



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

YASMIM MENDES ROCHA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *in vitro* DOS DERIVADOS SINTÉTICOS DE N-CICLOHEXIL-3(3-METILFENIL)-1,2,4-OXADIAZOL-5-AMINA SOBRE A CEPA Y DE *Trypanosoma cruzi* E UM ESTUDO DE TOXICIDADE *in vivo*

Orientador: Roberto Nicolete
Co-orientadora: Alice Maria Costa
Martins

FORTALEZA – CEARÁ

2026

YASMIM MENDES ROCHA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *in vitro* DOS DERIVADOS SINTÉTICOS DE N-CICLOHEXIL-3(3-METILFENIL)-1,2,4-OXADIAZOL-5-AMINA SOBRE A CEPA Y DE *Trypanosoma cruzi* E UM ESTUDO DE TOXICIDADE *in vivo*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia para a saúde.

Linha de Pesquisa: Biologia para Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Nicolete.

Co-orientadora: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins

FORTALEZA

2026

FICHA CATALOGRÁFICA

YASMIM MENDES ROCHA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *in vitro* DOS DERIVADOS SINTÉTICOS DE N-CICLOHEXIL-3(3-METILFENIL)-1,2,4-OXADIAZOL-5-AMINA SOBRE A CEPA Y DE *Trypanosoma cruzi* E UM ESTUDO DE TOXICIDADE *in vivo*

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, da Universidade Federal do Ceará.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Clarissa Romero Teixeira
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-CE)

Profa. Dra. Gabriela Silva Cruz
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Prof. Dra. Ketlen Christine Ohse
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-CE)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser meu sustento e refúgio em todos os momentos.

À minha família, em especial à minha mãe, Angélica, minha maior inspiração de força, perseverança, fé e temor a Deus. Mãe, você é a base de tudo o que eu sou e conquistei. Obrigada por cada renúncia, por nunca medir esforços, por cada palavra de incentivo e por todo amor que sempre me sustentou. Essa conquista também é sua. Sem você, nada disso seria possível.

Ao meu irmão, pelas implicâncias de sempre, mas, sobretudo, pelo amor e cuidado que tem por mim. Meu sobrinho, Murilo, te amo.

A família que Deus colocou em minha vida, a Paulina (minha “cunhas”) e ao Jerry, meu padrasto, por amar e cuidar tão bem da minha mãe.

À minha vó Zilar (*in memoriam*), que foi essencial no meu crescimento e amadurecimento como mulher. Eu te amarei para sempre, minha princesa.

Ao meu amor, João Paulo da Guia, por estar ao meu lado em todos os momentos, dividindo comigo as angústias, as incertezas e também as conquistas. Obrigada por viver esse processo comigo, com paciência, apoio e companheirismo. Eu te amo muito!

Ao meu orientador, Roberto Nicolete, por ter me acolhido em 2019, como sua aluna de iniciação científica, por ter caminhado ao meu lado durante o mestrado e doutorado. Sou profundamente grata pela parceria, compreensão e orientação ao longo dessa trajetória. Obrigada por tudo.

À minha coorientadora, Profa. Alice Martins, pelo suporte, parceria e por ter aberto as portas do laboratório LBFBC. Obrigada por acreditar em mim. Aos colegas do laboratório, pelo auxílio nos experimentos, em especial à Lyanna, Bruna Viana, Emanuel e Pedro Nonato.

Ao Prof. Ronaldo Nascimento e à Valentina, pela disponibilização das moléculas de estudo.

Aos amigos que a vida me deu – Gabriel, João Pedro, Igor, Janaína, Lariza, Naiara, Yuri, Daisy, Natasha, Nayane, Jully, Paulinne, Beatriz, Suelena, Cristian, Vanessa, Marlos –, por tornarem essa caminhada mais leve.

À Universidade Federal do Ceará, e em especial ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas e a todos os professores com quem tive a honra de conviver. Serei eternamente grata por toda experiência e pelo crescimento pessoal, acadêmico e profissional proporcionados.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento do projeto e pela concessão da bolsa de doutorado.

À Central Analítica da Universidade Federal do Ceará, pelo suporte nos experimentos de microscopia eletrônica, em especial ao meu amigo Marlos Chaves, pela paciência, parceria e valiosa ajuda.

À Fundação Oswaldo Cruz pelo suporte e apoios necessários para a realização deste trabalho.

À banca examinadora, pelas valiosas contribuições para o aprimoramento deste trabalho.

E, por fim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, torceram por mim e contribuíram, de alguma forma, para a realização deste sonho, o meu mais sincero agradecimento.

RESUMO

A doença de Chagas permanece como um importante problema de saúde pública na América Latina, sendo tratada principalmente com Nifurtimox e Benznidazol. Apesar de eficazes nos estágios iniciais, esses fármacos apresentam limitações, como baixa eficácia na fase crônica e efeitos adversos. Nesse contexto, compostos heterocíclicos, como os derivados de 1,2,4-oxadiazol, têm sido investigados como potenciais alternativas terapêuticas. Esse estudo teve como objetivo avaliar a atividade tripanocida e toxicidade das moléculas 2a, 2f e 2i frente à cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, por meio de ensaios *in vitro*, *in silico* e *in vivo*. Os resultados demonstraram efeito concentração-dependente sobre as formas epimastigotas, com valores de IC₅₀ de 31.4 µM, 44.4 µM e 7.0 µM, para 2a, 2f e 2i, respectivamente. Em tripomastigotas, observaram-se valores de LC₅₀ de 14.2 µM, 2.4 µM e 2.6 µM para essas mesmas moléculas, além de redução significativa da carga de amastigotas em células infectadas. O índice de seletividade foi de 15, 5.8, 9.8 e 4.7 para as moléculas 2a, 2f, 2i e benznidazol, respectivamente. As análises por citometria de fluxo indicaram comprometimento da integridade celular, indução de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, sugerindo diferentes alvos de ação das moléculas em estudo. Utilizando ensaios de neutralização de radicais livres em solução, através da atividade antioxidante e inibição da acetilcolinesterase, as moléculas em estudo demonstraram elevada capacidade de sequestro de radicais livres. Esses achados sugerem que tais compostos podem interferir no equilíbrio redox do parasito, contribuindo para o estresse oxidativo e, conseqüentemente, para os efeitos antiparasitários observados. Posteriormente, pela microscopia eletrônica de varredura foi possível observar alterações de membrana, arredondamento celular ou ausência flagelar. Entre os compostos avaliados, a molécula 2a destacou-se por apresentar melhor equilíbrio entre eficácia e seletividade *in vitro*, além de interações favoráveis com a enzima cruzafina em análises *in silico*. Nos ensaios *in vivo* com zebrafish, a molécula 2a apresentou toxicidade embrionária dependente da dose (LC₅₀~15 µM); semelhante ao bzn em concentrações mais elevadas, indicando um potencial citotóxico considerável. Em conjunto, esses achados reforçam o potencial dos derivados de 1,2,4-oxadiazol como candidatos promissores ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra a doença de Chagas, destacando a molécula 2a como alvo prioritário para estudos futuros.

Palavras-chave: Doença de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; 1,2,4-Oxadiazóis; Compostos heterocíclicos.

ABSTRACT

Chagas disease remains a significant public health problem in Latin America, primarily treated with Nifurtimox and Benznidazole. Despite initial proactive strategies, these medications have limitations, such as low efficacy in the chronic phase and adverse effects. In this context, heterocyclic compounds, such as 1,2,4-oxadiazole derivatives, have been investigated as potential therapeutic alternatives. This study aimed to evaluate the trypanocidal activity and toxicity of molecules 2a, 2f, and 2i against the *Trypanosoma cruzi* strain using *in vitro*, *in silico*, and *in vivo* assays. The results showed a concentration-dependent effect on epimastigote forms, with IC₅₀ values of 31.4 μM, 44.4 μM, and 7.0 μM for 2a, 2f, and 2i, respectively. In trypomastigotes, LC₅₀ values of 14.2 μM, 2.4 μM, and 2.6 μM were observed for these same molecules, in addition to a significant reduction in the amastigote load in infected cells. The selectivity index was 15, 5.8, 9.8, and 4.7 for molecules 2a, 2f, 2i, and benznidazole, respectively. Flow cytometry analyses indicated compromised cell integrity, induction of oxidative stress, and mitochondrial dysfunction, altering different targets of action of the molecules under study. Using free radical neutralization assays in solution, through antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition, the molecules under study showed a high capacity for scavenging free radicals. These findings suggest that such compounds may interfere with the redox balance of the parasite, contributing to oxidative stress and, consequently, to the observed antiparasitic effects. Subsequently, scanning electron microscopy revealed membrane alterations, cell rounding, or flagellar absence. Among the compositions evaluated, molecule 2a stood out for presenting a better balance between efficacy and selectivity *in vitro*, in addition to interactions developed with the cruzipain enzyme in *in silico* analyses. In *in vivo* assays with zebrafish, molecule 2a showed dose-dependent embryonic toxicity (LC₅₀~15 μM); similar to bzn at higher concentrations, decreasing a specific cytotoxic potential. Taken together, these findings reinforce the potential of 1,2,4-oxadiazole derivatives as promising candidates for the development of new therapeutic strategies against Chagas disease, highlighting molecule 2a as a priority target for future studies.

Keywords: Chagas disease; *Trypanosoma cruzi*; 1,2,4-Oxadiazoles; Heterocyclic compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição dos países endêmicos para a Doença de Chagas.....	19
Figura 2: Imagem ilustrativa da distribuição espacial das taxas de mortalidade relacionadas à Doença de Chagas por 100.000 habitantes, por estados de residência (2000-2019).....	20
Figura 3: Distribuição das notificações de Doença de Chagas Crônica (Janeiro de 2024).....	21
Figura 4: Evolução do número de óbitos por doença de Chagas no Nordeste brasileiro.....	23
Figura 5: Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
Figura 6: Principais vetores de importância epidemiológica de DC no Brasil.....	29
Figura 7: Principais estruturas do corpo de um triatomíneo (vista dorsal).....	30
Figura 8: Análise social, epidemiológica e entomológica pelo Programa de Apoio à Tomada de Decisão Baseada em Indicadores.....	31
Figura 9: Resíduos no sítio ativo da enzima cruzaina e sua divisão em sub-bolsas.....	43
Figura 10: Imagem ilustrativa da estrutura química das moléculas em estudo.....	49
Figura 11: efeito antiproliferativo da molécula 2a sobre as formas epimastigotas em 24 e 48 horas e das formas tripomastigotas da cepa Y em 24 horas.....	65

Figura 12: efeito antiproliferativo da molécula 2f sobre as formas epimastigotas em 24 e 48 horas e das formas tripomastigotas da cepa Y em 24 horas.....	66
Figura 13: efeito antiproliferativo da molécula 2i sobre as formas epimastigotas em 24 e 48 horas e das formas tripomastigotas da cepa Y em 24 horas.....	67
Figura 14: efeito antiamastigota da molécula 2a em cepa Y de <i>T. cruzi</i>	69
Figura 15: efeito antiamastigota da molécula 2f em cepa Y de <i>T. cruzi</i>	70
Figura 16: efeito antiamastigota da molécula 2i em cepa Y de <i>T. cruzi</i>	71
Figura 17: perfil de morte celular induzido pela molécula 2a por citometria de fluxo.....	73
Figura 18: perfil de morte celular induzido pela molécula 2f por citometria de fluxo sobre as formas epimastigotas.....	74
Figura 19: perfil de morte celular induzido pela molécula 2i por citometria de fluxo sobre as formas epimastigotas.....	75
Figura 20: formas epimastigotas tratadas com a molécula 2a e marcadas com DCF.....	76
Figura 21: formas epimastigotas tratadas com a molécula 2f e marcadas com DCF.....	77
Figura 22: formas epimastigotas tratadas com a molécula 2i e marcadas com DCF.....	77
Figura 23: efeito relativo da molécula 2a sobre o $\Delta\Psi_m$ nas formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> marcadas com Rho123.....	78
Figura 24: efeito relativo da molécula 2f sobre o $\Delta\Psi_m$ nas formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> marcadas com Rho123.....	79

Figura 25: Efeito relativo da molécula 2i sobre o $\Delta\Psi_m$ nas formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> marcadas com Rho123.....	79
Figura 26: Alterações ultraestruturais demonstradas pelas formas epimastigotas com os controles e a molécula 2a.....	81
Figura 27: Alterações ultraestruturais demonstradas pelas formas epimastigotas com as moléculas 2f e 2i.....	82
Figura 28: Redocking do ligante nativo B95 na cruzaina.....	84
Figura 29: Mapas de interação para a molécula 2a calculados usando o PLIP WEB.....	85
Figura 30: Distribuição dos valores de RMSD de B95.....	87
Figura 31: Distribuição dos valores de RMSD da molécula 2a.....	88
Figura 32: Efeito concentração-dependente na mortalidade, curva concentração-resposta e análise da sobrevivência da molécula 2a.....	89
Figura 33: Efeito concentração-dependente na mortalidade, curva concentração-resposta e análise da sobrevivência do Benznidazol.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Proporção de casos de doença de Chagas crônica segundo a forma clínica – Brasil, 6 de Janeiro de 2023 a 6 de Janeiro de 2024.....	22
Tabela 2: Valores de IC ₅₀ , LC ₅₀ , CC ₅₀ e índice de seletividade das moléculas 2a, 2f, 2i e Benznidazol.....	63
Tabela 3: Atividade antioxidante e antiacetilcolinesterásica das moléculas em estudo.....	80
Tabela 4: Os valores de afinidade e CNN foram obtidos a partir dos ensaios de docking.....	85
Tabela 5: Análises das previsões utilizando o Servidor Boltz-2.....	86
Tabela 6: Análise de RMSD dos ligantes B95 e molécula em estudo (2a).....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD	7-aminoactinomicina D
ABTS	(2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfônico))
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AX/PE	Anexina V marcada com ficoeritrina
BOD	Biochemical oxygen demand
Bzn	Benznidazol
CC ₅₀	Concentração capaz de causar citotoxicidade em 50% das células
CYP	Citocromo P450
DC	Doença de Chagas
DCA	Doença de Chagas Aguda
DCC	Doença de Chagas Crônica
DCC	Solução de arilamidoximas e diciclohexilcarbodiimida
DCF	Diclofluoresceína
DCFox	Forma oxidada de 2'7'-diclorofluoresceína
DCFH-DA	2'7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleotídeo
DNDi	Iniciativa Medicamentos para doenças negligenciadas
DPPH	(2,2-difenil-1-picril-hidrazil)
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPM	Erro padrão médio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América

H202	Peróxido de hidrogênio
HI	Hemaglutinação indireta
IC ₅₀	Concentração capaz de inibir o crescimento de 50% em epimastigotas
IFN- γ	Interferon gama
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G
IL-17	Interleucina-17
IgM	Imunoglobulina M
IS	Índice de seletividade
LLC-MK2	Células epiteliais renais de macaco
LIT	Infusão de triptose
LC ₅₀	Concentração capaz de matar 50% em tripomastigotas
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide
MW	Irradiação por microondas
Nf	Nifurtimox
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução salina tamponada com fosfato estéril
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Rho	Rodamina 123
RPM	Rotação por minuto
RNs	Espécies reativas de oxigênio
RN	Recém Nascido
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SNC	Sistema Nervoso Central
TDR	Testes de diagnóstico rápido

<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
WV	Western Blot
μM	Micrômetro
V-PE	Anexina V marcada com ficoeritrina
$\Delta\Psi\text{m}$	Potencial transmembrânico mitocondrial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Histórico e Epidemiologia da doença de Chagas	18
1.2 Ciclo biológico e fisiologia do <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
1.3 Principais vias de transmissão da doença	28
1.3.1 Transmissão vetorial	28
1.3.2 Transmissão oral	32
1.3.3 Outras formas de transmissão	33
1.4 Evolução clínica da doença de Chagas	34
1.5 Dinâmica imunológica na infecção aguda e crônica por <i>T. cruzi</i>	35
1.6 Diagnóstico laboratorial da doença de Chagas	37
1.6.1 Técnicas parasitológicas	37
1.6.2 Técnicas sorológicas	38
1.6.3 Técnicas moleculares	39
1.6.4 Testes rápidos	40
1.7 Tratamento farmacológico da doença de Chagas	41
1.7.1 Novas abordagens para o desenvolvimento de fármacos antiparasitários	43
1.8 Compostos heterocíclicos contendo o anel 1,2,4-oxadiazol	44
2. Justificativa e Relevância	47
3 OBJETIVOS	48
3.1 Objetivo Geral	48
3.2 Objetivos específicos	48
4 MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1 Obtenção das substâncias de estudo	49
4.2 Parasitos	50
4.3 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade anti <i>T. cruzi</i>	50
4.3.1 Avaliação da citotoxicidade em células hospedeiras	50
4.3.2 Avaliação sobre as formas epimastigotas	51

4.3.3 Avaliação sobre as formas tripomastigotas	52
4.3.4 Avaliação do efeito anti-amastigota	53
4.4 Citometria de fluxo	53
4.4.1 Perfil de morte celular utilizando Anexina V e 7-AAD	54
4.4.2 Análise da produção de EROs citoplasmáticas	55
4.4.3 Análise da determinação do potencial transmembrânico mitocondrial	55
4.5 Atividade antioxidante e anticolinesterásica	56
4.5.1 Amostras testes	56
4.5.2 Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	56
4.5.3 Atividade anticolinesterásica <i>in vitro</i>	57
4.6 Avaliação morfológica	57
4.6.1 Microscopia eletrônica de varredura	57
4.7 Estudos <i>in silico</i>	58
4.7.1 Estrutura da proteína e preparação do ligante	58
4.7.2 Protocolo de Ancoragem Molecular	59
4.7.3 Dinâmica Molecular	59
4.8 Toxicidade em embriões de Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	60
4.8.1 Organismo de teste	61
4.8.2 Condições de armazenamento	61
4.8.3 Condições para reprodução	61
4.8.4 Grupos	61
4.8.5 Amostra utilizada e controle	62
4.8.6 Exposição e reprodutibilidade dos dados	62
4.9 Análise estatística	52
5. RESULTADOS	63
5.1 Avaliação da toxicidade das moléculas em células hospedeiras	63
5.2 Efeito antiparasitário sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas	65

5.3 Efeito anti-amastigota	69
5.4 Análise de Citometria de fluxo	73
5.4.1 Avaliação da integridade celular e perfil de morte	73
5.4.2 Produção de EROs	75
5.4.3 Alteração no potencial transmembrânico mitocondrial	78
5.5 Atividade antioxidante e antiacetilcolinesterásica	80
5.6 Alterações morfológicas em epimastigotas por MEV	81
5.7 Análise <i>in silico</i> : Redocking	84
5.7.1 Análise e avaliação do docking	85
5.7.2 Análises das previsões do Servidor Boltz-2	86
5.7.3 Análises de Dinâmica Molecular (DM)	86
5.8 Toxicidade em embriões de Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	89
DISCUSSÃO	93
CONCLUSÃO	108
REFERÊNCIAS	109

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico e Epidemiologia da doença de Chagas

A doença de Chagas (DC), ou tripanossomíase americana, é considerada uma doença negligenciada e um grave problema de saúde pública, causada pelo parasito protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), por meio do inseto vetor, chamado triatomíneo (PÉREZ-MOLINA & MOLINA, 2018). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que mais de 7 milhões de pessoas estejam infectadas com o *T. cruzi* no mundo, especialmente a população da América Latina, sendo ainda considerada uma doença tropical negligenciada (WHO, 2025).

Estima-se que a DC cause mais de 10.000 mortes a cada ano, sendo encontrada, principalmente, em áreas endêmicas de 21 países da América Latina continental. No passado, a DC era associada como uma doença confinada às áreas rurais das regiões das Américas (CASTILLO-RIQUELME, 2017). No entanto, o perfil da doença mudou devido a crescente urbanização e o intenso movimento populacional, o que permitiu a identificação de casos da doença, principalmente por via não vetorial, em áreas não endêmicas, como América Central, América do Sul e atualmente América do Norte, causando um problema de saúde pública global (DNDi Chagas Disease Programme, 2017).

Hoje, a doença se alastra também no sul dos Estados Unidos da América (EUA), em que a primeira descrição de *T. cruzi* foi relatada no sangue de ratos-do-mato na Califórnia em 1916 (KOFOID & MCCULLOCH, 1916). Desde então, novos casos em humanos começaram a surgir, inclusive com relatos em 1995 (WOODY & WOODY, 1995). Acredita-se que essa distribuição parasitária inicial nos EUA tenha sido devido a imigrantes de El Salvador e Nicarágua. Os dados de incidência e prevalência não são claros, pois não há muita estimativa de casos recentes e documentados sobre a infecção de pessoas infectadas nos EUA, uma vez que os testes de diagnósticos são raramente realizados. No entanto, uma análise realizada em 2016 indica que há entre 240.000 e 350.000 casos, sendo os estados de Califórnia, Texas, Flórida e Nova York, em torno de 10.000 casos (MANNE-GOEHLER et al., 2016).

No entanto, acredita-se que a maioria das pessoas infectadas seja de origem latino-americana, onde adquiriu a infecção em seu país de origem, e devido à migração, acabou alcançando essas regiões não infectadas dos EUA (GASCON; BERN & PINAZO, 2010). As espécies mais comuns encontradas no sul dos EUA são *Triatoma sanguisuga*, conhecido popularmente como percevejo hematófago oriental (FIMBRES-MACIAS et al., 2023) e a ninfa de *Triatoma gerstaeckeri*, espécie peridoméstica de triatomíneo, o qual apresenta maior prevalência de infecção parasitária em cães (SALDAÑA et al., 2015).

Por outro lado, as regiões endêmicas das Américas apresentam aproximadamente 28.000 novos casos relatados anualmente (NORMAN & LÓPEZ-VÉLEZ, 2019). Já no complexo cenário epidemiológico na América do Sul, principalmente nos países Brasil, Argentina, Bolívia e Venezuela, é possível que tenha cerca de 4-5 milhões de pessoas infectadas com a doença (WHO, 2025). Abaixo, os países destacados no mapa são endêmicos para DC.

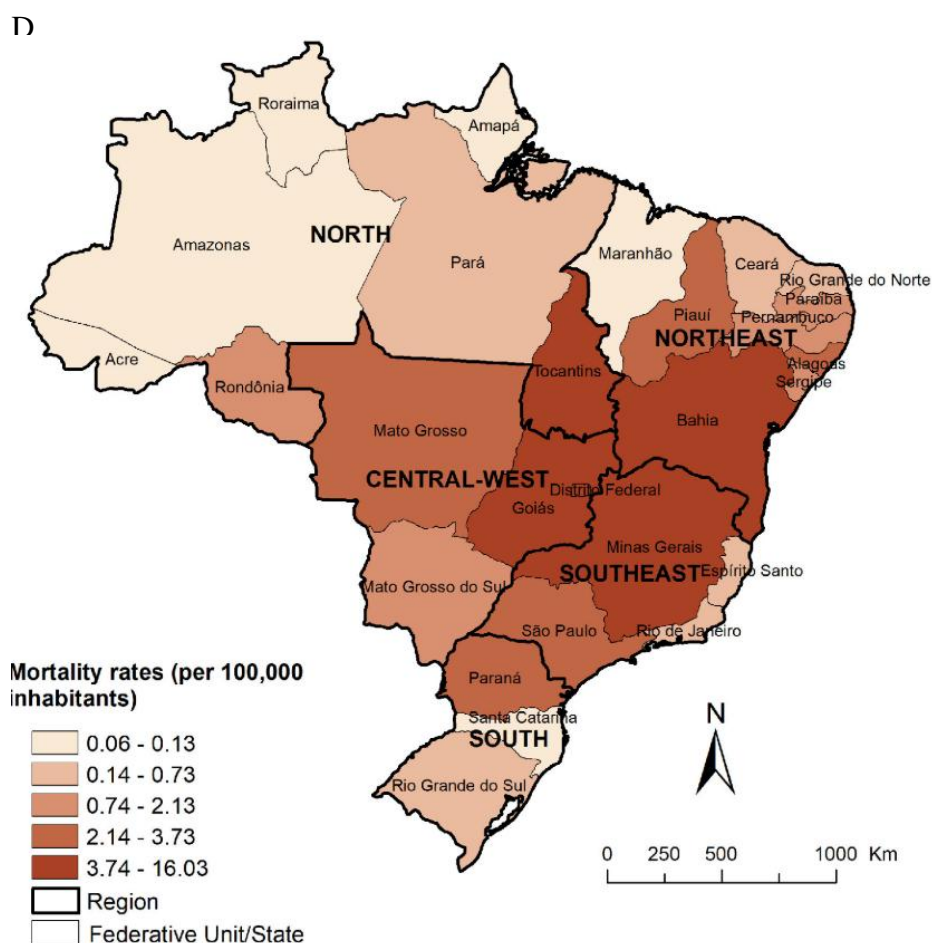
Figura 1: Distribuição dos países endêmicos para a Doença de Chagas



Fonte: plataforma Chagas (<https://dndial.org/redes-regionais/plataforma-chagas/>).

As análises do Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente do Ministério da Saúde, número especial de Abril de 2022, revelam a complexidade da DC no Brasil (BRASIL, 2022). Estima-se que a carga de mortalidade no país representa uma das quadro maiores causas de mortes por doenças infecciosas e parasitárias, por exemplo (MARTINS-MELO et al., 2015; SOUZA et al., 2024). Ainda segundo Martins-Melo & Colaboradores, (2015), há ainda uma importante e considerável variação geográfica na mortalidade da DC entre as regiões e estados brasileiros analisados. Sendo os estados de Goiás, Minas Gerais, Bahia e Tocantins, as áreas de maiores soroprevalência e infestação de *T. infestans*.

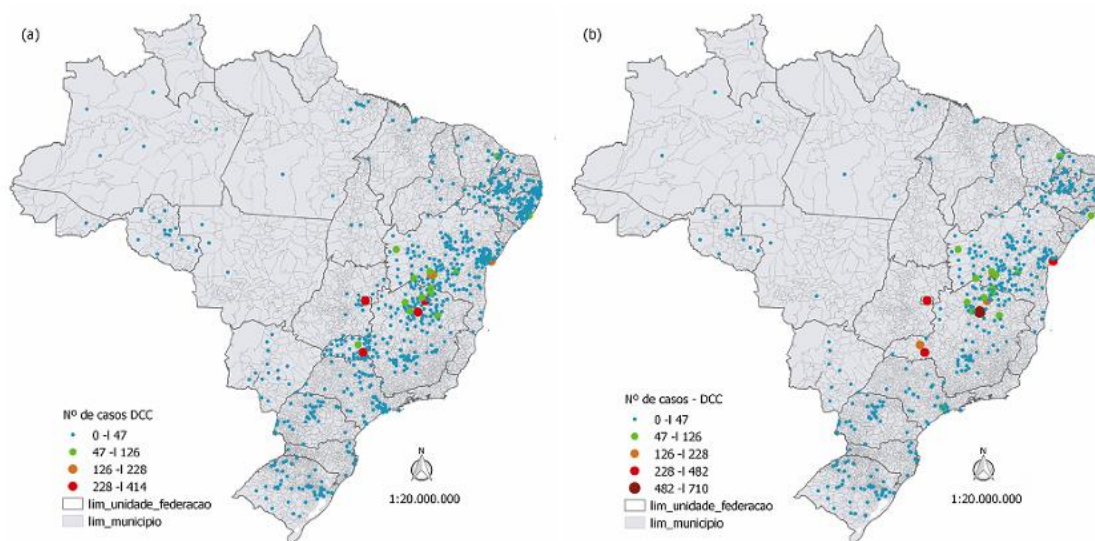
Figura 2: Imagem ilustrativa da distribuição espacial das taxas de mortalidade relacionadas à Doença de Chagas por 100.000 habitantes, por estados de residência (2000-2019).



Legenda: taxas de mortalidade; região; unidade federativa. **Autor:** Martins-Melo et al., 2012.

De acordo com e-SUS Notifica, a maioria das notificações (63%) corresponde à pessoas residentes em zona urbana, o que afirmam Ramos & Alberto (2024), por meio do Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde, ao destacarem que a atual transição demográfica, impulsionada pelos processos de migração populacional no país, tem contribuído para urbanização da DC e ampliação de seu impacto nas áreas urbanas brasileiras.

Figura 3: Distribuição das notificações de Doença de Chagas Crônica (Janeiro de 2024).



Legenda: notificações de DCC por município de residência (a) e de notificação (b) no Brasil de 6 de Janeiro de 2023 a 6 de Janeiro de 2024.

No Brasil, é prevalente a fase crônica da doença de Chagas (DCC), embora nos últimos anos tenham ocorrido notificações expressivas de DC aguda (DCA), sendo a região amazônica considerada historicamente endêmica para DCA (DE BARROS MOREIRA BELTRÃO et al., 2009; VALENTE et al., 2009). A DC cardíaca crônica é ainda mais evidente, com maior percentual (~53%), enquanto a forma digestiva crônica é menor (~25%), os quais sofrem variações a depender da diversidade da cepa de *T. cruzi*, idade do paciente e histórico genético ou nível de exposição do parasito em uma determinada região (NASCIMENTO et al., 2024).

As cardiopatias se apresentam em três formas de apresentação clínica, sendo elas a síndrome arritmica, insuficiência cardíaca e complicações tromboembólicas sistêmicas

e pulmonares (RAMOS & ALBERTO, 2024). Ressalta-se, pela tabela 1, que os pacientes notificados apresentavam algum tipo de cardiopatia, sendo 24% leve ou moderada e 18% avançada.

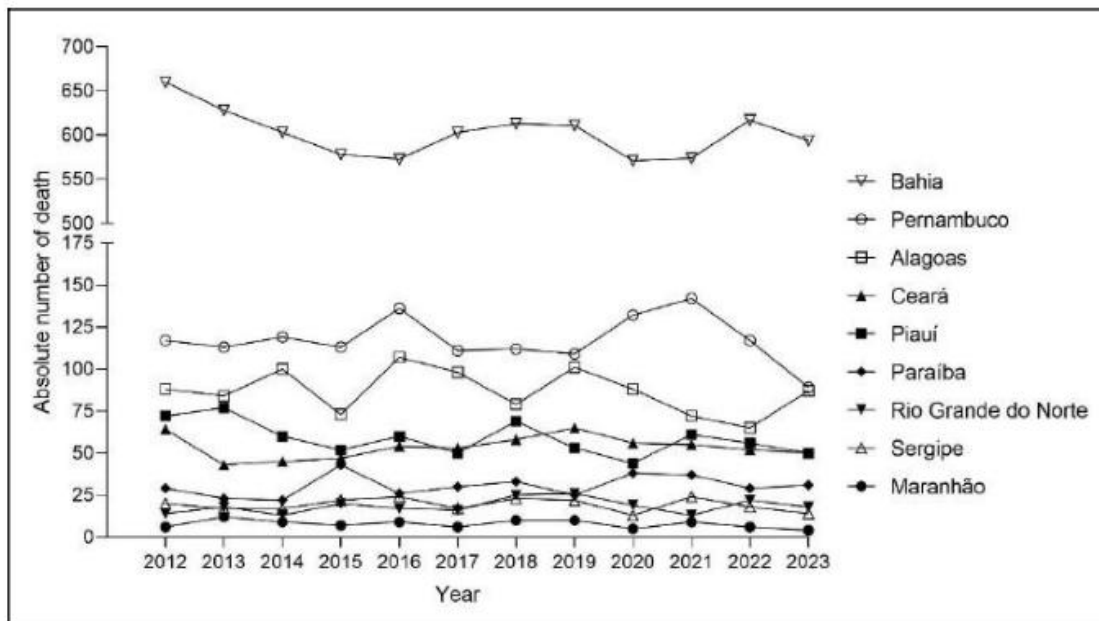
Tabela 1: Proporção de casos de doença de Chagas crônica segundo a forma clínica – Brasil, 6 de Janeiro de 2023 a 6 de Janeiro de 2024.

Forma clínica	Notificações de DCC	
	Nº	%
Cardíaca avançada	452	18%
Cardíaca leve/moderada	611	24%
Cardiodigestiva	168	7%
Digestiva	118	5%
Em investigação	329	13%
Indeterminada	834	33%
Total	2.512	100%

Legenda: Adaptada de Fonte: e-SUS Notifica. Dados preliminares, sujeitos à alteração. DCC: Doença de Chagas Crônica.

Ao analisar as distribuições dos municípios brasileiros, especialmente na região Nordeste do Brasil, nota-se que há grande preocupação em termos de risco de transmissão pela doença, que se dá, principalmente, pelas baixas condições socioeconômicas, pelas moradias propícias aos triatomíneos e ao baixo controle da DC (FREITAS et al., 2007; CARNEIR; DA SILVA & SANTOS, 2025). O estado da Bahia, por exemplo, registrou o maior número de óbitos para todas as formas clínicas, seguido por Pernambuco, Alagoas, Ceará, Piauí, Paraíba, Rio Grande do Norte, Sergipe e Maranhão, conforme relatado por Higino & De Araújo Soares, 2025.

Figura 4: Evolução do número de óbitos por doença de Chagas no Nordeste brasileiro (2012-2023)



Legenda: Fonte: Dados da Pesquisa (2025).

O município de Fortaleza além de concentrar populações, também é um pólo receptor de migrantes vindo de áreas endêmicas de outras regiões. Com elevado número de casos confirmados e diagnosticados, o estado do Ceará registrou um total de 962 de 2015-2021, com percentuais (%) de proporção de positividade da infecção por *T. cruzi* de 3,19%, 3,57%, 4,63%, 4,55% e 4,10%, nos respectivos anos (Sales; Almeida & De Oliveira, 2024).

Nos municípios de Tauá-CE, no sertão dos Inhamuns e Limoeiro do Norte, por exemplo, a infestação domiciliar por *T. brasiliensis* foi evidente nos dois municípios. No entanto, a captura de espécies nativas de triatomíneo, como *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* e *Rhodnius nasutus*, é ampla, contemplando diferentes taxas de infecção natural por *T. cruzi*, encontradas em cidades como Paraíba, Pernambuco, Bahia, Rio Grande do Norte e Ceará (SAMPAIO et al., 2023).

No estudo relatado por Bezerra & Colaboradores (2020), o autor avaliou 18 vilas rurais, em habitats peridomiciliares, silvestres e intradomiciliares, totalizando 242 casas. As análises epidemiológicas, a compreensão da distribuição e características geográficas fornecem informações para orientar políticas de saúde pública e analisar diferentes

estratégias para prevenção e controle da doença, além de proporcionar melhores qualidades de vida para as comunidades afetadas (DA COSTA MATOS et al., 2024).

1.2 Ciclo biológico e fisiologia do *T. cruzi*

O protozoário hemoflagelado é um parasito heteroxênico, de classe *Kinetoplastea*, ordem *Trypanosomatida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Trypanosoma* e espécie *Trypanosoma cruzi* se desenvolve em insetos hematófagos da família *Reduviidae* (D'AVILA-LEVY et al., 2015). Ainda segundo o autor, o *T. cruzi* alterna por infectar hospedeiros vertebrados e invertebrados, o qual passa por ciclos de diferenciação complexos. Estes tripanossomas são organismos unicelulares, conhecidos por possuírem um único núcleo localizado no centro de seu corpo.

O *T. cruzi* sofre mudanças morfológicas durante o seu desenvolvimento, na qual compreende três principais formas evolutivas morfológica e funcionalmente distintas, sendo as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas (AVALOS-BORGES et al., 2022). A forma epimastigota é não infecciosa e está presente no intestino superior do inseto, que antes de infectar os mamíferos, ainda no intestino médio do vetor, passam por mudanças na sua morfologia, metabolismo e expressão gênica, se transformando em tripomastigotas metacíclicas, pelo processo conhecido como metaciclogênese (GONÇALVES et al., 2018).

Estas formas tripomastigotas, não proliferativas e infectantes, colonizam humanos e são tipicamente fusiformes, possuem organelas, como glicossomos, acidocalcissoma, vacúolo citoplasmático e reservossomo, exclusivos desses parasitos (ENNES-VIDAL et al., 2020). Logo após o cinetoplasto, uma série de microtúbulos constituem o corpo basal que se estende ao longo da membrana até a extremidade oposta do parasito. A bolsa flagelar é formada por túbulos membranosos flagelares (CONTRERAS et al., 1985; AUGUSTO et al., 2024).

