



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Bárbara Verena Dias Galvão

**Avaliação da eficácia e segurança de produtos naturais e sintéticos ativos
sobre o *Trypanosoma cruzi***

Rio de Janeiro

2022

Bárbara Verena Dias Galvão

Avaliação da eficácia e segurança de produtos naturais e sintéticos ativos sobre o
Trypanosoma cruzi

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Israel Felzenszwalb

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Fernando Araujo-Lima

Rio de Janeiro

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

G182 Galvão, Bárbara Verena Dias.
Avaliação da eficácia e segurança de produtos naturais e sintéticos ativos sobre o *Trypanosoma cruzi*. / Bárbara Verena Dias Galvão. - 2022.
118 f.

Orientador: Prof. Dr. Israel Felzenszwalb
Coorientador: Prof. Dr. Carlos Fernando Araujo Lima

Mestrado (Dissertação) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. *Trypanosoma cruzi* – Teses. 2. Chagas, doença de – Teses. 3. Produtos naturais - Teses. 4. Mutagênese - Teses. I. Felzenszwalb, Israel. II. Lima, Carlos Fernando Araujo. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 576.893.161.13

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Bárbara Verena Dias Galvão

Avaliação da eficácia e segurança de produtos naturais e sintéticos ativos sobre o
Trypanosoma cruzi

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 25 de janeiro de 2022.

Orientador: Prof. Dr. Israel Felzenszwalb

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Fernando Araujo-Lima

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Frederico Castelo Branco

Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Francisco do Vale Chaves e Mello

Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2022

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à todas as mulheres professoras e cientistas, que independentemente de cor, origem, religião e orientação sexual, pisaram firme na Escola e na Academia antes de mim, para que hoje eu pudesse ver mais longe, sobre ombros de gigantes.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de demonstrar minha imensa gratidão a todos que de alguma forma me incentivaram e ajudaram durante minha trajetória acadêmica e realização do mestrado. Sem suas contribuições, nada disso seria possível. Por isso, agradeço especialmente:

Ao Prof. Israel Felzenszwalb, por ter me recebido no Laboratório de Mutagênese Ambiental (LABMUT), e aceitado orientar esta dissertação, sempre atencioso e compreensivo em seus ensinamentos, conselhos e sugestões. Ao Prof. Carlos Fernando, por guiado este trabalho, pela dedicação, compreensão, incentivo e paciência, e por me esperar para a seleção de IC de 2017. Vocês são grandes inspirações do que é ser um cientista e professor.

À Alana, Eduardo e Lizandra, pela amizade, colaboração e confiança, nos acertos e falhas que tornam nossa rotina mais leve e divertida. À toda equipe do LABMUT, Profa. Andreia, Prof. Francisco, Carine, Thais, Natália, Lays, Pedro, Matheus e Letícia, pelo ambiente de aprendizado e apoio fundamental para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos professores colaboradores da UNIRIO e FIOCRUZ. À Profa. Claudia Aiub, pelo apoio nas avaliações de mutagenicidade. À Profa. Édira Gonçalves e Profa. Mariana Larraz, pelas análises fitoquímicas. Profa. Nazaré Soeiro, pela parceria nas avaliações da atividade tripanocida. À Profa. Núbia Boechat, Prof. Frederico Castelo Branco e Prof. Cheyene Menozzi, por disponibilizar os compostos para avaliação.

À Profa. Marsen Garcia, pela revisão, e aos avaliadores, pelo interesse, disponibilidade e contribuição essencial a este trabalho. Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Biociências da UERJ, pela dedicação e conhecimento transmitido, e ao Stênio, pela atenção.

À CAPES, CNPq, FAPERJ e UNIRIO, pelo apoio financeiro.

À minha família, minha maior torcida. Ao meu avô, pela sua atenção e seu zelo. Às minhas mães, pelo amor, cuidado, incentivo e conselhos. Minha mãe Laura, pelo apoio incondicional e exemplo de bondade e dedicação à saúde pública. À minha irmã, minha companheira, por me apresentar à Biomedicina. À minha avó, coração de aço, pelas panquecas. E à Dulce, Nilzete, Berg e Nelma, por me ajudar a fazer do Rio a minha casa.

Ao Lorrán, pela amizade, amor e companheirismo diário em todos esses anos, por me incentivar e acreditar em mim, e pelas broncas ao nunca me deixar desistir. Obrigada por nunca soltar a minha mão, estando ao meu lado em todos os momentos.

Aos profissionais de saúde, cientistas e divulgadores científicos que, durante a pandemia, nos mantiveram informados, são, salvos e agora, vacinados.

“[...] Vem, seja luz apesar do agora
O caminho é a vitória
Meu bem, sua cruz é do tamanho da glória
Não desista agora, não

Nunca ficamos parados
Foca sempre em quem 'tava do seu lado
Vão te pedir um pouco de consciência
Só que aqui é lei da sobrevivência

Nossa ciência é acordar bem cedo e ir atrás
Dos sonhos, das dores, dos não e dos tombos
Sem medo caímos e levantamos
O som que bate no peito são dores de um ser humano
Sentimento bom explodindo no peito
Tudo conquistado e tudo do nosso jeito [...]”

Filipe Ret e Marcelo Falcão

RESUMO

GALVÃO, Bárbara Verena Dias. **Avaliação da eficácia e segurança de produtos naturais e sintéticos ativos sobre o *Trypanosoma cruzi***. 2022. 118 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Mais de 110 anos após a descoberta da Doença de Chagas (DC), apenas dois derivados nitro-heterocíclicos, associados a eficácia parcial e efeitos adversos, estão disponíveis para o tratamento de cerca de 7 milhões de infectados, sobretudo na América Latina. Considerando a importância da bioprospecção e do desenvolvimento racional de fármacos na busca por novas alternativas terapêuticas mais seletivas, este trabalho investigou, através de métodos *in silico* e *in vitro*, a eficácia e segurança de produtos naturais e de síntese com potencial aplicação no controle da infecção parasitária por *Trypanosoma cruzi*. Os produtos naturais consistiram em um extrato hidrometanólico das folhas de *Plinia cauliflora* (HME), conhecida como jabuticabeira, e seus constituintes fenólicos mais abundantes, e os sintéticos, foram dois novos derivados 3-nitro-1,2,4-triazólicos, PCBN 009/17 e PCBN 012/17. A caracterização metabolômica do extrato foi realizada por cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada a espectrometria de massas. Análises *in silico* preliminares de propriedades farmacocinéticas e de toxicidade (ADMET) foram conduzidas nas plataformas LAZAR, pkCSM e SwissADME. Posteriormente, a mutagenicidade e genotoxicidade foi investigada pelo Teste de Ames e ensaio do micronúcleo, em paralelo a determinação de citotoxicidade em células hepáticas HepG2 e F C3H pelos ensaios WST-1 e LDH. A atividade tripanocida *in vitro* foi avaliada sobre formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Um total de 14 compostos fenólicos foram identificados em HME, majoritariamente flavonoides. As predições *in silico* para os compostos mais abundantes, (+)- catequina, ácido digálico e hesperidina, indicam um perfil de *druglikeness* moderadamente viável e de baixa toxicidade. Nos ensaios *in vitro*, HME não produziu mutações pontuais no modelo procaríoto, nem aumento da frequência de micronúcleos. Contudo, exibiu efeitos citostáticos, reduzindo índices de divisão nuclear de HepG2. Complementarmente, HME apresentou citotoxicidade tempo e dose-dependente em ambas as linhagens, promovendo morte celular através de danos à membrana celular e mais evidentemente por disfunção mitocondrial, sendo F C3H, a linhagem mais sensível. Em baixas concentrações, HME inibiu tripomastigotas sanguíneos, gerando respostas dose-dependentes após 2 e 24 horas de exposição. Em continuidade, as análises *in silico* dos derivados nitrotriazólicos, indicaram alertas estruturais de toxicidade para ambas as moléculas, que foram preditas como hepatotóxicas e como substratos das enzimas CYP450 relacionadas às interações medicamentosas. Além disso, os derivados foram preditos como mutagênicos, em concordância com resultados *in vitro*, em que induziram mutações por substituição de pares de bases e deslocamento do quadro de leitura. Entretanto, a mutagenicidade e função da ativação metabólica foram influenciadas pelo tipo de substituinte, de forma que o PCBN 012/17 foi mutagênico apenas na maior concentração avaliada. Os derivados induziram principalmente citotoxicidade associada a danos à membrana celular, em concentrações superiores às suas concentrações tripanocidas descritas anteriormente. Em síntese, apesar das evidências pontuais de toxicidade, os produtos naturais e de síntese avaliados no presente estudo, especialmente PCBN 012/17, podem ser empregados no desenvolvimento de alternativas terapêuticas mais acessíveis e seletivas para DC.

Palavras-chave: Nitrotriazóis. *Plinia cauliflora*. Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi*.

Mutagenicidade. Citotoxicidade.

ABSTRACT

GALVÃO, Bárbara Verena Dias. **Efficacy and safety evaluation of natural and synthetic products active on *Trypanosoma cruzi***. 2022. 118 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

More than 110 years after the discovery of Chagas Disease (CD), only two nitro-heterocyclic derivatives, associated with partial efficacy and adverse effects, are available for the treatment of approximately 7 million infected people, mainly in Latin America. Considering the importance of bioprospection and rational drug design in the search for more selective therapeutic alternatives, this work investigated, using *in silico* and *in vitro* methods, the efficacy and safety of natural and synthetic products with potential application in the control of the parasitic infection by *Trypanosoma cruzi*. The natural products consisted of a hydromethanolic extract of the leaves of *Plinia cauliflora* (HME), known as jabuticabeira, and its most abundant phenolic constituents, and the synthetic ones were two new 3-nitro-1,2,4-triazole derivatives, PCBN 009/17 and PCBN 012/17. The metabolomic characterization of the extract was performed by ultra-efficiency liquid chromatography coupled with mass spectrometry. Preliminary *in silico* analyzes of pharmacokinetic and toxicity (ADMET) properties were conducted on the LAZAR, pkCSM and SwissADME platforms. Subsequently, mutagenicity and genotoxicity were investigated by Ames test and micronucleus assay, in parallel with the determination of cytotoxicity in HepG2 and F C3H liver cells by WST-1 and LDH assays. The *in vitro* trypanocidal activity was evaluated on trypomastigote forms of the Y strain of *T. cruzi*. A total of 14 phenolic compounds were identified in HME, mostly flavonoids. *In silico* predictions for the most abundant compounds, (+)-catechin, digallic acid, and hesperidin, indicated a moderately viable druglikeness profile with low toxicity. In *in vitro* assays, HME did not produce point mutations in the prokaryotic model, nor an increase in the frequency of micronuclei. However, it exhibited cytostatic effects, reducing nuclear division rates of HepG2. In addition, HME showed time- and dose-dependent cytotoxicity in both strains, promoting cell death through cell membrane damage and more evidently through mitochondrial dysfunction, with F C3H being the most sensitive line. At low concentrations, HME inhibited blood trypomastigotes, generating dose-dependent responses after 2 and 24 hours of exposure. *In silico* analyzes of the nitrotriazole derivatives indicated structural toxicity alerts for both molecules, which were predicted as hepatotoxic and as substrates of CYP450 enzymes related to drug-drug interactions. Furthermore, the derivatives were predicted to be mutagenic, in agreement with *in vitro* results, in which they induced base-pair substitution and frameshift mutations. However, the mutagenicity and function of metabolic activation were influenced by the type of substituent, since PCBN 012/17 was mutagenic only at the highest concentration evaluated. The derivatives mainly induced cytotoxicity associated with cell membrane damage, at concentrations higher than their previously described trypanocidal concentrations. In summary, despite the occasional evidence of toxicity, the natural and synthetic products evaluated in this study, especially PCBN 012/17, can be used in the development of more accessible and selective therapeutic alternatives for CD.

Keywords: Nitrotriazoles. *Plinia cauliflora*. Chagas Disease. *Trypanosoma cruzi*.

Mutagenicity. Cytotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Distribuição global dos casos de Doença de Chagas, estimados para o ano de 2018.....	12
Figura 2 –	Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i> no hospedeiro invertebrado e vertebrado.....	14
Figura 3 –	Estruturas químicas do Benznidazol e Nifurtimox.....	16
Figura 4 –	Mecanismo de ação proposto para o NFX e o BZN.....	17
Figura 5 –	Estruturas dos substratos de nitroredutase associados à genotoxicidade..	19
Figura 6 –	Esterano, a estrutura base dos esteróis, ao lado do colesterol e do ergosterol.....	20
Figura 7 –	Rota sintética resumida do ergosterol em <i>T. cruzi</i>	21
Figura 8 –	Estrutura dos anéis azol, imidazol e 1H-1,2,4-triazol.....	22
Quadro 1 –	Estruturas e concentrações inibitórias dos principais IBEs sobre <i>T. cruzi</i>	24
Figura 9 –	Estrutura do derivado PCBN 009/17 e seus análogos (A e B).....	25
Figura 10 –	Derivados PCBN 009/17 e PCBN 012/17.....	26
Figura 11 –	Árvore (A), frutos (B) e folhas (C) de <i>Plinia cauliflora</i>	27
Tabela 1 –	Características genéticas das linhagens TA98 E TA100 de <i>S. Typhimurium</i>	32
Figura 12 –	Formação de micronúcleos por agentes clastogênicos e aneugênicos....	33
Figura 13 –	Princípio do ensaio LDH para avaliação de danos na membrana celular..	34
Figura 14 –	Princípio do ensaio WST-1 para avaliação da função mitocondrial.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3T3	Linhagem celular de fibroblastos embrionários de pele de murinos
ADMET	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção, toxicidade
BZN	Benznidazol
CC ₅₀	Concentração citotóxica para 50% das células
DC	Doença de Chagas
DNDI	Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas
DQL	Deslocamento do quadro de leitura
DTN	Doenças tropicais negligenciadas
F C3H	Linhagem celular de fibroblastos de fígado de camundongo
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HepG2	Linhagem celular de hepatocarcinoma humano
IBE	Inibidores da biossíntese do ergosterol
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
INT	Cloreto de 2-[4-iodofenil]-3-[4-nitrofenil]-5-feniltetrazólio
IS	Índice de seletividade
L6	Linhagem celular de mioblastos de rato
L929	Linhagem celular de fibroblastos de murinos
LDH	Enzima lactato desidrogenase
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NFX	Nifurtimox
NRI	Nitroreductase tipo I
NTZ	Núcleo 3-nitro-1,2,4-triazol ou 3-nitro-1,2,4-triazóis
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
WHO	Organização Mundial da Saúde
PAHO	Organização Pan-Americana da Saúde
PN	Produtos naturais
QSAR	Relação quantitativa estrutura-atividade
QP	Quimioterapia preventiva
SAR	Relação estrutura-atividade
SPB	Substituição de pares de bases
WST-1	Sal de tetrazólio solúvel 1

