (3)	>59,1	J774.1	59,1	<i>Leishmania</i> spp.	Esteban-Parra <i>et al.</i> , 2019
Cu^{2+} complexo 1	45,69	LLC-MK ₂	35,64	<i>T. gondii</i>	Portes <i>et al.</i> , 2017
Cu^{2+} complexo 2	10,65	LLC-MK ₂	38,04	<i>T. gondii</i>	Portes <i>et al.</i> , 2017
Zn(KTZ) ₂ (1)	160	LLC-MK ₂	20	<i>C. albicans</i>	Azevedo-França <i>et al.</i> , 2021
Zn(KTZ) ₂ (3)	120	LLC-MK ₂	15	<i>C. albicans</i>	Azevedo-França <i>et al.</i> , 2021
Zn(KTZ) ₂ (1)	666,7	LLC-MK ₂	20	<i>C. neoformans</i>	Azevedo-França <i>et al.</i> , 2021
Zn(KTZ) ₂ (3)	500	LLC-MK ₂	15	<i>C. neoformans</i>	Azevedo-França <i>et al.</i> , 2021

Diante dos dados apresentados aqui, fica destacado a potente ação que os complexos Cu^{2+} -*phendione* e Ag^+ -*phendione* exercem contra o *T. cruzi*, afetando amplamente a população de células a partir de concentrações extremamente baixas quando comparadas aos demais exemplares com efeito similar. Frente a estes dados, é imprescindível no futuro prosseguir com ensaios que verifiquem possíveis mecanismos de ação dos compostos nos tripomastigotas. No trabalho de Lima e colaboradores (2021), Cu^{2+} -*phendione* e Ag^+ -*phendione* se mostraram capazes de afetar a atividade de metalopeptidases de *L. braziliensis*. Em Galdino *et al.* (2022), observou-se que principalmente Cu^{2+} -*phendione* foi capaz de se intercalar entre a dupla fita de DNA de *Pseudomonas aeruginosa*, além de levar ao relaxamento da dupla fita via topoisomerase I e promover dano oxidativo ao DNA. Santos (2019) demonstra que ambos os compostos são capazes de afetar as mitocôndrias de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, impactando o metabolismo mitocondrial, debilitando o potencial de membrana mitocondrial e induzindo a produção de ROS.

Adicionalmente, também é interessante se considerar possíveis estratégias de combinação dos compostos de coordenação deste trabalho com BZN a fim de se buscar uma eficácia ainda maior enquanto tornam os compostos ainda mais seguros. Ademais, também é interessante avaliar a capacidade que os compostos possuem de afetar a viabilidade das formas amastigotas intracelulares, vide a grande relevância que esta forma possui no desenvolvimento das fases clínicas da doença. Por fim, Cu^{2+} -*phendione* e Ag^+ -*phendione* também se mostraram capazes de serem bem tolerados *in vitro* pelas células LLC-MK₂ nos tempos de 24h e 72h. Esse caráter de baixa citotoxicidade destaca bastante a grande seletividade que tais compostos possuem entre os parasitos e as linhagens celulares, tornando necessário no futuro novas investigações acerca da eficácia e tolerância destes complexos em modelos *in vivo*.