As formas intracelulares amastigotas são replicativas obrigatórias nas células dos mamíferos, possuem morfologia arredondadas e flagelos encurtados, as quais sofrem replicação até retornarem novamente ao estágio de tripomastigotas, completando, assim, o seu ciclo lítico (DE SOUZA, 1985; ALVES & BASTIN, 2023). Curiosamente, estes flagelos encurtados das formas amastigotas não são inertes, ou seja, estes apresentam

flagelos móveis, que dependem da fosforilação oxidativa do parasito, desempenhando papel sensorial e de interação com as organelas da célula hospedeira (WON et al., 2023).

O ciclo de vida do parasito é do tipo heteroxênico e inicia quando o vetor não infectado faz o repasto sanguíneo no hospedeiro mamífero infectado contendo as formas tripomastigotas metacíclicas infectantes, ou também chamadas de tripomastigotas sanguíneas (CHIRIBAO et al., 2014). No intestino médio do inseto vetor, as formas tripomastigotas começam a sofrer conformação, se transformando em epimastigotas. Estas formas replicativas se multiplicam por divisão binária, colonizando todo o intestino do triatomíneo.

Posteriormente, já na porção posterior e na ampola retal, estas formas se aderem ao epitélio intestinal, amadurecendo e transformando-se novamente em tripomastigota metacíclica, um estágio não replicativo e infectante (DE SOUZA et al., 2010). Após um novo repasto sanguíneo, as formas tripomastigotas metacíclicas são excretadas sobre superfícies, as quais irão contaminar pele ou as mucosas do hospedeiro mamífero, causando infecção nas células epiteliais e completando, assim, o seu ciclo (AVALOS-BORGES et al., 2022).

O que leva à contaminação é o fato de que, após a picada do inseto, o local de entrada apresenta prurido, e o indivíduo, quase que involuntariamente, coça a região, arrastando as fezes através da injúria da lesão cutânea formada. Após o contato com a membrana das células, estas induzem um processo de formação de pseudópodes, o que causa a internalização parasitária (TANOWITZ et al., 2009; PÉREZ-MOLINA & MOLINA, 2018). Ainda segundo Chiribao & Colaboradores (2014), o *T. cruzi* consegue invadir praticamente qualquer tipo de célula, tornando-a em termos de profilaxia e terapêutica, uma doença parasitária complexa e difícil de contenção.

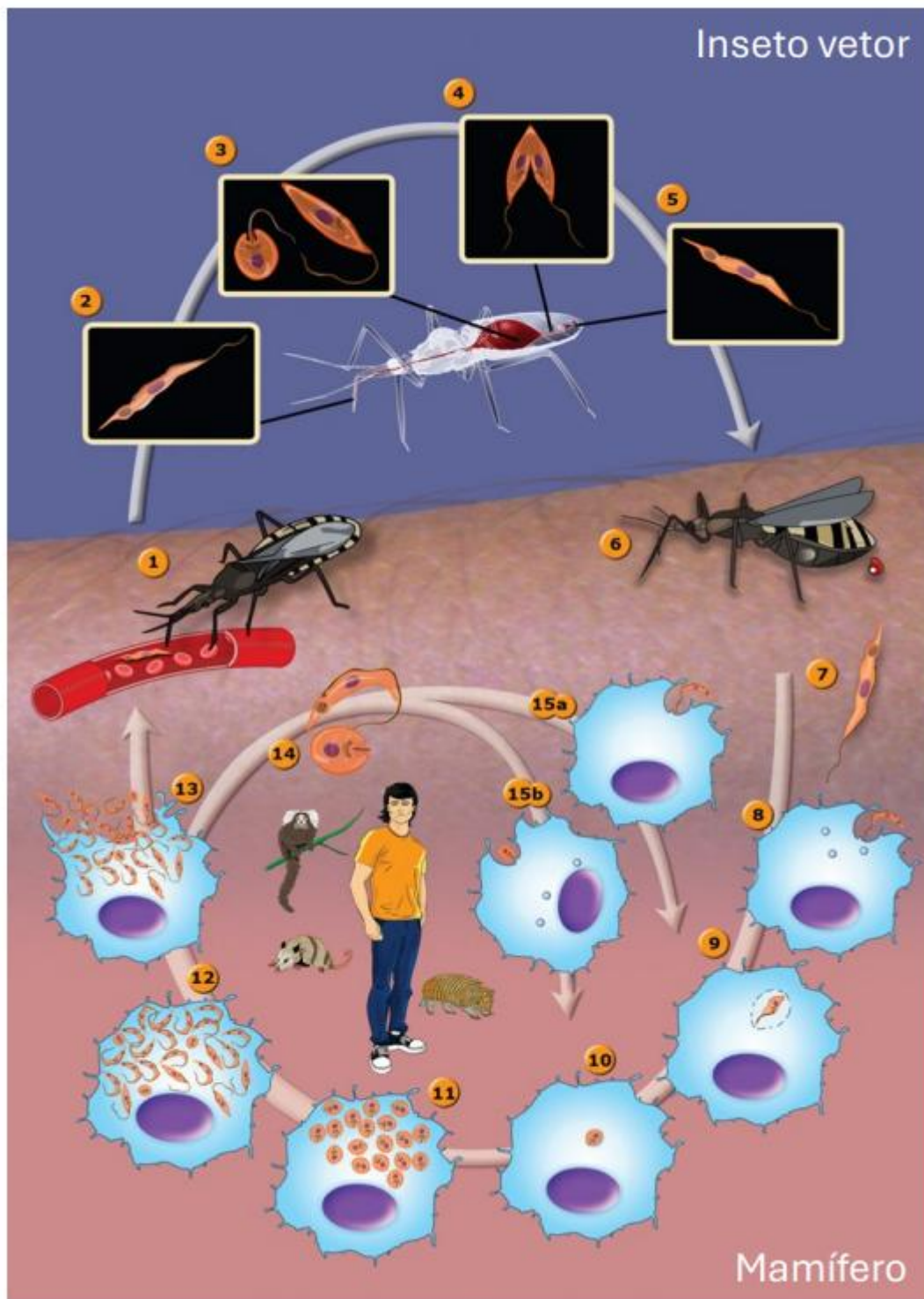
Após a internalização das formas tripomastigotas metacíclicas e sua interação inicial com praticamente todas as células do hospedeiro, a maioria dos estudos concentra-se na infecção de macrófagos, os quais fagocitam os parasitos, que permanecem temporariamente no interior de vacúolos parasitóforos (CARADONNA & BURLEIGH, 2011). Esses vacúolos são importantes para o estabelecimento da infecção intracelular, uma vez que as formas tripomastigotas interagem, por meio de moléculas de superfície,

com componentes da membrana da célula hospedeira, desencadeando alterações metabólicas e de sinalização que favorecem a infecção (MAEDA et al., 2012).

Segundo Weisbarth & Colaboradores (2018), os tripomastigotas diferenciam-se em amastigotas, enquanto à medida que o vacúolo parasitóforo se desfaz. Uma vez no interior da célula, as formas amastigotas se multiplicam por fissão binária até que a célula hospedeira se rompa, transformando-se novamente em tripomastigotas sanguíneos. À medida que ocorre a lise celular, os tripomastigotas são liberados e se disseminam pelos vasos linfáticos e corrente sanguínea, infectando novas células e tecidos subjacentes ampliando a infecção (DE SOUZA et al., 2010).

Essa transição representa uma etapa crítica no ciclo de vida do *T. cruzi*, uma vez que as formas amastigotas apresentam capacidade de replicação e proliferação intracelular. Após intensa proliferação, os parasitos ocupam tecidos e podem dar continuidade ao seu ciclo de infecção nas células hospedeiras, o que contribui para a persistência da infecção e dificuldade de cura (VANRELL et al., 2022).

Figura 5: Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*



Legenda: Adaptado de Zuma; Barris & Souza (2021).

Simplificando o resumo exemplificado pela figura 5 do artigo de Zuma; Barris & Souza (2021): em (1), o triatomíneo realiza o repasto sanguíneo com as formas tripomastigotas metacíclicas. Em (2-3), no intestino médio ocorre a transformação em

epimastigotas e a multiplicação por divisão binária. Em (4-5), há migração para o intestino posterior, com ocorre a diferenciação em tripomastigotas metacíclicos. Em (6), o inseto realiza o repasto e permite que os tripomastigotas metacíclicos, permitindo sua deposição na pele hospedeira. Em (7-8-9), os tripomastigotas adentram a pele ou mucosas lesionadas, as quais invadem as células do hospedeiro, principalmente macrófagos. Em (10-11), os tripomastigotas diferenciam-se em amastigotas e se multiplicam. Em (12-13-14), após intensa multiplicação, rompem as células hospedeiras e invadem outras células e tecidos. Por fim, em (15a-15b), os tripomastigotas são ingeridos por um novo triatomíneo durante o repasto sanguíneo, mantendo o ciclo do parasito.

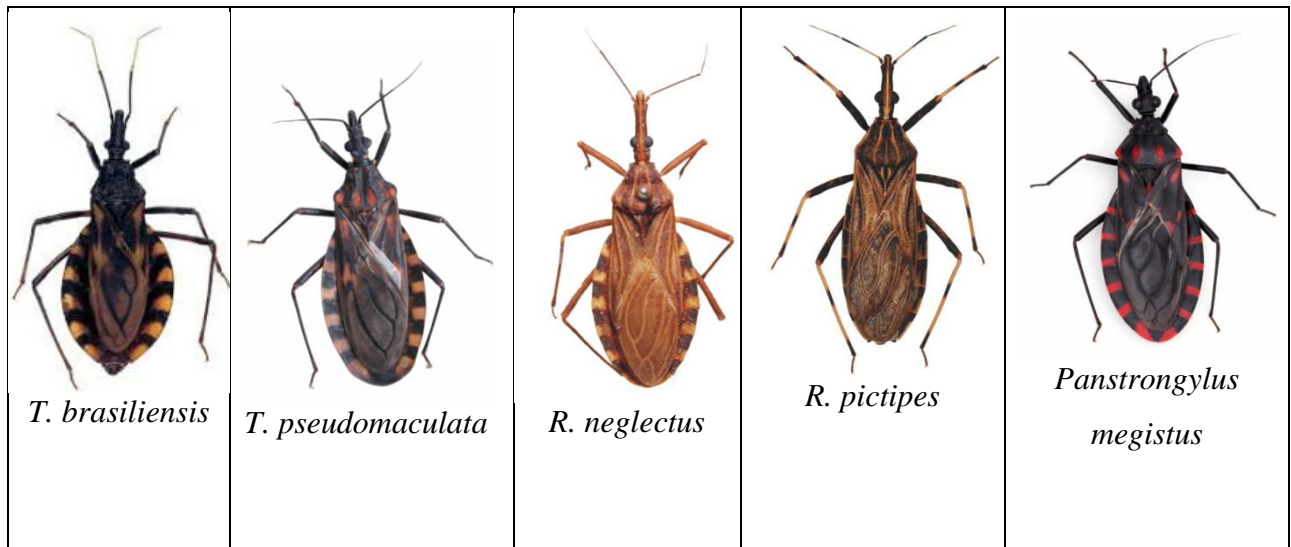
1.3 Principais vias de transmissão da doença

1.3.1 Transmissão vetorial

As principais vias de transmissão da DC podem ser classificadas em diferentes rotas, sendo a transmissão vetorial, a forma clássica de contágio através do triatomíneo hematófago, apresentando um período de incubação da doença de 4 a 15 dias (CARDINAL et al., 2018). Esse tipo de transmissão está diretamente associado à altos índices de vulnerabilidade social, como as desigualdades socioeconômicas em nível domiciliar ou peridomiciliar. Essas evidências corroboram com condições de vulnerabilidade social como o principal determinante estrutural da DC (AAGAARD-HANSEN et al., 2010; GONÇALVES et al., 2024).

A distribuição dos triatomíneos no Brasil classifica as espécies em domiciliares, peridomiciliares e silvestres, tendo como principais espécies de maior importância o *Triatoma sp.*, *Rhodnius sp.* e *Panstrongylus sp.*, o que vai depender das condições biogeográficas, morfológicas ou climáticas (CECCARELLI et al., 2020).

Figura 6: Principais vetores de importância epidemiológica de DC no Brasil.



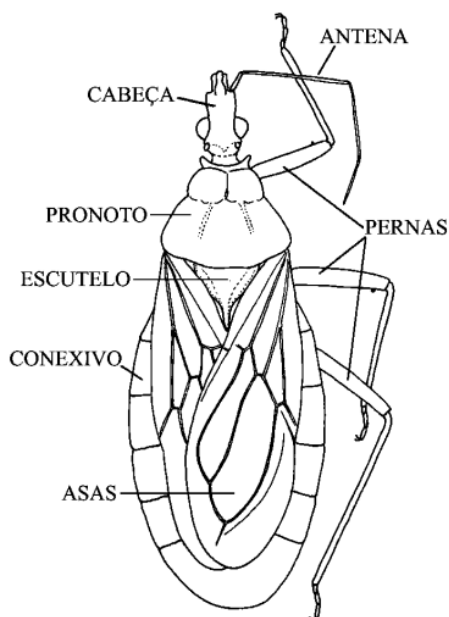
Legenda: Figura ilustrativa que mostra os principais triatomíneos de importância epidemiológica no Brasil. *Triatoma brasiliensis*; *Triatoma pseudomaculata*; *Rhodnius neglectus*; *Rhodnius pictipes*; *Panstrongylus megistus*. Imagem adaptada de JURBERG & Colaboradores (2014).

De acordo com o atlas iconográfico dos triatomíneos do Brasil, o *T. brasiliensis* tem tamanho de 22-25,5 mm, presente, principalmente em Alagoas, Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe e Tocantins (JURBERG et al., 2014). Enquanto o *T. pseudomaculata*, encontra-se em Alagoas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe e Tocantins (JURBERG et al., 2014).

Ao passo que o *R. neglectus* e *R. pictipes*, estão presentes no Amapá, Amazonas, Bahia, Distrito Federal, , Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Paraná, São Paulo e Tocantins (JURBERG et al., 2014). Ainda segundo Jurberg & Colaboradores (2014), *P. megistus* está presente em Alagoas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Sergipe, Santa Catarina e Tocantins.

Assim como todos os insetos, os triatomíneos também possuem o corpo dividido em cabeça, tórax e abdomen. Na cabeça, está localizada o tubérculo antenífero, onde estão as antenas, os quais são extremamente importantes na identificação de alguns gêneros de barbeiros.

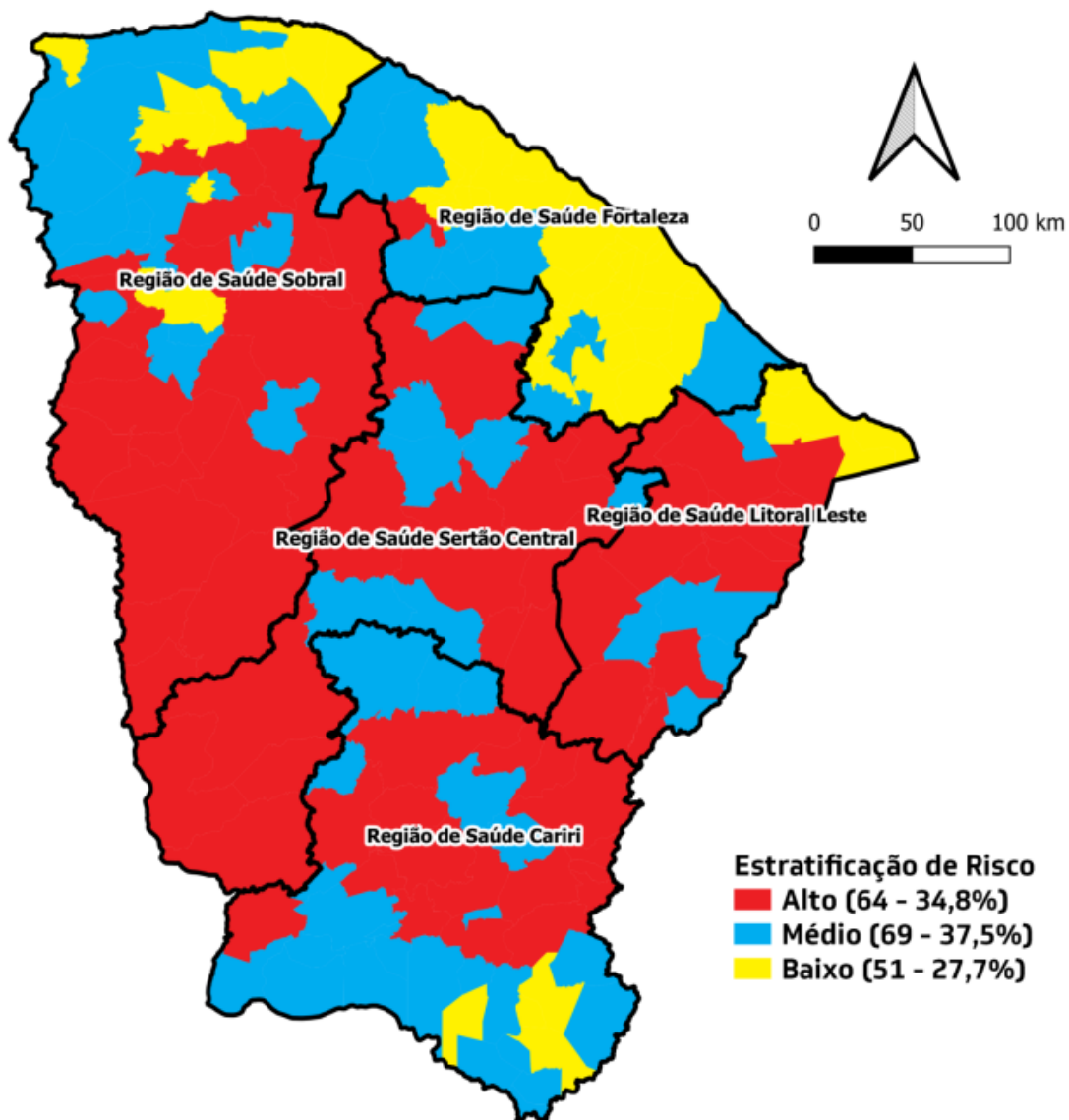
Figura 7: Principais estruturas do corpo de um triatomíneo (vista dorsal).



Legenda: estruturas morfológicas externas, como cabeça, antena, pronoto, escutelo, asas, conexivo e pernas. Imagem de JURBERG & Colaboradores (2014).

Ao realizar um estudo das glândulas salivares de algumas espécies de triatomíneos, principalmente *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infectans*, foi percebido que havia intensa atividade serotoninérgica lóbulo posterior, indicando se tratar de um órgão extensamente ativo durante o repasto sanguíneo (ANHÊ, 2011). Em 2020, foi realizada uma estratificação nos municípios conforme o risco por transmissão vetorial de DC no Ceará.

Figura 8: Análise social, epidemiológica e entomológica pelo Programa de Apoio à Tomada de Decisão Baseada em Indicadores.



Legenda: Análise mostra a estratificação de risco por região, sendo as regiões de risco: Sobral, Cariri, Sertão Central e Litoral Leste (https://www.saude.ce.gov.br/wp-content/uploads/sites/9/2018/06/boletim_doenca_de_chagas_20211201.pdf). Ano 2021.

1.3.2 Transmissão oral

No contexto da elevada prevalência de infecção pela DCC, a transmissão por via oral foi bastante associada com o avanço do desmatamento, principalmente, gerando alterações na biodiversidade da vida e dos ciclos silvestres de vetores e animais. Segundo a Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (2026), atualmente, a transmissão oral é responsável por mais de 80% dos casos agudos notificados em certas regiões e localizações geográficas, como por exemplo, na região Norte.

Pinto & Colaboradores (2008), realizaram um estudo envolvendo 233 casos de DCA, entre 1988 e 2005, de áreas urbanas dos estados do Pará, Amapá e Maranhão, demonstrando que entre os casos analisados, mais de 78% faziam parte de surtos por transmissão oral. Como consequência, alimentos podem ser contaminados após o processamento, como é o caso do caldo de cana, açaí, babaçu e buriti, bem como a ingestão de carne crua ou mal cozida de mamíferos infectados com o triatomíneo ou suas fezes (FRANCO-PAREDES et al., 2020).

O período de incubação para a transmissão após a ingestão oral, é de no máximo 22 dias após a exposição, sem sinais de entrada do parasito, mas exantema e manifestações cardíacas são mais comuns na doença por esse tipo de transmissão (SHIKANAI YASUDA, 2022). Além desses, outros sintomas sistêmicos são notados na transmissão por via oral, como edema facial e de membros inferiores, mialgia, linfadenopatia generalizada, desconforto abdominal, dispneia, vômitos, diarreia, hepatomegalia, esplenomegalia, cefaleia, erupção cutânea eritematosa, epistaxe, entre outros (BASTOS et al., 2010; RINCÓN-ACEVEDO et al., 2021).

Normalmente, observam-se diferenças entre a transmissão vetorial e oral pela rapidez na resposta imune sistêmica observada em pacientes com DCA oral, além disso, a carga parasitária em alimentos contaminados são maiores em comparação com a via vetorial, o que resulta em sinais e sintomas clínicos mais acentuados. Segundo Franco-Paredes & Colaboradores (2020), estima-se que um único triatomíneo infectado por *T. cruzi*, por exemplo, quando esmagado, possa contar cerca de 600.000 tripomastigotas metacíclicos, uma vez que eles conseguem sobreviver por horas nesses alimentos, tanto em temperatura ambiente quanto em refrigeração.

O maior surto urbano relatado foi relatado em uma escola na Venezuela, em que mais de 100 indivíduos, incluindo alunos e funcionários desenvolveram manifestações agudas de DC, isso porque foi feito a preparação de um suco de goiaba que foi deixado destampado por 24h, permitindo a contaminação noturna pelo inseto vetor (NOYA et al., 2015). Outras vias de transmissão podem ocorrer, como por exemplo, de forma congênita, os quais foram relatados na Espanha (MUÑOZ et al., 2009), EUA (ALARCÓN et al., 2016), Itália (RODARI et al., 2018), Suíça (JACKSON et al., 2009), França (PULL et al., 2015) e Irlanda (STONE et al., 2022).

Apesar da gravidade da doença, a maioria dos recém-nascidos (RN) infectados são assintomáticos, no entanto, se o tratamento não ocorrer ou demorar, a doença pode progredir para a fase crônica indeterminada, com menor taxa de sucesso ao tratamento (HOWARD et al., 2014). Ainda segundo o autor, mesmo diante desse cenário, o rastreamento de gestantes é crucial, visto que esses RNs infectados, diagnosticados e tratados durante o primeiro ano de vida, possuem quase 100% de chance de cura parasitológica e baixos riscos de efeitos adversos.

A transmissão congênita também foi registrada em países não endêmicos, destacando a importância da migração de gestantes infectadas, evidenciando o impacto na saúde e os fatores de risco para as populações não afetadas (CARLIER et al., 2015; CURA et al., 2017). Dados atualizados do CDC (2026) confirmam que a taxa de transmissão vertical do *T. cruzi* é estimada em 1-5%, e recém-nascidos tratados no primeiro ano de vida apresentam taxa de cura superior a 90%.

1.3.3 Outras formas de transmissão

Outras formas de transmissão podem ocorrer, como a forma acidental, em ambiente laboratorial, com tempo de incubação de até 20 dias, por transfusão de sangue, através de hemocomponentes ou hemoderivados infectados e por transplante de órgãos ou tecidos, com tempo de incubação de 30-40 dias (CECCARELLI et al., 2020). Tolezano et al., (1992) já relatava que a via de transmissão por transfusão de sangue, assim como a de transplante, era uma preocupação, chegando a surgir os primeiros casos comprovados no Brasil e em outros países da América Latina.

Segundo Silva & Colaboradores (2010), o fato de as doações de sangue serem remuneradas, ainda na década de 70, fez com que um grande número de pessoas realizasse a doação de sangue, sem nenhum controle do transfundido. Somente a partir de 1976, que o Ministério da Saúde definiu a necessidade de doação voluntária e hemocentros públicos.

1.4 Evolução clínica da doença de Chagas

Diferentes manifestações clínicas na DC podem surgir, apresentando-se em duas fases clínicas distintas: fase aguda e crônica, de acordo com a evolução clínica e o perfil laboratorial do paciente. Clinicamente, a fase aguda é caracterizada por uma intensa parasitemia e, na maioria dos casos, assintomática, com manifestações clínicas inespecíficas. Esta fase pode durar cerca de dois meses, e o paciente pode apresentar febre, mal-estar, edema subcutâneo e hepatoesplenomegalia (PRATA, 2001).

No entanto, em casos sintomáticos, o indivíduo pode apresentar os sinais clássicos da infecção, como o chagoma de inoculação, sinal de Romanã e manifestações sistêmicas. Graças aos hemocentros e as pesquisas laboratoriais internas, a incidência de infecção aguda diminuiu substancialmente (MARIN-NETO et al., 2002). Todavia, alguns indivíduos podem progredir para a fase indeterminada da doença graças à sua resposta imunológica, definida pela presença de infecção e confirmada pelos exames sorológicos e parasitológicos. Entretanto, os pacientes podem permanecer nessa fase por vários anos, tendo seus exames de eletrocardiograma e radiológicos normais.

Estima-se que, entre os pacientes na fase crônica, cerca de 60% permaneça na forma indeterminada assintomática por décadas, enquanto aproximadamente 30% evoluem para a cardiomiopatia chagásica crônica e 10% desenvolvem manifestações digestivas, seja isoladas ou associadas à forma cardíaca (FRADE et al., 2025). Na verdade, a doença crônica cardíaca – ou também comumente chamada de cardiomiopatia chagásica – é a manifestação mais comum e grave da DC, uma vez que a persistência parasitária leva a destruição tecidual e inflamação crônica persistente (BILLICK & SILVERBERG, 2023).

De fato, as características histopatológicas da cardiomiopatia chagásica apresentadas por Silva & Colaboradores (2024), relatam que havia comprometimento em todas as câmaras cardíacas, além de espessamento focal, destruição tecidual, fibrose

intersticial e disfunção ventricular geral. Além disso, a destruição de células miocárdicas e a fibrose difusa predis põem à ocorrência de bloqueios atrioventriculares e disfunção do nó sinusal, podendo determinar o pior prognóstico e levar à morte (TORRES et al., 2022).

Embora em menor proporção, alguns pacientes também podem desenvolver alterações anatômicas e funcionais do esôfago e cólon, além de insuficiência digestiva, neuronal e manifestações digestivas, como redução da mobilidade do trato gastrointestinal (D'ÁVILA et al., 2018). Por exemplo, em um estudo de coorte, com revisão de prontuários e arquivos laboratoriais, pacientes atendidos em um ambulatório no sudeste do Brasil evoluíram para as formas cardíacas e digestivas, associadas à síndrome coronariana e megaesôfago (NUNES DA COSTA; VICTÓRIA & FORTALEZA, 2021).

Os fármacos antiparasitários são eficazes na fase aguda, principalmente, no entanto, não revertem as alterações cardíacas ou digestivas já estabelecidas na fase crônica. Um ensaio randomizado, por exemplo, demonstrou que o tratamento com o Bzn não reduziu a progressão da cardiomiopatia chagásica em pacientes na fase crônica (MENAI et al., 2023).

1.5 Dinâmica imunológica na infecção aguda e crônica por *T. cruzi*

Sabe-se que a alta parasitemia na fase aguda está diretamente relacionada à disseminação de *T. cruzi* nos tecidos a partir de sucessivas replicações intracelulares. Com o auxílio do sistema imunológico adaptativo, ocorre o controle da parasitemia, levando o paciente a evoluir para a fase indeterminada da doença (LANNES-VIEIRA et al., 2023). Nesse contexto, a disseminação sistêmica do *T. cruzi* induz uma intensa resposta imunológica do hospedeiro, desencadeando uma cascata de eventos inflamatórios como sinal gerado pela presença de um agente patogênico.

A combinação de mecanismos efetores desenvolvidos da imunidade inata e adaptativa é determinante para a resistência do hospedeiro contra a infecção pelo *T. cruzi* (CESTARI & RAMIREZ, 2010). Independentemente dos mecanismos envolvidos na patogênese da doença, é a resposta imunológica do hospedeiro que vai desempenhar um papel central na modulação da patogênese e na eliminação do parasito, uma vez que

depende da interação das células imunes para o reestabelecimento da homeostase (TORRES et al., 2022).

Na fase aguda, a resposta imune depende da ação coordenada de anticorpos específicos, capazes de lisar as formas tripomastigotas circulantes. Já os amastigotas são eliminados por macrófagos ativados por IFN- γ , enquanto as células infectadas são destruídas por linfócitos T citotóxicos (CHOUDHURI & GARG, 2022). Além disso, ocorre predominância de infiltrado inflamatório composto por células mononucleares nos tecidos, bem como produção local e sistêmica de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico, contribuindo para um quadro de inflamação generalizada (ACEVEDO et al., 2018).

Ainda segundo Acevedo & Colaboradores (2018), após interação inicial dos macrófagos com o *T. cruzi*, há produção de TNF- α , que atua no recrutamento de células de defesa para o local da infecção. Por outro lado, sua produção exacerbada pode causar dano tecidual e, assim, agravar os processos patológicos da doença. Na fase crônica, apesar dos níveis baixos de parasitemia, a persistência dos antígenos formados mantém ativação do sistema imune, resultando em uma resposta inflamatória contínua causando lesões progressivas em órgãos e tecidos (ERSCHING et al., 2016; BOCCARDO et al., 2025).

A evolução clínica da doença é influenciada por diferentes fatores, como o tempo de infecção, o tropismo tecidual, a cepa do parasito, carga parasitária, perfil genético do hospedeiro e a natureza da resposta imunológica desenvolvida (MARROT et al., 2016). Após o reconhecimento de antígenos de *T. cruzi* pelas células efectoras do hospedeiro, os linfócitos TCD4⁺ tornam-se ativados e se diferenciam em subpopulações Th1 ou Th2, desempenhando papel determinante tanto nas funções protetoras quanto nas consequências patológicas da resposta imunológica (CHOUDHURI & GARG, 2022).

Além disso, os linfócitos TCD4⁺ induzem a ativação de células B, com subsequente produção de anticorpos e ativação do sistema complemento, além de contribuírem para a ativação de linfócitos TCD8⁺ (ERSCHING et al., 2016). Notavelmente, sabe-se que o Sistema nervoso central (SNC) é um sítio de reativação de *T. cruzi* em pacientes imunocromprometidos, especialmente em pacientes com HIV,

sendo essa reativação associada a aumento de IL-17 e à redução dos níveis de linfócitos TCD4+ (TORRES et al., 2022).

Os astrócitos, por sua vez, podem atuar como moduladores do microambiente inflamatório quanto como reservatórios de IFN- γ . Ainda assim, o *T. cruzi* pode persistir de forma silenciosa no interior dessas células gliais durante a fase crônica da infecção (SILVA et al., 2015). Um estudo sugere que, em astrócitos, o IFN- γ , pode ter efeito paradoxal, não controlando de maneira eficaz, como ocorre em macrófagos, podendo favorecer a infecção parasitária. Além disso, astrócitos infectados também podem induzir a produção de TNF- α e óxido nítrico, contribuindo para o dano tecidual no SNC (LANNES-VIEIRA et al., 2023).

1.6 Diagnóstico Laboratorial da doença de Chagas

O diagnóstico laboratorial da DC depende de uma série de fatores, como a fase em que o paciente se encontra, -se aguda ou crônica-, os modos de transmissão, se vertical, oral, e o contexto clínico, que determinam quais estratégias ou testes diagnósticos devem ser utilizados. Quando o paciente reside em áreas endêmicas, o diagnóstico torna-se mais fácil, uma vez que a presença de sinais clínicos e avaliações clinicopatológicas podem levar ao médico a suspeitar da DC. No entanto, em áreas não endêmicas, esse diagnóstico torna-se mais difícil de ser clinicamente revelado.

Historicamente, o xenodiagnóstico foi o primeiro procedimento utilizado, baseado em alimentar os triatomíneos com o sangue do paciente supostamente infectado, e após 60 dias, examinar suas fezes para verificar a presença de parasitos. Com o passar do tempo, foi se utilizando de outras ferramentas para descobrir a infecção (DOS SANTOS; DA SILVA & RASSI, 1995).

1.6.1 Técnicas parasitológicas

A visualização do agente causador se faz por meio de métodos laboratoriais diretos ou indiretos e na presença de anticorpos no soro. O primeiro método a ser desenvolvido foi o exame parasitológico, realizado principalmente na DCA em que a parasitemia é ainda alta (CLARK et al., 2024). Ainda segundo Clark & Colaboradores (2024), este exame é realizado pela demonstração das formas tripomastigotas em amostras do sangue periférico e visualizadas pela microscopia.

No entanto, quando o paciente está com DCC, há a produção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* circulantes, na qual os níveis de parasitemia diminuem significativamente, e por isso, a detecção por microscopia já não é mais possível. Devido a isso, o diagnóstico se baseia, principalmente, na detecção de anticorpos IgG específicos (SCHIJMAN et al., 2022).

Alguns testes específicos são realizados neste caso: imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta e reações imunoenzimáticas (ELISA). Os testes moleculares também são utilizados, como a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional e Western blot (WV). Enquanto os testes rápidos são os testes de diagnóstico realizados corriqueiramente e propostos para a vigilância epidemiológica (ZICKER et al., 1990).

1.6.2 Técnicas sorológicas

O teste de hemaglutinação indireta (HI) era muito utilizado no passado e foi padronizado por Cerisola & Colaboradores (1962), na qual se baseia na mistura da amostra do paciente (provavelmente contendo anticorpos contra o parasito) com hemácias de carneiro sensibilizadas com antígenos específicos de *T. cruzi* por 2 horas.

Após este período, havendo anticorpos específicos para o parasito no soro, os mesmos formarão ligação com as hemácias, formando uma rede no fundo do tubo, sendo a leitura do teste visual, com a placa colocada contra a luz ou um espelho (DE APPARECIDA LEVY; BOAINAIN & KLOETZEL, 1996; SCHIJMAN et al., 2022).

Segundo Gomes; Lorena & Luquetti (2009), no entanto, se o sedimento de hemácias no fundo formar um ponto, a reação é negativa. Esse método é simples, menos dispendioso, procedimentos com poucos passos, o que reduz erro de manipulação, no entanto, pode-se ter subjetividade e discordância na leitura dos resultados e resultados falso-positivos ou falsos-negativos.

O teste imunoenzimático (*Enzyme-linked Immunosorbent assay* - ELISA) é uma técnica para a detecção de antígenos ou anticorpos. A técnica consiste no contato do soro do paciente com antígenos do parasito, ambos fixados em uma microplaca. Um segundo anticorpo (secundário) é adicionado, conjugado a uma enzima, que, em presença de

substratos específicos, produzem cor. Se houver anticorpos anti-*T. cruzi* no soro do paciente, eles se ligarão a esses antígenos (MELLO, 2009).

A intensidade da cor é proporcional à quantidade de anticorpos presentes. A leitura no teste de ELISA é realizado pela leitura da absorbância em um espectrofotômetro, utilizando um comprimento de onda indicado pelo fabricante, com leitura objetiva. Algumas vantagens consistem em sua elevada sensibilidade, pequenas quantidades de amostra do paciente, bem como o processamento simultâneo de várias amostras em uma única placa e fácil uso em trabalhos realizados em campo. Por outro lado, também apresenta desvantagem, como possibilidade de reação cruzada com *L. sp.* Ou *T. rangeli* (LONGHI et al., 2012).

Na tentativa de superar essas limitações, foram desenvolvidas testes de ELISA com antígenos recombinantes, que se baseia no desenvolvimento de antígenos (peptídeos) construídos com tecnologia recombinante ao invés de lisados de parasitos inteiros (ABRAS et al., 2016).

1.6.3 Técnicas moleculares

O diagnóstico de DCC, de acordo com o Consenso Brasileiro e do Ministério da Saúde, baseia-se primariamente em métodos sorológicos, utilizando duas metodologias diferentes, como por exemplo, ELISA e hemaglutinação indireta ou imunofluorescência indireta (DIAS et al., 2016). No entanto, na DCC, a parasitemia é baixa e intermitente, e neste caso, a PCR é indicada quando os testes sorológicos apresentarem resultado indeterminado ou, por exemplo, para determinar a cura parasitológica em paciente cronicamente infectados após o tratamento (BRITTO et al., 2009).

Além disso, a PCR também pode ser utilizada para o diagnóstico de infecções agudas de transmissão por via oral, reativação devido à imunossupressão, reação transfusional ou transmissão congênica, que neste caso, não é indicado após a fase aguda da infecção (após três meses de idade), devido a baixa parasitemia (CURA et al., 2017). Segundo Gomes (2009), esse método se baseia na adição de oligonucleotídeos que amplificam sequências de DNA específicas do *T. cruzi* presentes na amostra do paciente, permitindo sua identificação mesmo em baixas concentrações.