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	11
1	REFERENCIAL TEÓRICO	12
1.1	Doença de Chagas.....	12
1.1.1	<u>Mecanismos de transmissão</u>	13
1.1.2	<u>Ciclo biológico</u>	13
1.1.3	<u>Manifestações clínicas</u>	15
1.2	Tratamento etiológico atualmente disponível para DC	15
1.3	Quimioterapia experimental	18
1.3.1	<u>Substratos de nitroredutases</u>	19
1.3.2	<u>Inibidores da biossíntese do ergosterol</u>	20
1.3.3	<u>Inibidores de CYP51</u>	22
1.3.4	<u>Inibidores 3-nitro-1,2,4-triazólicos</u>	24
1.3.5	<u>Produtos naturais com atividade tripanocida</u>	26
1.4	Aplicação de ferramentas <i>in silico</i> na descoberta de drogas	28
1.5	Estudos <i>in vitro</i> de mutagenicidade, genotoxicidade e citotoxicidade	30
1.5.1	<u>Avaliação de mutagenicidade</u>	30
1.5.1.1	Teste de Ames.....	31
1.5.1.2	Ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese <i>in vitro</i>	33
1.5.2	<u>Avaliação de citotoxicidade</u>	34
2	OBJETIVOS	38
3	RESULTADOS	39
3.1	Artigo publicado – “<i>Plinia cauliflora (Mart.) Kausel (Jaboticaba) leaf extract: in vitro anti-Trypanosoma cruzi activity, toxicity assessment and phenolic-targeted UPLC-MSE metabolomic analysis</i>” – Publicado no periódico “<i>Journal of Ethnopharmacology</i>”	40
3.2	Proposta de artigo “<i>In vitro and in silico study of mutagenicity, cytotoxicity and pharmacokinetic properties of novel 3-nitro-1,2,4-triazole-based derivatives</i>” – a ser submetido	59
4	DISCUSSÃO	87
	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	97
	REFERÊNCIAS	98

INTRODUÇÃO

Doenças tropicais negligenciadas (DTN) são um grupo de doenças transmissíveis que afetam principalmente regiões em desenvolvimento da América Latina, África, Ásia e Oceania (CASULLI, 2021). Ainda que a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010, 2021) estime que a cada ano mais de 1,7 bilhão de pessoas necessitam de intervenções para pelo menos uma DTN, essas enfermidades são escondidas e silenciadas, por se concentrarem em áreas rurais remotas ou periferias, onde os indivíduos infectados ou em risco de infecção têm pouca voz política. Embora seja clara a necessidade de prevenção e tratamento, a pobreza é um fator limitante do acesso às intervenções e serviços necessários para promovê-los, e determina também que as DTN não sejam alvo de grandes investimentos da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novos produtos, visto o potencial restrito de exploração econômica deste público (WHO, 2010, 2017, 2021).

As consequências são onerosas, não apenas pelo elevado custo social incidente sobre uma parcela da força de trabalho, sobretudo aquela dedicada à produção agrícola, mas também pelas despesas geradas aos sistemas públicos de saúde, por períodos de tratamento e/ou internação prolongados (SILVA, 2020). Diante disso, a WHO recomenda cinco intervenções estratégicas principais para enfrentar as DTN: boas condições de água, saneamento e higiene; saúde pública veterinária; controle de vetores; gestão de casos individuais; e quimioterapia preventiva. Estratégias associando tratamento e quimioterapia preventiva obtiveram sucesso em reduzir indicadores de diversas doenças parasitárias (CASULLI, 2021), porém foram menos efetivas em outras, como a Doença de Chagas (DC). Apesar dos esforços progressivos, um desafio para o controle da DC na América do Sul é a disponibilidade de apenas dois fármacos, associados à eficácia limitada e toxicidade (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Dada a importância do combate às DTN como instrumento promotor do desenvolvimento socioeconômico, avanços recentes em diversas frentes têm mudado radicalmente as perspectivas de controle dessas doenças, incluindo ações de grupos como a Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDI), que atuam para disponibilizar melhores tratamentos para muitas destas doenças, estimulando investigações de eficácia e segurança de alternativas terapêuticas mais acessíveis, novas ou reposicionadas, que possam ser administradas individualmente ou em combinação (WHO, 2010; DNDI, 2020).

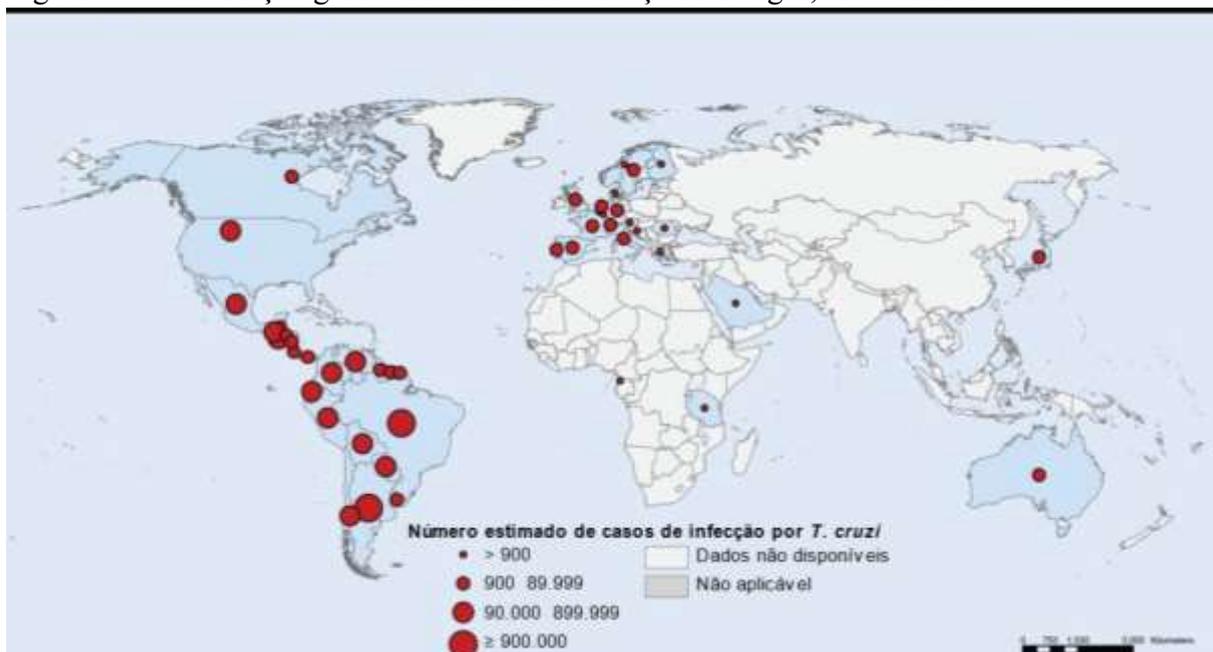
1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Doença de Chagas

Denominada em homenagem a seu descobridor, o cientista brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, a DC é causada pela infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1908; 1909). Considerada a mais brasileira das DTN, sua descoberta representa um marco para a ciência do país e está nas bases da medicina tropical, revelando que “as febres dos sertões” estavam relacionadas ao clima, mas especialmente a condições de pobreza (AZEVEDO, 2018).

Também conhecida como tripanossomíase americana, a DC é endêmica em 21 países da América Latina (Figura 1), onde é a doença parasitária de maior mortalidade (DNDI, 2017), e onde 70 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de infecção. Estimativas da WHO (WHO, 2020) e da Organização Pan-Americana da Saúde (PAHO, 2021) indicam que nas Américas, a doença apresenta uma incidência anual de 30.000 novos casos, 12.000 mortes e 8.000 recém-nascidos infectados (2021).

Figura 1 – Distribuição global dos casos de Doença de Chagas, estimados em 2018



Fonte: Adaptado de OMS, 2020; Avaria et al., 2021.

Além disso, a DC tem se propagado em países não-endêmicos como Canadá, EUA, Europa, Austrália e Japão, devido à migração de indivíduos de áreas endêmicas, se tornando

assim uma crescente preocupação de saúde pública global, que hoje soma mais de 7 milhões de infectados em todo o mundo (BONNEY, 2014; CASTILLO-RIQUELME, 2017). Em conjunto, estes dados demonstram a importância social da DC mais de 110 anos após sua descoberta (LANNES-VIEIRA, 2017).

1.1.1 Mecanismos de transmissão

A DC pode ser transmitida por mecanismos primários e secundários. Os primários incluem vetor, transfusão sanguínea, ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas, transmissão congênita e durante o parto. Os secundários, menos frequentes, incluem acidentes de laboratório, manuseio de animais infectados, ingestão de carne crua de animais infectados, transplantes de órgãos de doadores infectados, transmissão sexual e, excepcionalmente, por infecção induzida ou criminosa (COURA, 2015).

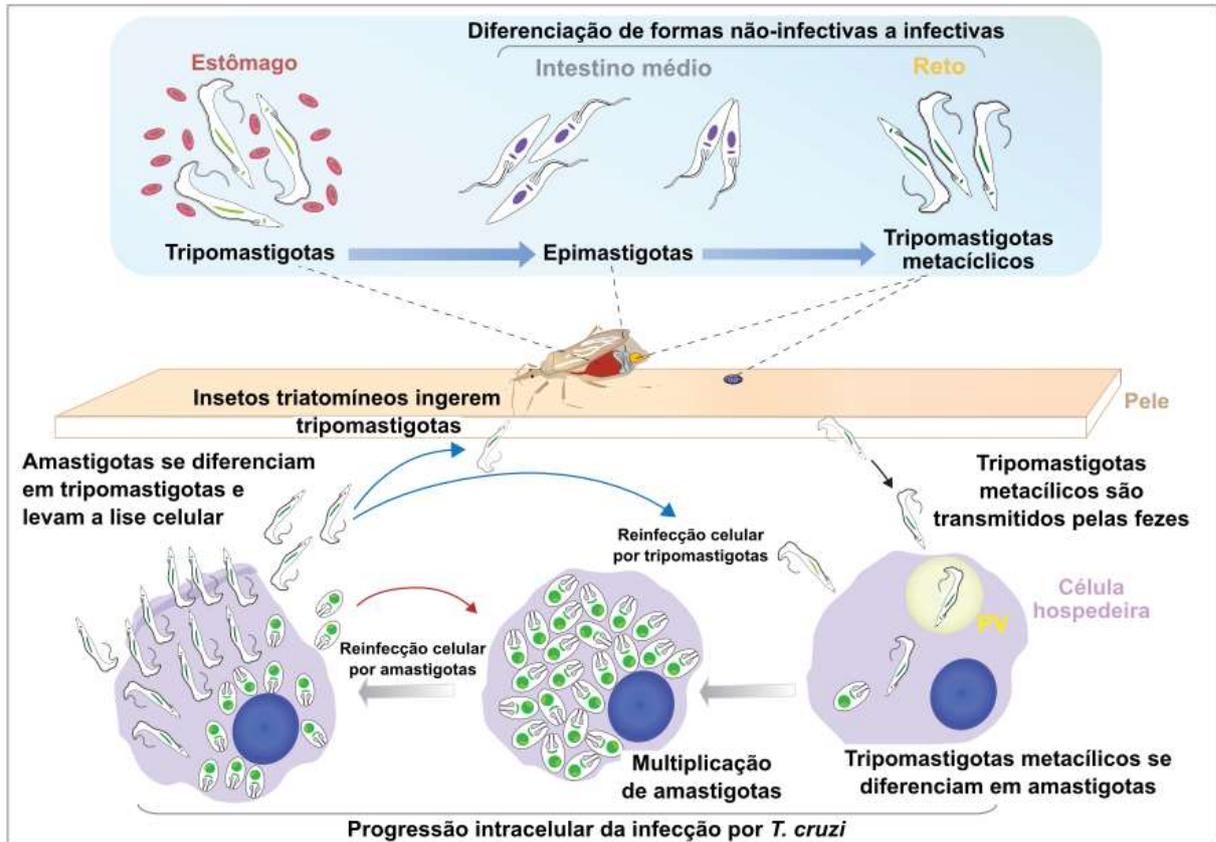
A transmissão de maior importância epidemiológica ocorre através dos vetores, os triatomíneos popularmente conhecidos como “barbeiros”. Os principais gêneros, *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*, estão amplamente distribuídos na América Latina, em áreas florestais e regiões mais secas (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Estes insetos hematófagos se infectam ao ingerirem formas tripomastigotas presentes na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado infectado com o parasito (DA LANA; TAFURI; BARTHOLOMEU, 2016).

1.1.2 Ciclo biológico

Em seu ciclo biológico (Figura 2), *T. cruzi* passa por alterações morfofisiológicas determinantes para sua habilidade de proliferação e infectividade. Após serem ingeridos, os tripomastigotas que sobrevivem a decomposição no estômago do inseto, se transformam em epimastigotas no intestino médio posterior, onde iniciam sua replicação e colonização. Na ampola retal, estes se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, forma infectante aos vertebrados, que é eliminada nas fezes e urina (MELO; GUARNERI; SILBER, 2020). Neste momento, pode ocorrer a transmissão vetorial durante o hematofagismo, quando o acúmulo de

sangue no sistema digestivo, estimula a eliminação de excrementos, que normalmente se depositam na superfície da pele (MORETTI; MORTARA; SCHENKMAN, 2020).

Figura 2 – Ciclo biológico de *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado e vertebrado



Fonte: Adaptado de Moretti *et al.*, 2019.

Os tripomastigotas metacíclicos contidos nos excrementos penetram ativamente na pele por movimento ativo e liberação de enzimas histolíticas (ONYEKWELU, 2019). As proteínas de superfície do parasito auxiliam a sua adesão e internalização em células próximas ao local da picada, formando o vacúolo parasitóforo, que é degradado em seguida. Intracelularmente, ocorre a diferenciação em amastigotas, que se multiplicam por divisão binária, seguida da diferenciação em tripomastigotas. A célula hospedeira repleta de parasitos se rompe, liberando tripomastigotas que podem invadir células e tecidos adjacentes, ou atingir a corrente sanguínea, para colonizar tecidos mais distantes, ou ainda, infectar outros triatomíneos que venham a se alimentar do hospedeiro infectado (DA LANA; TAFURI; BARTHOLOMEU, 2016).