7. CONCLUSÕES

- ✓ Os compostos Cu^{2+} -*phendione* e Ag^+ -*phendione* afetaram fortemente a viabilidade da população de tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* de forma dose dependente.
- ✓ Os compostos Cu^{2+} -*phendione* e Ag^+ -*phendione* se mostraram pouco citotóxicos para as células LLC-MK₂ nos períodos de 24 h e 72 h.
- ✓ Os compostos Cu^{2+} -*phendione* e Ag^+ -*phendione* apresentaram índices de seletividade extremamente altos, afetando drasticamente a população de tripomastigotas sem oferecer risco para as células LLC-MK₂.
- ✓ Os compostos Cu^{2+} -*phendione* e Ag^+ -*phendione* possuem um grande potencial como candidatos a novos quimioterápicos e futuramente precisam ser melhor investigados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, Ana P., Silva, H.F.L., Sarto, M.P.M., Iunklaus, G.F., Trovo, J.V., Fernandes, N.S., Sá, A.R.N., Gomes, M.L., Toledo, M.J.O. (2021). **Investigation regarding the presence of *Trypanosoma cruzi* in triatomines and humans in rural households in the State of Paraná, southern Brazil**. Research, Society and Development, 10 (10), e54101018366. ISSN 2525-3409.
- Adade, C.M., Carvalho, A.L., Tomaz, M.A., Costa, T.F., Godinho, J.L., Melo, P.A., Lima, A.P., Rodrigues, J.C., Zingali, R.B., Souto-Pradrón, T. (2014). **Crovinin, a snake venom cysteine-rich secretory protein (CRISP) with promising activity against *Trypanosomes* and *Leishmania***. PLoS Negl. Trop. Dis., 8 (10), e3252.
- Adl, S., Simpson, A.G.B., Farmer, M.A., Andersen, R.A., Anderson, O.R., Barta, J.R., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Fensome, R.A., Fredericq, S., James, T.Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C.E., Lewis, L.A., Lodge, J., Lynn, D.H., Mann, D.G., McCourt, R.M., Mendoza, L., Moestrup, Ø., Mozley-Standridge, S.E., Nerad, T.A., Shearer, C.A., Smirnov, A.V., Spiegel, F.W., Taylor, M.F.J.R. (2005). **The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists**. J. Eukary. Microb., 52 (5), pp. 399-451. ISSN 1066-5234.
- Andrade, Daniela V., Gollob, K.J., Dutra, W. O. (2014). **Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease**. PLOS Neglected Tropical Diseases, 8 (7), e3010.
- Andrade, Luciana O., Galvão, L.M.C., Meirelles, M.N.S.L., Chiari, E., Pena, S.D.J., Macedo, A.M. (2010). **Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 105 (6), pp. 834-837.
- Aragón-Muriel, A., Liscano, Y., Upegui, Y., Robledo, S.M., Ramírez-Apan, M.T., Morales-Morales, D., Oñate-Garzón, J., Polo-Cerón, D. (2021). **In Vitro Evaluation of the Potential Pharmacological Activity and Molecular Targets of New Benzimidazole-Based Schiff Base Metal Complexes**. Antibiotics. 10, 728.
- Azevedo-França, J.A., Borba-Santos, L.P., Pimentel, G.A., Franco, C.H.J., Souza, C., Celestino, J.A., Menezes, E.F., Santos, N.P., Vieira, E.G., Ferreira, A.M.C., Souza, W., Rozental, S., Navarro, M. (2021) **Antifungal promising agents of zinc(II) and copper(II) derivatives based on azole drug**, Journal of Inorganic Biochemistry. 219, 111401, ISSN 0162-0134.
- Babgi, B.A., Alsayari, J.H., Davaasuren, B., Emwas, A.-H., Jaremko, M., Abdellattif, M.H., Hussien, M.A. (2021). **Synthesis, Structural Studies, and Anticancer Properties of [CuBr(PPh₃)₂(4,6-Dimethyl-2-Thiopyrimidine-_κS)]**. Crystals. 11, 688.
- Bencine, A., Lippolis, V. (2010). **1,10-Phenanthroline: A versatile building block for the construction of ligands for various purposes**. Coordination Chemistry Reviews, 254, pp. 2096–2180.
- Benite, Anna M.C., Machado, S.P., Barreiro, E.J. (2007). **Uma visão da química bioinorgânica medicinal**. Quim. Nova, 30 (8), pp. 2062-2067.
- Brown, Ronald W., Hyland, C.G.J. (2015). **Medicinal organometallic chemistry – an emerging strategy for the treatment of neglected tropical diseases**. Med. Chem. Commun., 6, pp. 1230–1243.
- Caballero, A.B., Rodríguez-Diéguez, A., Salas, J.M., Sánchez-Moreno, M., Marín, C., Ramírez-Macías, I., Santamaría-Díaz, N., Gutiérrez-Sánchez, R. (2014). **Lanthanide complexes containing 5-methyl-1,2,4-triazolo[1,5-*a*] pyrimidin-7(4*H*)-one and their therapeutic potential to fight leishmaniasis and Chagas disease**. Journal of Inorganic Biochemistry. 138, 39-46.