A sensibilidade do teste depende do número de repetições dos sítios alvo e da especificidade, que depende dos *primers* empregados (iniciadores). É considerado um dos métodos mais sensíveis quando comparado com os métodos parasitológicos, permitindo detectar o DNA parasitário mesmo em diferentes amostras: sangue total, soro, cortes de tecidos, liquor ou conteúdo fecal.

O ensaio de Western blot (WB) é um método laboratorial que permite detectar proteínas específicas utilizando a eletroforese. Neste caso, foi funcionalizado o TESA-blot, um tipo específico de WB, mas que utiliza especificamente antígeno de *T. cruzi*, mais sensível e específico em casos de infecção aguda ou congênita (CASTRO-SESQUEN et al., 2021). No entanto, ao investigar o IgM-TESA, Umezawa & Colaboradores (1996) relatou que, por mais que este apresente bom desempenho para o diagnóstico precoce de DCC, é difícil sua implementação em áreas endêmicas, uma vez que esse ensaio se baseia em antígenos brutos e requer separação eletroforética.

Não obstante a isso, o TESA-blot mostrou bandas de até 160kDa reconhecidas no soro de pacientes com DCC, e além disso, não houve reação do soro de pacientes com Leishmaniose (UMEZAWA et al., 1996). Dois estudos de coorte conduzidos na Bolívia foi utilizado para determinar a infecção congênita e baseou-se em uso de diferentes metodologias, como microscopia, PCR e IgM-TESA, o qual revelou que esse teste apresentou acurácia diagnóstica precoce (CASTRO-SESQUEN et al., 2021).

1.6.4 Testes Rápidos

Os testes de diagnóstico rápidos (TDR) são ensaios imunocromatográficos projetados para detectar IgG específicas para *T. cruzi* e que fornecem resultados qualitativos para o rastreamento ou diagnóstico da DCC. São ferramentas de fácil utilização e que normalmente fornecem o resultado em 30 minutos (PEREZ et al., 2024).

Das vantagens, o TDR não requer equipamento elétrico e refrigeração, além de permitir a utilização de pouco volume de amostra. Fornece um diagnóstico rápido e confiável em áreas remotas. Por exemplo, na região do Chaco, Bolívia, 685 indivíduos participaram voluntariamente desse estudo. Foi realizada uma comparação com a técnica de ELISA, na qual resultou em % de concordância entre os testes de 96,1% e 93,1% para

o TDR, demonstrando que esse ensaio é uma alternativa ao método sorológico convencional (LOZANO et al., 2019).

Outro estudo de revisão sistemática e meta-análise demonstrou que o TDR também apresentou sensibilidade superior à 95% e especificidade acima de 99% (ANGHEBEN et al., 2019), no entanto, MARCHIOL & Colaboradores (2023), avaliou 11 testes, os quais mostraram haver discrepância entre os TDR, indicando que a maioria poderia falhar na detecção do analito (anticorpos anti.*T. cruzi*), presente nas amostras.

Em 2022, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) autorizou o registro do Kit NAT Chagas, um kit para diagnóstico molecular da DC baseado na identificação do DNA do *T. cruzi*, desenvolvido pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ) e o Governo do Paraná (Moreira et al., 2023).

1.7 Tratamento farmacológico da doença de Chagas

As chances de cura da DC aumentam quando o diagnóstico e o tratamento são realizados precocemente, reduzem o desenvolvimento de complicações e os riscos de progressão da doença, além da transmissão congênita ou por meio de transmissão por via vetorial, doação de sangue ou órgãos (DE SOUSA et al., 2024). Mesmo com grande impacto na saúde global, o desenvolvimento de vacinas e medicamentos eficazes nas fases agudas e crônicas são difíceis pelos diversos estágios de vida do parasito, pelas diferentes vias de infecção e pelos mecanismos de evasão imunológica do *T. cruzi* (PINAZO et al., 2024).

Atualmente, as opções terapêuticas disponíveis para a DC são limitadas, sendo os compostos nifurtimox (Nf – [3- metil-4-(5' nitrofurfurilidenoamina tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido)] e benznidazol (bnz - [2-Nitro-N-(fenilmetil)-1H-imidazol-1-acetamida]), introduzidos ainda na década de 60 e 70, respectivamente (PÉREZ-MOLINA et al., 2021). Ainda segundo Pinazo & Colaboradores (2024), ambos os medicamentos são fármacos nitroheterocíclicos, desenvolvidos por Bayer e Roche, com efeito tripanocida conhecidos e demonstram eliminar a parasitemia, principalmente quando os pacientes são tratados precocemente.

O mecanismo de ação dos medicamentos é dependente de ativação intracelular. Por serem considerados pró-fármacos, estes são metabolizados por nitroreduases do

parasito, que os convertem em produtos intermediários através da geração de EROs, afetando as funções biológicas do *T. cruzi* (HALL; BOT & WILKINSON, 2011; HALL & WILKINSON, 2012). O Nf foi o primeiro fármaco utilizado para o tratamento da DCA, no entanto, deixou de ser utilizado devido a sua alta toxicidade. Desta forma, o bzn foi adotado pelo Ministério da Saúde e passou a ser utilizado como fármaco de referência no Brasil (CANÇADO, 2002).

O bzn é um antimicrobiano oral de amplo espectro com atividade contra diversas bactérias. No entanto, demonstrou eficácia contra *T. cruzi* e devido à isso, começou a ser utilizada como fármaco anti-*T. cruzi* (ALPERN; LOPEZ-VELEZ, & STAUFFER, 2017). Tanto na fase aguda, quanto na fase crônica, a administração do tratamento consiste em 300 mg bzn em duas doses diárias, durante por pelo menos 60 dias. Após a administração, o fármaco é rapidamente absorvido, com pico plasmático entre 2 a 4 horas depois (VIOTTI et al., 2009).

Mesmo apresentando boa biodisponibilidade e sendo distribuídos ao longo dos tecidos, incluindo SNC, evidências sugerem que o bzn tenha o mecanismo de eliminação inicial por biotransformação hepática e recirculação entero-hepática, provavelmente com grau de metabolismo entérico (CORDOVA et al., 2008). Por outro lado, a hepatotoxicidade associada à terapia com o bzn não é bem esclarecido, uma vez que ensaios clínicos não relataram lesões hepáticas clinicamente aparente com icterícia atribuída ao bzn (National Institute Of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012).

Os efeitos adversos mais comumente observados pela utilização do bzn incluem anorexia, vômito, polineuropatia, perda de peso, dermatopatias alérgicas, eritomatose, púrpura e distúrbios gastrointestinais, levando muitas vezes a suspensão e abandono do tratamento (ALPERN; LOPEZ-VELEZ, & STAUFFER, 2017). No entanto, distúrbios neurológicos, leucopenia e trombocitopenia podem também surgir com o avançar do tratamento. A necessidade de esquemas posológicos prolongados, de 30 a 60 dias, com doses diárias de 5-7 mg/kg de peso corporal, facilita o surgimento dessas reações (ARRÚA et al., 2019).

Apesar de relativa eficiência no tratamento, o bzn apresenta demora terapêutica e uma combinação de efeitos tóxicos, além de sua ineficácia na fase crônica, que dificultam

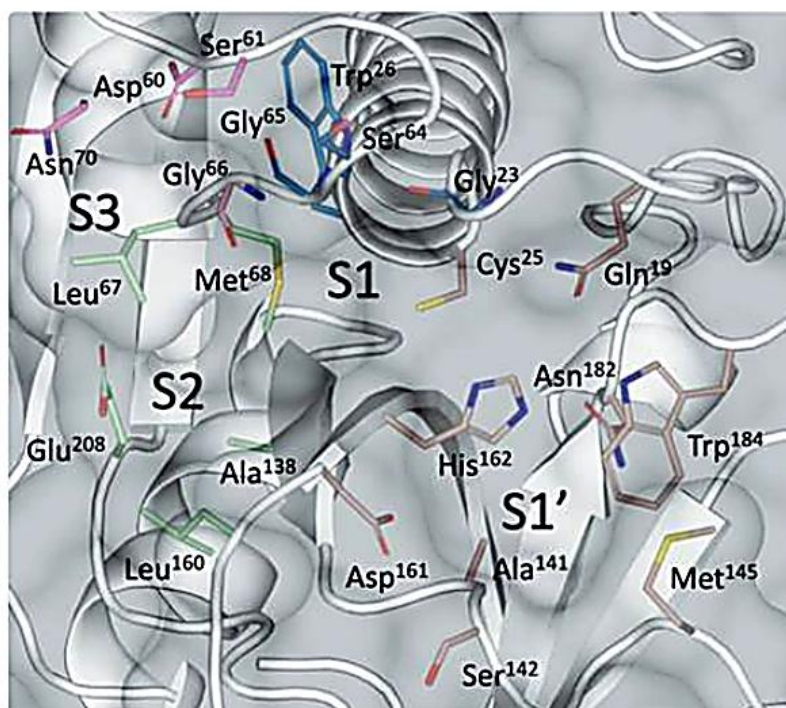
a adesão ao tratamento (VÁZQUEZ et al., 2020). Perante o exposto, há esforços na pesquisa por novas alternativas terapêuticas consideradas com eficácia superior e toxicidade inferior quando comparados ao bzn.

1.7.1 Novas abordagens para o desenvolvimento de fármacos antiparasitários

As cruzipainas fazem parte de uma família multigênica de proteases do *T. cruzi*, com diferentes funções ao longo do ciclo de vida do parasito, os quais estão associadas à nutrição, metaciclogênese, invasão de células hospedeiras e modulação da resposta por macrófagos frente à infecção. O termo cruzaina refere-se à forma recombinante de uma versão truncada na extremidade C-terminal, fato este, que a maior parte da literatura e de todos os complexos cristalográficos com inibidores, foram determinados com o termo cruzaina (SYLKE et al., 2016).

A cruzaina possui um sítio ativo subdividido em sete subbolsas capazes de acomodar resíduos dos substratos. As subbolsas que acomodam os aminoácidos dos substratos pelo lado acil são chamadas S1 a S4, enquanto as subbolsas que acomodam os aminoácidos pelo lado amino são denominadas S1' a S3', sendo a tríade catalítica formada por Cys25, His162 e Asn182 localizadas na interface entre as subbolsas S1 e S1' (DÍAZ et al., 2025).

Figura 9: Resíduos no sítio ativo da enzima cruzaina e sua divisão em sub-bolsas.



Legenda: Os resíduos das sub-bolsas envolvidas no reconhecimento de inibidores são mostrados como bastões e coloridos de acordo com a subbolsa à qual pertencem: rosa (S3); verde (S2); azul (S1); e marrom (S1'). A estrutura da cruzaina (PDB 3KKU) é representada em desenho esquemático e em superfície.

Fonte: Santos & Ferreira, 2022.

A literatura demonstra que análises das sub-bolsas S3 e S1 das estruturas cristalinas da cruzaina geralmente interagem com inibidores, sendo as mais relevantes para o desenvolvimento de fármacos. Nos estudos de especificidade de substrato da cruzaina, as subbolsas S3 acomoda melhor resíduos carregados positivamente e grupos aromáticos, enquanto a S2 acomoda aminoácidos hidrofóbicos, S1 acomoda melhor resíduos carregados positivamente e pequenos grupos aromáticos e S1' não apresenta preferência por aminoácidos (SANTOS et al., 2023).

Uma estratégia comum utilizada é a busca de candidatos a fármacos que consigam inibir a atividade do alvo, e para isso, realizam a triagem virtual para diminuir os custos e acelerar o processo. O acoplamento molecular permite prevê o modo de ligação entre duas moléculas, o alvo biológico e a molécula em estudo. Além disso, os estudos de ancoragem molecular também permitem propor diferentes modos de ligação dos inibidores conhecidos da cruzaina, auxiliando na geração de hipóteses sobre as diferentes ligações realizadas (PEREIRA et al., 2019).

1.8 Compostos heterocíclicos contendo o anel 1,2,4-oxadiazol

O interesse pelos derivados de oxadiazol surgiu a partir da consolidação da linha de pesquisa do grupo, que há alguns anos vem investigando o potencial biológico dessas moléculas e seus derivados em diferentes modelos experimentais. Estudos prévios desenvolvidos pelo grupo demonstraram que compostos contendo o núcleo oxadiazol apresentavam atividades relevantes, especialmente em modelos de células tumorais (MENDES ARAÚJO et al., 2023), bem como em parasitos de importância epidemiológica, como *Leishmania spp.* e *Trypanosoma cruzi* (PINHEIRO et al., 2025; ROCHA et al., 2022). Diante disso, o presente trabalho foi desenhado com o objetivo de ampliar as investigações do potencial tripanocida desses derivados, buscando confirmar sua atividade biológica e contribuir na compreensão de possíveis mecanismos de ação, tornando a pesquisa ainda mais consolidada, associada a uma lacuna ainda existente no entendimento do efeito desses compostos sobre *T. cruzi*.

A síntese de análogos de heterocíclicos à base de nitrogênio ganhou impulso devido a sua versatilidade no arsenal terapêutico em química medicinal dedicada ao desenvolvimento de novas moléculas e compostos, e assim, vem ganhando importância por suas diversas atividades biológicas (YANG et al., 2021). Dentre esses compostos heterocíclicos, o N-ciclohexil-1,2,4-oxadiazol são anéis heteroaromáticos de cinco membros, constituídos por dois átomos de nitrogênio, dois átomos de carbono e um de oxigênio, os quais existem em quatro isômeros constitucionais diferentes, a depender dos materiais de partida e das condições reacionais: 1,2,5-oxadiazol, 1,2,3-oxadiazol, 1,2,4-oxadiazol e 1,3,4-oxadiazol (TALE et al., 2011).

Enquanto o 1,2,3-oxadiazol é considerado instável, o 1,2,5-oxadiazol, 1,2,4-oxadiazol e o 1,3,4-oxadiazol são comuns e já foram comercializados. Por exemplo, esses dois últimos possuem atividades biológicas conhecidas, incluindo antidiabéticas, inibidoras de tirosinase, antioxidantes e anti-hipertensivos, sendo o furamizol, um antimicrobiano, contendo um núcleo oxadiazol (KAVITHA; KANNAN & GNANAVEL, 2017). Essas moléculas também apresentam também atividades antifúngicas (IWATA *et al.*, 2019), antivirais (KIM *et al.*, 2018), anti-inflamatórias (GOBEC *et al.*, 2015), anticonvulsivantes (MOHAMMADI-KHANAPOSHTANI *et al.*, 2019), antibacterianas (PICCIONELLO *et al.*, 2012), anti-helmínticas (SHAIKH *et al.*, 2016) e antiparasitárias (DOS SANTOS FILHO *et al.*, 2009).

O oxadiazol é de considerável interesse em diferentes áreas da química devido à capacidade do anel oxadiazol ter estabilidade hidrolítica e metabólica, apresentando melhor atividade farmacocinética e *in vivo*, além de serem frequentemente descritas na literatura como potencial bioisótero para amidas e ésteres (PATANI & LAVOIE, 1996). Além disso, os oxadiazóis possuem propriedades aceptoras de ligações de hidrogênio devido à eletronegatividade dos átomos de nitrogênio e oxigênio, em que os átomos de nitrogênio são mais abundantes do que os de oxigênio (NOBELLI et al., 1997; BOSTRÖM et al., 2012).

Entre os oxadiazóis isoméricos conhecidos, o 1,2,4-oxadiazol encontra-se com diversas aplicações na indústria farmacêutica, como materiais cintilantes e indústrias de corantes. Atualmente, existem alguns medicamentos disponíveis contendo o núcleo 1,2,4-oxadiazol, como anti-inflamatório (oxolamina), anti-infeccioso (pleconaril), supressor de

tosse (prenoxdiazina), vasodilatador (butalamina), entre outros (COUPAR et al., 1969; PEVEAR et al., 1999; TADIKONDA et al., 2014).

Em relação a efeitos anticancerígenos, no estudo de Hagar & Colaboradores (2023), os autores realizaram modificações estruturais em que o benzimidazol se ligou diretamente ao oxadiazol e à chalcona, a fim de que pudesse proporcionar uma progressão do ciclo celular. Os dados obtidos indicaram que alguns analógos interromperam o ciclo celular na fase G1/S e impediram a entrada das células na fase G2/M, ocorrendo diminuição do percentual (3,19%) de acúmulo de células nessa fase em comparação com o controle.

Além disso, sabe-se que a evasão da apoptose é essencial para a sobrevivência de células cancerígenas, o qual estimula a angiogênese, desregulando a proliferação celular e auxiliando na interferência na diferenciação. Desse modo, estudos que comprovem a indução de apoptose através da ativação de caspases são bons candidatos anticancerígenos (HAGAR et al., 2023). As atividades de pesquisa com fármacos anticancerígenos, especificamente os oxadiazóis são constantemente pesquisados, os quais envolvem diferentes mecanismos, incluindo inibição da metaloproteinase de matriz-9 (ÖZDEMIR et al., 2017), polimerização da tubulina (AHSAN et al., 2018), fatores de crescimento (BAJAJ et al., 2015), sinalização de Nf- κ B (MOHAN et al., 2018) e Bcl-2 (HAMDY et al., 2017), por exemplo.

Por outro lado, os oxadiazóis também apresentam indícios pela literatura de seu potencial efeito antiparasitário, demonstrado, principalmente, pela microscopia eletrônica de transmissão, utilizando as formas tripomastigotas e amastigotas, que demonstram desorganização do aparelho de Golgi e degeneração mitocondrial, com formação de vacúolos atípicos (DOS SANTOS FILHO et al., 2012). Alterações da morfologia mitocondrial são extremamente importantes, uma vez que estes tripanossomatídeos possuem uma única mitocôndria altamente ramificada, intimamente ligada ao DNA do cinetoplasto, também chamado de k-DNA (SOUZA et al., 2009).

O inchaço mitocondrial também é observado com as formas promastigotas de *L. infantum*, além de alterações indicativas de perda de polaridade celular e aparência de células fantasmas, corroborando com estudos anteriores que o 1,2,4 oxadiazol podem

atuar como inibidores de CYP51, afetando significativamente a biossíntese de ergosterol (SOUZA et al., 2024).

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Desde a descoberta da doença de Chagas, a morte de milhares de pessoas foi subnotificada, reforçando a compreensão de ser uma doença negligenciada e um grave problema de saúde pública. Apesar da implementação de programas de controle e erradicação, ainda não se conseguiu eliminar a doença, principalmente em áreas endêmicas do país. Dada à sua proporcionalidade, seriedade e gravidade, há esforços da pesquisa científica em conseguir a correta identificação dos indivíduos infectados com o *T. cruzi*, bem como estratégias de controle e desenvolvimento de terapias capazes de eliminarem totalmente os parasitos.

Os medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento da infecção por *T. cruzi* são o Benznidazol e o Nifurtimox, ambos apresentam uma taxa de cura em torno de 85% após o tratamento na fase aguda, no entanto, apresentam limitações importantes, incluindo eficácia reduzida na fase crônica da doença e efeitos adversos que comprometem a adesão terapêutica. Diante desse cenário, há uma necessidade urgente por novos compostos com atividade antiparasitária que seja mais eficaz, segura e seletiva, capazes de atuar em diferentes formas evolutivas de *T. cruzi* e superar as limitações propostas pelos fármacos atualmente disponíveis.

Nesse contexto, tem sido proposta como uma estratégia promissora o núcleo 1,2,4-oxadiazol, amplamente conhecido na literatura por suas diversas atividades farmacológicas, incluindo atividade antiparasitária. Diante ao exposto, o presente estudo justifica necessidade de explorar o potencial biológico de novos derivados sintéticos de N-ciclohexil-3-(3-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-amina, contribuindo, através de uma investigação integrada, identificar moléculas com atividade anti *T. cruzi* com perfil toxicológico adequado e ter uma melhor compreensão sobre o potencial farmacológico dessas moléculas.

A identificação da atividade antiparasitária das moléculas de estudo visa elucidar os possíveis mecanismos de ação contra o *T. cruzi*, além de fornecer evidências que podem subsidiar o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, visando maior eficácia e segurança no tratamento das fases da doença de Chagas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a atividade dos derivados sintéticos de N-ciclohexil 3-(3-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-amina *in vitro* contra a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e avaliar a toxicidade aguda *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar triagem dos principais derivados oxadiazóis, com potencial atividade antiparasitária;
- Analisar o efeito das moléculas sobre as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas da cepa Y de *T. cruzi*;
- Analisar a atividade antioxidante e acetilcolinesterase das moléculas de estudo;
- Demonstrar as alterações morfológicas induzidas pelas moléculas derivadas sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi*;
- Investigar o mecanismo de morte celular sobre as formas epimastigotas;
- Identificar possíveis interações *in silico* com a molécula de estudo;
- Realizar testes de toxicidade aguda em embriões de zebrafish.

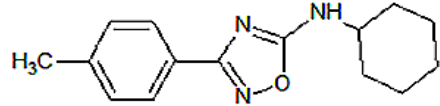
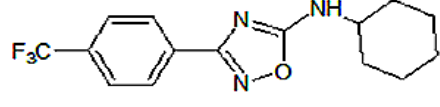
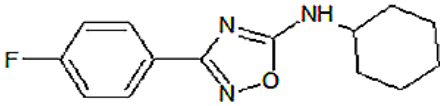
4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção das substâncias de estudo

Os derivados sintéticos de N-ciclohexil 3-(3-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-amina foram fornecidos pelo Laboratório de Síntese de Compostos Bioativos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, através de colaboração entre projetos de pesquisa conjuntos. As moléculas foram sintetizadas por irradiação com micro-ondas direcionada (MW) a partir de uma solução de arilamidoximas e diciclohexilcarbodiimida (DCC). A partir deste protocolo, foi possível caracterizar compostos meta-substituídos (m-CH₃) com o objetivo de utilizá-los neste estudo (DE OLIVEIRA et al., 2018).

As moléculas e as concentrações selecionadas para este estudo foram escolhidas com base em ensaios realizados anteriormente pelo próprio grupo de pesquisa (ROCHA et al., 2022) e baseadas em recomendações da literatura para estudos com protozoários e oxadiazol, os quais priorizam concentrações próximas aos valores de IC₅₀, a fim de evidenciar os efeitos subcelulares.

Figura 10: Imagem ilustrativa da estrutura química das moléculas em estudo.

Oxadiazol (cod.)	Estrutura química	Massa Molar (g/mol)	Fórmula molecular	Código utilizado
FGS 16		257,3	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O	2a
FGS 15		311,3	C ₁₅ H ₁₆ F ₃ N ₃ O	2f
VNPF		261,3	C ₁₄ H ₁₆ FN ₃ O	2i

Fonte: Elaborada pelo autor.

O Benznidazol (bzn), usado como fármaco de referência, foi doado pelo Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE), com uma pureza de 99,93%. Todas as substâncias foram diluídas em DMSO (Dimetilsulfóxido) estéril para obtenção de soluções estoque na concentração de 0,2 M, com o intuito de se obter soluções de trabalho, de modo que a concentração de DMSO não ultrapassasse 0,5%. A partir da solução estoque, a substância foi preparada por diluição seriada em solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS), constituído de NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH_2PO_4 1,47 mM; Na_2HPO_4 8,1 mM; pH 7,4.

4.2 Parasitos

As formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram doadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ), enquanto as formas tripomastigotas foram obtidas a partir da infecção de células hospedeiras, conforme realizado anteriormente por Lima et al., (2016).

4.3 Avaliação *in vitro* da atividade anti *T. cruzi*

4.3.1 Avaliação da citotoxicidade em células hospedeiras

A avaliação da atividade citotóxica das moléculas sintéticas 2a, 2f e 2i sobre células de mamíferos foi realizada utilizando linhagem celular LLC-MK₂ (células epiteliais renais de macaco), obtidas da fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ). As células foram cultivadas em garrafas plásticas estéreis em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com soro bovino fetal (SBF) a 10% e antibióticos (penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/L), incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ (CECILIO et al., 2013). Após confluência, as células foram deslocadas usando solução de tripsina-EDTA e transferidas para novas garrafas de cultivo. Para estocagem, as células foram congeladas em nitrogênio líquido em *vials* de criopreservação estéreis, usando SBF (95%) e DMSO (5%).

Para realização dos experimentos, as células foram deslocadas, usando solução de tripsina/EDTA, centrifugadas (4000 rpm por 5 minutos), quantificadas em câmara de Neubauer e transferidas para placas estéreis de 96 poços (10⁵ células/mL) em meio DMEM a 10% de SBF e 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ por 24 horas para permitir

adesão e proliferação das células. As células foram tratadas com diferentes concentrações das substâncias em estudo, de 100-1.5 μM (DA SILVA et al., 2013).

A viabilidade celular foi determinada através do método colorimétrico empregando o sal MTT (Brometo de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio). O MTT é um sal de tetrazólio, em que sua forma oxidada possui coloração amarela, podendo tornar-se azul quando reduzido devido às células estarem viáveis, gerando cristais de formazan (MOSMANN, 1983), aos quais são solubilizados pela adição de SDS (dodecilsulfato de sódio).

Foram utilizadas células não tratadas como controle negativo, e células tratadas com DMSO 0,5% foram utilizadas para avaliar o efeito citotóxico do diluente. Além disso, poços contendo apenas meio de cultura foram utilizados como branco e, como controle positivo, foram utilizadas células tratadas com o fármaco Benznidazol. Após o período de incubação de 24 horas, foram removidos 100 μL de cada poço, os poços foram lavados com 100 μL de PBS e adicionados 10 μL de solução de MTT (2,5 mg/mL).

As placas foram incubadas por um período de 4 horas a 37°C e depois foram adicionados 90 μL de SDS (10% m/v em HCl 0,05N). As placas foram novamente incubadas por mais de 17 horas, em temperatura ambiente, para solubilização dos cristais de formazan, sendo em seguida, realizada a leitura em leitor espectrofotométrico a 570 nm. A toxicidade sobre as linhagens celulares foi usada para definir as concentrações de trabalho dos ensaios com *T. cruzi*, bem como para estimar a seletividade do patógeno em relação às células hospedeiras. Para isso, foi realizada a estimativa da CC_{50} (concentração capaz de causar 50% de citotoxicidade) por regressão não-linear.

4.3.2 Avaliação sobre as formas epimastigotas

As formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT (Infusão de fígado e triptose constituído de NaCl 4g/L; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 11,6 g/L; KCl 0,4 g/L; glicose 2,2 g/L; triptose 5 g/L; infusão de fígado 5 g/L; hemina 25 mg/L; pH 7,4), suplementado com 10% de SBF, penicilina (200 U/mL) e estreptomicina (50 mg/L). As culturas foram mantidas a 28°C em garrafas plásticas estéreis, sem agitação, em incubadora BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) e replicadas a cada 7-8 dias, para sua concentração, na fase logarítmica, atingir a densidade de 1×10^6 células/mL. A inibição do

crescimento dos parasitos foi quantificada em uma câmara de Neubauer (DA SILVA RODRIGUES et al., 2014).

Para avaliar a atividade biológica das moléculas em estudo, alíquotas contendo os parasitos na fase exponencial foram diluídas em meio LIT e transferidas para uma câmara de Neubauer, sendo realizada a determinação da densidade celular em cinco quadrantes. Logo após, os parasitos foram transferidos para uma placa de 96 poços (1×10^6 células/mL) com diferentes concentrações das moléculas de estudo e o bzn (100-1,5 μ M).

Após o tratamento, as placas foram incubadas em estufa BOD, e colhidas alíquotas em 24 e 48 horas para quantificação de parasitos viáveis. Foram considerados viáveis os parasitos que preservaram a sua mobilidade e formato típico. Como controle negativo, foi utilizada a cultura de parasitos em presença de meio LIT (LIMA et al., 2016). A quantificação foi realizada em câmara de Neubauer.

O percentual da viabilidade celular foi determinado utilizando a IC_{50} (concentração capaz de inibir o crescimento de 50% dos parasitos), através da determinação por regressão não-linear.

4.3.3 Avaliação sobre as formas tripomastigotas

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram obtidas a partir do sobrenadante de células hospedeiras (LIMA et al., 2016). As células infectadas foram cultivadas em frascos estéreis de 25 cm² na concentração 2×10^5 células/mL em meio DMEM 10% SBF. O meio de cultura foi substituído após 48 horas de incubação, usando meio DMEM, suplementado com 2% de SBF e antibióticos, em atmosfera com 5% de CO₂. Após 72 horas, o meio de cultura foi substituído, e o sobrenadante centrifugado em 2800 rpm por 7 minutos para obtenção das formas tripomastigotas que foram utilizadas para realização dos ensaios de avaliação.

Para avaliação do efeito antiproliferativo, 10^6 tripomastigotas/mL foram incubadas e adicionadas as moléculas de estudo e bzn (100-1,5 μ M) em placas de 96 poços com meio DMEM 10% SBF. Como controle negativo foram utilizadas células não tratadas e consideradas como 100% de viabilidade. Em seguida, as placas foram incubadas por 24 horas e colhidas para contagem em câmara de Neubauer. O percentual de viabilidade celular foi calculado com a mesma fórmula usada para as formas

epimastigotas. Foi calculado o índice de seletividade dos oxadiazóis sobre as formas tripomastigotas em relação às células hospedeiras e a LC_{50} (concentração letal para 50% dos parasitos) foi determinada por regressão não-linear.

4.3.4 Avaliação do efeito sobre as formas amastigotas de *T. cruzi*

As células LLC-MK2 foram cultivadas (10^5 células/mL) em placas de cultivo de 24 poços sobre lamínulas circulares de vidro de 13 mm de diâmetro e incubadas em estufa de CO_2 . Em seguida, as células foram infectadas com as formas tripomastigotas (2×10^6 células/mL) e incubadas durante 48 horas para que ocorresse a infecção. Após este período, as células infectadas foram tratadas com as moléculas em concentrações de 30 e 60 μM e as placas permaneceram em estufa de CO_2 por 24 horas.

Logo após, as lamínulas foram retiradas de cada poço, lavadas com água destilada e fixadas com uma solução de Bouin, para que ocorresse a fixação das células. Depois de lavadas com água destilada e etanol a 70%, as lamínulas foram mergulhadas em metanol, para desidratação, por 2 minutos. Em seguida, elas foram coradas utilizando uma solução de corante Giemsa (5% v/v em água destilada) durante 60 minutos. Por fim, as lamínulas foram lavadas para remoção do excesso de corante, secadas e montadas em lâmina utilizando entelan (BANDEIRA et al., 2018).

A avaliação do efeito anti-amastigota foi determinada por contagem em microscópio óptico, através da quantidade de células não infectadas e células infectadas, perfazendo um total de 300 células em cada poço. Os resultados foram expressos como percentual de células infectadas, quantidade de amastigotas por células infectadas e o índice de sobrevivência (MONTEIRO et al., 2019).

4.4 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma metodologia utilizada para o estudo quantitativo, funcional e morfológico, onde são avaliadas individualmente as células e suas partículas suspensas em uma solução, de acordo com o seu tamanho, intensidade de fluorescência e granulosidade. Cada particulada analisada é realizada através de mensuração em direções diferentes, sendo a direção frontal (FSC – *Forward Scatter*), a qual permite avaliar o tamanho de cada célula individualmente e a direção lateral (SSC – *Side Scatter*), que

indica a carga de granulosidade e complexidade de cada célula interna (DOS SANTOS et al., 2024).

Além da mensuração e tamanho, as células também podem ser marcadas com fluorocromos, cuja intensidade é detectada através de detectores fluorescentes, como FL1, FL2, FL3 e FL4. Cada partícula/célula que o *laser* intercepta é chamada de evento, o qual é avaliada graficamente, seja através de histogramas ou/e *dotplots*, os quais podem ser divididos em quadrante.

4.4.1 Perfil de morte celular utilizando marcadores Anexina V e 7-AAD

A avaliação do mecanismo de morte celular foi induzido pelas três moléculas de estudo (2a, 2f e 2i) através da citometria de fluxo, utilizando os marcadores fluorescentes Anexina V marcada com a ficoeritrina (Ax/PE) e o 7-AAD (7-aminoactinomicina D). O corante 7AAD é um marcador de viabilidade celular capaz de se inserir entre as bases nitrogenadas citosina e guanina (C-G) na fita dupla de DNA, no entanto, é incapaz de penetrar em membrana celular íntegra. Quando ocorre o processo de morte, a membrana plasmática é progressivamente alterada com perda de integridade, tornando possível a permeabilização de 7AAD, que por sua vez, se ligará ao DNA no interior da célula (DE CARVALHO; RIBEIRO & NOGUEIRA, 2010).

A análise de células viáveis e não viáveis é realizada através da intensidade de fluorescência, ou seja, quanto maior é o pico de intensidade de fluorescência, mais células mortas estão representadas no histograma. Assim, quanto maior a marcação de 7AAD, maior a sua característica de morte por necrose. Por sua vez, a proteína Anexina V se liga à fosfolipídeos internos de membrana, exercendo alta afinidade pela fosfatidilserina, principalmente na presença de íons cálcio. Quando ocorre morte celular por apoptose, esses resíduos são translocados para o meio externo, permitindo a ligação com este marcador (ATALE et al., 2014).

Basicamente, as formas epimastigotas foram cultivadas em placas de cultivo de 24 poços, em densidade de 10^6 células/mL, incubadas com as moléculas de estudo (2a, 2f e 2i) e em concentrações de 100 e 50 μ M por 24 horas. Após este período, os grupos experimentais foram centrifugados a 2800 rpm por 7 minutos, lavados com tampão de ligação (HEPES 10 mM; NaCl 140 mM; CaCl₂ 2,5 mM; pH 7,4). Logo após, foi

realizada a marcação com kit comercial (400 μL do tampão de ligação + 5 μL de 7-AAD + 5 μL de AxV PE) (Annexin V/PE Apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences) conforme as instruções do fabricante.

Após incubação por 15 minutos no escuro, foi adicionado 400 μL de tampão de ligação em cada tubo e as células foram contadas e identificadas em aparelho de citometria de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences), respeitando as orientações do fabricante. Para cada uma das amostras, foram considerados pelo menos dez mil eventos por análise (SAMPAIO, 2016).

4.4.2 Análise da produção de EROs citoplasmáticas

O reagente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) foi utilizado para avaliar o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) no citoplasma de células epimastigotas após o tratamento com os derivados oxadiazol. O DCFH₂-DA avalia a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e de outros peróxidos, o qual não é capaz de permear membranas. No entanto, ao reagir com as EROs citoplasmáticas, este é oxidado, produzindo o fluorescente diclofluoresceína (DCF), o qual é utilizado como marcador para o estresse oxidativo celular (CHEN et al., 2010).

O DCF é excitado em um comprimento de 488 nm e emite fluorescência a medida que há aumento de Ros presente no citoplasma das células. Após um período de 3 horas de tratamento em placas de 24 poços das moléculas de estudo em relação as formas epimastigotas (10⁵⁶ células/mL), foi adicionado o DCFH₂-DA, em concentração final de 20 μM em DMSO e, logo, incubadas no escuro por 24 horas. Após este período, os grupos experimentais foram transferidos para tubos de citometria, os quais foram realizados duas lavagens e ressuspensos em 500 μL de PBS. A leitura foi realizada através da aquisição de pelo menos 10.000 eventos através do equipamento FACSCalibur.

4.4.3 Análise da determinação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$)

O corante fluorescente Rodamina 123 (Rho123) foi utilizado para avaliar se as moléculas em estudo induziam alteração mitocondrial nas formas epimastigotas. A Rho123 é um marcador catiônico e lipofílico que se acumula no espaço mitocondrial de células viáveis, o qual emite fluorescência vermelha. No entanto, após lesão na

integridade mitocondrial, há redução de acúmulo deste corante, ou seja, de íons H⁺, e consequentemente, o corante se desloca até o citoplasma, onde emite fluorescência verde, confirmando sua alteração no $\Delta\Psi_m$ (BARACCA et al., 2003).

As formas epimastigotas em concentrações já definidas (1×10^6 parasitos/mL) da cepa Y de *T. cruzi* foram incubadas e plaqueadas com as moléculas de estudo (especificamente 2a, 2f e 2i – ambas em concentração de 100 e 50 μM) e PBS (controle) por 24 horas em placas de 24 poços. Após este período, as células foram transferidas para tubos de centrifuga, centrifugadas a 2800 rpm por 7 minutos e lavadas 2x com PBS. Em seguida, e na ausência de luz, as células foram ressuspendidas com 5 μL de Rho 123 a 10 $\mu\text{g/mL}$ e 100 μL de PBS e incubadas 30 minutos no escuro. Após este período, os tubos individualmente foram analisados por citometria de fluxo e os resultados expressos de acordo com a intensidade de fluorescência (DE MENEZES et al., 2019).