1.1.3 Manifestações clínicas

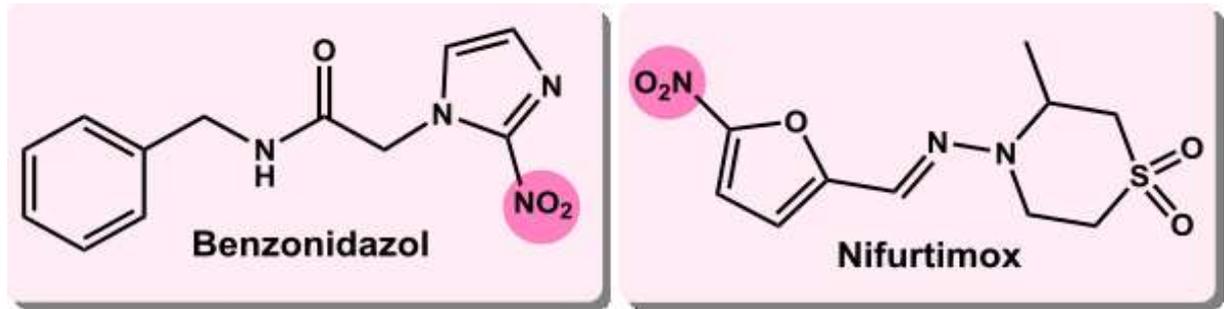
A DC apresenta duas formas ou fases clínicas: aguda e crônica. A forma aguda, caracterizada pela alta parasitemia, quando sintomática, dura cerca de dois meses após a infecção. Seus sinais e sintomas podem incluir: sinais de entrada do parasito, como erupção cutânea, nódulos inflamatórios (chagoma de inoculação), edema dos tecidos moles periorbitais (sinal de Romana), febre, cefaleia, náusea, diarreia ou vômito, gânglios linfáticos aumentados, dificuldade para respirar, dores musculares, abdominais ou torácicas, entre outros. Pacientes assintomáticos ou com sintomas leves nesta fase, raramente são diagnosticados e tratados (BUCKNER; URBINA, 2012). Entretanto, o diagnóstico precoce é fundamental, visto que se a infecção não for tratada nesse momento, pode evoluir para a forma crônica (DA LANA; TAFURI; BARTHOLOMEU, 2016; PAHO, 2021).

Na fase crônica, cerca de 70% dos infectados permanecem assintomáticos (forma crônica indeterminada), enquanto 30% desenvolvem manifestações clínicas. Estima-se que 1/3 desenvolverá danos cardíacos, como cardiomiopatia, arritmia e aneurisma apical, que podem culminar em insuficiência cardíaca e morte súbita, causada pela destruição progressiva do músculo cardíaco (PAHO, 2021). Menos de 10% dos pacientes apresentarão a forma digestiva devido à desnervação do sistema nervoso entérico, que regula as funções motoras do trato digestivo, resultando em disfagia e hipomotilidade, induzindo a dilatação de alguns órgãos (megaesôfago e megacólon), com consequente constipação massiva (LIDANI et al., 2019).

1.2 **Tratamento etiológico atualmente disponível para DC**

A quimioterapia da DC associa o tratamento sintomático e o etiológico, porém, este último permanece parcialmente ineficaz, tendo em vista as baixas taxas de cura na forma crônica e a existência de cepas naturalmente resistentes (DA LANA; TAFURI; BARTHOLOMEU, 2016). Atualmente, o tratamento etiológico se restringe a dois derivados nitro-heterocíclicos (Figura 3) introduzidos na década de 70, o nitrofurano Nifurtimox (NFX, Lampit[®], Bayer) e o 2-nitroimidazol Benznidazol (BZN, Rochagan[®], Roche). Entretanto, o NFX teve sua comercialização descontinuada no Brasil desde a década de 80 (COURA; CASTRO, 2002), sendo atualmente recomendado apenas em casos específicos.

Figura 3 – Estruturas químicas do Benznidazol e Nifurtimox



Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2018), ambos são recomendados para casos agudos, congênitos e reativação por imunossupressão. Na forma crônica indeterminada ou digestiva, ambos são recomendados para crianças e adolescentes, e para adultos abaixo de 50 anos, apenas o BZN é recomendado. As fases iniciais da forma crônica cardíaca podem ser tratadas apenas com BZN, caso não haja contraindicações; para a forma crônica cardíaca avançada, não há recomendações de tratamento.

Frequentemente o tratamento é interrompido por seu curso prolongado e efeitos adversos (LIDANI et al., 2019), além de apresentarem baixas taxas de cura na forma crônica (15 a 30%), atuando principalmente como supressores de parasitemia, com maior ação sobre as formas tripomastigotas sanguíneas (BERN, 2011; FABBRO et al., 2007; RASSI, 1982). Para alcançar concentrações suficientes na circulação sistêmica para inibir as formas intracelulares, predominantes na forma crônica, seria necessário que as doses atingissem níveis tóxicos que não devem ser utilizados na clínica (IANNI; MADY, 1998). Além disso, é importante que o fármaco apresente um grau de lipofilicidade que lhe conceda fácil difusão entre as múltiplas membranas do hospedeiro para chegar ao parasito (FIELD et al., 2017).

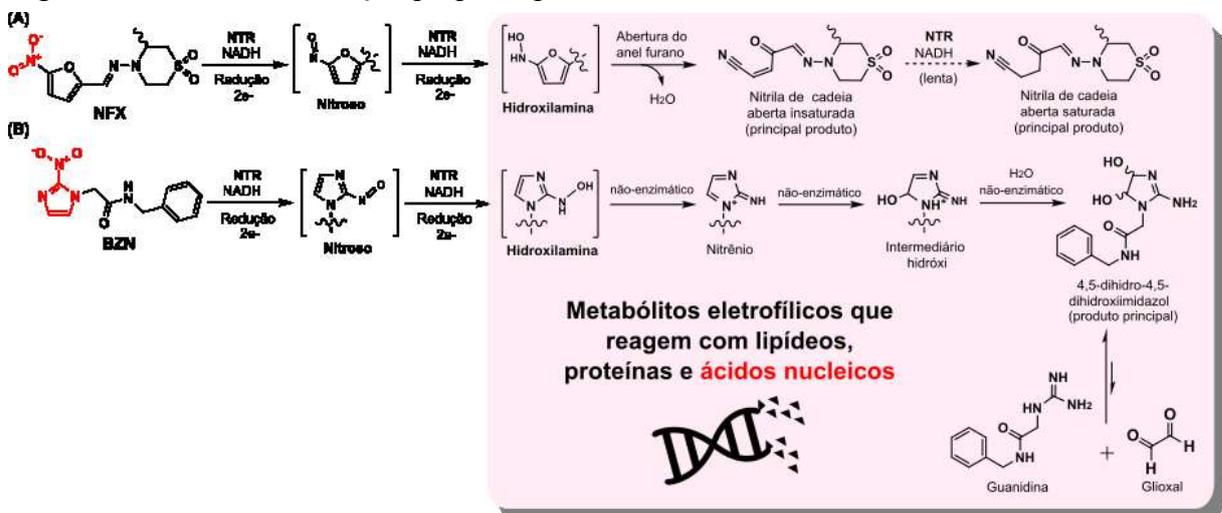
O mecanismo de ação dos compostos nitroaromáticos envolve sua ligação a um ou mais alvos moleculares, após serem enzimaticamente reduzidos, gerando metabólitos reativos, que induzem citotoxicidade através de mecanismos adicionais. Assim, NFX e BZN precisam ser bioativados para exercerem sua função, mediada em *T. cruzi* por uma nitroreductase tipo I (NRI). Essa enzima é expressa em tripanossomas, mas ausente em mamíferos, o que confere seletividade para o parasito (PATTERSON; WYLLIE, 2014).

No NFX, a NRI fragmenta os anéis heterocíclicos, promovendo uma série de reduções de dois elétrons, produzindo um intermediário nitroso e uma hidroxilamina. A abertura subsequente do anel furano com perda de água, leva à formação de uma nitrila de cadeia aberta insaturada. A NRI então reduz a ligação dupla carbono-carbono deste metabólito resultando em uma nitrila de cadeia aberta saturada (PATTERSON; WYLLIE, 2014). O mecanismo destes

metabólitos ainda não foi completamente elucidado, porém foi sugerido que a nitrila de cadeia aberta insaturada pode reagir covalentemente com grupos sulfidrila de algumas biomoléculas, inativando ou tornando resíduos de cisteína inacessíveis, promovendo a morte celular do parasito (AMSLINGER, 2010). Além disso, os metabólitos da hidroxilamina podem promover quebra de ácido desoxirribonucleico (DNA) e formação de adutos (WILKINSON et al., 2011).

De forma similar, o BZN é reduzido pela NRI, gerando um intermediário hidroxilamina, mas apresenta especificidades quanto à abertura do seu anel. Uma série de reações não-enzimáticas leva a conversão da hidroxilamina em um 4,5-dihidro-4,5-dihidroxiimidazol, que após decomposição, gera um produto glioxal (PANICUCCI; MCCLELLAND, 1989; MCCLELLAND; PANICUCCI; RAUTH, 2002). Este, por sua vez, é um dialdeído reativo altamente tóxico, que modifica proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (THORNALLEY, 2008). No entanto, a produção de glioxal é extremamente lenta, o que sugere que sua produção não seja o único mecanismo citotóxico do BZN (PATTERSON; WYLLIE, 2014). Os mecanismos de ação do NFX e BZN estão resumidos na Figura 4.

Figura 4 – Mecanismo de ação proposto para o NFX e o BZN



Fonte: Adaptado de Patterson e Willie, 2014.

As espécies quimicamente ativas formadas nesse processo, consideradas radicais livres, interagem com o DNA, proteínas, lipídios e outros componentes celulares (CORONEL et al., 2017) do parasito e também do hospedeiro, de forma que esses mecanismos se relacionam tanto a ação terapêutica anti-*T. cruzi* quanto aos efeitos adversos desses fármacos. Deste modo, os nitroderivados são comumente relacionados a toxicidade, em especial à mutagenicidade e carcinogenicidade, por isso, o grupo nitro é categorizado como um alerta estrutural ou um toxicóforo (ASHBY; TENNANT, 1991; PLOŠNIK; VRAČKO; DOLENC, 2016).

Em concordância, BZN e NFX estão associados à altas frequências de eventos adversos, de 53% e 85% respectivamente. A eficácia e tolerância do BZN são inversamente proporcionais a idade do paciente (STREIGER et al., 2004), visto que a atividade enzimática de nitrorredução é mais baixa em crianças e jovens adultos (VIOTTI et al., 2009), levando a uma maior frequência de eventos adversos em pacientes mais velhos (CANÇADO, 2002). Com o uso de BZN, destacam-se parestesias (10,3%), artralguas (8,1%), intolerância gastrointestinal (13,3%), neutropenia, além de efeitos dermatológicos como alopecia, dermatites e *rash* cutâneo. Sintomas neurotóxicos, como a polineuropatia periférica, podem persistir por meses, tendo importante impacto sobre funcionalidade e qualidade de vida dos pacientes. O NFX está relacionado à ocorrência de intolerância gastrointestinal (61%), eventos reumatológicos (artralguas, 33%) e acometimento dermatológico (15%) (BRASIL, 2018).

BZN e NFX foram associados com aumento do risco de linfomas em animais e demonstraram mutagenicidade *in vitro* em modelos como Teste de Ames, ensaio do cometa e ensaio do micronúcleo usando células de medula óssea de camundongo, eritrócitos humanos e de camundongo (FERREIRA; FERREIRA, 1986; NAGEL, 1987; BUSCHINI et al., 2009; CABRERA et al., 2009; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017; BRASIL, 2018).

Diante da eficácia limitada e toxicidade dos medicamentos disponíveis para o tratamento da DC, urge a necessidade da busca por novas alternativas terapêuticas mais seguras, eficazes e acessíveis, que possam ser administradas por períodos mais curtos (WHO, 2002), aplicando estratégias como reposicionamento, combinação e desenvolvimento de novos fármacos, além da bioprospecção de produtos naturais (PN) (WHO, 2017).

1.3 Quimioterapia experimental

Diversas abordagens baseadas em alvos bioquímicos bem estabelecidos têm sido empregadas na triagem de candidatos a fármacos tripanocidas, focando em vias e alvos de potencial importância para o *T. cruzi*, como sítios de DNA do cinetoplasto (kDNA), tripanotiona redutase, cisteína protease (cruzaína), transialidase, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, dihidrofolato redutase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, e sobretudo, nitroreduases e enzimas da via de biossíntese do ergosterol (SOEIRO; DE CASTRO, 2009; URBINA, 2010; CHATELAIN, 2015; SUETH-SANTIAGO et al., 2017).

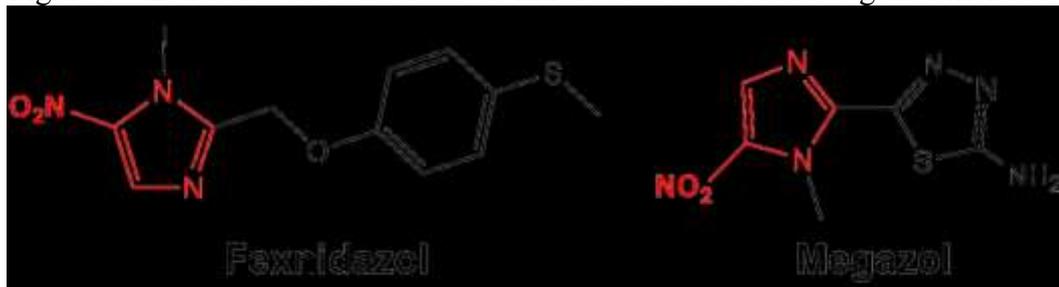
1.3.1 Substratos de nitroredutases

As nitroredutases são flavoenzimas NAD(P)H-dependentes que catalisam a redução de grupos nitro de uma grande variedade de nitrocompostos. As NRI são expressas majoritariamente em bactérias e algumas espécies de fungos. Contudo, alguns estudos filogenéticos sugerem que protozoários como *Trypanosoma* sp. e *Leishmania* sp. tenham adquirido essa enzima por transferência lateral de genes (DE OLIVEIRA; HENRIQUES; BONATTO, 2007). Por outro lado, é a ausência dessa enzima em humanos que a torna um alvo de interesse para novos agentes tripanocidas.

Seu substrato, o grupo nitro, contém um átomo de nitrogênio ligado a dois átomos de oxigênio. Este grupo é pequeno, polar, forte acceptor de elétrons e capaz de formar ligações de hidrogênio (MEANWELL, 2011). Por sofrer redução enzimática, origina espécies reativas responsáveis pelos efeitos biológicos da classe, de forma que muitos nitro-heterocíclicos atuam como pró-fármaco (PATTERSON; WYLLIE, 2014).

Os primeiros nitroaromáticos avaliados sobre *T. cruzi* datam da década de 50, como a nitrofurazona e o derivado 5-nitroimidazólico metronidazol (EVENS; NIEMEGEERS; PACKCHANIAN, 1957; COSAR; JULOU, 1959; COSAR et al., 1966). Na época da descoberta do BZN (ANDRADE; FIGUEIRA, 1977; BARRAL NETO, 1981), um derivado da mesma classe foi descoberto como um anti-protozoário de amplo espectro, o fexinidazol (Figura 5), mas pouco tempo depois teve seu estudo descontinuado devido ao seu potencial genotóxico (RAETHER; SEIDENATH, 1983). Contudo, anos depois, após uma triagem promovida pela iniciativa DNDI (2008), o fexinidazol foi reconsiderado, e posteriormente aprovado pela WHO (DEEKS, 2019) para tratamento da tripanossomíase africana, além de estar em fase clínica II para a DC (SALES JUNIOR et al., 2017).