- Campos, Mônica C.O., Leon, L.L., Taylor, M.C., Kelly, J.M. (2014). **Benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*: Evidence that distinct mechanisms can act in concert.** *Molecular & Biochemical Parasitology*, 193, pp. 17–19.
- Catalá, S. S., Noireau, F., Dujardin, J.-P. (2017). **Biology of Triatominae.** In: *American Trypanosomiasis Chagas Disease. 2ª Ed* (United Kingdom: Academic Press by Elsevier). 18, 145–167.
- Cavalli, Andrea, Bolognesi, M.L. (2009). **Neglected Tropical Diseases: Multi-Target-Directed Ligands in the Search for Novel Lead Candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*.** *J. Med. Chem.*, 52, pp. 7339–7359.
- CENTER FOR CONTROL OF DISEASE AND PREVE - DPDx (2021). **American Trypanosomiasis.** Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>>. Acesso em: 30/01/2022.
- Chagas, C.J.B. (1909). **Nova tripanozomiose humana: Estudos sobre morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. Gen., n. Sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1, 159-218.
- De Souza, W., de Carvalho, T. U., Barrias, E. S. (2017). **Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* and its interaction with host cells.** In: *American Trypanosomiasis Chagas Disease. 2ª Ed.* (United Kingdom: Academic Press by Elsevier). 18, pp 401-427.
- De Souza, W. (2002). **Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*.** *Current Pharmaceutical Design*, 8, 269-285.
- Dias, João C.P. (2000). **Epidemiological surveillance of Chagas disease.** *Cad. Saúde Pública*, 16, suppl. 2, pp. 43-59.
- Dias, J.P.C., Schofield, C.J. (2017). **Social and medical aspects on Chagas disease management and control.** In: *American Trypanosomiasis Chagas Disease. 2ª Ed* (United Kingdom: Academic Press by Elsevier). 3, pp. 47-57
- Dias, Luiz C., Dessoy, M.A. (2013). **Doenças Tropicais Negligenciadas: Uma Nova Era de Desafios e Oportunidades.** *Quim. Nova*, Vol. 36 (10), 1552-1556.
- Dias, P.P., Capila, R.F., do Couto, N.F., Estrada, D., Gadelha, F.R., Radi, R., Piacenza, L., Andrade, L.O. (2017). **Cardiomyocyte oxidants production may signal to *T. cruzi* intracellular development.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(8), pp. 1-23.
- Espuri, P.F., Reis, L.L., Peloso, E.F., Gontijo, V.S., Colombo, F.A., Nunes, J.B., Oliveira, C.A., Almeida, E.T., Silva, D.E.S., Bortoletto, J., Segura, D.F., Netto, A.V.G., Marques, M.J. (2019). **Synthesis and evaluation of the antileishmanial activity of silver compounds containing imidazolidine-2-thione.** *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 24, 419–432.
- Esteban-Parra, G.M., Méndez-Arriaga, J.M., Rodríguez-Diéguez, A., Quirós, M., Salas, J.M., Sánchez-Moreno, M. (2019). **High antiparasitic activity of silver complexes of 5,7-dimethyl-1,2,4-triazolo[1,5 a]pyrimidine.** *Journal of Inorganic Biochemistry*. 201, 110810.
- Flora, Swaran J.S., Pachauri, V. (2010). **Chelation in Metal Intoxication.** *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 7, pp. 2745-2788.
- Fonseca, D., Paéz, C., Ibarra, L., García-Huertas, P., Macías, M.A., Triana-Chávez, O., Hurtado, J.J. (2019). **Metal complex derivatives of bis(pyrazol-1-yl)methane ligands: synthesis, characterization and anti-*Trypanosoma cruzi* activity.** *Transition Metal Chemistry*. 44, 135–144.

Freshney, R. I. (1994). **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**. 4^a Ed. (Nova York: Wiley-Liss), 397 p..

Galdino, A.C.M., Viganor, L., Pereira, M.M., Devereux, M., McCann, M., Branquinha, M.H., Molphy, Z., O'Carroll, S., Bain, C., Menounou, G., Kellert, A., Santos, A.L.S. (2022). **Copper(II) and silver(I)-1,10-phenanthroline-5,6-dione complexes Interact with double-stranded DNA: further evidence of their apparent multi-modal activity towards *Pseudomonas aeruginosa***. Journal of Biological Inorganic Chemistry. 27, 201-213.

Gandra, Rafael M., McCarron, P., Fernandes, M.F., Ramos, L.S., Mello, T.P., Aor, A.C., Branquinha, M.H., McCann, M., Devereux, M., Santos, A.L.S. (2017). **Antifungal Potential of Copper(II), Manganese(II) and Silver(I) 1,10-Phenanthroline Chelates Against Multidrug-Resistant Fungal Species Forming the *Candida haemulonii* Complex: Impact on the Planktonic and Biofilm Lifestyles**. Front. Microbiol., 8, 1257.