4.5 Atividade antioxidante e anticolinesterásica

3.5.1 Amostras testes

As amostras foram preparadas pesando 2,0 mg cada e sendo solubilizada em 1,0 mL de DMSO 3 %, tendo a concentração final de $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$

3.5.2 Atividade Antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) seguindo a metodologia descrita por Becker *et al.* (2019) com modificações, e pelo método ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfônico)) conforme descrito por Re *et al.* (1999). Ambos os testes foram conduzidos em uma microplaca de fundo plano de 96 poços, sendo adicionado 180 μL de solução metanólica de DPPH e 20 μL das amostras. A absorbância foi realizada a 490 nm em 60 minutos de incubação e como controle positivo foram utilizados os padrões BHT e Trolox, usando um leitor BioTek Elisa, modelo ELX 800.

O percentual de inibição foi calculada através da comparação da velocidade de reação das amostras em relação aos grupos controles. Todas as amostras foram realizadas em triplicata.

4.5.3 Atividade anticolinesterásica *in vitro*

A atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase recombinante (AChE) foi medida utilizando um leitor de ELISA BioTek, modelo ELX 800, com o software "Gen5 V2.04.11", com base na metodologia descrita por Rhee *et al.* (2001) e Trevisan *et al.* (2003). Foi adicionado 25 µL de iodeto de acetiltiocolina (15 mM), 125 µL de 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] na solução Tris/HCL (50nM, pH=8, com 0,1 M de NaCL e 0,02 M de MgCL₂ .6H₂O. (3 mM de DTNB), 50 µL da solução Tris/HCL (50 nM, pH=8, com 0,1% de albumina sérica bovina (BSA)), 25 µL da amostra dissolvida no solvente de extração da amostra e diluída 10 vezes na solução Tris/HCL (50 mM, pH=8) para obter uma concentração final de 0,2 mg.mL⁻¹ .

A absorbância foi realizada a 405 nm durante 30 segundos. Em seguida, foram adicionados 25 µL da enzima acetilcolinesterase (0,25 U.mL⁻¹) e a absorbância foi conferida em 25 minutos de incubação da enzima. Como padrão negativo foi utilizada todas as soluções, com exceção das moléculas de estudo. O percentual de inibição da acetilcolinesterase foi calculada pela comparação das velocidades de reação, através da hidrólise do substrato das amostras em relação ao branco, na qual é considerada como atividade de 100% da AChE. Todas as amostras foram analisadas em triplicata e a fisostigmina e a galantamina foram utilizadas como controle positivo.

As amostras apresentaram coloração própria absorvida pelo espectro de onda de leitura, sendo assim, foram deduzidos os valores referentes à coloração. Após normalização dos dados foi realizado teste de curva de regressão não-linear.

4.6 Avaliação morfológica

4.6.1 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica de observação e análise das características microestruturais de materiais, sendo capaz de analisar estruturas de 1,4 nm, utilizando feixes de elétrons para explorar a superfície da amostra. O procedimento experimental consiste na avaliação de alterações morfológicas do parasito induzidas pelos compostos sintéticos oxadiazóis. As formas epimastigotas foram incubadas com as moléculas em estudo por 24 horas. Foi adicionado glutaraldeído com concentração final de 2,5%, centrifugadas a 800 g por 10 minutos. Logo após desprezar o

sobrenadante, o sedimento foi ressuspensão em solução de glutaraldeído a 2,5% e incubado por 2 horas.

As amostras fixadas foram centrifugadas novamente e expostas a uma crescente de etanol a 30, 50, 70, 90 e 100% para desidratação e centrifugação a 800 g por 5 minutos. As células foram transferidas para lâminas circulares de 15 mm e colocadas para secagem em estufa. As lâminas foram cobertas com camadas de ouro (espessura de 20 nm) utilizando a Metalizadora QT150 ES-Quorum e analisadas em Microscópio Eletrônico de varredura. As grades foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura na Central Analítica do Laboratório Multifuncional da Universidade Federal do Ceará.

4.7 Estudos *in silico*

Foram realizados ensaios *in silico* através de *docking molecular* para avaliação teórica das interações entre a molécula 2a e a enzima cruzaina de *T. cruzi*, os quais foram realizados em colaboração e coordenado pelo Prof. Dr. Ernesto Caffarena, pesquisador da Fiocruz-RJ e pesquisador visitante da Fiocruz-CE.

A cruzaina, uma cisteína protease do *T. cruzi*, é alvo conhecido e validado para medicamentos devido à sua sobrevivência, diferenciação e virulência do parasito, sendo, consequentemente, alvo para o planejamento de fármacos baseado à identificação de inibidores da cruzaina (SANTOS et al., 2023).

4.7.1 Estrutura da proteína e preparação do ligante

A estrutura cristalina da cruzaina (PDB ID: 3KKU) foi obtida do Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) e utilizada como proteína alvo para estudos de ancoragem molecular. A estrutura da proteína foi preparada mantendo-se todas as moléculas de água. Os átomos de hidrogênio faltantes foram adicionados e os estados de protonação foram atribuídos em pH fisiológico (7,4). Os resíduos do sítio catalítico, Asp25 e Cys162 foram mantidos em estado de par iônico. As conformações tridimensionais iniciais foram geradas utilizando o servidor Acepype e salvas no formato pdb.

4.7.2 Protocolo de Ancoragem Molecular

A ancoragem molecular foi realizada utilizando o Software Gnina versão 1.0, um programa de ancoragem molecular com suporte integrado para pontuação e otimização de ligantes utilizando redes neurais convolucionais (CNNs). Para validar o protocolo de ancoragem, experimentos de re-ancoragem foram realizados removendo o ligante co-cristalizado da estrutura 3KKU e ancorando-o novamente em seu sítio de ligação original.

Todos os cálculos de acoplamento molecular foram realizados usando o Gnina versão 1.0+ no Linux Ubuntu 24.04.3 LTS com uma GPU GeForce 3060. A visualização e a análise foram conduzidas usando os softwares ChimeraX e VMD. As poses de ligação foram analisadas monitorando interações intermoleculares chave, incluindo ligações de hidrogênio (limite de distância $\leq 3,5$ Å, limite de ângulo $\geq 65^\circ$), contatos hidrofóbicos e interações eletrostáticas.

O desvio quadrático médio (RMSD) das estruturas de referência e as mudanças conformacionais do ligante após a ligação também foram avaliados, quando aplicável. Para fornecer uma análise comparativa e validação adicional das previsões de ligação, uma série de ligantes foi alternativamente submetida ao servidor Boltz-2 (<https://boltz.bio/boltz2>) para previsão de pose independente, estimativa da energia livre de ligação e avaliação da probabilidade de ligação.

O Boltz-2 é uma abordagem de aprendizado profundo de última geração para previsão de estrutura molecular que aproveita arquiteturas transformadoras avançadas treinadas em extensos bancos de dados estruturais (PASSARO et al., 2025). A plataforma oferece vantagens significativas, incluindo maior precisão na previsão de complexos proteína-ligante, estimativa confiável da termodinâmica de ligação e avaliação quantitativa das probabilidades de ligação que complementam as pontuações de acoplamento tradicionais.

4.7.3 Dinâmica Molecular

Todas as simulações de dinâmica molecular (DM) foram realizadas utilizando o pacote de simulação GROMACS 9 (ABRAHAM et al., 2015) com o campo de força AMBER (HORNAK et al., 2006; TAVARES et al., 2023). A parametrização do ligante foi realizada utilizando o servidor ACpype, que gera arquivos de topologia e parâmetros

compatíveis com campo de forças AMBER. O protocolo de simulação consistiu em quatro etapas sequenciais: minimização de energia, equilíbrio NVT, equilíbrio NPT e produção.

As estruturas iniciais foram submetidas à minimização de energia utilizando o algoritmo de descida mais íngreme com um máximo de 5.000 passos. A minimização de energia foi encerrada quando a força máxima caiu abaixo de $100 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$ (emtol = 100) com um tamanho de passo de 0,01 nm. O algoritmo L-BFGS foi empregado com um parâmetro de correção de 10 (nbfsgcorr = 10) e um máximo de 20 iterações por passo. Após a minimização de energia, o sistema passou por duas fases de equilíbrio.

O primeiro estágio de equilíbrio foi realizado no conjunto canônico (NVT) por 500 ps (250.000 passos com um intervalo de tempo de 2 fs) a 100 K, utilizando um termostato de reescalonamento de velocidade (v-rescale) com uma constante de acoplamento de 1,0 ps. Restrições de posição foram aplicadas aos átomos pesados durante essa fase para permitir o equilíbrio gradual do solvente ao redor do soluto. Posteriormente, o equilíbrio NPT foi conduzido por 500 ps (250.000 passos com um intervalo de tempo de 2 fs) a 300 K e 1 bar, com as restrições de posição removidas.

O acoplamento de temperatura foi mantido utilizando um termostato de reescalonamento de velocidade com uma constante de tempo de 1,0 ps, enquanto o acoplamento de pressão empregou o barostato de Parrinello-Rahman com uma constante de acoplamento de 1,0 ps e uma compressibilidade isotérmica de $4,5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$. Simulações de dinâmica molecular (MD) de produção foram realizadas no conjunto NPT por 100 ns (50.000.000 passos com um intervalo de tempo de 2 fs) a 300 K e 1 bar. Os mesmos esquemas de acoplamento de temperatura e pressão usados durante o equilíbrio NPT foram mantidos para as simulações de produção. Todas as simulações empregaram condições de contorno periódicas nas três dimensões (xyz).

4.8 Toxicidade em embriões de Zebrafish (*Danio rerio*)

Os ensaios com Zebrafish, incluindo manutenção dos animais, exposição aos tratamentos e avaliações, foram realizados através de uma colaboração com a empresa especializada Z-Safe Biotecnologia Ltda., na cidade de Natal, Rio Grande do Norte, conforme seu protocolo aprovado (ZS-TOX-06/25-1).

Neste estudo, foi utilizado o Teste de Toxicidade Aguda em embriões de Zebrafish, referente ao FET236 da OECD (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico).

4.8.1 *Organismo de teste*

Os embriões de zebrafish (*Danio rerio*) da linhagem WT foram obtidos através da desova natural de matrizes, de acordo com o protocolo de reprodução de progenitores.

4.8.2 *Condições de Armazenamento*

Os animais foram mantidos em sistema de recirculação de água (densidade de 2 peixes/L), com qualidade mantida por filtração mecânica, biológica e química, e passagem por uma unidade de esterilização com luz UV. Os parâmetros químicos da água foram mantidos em pH ~7, temperatura 27 °C, oxigênio ~6 mg/L, amônia total <0,01 mg/L, e condutividade de 600µS/cm. O fotoperíodo foi fixado em 14h/12h com início da fase clara às 07:00 (190 Lux). Os peixes (jovens e adultos) foram alimentados com *Artemia* sp. (*Artemia salina* do RN®, Brasil) e ração comercial em flocos (Alcon Basic®, Brasil; 60% proteína e 15% gordura). A alimentação foi oferecida três vezes ao dia.

4.8.3 *Condições para reprodução*

Os peixes adultos foram colocados em tanques de reprodução (3 machos: 2 fêmeas) contendo uma divisória transparente removível, com orifícios, separando machos e fêmeas, mas permitindo o contato químico e visual entre os indivíduos. A partição foi removida na primeira hora de luz (07:00h) e a desova ocorreu naturalmente. Uma hora após a desova, os embriões foram coletados, verificados quanto à fertilização (sob estereomicroscópio com aumento de 40x; MOTIC) e contados.

4.8.4 *Grupos*

Ovos fertilizados foram separados, lavados com água do sistema e transferidos para placas de poliestireno de 24 poços (1 embrião/poço). Foram selecionados 20 embriões, somados a quatro para controle da placa.

4.8.5 Amostra utilizada e controle

A água do sistema de recirculação foi utilizada como controle negativo e o DMSO em concentração a 0.1%, A molécula de estudo (2a) foi escolhida e utilizada em concentrações de 100-12,5 μ M, bem como a associação de oxadiazol + benznidazol, nas mesmas concentrações.

4.8.6 Exposição e reprodutibilidade dos dados

Os embriões expostos às substâncias por 96h foram observados a cada 24h em estereomicroscópio com aumento de 80X para verificação de sinais de letalidade e malformação: coagulação do ovo ou ausência de batimentos cardíacos.

Todo o procedimento descrito foi realizado em duplicata para garantir a reprodutibilidade dos dados, bem como aumentar a confiabilidade estatística pelo tamanho amostral.

4.9 Análise estatística

Os dados numéricos foram expressos como média \pm erro padrão médio (EPM). Para comparação dos grupos experimentais, foi utilizado o teste estatístico *one-way* ANOVA ou teste não paramétrico, de Kruskal-Wallis, considerando significância de $*p < 0,05$. Para a realização dos testes, foi utilizado o programa R studio.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da toxicidade das moléculas (2a, 2f e 2i) em células hospedeiras

As atividades antiparasitárias, de citotoxicidade e os índices de seletividade das três moléculas de estudo (2a, 2f e 2i) estão resumidas na **tabela 2**. Ainda na tabela 2, observa-se os valores de IC₅₀, LC₅₀ e CC₅₀ de todas as moléculas em estudo envolvidas neste trabalho e o índice de seletividade (IS). Todos os análogos estudados apresentaram IS significativos, quando comparados à molécula de referência Benznidazol.

Tabela 2: Valores de IC₅₀, LC₅₀, CC₅₀ e índice de seletividade das moléculas 2a, 2f, 2i e Benznidazol.

	Tempo de Exposição	
	24h	48h
Molécula 2a:		
IC ₅₀	31.34 µM	7.61 µM
LC ₅₀	14.2 µM	
CC ₅₀	221 µM	
IS (Sel)	15	
Molécula 2f:		
IC ₅₀	44.4 µM	2.6 µM
LC ₅₀	2.4 µM	
CC ₅₀	14 µM	
IS (Sel)	5.8	
Molécula 2i:		
IC ₅₀	7.0 µM	3.7 µM
LC ₅₀	2.6 µM	
CC ₅₀	25.7 µM	
IS (Sel)	9.8	
Benznidazol:		
IC ₅₀	17.3 µM	3.5 µM
LC ₅₀	12.5 µM	
CC ₅₀	59.1 µM	
IS (Sel)	4.7	

Legenda: IC₅₀ = concentração inibitória de 50% de epimastigotas; LC₅₀ = concentração capaz de matar 50% as formas tripomastigotas; CC₅₀ = concentração capaz de causar citotoxicidade em 50% das células; IS = índice de seletividade. Todos os resultados expressos em µM*. O índice de seletividade foi calculado em: $IS = CC_{50}/LC_{50}$.

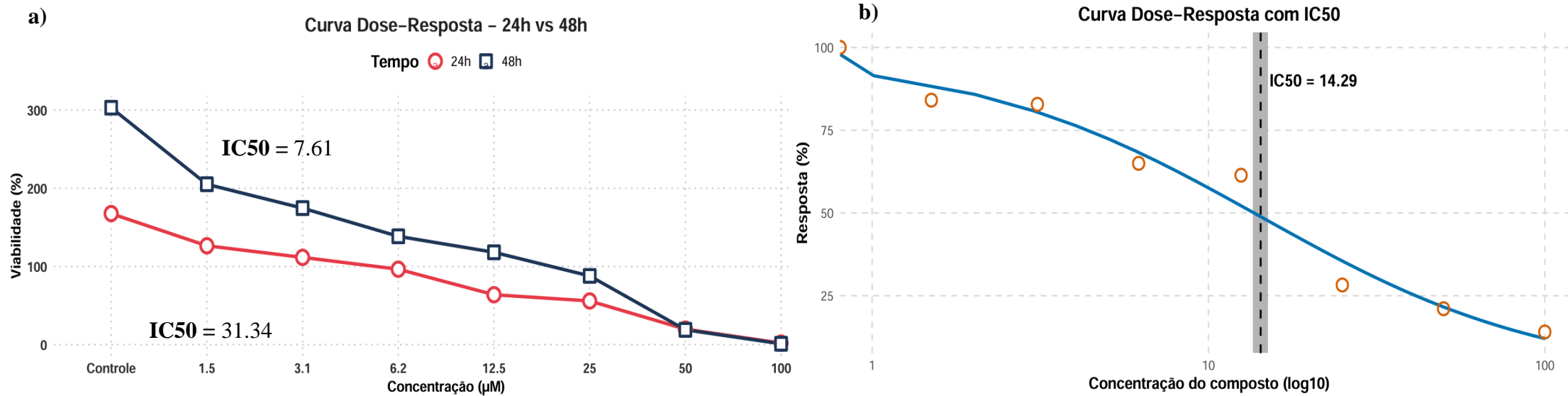
O presente estudo demonstrou que a molécula 2a apresentou menor efeito citotóxico frente à célula hospedeira, com valor de CC₅₀ de 221 µM. Esse efeito pode ser

respondido pelas modificações eletrônicas no substituinte na posição *para* do anel aromático da molécula que provavelmente tenha influenciado diretamente a sua atividade biológica. Paralelamente, os valores de IC₅₀ observados indicaram menor potência quando comparados com a molécula de referência. No entanto, a molécula 2a apresentou o maior IS.

Por outro lado, o grupo trifluormetil, presente na molécula 2f, resultou em maior citotoxicidade, com valores de CCC50 de 14 µM e menor IS, de 5.8. Em contrapartida, apresentou elevada atividade antiparasitária, demonstrado pelos valores de IC₅₀ de 2.6 µM, possivelmente associada ao aumento da lipofilicidade promovido por esse substituinte. A molécula 2i, contendo flúor, apresentou um perfil intermediário, com boa atividade em 24h e 48h, com valores de IC₅₀ de 7.0 µM e 3.5 µM. Além disso, os valores de LC₅₀ e IS indicaram um equilíbrio entre atividade biológica e citotoxicidade, com valores de 2.6 µM e 9.8, respectivamente.

5.2 Efeito antiparasitário sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas

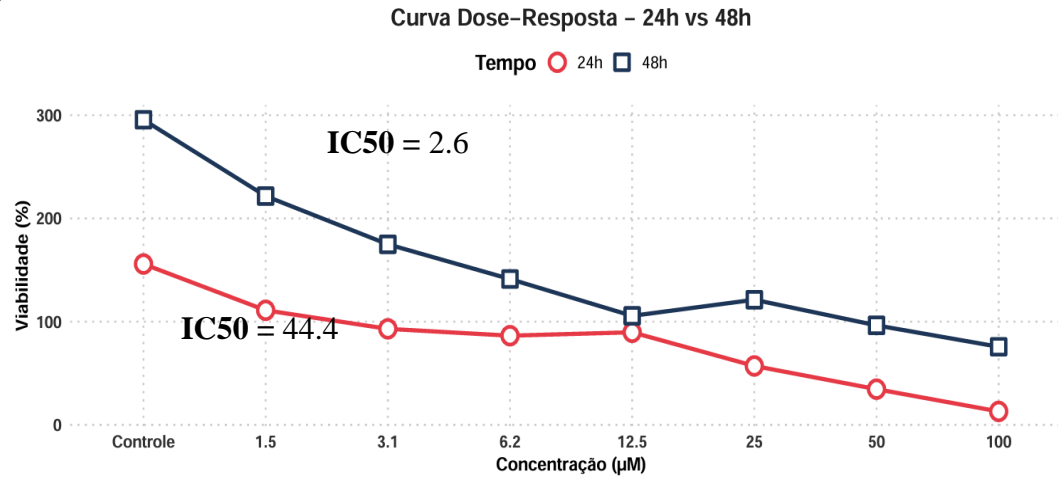
Figura 11: efeito antiproliferativo da molécula 2a sobre as formas epimastigotas em 24h e 48 horas (em a) e das formas tripomastigotas (em b) da cepa Y em 24 horas



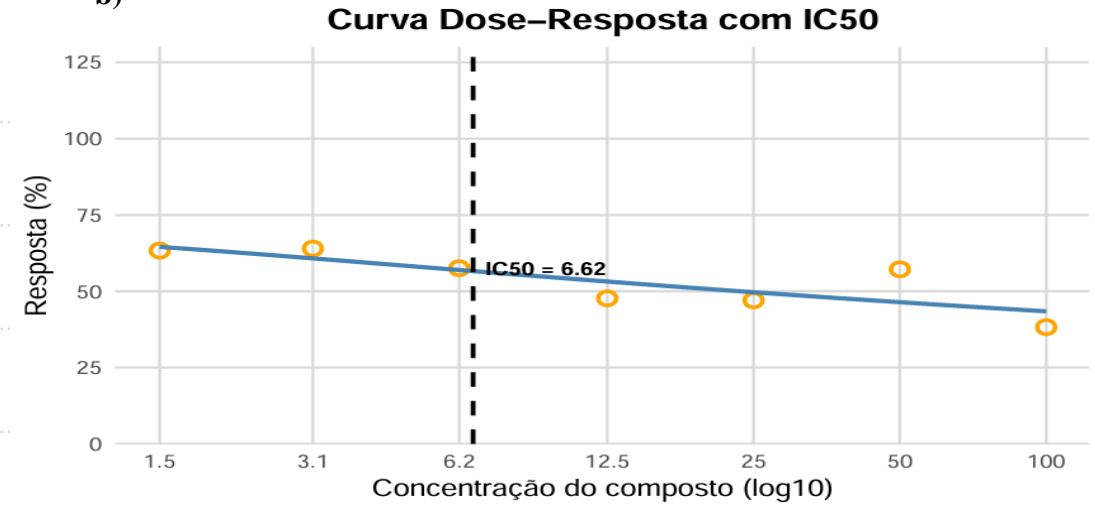
Legenda: grupo controle realizado (mas não expresso na figura). Os dados apresentados como média \pm EPM. Acima, estão apresentados os resultados antiproliferativos sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas nos tempos. **Fonte:** elaborado pelo autor.

Figura 12: efeito antiproliferativo da molécula 2f sobre as formas epimastigotas em 24h e 48 horas (em a) e das formas tripomastigotas (em b) da cepa Y em 24 horas

a)

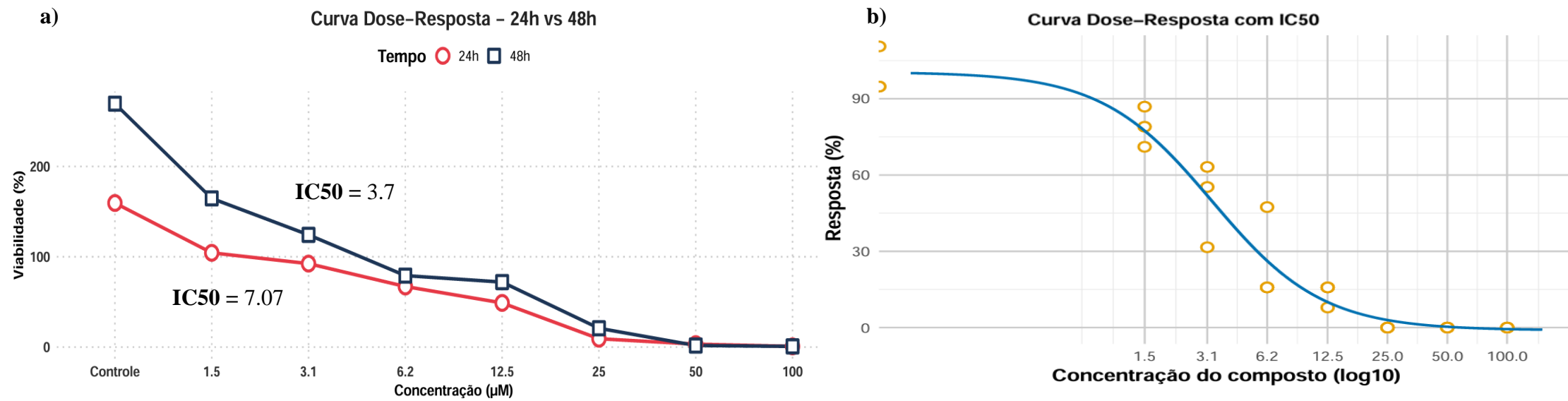


b)



Legenda: grupo controle realizado (mas não expresso na figura). Os dados apresentados como média ± EPM. Acima, estão apresentados os resultados antiproliferativos sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas nos tempos. **Fonte:** elaborado pelo autor.

Figura 13: efeito antiproliferativo da molécula 2i sobre as formas epimastigotas em 24h e 48 horas (em a) e das formas tripomastigotas (em b) da cepa Y em 24 horas



Legenda: grupo controle realizado (mas não exposto na figura). Os dados apresentados como média ± EPM. Acima, estão apresentados os resultados antiproliferativos sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas nos tempos. **Fonte:** elaborado pelo autor.

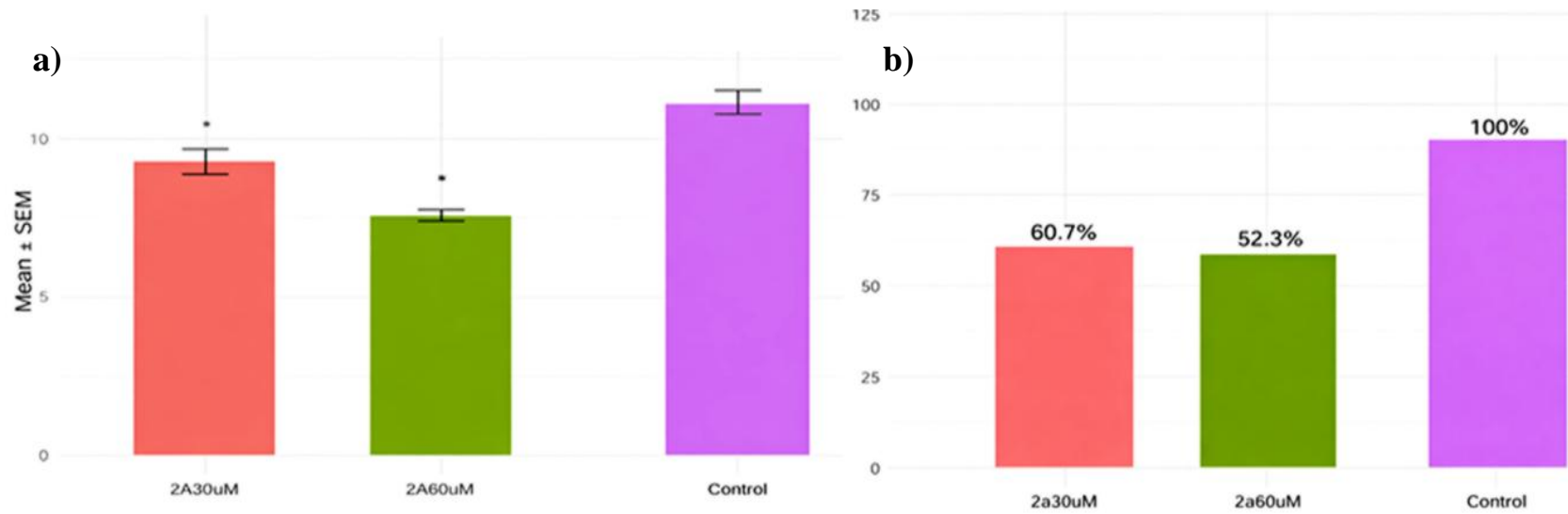
A partir das figuras 11, 12 e 13, é possível observar mudanças nos ensaios realizados para as formas epimastigotas e tripomastigotas. A figura 10 apresenta um efeito antiproliferativo da molécula 2a, evidenciando um perfil de resposta dependente da concentração e do tempo da exposição. Ainda na figura 10, observa-se no item a uma redução gradual de viabilidade das formas epimastigotas à medida que a concentração da molécula aumenta, tanto em 24h quanto em 48h. No item b, referente às formas tripomastigotas, a curva concentração-resposta apresenta um perfil sigmoidal bem definindo, estabelecendo IC_{50} de aproximadamente 14,29 μ M.

A figura 11 representa o efeito antiproliferativo da molécula 2f sobre as duas formas evolutivas de *T. cruzi*, evidenciando um perfil de resposta dependente de concentração e influenciado pelo tempo de exposição. No item a, observa-se redução de viabilidade das formas epimastigotas à medida que a concentração fosse aumentando, no entanto, com valor de $IC_{50} = 44,4 \mu$ M, indicando baixa potência nesse intervalo. Entretanto, em 48h, há aumento expressivo da atividade, com IC_{50} reduzido para 2,6 μ M, demonstrando um efeito altamente tempo-dependente e sugerindo que a molécula 2f requer maior tempo para exercer sua ação máxima. No item b, em relação às formas tripomastigotas, a curva concentração-resposta apresentou um perfil menos acentuado quando comparado para as formas epimastigotas, com $IC_{50} = 6,62 \mu$ M.

A figura 12 representou o efeito antiproliferativo da molécula 2i sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, na qual evidenciou um perfil de resposta dependente da concentração e do tempo de exposição. No item a, observa-se uma redução progressiva de viabilidade a medida que a concentração vai aumentando, tanto em 24h quanto em 48h. No entanto, o seu efeito é ainda maior em 48h, indicando um comportamento tempo-dependente da molécula, o que corrobora para a sua $IC_{50} = 7,07 \mu$ M e 3,7 μ M nos dois tempos de incubação. Em b, essa resposta foi ainda mais evidente, o que se observa uma queda mais acentuada de viabilidade na faixa entre 3,1 e 12,5 μ M. essa resposta é ainda maior nas concentrações mais elevadas, indicando alta eficácia da molécula de estudo.

5.3 Efeito anti-amastigota

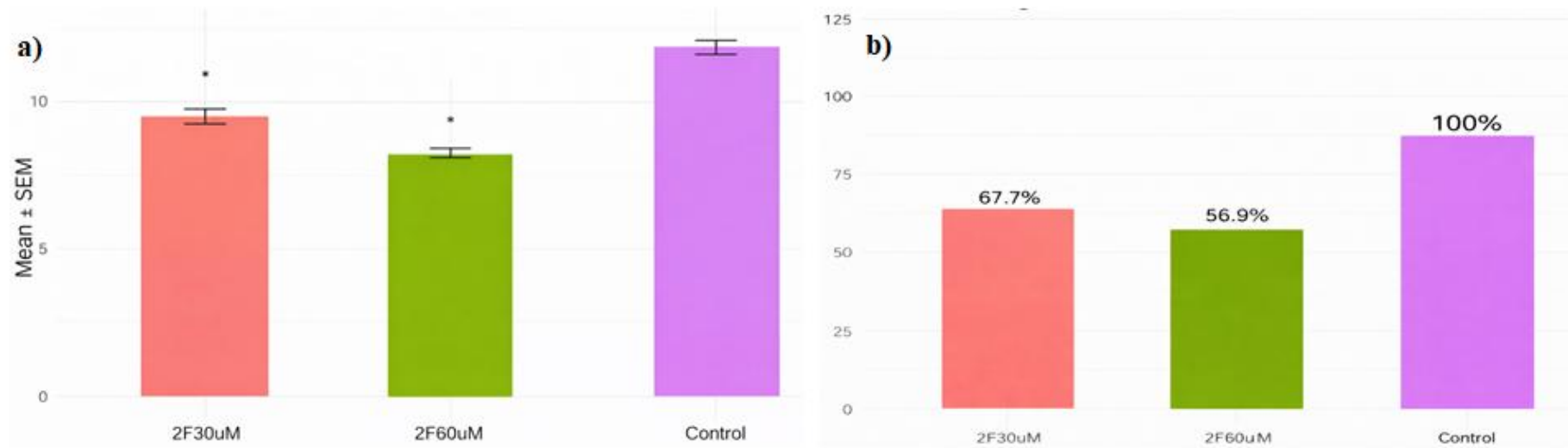
Figura 14: efeito anti-amastigota da molécula 2a em cepa Y de *T. cruzi*



Legenda: (A) contagem de amastigotas por células infectadas; (B) índice de sobrevivência dos grupos experimentais. Os dados foram expressos como média \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. * $p < 0,05$.

Fonte: elaborado pelo autor.

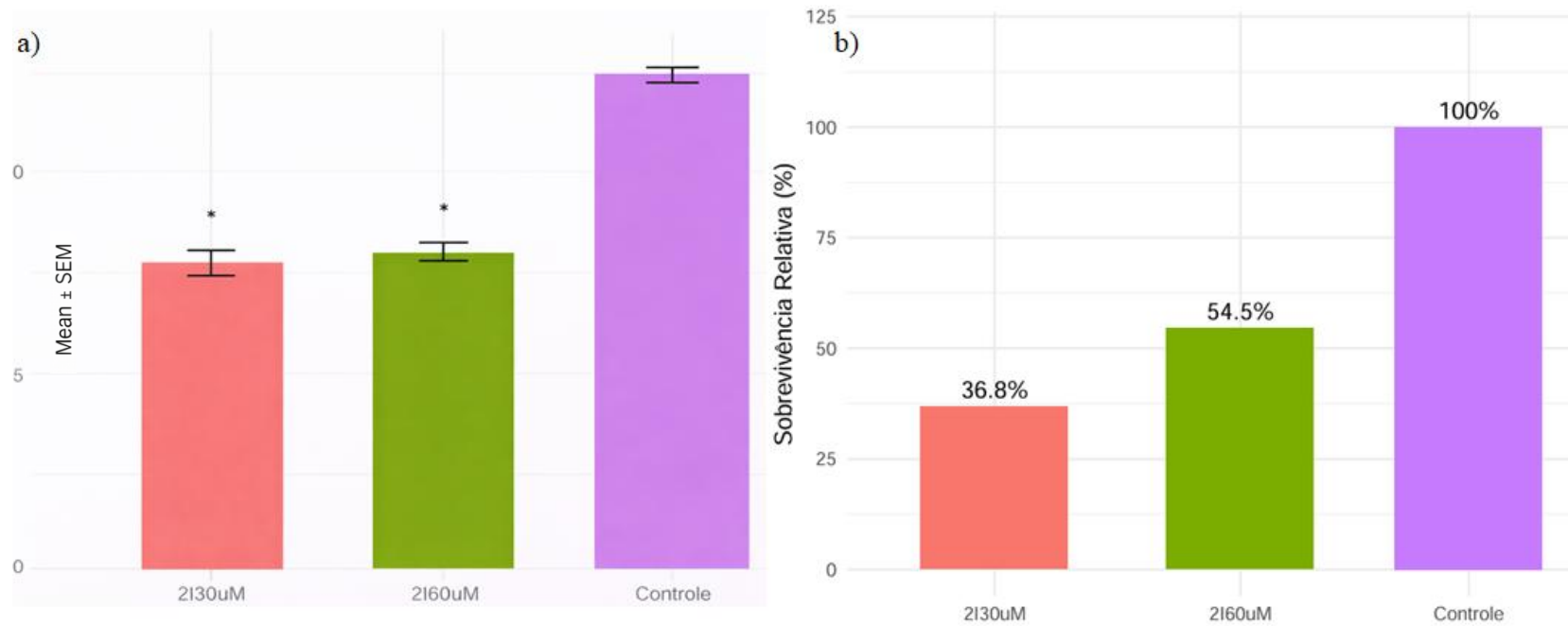
Figura 15: efeito anti-amastigota da molécula 2f em cepa Y de *T. cruzi*



Legenda: (A) contagem de amastigotas por células infectadas; (B) índice de sobrevivência dos grupos experimentais. Os dados foram expressos como média ± EPM e avaliados por one-way ANOVA com teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. * $p < 0,05$.

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 16: efeito anti-amastigota da molécula 2i em cepa Y de *T. cruzi*



Legenda: (A) contagem de amastigotas por células infectadas; (B) índice de sobrevivência dos grupos experimentais. Os dados foram expressos como média ± EPM e avaliados por one-way ANOVA com teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. * $p < 0,05$.

Fonte: elaborado pelo autor.

O efeito anti-amastigota das moléculas em estudo foi avaliado nas concentrações de 30 e 60 μM , as quais foram analisados o número de amastigotas por 100 células e o índice de sobrevivência. Na comparação das três moléculas em estudo, percebeu-se que as mesmas foram capazes de causar diminuição ou redução da carga parasitária. O fármaco *bnz* também foi avaliado quanto à sua atividade, no entanto, não foi demonstrado visualmente. Apesar disso, observou-se efeito esperado, como fármaco controle, reduzindo o número de amastigotas a medida que a concentração foi aumentando.