Figura 5 – Estruturas dos substratos de nitroredutase associados à genotoxicidade



A genotoxicidade também levou a interrupção do desenvolvimento de outro potente derivado 5-nitroimidazólico, o megazol (Figura 5) (POLI et al., 2002; NESSLANY et al., 2004), o que estimulou a produção de diversos análogos com atividade anti-*T. cruzi* em baixas concentrações, que não promovem, ou induzem menos mutagenicidade que seu precursor (MELLO et al., 2013; CARVALHO et al., 2014). Complementarmente, Boechat et al. (2015) investigaram o efeito de diferentes substituintes na genotoxicidade de derivados 4 e 5-nitroimidazólicos, concluindo que o grupo nitro não é o único responsável pela mutagenicidade da classe, incentivando a progressão do desenvolvimento de moléculas contendo este grupo.

1.3.2 Inibidores da biossíntese do ergosterol (IBEs)

Os esteróis são uma classe de álcoois mono-hidroxilados, caracterizados pela presença de um núcleo tetracíclico, denominado ciclopentanoperidrofenantreno ou esterano (Figura 6). Esta estrutura apresenta quatro anéis fusionados, sendo três deles (A, B, C) compostos por 6 átomos de carbono, e um deles (D) por apenas 5 (DUPONT, 2005; GUPTA, 2019).

Figura 6 – Esterano, a estrutura base dos esteróis, ao lado do colesterol e do ergosterol

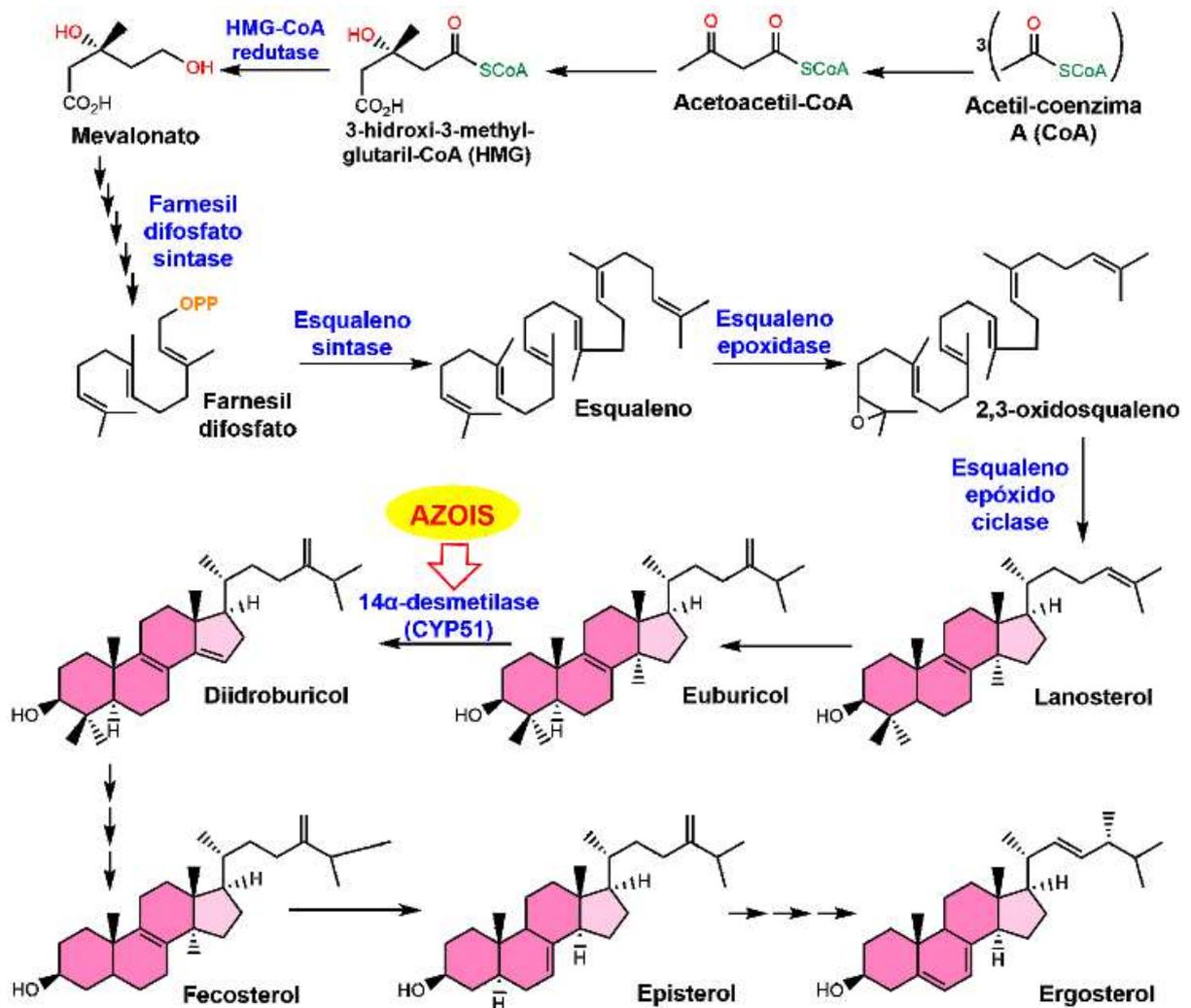


Os esteróis são biomoléculas lipofílicas que compõem a membrana celular de animais, plantas e microrganismos, modulando sua fluidez, integridade e permeabilidade seletiva, e exercendo assim, uma função essencial na divisão e manutenção celular (DUFOURC, 2008; BOOTH; SMITH, 2020). A variedade significativa entre rotas biossintéticas de esteróis resulta em uma diversidade na composição lipídica entre reinos (BROWN, 1998). Nos mamíferos predomina o colesterol (Figura 6), diferentemente de fungos e alguns protozoários, como *T.*

cruzi e *Leishmania* sp., em que o ergosterol é majoritário (WILLIAMS, B. L.; GOODWIN; RYLEY, 1966; BARRETT-BEE; RYDER, 1992).

A ausência deste esteroide em hospedeiros mamíferos permite que as enzimas desta via biossintética (Figura 7) sejam utilizadas como alvo de interesse no desenvolvimento de fármacos com toxicidade seletiva para esses patógenos (SUETH-SANTIAGO et al., 2015, 2017), como a Hidroxi-metil-glutaril-Coenzima A (HMG-CoA) redutase, alvo para estatinas; Farnesil difosfato sintase, o alvo para bifosfonatos; Esqualeno sintase, que é inibida por derivados de quinuclidina; Esqualeno sintase, que é inibida por derivados de quinuclidina; e a Esterol 14 α -desmetilase (CYP51), inibida pelos azóis (LEPESHEVA; VIRUS; WATERMAN, 2003).

Figura 7 – Rota sintética resumida do ergosterol em *T. cruzi*.



Fonte: Adaptado de Lepesheva et al., 2011; Cosentino e Agüero, 2014.

1.3.3 Inibidores de CYP51

Outro alvo promissor é a CYP51, uma enzima de alta *druggability*, que catalisa a remoção oxidativa do grupo metil C14 do eburicol (Figura 7), pela redução e regeneração do ferro heme de seu sítio ativo, que induz uma transferência de elétrons ao substituinte C14, formando o diidroburicol (BUCKNER; URBINA, 2012).

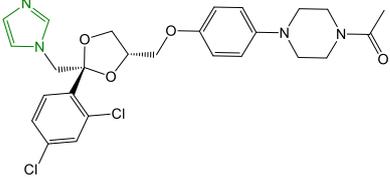
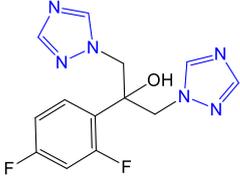
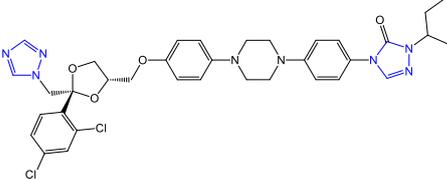
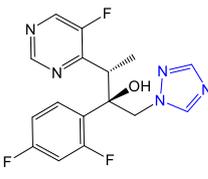
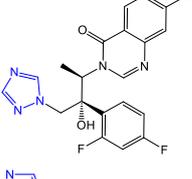
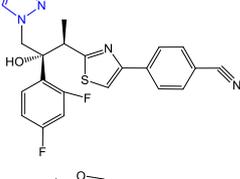
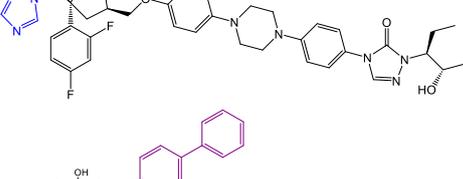
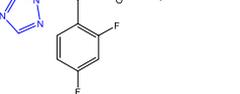
Os derivados azólicos (Figura 8), seus principais inibidores, consistem em compostos heterocíclicos contendo um átomo de nitrogênio e um outro heteroátomo dispostos em um anel de cinco átomos (GODOY NETTO; FREM; MAURO, 2008). O mecanismo dos azóis se dá pela interação do nitrogênio N-3 do imidazol ou N-4 do 1,2,4,-triazol com o ferro heme do sítio catalítico da CYP51, bloqueando a ligação de seu substrato. A potência da classe é ampliada pela indução do acúmulo de precursores tóxicos de esterol metilado, que em adição ao bloqueio da biossíntese de ergosterol, induz alterações deletérias na membrana celular, afetando sua permeabilidade, um fator essencial para a viabilidade do parasito (LEPESHEVA; VILLALTA; WATERMAN, 2011; BUCKNER; URBINA, 2012).

Figura 8 – Estrutura dos anéis azol, imidazol e 1H-1,2,4-triazol



O cetoconazol foi um dos primeiros azóis avaliados quanto à sua atividade sobre *T. cruzi*, exibindo atividade *in vitro* potente e seletiva, porém sem efeitos curativos em animais, falha relacionada a inativação metabólica sofrida pelos imidazóis oralmente administrados, perdendo sua interação com o grupo heme (MCCABE, 1988; URBINA et al., 1993). Buscando contornar esse fator, aprimorando potência e propriedades farmacocinéticas, foram desenvolvidos derivados onde o núcleo imidazólico foi substituído pelo 1,2,4-triazol, como fluconazol, itraconazol, voriconazol, albaconazol e ravuconazol ().

Quadro 1 – Estruturas e concentrações inibitórias dos principais IBEs sobre *T. cruzi*.

Estrutura	Derivado	IC ₅₀	CC ₅₀	Referência
	Cetoconazol	0,1 µM ^(Y, E) 0,002 µM ^(Y, A)	30 M	1,2
	Fluconazol	8 µM ^(Tu, A)	100 M	2,3
	Itraconazol	0,001 µM ^(Tu, A)	1 M	2
	Voriconazol	0,004 µM ^(Tu, A)	30 M	2
	Albaconazol	0,01 µM ^(Y, E) 0,001 µM ^(Y, A)	–	4
	Ravuconazol	0,1 µM ^(Y, E) 0,0001 µM ^(Y, A)	–	5
	Posaconazol	0,014 µM ^(Y,E) 0,00025 µM ^(Y,A)	–	6
	Derivado Posaconazol	0,035 µM ^(Tu, A)	29,8 µM	7

Legenda: IC₅₀: concentração inibitória média; CC₅₀: concentração citotóxica média; Tu: cepa Tulahuen; Y: cepa Y; E: epimastigota; A: amastigota.

Fonte: ¹ URBINA et al., 1993; ² BUCKNER, 2008; ³ BUCKNER et al., 1996; ⁴ URBINA et al., 2000; ⁵ URBINA et al., 2003; ⁶ BENAÏM et al., 2006; ⁷ CASTELO-BRANCO, 2015.

Com exceção do fluconazol, os demais mostraram alta potência *in vitro*, inclusive sobre amastigotas, prevalentes na infecção crônica (BUCKNER et al., 1996; BUCKNER, 2008),

entretanto, sem promover a cura em modelos *in vivo* (MCCABE, REMINGTON; ARAUJO, 1986; CAMPOS, et al., 1992; URBINA, et al., 2003; GUEDES et al., 2004; GULIN et al., 2020). Um problema apresentado por alguns destes derivados, como o fluconazol, voriconazol e albaconazol, é a baixa lipofilicidade, que afeta a distribuição e difusão entre biomembranas, um fator relevante para a ação sobre as formas intracelulares (URBINA, 2010).

O posaconazol, é um IBE de última geração com maior lipofilicidade, ativo no modelo crônico *in vivo*, sendo o primeiro fármaco desenvolvido racionalmente a entrar em ensaios clínicos para DC (MOLINA et al., 2000; 2014). No entanto, além de induzir o aumento de marcadores de hepatotoxicidade em humanos, apresentou baixa eficácia quando comparado ao BZN, falha relacionada a baixa biodisponibilidade oral e alta taxa de ligação a proteínas plasmáticas (URBINA, 2015). Além disso, seu alto custo sintético, é incompatível com os princípios da DNDI para desenvolvimento de fármacos acessíveis para doenças negligenciadas (FRANÇA et al., 2014; DNDI, 2008).

Visando aumentar a viabilidade sintética e biodisponibilidade oral do posaconazol, uma série de derivados foi desenvolvida, incluindo grupos fenoxilas provenientes de fenóis de baixo custo que mimetizam o início de sua cadeia lateral (CASTELO-BRANCO, 2015). Em um deles foi incluso o grupo bifenila (

), que confere rigidez e linearidade, um fator relevante para melhor acomodação no sítio ativo da CYP51, além de adicionar maior lipofilicidade a seus derivados (PAPADOPOULOU et al., 2015a). Este foi mais seletivo e 100 vezes mais potente que o BZN em um modelo intracelular em linhagem de fibroblastos de murinos (L929), contendo formas amastigotas e tripomastigotas, destacando o papel da lipofilicidade na inibição da forma intracelular. Além disso, não induziu mutagenicidade, mostrou hepatotoxicidade inferior ao BZN e promoveu maior sobrevivência dos animais e redução da carga parasitária, apesar de não promover a cura.

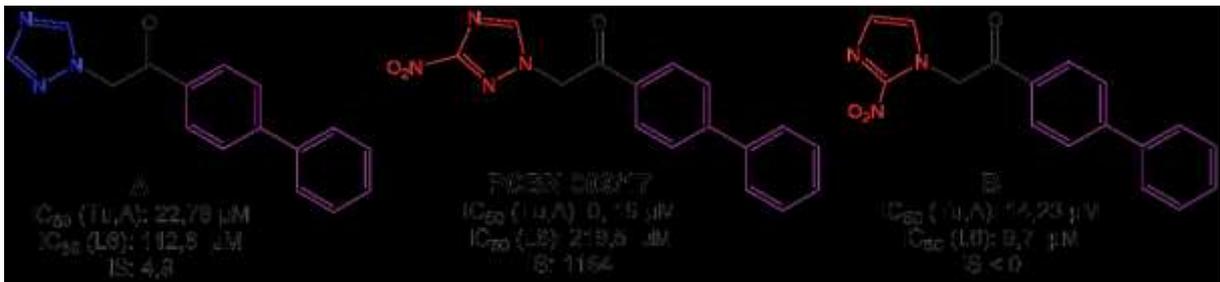
1.3.4 Inibidores 3-nitro-1,2,4-triazólicos

Um *lead* (protótipo) muito explorado por Papadopoulou et al. (2012, 2013; 2015a; 2015b; 2017) é o núcleo 3-nitro-1,2,4-triazol (NTZ), com base em evidências do papel do grupo nitro na otimização da atividade biológica de derivados azólicos. Muitos destes NTZ demonstram atividade sobre amastigotas intracelulares em escala nanomolar, apresentando índice de seletividade (IS) superior a 200. Além de serem substratos da Nitroreductase, os NTZ

são inibidores de CYP51, sendo considerados fármacos multialvo, definidos como compostos que modulam diferentes alvos relevantes para uma doença, visando o aumento da eficácia e segurança (MORPHY; RANKOVIC, 2005). Alguns destes derivados foram avaliados em ensaios de tratamento longo, levando à supressão da parasitemia, 100% de sobrevivência e ausência de inflamação do miocárdio em doses menores que o BZN (PAPADOPOULOU et al., 2017).