Gandra, Rafael M., McCarron, P., Viganor, L., Fernandes, M.F., Kavanagh, K., McCann, M., Branquinha, M.H., Santos, A.L.S., Howe, O., Devereux, M. (2020). **In vivo Activity of Copper(II), Manganese(II), and Silver(I) 1,10-Phenanthroline Chelates Against *Candida haemulonii* Using the *Galleria mellonella* Model**. Front. Microbiol., 11, 470.

Garcia, E.S., Azambuja, P. (1991). **Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector**. Parasitology Today, 7 (9), pp. 240-244.

Granato, Marcela Q., Gonçalves, D.S., Seabra, S.H., McCann, M., Devereux, M., Santos, A.L.S., Kneipp, L.F. (2017). **1,10-Phenanthroline-5,6-Dione-Based Compounds Are Effective in Disturbing Crucial Physiological Events of *Phialophora verrucosa***. Front. Microbiol, 8, 76.

Guedes, Paulo M.M., Silva, G.K., Gutierrez, F.R.S., Silva, J.S. (2011). **Current status of Chagas disease chemotherapy**. Expert Rev. Anti Infect. Ther., 9 (5), pp. 609–620.

Haas, Kathryn L., Franz, K.J. (2009). **Application of Metal Coordination Chemistry To Explore and Manipulate Cell Biology**. Chem. Rev., 109, pp. 4921–4960.

Jesús, Guajardo, Elpidio, M., Francisco, L., Cristina, Q., Martha, C., María-Eugenia, N., Jesús, G., Facundo, R. (2011). **A Comparative Study of the Chelating Effect Between Textured Soya Aqueous Extract and EDTA on Fe³⁺, Pb²⁺, Hg²⁺, Cd²⁺ and Ni²⁺ Ions**. In: Soybean: Physiology and Biochemistry. 1^a Ed. (London: IntechOpen), 16, pp. 313-332.

João C. P. Dias (2007). **Globalization, inequity and Chagas disease**. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 23 Sup 1:S13-S22.

Ke, Hua, Hu, F., Meng, L., Chen, Q., Lai, Q., Li, Z., Huang, Z., Liao, J., Qiu, J., Lu, C. (2020). **Ultrastable radical-doped coordination compounds with antimicrobial activity against antibiotic-resistant bacteria**. Chem. Commun., 56 (92), pp. 14353-14356.

Killip, Shersten, Bennett, J.M., Chambers, M.D. (2007). **Iron Deficiency Anemia**. American Family Physician. 75, 5, pp. 671-678.

Kordestani, N., Rudbari, H.A., Fatemina, Z., Caljon, G., Maes, L., Mineo, P.G., Cordaro, A., Mazzaglia, A., Scala, A., Micale, N. (2020). **Antimicrobial and antiprotozoal activities of silver coordination polymers derived from the asymmetric halogenated Schiff base ligands**. Appl Organomet Chem. 35, e6079.