Na figura 12A, demonstrado pelo ensaio com a molécula 2a, observou-se um padrão concentração-resposta nas concentrações avaliadas, uma vez que quanto maior a concentração, menos amastigotas foram observadas nas células, observando uma redução mais acentuada quando comparada ao grupo controle. Na figura 12B, a molécula 2a também reduziu a sobrevivência parasitária, em 60% e 52,3% nas duas concentrações de 30 e 60 μM , respectivamente, o que reforça o seu efeito.

Na figura 13A, demonstrado pela molécula 2f, há uma redução do número de amastigotas em ambas as concentrações, sendo o efeito mais evidente em 60 μM , indicando um comportamento concentração-dependente e estatisticamente significativo em relação ao grupo controle. Em 13B, no ensaio do índice de sobrevivência, a molécula 2f apresentou redução da taxa de sobrevivência, principalmente na maior concentração, indicando diminuição da sobrevivência e efeito significativo.

A molécula 2i, demonstrada pela figura 14A, apresenta o ensaio de amastigota por célula infectada, em que se observa diminuição relativa de amastigotas em relação ao grupo controle, nos dois ensaios avaliados, no entanto, não há diferença estatística entre os dois grupos. Na figura 14B, observa-se redução na taxa de sobrevivência, indicando efeito moderado em que as formas amastigotas foram eliminadas, principalmente na menor concentração, em que esse efeito se potencializou (36,8%).

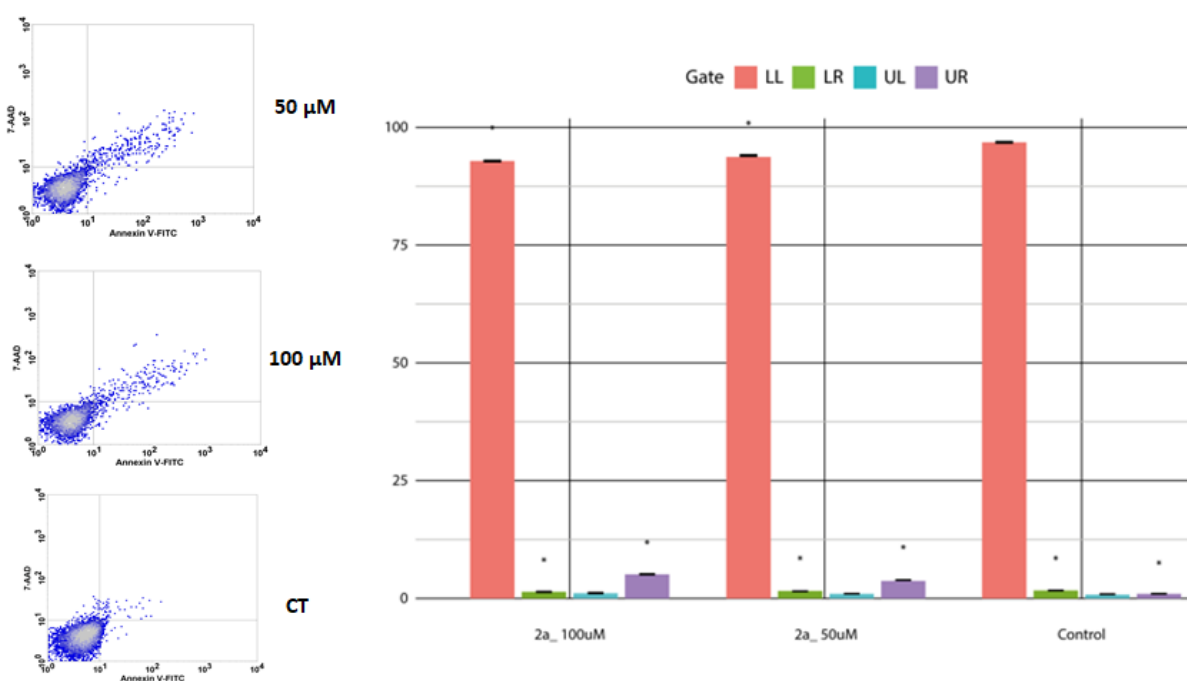
Em todos os tratamentos realizados, houve diminuição significativa, principalmente na maior concentração avaliada, em relação ao grupo controle do número de amastigotas/100 células infectadas no tempo de 24 horas.

5.4 Análise de Citometria de Fluxo

5.4.1 Avaliação da integridade celular e perfil de morte

Para avaliação do perfil de morte, foram utilizados 7-AAD e Anexina V e o comportamento dos *gates* nos gráficos de dotplot LL (inferior esquerdo), representada pelas células viáveis, LR (inferior direito), representada pelas células em apoptose inicial, UL (superior esquerdo), células em necrose e UR (superior direito), células em apoptose tardia.

Figura 17: perfil de morte celular induzido pela molécula 2a em epimastigotas

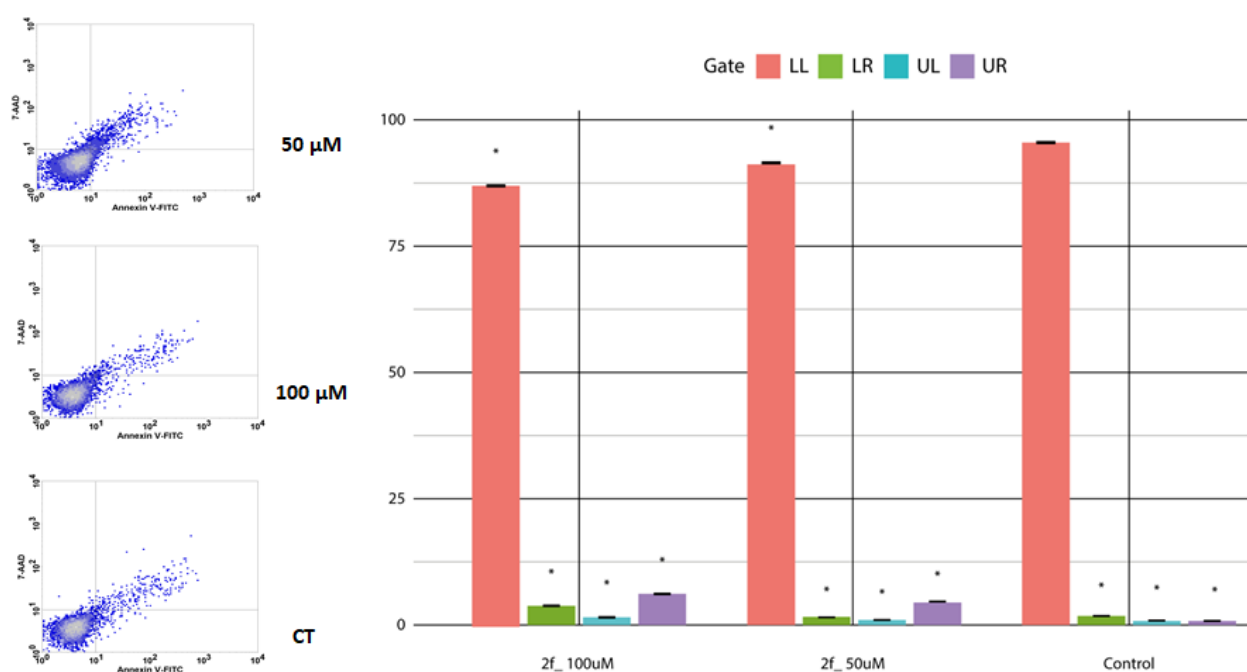


Legenda: Análise estatística foi feita por one-way ANOVA com teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. * $p < 0,05$ em relação ao controle. Ensaios de perfil de morte das formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* usando 7-AAD e Anexina V-PE após 24 horas de incubação. LL: células viáveis; LR: apoptose inicial; UL: necrose; UR: apoptose tardia.

Os resultados indicam que a população majoritária do ensaio foi no quadrante LL, indicando alta viabilidade celular, enquanto que após o tratamento com a molécula 2a na menor concentração (50 μM) observou leve dispersão para a direita, com pequeno aumento de UR e LR, com indício de apoptose inicial e provável início de externalização de fosfatidilserina. A dispersão aumenta um pouco mais na maior concentração (100 μM), com maior ativação de morte celular e, conseqüentemente, aumento mais evidente de morte, com provável progressão para apoptose tardia, o que sugere aumento apoptótico progressivo de acordo com a dose.

No ensaio com a molécula 2f, observa-se aumento um pouco mais proeminente de células em Anexina+, com discreto aumento de apoptose tardia (UR). Na maior concentração, essa progressão apoptótica se torna ainda mais evidente, com ativação de morte celular, evidenciando um comportamento concentração-dependente, o que sugere que a molécula 2f pode estar atuando em vias envolvendo disfunção mitocondrial, uma vez que há progressão para apoptose tardia, mas sem aumento expressivo de necrose.

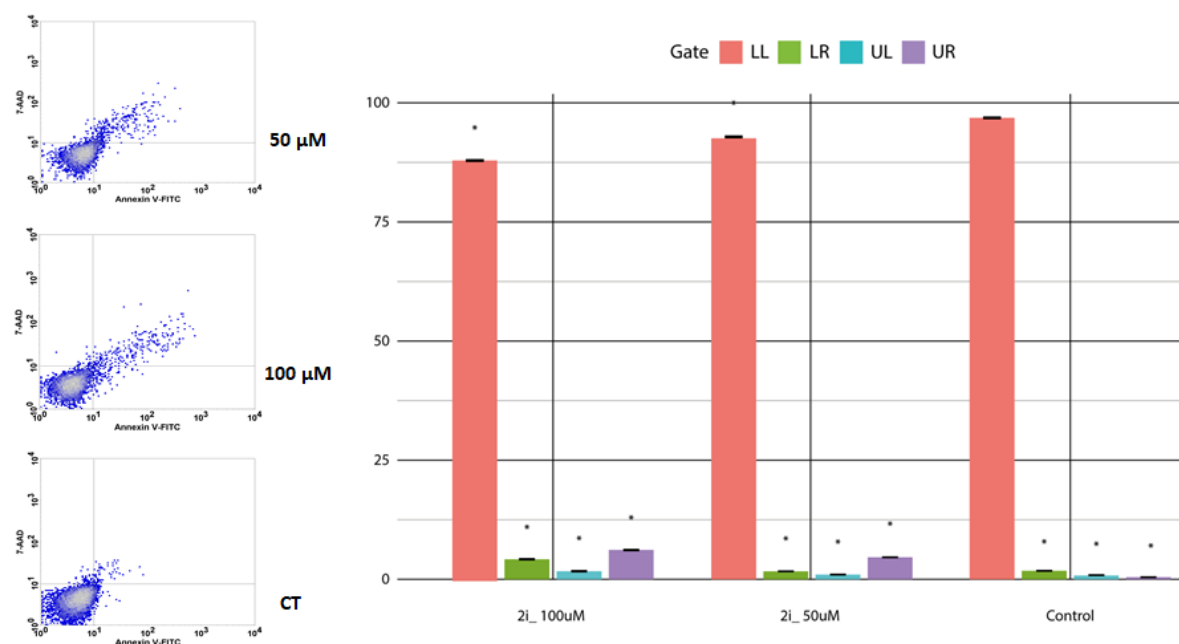
Figura 18: perfil de morte celular induzido pela molécula 2f em epimastigotas.



Legenda: Análise estatística foi feita por one-way ANOVA com teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. * $p < 0,05$ em relação ao controle. Ensaio de perfil de morte das formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* usando 7-AAD e Anexina V-PE após 24 horas de incubação. LL: células viáveis; LR: apoptose inicial; UL: necrose; UR: apoptose tardia.

A molécula 2i induziu um leve deslocamento da população para a direita, pelo gráfico em dotplot e no gráfico observa-se pequeno aumento em apoptose tardia (UR). A maior concentração demonstra esse aumento ainda mais evidente da dispersão celular, com ativação de morte celular, especialmente em apoptose tardia.

Figura 19: perfil de morte celular induzido pela molécula 2i em epimastigotas



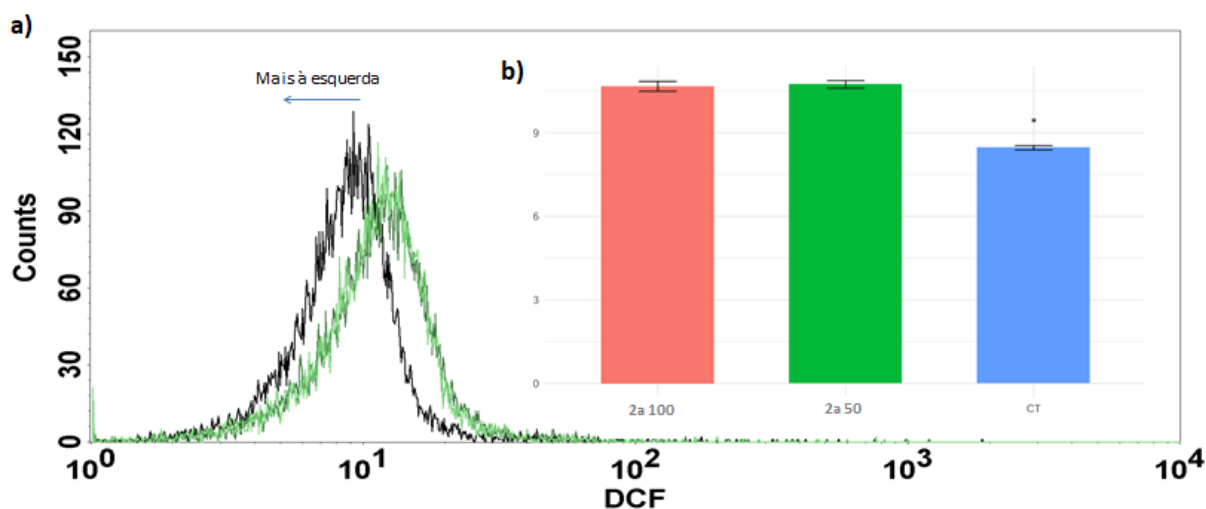
Legenda: Análise estatística foi feita por one-way ANOVA com teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. * $p < 0,05$ em relação ao controle. Ensaio de perfil de morte das formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* usando 7-AAD e Anexina V-PE após 24 horas de incubação. LL: células viáveis; LR: apoptose inicial; UL: necrose; UR: apoptose tardia.

Em relação às populações e as moléculas de estudo, ambas apresentaram marcação significativa, especialmente para apoptose tardia ou dupla marcação (*gate* UR), indicando que ambas as moléculas assumem o mesmo perfil discreto de apoptose tardia /necrose inicial, conforme demonstrado pelas figuras 15, 16 e 17.

5.4.2 Produção de EROs

Os resultados da citometria de fluxo demonstram a curva controle, em preto, mais à esquerda, com menor fluorescência de DCF, ou seja, baixa produção de EROs na ausência das moléculas em estudo. No entanto, as curvas de tratamento mudaram, por exemplo, com a molécula 2a. Observou-se que nas duas concentrações avaliadas (100 μM e 50 μM , nas cores verde claro e verde escuro, respectivamente), houve deslocamento do pico um pouco mais à direita, o que significa aumento de fluorescência, logo, mais EROs citoplasmáticas nas células, conforme figura 18:

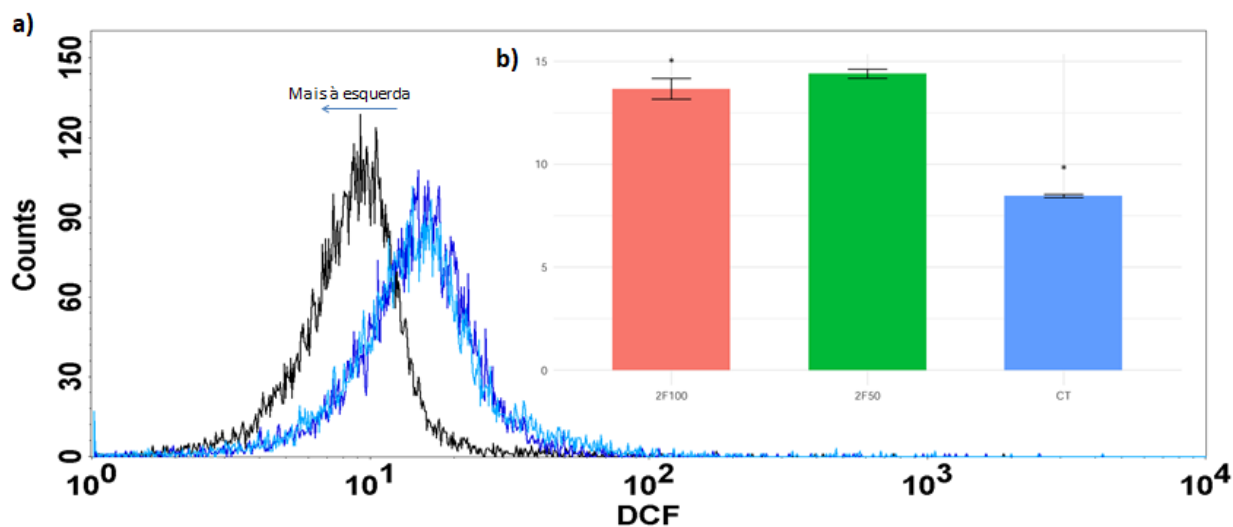
Figura 20: formas epimastigotas tratadas com a molécula 2a e marcadas com DCF



Legenda: Análise de citometria de fluxo para a produção de EROs citoplasmáticas por epimastigotas tratadas com a molécula 2a em 24h. Em (a), pelo histograma, a cor preta é observada como grupo CT; as curvas em verde escuro e verde claro representam o comportamento das populações após tratamento com a molécula 2a, representada pelas concentrações com 100 μM e 50 μM , respectivamente. Em (b), observa-se os tratamentos e o grupo controle em formato de barras.

Da mesma forma, ao analisar o histograma, observa-se que a molécula 2f também apresentou deslocamento mais acentuado à direita, no entanto, não houve mudança em relação às concentrações avaliadas. Esse deslocamento indica aumento de fluorescência, com mais EROs citoplasmáticas nas células, mostrando maior estresse oxidativo. A figura 19 mostra esse deslocamento acentuado.

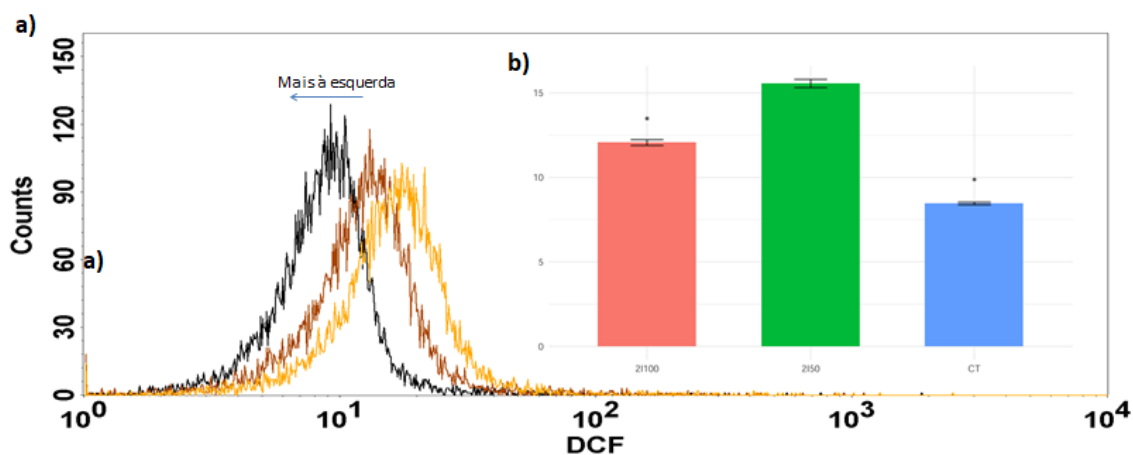
Figura 21: formas epimastigotas tratadas com a molécula 2f e marcadas com DCF



Legenda: Análise de citometria de fluxo para a produção de EROs citoplasmáticas por epimastigotas tratadas com a molécula 2f em 24h. Em (a), pelo histograma, a cor preta é observada como grupo CT; as curvas em verde escuro e verde claro representam o comportamento das populações após tratamento com a molécula 2f, representada pelas concentrações com 100 μM e 50 μM , respectivamente. Em (b), observa-se os tratamentos e o grupo controle em formato de barras.

Igualmente, a molécula 2i também apresentou o mesmo comportamento, sendo intensamente deslocada à direita, principalmente, em sua maior concentração, representados pela coloração amarela. Logo, este ensaio indica que houve aumento de fluorescência e, conseqüentemente, mais EROs formada no interior das células, indicando maior estresse oxidativo.

Figura 22: formas epimastigotas tratadas com a molécula 2i e marcadas com DCF

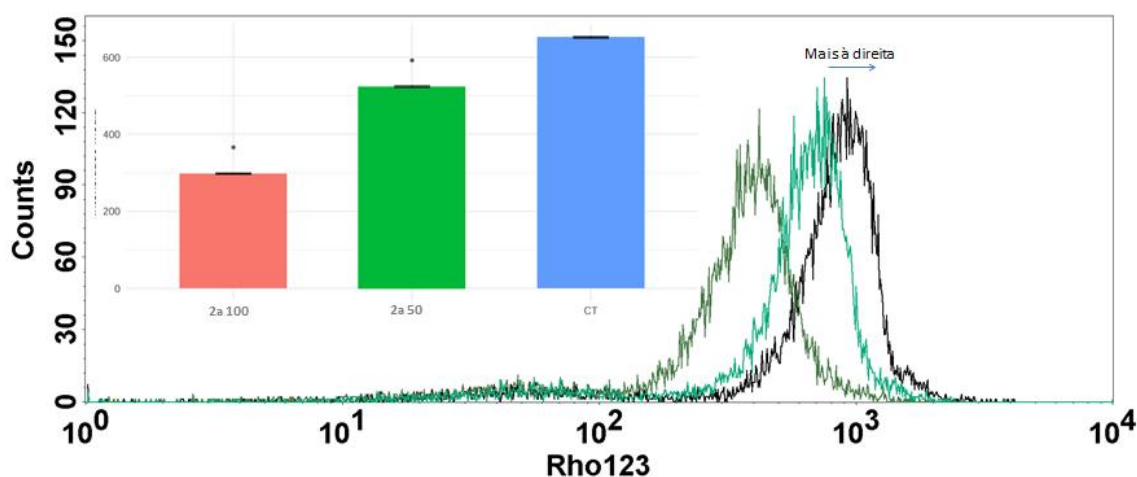


Legenda: Análise de citometria de fluxo para a produção de EROs citoplasmáticas por epimastigotas tratadas com a molécula 2i em 24h. Em (a), pelo histograma, a cor preta é observada como grupo CT; as curvas em verde escuro e verde claro representam o comportamento das populações após tratamento com a molécula 2i, representada pelas concentrações com 100 μM e 50 μM , respectivamente. Em (b), observa-se os tratamentos e o grupo controle em formato de barras.

5.4.3 Alteração no potencial transmembrânico mitocondrial

Este ensaio indica que quanto maior o potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$), mais Rho123 é retida, ou seja, esse corante se acumula em mitocôndrias ativas e quanto maior é a fluorescência, maior é o desvio à direita. Uma vez que a molécula 2a foi induzida, o seu $\Delta\Psi\text{m}$ cai, indicando dano mitocondrial, conseqüentemente, a Rho123 não é retida, e por isso, há menor fluorescência, e maior desvio à esquerda.

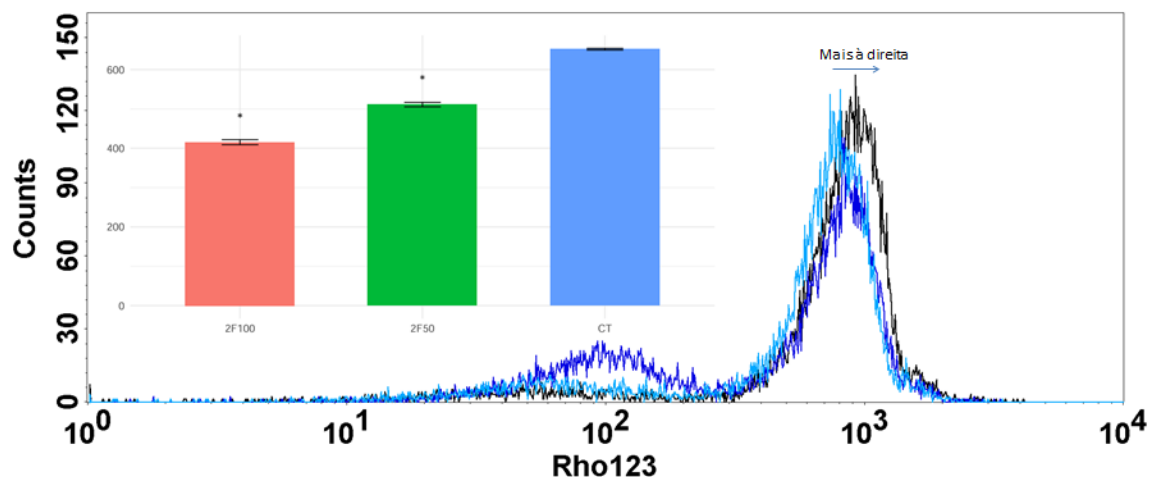
Figura 23: efeito relativo da molécula 2a sobre o $\Delta\Psi\text{m}$ em epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com Rho123



Legenda: A figura mostra o potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) avaliado pela intensidade de fluorescência relativa. A cor preta representa o grupo CT e as curvas em verde claro (meio) e verde escuro (à esquerda) representam os grupos tratados com 50 μM e 100 μM da molécula 2a, respectivamente.

De igual modo, após o tratamento com a molécula 2f, foi observado um pequeno deslocamento à esquerda, comparado ao grupo controle, indicando um leve impacto mitocondrial, de acordo com a figura 22.

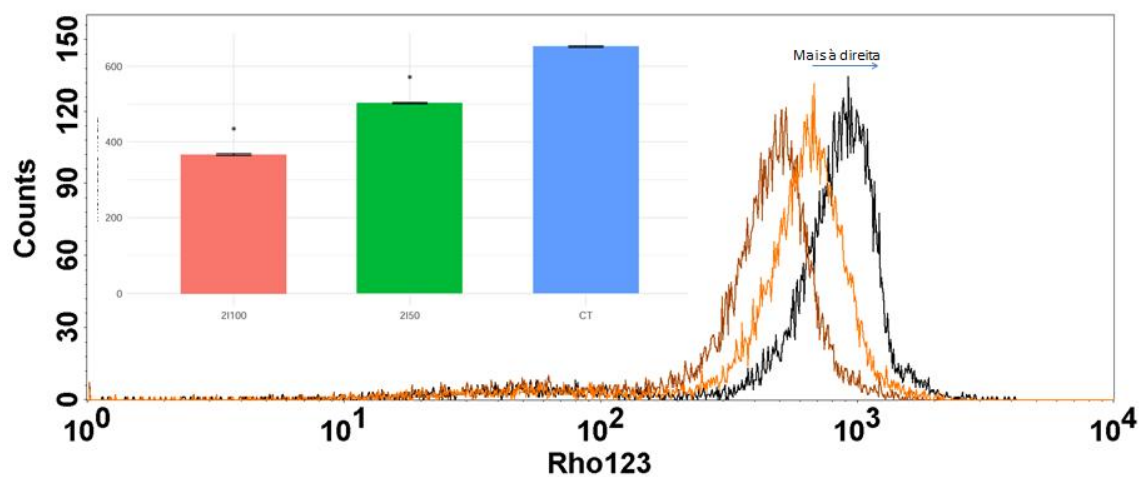
Figura 24: efeito relativo da molécula 2f sobre o $\Delta\Psi_m$ em epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com Rho123



Legenda: A figura mostra o potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) avaliado pela intensidade de fluorescência relativa. A cor preta representa o grupo CT e as curvas em verde claro (meio) e verde escuro (à esquerda) representam os grupos tratados com 50 μM e 100 μM da molécula 2f, respectivamente.

Igualmente, a molécula 2i mostrou-se ser capaz de induzir uma maior perda de potencial transmembrânico mitocondrial, demonstrado pelo seu deslocamento à esquerda, indicando que a molécula avaliada despolariza as mitocôndrias, de forma dose dependente, conforme demonstrado pela figura 23.

Figura 25: efeito relativo da molécula 2i sobre o $\Delta\Psi_m$ em epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com Rho123.



Legenda: A figura mostra o potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) avaliado pela intensidade de fluorescência relativa. A cor preta representa o grupo CT e as curvas em verde claro (meio) e verde escuro (à esquerda) representam os grupos tratados com 50 μM e 100 μM da molécula 2i, respectivamente.

5.5 Atividade Antioxidante e antiacetilcolinesterásica

Nos ensaios antioxidante, todas as amostras demonstraram a capacidade de inibir os radicais.

Tabela 3. Atividade antioxidante e antiacetilcolinesterásica de amostras diversas.

Amostras	CI ₅₀ DPPH• ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CI ₅₀ ABTS ⁺ • ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CI ₅₀ AChE ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
BHT (Padrão)	10,25 ± 0,02	10,67 ± 0,08	-
Trolox (Padrão)	12,35 ± 0,05	12,13 ± 0,07	-
Galantamina (Padrão)	-	-	5,82 ± 0,02
Fisostigmina (Padrão)	-	-	6,68 ± 0,08
bzn (Controle)	11,19 ± 0,24	16,46 ± 0,72	58,94 ± 6,48
2f	10,49 ± 0,37	12,10 ± 0,43	58,19 ± 22,32
2i	10,05 ± 0,72	13,97 ± 0,47	58,58 ± 49,13
2 ^a	8,56 ± 0,99	17,98 ± 0,75	18,87 ± 0,30

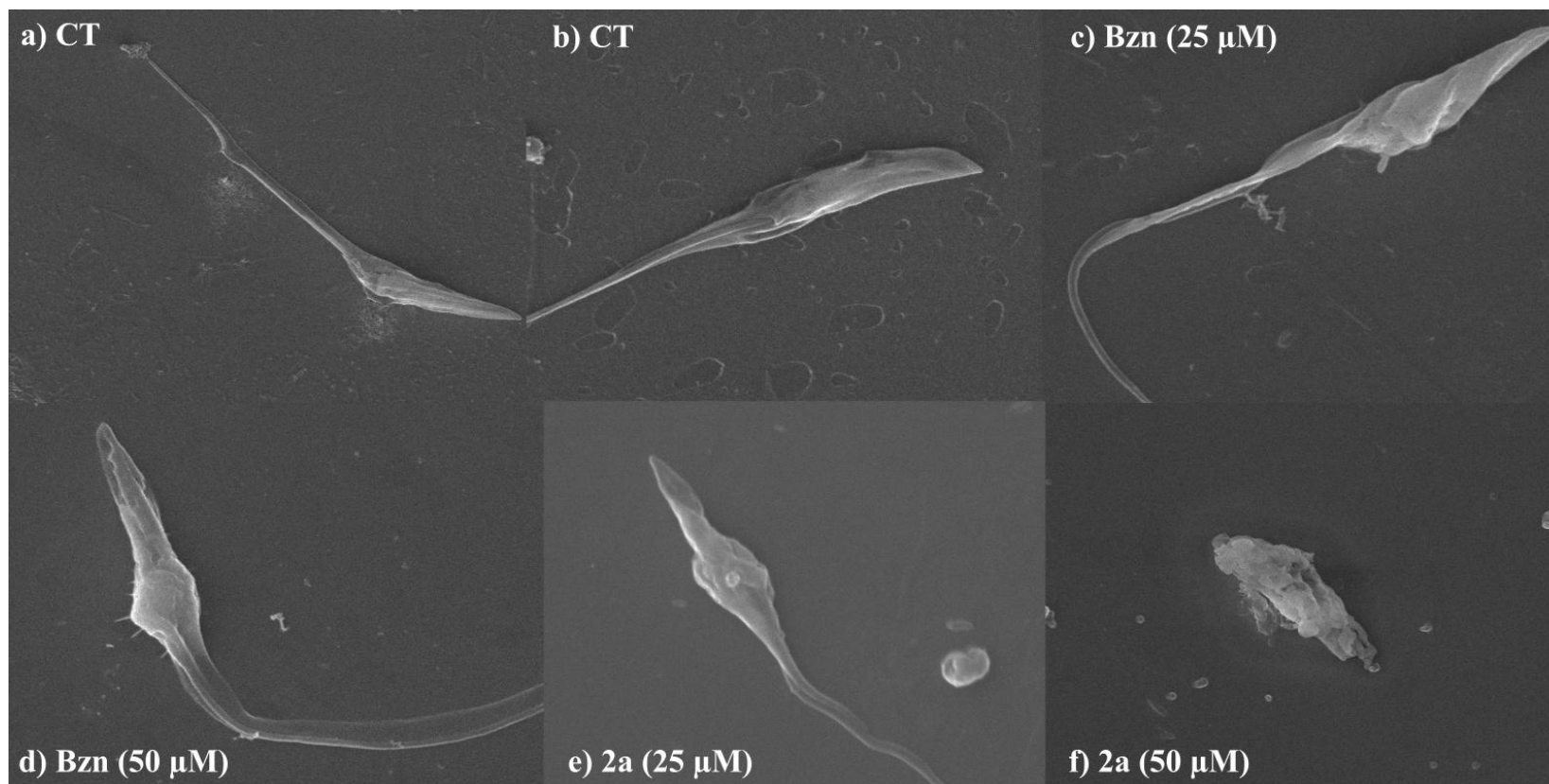
IC₅₀ - concentração inibitória média; BHT - Butil-hidroxitolueno; Trolox - Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico.

Os resultados obtidos indicam que as amostras exibiram uma elevada capacidade de inibição do radical tanto para o ABTS como para o DPPH, este tendo maior destaque para a amostra 2a com valores médios de concentração inibitória (IC₅₀) de 8,56 ± 0,99 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo mais ativo do que os antioxidantes comerciais BHT e Trolox.

Para a inibição da acetilcolinesterase, apenas a amostra 2a apresentou atividade de inibição da enzima, sendo classificada como tendo uma alta inibição, com IC₅₀ de 18,87 ± 0,30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, mostrando ser um material promissor em estudos de inibição desta enzima.

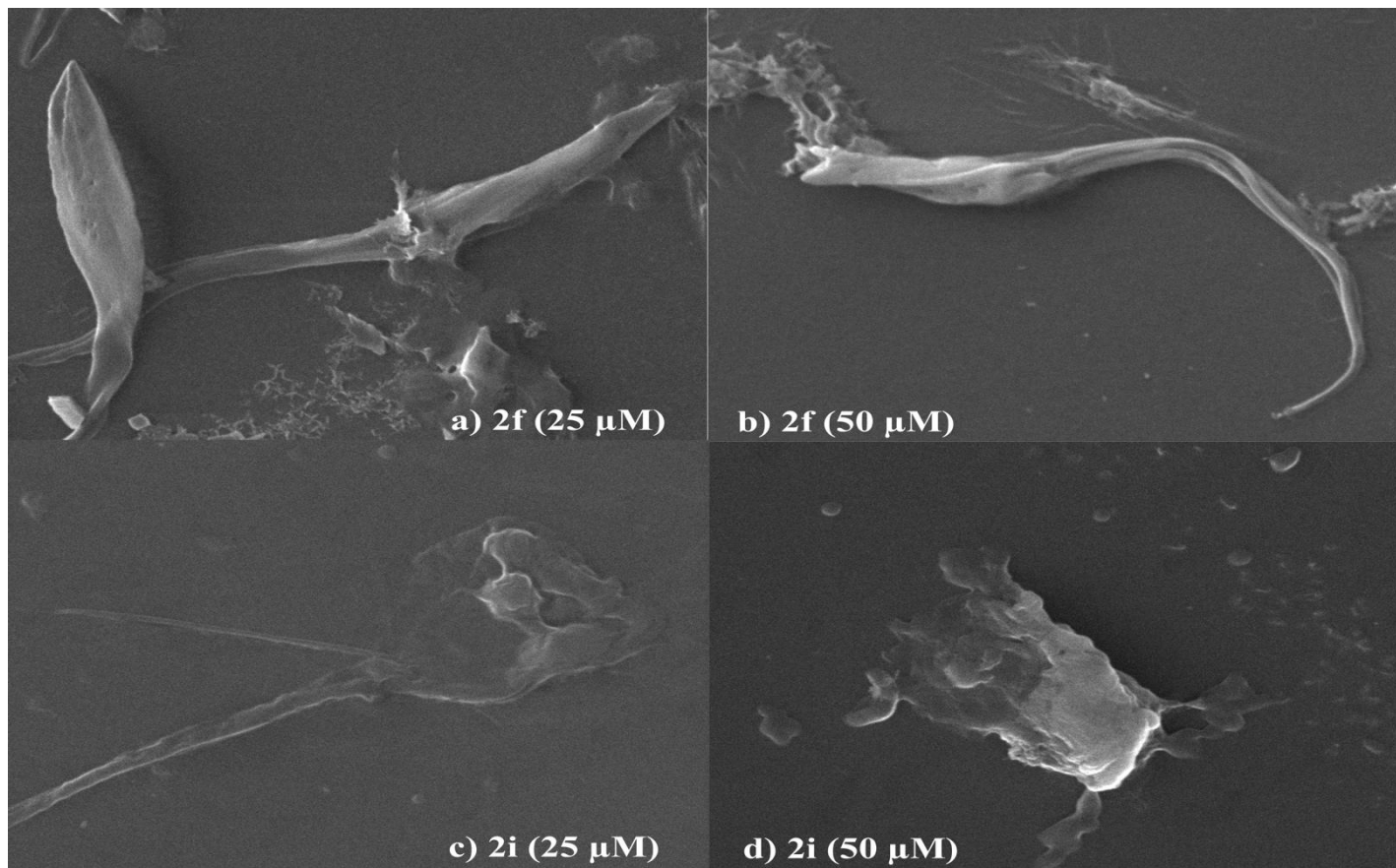
5.6 Alterações morfológicas em epimastigotas por MEV

Figura 26: alterações ultraestruturais demonstradas nas formas epimastigotas com os controles e a molécula 2a



Legenda: figuras A e B mostram morfologia inalterada das formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* sem nenhum tratamento. Figura C e D, após tratamento com o fármaco de referência (bzn) e a molécula 2a (E e F).