O derivado PCBN 009/17 (1-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-(3-nitro-1H-1,2,4-triazol-1-il)etan-1-ona), que possui uma cetona e uma bifenila adicionadas ao núcleo NTZ, se destacou nas avaliações de Papadopoulou et al. (2015a), com IC₅₀ de 0,19 µM sobre amastigotas intracelulares, sendo mais potente que seus análogos nitroimidazólicos e triazólicos (Figura 9), além de apresentar menor citotoxicidade e IS de 1164.

Figura 9 – Estrutura do derivado PCBN 009/17 e seus análogos (A e B)

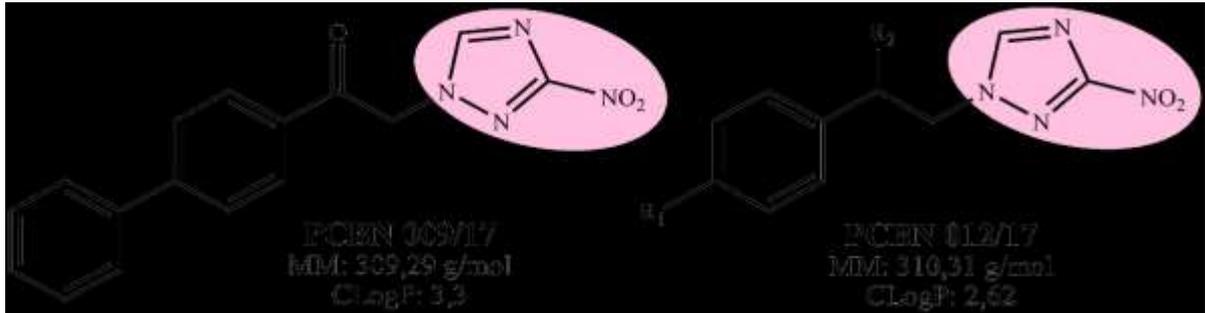


Legenda: IC₅₀: concentração inibitória média; E: epimastigota; A: amastigota; Tu: Tulahuen; L6: células hospedeiras de mioblastos de rato

Fonte: Papadopoulou et al., 2015a.

Uma linha similar vem sendo conduzida no Laboratório de Síntese de Fármacos da Farmanguinhos (FIOCRUZ), onde o grupo da Dra. Núbia Boechat emprega modelos e estratégias de desenvolvimento racional, para desenvolver novos análogos do megalol e do BZN, com o objetivo de reduzir efeitos genotóxicos e citotóxicos, aprimorando sua atividade anti-*T. cruzi* (BOECHAT et al., 2015; PITOMBEIRA, 2019). Através de uma rota sintética de menor custo e complexidade, o grupo desenvolveu um análogo do PCBN 009/17 (MENOZZI, 2019), o PCBN 012/17, cuja estrutura está protegida em razão do processo de pedido de patente (Figura 10). Ambos foram planejados de modo a cumprir a regra dos cinco de Lipinski (2012), que estabelece que a má absorção ou permeação de uma molécula é mais provável se ela atende a dois ou mais dos seguintes critérios: mais de 5 doadores de ligações de hidrogênio (–NH–, –OH); mais de 10 aceptores de ligação de hidrogênio (–N=, –O–); o peso molecular é superior a 500 Da; e o valor do coeficiente de partição (Clog P) é superior a cinco.

Figura 10 – Derivados PCBN 009/17 e PCBN 012/17



Legenda: MM, massa molar. CLogP, coeficiente de partição calculado pelo *SwissADME* (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsmprediction>).

Os derivados foram avaliados em modelo intracelular da cepa Tulahuen de *T. cruzi* em células L929 (MENOZZI, 2019). O PCBN 009/17 apresentou resultados similares aos observados por Papadopoulou et al. (2015a), enquanto que PCBN 012/17 foi mais que 4 mil vezes mais ativo e mais que 3 mil vezes mais seletivo que o BZN. O PCBN 012/17 foi ainda 540 vezes mais ativo e mais que 4,5 mil vezes mais seletivo que seu precursor, mostrando que suas modificações estruturais foram favoráveis à atividade anti-*T. cruzi*. Pelo IS superior à 50, o PCBN 012/17 foi considerado apto para os testes *in vivo*. Entretanto, é essencial que estes compostos sejam avaliados em relação à sua mutagenicidade, visto que além de todas as evidências acerca da genotoxicidade e carcinogenicidade associada aos nitrocompostos (NEPALI; LEE; LIOU, 2019), um derivado 3-nitro-1,2,4-triazólico já foi descrito como mutagênico (PAPADOPOULOU et al., 2013). Deste modo, é importante avaliar o efeito que estes substituintes apresentam sobre o potencial mutagênico destes derivados.

1.3.5 Produtos naturais com atividade tripanocida

Muitos fármacos atualmente disponíveis no mercado são derivados de plantas e de seus metabólitos secundários, alguns deles quimicamente modificados para garantir maior potência contra doenças não-infecciosas ou patógenos (SACCARO JÚNIOR, 2012). As plantas são uma fonte de tratamentos alternativos de baixo custo para doenças negligenciadas, sendo a malária, um exemplo de sucesso do uso terapêutico de PN. A quinina (*Cinchona* sp.) e a artemisina (*Artemisia annua*) deram origem a diversos derivados utilizados como antimaláricos (FRANÇA; FIGUEROA-VILLAR, 2008). Uma variedade de compostos da família dos

alcaloides apresenta sobre tripanossomatídeos, em sua maioria fenóis, terpenoides de quininos. Todavia, até o momento nenhum deles pode ser considerado um candidato a fármaco promissor, devido a dados *in vivo* limitados (NDJONKA et al., 2013).

Para DC, foram identificadas mais de 400 espécies pertencentes a mais de 100 famílias com ação anti-*T. cruzi* (IZUMI et al., 2011), impulsionando esforços para elucidar seus mecanismos de ação (APT, 2017). Alguns alcaloides do boldo (*Peumus boldus*) e naftoquinonas extraídas de *Calceolaria sessilis* atuam bloqueando a cadeia respiratória do parasito (MORELLO et al., 1994). Em um estudo enzimático, uma proteína extraída das sementes de *Bahuinia bauhinioides* mostrou potencial inibitório sobre a cruzipaina (DE OLIVEIRA et al., 2001), mas não chegou a ser avaliada experimentalmente sobre o parasito. PN também atuam inibindo desidrogenases mitocondriais e a biossíntese de esteróis de membrana (VARELA et al., 2014). Além disso, outros inibem a resposta do parasito ao estresse oxidativo pela produção de radicais superóxidos (MAYA et al., 2007). Em avaliações *in vivo* em roedores, os compostos isolados desoximicanolida (*Mikania michanta*), (+)-15-hidroxi-labd-7-en-17-al (*Aristeguietia glutinosa*) e psilostaquina (*Ambrosia tenuifolia*) exibiram aumento da sobrevivência e redução da parasitemia *in vivo* (SÜLSEN et al., 2008; LAURELLA et al., 2012; VARELA et al., 2014).

Espécies ricas em compostos fenólicos também foram avaliadas em *T. cruzi* e *Leishmania* sp. (CALIXTO JÚNIOR et al., 2016; ANTWI et al., 2019). A família Myrtaceae inclui diversos membros ricos em polifenóis com atividade antimicrobiana e antiparasitária. Extratos e óleos essenciais das folhas das espécies *Myrciaria dubia*, *Plinia cauliflora* (Figura 11) e *P. cerrocampaensis* exibiram potencial inibitório sobre *Plasmodium falciparum* e *L. amazonensis* (DURANT et al., 2014; CORREIA et al., 2016; DA SILVA et al., 2018).

Figura 11 – Árvore (A), frutos (B) e folhas (C) de *Plinia cauliflora*



Fonte: Adaptado de (A): <<http://www.flora.avph.com.br/jaboticabeira.php>>; (B) <<https://bit.ly/2YbNILj>>; (C) <<https://www.flickr.com/photos/26147157@N03/5089554445>>. Acesso em: 10 nov. 2021.

P. cauliflora, anteriormente classificada como *M. cauliflora* (SOBRAL, 1985), é uma árvore frutífera popularmente conhecida como jabuticabeira, encontrada principalmente nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil. Seu fruto, a jabuticaba, de grande potencial comercial, é muito apreciado na indústria de alimentos e bebidas (GASPAROTTO; DE SOUZA; LÍVERO, 2019). Entretanto, investigações etnofarmacológicas possibilitaram a descoberta de substâncias bioativas de interesse na fruta, casca do fruto e da árvore, e em suas sementes, de forma que atualmente a espécie também é empregada na produção de fitoterápicos, nutracêuticos e cosméticos (WU; LONG; KENNELLY, 2013; NERI-NUMA et al., 2018; INADA et al., 2020).

A jabuticabeira apresenta diversas aplicações etnomedicinais relacionadas ao seu conteúdo fenólico, que inclui substâncias antioxidantes, anti-inflamatórias, antiproliferativas, antimutagênicas, vasodilatadoras, hipoglicemiantes, cardioprotetoras, entre outras (GASPAROTTO; DE SOUZA; LÍVERO, 2019). Folhas, caules e cascas são utilizadas, em infusões ou decocções, em afecções cutâneas (LORENZI, 1992) e ginecológicas (PAIVA et al., 2017). Várias partes da planta, em especial suas folhas, são usadas no tratamento de infecções e inflamações respiratórias e gastrointestinais (CRUZ; KAPLAN, 2004; AGRA et al., 2008). Por isso, uma propriedade das folhas muito estudada é o potencial antibacteriano e antifúngico (SOUZA-MOREIRA et al., 2011; SOUZA-MOREIRA et al., 2013).

Por outro lado, um ponto ainda pouco explorado é seu potencial antiparasitário. Dadas as evidências de sua atividade em *Leishmania* (DA SILVA et al., 2018), é relevante que a ação da folha de *P. cauliflora* seja alvo de estudo sobre outros protozoários flagelados, como *T. cruzi*, tendo em vista a conservação de certos alvos farmacológicos entre tripanossomatídeos, e também entre protozoários e fungos (COWELL; WINZELER, 2019). Além disso, assim como os compostos sintéticos, é fundamental que os PN também sejam devidamente analisados em ensaios toxicológicos, para garantir práticas seguras quanto ao seu uso e comercialização, incluindo avaliações de citotoxicidade e genotoxicidade (EKOR, 2014; PALOZI et al., 2020).

1.4 Aplicação de ferramentas *in silico* na descoberta de fármacos

Por um longo período da história, os medicamentos eram obtidos a partir de extratos vegetais sem avaliações ou validações adequadas, muitos deles sendo formados por misturas complexas de compostos, dentre os quais, poucos eram responsáveis pela ação fisiológica

desejada. No século XIX, os avanços químicos permitiram o fracionamento dos extratos, isolamento e avaliação dos constituintes farmacologicamente ativos (HACKER, 2009). Durante a primeira metade do século XX, os fármacos passaram a ser sintetizados a partir de modificações de compostos naturalmente produzidos por plantas ou animais. Logo, a observação de que moléculas sintéticas e naturais estruturalmente similares poderiam agir no mesmo alvo farmacológico de formas diferentes, como agonistas ou antagonistas, deu origem à percepção de que alterações estruturais mínimas poderiam modificar drasticamente determinadas atividades farmacológicas (PROEKT; HEMMINGS, 2013), fortalecendo o estudo da relação estrutura-atividade (SAR, do inglês *structure-activity relationship*).

Atualmente, o processo de descoberta de novos fármacos (*drug discovery*) pode aliar a biodiversidade e a tecnologia farmacêutica, seja a partir da prospecção por princípios ativos em PN, ou pela criação de novos fármacos sintéticos, aplicando métodos de química combinatória e desenvolvimento racional de fármacos (ANTEL, 1999; MIGNANI et al., 2016; ZHANG et al., 2020). Apesar dos inúmeros métodos aplicáveis, o custo do desenvolvimento de um único fármaco pode ultrapassar US\$1,6 bilhão (TUFTS, 2014), um valor muitas vezes usado para justificar o alto preço de vários medicamentos e apoiar períodos mais longos de exclusividade de venda (AVORN, 2015), questões incompatíveis com os princípios da DNDI (2008), que defende tratamentos acessíveis, disponíveis e adaptados às comunidades que os necessitam.

Do laboratório às farmácias, os candidatos a fármacos enfrentam uma grande série de etapas, geralmente iniciada por uma triagem de alto rendimento em busca de uma substância ativa (*hit*) que possua atividade reproduzível acima de um limite predefinido em algum ensaio biológico (BUCKLE et al., 2013). As substâncias ativas identificadas nesse processo raramente são comercializáveis e cerca de 80% são abandonadas em algum ponto do seu desenvolvimento (AVORN, 2015), por apresentarem baixa potência, seletividade ou afinidade pelo alvo, efeitos colaterais e propriedades de ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) inadequadas (NOËL, 2013). Há 20 anos, estes problemas se relacionavam, a falha em ensaios clínicos ou remoção do mercado de cerca de 50% dos potenciais compostos (KOLA; LANDIS, 2004). Essa porcentagem foi reduzida após a intensificação da filtragem e otimização de propriedades de ADMET durante estudos iniciais (HOU; WANG, 2008; MERLOT, 2010).

Todavia, os experimentos que avaliam esses parâmetros individualmente geram custos e carga de trabalho incompatíveis com as demandas de triagem e otimização (CHENG et al., 2012). Diante disso, a união de estudos experimentais e computacionais é uma alternativa mais viável para a identificação de *leads* (protótipos), que são substâncias que satisfazem critérios

mínimos predefinidos para viabilizar futuras otimizações de SAR (*lead optimization*) dos compostos.

De modo geral, os *leads* demonstram SAR controlável, além de atividade e seletividade adequadas, confirmadas em um ensaio *in vitro* relevante (NOËL, 2013). Após uma série de otimizações e passagem por uma bateria de avaliação toxicológica em modelos alternativos e animais, é possível chegar a um candidato a fármaco (*drug candidate*). Para avançar para ensaios clínicos, este deve se ligar seletivamente ao sítio receptor do alvo promovendo uma resposta funcional precisa, e apresentar biodisponibilidade e distribuição adequada para induzir as respostas desejadas em animais e humanos.