- Lana, M., Machado, E.M.M. (2017). **Biology of *Trypanosoma cruzi* and biological diversity**. In: American Trypanosomiasis Chagas Disease. 2^a Ed. (United Kingdom: Academic Press by Elsevier). 16. pp. 345-369.
- Lana, Marta, Tafuri, W. L. (2004). ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas**. In: Parasitologia Humana. 11^a Ed. (São Paulo: Editora Atheneu), 2 (11), pp 85-108.
- Libisch, María G., Rego, N., Robello, C. (2021). **Transcriptional Studies on *Trypanosoma cruzi* – Host Cell Interactions: A Complex Puzzle of Variables**. Front. Cell. Infect. Microbiol., 11, 692134.
- Lidani, K.C.F., Andrade, F.A., Bavia, L., Damasceno, F.S., Beltrame, M.H., Messias-Reason, I.J., Sandri, T.L. (2019). **Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem**. Front. Public Health, 7, 166.
- Lima, A.K.C., Elias, C.G.R., Oliveira, S.S.C., Santos-Mallet, J.R., McCann, M., Devereux, M., Branquinha, M.H., Dutra, P.M.L., Santos, A.L.S. (2021). **Anti-*Leishmania braziliensis* activity of 1,10-phenanthroline-5,6-dione and its Cu(II) and Ag(I) complexes**. Parasitology Research, 120, 3273–3285.
- Longo, Dan L., Bern, C. (2015). **Chagas' Disease**. The New England Journal of Medicine. 373, 456-66.
- Mackey, Tim K., Liang, B.A., Cuomo, R., Hafen, R., Brouwer, K.C., Lee, D.E. (2014). **Emerging and reemerging neglected tropical diseases: a review of key characteristics, risk factors, and the policy and innovation environment**. Clin. Microbiol. Rev., 27 (4), pp. 949-79.
- Manne-Goehler, Jennifer, Umeh, C.A., Montgomery, S.P., Wirtz, V.J. (2016). **Estimating the Burden of Chagas Disease in the United States**. PLoS Neglected Tropical Diseases, 10 (11), e0005033.
- Martins, D.A., Gouvea, L.R., Muniz, G.S.V., Louro, S.R.W., Batista, D.G.J., Soeiro, M.N.C., Teixeira, L.R. (2016). **Norfloxacin and N-Donor Mixed-Ligand Copper(II) Complexes: Synthesis, Albumin Interaction, and Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity**. Bioinorganic Chemistry and Applications. 2016, e5027404, 11.
- Martins, Darliane A., Gouvea, L.R., Batista, D.G.J., Silva, P.B., Louro, S.R.W., Soeiro, M.N.C., Teixeira, L.R. (2012). **Copper(II)–fluoroquinolone complexes with anti-*Trypanosoma cruzi* activity and DNA binding ability**. Biometals, 25, pp. 951–960.
- Maslov, Dimitri A., Votýpka, J., Yurchenko, V., Lukeš, J. (2013). **Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed**. Trends in Parasitology, 29 (1), 43-52.
- Matsudamasv, Nilce M., Miller, S.M., Evora, P.R.B. (2009). **The Chronic Gastrointestinal Manifestations of Chagas Disease**. Clinics, 64 (12), 1219-24.
- McCann, M., Coyle, B., McKay, S., McCormack, P., Kavanagh, K., Devereux, M., *et al.* (2004). **Synthesis and X-ray crystal structure of [Ag(phendio)₂]ClO₄ (phendio=1,10-phenanthroline-5,6-dione) and its effects on fungal and mammalian cells**. Biometals, 17, 635–645.
- McCann, M., Santos, A.L.S., Silva, B.A., Romanos, M.T.V., Pyrrho, A.S., Devereux, M., Kavanagh, K., Fichtner, I., Kellet, A. (2012). **In vitro and in vivo studies into the biological activities of 1,10-phenanthroline, 1,10-phenanthroline-5,6-dione and its copper(II) and silver(I) complexes**. Toxicol. Res., 1 (1), pp. 47-54.
- Méndez- Arriaga, J.M., Esteban-Parra, G.M., Juárez, M.J., Rodríguez-Diéguez, A., Sánchez-Moreno, M., Isac-García, J., Salas, J.M. (2017). **Antiparasitic activity against trypanosomatid diseases and novel metal complexes derived from the first time characterized 5-phenyl-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidi-7(4H)-one**. Journal of Inorganic Biochemistry. 175, 217–224.