Figura 27: Alterações ultraestruturais demonstradas nas formas epimastigotas com as moléculas 2f e 2i



Legenda: Figuras A e B mostram morfologia alterada das formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* com o tratamento da molécula 2f. Figura C e D, mostram alterações ultraestruturais após tratamento com a molécula 2i.

Nas análises do MEV, na figura 24A-B, observou-se parasitos controles, com o comprimento adequado, com flagelos longos e visíveis, livres e preservados, corpo celular alongado típico e intacto em sua morfologia. Ainda na figura 24 (C e D), após o tratamento com o fármaco Bzn, nas duas concentrações (25 e 50 μM), observou-se irregulares no corpo e cauda e poros de membrana (24-C), além de rugosidade de membrana e espículas na superfície celular (24-D).

Após o tratamento com a molécula 2A na figura 24-E, é possível observar características celulares alteradas, como integridade de membrana, com presença de pequenas vesículas e leve rugosidade de membrana, possível desorganização flagelar, no entanto, menor dano estrutural. No entanto, na figura 24-F, se observa um maior dano, com possível colapso celular, com sinais claros de estresse celular ou lise. Além disso, observa-se retração, perda ou fragmentação flagelar e encurtamento ou deformação na forma celular.

Na figura 25A-B, após o tratamento com a molécula 2f, nas duas concentrações de 25 e 50 μM , se observam parasitos com morfologia geral alongada, com alterações compatíveis de estresse celular, como perda parcial do formato fusiforme típico, principalmente inchaço celular, rugosidades e depressões de superfície, além de presença de possíveis detritos celulares ao redor das células, indicando possível liberação de conteúdo intracelular.

Ainda que se observe alterações compatíveis com dano estrutural nas moléculas 2a e 2f, a molécula 2i, nas duas concentrações, foi capaz de colapsar quase que totalmente a morfologia parasitária, com alterações no corpo celular e perda evidente de simetria. Além disso, o flagelo foi totalmente desconectado ou fragmentado, podendo indicar comprometimento da integridade celular.

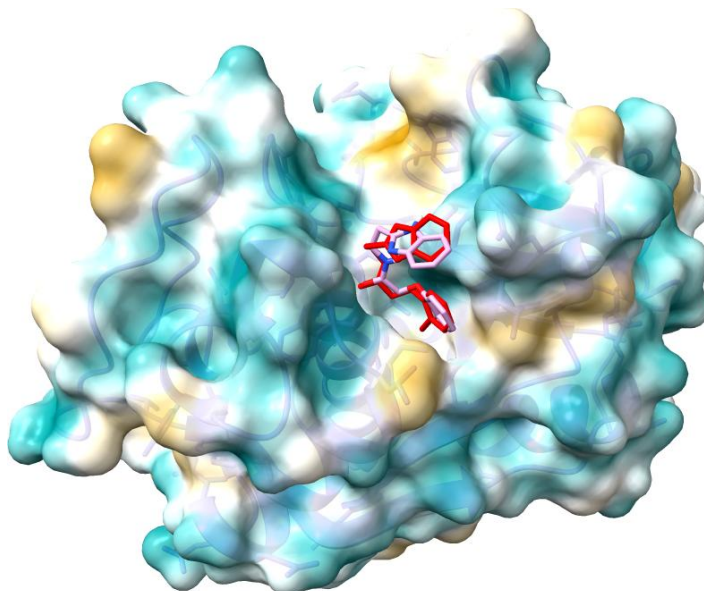
Após a realização dos ensaios *in vitro* com as três moléculas derivadas de oxadiazol, e visando um maior afinamento da molécula mais promissora para ensaios *in silico* e *in vivo*, foi possível selecionar a molécula 2a baseada em sua atividade tripanocida e índice de seletividade observadas pelos ensaios iniciais. A molécula de estudo selecionada destacou-se por ter mais eficácia, efeito dose e tempo dependente, sendo, portanto, selecionada para os ensaios de toxicidade.

5.7 Análise *in silico*: Redocking

A validação por redocking com a cruzaina e a molécula 2a revelou que a solução com melhor classificação (Top1), de acordo com a pontuação da CNN, resultou em um RMSD de 4,124 Å e um valor de afinidade estimado de -5,64 kcal/mol. No entanto, a segunda solução classificada (Top2), com uma afinidade de -5,12 kcal/mol, alcançou um RMSD significativamente melhorado de 1,099 Å, demonstrando a reprodução bem-sucedida da conformação de ligação nativa. Essa solução Top2 foi considerada adequada para cálculos adicionais de dinâmica molecular.

Notavelmente, a estrutura cristalina 3KKU fornece duas conformações do ligante B95: uma estendida e a outra dobrada. A solução obtida pelo ensaio de redocking correspondeu à conformação dobrada, confirmando a confiabilidade do protocolo de docking e das configurações de parâmetros. Esse resultado reforça a capacidade do Gnina de prever com precisão as conformações de ligação do ligante sob as condições computacionais estabelecidas e fornece confiança nos ensaios de docking subsequentes da série de compostos.

Figura 28: Redocking do ligante nativo B95 na cruzaina.



Legenda: Demonstração da reprodução bem-sucedida da conformação de ligação nativa da cruzaina.

5.7.1 Análise e avaliação do docking

Tabela 4: Os valores de afinidade e CNN foram obtidos a partir dos ensaios de docking.

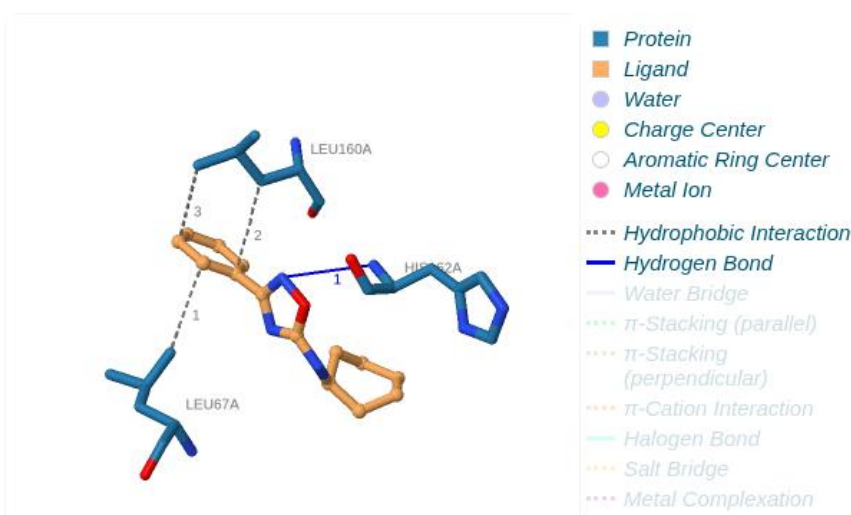
Molécula	Afinidade (kcal/mol)	intramol (kcal/mol)	Pose CNN score	Afinidade CNN
B95	-5,64	-0,8	0,8686	5,961
2 ^a	-5,76	-0,23	0,8088	5,055

A molécula 2a apresentou desempenho favorável em comparação com o ligante cristográfico (B95), apresentando melhor afinidade por CNN mais baixo (5,055) do que B95 (5,961), sugerindo que, mesmo com a classificação de pose otimizada, a rede neural prevê interações de ligação mais fracas com base em características estruturais 3D e que a molécula testada possui potencial de interação com o sítio ativo da enzima.

Além disso, ofereceu afinidade de ligação aprimorada, mantendo uma alta confiança na classificação de pose por CNN e evitando tensão interna significativa, tornando-o o candidato mais promissor para investigação adicional.

Em relação as análises das interações intermoleculares, a molécula 2a estabeleceu ligações hidrofóbicas favoráveis à estabilização do complexo, se ligando aos resíduos Leu67, Leu160 e His162 (associada predominantemente à ancoragem de ligantes no sítio catalítico da cruzaina), conforme demonstrado pela figura 29:

Figura 29: Mapas de interação para a molécula 2a calculados usando o PLIP WEB (SALENTIN et al., 2015).



Legenda: Interações hidrofóbicas com Leu67 e Leu160, enquanto uma ligação de hidrogênio é formada com His162. A pose foi obtida usando o software Gnina.

5.7.2 Análises das previsões do Servidor Boltz-2

O Servidor Boltz-2 considera apenas as sequências de proteínas e a sequência de SMILES do ligante como informações de entrada, desconsiderando elementos estruturais cruciais, como a presença de cofatores e moléculas de água estruturais. Essa limitação impediu o algoritmo de identificar a pose cristalográfica como ótima, afetando potencialmente as previsões de afinidade de ligação.

Apesar das limitações apresentadas, a molécula 2a apresentou um perfil levemente menos favorável que a molécula B95 em todas as métricas avaliadas ($IC_{50} = 9567,53$ nM, $\Delta G = -6,85$ kcal/mol, probabilidade = 23,14%), em contraste com os resultados obtidos por acoplamento molecular usando o Gnina.

Tabela 5: Análises das previsões utilizando o Servidor Boltz-2

Molécula	$\log(IC_{50})$	Concentração (nM)	ΔG (calculado)	Probabilidade de ligação
B95	0,2115	1627,42	-7,90	58,75%
2a	0,9808	9567,53	-6,85	23,14%

Legenda: Previsões da molécula 2a pelo Servidor Boltz-2 indicando baixa probabilidade de ligação e IC_{50} predito elevado.

5.7.3 Análises de Dinâmica Molecular (DM)

Após as simulações de DM, foram avaliados a distribuição de clusters e os valores de RMSD dos ligantes. A análise de cluster indicou que o ligante B95 apresentou 9 clusters, enquanto a molécula 2a apresentou apenas 1 cluster, com 100% de ocupação, indicando uma maior consistência conformacional do ligante.

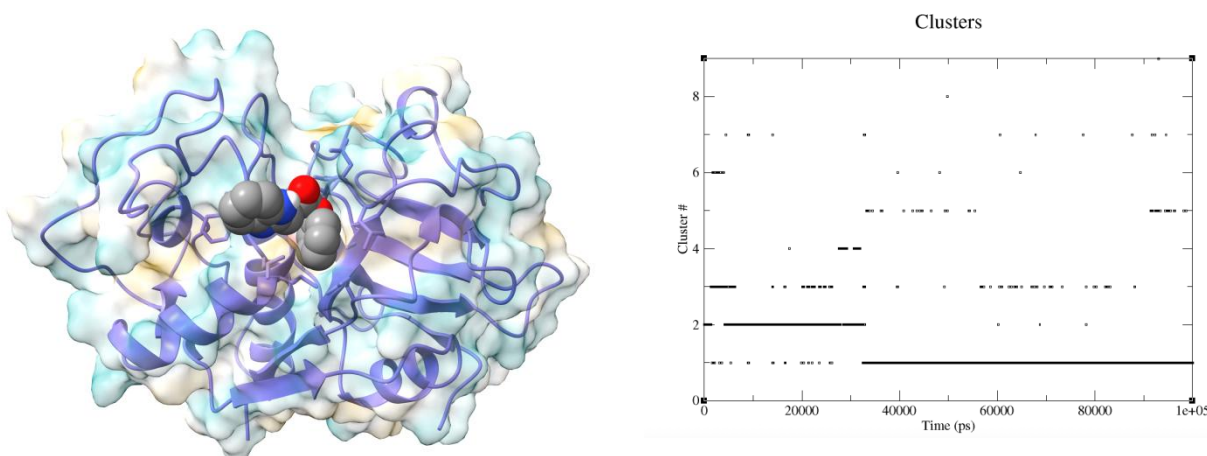
Tabela 6: Análise de RMSD dos ligantes B95 e molécula em estudo (2a):

Compound	# Clusters	Occupancy #1	RMSD (Angstrom)
B95	9	66,07	6,6
2 ^a	1	100,00	1,0

Legenda: A análise de RMSD das poses obtidas para o ligante B95 e a molécula 2a no sítio ativo da cruzaina.

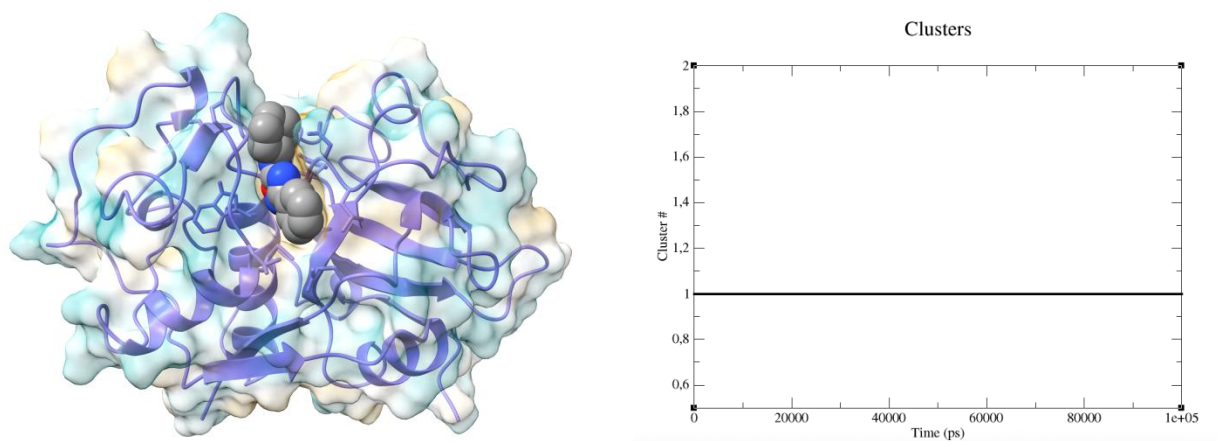
O valor de 1,0 Å para o ligante 2a demonstra alta estabilidade conformacional, com flutuações mínimas em relação ao sítio ativo.

Figura 30: Distribuição dos valores de RMSD de B95



Legenda: Poses obtidas por docking para o ligante cristalográfico B95, evidenciando agrupamentos conformacionais no sítio ativo da cruzaina.

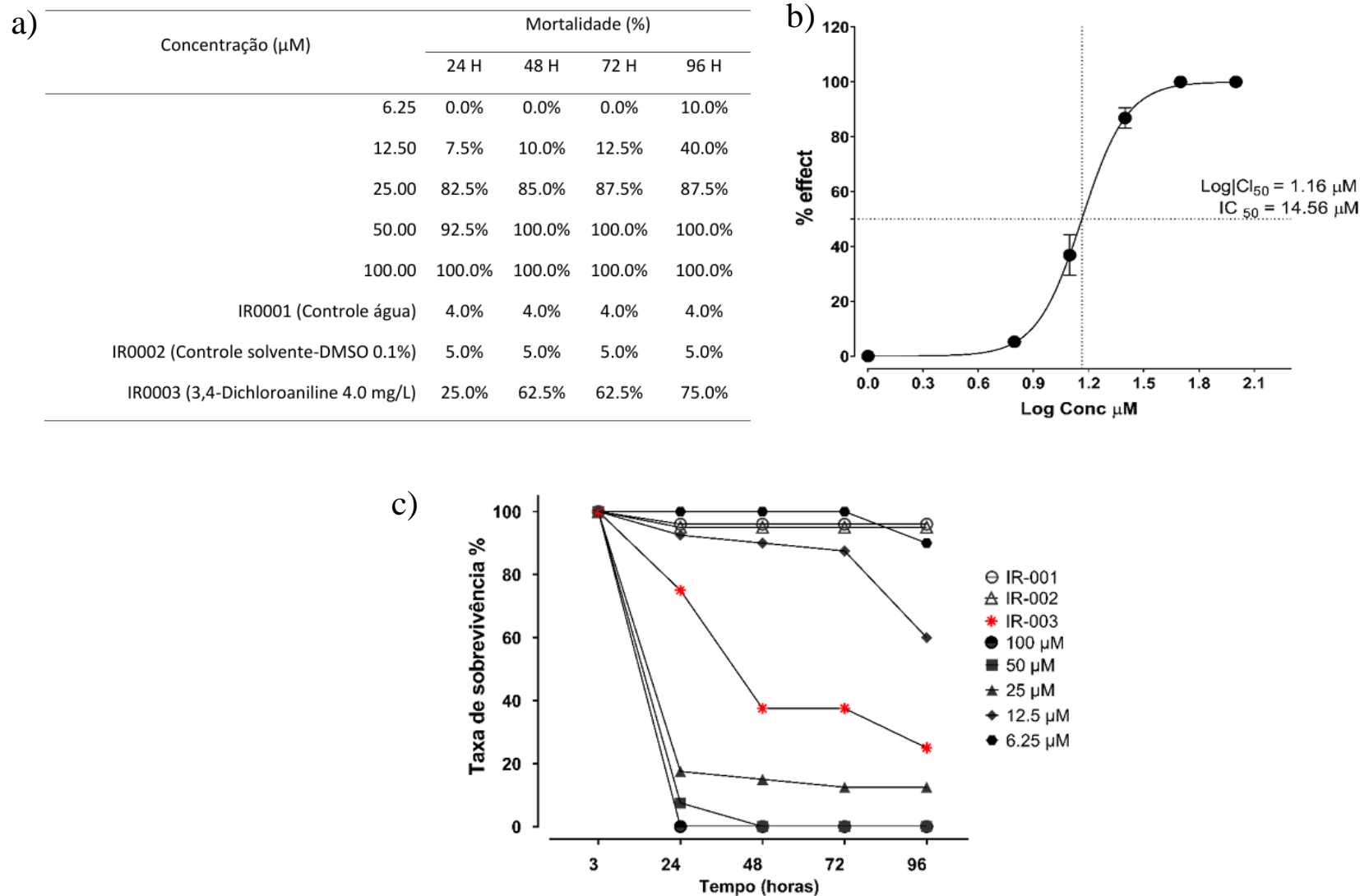
Figura 31: Distribuição dos valores de RMSD da molécula 2a



Legenda: Poses obtidas por docking, indicando que a molécula 2a possui agrupamento conformacional no sítio ativo da cruzaiína.

5.8 Toxicidade em embriões de Zebrafish (*Danio rerio*)

Figura 32: Efeito concentração-dependente na mortalidade, curva concentração-resposta e análise da sobrevivência da molécula 2a.

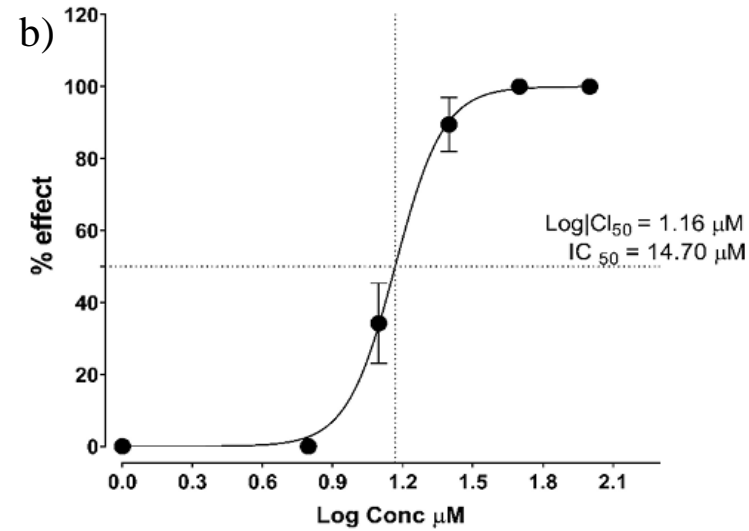


Legenda: Avaliação dos efeitos da molécula em estudo em embriões de zebrafish. (A) taxa de mortalidade (%) em função do tempo de exposição e diferentes concentrações testadas. (B) curva concentração-resposta representando a relação entre o log da concentração e mortalidade. (C) taxa de sobrevivência (%) dos embriões.

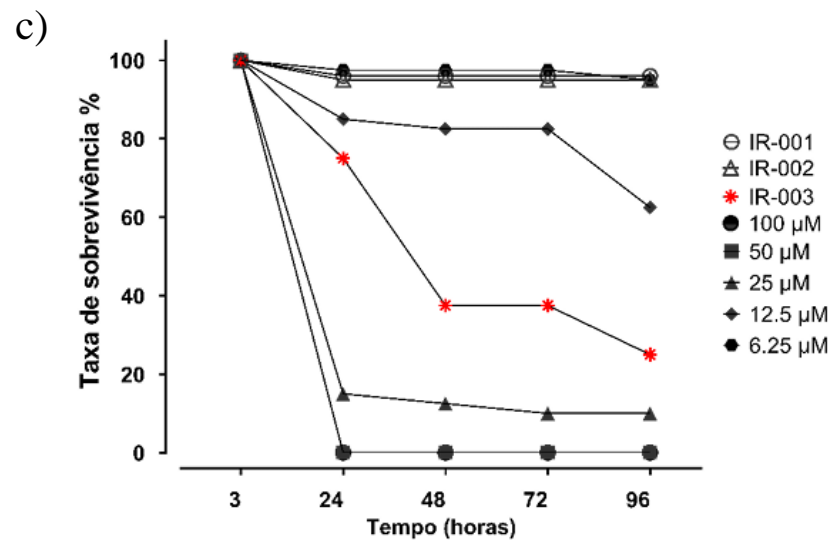
Figura 33: Efeito concentração-dependente na mortalidade, curva concentração-resposta e análise da sobrevivência do Benznidazol.

a)

Concentração (μM)	Mortalidade (%)			
	24 H	48 H	72 H	96 H
6.25	2.5%	2.5%	2.5%	5.0%
12.50	15.0%	17.5%	17.5%	37.5%
25.00	85.0%	87.5%	90.0%	90.0%
50.00	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
100.00	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
IR0001 (Controle água)	4.0%	4.0%	4.0%	4.0%
IR0002 (Controle solvente-DMSO 0.1%)	5.0%	5.0%	5.0%	5.0%
IR0003 (3,4-Dichloroaniline 4.0 mg/L)	25.0%	62.5%	62.5%	75.0%



Legenda: Avaliação dos efeitos da molécula em estudo em embriões de zebrafish. (A) taxa de mortalidade (%) em função do tempo de exposição e diferentes concentrações testadas. (B) curva concentração-resposta representando a relação entre o log da concentração e mortalidade. (C) taxa de sobrevivência (%) dos embriões.



Os dados obtidos no ensaio com zebrafish mostram que a molécula 2a apresenta um efeito dependente tanto da dose quanto do tempo de exposição. Conforme demonstrado na figura 33A, nas concentrações mais baixas (6,25 μM) praticamente não há mortalidade mesmo após 72h, com discreto aumento de 10% em 96 horas, indicando baixa toxicidade nessa faixa de concentração. Por outro lado, na concentração intermediária de 12,5 μM , observa-se um aumento progressivo gradual da mortalidade ao longo do tempo, evidenciando efeito cumulativo de exposição.

A partir de 25 μM , a toxicidade se torna evidente, com mortalidade superior a 80% já nas primeiras 24 horas, mantendo-se elevada até 96h. Por outro lado, nas maiores concentrações (50 e 100 μM), a mortalidade atinge valores máximos de 100%, caracterizando um quadro de toxicidade aguda severa. Em contrapartida, os grupos controle (água e DMSO) apresentam baixa mortalidade, confirmando a validade e confiabilidade dos resultados experimentais.

A figura 33B complementa esses achados ao demonstrar uma relação sigmoideal entre o *log* da concentração e a mortalidade, indicando que há um aumento da resposta biológica a partir de um determinado limiar de concentração. Com base nessa análise, foi determinado um valor de $\text{LC}_{50} = 14,56 \mu\text{M}$, indicando que concentrações relativamente baixas já são suficientes para provocar efeito letal em 50% dos embriões.

De forma a complementar, a figura 33C evidenciando um comportamento inverso ao da mortalidade. Observa-se que há uma acentuada queda na taxa de sobrevivência à medida que há aumento da concentração, com uma redução mais crítica a partir de 12,5 μM , consolidando o perfil tóxico da molécula 2a.

De maneira semelhante, os resultados apresentados na figura 34A evidenciam que o fármaco Bzn também apresenta um perfil de toxicidade dependente da dose. Nas concentrações de 6,25 μM , a mortalidade é praticamente inexistente, enquanto em 12,5 μM , se observa um aumento progressivo ao longo tempo. A partir da dose de 25 μM , ocorre um aumento abrupto da mortalidade em 24 horas, que se mantém elevado até 96 horas. Assim como observado para a molécula 2a, nas maiores concentrações (50 e 100 μM), a mortalidade atinge 100% em todos os tempos experimentais, caracterizando uma toxicidade aguda significativa.

Na figura 34B, a curva dose-resposta apresenta um padrão sigmoidal, indicando uma forte relação entre o aumento da concentração e mortalidade embrionária. A partir dessa análise, foi estimada o valor de LC_{50} de aproximadamente 14,70 μM , muito próximo ao observado para a molécula 2a, sugerindo perfil toxicológico semelhante entre ambos. Por fim, a figura 34C demonstra a taxa de sobrevivência dos embriões, evidenciando uma redução progressiva da viabilidade conforme o aumento da concentração. Essa queda se torna mais acentuada a partir de 12,5 μM , corroborando o padrão observado nos dados de mortalidade.

DISCUSSÃO

Recentemente, estudos têm investigado a atividade de derivados sintéticos de 1,2,4-oxadiazol contra linhagens de células tumorais, bem como seus possíveis mecanismos imunomediados, por meio de uma revisão sistemática (MENDES ARAÚJO et al., 2023). Além disso, essas moléculas tiveram seus efeitos antitumorais e imunomoduladores avaliados em células de melanoma, assim como suas atividades leishmanicidas e tripanocidas *in vitro* (ROCHA et al., 2022; PINHEIRO et al., 2025). Nesse contexto, visando ampliar a investigação de novas moléculas antiparasitárias, particularmente contra o *Trypanosoma cruzi*, foram realizadas nessa pesquisa avaliações biológicas de três derivados contendo o núcleo de 1,2,4-oxadiazol.

Na literatura, compostos heterocíclicos, especialmente os 1,2,4-oxadiazol, são reconhecidos como farmacóforos relevantes no desenvolvimento de novos fármacos (BIERNACKI et al., 2020). Esse heterocíclico nitrogenado de cinco membros apresenta ampla diversidade de atividades farmacológicas, sendo objeto de estudo em diferentes áreas científicas, incluindo a indústria farmacêutica. Entre essas atividades, destacam-se propriedades antifúngicas (YU et al., 2005), antivirais (NAM et al., 2022), anticonvulsivantes (MOHAMMADI-KHANAPOSHTANI et al., 2019) e antibacterianas (FREJAT et al., 2022).

Nesse sentido, diversos estudos vêm explorando as atividades biológicas dos derivados de 1,2,4-oxadiazol, incluindo seus efeitos antiparasitários. Barbosa et al., (2024) descreveram esses efeitos por meio de abordagens *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, desmonstrando atividade biológica promissora contra *Leishmania infantum*. Paralelamente, a literatura destaca as limitações terapêuticas no tratamento da Doença de Chagas (DC) com Benznidazol ou Nifurtimox, como os desafios na busca por novas opções terapêuticas ou no reposicionamento de fármacos já aprovados (KAISER et al., 2015).

Para exemplificar, um derivado de 1,3,4-oxadiazol-2-il benzamida demonstrou inibir a enzima fúngica esterol 14 α -desmetilase (CYP51) de *T. cruzi*, promovendo alterações estruturais e no crescimento do parasito, além de aumenta a sobrevida e induzir cura parasitológica em camundongos BALB/c tratados com 25mg/kg (VILLALTA et al.,

2013). Compostos que atuam na via de biossíntese de esteróis, especialmente a CYP51, têm sido amplamente investigados (GUEDES-DA-SILVA et al., 2019).

Em outro estudo, análogos dessa classe, associados ao benznidazol, resultaram em cura parasitológica em até 70% dos camundongos Swiss, com efeito potencializado frente a cepas resistentes. Adicionalmente, De Oliveira et al., (2018), avaliaram a atividade antitumoral de derivados 3,5-dissubstituídos de 1,2,4-oxadiazol, demonstrando atividade antiproliferativa contra três linhagens de câncer de cólon (HCT), próstata (PC-3) e glioblastoma (SNB-19), além de citotóxica de baixa a moderada.

No presente estudo, os derivados 2a, 2f e 2i foram sintetizados por irradiação assistida micro-ondas, a partir de uma solução de arilamidoximas e diciclohexilcarbodiimida. Essas moléculas apresentam núcleo 1,2,4-oxadiazol-5-amina, com substituição por grupo N-ciclohexil, o que aumenta sua lipofilicidade. Modificações estruturais, especialmente no anel aromático, podem favorecer interações com sítios ativos de enzimas alvo, influenciando potência e seletividade (DE SOUSA et al., 2019).

Apesar dos avanços, ainda há lacunas no conhecimento sobre esses compostos e seu potencial terapêutico contra a doença de Chagas. Neste estudo, os derivados foram avaliados nas três formas evolutivas de *T. cruzi*, além de seus efeitos citotóxicos em células hospedeiras. A cepa Y de *T. cruzi* foi utilizada devido à sua alta infectividade *in vitro* e por sua resistência parcial ao benznidazol, sendo amplamente empregada como modelo de experimental (SYKES; KENNEDY & AVERY, 2023; FRANCO et al., 2019).

Inicialmente, a citotoxicidade foi avaliada em células LLC-MK2 por ensaio MTT permitindo o cálculo da CC50. Esse modelo é amplamente utilizado na triagem de compostos tripanocidas devido à sua susceptibilidade de infecção e facilidade de cultivo (DURAN-REHBEIN et al., 2014; BELTRAN-HORTELANO et al., 2022).

Beltrano-Hortelano et al., (2022) e Borba-Santos et al., (2020) realizaram o ensaio de citotoxicidade utilizando o método MTT, levando em consideração que a seletividade entre o parasito *T. cruzi* e as células do hospedeiro representam um dos principais desafios terapêuticos. Nesse contexto, os resultados demonstraram que as moléculas 2f e 2i apresentaram maior citotoxicidade, enquanto a 2a foi menos tóxica. O bzn apresentou CC50 de 59,1 μM , compatível com toxicidade moderada, possivelmente associada à

geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) após bioativação do grupo nitroimidazol (TÉLLEZ et al., 2019).

Os valores de CC50 para 2f foi de 14 μM e da 2i de 25,7 μM podem ser explicados por suas características estruturais, como a presença de grupos trifluorometil (-CF₃) e flúor (-F), respectivamente, que aumentam a lipofilicidade e reatividade, favorecendo a interação com membranas e organelas celulares (LIU et al., 2021). A característica estrutural da molécula 2f permite com que haja penetração na membrana celular, afetando organelas sensíveis e causando morte celular, além disso, a molécula 2i pode impactar as propriedades farmacocinéticas e interações indesejadas (ZAINAB et al., 2025).

Por outro lado, a molécula 2a apresentou maior CC50 221 μM , sugerindo menor toxicidade, possivelmente relacionada à sua estrutura menos reativa. A presença de um substituinte cicloexil confere um caráter hidrofóbico, além de aumentar a massa e lipofilicidade. Esses atributos podem diminuir a capacidade de cobertura celular e a camada protetora contra alvos citotóxicos, resultado, assim, aumento da CC50 (YANG et al., 2021). Estes efeitos citotóxicos são relevantes para analisar o perfil de segurança celular entre os derivados testados, podendo indicar que alterações estruturais entre as moléculas afetam diretamente a interação, ou a falta dela, com as células do hospedeiro, sinalizando uma menor ou maior tolerabilidade celular.

Estudos recentes demonstraram que um conjunto de derivados de pirazolimidazolina também apresentou baixa toxicidade, com valores de CC50 superiores a 100 μM . Ademais, há evidências na literatura que investigam a relação entre características estruturais e os perfis de bioatividade e toxicidade desses compostos (DE OLIVEIRA et al., 2025). Nesse contexto, a toxicidade para as células hospedeiras também foi avaliada no presente estudo, por meio da determinação da concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular (CC50). No entanto, é importante destacar que o ensaio de MTT avalia a atividade metabólica mitocondrial, não sendo capaz de distinguir os diferentes mecanismos de morte celular envolvidos.

Os resultados obtidos neste estudo indicaram que os derivados avaliados exibem perfis distintos de citotoxicidade. A molécula 2a apresentou o menor efeito citotóxico, seguida pela molécula 2i, enquanto a molécula 2f demonstrou maior impacto na

viabilidade celular. Esses achados sugerem que pequenas variações estruturais entre os compostos influenciam diretamente sua interação com componentes celulares, refletindo em diferentes níveis de citotoxicidade. Posteriormente, foram conduzidos experimentos com as formas epimastigotas, apesar de não estar presente diretamente no hospedeiro humano, ela desempenha um papel essencial no ciclo biológico do parasito, sendo responsável por sua multiplicação no vetor triatomíneo e pela posterior diferenciação em tripomastigotas metacíclicos, formas infectantes (BRENER, 1973; KOLLIEN & SCHAUB, 2000).

As formas epimastigotas são amplamente utilizadas em ensaios *in vitro* devido a sua facilidade de cultivo, rápido crescimento e estabilidade experimental. Por essa razão, constituem um modelo triagens iniciais de compostos com potencial atividade tripanocida. Além disso, oferece *insights* relevantes sobre metabolismo, divisão celular e resposta a agentes químicos (SANA; ROSSI & RAMIREZ, 2025). Nesse cenário, os derivados de oxadiazol foram avaliados quanto à sua capacidade de inibir o crescimento das formas epimastigotas nas diferentes concentrações testadas. Os resultados demonstraram um efeito dependente da dose, caracterizado por aumento progressivo da taxa de morte parasitária com o aumento da concentração.

Resultados semelhantes foram descritos por Pitasse-Santos & Colaboradores (2022), que compilaram uma série de derivados de 1,2,4 oxadiazol com atividade biológica contra *T. cruzi* e *L. amazonensis*. No entanto, esses autores não evidenciaram padrão concentração-resposta linear nos parâmetros avaliados. No presente estudo, os ensaios foram conduzidos em períodos de incubação de 24h e 48h, uma vez que evidências recentes indicam que períodos mais prolongados, como o de 72h podem introduzir variáveis experimentais, como depleção de nutrientes e alterações no microambiente de cultivo, interferindo na interpretação dos resultados (ARIAS; PÉREZ & GARAVITO, 2025).

Destaca-se ainda que as formas tripomastigotas e amastigotas derivadas da infecção de células LLC-MK2 apresentam alta capacidade de infecção, internalização e liberação de novas formas parasitárias, constituindo um modelo robusto para avaliação da atividade antiparasitária (ZINGALES et al., 1982). Nos experimentos realizados neste trabalho, as formas tripomastigotas foram avaliadas após 24 horas de exposição, considerando que se trata de formas não replicativas em cultivo, o que favorece a

observação de efeitos diretos dos compostos sobre a viabilidade e motilidade do parasito (MACLEAN et al., 2018). Os resultados demonstraram que as concentrações letais médias (LC_{50}) foram de 14.2 μM (2a), 6.6 μM (2f) e 2.6 μM (2i), evidenciando atividade tripanocida relevante em curto período de exposição.