Para facilitar esse caminho, existem diversas plataformas gratuitas para predição *in silico* de propriedades farmacocinéticas e toxicidade baseada na estrutura química dos compostos, como as plataformas *LAZAR*, *pkCSM* e *SwissADME* (MAUNZ et al., 2013; PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015; DAINA; MICHELIN; ZOETE, 2017).

1.5 Estudos *in vitro* de mutagenicidade, genotoxicidade e citotoxicidade

1.5.1 Avaliação de mutagenicidade e genotoxicidade

A genética toxicológica é a área da Toxicologia que estuda agentes físicos ou químicos (naturais ou sintéticos) que podem causar danos no material genético (GUPTA, 2016; JAIN; BANDYOPADHYAY; SUNDAR, 2018). Quando amplificados pela divisão celular, esses danos podem gerar um grupo crescente de células disfuncionais em um órgão ou tecido. Em células germinativas, esses danos estão relacionados ao aborto espontâneo, infertilidade e doenças genéticas hereditárias. Em células somáticas, estão associados a condições degenerativas como envelhecimento precoce, disfunções imunes, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (OECD, 2015).

Outro importante processo patológico ligado a danos genéticos é a carcinogênese. Os agentes genotóxicos podem causar mutações potencialmente cancerígenas no DNA, especialmente se ocorrerem em proto-oncogenes, que controlam o ciclo celular, incluindo processos como apoptose, inativação de genes supressores de tumor ou reparo do DNA (JACKSON; BARTEK, 2009; NAKAD; SCHUMACHER, 2016; TURKEZ; ARSLAN;

OZDEMIR, 2017). Logo, conhecer as propriedades mutagênicas e carcinogênicas é uma etapa fundamental na avaliação de segurança de produtos químicos (PLOŠNIK; VRAČKO; DOLENC, 2016). Por isso, a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2015) preconiza uma série de ensaios internacionalmente validados, como o Teste de Ames e o ensaio do micronúcleo (OECD, 2016, 2020).

1.5.1.1 Teste de Ames

O ensaio de mutação reversa bacteriana, conhecido como Teste de Ames ou *Salmonella*/microsoma, é a técnica de triagem mais utilizada na identificação de indutores de mutações pontuais, com resultados de alta correlação qualitativa com avaliações de carcinogenicidade em roedores (MCCANN et al., 1975). Aprimorado ao longo dos anos (AMES, 1971; MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000), foi internacionalmente padronizado e validado, e integra as diretrizes da OECD (2020), como o teste inicial nas baterias de ensaios toxicológicos necessários para o registro de medicamentos, formulações químicas e moléculas em fase de desenvolvimento (ROUBICEK et al., 2021).

O princípio do ensaio é fundamentado pelo uso de linhagens de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium¹ com mutações específicas no *operon* da histidina (*his*), que conferem auxotrofia para este aminoácido. Desse modo, estas linhagens não formam colônias visíveis em meio de cultura com traços de histidina, a não ser que suas mutações sejam revertidas de forma espontânea ou induzida por um agente mutagênico (MARON; AMES, 1983).

Na inexistência de dados sobre a mutagenicidade de um agente, as linhagens TA98 e TA100, que detectam respectivamente, deslocamento do quadro de leitura e substituição de pares de bases, geralmente são utilizadas em ensaios preliminares, sendo consideradas linhagens essenciais nas avaliações (PRIVAL; ZEIGER, 1998; MORTELMANS; ZEIGER, 2000). A aplicação de TA98 e TA100 está associada à alta sensibilidade que apresentam, baseada em evidências que indicam que o uso exclusivo dessas linhagens permite a detecção de até 93% dos compostos mutagênicos (WILLIAMS et al., 2019) detectados coletivamente pelas linhagens recomendadas pela diretriz 471 da OECD (2020).

¹ *Salmonella typhimurium* foi reclassificada para *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, cuja notação científica é *Salmonella* Typhimurium ou *S. Typhimurium* (TINDALL et al., 2005).

As linhagens também possuem mutações adicionais (Tabela 1) que aumentam sua capacidade de detecção de agentes mutagênicos: a mutação *uvrB*, é a deleção de um gene envolvido no reparo de DNA por excisão; a mutação *rfa*, induz aumento de permeabilidade a moléculas grandes, por alterações na cadeia lipopolissacarídica; e o plasmídeo pKM101 contém o gene *mucAB* que promove o aumento do reparo propenso a erro (MARON; AMES, 1983).

Tabela 1 – Características genéticas das linhagens TA98 E TA100 de *S. Typhimurium*.

Linhagem	Mutação	Especificidade	$\Delta uvrB$	<i>rfa</i>	pKM101
TA98	<i>hisD3052</i>	SBP	+	+	+
TA100	<i>hisG46</i>	SPB; DQL	+	+	+

Legenda: $\Delta uvrB$, deleção do gene *uvrB*; *rfa*, remoção parcial da cadeia lipopolissacarídica; DQL, deslocamento do quadro de leitura; SPB, substituição de pares de bases.

Geralmente, carcinógenos genotóxicos são moléculas eletrofilicas altamente reativas que interagem com o nucleófilos celulares mais vulneráveis, os ácidos nucleicos, bases de DNA guanina, adenina, citosina, e timina, formando ligações covalentes. Estes agentes podem ser eletrofilicos por si mesmos ou podem ser metabolizados por vários processos celulares em intermediários eletrofilicos reativos (PLOŠNIK; VRAČKO; DOLENC, 2016).

O Teste de Ames se baseia em um modelo procarioto, que difere das células de mamíferos em fatores como absorção, estrutura cromossômica, processos de reparo de DNA, e em especial, no metabolismo (OECD, 2020), considerando a ausência de enzimas importantes para a biotransformação de xenobióticos, processo capaz de determinar se um composto metabolizado é “desintoxicado” ou transformado em um metabólito tóxico (JIA; LIU, 2007; ASHA; VIDYAVATHI, 2010). Em virtude destas diferenças metabólicas, a utilização de um sistema de metabolização exógena *in vitro* é essencial.

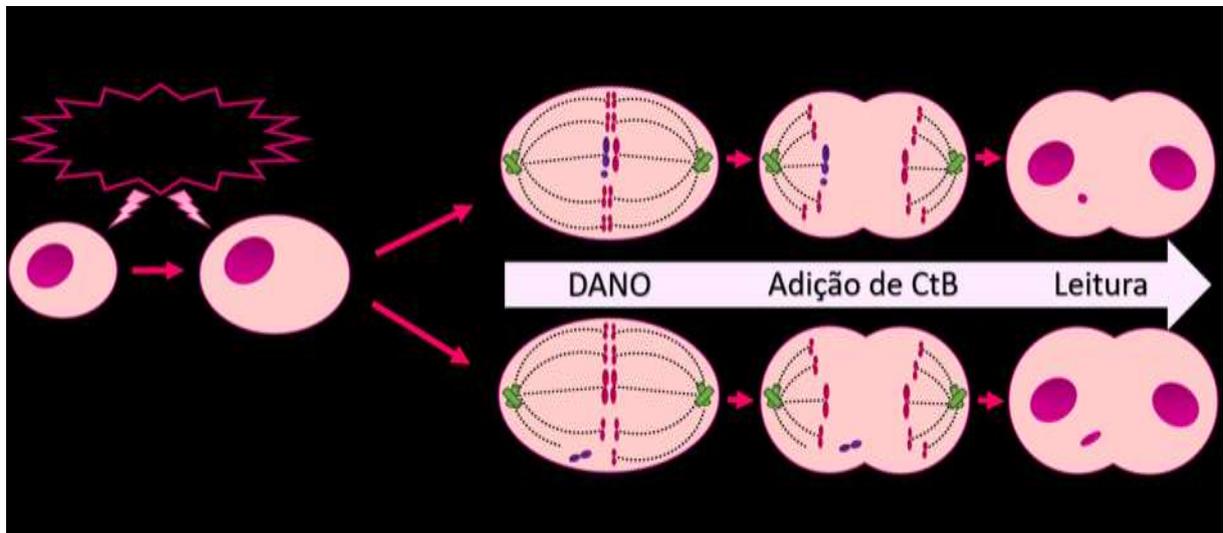
O sistema usado no Teste de Ames é a fração S9, o sobrenadante de um homogenato de fígado de ratos Sprague-Dawley, que contém frações microssomais e citosólicas, combinando enzimas de fase I e fase II e seus cofatores (PARMENTIER et al., 2007). Desta forma, além de CYP450 e uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferases, a fração S9 também contém enzimas citosólicas, como aldeído oxidase, xantina oxidase, sulfotransferases, metiltransferases, N-acetiltransferases e glutatona transferases (HAYES, 1994). O sistema de oxidação metabólica baseado em CYP450 é capaz de metabolizar um grande número de produtos químicos em formas eletrofilicas reativas (GUENGERICH, 2008). Por isso, para induzir a expressão de

enzimas CYP450 (MORTELMANS; ZEIGER, 2000), os animais são previamente tratados com bifenil-policlorinato (Aroclor 1254).

1.5.1.2 Ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese *in vitro*

O ensaio do micronúcleo (MN) *in vitro*, também recomendado pela OECD (2016), identifica agentes que induzem a formação de MN expressos em células em divisão que apresentam quebras de cromossomos acêntricos e/ou inteiros que foram incapazes de migrar aos polos mitóticos e ficaram para trás durante a anáfase, permanecendo fora dos núcleos filhos (MANTOVANI et al., 2021). Este método pode detectar rupturas cromossômicas estruturais (causadas por agentes clastogênicos) e anomalias cromossômicas numéricas ou perda cromossômica (por agentes aneugênicos), conforme ilustra a Figura 12.

Figura 12 – Formação de micronúcleos por agentes clastogênicos e aneugênicos



Legenda: CtB, citocalasina B.
Fonte: A autora, 2019.

A contagem de MN é conduzida nas células filhas da primeira divisão. Para isso, o método aplica um inibidor de polimerização de actina, a citocalasina B (CtB), para bloquear a citocinese (Figura 12). As células inibidas são facilmente reconhecidas por sua aparência binucleada, permitindo a contabilização. Além de danos ao DNA, esta técnica pode ser empregada para avaliar a proliferação celular, medindo citostase e citotoxicidade. Os efeitos

citostáticos são medidos por meio da proporção de células mono-, bi- e multinucleadas e a citotoxicidade por meio de proporções de células necróticas e/ou apoptóticas (FENECH, 2007).

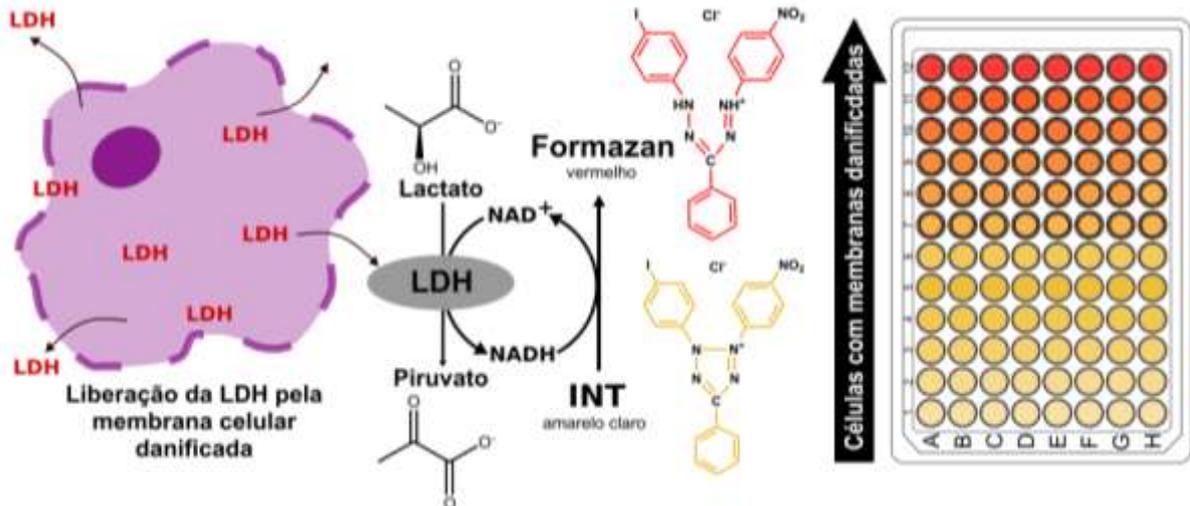
1.5.2 Avaliação de citotoxicidade

A hipótese de que os xenobióticos exercem seus efeitos interagindo com funções celulares básicas comuns às células animais sustenta a expectativa de que testes *in vitro* sejam úteis na predição de toxicidade *in vivo*. Deste modo, a citotoxicidade é definida como a capacidade de um agente gerar uma lesão com efeitos deletérios no metabolismo, estrutura e/ou viabilidade das células (NOGACKA et al., 2019), podendo culminar na morte celular. As células expostas a compostos tóxicos podem responder através de diferentes mecanismos. Se o dano é letal, podem sofrer necrose, perdendo a integridade de sua membrana e morrendo rapidamente, ou podem seguir outra via de morte celular, como apoptose ou autofagia. Se expostas a danos subletais, podem parar ativamente seu crescimento e divisão, levando à diminuição na proliferação celular (JAIN; BANDYOPADHYAY; SUNDAR, 2018).

Tais respostas podem ser medidas pelo monitoramento de células inteiras ou componentes subcelulares e organelas, utilizando métodos que avaliam o funcionamento de alvos moleculares envolvidos em processos fisiológicos das células, através de indicadores de viabilidade ou morte celular (ASLANTÜRK, 2018). Os parâmetros frequentemente mensurados nesses ensaios incluem indução de peróxido, depleção de glutatona, diminuição de potencial de membrana mitocondrial e redução na viabilidade geral (ADAN; KIRAZ; BARAN, 2016; THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2019).

A membrana plasmática pode ser considerada o primeiro meio de interação direta da célula com o xenobiótico, onde este pode agir sobre o funcionamento de canais iônicos ou receptores, e sobre a integridade da bicamada fosfolipídica, afetando a troca de substâncias e o equilíbrio entre o citoplasma e o meio extracelular, modificando o funcionamento normal das células (VINKEN; BLAAUBOER, 2017; KUMAR, 2020). Um dos principais métodos para avaliar essas alterações é a medição da atividade da lactato desidrogenase (LDH), uma enzima citoplasmática marcadora de citotoxicidade e lise celular, por ser rapidamente liberada no meio de cultura frente a alteração de permeabilidade ou danos na membrana (ROCHE, 2016), conforme ilustra a Figura 13.