- Moncayo, A., Silveira, A.C. (2017). **Current epidemiological trends of Chagas disease in Latin America and future challenges: epidemiology, surveillance, and health policies**. In: American Trypanosomiasis Chagas Disease. 2^a Ed (United Kingdom: Academic Press by Elsevier). 4. pp. 60-88.
- Mosqueira, Vanessa C.F., Mazzeti, A.L., Bahia, M.T. (2021). **Nanomedicines against Chagas disease**. In: Applications of Nanobiotechnology for Neglected Tropical Diseases. 1^a Ed. (United Kingdom: Academic Press by Elsevier). 9, pp 169-190.
- Murcia, Laura, Carrilero, B., Viñas, P.A., Segovia, M. (2012). **Nifurtimox chemotherapy: collateral effects in treated *Trypanosoma cruzi* infected patients**. Rev. Esp. Quimioter., 25 (1), pp. 74-75.
- Navarro, M., Gabbiani, C., Messori, L., Gambino, D.. (2010). **Metal-based drugas for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: recente achievements and perspectives**. Drug Discovery Today. 15(23/24), 1070-1078.
- Ng, Neville S., Wu, M.J., Aldrich-Wright, J.R. (2018). **The cytotoxicity of some phenanthroline-based antimicrobial copper(II) and ruthenium(II) complexes**. Journal of Inorganic Biochemistry. 180, 61–68.
- Ng, Neville S., Wu, M.J., Myers, S.J., Aldrich-Wright, J.R.. (2018). **The *in vitro* renal cell toxicity of some unconventional anticancer phenanthroline-based platinum(II) complexes**. Journal of Inorganic Biochemistry. 179, 97–106.
- Niles, A. L., Moravec, R. A., Riss, T. L. (2008). **Update on *in vitro* cytotoxicity assays for drug development**. Expert Opinion on Drug Discovery, 3(6), 655–669.
- Oliveira, T.D., Ribeiro, G.H., Honorato, J., Leite, C.M., Santos, A.C.S., Silva, E.D., Pereira, V.R.A., Plutín, A.M., Cominetti, M.R., Catellano, E.E., Batista, A.A. (2022). **Cytotoxic and antiparasitic activities of diphosphine-metal complexes of group 10 containing acylthiourea as ligands**. Journal of Inorganic Biochemistry. 234, 111906.
- Paixão, Drielly A., Lopes, C.D., Carneiro, Z.A., Sousa, L.M., Oliveira, L.P., Lopes, N.P., Pivatto, M., Chaves, J.D.S., Almeida, M.V., Ellena, J., Moreira, M.B., Netto, A.V.G., Oliveira, R.J., Guilardi, S., Albuquerque, S., Guerra, W. (2017). ***In vitro* anti-*Trypanosoma cruzi* activity of ternary copper(II) complexes and *in vivo* evaluation of the most promising complex**. Biomedicine & Pharmacotherapy. 109, 157-166.
- PAN-AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (2022). **Chagas Disease**. Disponível em <<https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease>>. Acesso em: 28/10/2022.
- Phromsatit, T., Arpornmaeklong, P., Shirotsaki, Y., Teerawatananond, T., Rabablert, J., Boonyuen, S. (2021). **Synthesis and cytotoxicity study of gold(III) porphyrin complexes and their derivative in breast cancer cells**. Journal of Saudi Chemical Society. 25, 101366.
- Pinheiro, Eloan, Brum-Soares, L., Reis, R., Cubides, J.C. (2017). **Chagas disease: review of needs, neglect, and obstacles to treatment access in Latin America**. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 50 (3), pp. 296-300.
- Plutín, Ana M., Alvarez, A., Mocado, R., Ramos, R., Castellano, E.E., Silva, M.M., Villarreal, W., Pavan, F.R., Meira, C.S., Filho, J.S.R., Moreira, D.R.M., Soares, M.B.P., Batista, A.A. (2017). **Palladium(II)/N,N-disubstituted-N'-acylthioureas complexes as anti-*Mycobacterium tuberculosis* and anti-*Trypanosoma cruzi* agentes**. Polyhedron. 132, 70-77.

Portes, J.A., Motta, C.S., Azeredo, N., Fernandes, C., Horn, A., Souza, W., DaMatta, R.A., Seabra, S.H. (2017). **In vitro treatment of *Toxoplasma gondii* with copper(II) complexes induces apoptosis-like and cellular division alterations.** *Veterinary Parasitology* 245 141–152.

Portes, J.A., Azeredo, N.F.B., Siqueira, P.G.T., Sousa, T.G., Fernandes, C., Horn Jr, A., Candela, D.R.S., Souza, W., DaMatta, R.A., Seabra, S.H. (2015). **A new iron(III) complex-containing sulfadiazine inhibits the proliferation and induces cystogenesis of *Toxoplasma gondii*.** *Parasitology Research*. 117(10), 1007.

Portman, N., Gull, K. (2010). **The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: From structure to components and function.** *International Journal for Parasitology*, 40 (2), pp 135–148.

Prata, Aluizio (2001). **Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease.** *Infectious Diseases*, Vol 1, pp. 92-100.

Punukollu, G., Gowda, R.M., Khan, I.A., Navarro, V.S., Vasavada, B.C. (2007). **Clinical aspects of the Chagas' heart disease.** *International Journal of Cardiology*, 115 (3), pp. 279–283

Rassi Jr, Anis, Rassi, A., Marin-Neto, J. A. (2015). **Chagas Disease.** In: *Neglected Tropical Diseases - Latin America and the Caribbean. Neglected Tropical Diseases* (Springer, Vienna), pp. 45-71.

Reddy, A., Sangenito, L.S., Guedes, A.A., Branquinha, M.H., Kavanagh, K., McGinley, J., Santos, A.L.S., Velasco-Torrijos, T. (2017). **Glycosylated metal chelators as anti-parasitic agents with tunable selectivity.** *Dalton Transactions*, 46 (16), 5297–5307.