Esses valores são consistentes com dados da literatura, nos quais derivados de oxadiazol apresentaram LC_{50} na faixa micromolar (9.5-3.5 μM), enquanto o Benznidazol apresentou LC_{50} de 11.3 μM (DOS SANTOS FILHO et al., 2012), corroborando o potencial biológico desses compostos. Em seguida, foi calculado o índice de seletividade (IS), parâmetro que expressa a relação entre a toxicidade para células hospedeiras e atividade antiparasitária. De modo geral, quanto maior o IS, maior a seletividade dessa molécula pelo parasito (HUGGINS; SHERMAN & TIDOR, 2012; LICA et al., 2021). Os resultados indicaram que, com exceção da molécula 2f, as moléculas 2a e 2i apresentaram valores de IS relevantes (5,8, 15 e 9,8, respectivamente), sugerindo maior segurança e potencial terapêutico.

A atividade dos derivados também foi avaliada nas formas amastigotas intracelulares, que representam a fase replicativa do parasito no hospedeiro vertebrado e estão diretamente associadas à patogênese da doença. Essas formas se multiplicam por divisão binária, contribuindo para danos celulares, inflamação e fibrose tecidual (DE ARAÚJO, 2019). Logo, a replicação de amastigotas *in vitro* começa rapidamente após a invasão. Por isso, os protocolos de triagem de drogas e bioensaios costumam padronizar o período de incubação em 24 horas, o que é suficiente para identificar variações na resposta ao tratamento (LEY et al., 1988).

Nos ensaios realizados, foram analisados dois parâmetros principais: número médio de amastigotas por célula infectada e o índice de sobrevivência (%). Esses parâmetros permitem diferenciar, respectivamente, os efeitos sobre a carga parasitária intracelular e sobre a viabilidade do parasito. Os resultados neste estudo demonstraram que a molécula 2a promoveu redução no número de amastigotas por célula, tanto na concentração de 30 μM quanto em 60 μM , sendo este efeito mais pronunciado na maior concentração. Esse achado é relevante, considerando que a redução da carga parasitária intracelular impacta diretamente a persistência da infecção (FERRI & EDREIRA, 2021). Em contrapartida, no ensaio de sobrevivência, observou-se que os valores permaneceram

elevados (60,7% e 52,3%), enquanto os grupos controle apresentaram cerca de 100% de sobrevivência.

Uma meta-análise recente demonstrou que a eficácia do benznidazol pode variar significativamente nas formas amastigotas, dependendo do tempo de incubação e da linhagem de *T. cruzi*, sugerindo que o estado replicativo influencia a sensibilidade ao tratamento (JAYAWARDHANA et al., 2023). Além disso, mecanismos como quiescência parasitária e adaptação ao estresse podem contribuir para a persistência do parasito em condições *in vitro* (DUMOULIN & BURLEIGH, 2018; WAD et al., 2020), reforçando a necessidade do desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

A molécula 2f também demonstrou atividade antiparasitária relevante contra amastigotas intracelulares, com redução significativa tanto na carga parasitária quanto na taxa de sobrevivência, de forma dependente da concentração. Os valores de redução observados foram de 67,7% e 56,9%, nas concentrações de 30 e 60 μM , respectivamente, enquanto o bzn apresentou redução de aproximadamente 80%. Por sua vez, a molécula 2i apresentou o perfil mais potente entre as moléculas avaliadas, promovendo redução expressiva no número de amastigotas por célula infectada e na taxa de sobrevivência, com valores de 36,8% e 54,5% nas concentrações de 30 e 60 μM , respectivamente. Esses dados indicam um efeito íntiseco relevante sobre o parasito intracelular.

Em contraste, o bzn apresentou efeito mais discreto nas condições experimentais avaliadas, sugerindo dependência de maior tempo de exposição para máxima eficácia, conforme descrito na literatura (MEJIA et al., 2012; VELA et al., 2021). Os derivados de oxadiazol avaliados apresentam um núcleo contendo grupo hidrazida modificado ($-\text{NH}-\text{NH}-\text{R}$) associado ao anel oxadiazol. Essa configuração estrutural sugere que esses compostos podem atuar como protonóforos, promovendo o transporte de prótons através da membrana mitocondrial interna, levando desacoplamento da fosforilação oxidativa (CHILDRESS et al., 2020). Esse mecanismo pode explicar, ao menos em parte, os efeitos observados sobre viabilidade do parasito.

Posteriormente, o ensaio de citometria de fluxo foi realizado para avaliar os diferentes perfis de morte. A literatura indica que o *T. cruzi* exibe características de morte celular semelhantes à apoptose. Isso ocorre porque o *T. cruzi* não possui caspases, como as células animais, o que resulta em vias alternativas de morte celular regulada (CORIA-

PAREDES; WILKINS-RODRÍGUEZ & GUTIÉRREZ-KOBEH, 2025). Ainda assim, frequentemente se utilizam marcadores associados à apoptose, como a exposição de fosfatidilserina e a fragmentação do DNA, avaliados por Anexina V e 7-AAD, mesmo que os mecanismos bioquímicos em *T. cruzi* não sejam idênticos aos de células animais (SARASTE & PULKKI, 2000).

Nesse sentido, as análises de *dot plot* demonstraram que o grupo controle foi formado predominantemente por células viáveis, localizadas no quadrante LL, caracterizadas pela ausência de marcação para Anexina V e 7-AAD, indicando a confiabilidade do controle negativo do ensaio. Em relação à molécula 2a, nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M, observou-se um leve deslocamento populacional, com aumento de marcação compatível com apoptose tardia, sugerindo possível indução de necrose. Esse achado é consistente com o estudo de Lachhab & Colaboradores (2022), que demonstraram que análogos de pirimidina e 1,3,4-oxadiazol induziram significativamente apoptose inicial e tardia em células cancerígenas após 24 horas de tratamento.

De forma semelhante, outro estudo envolvendo duas novas séries de derivados de oxadiazol também demonstrou modulação dos mecanismos apoptóticos em células HepG-2, mostrando apoptose tardia e alterações na expressão de proteínas pró e anti apoptóticas (SERAG et al., 2022). É provável que a exposição de fosfatidilserina esteja associada a esses processos de morte celular, uma vez que a Anexina V é um marcador sensível não apenas para a apoptose, mas também para eventos de necrose (VERMES et al., 1995). Ainda nas análises de citometria de fluxo, as moléculas 2f e 2i induziram um perfil de morte celular com características de apoptose tardia em epimastigotas de *T. cruzi*. Essa característica foi evidenciada pelo aumento da população no quadrante UR e reforçada pela análise em *dot plot*, demonstrando um efeito dependente de concentração, sobretudo em 100 μ M, com aumento das populações Anexina V+ e 7AAD+.

Nos ensaios de citometria de fluxo, foi utilizada a sonda DCF-DA (diacetato de diclorodihidrofluoresceína), amplamente empregada para quantificar espécies reativas de oxigênio (EROs) no citoplasma. Para que esse processo ocorra, as moléculas em estudo devem penetrar na célula, onde são convertidas por esterases em DCFH, a forma reduzida de 2'-7'-diclorofluoresceína. Essa forma reduzida é então oxidada por EROs em DCF, um composto com alta fluorescência. Assim, quanto maior a fluorescência emitida por DCF,

maior o acúmulo de EROs intracelulares. Observou-se, nos histogramas, que a população tratada com a molécula 2a apresentou deslocamento para a direita, indicando aumento na produção de EROs ou desequilíbrio redox intracelular. Entretanto, apesar das variações no deslocamento, não houve diferença estatisticamente significativa entre as duas concentrações analisadas, sugerindo possível saturação do efeito pró-oxidante. Em contraste, as moléculas 2f e 2i promoveram aumento significativo da produção de EROs citoplasmática nas concentrações de 50 μM e 100 μM , evidenciando efeito pró-oxidante mais pronunciado.

Os resultados obtidos por citometria com avaliação da despolarização do potencial de membrana mitocondrial reforçam esse cenário. Os dados indicam que protonóforos utilizam o gradiente de pH mitocondrial para mover prótons do espaço intermembranar para a matriz mitocondrial (KENWOOD et al., 2015). Esse fluxo eletroquímico através de membrana interna compromete a atividade da enzima ATP sintase, reduzindo a síntese de ATP e, conseqüentemente, o metabolismo energético. Para compensar essa perda, as mitocôndrias aumentam sua taxa metabólica, o que pode comprometer o equilíbrio energético do parasito e contribuir para a morte celular (MURRAY et al., 2023).

Esses efeitos podem estar relacionados às características estruturais das moléculas avaliadas, que possivelmente interagem diretamente com a membrana mitocondrial. Dessa forma, a modulação do fluxo de prótons pode influenciar diretamente a produção de EROs (KHAILOVA et al., 2019). A produção exacerbada de EROs pode desencadear peroxidação lipídica das membranas celulares, induzindo processos de apoptose ou apoptose tardia (SU et al., 2019), como demonstrado nos ensaios de citometria de fluxo. Estudos anteriores envolvendo *T. cruzi* também associaram níveis elevados de EROs relacionados a danos oxidativos e à sinalização de morte celular, sugerindo uma relação direta à morte do parasito. O estudo de Pedrosa et al., (2001) demonstraram que o bzn provoca danos teciduais ao parasito; no entanto, esse fármaco não promoveu o aumento de EROs na presença de *T. cruzi*.

Há evidências na literatura de que o bzn atua sobre o *T. cruzi* por meio da redução de seu grupo nitro, mediada por enzimas nitroreduases do tipo I (WILKINSON et al., 2008). Esse processo gera adutos de glioxal tóxicos para o DNA, sugerindo que o efeito antiparasitário do bzn não está diretamente associado à geração de EROs (HALL & WILKINSON, 2012). Por outro lado, algumas pesquisas apontam que baixas

concentrações de EROs podem favorecer a sobrevivência e o crescimento intracelular de parasitos. Nesse contexto, o ambiente oxidativo, por si só, pode estimular diretamente o crescimento de *T. cruzi*, embora o excesso de estresse oxidativo leve à formação de lesões no DNA, que podem levar à instabilidade genômica e, conseqüentemente, morte celular (AGUIAR et al., 2013; FREIRE et al., 2017; PAIVA; MEDEI & BOZZA, 2018).

Ainda por meio da citometria de fluxo, utilizou-se o corante lipofílico Rodamina 123 (ou Rho123), que possui a capacidade de se acumular seletivamente na matriz mitocondrial de acordo com o potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Assim, quanto maior o acúmulo de Rho123, maior o sinal de fluorescência, refletindo um maior número de mitocôndrias de membrana preservado (BARACCA et al., 2003). De forma inversa, a redução desse acúmulo resulta em diminuição da intensidade de fluorescência, sendo um indicativo de despolarização mitocondrial.

Os resultados neste estudo demonstraram que a molécula 2a promoveu uma redução considerável na intensidade média de fluorescência em comparação ao grupo controle. Esse efeito foi evidenciado pelo deslocamento do pico de fluorescência para a esquerda, sugerindo perda de $\Delta\Psi_m$. A diminuição de $\Delta\Psi_m$ observada pode estar associada à permeabilização da membrana mitocondrial interna, resultando em um processo de morte celular com características semelhantes à apoptose. Esse achado corrobora com a hipótese de que derivados de oxidazol possuem essa capacidade de modular funções mitocondriais (SHI et al., 2021).

De forma semelhante, as moléculas 2f e 2i também foram avaliadas por citometria de fluxo utilizando Rho123. Observou-se que em ambas as concentrações testadas, houve um deslocamento da distribuição de fluorescência para a esquerda em relação ao grupo controle, sugerindo despolarização mitocondrial. Este comportamento indica redução do $\Delta\Psi_m$, o qual é amplamente descrito na literatura, como por exemplo, em modelos experimentais com os derivados de oxadiazol em modelos tumorais, que demonstraram efeitos semelhantes, evidenciando a capacidade dessas moléculas em modular a função mitocondrial e promover apoptose nessas células (SALEM et al., 2025).

No contexto de *T. cruzi*, observou-se que a produção de EROs é um processo regulado por sistemas antioxidantes, incluindo tanto componentes enzimáticos quanto não enzimáticos, como a tripanotona redutase e a glutatona. Esse equilíbrio redox

depende não apenas do estado funcional da mitocôndria, mas também do transporte de moléculas através da membrana celular (PAIVA et al., 2012). Além disso, avaliou-se a capacidade antioxidante das moléculas por meio dos ensaios de DPPH e ABTS, utilizando os antioxidantes BHT e Trolox como controle. Embora esses testes forneçam informações relevantes sobre o potencial antioxidante químico das moléculas, é importante destacar que tais resultados não necessariamente refletem seu comportamento em sistemas biológicos complexos.

Um estudo que desenvolveu uma série de novos compostos de tiadiazol substituídos biologicamente ativos e compostos de oxadiazol, demonstrou que esses derivados apresentam elevada atividade antioxidante. No referido trabalho, os compostos apresentaram maior capacidade de sequestro de radicais livres em relação ao padrão de referência, utilizando o método DPPH, além de apresentarem interação com proteínas-alvo como a CYP51 (KHADRI et al., 2020). De forma semelhante, outro estudo com novos derivados de 1,3,4 oxadiazol também demonstrou atividade antioxidante relevante, com um valor de IC_{50} de 2,2 $\mu\text{g/mL}$. Sob uma perspectiva biológica, essa atividade observada é especialmente relevante, uma vez que o *T. cruzi* depende de um sistema redox – baseado principalmente na tripanotona redutase e enzimas associadas – para suportar o estresse oxidativo gerado pelo hospedeiro (NAZARBAHJAT et al., 2016).

Neste estudo, a molécula 2a apresentou o melhor desempenho no ensaio de DPPH, sendo sugerida como uma doadora de hidrogênio, provavelmente devido à conjugação aromática e à presença de grupos NH em sua estrutura. No entanto, sua atividade foi limitada no teste de ABTS, possivelmente devido à menor solubilidade ou à menor eficiência na doação de elétrons em meio aquoso (BECKER et al., 2019). Por outro lado, a molécula 2f exibiu um perfil antioxidante mais estável, demonstrando maior eficácia no ensaio ABTS, provavelmente devido à presença do grupo trifluorometil, que aumenta sua polaridade. De forma semelhante, a molécula 2i também apresentou melhor desempenho no sistema ABTS, indicando que os substituintes estruturais desses compostos influenciam diretamente sua capacidade antioxidante, a depender do tipo de radical envolvido e das propriedades físico-químicas da molécula (KHALAF et al., 2025).

Essas observações corroboram com a literatura, que aponta que a atividade antioxidante de compostos heterocíclicos pode variar conforme a natureza do radical .

envolvido e as propriedades físico-químicas das moléculas (MIHAILOVIĆ et al., 2017). Além disso, os compostos avaliados demonstraram elevada capacidade de sequestro do radical ABTS e de redução do íon férrico. Embora as moléculas analisadas neste estudo tenham exibido atividade antioxidante em sistemas químicos, também foram capazes de interagir com as células de *T. cruzi*, promovendo aumento da produção intracelular de EROs, desequilíbrio redox e despolarização mitocondrial. Esses resultados sugerem que, no ambiente celular, tais moléculas podem interferir no equilíbrio redox do parasito, possivelmente afetando processos associados à cadeia respiratória.

Portanto, essa dualidade de resultados evidencia a diferença entre o comportamento químico de uma molécula em ensaios *in vitro* e seus efeitos biológicos, que dependem de fatores como transporte celular, bioacumulação e interação com sistemas redox intracelulares. Esses achados reforçam o papel do estresse oxidativo mitocondrial como um dos mecanismos importantes envolvidos na atividade antiparasitária observada. Além disso, a avaliação da inibição de acetilcolinesterase demonstrou que a molécula 2a apresentou desempenho superior em comparação aos controles, incluindo o bzn e as demais moléculas analisadas. Embora o *T. cruzi* não possua um sistema colinérgico funcional semelhante ao de mamíferos, o parasito apresenta colina e acetilcolina associadas à membrana (BARNADAS-CARCELLER et al., 2023). Assim, a inibição da formação de colina pôde ser investigada utilizando inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE).

No que diz respeito à ultraestrutura de *T. cruzi*, estudos indicam que o parasito necessita de esteróis específicos em todos os estágios do seu ciclo celular, os quais são fundamentais para sua viabilidade e proliferação. A via de biossíntese desses esteróis é, portanto, essencial para o parasito, uma vez que este não consegue sobreviver apenas a partir do colesterol do hospedeiro (CHEN et al., 2010). Nesse contexto, *T. cruzi* é particularmente sensível a inibidores da enzima 14 α -desmetilase (CYP51), responsável pela conversão de lanosterol em ergosterol. A inibição dessa via resulta em alterações estruturais de várias organelas, desencadeando efeitos citotóxicos. Com base nisso, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi empregada para avaliar os efeitos das moléculas em estudo (2a, 2f e 2i) nas concentrações de 25 e 50 μ M.

O MEV tem sido amplamente utilizado desde sua primeira aplicação em 1954 por Meyer & Porter, para analisar a morfologia de *T. cruzi* em suas formas de vida livre, pois

permite observar alterações estruturais decorrentes da exposição a compostos bioativos. As formas epimastigotas são comumente utilizadas nesse tipo de análise, pois podem ser cultivadas *in vitro*, gerando um número suficiente de células para avaliação morfológica (SOUZA et al., 2009). Além disso, as formas epimastigotas apresentam morfologia bem definida e maior resistência aos processamentos fixação e preparação para o MEV, ao contrário das formas tripomastigotas, que possuem estrutura mais delicada e são mais suscetíveis a danos durante as etapas de processamento (DE SOUZA; ALCANTARA & CUNHA E SILVA, 2020).

Peron & Colaboradores (2017), ao analisarem epimastigotas tratados com diferentes compostos e com bzn, relataram alterações na membrana, redução do volume celular, arredondamento do parasito e ausência do flagelo. De forma semelhante, no presente estudo, o tratamento com o fármaco de referência levou a alterações morfológicas progressivas, incluindo irregularidades no corpo e na região flagelar, rugosidade da superfície e formação de espículas na membrana, indicando danos estruturais severos e morte celular.

Quando as células foram tratadas com a molécula 2a, observou-se um efeito ainda mais pronunciado, resultando na completa perda da integridade morfológica na concentração de 50 μM . Esse efeito pode estar relacionado à indução de estresse oxidativo ou disfunção metabólica, que levam à morte celular. Curiosamente, Mihailovic & Colaboradores (2017), já haviam sugerido que derivados de oxadiazol podem interagir com membranas e proteínas. De maneira semelhante, o tratamento com a molécula 2f resultou em alterações significativas, com o surgimento de poros ou canais de membrana dos epimastigotas, possivelmente decorrentes da interação com componentes lipídicos ou proteicos do parasito. Na concentração de 25 μM , as células apresentaram morfologia expandida, enquanto na concentração de 50 μM observou-se um colapso quase completo da estrutura celular. Achados semelhantes foram relatados por Santos et al., (2012) que observaram formação de poros em *T. cruzi* após o tratamento com os análogos de oxadiazol e tiazolidinonas, associando esse efeito à interação com ergosterol.

Por fim, a molécula 2i demonstrou efeito citotóxico mais intenso entre os compostos avaliados. As células apresentaram sinais evidentes de ruptura e destruição quase completa da estrutura celular, sugerindo mecanismos letais. Menna-Barreto et al., (2009) relataram que alterações na membrana associadas à disfunção mitocondrial e à

peroxidação lipídica induzida por análogos de oxadiazol resultam em desorganização mitocondrial, aumento da produção de EROs e danos oxidativos. Assim, esses achados sugerem que os derivados de oxadiazol neste estudo tenham interferido na via de biossíntese de esteróis, afetando a composição lipídica do parasito. Essa hipótese é reforçada pelas alterações observadas, como rugosidade da superfície celular, formação de poros e arredondamento celular.

Após a realização de todos os ensaios *in vitro* e a análise dos resultados obtidos, constatou-se que a molécula 2f apresentou um perfil intermediário de atividade tripanocida, embora com baixo índice de seletividade. Por sua vez, a molécula 2i demonstrou maior potência terapêutica; entretanto, exibiu também maior toxicidade em comparação com a molécula 2a. Nesse contexto, a molécula 2a destacou-se como uma candidata promissora para dar continuidade dos estudos, especialmente em análises *in silico* e ensaios *in vivo* utilizando o modelo de toxicidade com Zebrafish por reunir melhor eficácia e seletividade *in vitro*.

As análises *in silico* correspondem ao uso de métodos computacionais e modelos matemáticos que permitem simular fenômenos biológicos e químicos, constituindo ferramentas estratégicas para a investigação do comportamento de moléculas bioativas (ALDOSSARY et al., 2024). Embora relevantes, tais abordagens não substituem os estudos experimentais *in vitro* e *in vivo*, devendo ser compreendidas como ferramentas complementares e integradas ao processo do desenvolvimento farmacêutico (MARQUES et al., 2024).

Nesse contexto, foi fundamental avaliar o desempenho da molécula selecionada (2a) frente ao alvo cruzaina por meio de ensaios *in silico*. A cruzaina é uma cisteína protease pertencente à família das peptidases, com propriedades únicas em seu sítio ativo, sendo expressas ao longo de todo o ciclo de vida dos tripanossomatídeos (DUSCHAK & COUTO, 2009). Além de sua importância nas três formas de vida do parasito, essa enzima desempenha funções essenciais em processos celulares, como nutrição, reprodução, invasão de células hospedeiras e evasão do sistema imunológico, configurando-se como alvo chave para o desenvolvimento de fármacos inibidores (FERREIRA & ANDRICOPULO, 2017).

Nos ensaios de validação do protocolo, realizados por meio de redocking com o alvo cruzaina utilizando o software Gnina, a molécula 2a apresentou afinidade de ligação

comparável ao ligante cristalográfico B95. Observou-se, inclusive, uma energia ligeiramente mais favorável que o ligante, no entanto, foi observada pequena diferença frente às funções de pontuação (TROTT & OLSON, 2010). A cruzaina possui sete subsítios responsáveis de ligações de aminoácidos – S1, S2, S3, S4, S1', S2' e S3' (BELTRAN-HORTELANO et al., 2022). No presente estudo, entretanto, os subsítios S1 e S2 mostraram-se mais relevantes, possivelmente devido sua menor exposição ao solvente, o que contribui para maior especificidade de interação.

No ensaio de interações não covalentes entre proteínas e ligantes em estrutura 3D, realizado por meio do serviço web PLIP (*Protein-Ligand Interaction Profiler*), a molécula em estudo estabeleceu interações hidrofóbicas no subdomínio S2, envolvendo os resíduos Leu67 e Leu160. De acordo com Salas-Sarduy & Colaboradores (2017), esse tipo de interação é crítico para acomodação de porções hidrofóbicas do ligante, influenciando a potência parasitária. No entanto, a predição realizada pelo servidor Boltz-2 indicou baixa probabilidade de ligação para a molécula 2a. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que tais ferramentas utilizam apenas sequência de proteínas e a representação SMILES do ligante como entrada, desconsiderando elementos estruturais cruciais, como a presença de cofatores e moléculas de água estruturais (PASSARO et al., 2025). Essa limitação compromete o algoritmo de identificar a pose cristalográfica adequada, impactando, potencialmente, as previsões de afinidade de ligação.

Após as análises *in silico*, foram realizados ensaios *in vivo* com o objetivo de determinar o perfil de toxicidade aguda da molécula. Esse tipo de abordagem surgiu na ciência como um modelo valioso em estudos de toxicidade e descoberta de fármacos, sobretudo devido a vantagens como alta fecundidade, facilidade de manipulação genética e menor custo operacional (PARTHASARATHY et al., 2025). Além disso, esse modelo apresenta boa previsibilidade toxicológica em comparação com outros sistemas mais complexos, funcionando como um elo entre os ensaios iniciais *in vitro* e testes em mamíferos, possibilitando uma triagem mais rápida e precoce de potenciais efeitos adversos (CASSAR et al., 2019).

Os resultados demonstraram que a molécula 2a apresentou toxicidade embrionária dependente da dose, com valores de LC₅₀ variando entre 14 e 15 µM. O valor obtido (14,56 µM) sugere uma toxicidade moderada, evidenciada pela faixa de concentração relativamente estreita entre concentrações sem efeito aparente (inferiores a 6,25 µM) e

níveis associados à letalidade significativa (superiores a 12,5 μM). ensaios comparativos utilizando Zebrafish com benznidazol e a molécula 2a também foram realizados. A molécula 2a apresentou maior toxicidade em embriões de *Danio rerio*. Embora o bzn tenha exibido o perfil dose-dependente esperado, com IC_{50} de 14,7 μM e aumento de mortalidade em concentrações mais elevadas, a molécula 2a induziu mortalidade em concentrações intermediárias, indicando um potencial citotóxico mais pronunciado. Mesmo quando administrada em associação com bzn, a LC_{50} manteve-se semelhante, sugerindo que o núcleo químico da molécula 2a desempenha papel central na toxicidade observada, enquanto o bzn, nessa mesma condição, pode contribuir de forma secundária para a letalidade aguda.

Adicionalmente, os resultados conduzidos por Yang & Colaboradores (2021) indicam que os derivados de 1,2,4-oxadiazol frequentemente apresentam toxicidade embrionária em zebrafish. Cabe destacar que muitos efeitos da interação entre fármacos e sistemas biológicos dependem de processos metabólicos ativos. Contudo, os embriões apresentam capacidade metabólica restrita, além de variações nas vias de biotransformação, o que pode justificar a ausência de interações observadas nesse modelo experimental (ALI; MIL & RICHARDSON, 2011).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos foram capazes de identificar que os derivados analisados apresentaram atividade antiparasitária contra as três formas evolutivas de *T. cruzi*, embora com perfis de citotoxicidade e seletividade distintos. Além disso, o mecanismo de ação estava relacionado, em grande parte, à disfunção mitocondrial, ao desequilíbrio redox e processos apoptóticos. A molécula 2a se destacou por sua melhor atividade antiparasitária *in vitro*, justificando a avaliação em modelo *in silico* e *in vivo*. As predições demonstraram por redocking que a molécula selecionada possuía encaixe plausível no sítio ativo da cruzaina e interações hidrofóbicas importantes, embora apresente limitações à sua função de pontuação. A estabilidade causada pelo complexo cruzaina-2a também foi importante, uma vez que a molécula em estudo permaneceu em sua única conformação ao longo de toda a simulação. Nos testes *in vivo*, a molécula 2a apresentou toxicidade embrionária aguda dose-dependente. Esses resultados fornecem informações importantes sobre janela terapêutica e necessidade de estratégias de otimização e sistemas de liberação controlada. Novos ensaios *in vivo* em modelos murinos de infecção precisam ser realizados, bem como a necessidade de alvos moleculares mais específicos. Por isso, são necessários mais estudos para entender como a covariância da toxicidade em zebrafish é afetada por elementos como absorção, metabolismo e mecanismos de toxicidade. O próximo passo pode ser diminuir a exposição do organismo-modelo à molécula e aumentar sua entrega ao local de ação sítio-dirigido por meio de estratégias de liberação controlada, como as nanopartículas estruturadas, a fim de se otimizar a biodisponibilidade do composto estudado.

REFERÊNCIAS

- AAGAARD-HANSEN, J. et al. Equity, social determinants and public health programmes. **Equity, social determinants and public health programmes**, p. 77ff, 2010.
- ACEVEDO, Gonzalo R.; GIRARD, Magalí C.; GÓMEZ, Karina A. The unsolved jigsaw puzzle of the immune response in Chagas disease. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1929, 2018.
- ABRAS, Alba et al. Serological diagnosis of chronic Chagas disease: is it time for a change?. **Journal of clinical microbiology**, v. 54, n. 6, p. 1566-1572, 2016.
- ABRAHAM, Mark James et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1, p. 19-25, 2015.
- AUGUSTO, Ingrid et al. Quantitative assessment of the nanoanatomy of the contractile vacuole complex in *Trypanosoma cruzi*. **Life Science Alliance**, v. 7, n. 10, 2024.
- AHSAN, Mohamed J. et al. Synthesis, cytotoxic evaluation, and molecular docking studies of new oxadiazole analogues. **Letters in Organic Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 49-56, 2018.
- AGUIAR, Pedro HN et al. Oxidative stress and DNA lesions: the role of 8-oxoguanine lesions in *Trypanosoma cruzi* cell viability. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 6, p. e2279, 2013.
- ALI, Shaukat; MIL, Harald GJ van; RICHARDSON, Michael K. Large-scale assessment of the zebrafish embryo as a possible predictive model in toxicity testing. **PloS one**, v. 6, n. 6, p. e21076, 2011.
- ALARCÓN, Andrés et al. Diagnosis and treatment of congenital Chagas disease in a premature infant. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 5, n. 4, p. e28-e31, 2016.
- ALPERN, Jonathan D.; LOPEZ-VELEZ, Rogelio; STAUFFER, William M. Access to benznidazole for Chagas disease in the United States—Cautious optimism?. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 9, p. e0005794, 2017.
- ALDOSSARY, Abdulrahman et al. In silico chemical experiments in the age of AI: From quantum chemistry to machine learning and back. **Advanced Materials**, v. 36, n. 30, p. 2402369, 2024.
- ALVES, Aline Araujo; BASTIN, Philippe. The hows and whys of amastigote flagellum motility in *Trypanosoma cruzi*. **MBio**, v. 14, n. 4, p. e00531-23, 2023.
- ANHÊ, Ana Carolina Borella. Estudo morfológico e ultraestrutural da glândula salivar de *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans* (Hemiptera, Triatominae). 2011.

ANGHEBEN, Andrea et al. Rapid immunochromatographic tests for the diagnosis of chronic Chagas disease in at-risk populations: a systematic review and meta-analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 5, p. e0007271, 2019.

ARIAS, María-Helena; PÉREZ, Jhindy-Tatiana; GARAVITO, Giovanni. Experimental conditions for assessing antiTrypanosoma cruzi (epimastigotes) activity in vitro: A scoping review. **Revista Salud UIS**, v. 57, n. 1, 2025.

ARRÚA, Eva C. et al. Nanocarriers for effective delivery of benznidazole and nifurtimox in the treatment of Chagas disease: a review. **Acta tropica**, v. 198, p. 105080, 2019.

ATALE, N. et al. Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. **Journal of microscopy**, v. 255, n. 1, p. 7-19, 2014.

AVALOS-BORGES, Eduardo E. et al. Animal models of Trypanosoma cruzi congenital transmission. **Pathogens**, v. 11, n. 10, p. 1172, 2022.

BAJAJ, Shalini et al. 1, 3, 4-Oxadiazoles: An emerging scaffold to target growth factors, enzymes and kinases as anticancer agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 97, p. 124-141, 2015.

BANDEIRA, Izabel Cristina Justino et al. Antichagasic effect of crotalicidin, a cathelicidin-like viperacidin, found in Crotalus durissus terrificus rattlesnake's venom gland. **Parasitology**, v. 145, n. 8, p. 1059-1064, 2018.

BARACCA, Alessandra et al. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis. **Biochimica et biophysica acta (BBA)-bioenergetics**, v. 1606, n. 1-3, p. 137-146, 2003.

BARBOSA, Deyzi CS et al. 1, 2, 4-Oxadiazole derivatives: physicochemical properties, Antileishmanial potential, docking and molecular dynamic simulations of Leishmania infantum target proteins. **Molecules**, v. 29, n. 19, p. 4654, 2024.

BARNADAS-CARCELLER, Berta et al. Identification of compounds with activity against Trypanosoma cruzi within a collection of synthetic nucleoside analogs. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 1067461, 2023.

BASTOS, Claudilson JC et al. Clinical outcomes of thirteen patients with acute chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 6, p. e711, 2010.

BEZERRA, Claudia Mendonça et al. Fast recovery of house infestation with Triatoma brasiliensis after residual insecticide spraying in a semiarid region of Northeastern Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 7, p. e0008404, 2020.

BELTRAN-HORTELANO, Iván et al. Examination of multiple Trypanosoma cruzi targets in a new drug discovery approach for Chagas disease. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 58, p. 116577, 2022.

BECKER, Magda M. et al. Determination of the antioxidant capacity of red fruits by miniaturized spectrophotometry assays. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, p. 1108-1114, 2019.

BIERNACKI, Karol et al. Novel 1, 2, 4-oxadiazole derivatives in drug discovery. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 6, p. 111, 2020.

BOSTRÖM, Jonas et al. Oxadiazoles in medicinal chemistry. **Journal of medicinal chemistry**, v. 55, n. 5, p. 1817-1830, 2012.

BORBA-SANTOS, Luana P. Cytotoxicity assay using LLC-MK2 cell line. 2020.

BOCCARDO, Santiago et al. Dynamics of tissue repair regulatory T cells and damage in acute Trypanosoma cruzi infection. **PLoS pathogens**, v. 21, n. 1, p. e1012906, 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico: Territorialização e vulnerabilidade para doença de Chagas crônica. Secretaria de Vigilância em Saúde. ISSN 9352-7864. Coordenação-geral: Arnaldo Correia de Medeiros –SVS/MS; Cássia de Fátima Rangel Fernandes –Deidt/SVS/MS.

BRENER, Zigman. Biology of Trypanosoma cruzi. 1973.

BILLICK, Maxime J.; SILVERBERG, Sarah L. Chagas disease. **CMAJ**, v. 197, n. 42, p. E1455-E1455, 2025.

BRITTO, Constança Carvalho. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 122-135, 2009.

CARLIER, Yves et al. Congenital Chagas disease: an update. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 363-368, 2015.

CARDINAL, Marta Victoria et al. High levels of human infection with Trypanosoma cruzi associated with the domestic density of infected vectors and hosts in a rural area of northeastern Argentina. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 492, 2018.

CARADONNA, Kacey L.; BURLEIGH, Barbara A. Mechanisms of host cell invasion by Trypanosoma cruzi. **Advances in parasitology**, v. 76, p. 33-61, 2011.

CARNEIRO, Luan Muniz; DA SILVA, Rael Douglas Santos; SANTOS, Jânio Sousa. Panorama Epidemiológico da Doença de Chagas no Brasil: Tendências, fatores de risco e impacto em populações vulneráveis: Revisão integrativa da literatura. **Research, Society and Development**, v. 14, n. 12, p. e112141250349-e112141250349, 2025.

CASTILLO-RIQUELME, Marianela. Chagas disease in non-endemic countries. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 4, p. e379-e380, 2017.

CASSAR, Steven et al. Use of zebrafish in drug discovery toxicology. **Chemical research in toxicology**, v. 33, n. 1, p. 95-118, 2019.

CANÇADO, J. Romeu. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 44, p. 29-37, 2002.

CASTRO-SESQUEN, Yagahira E. et al. The immunoglobulin M-shed acute phase antigen (SAPA)-test for the early diagnosis of congenital Chagas disease in the time of the elimination goal of mother-to-child transmission. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 2, p. e477-e484, 2021.

CECCARELLI, Soledad et al. Analysis of Chagas disease vectors occurrence data: the Argentinean triatomine species database. **Biodiversity data journal**, v. 8, 2020.

CECILIO, Alzira B. et al. Molecular characterization of Lys49 and Asp49 phospholipases A2 from snake venom and their antiviral activities against Dengue virus. **Toxins**, v. 5, n. 10, p. 1780-1798, 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Congenital Chagas disease: clinical care*. Disponível em: <https://www.cdc.gov/chagas/hcp/clinical-care/congenital.html>. Acesso em: 9 abr. 2026.

CESTARI, Igor; RAMIREZ, Marcel I. Inefficient complement system clearance of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enables resistant strains to invade eukaryotic cells. **PLoS one**, v. 5, n. 3, p. e9721, 2010.

COUPAR, I. M. et al. Effect of aminophylline, butalamine and imolamine on human isolated smooth muscle. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 21, n. 7, p. 474-475, 1969.

CORIA-PAREDES, Diego Maurizio; WILKINS-RODRÍGUEZ, Arturo A.; GUTIÉRREZ-KOBEH, Laila. Apoptosis: A key process that *Trypanosoma cruzi* modulates as a strategy to perpetuate infection. **Journal of Parasitology Research**, v. 2025, n. 1, p. 2093615, 2025.

CONTRERAS, Victor T. et al. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 16, n. 3, p. 315-327, 1985.

CORDOVA, Ezequiel et al. Reactivation of Chagas disease with central nervous system involvement in HIV-infected patients in Argentina, 1992–2007. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 587-592, 2008.

CURA, Carolina I. et al. Comparative study and analytical verification of PCR methods for the diagnosis of congenital Chagas disease. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 19, n. 5, p. 673-681, 2017.