Figura 13 – Princípio do ensaio LDH para avaliação de danos na membrana celular



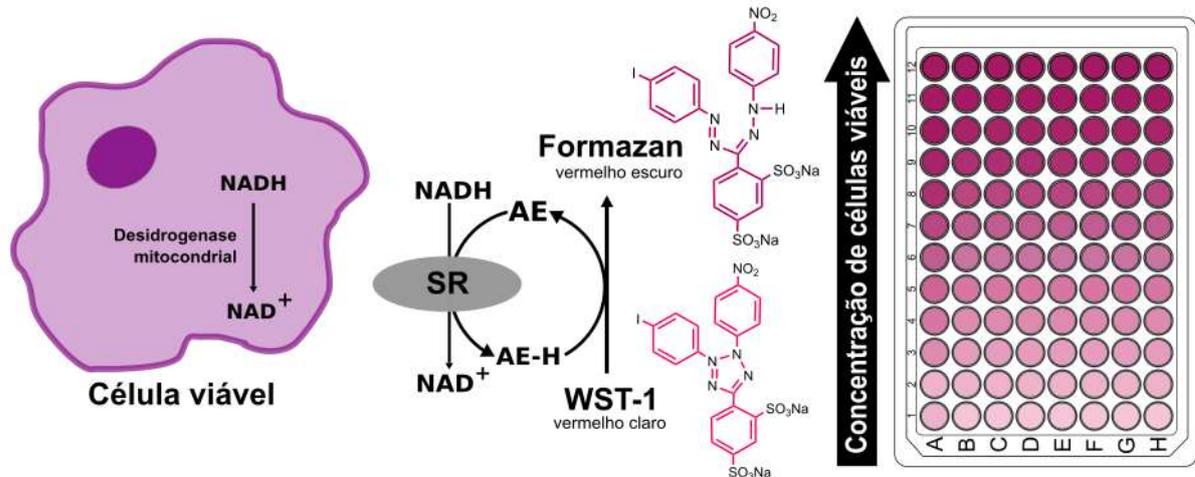
Legenda: SR, sistema redutor; AE, acoplador de elétrons.
Fonte: A autora, 2021.

Esta técnica se baseia inicialmente na redução do NAD^+ a $\text{NADH} + \text{H}^+$ pela oxidação de lactato a piruvato catalisada pela LDH liberada no meio. Em seguida, dois hidrogênios são transferidos de $\text{NADH} + \text{H}^+$ para o sal de tetrazólio amarelo INT (cloreto de 2-[4-iodofenil]-3-[4-nitrofenil]-5-feniltetrazólio) por um catalisador, gerando o cromógeno formazan vermelho (ROCHE, 2016). Logo, um aumento no número de células mortas ou com danos na membrana plasmática, resulta em um aumento da atividade enzimática da LDH no sobrenadante evidenciado pela presença de formazan, mensurada por espectrofotometria.

Outro parâmetro de citotoxicidade comumente avaliado, é o potencial redox, que avalia indiretamente a atividade mitocondrial da célula. Isso é possível, pois muitas enzimas da cadeia respiratória mitocondrial são sensíveis a ação de xenobióticos, que podem comprometer a produção de energia para o funcionamento celular e, conseqüentemente, a viabilidade (PRÄBST et al., 2017; VINKEN; BLAAUBOER, 2017). Esses eventos podem ser avaliados pelo ensaio WST-1 (*water soluble tetrazolium*), uma otimização do ensaio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio).

Ao contrário do MTT, o WST-1 (4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazólio]-1,3-benzeno dissulfonato) é um sal hidrossolúvel que elimina a necessidade de uma etapa de solubilização (ROCHE, 2021). Apesar dos princípios similares, o ensaio WST-1 se diferencia do LDH por ser reduzido por enzimas da cadeia respiratória mitocondrial (Figura 14), como flavoproteínas ou desidrogenases, caracterizando esta reação como exclusiva de células metabolicamente ativas (SLATER, 1959). Logo, a quantidade de produto gerado se relaciona diretamente ao número de células viáveis no meio (ALTMAN, 1974).

Figura 14 – Princípio do ensaio WST-1 para avaliação da função mitocondrial



Legenda: SR: sistema redutor; AE: acoplador de elétrons.

Fonte: A autora, 2021.

Um fator relevante nos ensaios de toxicidade *in vitro* é a escolha das linhagens celulares, uma vez que geralmente tais avaliações requerem o uso de uma fonte exógena de ativação metabólica a menos que as células sejam metabolicamente competentes no que diz respeito às substâncias-teste (OECD, 2016). Assim, para estabelecer sistemas *in vitro* confiáveis que prevejam com precisão a toxicidade, é necessário empregar modelos que possam reproduzir a bioativação ou geração de metabólitos reativos intermediários potencialmente envolvidos no mecanismo de toxicidade de um agente (VAN DEN HOF et al., 2014).

Um modelo muito empregado na avaliação de fármacos são os hepatócitos, visto que o fígado representa um alvo importante para a toxicidade sistêmica, por sua função ímpar no metabolismo de xenobióticos (VINKEN; HENGSTLER, 2018). Este órgão é responsável pela produção de níveis relativamente altos de metabólitos tóxicos produzidos por enzimas de fase I e II, como as enzimas do citocromo P450 (CYP450), Acetiltransferases, Nitroreduases e Glutathiona transferases (ALMAZROO; MIAH; VENKATARAMANAN, 2017). Entre estas, as CYP450 protagonizam a biotransformação de grande parte das substâncias exógenas, incluindo 70 a 80 % da metabolização de medicamentos (ZANGER; SCHWAB, 2013).

Em vista disso, a linhagem de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) é uma opção acessível e de fácil cultivo, de considerável valor preditivo (GERETS et al., 2009). O'Brien et al. (2006) demonstraram que HepG2 foi capaz de detectar 90% dos fármacos hepatotóxicos avaliados em uma triagem de alto conteúdo. Por ter origem tumoral e não possuir capacidade metabólica equivalente a hepatócitos primários, devido a baixos níveis de enzimas de fase I (GERETS et al., 2012; WESTERINK; SCHOONEN, 2007), é conveniente que a avaliação com

HepG2 seja complementada com o uso de uma linhagem não-tumoral, como por exemplo, a linhagem de fibroblastos de fígado de camundongo F C3H (GALVÃO et al., 2021).

Em síntese, a combinação de ferramentas *in silico* e *in vitro* para o estudo de propriedades farmacocinéticas e toxicidade representa uma opção rápida e viável na investigação de substâncias bioativas, de origem natural ou de síntese, empregada como alternativa a testes em modelos animais durante anos na triagem de candidatos a medicamentos (VAN DEN HOF et al., 2014; OECD, 2015; VINKEN; HENGSTLER, 2018). Portanto, as metodologias anteriormente descritas são ferramentas essenciais no processo de descoberta de fármacos, fornecendo dados que podem ser aplicados para aprimorar ou ampliar as alternativas farmacológicas, auxiliando o desenvolvimento de compostos mais eficazes, seguros e de menor custo para o tratamento de doenças negligenciadas, como a DC.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar, através de métodos *in silico* e *in vitro*, a eficácia e segurança de PN e de síntese com potencial aplicação no controle da infecção parasitária por *Trypanosoma cruzi*, visando a identificação de alternativas terapêuticas de maior seletividade no tratamento da Doença de Chagas.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Promover a caracterização metabolômica do extrato hidrometanólico da folha de *P. cauliflora* (HME);
- b) Investigar propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e toxicológicas dos compostos mais abundantes do HME e de derivados nitrotriazólicos (NTZ) através de modelos de predição *in silico*;
- c) Avaliar a mutagenicidade *in vitro* do HME e de derivados NTZ sobre cepas de *Salmonella* Typhimurium, na presença e ausência de ativação metabólica exógena;
- d) Analisar o perfil de citotoxicidade *in vitro* do HME e de derivados NTZ sobre células de hepatocarcinoma humano HepG2 e fibroblastos de fígado de camundongo F C3H;
- e) Investigar o potencial genotóxico *in vitro* do HME sobre células de hepatocarcinoma humano HepG2;
- f) Investigar a ação fenotípica *in vitro* do HME sobre a forma tripomastigota sanguínea da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

3 RESULTADOS

Os resultados desta dissertação foram organizados em forma de capítulos, apresentando duas propostas independentes desenvolvidas durante o mestrado, em concordância com os objetivos da dissertação.

O item 3.1, focado no estudo de um produto natural, consiste em um artigo científico elaborado na língua inglesa, brevemente explicado em português. O estudo intitulado “*Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Jaboticaba) leaf extract: *in vitro* anti-*Trypanosoma cruzi* activity, toxicity assessment and phenolic-targeted UPLC-MSE metabolomic analysis” foi publicado no periódico “*Journal of Ethnopharmacology*” (fator de impacto: 4,360, Qualis A2) em 2021. Neste artigo, investigamos a composição fenólica, o perfil de toxicidade *in vitro* e *in silico*, e a atividade anti-*T. cruzi* do extrato hidrometanólico enriquecido com fenólicos da folha de *P. cauliflora*. Observamos que apesar de não apresentar potencial mutagênico nas cinco linhagens de *S. Typhimurium* avaliadas, o extrato induziu efeitos citotóxicos e citostáticos sobre as linhagens HepG2 e FC3H. Por outro lado, o extrato demonstrou atividade tripanocida *in vitro* dose-dependente sobre formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*.

O item 3.2, focado no estudo de produtos sintéticos, consiste em uma proposta de artigo científico, a ser submetido, intitulado “*In vitro and in silico study of mutagenicity, cytotoxicity and pharmacokinetic properties of novel 3-nitro-1,2,4-triazole-based derivatives*”. Neste trabalho, os derivados nitrotriazólicos PCBN 009/17 e PCBN 012/17 foram avaliados em relação ao seu perfil de mutagenicidade em modelo procarioto, e citotoxicidade *in vitro* frente a linhagens hepáticas eucariotas tumorais e normais. Além disso, as propriedades físico-químicas e farmacocinéticas, obtidas através de predição *in silico*, também foram investigadas. As predições indicaram que compostos apresentaram alertas estruturais relacionados ao grupo nitro, sendo previstos como potencialmente mutagênicos, além de serem previstos como hepatotóxicos e como substratos das enzimas CYP450 relacionadas a interações medicamentosas. De acordo com as avaliações *in vitro*, concluímos que ambos os compostos apresentaram potencial mutagênico, entretanto, o PCBN 012/17 exibiu maior intervalo de segurança entre as concentrações mutagênicas, citotóxicas e inibitórias sobre *T. cruzi*.

3.1 Artigo publicado – “*Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Jaboticaba) leaf extract: *in vitro* anti-*Trypanosoma cruzi* activity, toxicity assessment and phenolic-targeted UPLC-MSE metabolomic analysis” – Publicado no periódico “*Journal of Ethnopharmacology*”



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharm

Plinia cauliflora (Mart.) Kausel (Jaboticaba) leaf extract: *In vitro* anti-*Trypanosoma cruzi* activity, toxicity assessment and phenolic-targeted UPLC-MS^E metabolomic analysis

Bárbara Verena Dias Galvão^{a,1}, Carlos Fernando Araujo-Lima^{a,b,c,1},
 Mônica Cristine Pereira dos Santos^{c,1}, Mariana Pulmar Seljan^c,
 Eduardo Kennedy Carrão-Dantas^b, Claudia Alessandra Fortes Aiub^d, Luiz Claudio Cameron^{d,e},
 Mariana Simões Larráz Ferreira^{c,e}, Édira Castello Branco de Andrade Gonçalves^c,
 Israel Felzenszwalb^b

^a Laboratory of Environmental Mutagenesis, Department of Biophysics and Biometry, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil

^b Laboratory of Cell Biology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

^c Laboratory of Bioactive, Nutritional Biochemistry Core, Federal University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^d Genetics and Molecular Biology Department, Federal University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^e Laboratory of Protein Biochemistry, Center of Innovation in Mass Spectrometry, Federal University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Plinia cauliflora
 Polyphenols
 Toxicity
 Antitrypanosomal
Trypanosoma cruzi

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel, known as Brazilian grape or jaboticaba, is widely used in Brazilian traditional medicine to treat infectious and inflammatory disorders. However, several aspects of its biological potential remain unclear, such as toxicity and effects on pathogenic protozoa.

Aim of the study: Investigate the phenolic composition, the *in vitro* and *in silico* toxicity profile, and the anti-*Trypanosoma cruzi* activity of the phenolics-enriched hydromethanolic extract of *P. cauliflora* leaf.

Material and methods: Phytochemical analysis was performed ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS^E). Mutagenicity, genotoxicity and eukaryotic cytotoxicity was evaluated by Ames test, cytokinesis-block micronucleus and colorimetric assays, respectively, alongside with a computational prediction of the major compound's pharmacokinetics and toxicity. Anti-*T. cruzi* activity was investigated on *T. cruzi* bloodstream trypomastigotes.

Results: A total of 14 phenolic compounds were identified, including 11 flavonoids and 2 phenolic acids. No positive response regarding mutagenic potential was detected in *Salmonella* strains TA97, TA98, TA100, TA102, TA104, both in absence or presence of metabolic activation. The extract induced significant dose-response reduction on nuclear division indexes of HepG2 cells, suggesting cytostatic effects, with no micronuclei induction on cytokinesis-block micronucleus assay. Likewise, it also presented cytotoxic effects, inducing HepG2 and F C3H dose and time dependently cell death through cell membrane damage and more evidently by mitochondrial dysfunction. A dose-response curve of *in vitro* trypanocidal activity was observed against *T. cruzi* bloodstream trypomastigotes after 2 and 24 h of exposure. *In silico* predictions of most abundant compounds' structural alerts, pharmacokinetics and toxicity profile indicates a moderately feasible druglikeness profile and low toxicity for them, which is compatible with *in vitro* results.

Conclusions: The present study demonstrated that *P. cauliflora* leaf extract is a potential source of antiparasitic bioactive compounds, however it presents cytotoxic effects in liver cell lines.

* Corresponding author. Laboratory of Environmental Mutagenesis, Department of Biophysics and Biometry, Rio de Janeiro State University, Avenida Boulevard 28 de Setembro, 87 Fundos, 4º Andar, 20551-030, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

E-mail address: biomed.carlos@gmail.com (C.F. Araujo-Lima).

¹ These authors contributed equally to this study.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114217>

Received 15 February 2021; Received in revised form 2 May 2021; Accepted 17 May 2021

Available online 24 May 2021

0378-8741/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Plinia cauliflora (Mart.) Kausel, formerly named *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg (Sobral, 1965), is a Myrtaceae family native fruit tree, commonly known as Brazilian grape or jaboticaba. Ethnopharmacological investigations enabled the discovery of therapeutic properties of the fruit, peel, bark, and seed of *P. cauliflora*, now employed in the development of phytotherapies, nutraceuticals and cosmetics (Wu et al., 2013; Neri-Numa et al., 2018; Iwada et al., 2020).

P. cauliflora leaves are also used in traditional medicine, in the form of decoction, infusions or syrup, for treating inflammatory and infectious disorders such as flu, diarrhea, dysentery, labyrinthitis and bronchitis (Cruz and Kaplan, 2004; Paiva et al., 2017; Agra et al., 2008). Despite popular use since herbal products are often marketed and consumed without proper toxicological assessments, toxicity evaluation is essential to guarantee safe and healthy practices (Eloor, 2014). However, as *P. cauliflora* leaf is under-exploited in scientific studies, compared to other plant parts, its phenolic composition and toxicity profile have not been completely elucidated since few studies focus on these parameters (Gaparotto et al., 2019; Napolini et al., 2016).