Rigo, G.V., Petro-Silveira, B., Devereux, M., McCann, M., Santos, A.L.s., Tasca, T. (2019). **Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of 1,10-phenanthroline-5,6-dione-based metallodrugs and synergistic effect with metronidazole.** *Parasitology*. 146, 1179–1183.

Rocha, Diego P., Pinto, G.F., Ruggiero, R., Oliveira, C.A., Guerra, W., Fontes, A.P.S., Tavares, T.T., Marzano, I.M., Pereira-Maia, E.C. (2011). **Coordenação de metais e antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana.** *Quim. Nova*, 34 (1), pp. 111-118.

Rodrigues, J. C. F., Godinho, J. L. P., de Souza, W. (2014). **Biology of Human Pathogenic Trypanosomatids: Epidemiology, Lifecycle and Ultrastructure.** In: *Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma. Subcellular Biochemistry*, Vol 70 (1), pp. 1-42.

Sadler, Peter J., Guo, Z. (1998). **Metal complexes in medicine: design and mechanism of action.** *Pure & Appl. Chem.*, 70 (4), pp. 863-871.

Sangenito, L.S., Rodrigues, H.D., Santiago, S.O., Bombaça, A.C.S., Menna-Barreto, R.F.S., Reddy, A., Branquinha, M.H., Velasco-Torrijos, T., Santos, A. L. S. (2021). **In vitro effects of bis(N-[4-(hydroxyphenyl)methyl]-2-pyridinemethamine)zinc perchlorate monohydrate 4 on the physiology and interaction process of *Leishmania amazonensis*.** *Parasitology International*, 84, 102376.

Sangenito, Leandro S., Branquinha, M.H., dos Santos, A.L.S. (2020). **Funding for Chagas Disease: A 10-Year (2009–2018) Survey.** *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 5, 88.

Sangenito, Leandro S., Santos, V.S., d'Ávila-Levy, C.M., Branquinha, M.H., dos Santos, A.L.S., de Oliveira, S.S.C. (2019). **Leishmaniasis and Chagas Disease – Neglected Tropical Diseases: Treatment Updates.** *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 19 (3), pp. 174-177.

Sangenito, Leandro S., d'Ávila-Levy, C.M., Branquinha, M.H., dos Santos, A.L.S. (2016). **Nelfinavir and lopinavir impair *Trypanosoma cruzi* trypomastigote infection in mammalian host cells and show anti-amastigote activity.** International Journal of Antimicrobial Agents, 48, pp. 703–711.

Sangenito, L.S., Gonçalves, D.S., Seabra, S.H., d'Ávila-Levy, C.M., Santos, A.L.S., Branquinha, M.H. (2016). **HIV aspartic peptidase inhibitors are effective drugs against the trypomastigote form of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*.** International Journal of Antimicrobial Agents, 48 (4), pp. 440–444.

Santos, Diego, Parajón-Costa, B., Rossi, M., Caruso, F., Benítez, D., Varela, J., Cerecetto, H., González, M., Gómez, N., Caputto, M.E., Moglioni, A.G., Moltrasio, G.Y., Finkielstein, L.M., Gambino, D. (2012). **Activity on *Trypanosoma cruzi*, erythrocytes lysis and biologically relevant physicochemical properties of Pd(II) and Pt(II) complexes of thiosemicarbazones derived from 1-indanones.** Journal of Inorganic Biochemistry. 117, 270-276.

Santos, André L.S., Lima, A.K.C., Oliveira, S.S.C., Santos, R.F., Devereux, M., McCann, M., Branquinha, M.H., Dutra, P.M.L. (2022). **Decoding the anti-*Leishmania braziliensis* activity of 1,10-phenanthroline-5,6-dione and its silver- and copper-based complexes: *in vitro* and *in vivo* approaches.** Eur. Jour. Med. Chem. Rep. 6, e100093.

Santos, André L.S., Sodré, C.L., Valle, R.S., Silva, B.A., Abi-chacra, E.A., Silva, L.V., Souza-Gonçalves, A.L., Sangenito, L.S., Gonçalves, D.S., Souza, L.O.P., Palmeira, V.F., d'Ávila-Levy, C.M., Kneipp, L.F., Kellett, A., McCann, M., Branquinha, M.H. (2012). **Antimicrobial Action of Chelating Agents: Repercussions on the Microorganism Development, Virulence and Pathogenesis.** Current Medicinal Chemistry, 19, pp. 2715-2737.