CHEN, Xiuping et al. 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. **Free radical research**, v. 44, n. 6, p. 587-604, 2010.

CHEN, Chiung-Kuang et al. Structural characterization of CYP51 from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* bound to the antifungal drugs posaconazole and fluconazole. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 4, p. e651, 2010.

CHILDRESS, Elizabeth S. et al. [1, 2, 5] Oxadiazolo [3, 4-b] pyrazine-5, 6-diamine derivatives as mitochondrial uncouplers for the potential treatment of nonalcoholic steatohepatitis. **Journal of medicinal chemistry**, v. 63, n. 5, p. 2511-2526, 2020.

CHIRIBAO, María Laura et al. Early *Trypanosoma cruzi* infection reprograms human epithelial cells. **BioMed Research International**, v. 2014, n. 1, p. 439501, 2014.

CHOUDHURI, Subhadip; GARG, Nisha J. Platelets, macrophages, and thromboinflammation in Chagas disease. **Journal of Inflammation Research**, p. 5689-5706, 2022.

CLARK, Eva H. et al. Chagas disease in immunocompromised patients. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 37, n. 2, p. e00099-23, 2024.

DA COSTA MATOS, Daniele et al. Contexto brasileiro da Doença de Chagas: Perspectivas atuais sobre epidemiologia, vetores e diagnóstico. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 6, n. 5, p. 455-467, 2024.

DE ARAÚJO, Julianna Siciliano et al. Imidazole derivatives as promising agents for the treatment of Chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 4, p. 10.1128/aac.02156-18, 2019.

DE SOUZA, Wanderley. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **International review of cytology**, v. 86, p. 197-283, 1984.

DE SOUZA, Mariana L. et al. Discovery of potent, reversible, and competitive cruzain inhibitors with trypanocidal activity: a structure-based drug design approach. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, n. 2, p. 1028-1041, 2019.

DE SOUZA, Wanderley; ALCANTARA, Carolina L.; CUNHA E SILVA, Narcisa L. Electron microscopy cytochemistry and three-dimensional reconstruction of labeled structures in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 119, n. 11, p. 3887-3891, 2020.

DE SOUSA, Andréa Silvestre et al. Chagas disease. **The Lancet**, v. 403, n. 10422, p. 203-218, 2024.

DE OLIVEIRA, Valentina Nascimento Melo et al. Focused microwave irradiation-assisted synthesis of N-cyclohexyl-1, 2, 4-oxadiazole derivatives with antitumor activity. **Synthetic Communications**, v. 48, n. 19, p. 2522-2532, 2018.

DE MENEZES, Ramon RPPB et al. Antiparasitic effect of (-)- α -bisabolol against *Trypanosoma cruzi* Y strain forms. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 95, n. 3, p. 114860, 2019.

DE SOUZA, Gloria EP; FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents and Actions**, v. 17, n. 1, p. 97-103, 1985.

DE SOUZA, E. M. et al. Differential apoptosis-like cell death in amastigote and trypomastigote forms from *Trypanosoma cruzi*-infected heart cells in vitro. **Cell and Tissue Research**, v. 341, n. 1, p. 173-180, 2010.

DE BARROS MOREIRA BELTRÃO, Henrique et al. Investigation of two outbreaks of suspected oral transmission of acute Chagas disease in the Amazon region, Para State, Brazil, in 2007. **Tropical doctor**, v. 39, n. 4, p. 231-232, 2009.

DE OLIVEIRA, Edinaldo Castro et al. Anti-*Trypanosoma cruzi* Potential of New Pyrazole-Imidazoline Derivatives. **Molecules**, v. 30, n. 15, p. 3082, 2025.

DE CARVALHO, A. T.; RIBEIRO, G. A.; NOGUEIRA, R. F. Citometria de fluxo no estudo das doenças infecto-parasitárias. **Instituto Oswaldo Cruz**, p. 1-111, 2010.

DE APPARECIDA LEVY, Antonio Marcos; BOAINAIN, Elias; KLOETZEL, Judith Kardos. In situ indirect fluorescent antibody: a new specific test to detect ongoing chagasic infections. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 10, n. 2, p. 98-103, 1996.

DIAS, João Carlos Pinto et al. 2nd Brazilian consensus on Chagas disease, 2015. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, p. 03-60, 2016.

DÍAZ, Jorge Javier Alfonso Ruiz et al. Cystatin from *Austrelaps superbis* snake venom as a model for identifying potential inhibitors of *Trypanosoma cruzi* cruzain. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 31, p. e20240055, 2025.

DOS SANTOS, Alessandro Marins et al. Citometria de Fluxo: Fundamentos e Aplicações na Pesquisa Científica, 2024.

DOS SANTOS, A. H.; DA SILVA, I. G.; RASSI, A. A comparative study between natural and artificial xenodiagnosis in chronic Chagas' disease patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 28, n. 4, p. 367-373, 1995.

DOS SANTOS FILHO, José Maurício et al. Optimization of anti-*Trypanosoma cruzi* oxadiazoles leads to identification of compounds with efficacy in infected mice. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 20, n. 21, p. 6423-6433, 2012.

DUMOULIN, Peter C.; BURLEIGH, Barbara A. Stress-induced proliferation and cell cycle plasticity of intracellular *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **MBio**, v. 9, n. 4, p. 10.1128/mbio.00673-18, 2018.

DUSCHAK, Vilma G.; COUTO, Alicia S. Cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi*: a sulfated glycoprotein antigen as relevant candidate for vaccine development and drug target. A review. **Current medicinal chemistry**, v. 16, n. 24, p. 3174-3202, 2009.

D'AVILA-LEVY, Claudia Masini et al. Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 956-965, 2015.

DNDi: R&D Status February 2017: DNDi Chagas disease programme. Published 15 February 2017.

ENNES-VIDAL, Vítor et al. Expression and cellular localisation of *Trypanosoma cruzi* calpains. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, 2020.

ERSCHING, Jonatan et al. A human trypanosome suppresses CD8⁺ T cell priming by dendritic cells through the induction of immune regulatory CD4⁺ Foxp3⁺ T cells. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 6, p. e1005698, 2016.

FERRI, Gabriel; EDREIRA, Martin M. All roads lead to cytosol: *Trypanosoma cruzi* multi-strategic approach to invasion. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, p. 634793, 2021.

FERREIRA, Leonardo G.; ANDRICOPULO, Adriano D. Targeting cysteine proteases in trypanosomatid disease drug discovery. **Pharmacology & therapeutics**, v. 180, p. 49-61, 2017.

FIMBRES-MACIAS, Juan P. et al. Phenology and environmental predictors of *Triatoma sanguisuga* dispersal in east-central Texas, United States. **Acta Tropica**, v. 240, p. 106862, 2023.

FRADE, Amanda Farage et al. Cardiac and digestive forms of Chagas disease: an update on pathogenesis, genetics, and therapeutic targets. **Mediators of Inflammation**, v. 2025, n. 1, p. 8862004, 2025.

FRANCO, Caio Haddad et al. Drug discovery for Chagas disease: impact of different host cell lines on assay performance and hit compound selection. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 4, n. 2, p. 82, 2019.

FRANCO-PAREDES, Carlos et al. A deadly feast: Elucidating the burden of orally acquired acute Chagas disease in Latin America—Public health and travel medicine importance. **Travel medicine and infectious disease**, v. 36, p. 101565, 2020.

FREITAS, A. L. C. et al. Entomological surveillance of Chagas' disease vectors in Farias Brito city, State of Ceará, Brazil. **Cad Saúde Colet**, v. 15, n. 2, p. 231-40, 2007.

FREIRE, Anna Cláudia Guimarães et al. Catalase expression impairs oxidative stress-mediated signalling in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 144, n. 11, p. 1498-1510, 2017.

FREJAT, Firas OA et al. New 1, 2, 4-oxadiazole/pyrrolidine hybrids as topoisomerase IV and DNA gyrase inhibitors with promising antibacterial activity. **Archiv der Pharmazie**, v. 355, n. 7, p. 2100516, 2022.

GASCON, Joaquim; BERN, Caryn; PINAZO, María-Jesús. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 22-27, 2010.

GOBEC, Martina et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of 1, 2, 4-oxadiazole analogs of resveratrol. **Chemico-biological interactions**, v. 240, p. 200-207, 2015.

GONÇALVES, Camila Silva et al. Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation. **Parasites & vectors**, v. 11, p. 1-14, 2018.

GOMES, Daniele Cavalcante et al. From Benznidazole to new drugs: Nanotechnology contribution in Chagas disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 18, p. 13778, 2023.

GOMES, Yara M.; LORENA, Virginia; LUQUETTI, Alejandro O. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies?. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 115-121, 2009.

GOMES, Débora Lohana Lima. Doença de chagas: o papel essencial do diagnóstico laboratorial. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, v. 9, n. 20, p. e092836-e092836, 2026.

GONÇALVES, Thainara da Silva et al. Socio-environmental factors associated with the occurrence of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) in an endemic municipality in northern Minas Gerais, Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v. 71, n. 1, p. 34-47, 2024.

GUEDES-DA-SILVA, Francisca Hildemagna et al. Successful aspects of the coadministration of sterol 14 α -demethylase inhibitor VFX and benznidazole in experimental mouse models of Chagas disease caused by the drug-resistant strain of *Trypanosoma cruzi*. **ACS infectious diseases**, v. 5, n. 3, p. 365-371, 2019.

HALL, Belinda S.; WILKINSON, Shane R. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 115-123, 2012.

HALL, Belinda S.; BOT, Christopher; WILKINSON, Shane R. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 15, p. 13088-13095, 2011.

HAGAR, Fatma Fouad et al. Chalcone/1, 3, 4-Oxadiazole/Benzimidazole hybrids as novel anti-proliferative agents inducing apoptosis and inhibiting EGFR & BRAFV600E. **BMC chemistry**, v. 17, n. 1, p. 116, 2023.

HAMDY, Rania et al. Synthesis and evaluation of 5-(1H-indol-3-yl)-N-aryl-1, 3, 4-oxadiazol-2-amines as Bcl-2 inhibitory anticancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 4, p. 1037-1040, 2017.

HIGINO, Taciana Mirely Maciel; DE ARAÚJO SOARES, Ana Karine. Chagas Disease mortality in Northeastern Brazil: Trends and spatial analysis (2012–2023). **Research, Society and Development**, v. 14, n. 6, p. e8814649107-e8814649107, 2025.

HORNAK, Viktor et al. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 65, n. 3, p. 712-725, 2006.

HOWARD, Elizabeth J. et al. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 121, n. 1, p. 22-33, 2014.

HUGGINS, David J.; SHERMAN, Woody; TIDOR, Bruce. Rational approaches to improving selectivity in drug design. **Journal of medicinal chemistry**, v. 55, n. 4, p. 1424-1444, 2012.

IWATA, J. et al. Oxadiazole Compound and Fungicide for Agricultural and Horticultural Use. **WO Patent WO2019022061A1**, v. 31, 2019.

JACKSON, Yves et al. Congenital transmission of Chagas disease in Latin American immigrants in Switzerland. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 4, p. 601, 2009.

JAYAWARDHANA, Shiromani et al. Benznidazole treatment leads to DNA damage in *Trypanosoma cruzi* and the persistence of rare widely dispersed non-replicative amastigotes in mice. **PLoS Pathogens**, v. 19, n. 11, p. e1011627, 2023.

JURBERG, José et al. Atlas Iconográfico dos triatomíneos do Brasil: vetores da doença de Chagas [em linha]. 2014.

KAISER, Marcel et al. Antiprotozoal activity profiling of approved drugs: a starting point toward drug repositioning. **PloS one**, v. 10, n. 8, p. e0135556, 2015.

KAVITHA, Selvaraj; KANNAN, Kulanthai; GNANAVEL, Sadhasivam. Synthesis, characterization and biological evaluation of novel 2, 5 substituted-1, 3, 4 oxadiazole derivatives. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, n. 3, p. 337-345, 2017.

KENWOOD, Brandon M. et al. Structure–activity relationships of furazano [3, 4-b] pyrazines as mitochondrial uncouplers. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 25, n. 21, p. 4858-4861, 2015

KIM, Jinwoo et al. 3-Aryl-1, 2, 4-oxadiazole derivatives active against human rhinovirus. **ACS medicinal chemistry letters**, v. 9, n. 7, p. 667-672, 2018.

KOLLIEN, Astrid; SCHAUB, Günter. The development of Trypanosoma cruzi in triatominae. **Parasitology today**, v. 16, n. 9, p. 381-387, 2000.

KOFOID, Charles Atwood; MCCULLOCH, Irene. On Trypanosoma triatomae, a new flagellate from a hemipteran bug from the nests of the wood rat Neotoma fuscipes. 1916.

KHALAF, Norhan A. et al. Exploring 1, 3, 4-oxadiazolyl sulfide derivatives as antidiabetic candidates: synthesis, antioxidant activity, SAR-study, molecular docking, and DFT-insights. **BMC chemistry**, v. 19, n. 1, p. 316, 2025.

KHADRI, MJ Nagesh et al. Synthesis, docking and biological evaluation of thiadiazole and oxadiazole derivatives as antimicrobial and antioxidant agents. **Results in Chemistry**, v. 2, p. 100045, 2020.

KHAILOVA, Ljudmila S. et al. Interaction of potent mitochondrial uncouplers with thiol-containing antioxidants. **Antioxidants**, v. 8, n. 6, p. 194, 2019.

LACHHAB, Saida et al. Synthesis, characterization, molecular docking, and anticancer activities of new 1, 3, 4-oxadiazole-5-fluorocytosine hybrid derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 1272, p. 134135, 2023.

LANNES-VIEIRA, Joseli et al. Anxiety, depression, and memory loss in Chagas disease: a puzzle far beyond neuroinflammation to be unpicked and solved. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 118, p. e220287, 2023.

LEY, Victoria et al. Amastigotes of Trypanosoma cruzi sustain an infective cycle in mammalian cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 168, n. 2, p. 649-659, 1988.

LICA, Jan Jakub et al. Effective drug concentration and selectivity depends on fraction of primitive cells. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 9, p. 4931, 2021.

LIMA, Danya Bandeira et al. Antiparasitic effect of Dinoponera quadriceps giant ant venom. **Toxicon**, v. 120, p. 128-132, 2016.

LIMA, Camila Bento de. **Efeitos dos ligantes de TSPO sobre a migração leucocitária: participação de receptores de glicorticóides**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

LIU, Xing-Hai et al. Design, synthesis, and pesticidal activities of pyrimidin-4-amine derivatives bearing a 5-(trifluoromethyl)-1, 2, 4-oxadiazole moiety. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 25, p. 6968-6980, 2021.

LIU, Qi et al. Structure-based bioisosterism design, synthesis, insecticidal activity and structure–activity relationship (SAR) of anthranilic diamide analogues containing 1, 2, 4-oxadiazole rings. **Pest management science**, v. 73, n. 5, p. 917-924, 2017.

LONGHI, Silvia A. et al. Evaluation of in-house ELISA using *Trypanosoma cruzi* lysate and recombinant antigens for diagnosis of Chagas disease and discrimination of its clinical forms. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 87, n. 2, p. 267, 2012.

LOZANO, Daniel et al. Use of rapid diagnostic tests (RDTs) for conclusive diagnosis of chronic Chagas disease–field implementation in the Bolivian Chaco region. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 12, p. e0007877, 2019.

MACLEAN, Lorna M. et al. Development of *Trypanosoma cruzi* in vitro assays to identify compounds suitable for progression in Chagas' disease drug discovery. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 7, p. e0006612, 2018.

MANNE-GOEHLER, Jennifer et al. Estimating the burden of Chagas disease in the United States. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 11, p. e0005033, 2016.

MARTINS-MELO, Francisco Rogerlândio et al. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000–2011. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 2, p. 103, 2015.

MARCHIOL, Andrea et al. Laboratory evaluation of eleven rapid diagnostic tests for serological diagnosis of Chagas disease in Colombia. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 8, p. e0011547, 2023.

MARIN-NETO, José Antonio et al. Indeterminate form of Chagas' disease. Proposal of new diagnostic criteria and perspectives for early treatment of cardiomyopathy. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 79, n. 6, p. 623-627, 2002.

MARQUES, Lara et al. Advancing precision medicine: a review of innovative in silico approaches for drug development, clinical pharmacology and personalized healthcare. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 3, p. 332, 2024.

MAEDA, Fernando Yukio et al. Mammalian cell invasion by closely related *Trypanosoma* species *T. dionisii* and *T. cruzi*. **Acta tropica**, v. 121, n. 2, p. 141-147, 2012.

MELLO, Marcelle Bral de. Padronização do Kit de ELISA Recombinante para o diagnóstico da doença de Chagas visando sua utilização nos Serviços de Hemoterapia. 2009.

MENAI, Samanta Díaz et al. Short versus long drug regimens for Chagas disease. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2025, n. 5, p. CD016172, 2025.

MEYER, Hertha; PORTER, Keith R. A study of *Trypanosoma cruzi* with the electron microscope. **Parasitology**, v. 44, n. 1-2, p. 16-23, 1954.

MEJIA, Ana Maria et al. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. **The Journal of infectious diseases**, v. 206, n. 2, p. 220-228, 2012.

MENDES ARAUJO, Heverton et al. Oxadiazole derivatives as anticancer and immunomodulatory agents: a systematic review. **Current medicinal chemistry**, v. 30, n. 30, p. 3472-3485, 2023.

MENNA-BARRETO, Rubem FS et al. The effects on Trypanosoma cruzi of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 5, p. 644-653, 2009.

MIHAILOVIĆ, Nevena et al. Synthesis and antioxidant activity of 1, 3, 4-oxadiazoles and their diacylhydrazine precursors derived from phenolic acids. **RSC advances**, v. 7, n. 14, p. 8550-8560, 2017.

MOHAMMADI-KHANAPOSHTANI, Maryam et al. Design, synthesis, in vivo, and in silico evaluation of new coumarin-1, 2, 4-oxadiazole hybrids as anticonvulsant agents. **Bioorganic chemistry**, v. 89, p. 102989, 2019.

MOHAN, Chakrabhavi Dhananjaya et al. Novel 1, 3, 4-oxadiazole induces anticancer activity by targeting NF- κ B in hepatocellular carcinoma cells. **Frontiers in oncology**, v. 8, p. 42, 2018.

MORROT, Alexandre et al. Evasion and immuno-endocrine regulation in parasite infection: two sides of the same coin in chagas disease?. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 704, 2016.

MOREIRA, Otacilio C. et al. Validation of the NAT Chagas IVD kit for the detection and quantification of Trypanosoma cruzi in blood samples of patients with Chagas disease. **Life**, v. 13, n. 6, p. 1236, 2023.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MONTEIRO, M. E. et al. Synthesis, structure-activity relationship and trypanocidal activity of pyrazole-imidazoline and new pyrazole-tetrahydropyrimidine hybrids as promising chemotherapeutic agents for Chagas disease. **European journal of medicinal chemistry**, v. 182, p. 111610, 2019.

MURRAY, Jacob H. et al. Oxadiazolopyridine derivatives as efficacious mitochondrial uncouplers in the prevention of diet-induced obesity. **Journal of medicinal chemistry**, v. 66, n. 6, p. 3876-3895, 2023

MUÑOZ, José et al. Prevalence and vertical transmission of Trypanosoma cruzi infection among pregnant Latin American women attending 2 maternity clinics in Barcelona, Spain. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 12, p. 1736-1740, 2009.

NAM, Sangwoo et al. Discovery and synthesis of 1, 2, 4-oxadiazole derivatives as novel inhibitors of Zika, dengue, Japanese encephalitis, and classical swine fever virus infections. **Archives of Pharmacal Research**, v. 45, n. 4, p. 280-293, 2022.

NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES (US). **LiverTox: clinical and research information on drug-induced liver injury**. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012.

NASCIMENTO, Bruno Ramos et al. Prevalence of clinical forms of Chagas disease: a systematic review and meta-analysis—data from the RAISE study. **The Lancet Regional Health—Americas**, v. 30, 2024.

NAZARBAHJAT, Nafal et al. Synthesis, characterization, drug-likeness properties and determination of the in vitro antioxidant and cytotoxic activities of new 1, 3, 4-oxadiazole derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 25, n. 9, p. 2015-2029, 2016.

NICOLETE, Roberto. Estudos sobre os efeitos da administração in vivo de microesferas biodegradáveis contendo leucotrieno B₄ ou prostaglandina E₂ em modelo de histoplasmoze murina. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

NOBELI, I. et al. Hydrogen bonding properties of oxygen and nitrogen acceptors in aromatic heterocycles. **Journal of computational chemistry**, v. 18, n. 16, p. 2060-2074, 1997.

NORMAN, Francesca F.; LÓPEZ-VÉLEZ, Rogelio. Chagas disease: comments on the 2018 PAHO Guidelines for diagnosis and management. **Journal of travel medicine**, v. 26, n. 7, p. taz060, 2019.

NOYA, Belkisyolé Alarcón de et al. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 377-386, 2015.

NUNES DA COSTA, Erika Alessandra Pellison; VICTÓRIA, Cassiano; FORTALEZA, Carlos Magno Castelo Branco. Predictors of development of cardiac and digestive disorders among patients with indeterminate chronic Chagas Disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 8, p. e0009680, 2021.

ÖZDEMİR, Ahmet et al. Synthesis and evaluation of new oxadiazole, thiadiazole, and triazole derivatives as potential anticancer agents targeting MMP-9. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1109, 2017.

PAIVA, Claudia N.; MEDEI, Emiliano; BOZZA, Marcelo T. ROS and Trypanosoma cruzi: Fuel to infection, poison to the heart. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 4, p. e1006928, 2018.

PATANI, George A.; LAVOIE, Edmond J. Bioisosterism: a rational approach in drug design. **Chemical reviews**, v. 96, n. 8, p. 3147-3176, 1996.

PARTHASARATHY, Sudharsan et al. Zebrafish in the spotlight: expanding Frontiers in toxicology and drug discovery. **Toxicology Research**, v. 14, n. 4, p. tfaf095, 2025.

PASSARO, Saro et al. Boltz-2: Towards accurate and efficient binding affinity prediction. **BioRxiv**, 2025.

PAIVA, Claudia N. et al. Oxidative stress fuels Trypanosoma cruzi infection in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 7, p. 2531-2542, 2012.

PEDROSA, Rozangela C. et al. Time-dependent oxidative stress caused by benznidazole. **Redox Report**, v. 6, n. 4, p. 265-270, 2001.

PEVEAR, Daniel C. et al. Activity of pleconaril against enteroviruses. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 9, p. 2109-2115, 1999.

PÉREZ-MOLINA, José A.; MOLINA, Israel. Chagas disease cardiomyopathy treatment remains a challenge—Authors' reply. **The Lancet**, v. 391, n. 10136, p. 2209-2210, 2018.

PÉREZ-MOLINA, Jose A. et al. Trypanocidal treatment of Chagas disease. **Enfermedades infecciosas y microbiología clinica**, v. 39, n. 9, p. 458-470, 2021.

PEREZ, Freddy et al. The use of rapid diagnostic tests for chronic Chagas disease: An expert meeting report. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 18, n. 8, p. e0012340, 2024.

PEREIRA, Glaécia AN et al. Discovery and characterization of trypanocidal cysteine protease inhibitors from the 'malaria box'. **European journal of medicinal chemistry**, v. 179, p. 765-778, 2019.

PERON, Francieli et al. Effects of (1E, 4E)-2-Methyl-1, 5-bis (4-nitrophenyl) penta-1, 4-dien-3-one on *Trypanosoma cruzi* and Its Combinational Effect with Benznidazole, Ketoconazole, or Fluconazole. **BioMed research international**, v. 2017, n. 1, p. 7254193, 2017.

PICCIONELLO, Antonio Palumbo et al. Synthesis and preliminary antibacterial evaluation of Linezolid-like 1, 2, 4-oxadiazole derivatives. **European journal of medicinal chemistry**, v. 50, p. 441-448, 2012.

PITASSE-SANTOS, Paulo et al. A novel protocol for the synthesis of 1, 2, 4-oxadiazoles active against trypanosomatids and drug-resistant leukemia cell lines. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 12, p. 403, 2022.

PINTO, Ana Yecê das Neves et al. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira: estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 602-614, 2008.

PINHEIRO, Cristian Vicson Gomes et al. Anti-*Leishmania infantum* in vitro effect of n-cyclohexyl-1, 2, 4-oxadiazole and its ADME/TOX parameters. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 46, n. 2, p. 317-322, 2022.

PULL, Lauren et al. Negativation of *Trypanosoma cruzi* PCR within Six Months after Treatment of a Child with Nifurtimox. 2015.

PRATA, Aluízio. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet infectious diseases**, v. 1, n. 2, p. 92-100, 2001.

QUEIROZ, Norinne Lacerda. Avaliação da resposta inflamatória cerebral em camundongos BALB/ce C47Bl/6 infectados por *Plasmodium berghei* cepa NK65. 2007.

RABELO, Alana Fonteles Lima. Caracterização in vivo e in vitro da resposta inflamatória aguda induzida por uma fração proteica isolada do látex de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. 2014.

RAMOS JR, Alberto N. Doença de Chagas: Informe Epidemiológico São Luís de Montes Belos-GO—2024. **Informe Epidemiológico-Doença de Chagas: Informe Epidemiológico São Luís de Montes Belos-GO—2024**, 2024.

RE, Roberta et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

RINCÓN-ACEVEDO, Claudia Yaneth et al. Clinical and epidemiological characterization of acute Chagas disease in Casanare, Eastern Colombia, 2012–2020. **Frontiers in Medicine**, v. 8, p. 681635, 2021.

ROCHA, Yasmim Mendes et al. Antiparasitary and antiproliferative activities in vitro of a 1, 2, 4-oxadiazole derivative on *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology research**, v. 121, n. 7, p. 2141-2156, 2022.

RODARI, Paola et al. Congenital Chagas disease in a non-endemic area: Results from a control programme in Bergamo province, Northern Italy. **Travel medicine and infectious disease**, v. 25, p. 31-34, 2018.

RHEE, In Kyung et al. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of chromatography A*, v. 915, n. 1-2, p. 217-223, 2001.

SALEM, Mo'men et al. A two-decade overview of oxadiazole derivatives as promising anticancer agents. **RSC advances**, v. 15, n. 39, p. 32778-32795, 2025.

SALDAÑA, Azael et al. Risk factors associated with *Trypanosoma cruzi* exposure in domestic dogs from a rural community in Panama. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 936-944, 2015.

SALAS-SARDUY, Emir et al. Novel scaffolds for inhibition of Cruzipain identified from high-throughput screening of anti-kinetoplastid chemical boxes. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 12073, 2017.

SAMPAIO, George Harisson Felinto et al. Temporal assessment of entomological surveillance of *Trypanosoma cruzi* vectors in an endemic area of northeastern Brazil. **Plos one**, v. 18, n. 6, p. e0287260, 2023.

SAMPAIO, Tiago Lima. Efeito nefroprotetor do (-)- α -bisabolol na lesão renal aguda em modelos de isquemia-reperfusão. 2016.

SANA, Abel; ROSSI, Izadora Volpato; RAMIREZ, Marcel Ivan. Regulação e funções da metaciclo-gênese e epimastigogênese no ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. **Pathogens**, v. 14, n. 11, p. 1149, 2025.

SANTOS, Viviane Corrêa; FERREIRA, Rafaela Salgado. Computational approaches towards the discovery and optimisation of cruzain inhibitors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, p. e210385, 2022.

SANTOS, Viviane Correa et al. Structure-based discovery of novel cruzain inhibitors with distinct trypanocidal activity profiles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 257, p. 115498, 2023.

SARASTE, Antti; PULKKI, Kari. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular research**, v. 45, n. 3, p. 528-537, 2000.

SALES, Edna dos Santos Duarte; ALMEIDA, Samira Vieira Santos; DE OLIVEIRA, Allan Demétrius Leite. PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS NO ESTADO DO CEARÁ E NA REGIÃO DO CARIRI, NO PERÍODO DE 2015 A 2019. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, v. 12, n. 4, p. 5053-5060, 2024.

SALENTIN, Sebastian et al. PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler. **Nucleic acids research**, v. 43, n. W1, p. W443-W447, 2015.

SERAG, Marwa I. et al. New oxadiazole and pyrazoline derivatives as anti-proliferative agents targeting EGFR-TK: design, synthesis, biological evaluation and molecular docking study. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 5474, 2024.

SILVA, Élvio Marques da et al. Estudo clínico-epidemiológico da doença de Chagas no distrito de Serra Azul, Mateus Leme, centro-oeste do Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 178-181, 2010.

SILVA, Tatiana Araújo et al. Pirfenidone prevents heart fibrosis during chronic chagas disease cardiomyopathy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 13, p. 7302, 2024.

SILVA, Rafael Rodrigues et al. Interferon-gamma promotes infection of astrocytes by *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. e0118600, 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL (SBMT). *Novo perfil da doença de Chagas coloca a transmissão oral no centro da resposta em saúde pública*. 2026. Disponível em: <https://sbmt.org.br/novo-perfil-da-doenca-de-chagas-coloca-a-transmissao-oral-no-centro-da-resposta-em-saude-publica/>. Acesso em: 9 abr. 2026.

SOUZA, Wanderley de. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 89-100, 2009.

SOUZA, Eliana Amorim de et al. Hospital case fatality and mortality related to Chagas disease in Brazil over two decades. **BMC Public Health**, v. 24, n. 1, p. 2282, 2024.

SU, Lian-Jiu et al. Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, n. 1, p. 5080843, 2019

SYLKE, M. Comprehensive analysis of parasite biology: from metabolism to drug discovery. Vol. 7. 2016.

SYKES, Melissa L.; KENNEDY, Emily K.; AVERY, Vicky M. Impact of laboratory-adapted intracellular *Trypanosoma cruzi* strains on the activity profiles of compounds with anti-T. cruzi activity. **Microorganisms**, v. 11, n. 2, p. 476, 2023.

SHAIKH, Ambareen; MESHARAM, Jyotsna. Novel 1, 3, 4-Oxadiazole Derivatives of Dihydropyrimidinones: Synthesis, Anti-Inflammatory, Anthelmintic, and Antibacterial Activity Evaluation. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1176-1182, 2016.

SUZUKI, Jun et al. Synthesis and insecticidal activity of 1, 2, 4-oxadiazole and 1, 2, 4-thiadiazole derivatives. **Journal of Pesticide Science**, p. 1107080203-1107080203, 2011.

SHIKANAI YASUDA, Maria Aparecida. Emerging and reemerging forms of *Trypanosoma cruzi* transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, p. e210033, 2022.

SHI, Jinguo et al. Synthesis and biological evaluation of 1, 2, 4-oxadiazole core derivatives as potential neuroprotectants against acute ischemic stroke. **Neurochemistry international**, v. 148, p. 105103, 2021.

STONE, Roy G. et al. Emergence of Congenital Chagas Disease in Ireland. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 41, n. 7, p. 587-589, 2022.

SCHIJMAN, Alejandro Gabriel et al. Parasitological, serological and molecular diagnosis of acute and chronic Chagas disease: from field to laboratory. **Memórias do instituto oswaldo cruz**, v. 117, p. e200444, 2022.

TADIKONDA, Ramu et al. Efficient and Convenient Protocol for the Synthesis of 3, 5-Disubstituted 1, 2, 4-Oxadiazoles Using HClO₄-SiO₂ as a Heterogeneous Recyclable Catalyst. **Synthetic Communications**, v. 44, n. 13, p. 1978-1986, 2014.

TALE, R. H. et al. Synthesis and anti-bacterial, anti-fungal activity of novel 1, 2, 4-oxadiazole. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 2, p. 496-505, 2011.

TANOWITZ, Herbert B. et al. Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). **Progress in cardiovascular diseases**, v. 51, n. 6, p. 524-539, 2009.

TAVARES, Camila A. et al. Parameterization and validation of a new AMBER force field for an oxovanadium (IV) complex with therapeutic potential implications in Alzheimer's disease. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 122, p. 108511, 2023.

TÉLLEZ, Jair et al. Drug transporter and oxidative stress gene expression in human macrophages infected with benznidazole-sensitive and naturally benznidazole-resistant *Trypanosoma cruzi* parasites treated with benznidazole. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 262, 2019.

TOLEZANO, José Eduardo et al. Quantificação do risco mínimo de aquisição de doença de Chagas transfusional, através do xenodiagnóstico em doadores de sangue com sorologia positiva. **Bol. Soc. Bras. Hematol. Hemoter**, p. 271-4, 1992.

TORRES, Rosália Morais et al. Prognosis of chronic Chagas heart disease and other pending clinical challenges. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, p. e210172, 2022.

TREVISAN, Maria Teresa Salles et al. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 26, p. 301-304, 2003.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

UMEZAWA, Eufrosina S. et al. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. **Journal of clinical microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2143-2147, 1996.

VALENTE, Sebastião Aldo da Silva et al. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 3, p. 291-297, 2009.

VANRELL, María Cristina et al. Induction of autophagy by ursolic acid promotes the elimination of trypanosoma cruzi amastigotes from macrophages and cardiac cells. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 919096, 2022.

VÁZQUEZ, Cristina et al. Pregnancy and Chagas Disease: Benznidazole's Impact on Pregnancy and Newborns: A Report of Four Cases. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 102, n. 5, p. 1075, 2020.

VELA, Andrea et al. In vitro susceptibility of Trypanosoma cruzi discrete typing units (DTUs) to benznidazole: A systematic review and meta-analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 3, p. e0009269, 2021.

VERMES, István et al. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. **Journal of immunological methods**, v. 184, n. 1, p. 39-51, 1995.

VILLALTA, Fernando et al. VNI cures acute and chronic experimental Chagas disease. **The Journal of infectious diseases**, v. 208, n. 3, p. 504-511, 2013.

VIOTTI, Rodolfo et al. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 7, n. 2, p. 157-163, 2009.

VOLPEDO, Greta et al. Nanoparticulate drug delivery systems for the treatment of neglected tropical protozoan diseases. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 25, 2019.

WARD, Alexander I. et al. Trypanosoma cruzi amastigotes that persist in the colon during chronic stage murine infections have a reduced replication rate. **Open biology**, v. 10, n. 12, p. 200261, 2020.

WEISBARTH, R. Tyler et al. The Trypanosoma cruzi RNA-binding protein RBP42 is expressed in the cytoplasm throughout the life cycle of the parasite. **Parasitology research**, v. 117, n. 4, p. 1095-1104, 2018.

WITIKA, Bwalya A. et al. Biocompatibility of biomaterials for nanoencapsulation: Current approaches. **Nanomaterials**, v. 10, n. 9, p. 1649, 2020.

WILKINSON, Shane R. et al. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 13, p. 5022-5027, 2008.

WOODY, Norman C.; WOODY, Hannah B. AMERICAN TRYPANOSOMIASIS (CHAGAS'DISEASE): FIRST INDIGENOUS CASE IN THE UNITED STATES. **Journal of the American Medical Association**, v. 159, n. 7, p. 676-677, 1955.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis) [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2025 [cited 2025 May 9]. Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))

WON, Madalyn M. et al. The intracellular amastigote of *Trypanosoma cruzi* maintains an actively beating flagellum. **MBio**, v. 14, n. 2, p. e03556-22, 2023.

ZAINAB, Syeda Rida et al. Safety assessment of novel oxadiazole derivatives in acute and sub-acute toxicity studies. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 398, n. 4, p. 3631-3653, 2025.

ZINGALES, Bianca et al. Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi*: possible correlation with the interiorization process in mammalian cells. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 6, n. 2, p. 111-124, 1982.

ZICKER, Fábio et al. Mass screening for *Trypanosoma cruzi* infections using the immunofluorescence, ELISA and haemagglutination tests on serum samples and on blood eluates from filter-paper. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 68, n. 4, p. 465, 1990.

ZUMA, Aline A.; DOS SANTOS BARRIAS, Emile; DE SOUZA, Wanderley. Basic biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current pharmaceutical design**, v. 27, n. 14, p. 1671-1732, 2021.

YANG, Sen et al. Synthesis and biological activity of benzamides substituted with pyridine-linked 1, 2, 4-oxadiazole. **Molecules**, v. 25, n. 15, p. 3500, 2020.

YANG, Sen et al. 1, 2, 4-Oxadiazole-based bio-isosteres of benzamides: Synthesis, biological activity and toxicity to zebrafish embryo. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 5, p. 2367, 2021.

YU, Lili et al. Synthesis and Antifungal Activity of 1, 2, 4-Oxadiazole Derivatives. **Molecules**, v. 30, n. 8, p. 1851, 2025.