Santos, V. S. (2019). **Compostos de coordenação e suas aplicações como potenciais metalofármacos: uma nova proposta terapêutica contra leishmaniose.** Rio de Janeiro, 2019. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Scalese, G., Machado, I., Salinas, G., Pérez-Díaz, L., Gambino, D. (2021). **Heteroleptic Oxidovanadium(V) Complexes with Activity against Infective and Non-Infective Stages of *Trypanosoma cruzi*.** Molecules. 26, 5375.

Sears, Margaret E. (2013). **Chelation: Harnessing and Enhancing Heavy Metal Detoxification—A Review.** The ScientificWorld Journal, 13, pp. 1-13.

Silva, L. H. P., Nussenzweig, V. (1953). **Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco.** Fol. Clin. Biol., 20, 191-207.

Siqueira, Ari M. (2006). **Subfilo Mastigophora.** In: Parasitologia Humana. 11ª Ed. (São Paulo: Editora Atheneu), 2 (11), pp 37-40.

Sieveking, I., Thomas, P., Estévez, J.C., Quiñones, N., Cuéllar, M.A., Villena, J., Espinosa-Bustos, C., Fierro, A., Tapia, R.A., Maya, J.D., López-Muñoz, R., Cassels, B.K., Estévez, R.J., Salas, C.O. (2014). **2-Phenylaminonaphthoquinones and related compounds: synthesis, trypanocidal and cytotoxic activities.** Bioorg. Med. Chem., 22, pp. 4609-4620.

Souza, Cassiano C., Azevedo-França, J.A., Barrias E., Cavalcante, S.C.F., Vieira, E.G., Ferreira, A.M.C., Souza, W., Navarro, M. (2023). **Silver and copper-benzimidazole derivatives as potential antiparasitic metallodrugs: Synthesis, characterization, and biological evaluation.** Journal of Inorganic Biochemistry. 239, 112047.

Tella, Adedibu C., Obaleye, J.A. (2010). **Metal complexes as antibacterial agents: Synthesis, characterization and antibacterial activity of some 3d metal complexes of sulphadimidine.** Orbital Elec. J. Chem., 2(1), pp. 11-26.

Tyler, K., Engman, D. (2001). **The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited**. International Journal for Parasitology, 31, 472-481.

Viganor, Livia, Galdino, A.C.M., Nunes, A.P.F., Santos, K.R.N., Branquinha, M.H., Devereux, M., Kellett, A., McCann, M., Santos, A.L.S. (2016). **Anti-*Pseudomonas aeruginosa* activity of 1,10-phenanthroline-based drugs against both planktonic- and biofilm-growing cells**. Antimicrob. Chemother., 71, pp. 128–134.

Viganor, Livia, Howe, O., McCarron, P., McCann, M., Devereux, M. (2017). **The antibacterial activity of metal complexes containing 1,10-phenanthroline: potential as alternative therapeutics in the era of antibiotic resistance**. Curr. Top. Med. Chem., 17, pp. 1280–1302.

Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Alvarez, M.G., Petti, M., Bertocchi, G., Armenti, A. (2009). **Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities**. Expert Rev. Anti. Infect. Ther., 7 (2), pp. 157-63.

Williams, David R., Halstead, B.W.. (1982). **Chelating Agents in Medicine**. Clin. Toxicol., 19 (10), pp. 1081-1115.

Wojciechowska, Agnieszka, Bregier-Jarzębowska, R., Komarnicka, U.K., Koziel, S., Szuster- Ciesielska, ASztandera-Tymoczek, M., Jarzab, A., Staszak, Z., Witkowska, D., Bojarska- Junak, A., Jezierska, J. (2021). **Isothiocyanate L– argininato copper(II) complexes – Solution structure, DNA interaction, anticancer and antimicrobial activity**. Chemico-Biological Interactions. 348, e1096436.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2010). **Chagas disease (American trypanosomiasis) fact sheet (revised in June 2010)**. Wkly. Epidemiol. Rec., 85, pp. 334-336.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2015). **Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates**. Wkly Epidemiol. Rec, N. 6, pp. 33-43.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2018). **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em <https://cdn.who.int/media/docs/default-source/ntds/chagas-disease/chagas-2018-cases.pdf?sfvrsn=f4e94b3b_2>. Acesso em: 15/02/2022.

Zingales, B. (2018). ***Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity**. Acta Tropica, 184, 38-52.