Another unclear point about the *P. cauliflora* leaf is its antiparasitic potential, since Myrtaceae family is considered a great source of species traditionally used for the prevention and treatment of infectious diseases (Farias et al., 2020) due to antioxidant and antimicrobial properties (Macedo-Costa et al., 2009; Napolini et al., 2016). In tropical developing countries, parasitic diseases persist as a main public health problem due to limitations in the effectiveness, availability, and accessibility of drugs. In this scenario, medicinal plants have always been an alternative and low-cost treatment, especially for traditional populations (Wink, 2012).

Chagas' disease (CD) is a Neglected Tropical Disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, affecting about 8 million people worldwide (Zingales, 2018). The only drugs currently available for CD chemotherapy, benznidazole (BZ) and nifurtimox, are associated with adverse effects related to a high toxicity profile, and partial efficacy, since there is no satisfactory treatment for chronic CD (Chatelain, 2015; Ribeiro et al., 2020). Thus, the search for safer and more effective therapeutic alternatives is necessary, including the use of medicinal plants as a source of novel compounds (Pisocchi et al., 2016). For CD, the prospect of developing new drugs has led to the screening of almost 400 species belonging to more than 100 plant families for activity against *T. cruzi* over the last 20 years (Izumi et al., 2011).

Among few studies approaching antiparasitic activity of Myrtaceae species, *M. dubia* leaf extract, *P. cauliflora* and *P. cerrocampaensis* leaf essential oils were reported for inhibit *Plasmodium falciparum* and *Leishmania amazonensis* (Correia et al., 2016; Durant et al., 2014; da Silva et al., 2018). Consequently, considering that some drug targets identified for protozoan pathogens are conserved across species (Cowell and Winkler, 2019), it is important to study these species as a potential source of bioactive compounds against other parasites, such as *T. cruzi* (Aguilera et al., 2019). Therefore, this study investigated the *in vitro* cytotoxicity and genotoxicity, phytochemical profile, and anti-*T. cruzi* activity of the phenolic-enriched hydromethanolic extract of *P. cauliflora* leaf (HME), along with an *in silico* prediction of pharmacokinetics and toxicity.

2. Material and Methods

2.1. Plant collection and extract preparation

P. cauliflora leaves were collected on March 2016, at Penedo District, Itatiaia, RJ, Brazil (22°29'46.0"S 44°33'47.9"W). An identified voucher specimen (HUN16408) was deposited at Prof. Jorge Pedro Pereira Carauta Herbarium of Federal University of the State of Rio de Janeiro (HUN) and registered at the National Management System Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge/Brazil (SisGen) under

the register number ABD4204. The leaves were sanitized and dried at 40 °C for 16 h, crushed and stored at room temperature (23–24 °C) and protected from light until used.

The phenolic compounds extraction was conducted as previously described (Napolini et al., 2016). Briefly, the plant material (0.5 g) was added with 10 mL of methanol/water solution (80:20 v/v). The mixture was homogenized with an Ultra-Turrax (T25, Ika, Germany) mixer for 3 min and followed by vortex for 10 min. The homogenized sample was incubated at orbital shaker (60 °C, 240 rpm, 1 h) (TE420, Tecnal, Brazil), centrifuged (3000 ×g, 5 min, 25 °C) (Heraeus Megafuge 16R, Thermo Fisher Scientific Co., Germany) and the supernatant was transferred to a rotary evaporator flask. The steps described were performed twice and the supernatants were combined and dried in rotary evaporator (40 °C). The material was stored in screw-cap amber bottles at –20 °C until further analysis.

2.2. Metabolomics analysis of phenolic compounds by UPLC-ESI-Q-TOF-MS²

The phenolics profiling was performed using ultra-performance liquid chromatography (UPLC) coupled to an electrospray ionization (ESI) quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass spectrometer (MS²). For the analysis, 2 µL of HME were injected in triplicate onto a UPLC Q-TOF-MS/MS system equipped with ESI source (Xevo G2-S QTOF, Waters Corporation, UK) operating in negative ion mode ESI(–) according to Mendes et al. (2019), with slight modifications. Chromatographic separation was carried out on an Acquity UPLC HSS T3 C18 column (100 nm x 2.1 mm, 1.8 µm particle size) at 30 °C, while autosampler were maintained at 8 °C. The flow rate of mobile phases was 0.6 mL/min conducted with two mobile phases consisting of acidified water (0.3% formic acid, v/v) containing 5 mM ammonium formate (solvent A) and acetonitrile containing 0.3% formic acid (solvent B), following the gradient method: 97% A and 3% B (0 min), 50% A and 50% B (6.78 min), 15% A and 85% B (7.36 min), followed by an additional equilibration step 97% A and 3% B (8.51–9.09 min). The capillary and cone voltage were set at 2.0 kV and 30 V, respectively. The desolvation gas (high purity Nitrogen) was set at 600 L/h at 450 °C, the cone gas was set at 50 L/h, and the source temperature at 120 °C. Data were acquired from *m/z* 50 to 1000 with centroid mode, using a multiplexed MS/MS acquisition with alternating low and high energy acquisition (MS²) following a collision energy range from 15 to 55 eV using ultra-high pure Argon (Ar) as a collision gas. Data acquisition was performed by using Masslynx 4.1 (Waters Corporation, UK). Accuracy and reproducibility were determined by infusion of 10 µL/min of lock mass calibrant leucine-enkephalin (Waters Corporation, USA) (*m/z* 554.2615) at 1.0 ng/L in acetonitrile: water (50:50, v/v) acidified (0.1% formic acid, v/v). Scan time for the lock mass was set to 0.3 s, at intervals of 15 s and 3 scans to average with a mass window of ±0.3 Da.

The raw data obtained from UPLC-MS² analysis were processed with Progenesis Q1 v2.1 (Nonlinear Dynamics, Waters Corporation, UK) within the following conditions: all runs, automatic limits, centroid data, resolution full-width at half maximum (FWHM) of 50,000, ionization negative mode, deprotonated molecules [M-H][–]. The untargeted identification of phenolic compounds was performed by MetaScope, an integrated search tool allowing the use of the customized database of phenolic compounds from PubChem. Thus, targeted identification was carried out using PubChem and Phenol Explorer database following the parameters in descending order of importance: precursor exact mass error <5 ppm, fragment tolerance <10 ppm, isotopic similarity (>80%), score (>30) and fragmentation scores. The total ion counting was used to determine the relative abundance and only compounds found in the technical replicates with coefficient of variance (CV) < 30%, using the relative abundance of replicates, were evaluated. Phenolic compounds were considered putatively identified based upon physicochemical properties and spectral similarity with public/commercial spectral libraries according to Metabolomics Standard Initiative guidelines

(Sumner et al., 2007), using the parameters described above.

2.3. In vitro bioactivity screening

2.3.1. Culture conditions of cell lines, bacteria and parasites

HepG2 (human hepatocellular carcinoma) and F C3H (mouse liver fibroblast) cells were maintained in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, GIBCO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 µg/mL streptomycin and 100 µg/mL penicillin, in T25/75 cm² flasks at 37 °C, 95% humidity and 5% CO₂ (Armojo-Lima et al., 2018a). Cells were split each time they reached 80–90% confluence using a solution containing 0.05% trypsin and 0.02% EDTA. Cell counting was performed by trypan blue exclusion using a Neubauer's chamber.

The five histidine-dependent (his⁻) strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (TA97, TA98, TA100, TA102 and TA104) were previously checked for genotype confirmation (Maron and Ames, 1983). For mutagenicity assays, each tester strain was inoculated in 10 mL of Oxoid nutrient broth No. 2 and incubated at 37 °C on an orbital shaker (100 rpm) for 14 h to obtain approximately $1-2 \times 10^8$ cells/mL.

T. cruzi bloodstream trypomastigotes (BT) of the Y strain (DTU II) were obtained from blood samples of infected albino Swiss mice at the parasitemia peak. The purified parasites were re-suspended in RPMI 1640 medium (Roswell Park Memorial Institute, Thermo Fisher Co.) and supplemented with 10% FBS, according to procedures previously described (Meirelles et al., 1986; Armojo-Lima et al., 2018b).

2.3.2. Mutagenicity assay (Salmonella/Microsome)

The mutagenic potential of the HME was determined by the Salmonella/Microsome mutation test (Maron and Ames, 1983; OECD, 2020). The pre-incubation method was performed using five tester strains (TA97, TA98, TA100, TA102 and TA104) in absence and presence of rat liver homogenate metabolic fraction (S9 Mix 4%, Ardox induced, MOLTOX Inc., Boone, NC, USA). HME was diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO, 2%, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) by vortex mixing to prepare a 50 mg/mL stock solution (final concentration: 5000 µg/plate). This solution was diluted to five concentrations (0.05, 0.5, 5, 50 and 500 µg/plate). DMSO was used as negative control. Positive controls without S9 (-S9) were 4-nitroquinoline-N-oxide (4NQO) (10.0 µg/plate) for TA97 and for TA98; sodium azide (SA) (5.0 µg/plate) for TA100; mitomycin-C (MMC) (1.0 µg/plate) for TA102; and methyl methane sulphonate (MMS) (200 µg/plate) for TA104. With S9 (+S9): 2-aminanthracene (2-AA) (100 µg/plate) for TA97, TA98 and TA100 and benzo-a-pyrene (BaP) (50 µg/plate) for TA102 and TA104. All positive controls were purchased from Sigma-Aldrich Corp. Briefly, 100 µL of stationary growth cultures of each strain ($1-2 \times 10^8$ cells/mL) were pre-incubated with 100 µL of HME dilutions and 500 µL of 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) or S9 Mix (4%) at 60 rpm, at 37 °C. After 20 min, 2 mL top agar (0.7% agar, 0.5% NaCl, 0.05 mmol/L histidine and biotin) at 40 °C were added to the test tubes and the final mixtures were poured into Petri's plate containing Vogel-Bonner agar medium E 10x (1.5% agar, 10 g/L MgSO₄·7H₂O; 100 g/L C₆H₁₂O₅·H₂O; 500 g/L K₂HPO₄; 175 g/L Na(NH₄)HPO₄·4H₂O), 2% glucose). These final mixtures were incubated at 37 °C for 72 h. In parallel, bacterial survival assay was performed. After 20 min of pre-incubation the assay mixtures were diluted in 0.9% NaCl (w/v) to a final concentration of $1-2 \times 10^7$ cells/plate and plated on Luria Bertani agar medium (1% tryptone; 0.5% yeast extract; 1% NaCl; 1.5% bacteriological agar). The plates were incubated for 24 h at 37 °C and the results were expressed as the mean number of revertant colonies (His⁺) with standard deviation (SD) for each condition, and mutagenicity index (MI) calculated as the ratio between the number of colonies in the test group and the number of colonies in the solvent control group.

2.3.3. Eukaryotic cytotoxicity

Cell culture media and reagents were purchased from Sigma-Aldrich

Corp. and Thermo Fisher Scientific Co. The water-soluble tetrazolium (Cell Proliferation Kit WST-1, Roche Co., Nutley, NJ, USA) and the lactate dehydrogenase (LDH, Cytotoxicity Detection Kit, Roche Co.) assay kits, were used to determine the cytotoxicity of HME. WST-1 assay is based on the reduction of the salt by mitochondrial dehydrogenases in viable cells, yielding a yellow product that is soluble in the cell culture medium, while LDH assay is based on LDH cytoplasmic enzyme activity, which is rapidly released into the cell culture medium when the plasma membrane is damaged (Peng et al., 2016). HepG2 and F C3H cells were seeded in a 96-well flat-bottomed plate at a density of 1×10^4 cells/well. The cultured cells were exposed to HME (0–500 µL/mL, maximum of 1% DMSO) for 24, 48 and 72 h. Briefly after exposure the culture medium was replaced by 90 µL DMEM and 10 µL WST-1 reagent and incubated for 3 h. The absorbance was then measured using a microplate reader (Polaris, Celer, MG, Brazil) at 440 nm. The absorbance of control wells (DMSO 1%) was designated as 100% viability. Then the lethal concentration (LC₅₀) for 50% of cultured cells was determined by comparisons based on this reference level. For the LDH assay, briefly after treatment, 100 µL supernatant was transferred from each well to a 96-well flat-bottomed plate and 100 µL reaction mixture freshly prepared were added to each well. After incubation (30 min in the dark at 20 °C), the absorbance was measured at 492 nm. Blank values indicating the absorbance of the LDH were subtracted from all samples. The percentage of cytotoxicity was calculated according to the kit protocol. Sterile DMSO 1% was used as negative control and Triton X-100 as the positive control (Pinto et al., 2018).

2.3.4. Cytokinesis-block micronucleus (CBMN) genotoxicity assay

CBMN assay was performed as previously described by Fenech (2007), with few modifications. Cell culture media and reagents were purchased from Sigma-Aldrich Corp. and Thermo Fisher Scientific Co. Fresh HepG2 cells were seeded at a density of $2-3 \times 10^4$ cells/mL in a 24-well plate (1 mL per well). HME was then added to the medium to final concentrations from 1.25 to 100 µL/mL diluted in DMSO, and the incubation continued for 24 h. DMSO (1%) was used as the negative control, and BaP, 0.1 µg/mL was the positive control. To evaluate the frequency of micronuclei (MN) in binucleated cells (BNC), cytochalasin B at 3 µg/mL, final concentration, was added, and the culture was reincubated at standard conditions for 24 h. Then the medium was replaced by a cold methanol-glacial acetic acid (3:1) fixative for 30 min and the cells were then rinsed with distilled water for 2 min and air-dried. The fixed cells were stained with Giemsa 1:20 from a stock solution 0.6% (Merck, HE, Germany) for 60 min, washed with phosphate-buffered saline (PBS) for 5 min and briefly rinsed with distilled water. To determine the Nuclear Division Indexes (NDI) and the number of cells with MN, 1000 BNC cells per well (3000 BNC cells per concentration) were analyzed under a light microscope (L200A, Bioval, SP, Brazil). The percentage of viable cells was evaluated discounting apoptotic and necrotic cells.

2.3.5. Trypanocidal activity assay

T. cruzi BT were incubated at a density of 5×10^6 /mL for 2 and 24 h at 37 °C in RPMI medium in presence or absence of serial dilutions of HME (0–300 µg/mL) and BZ (Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco [LAFEPE], PE, Brazil), up to 100 µM, was used as trypanocidal reference drug control. After incubation, the parasite death rates were determined by light microscopy via direct quantification of the number of live parasites using a Neubauer's chamber, and the EC₅₀ (effective concentration that reduces to 50% the number of parasites) was calculated (De Azmújo et al., 2014). Results were expressed as the percentage of parasite death ± SD.

2.4. Pharmacokinetic and toxicity in silico prediction approaches

The three most abundant compounds detected on UPLC ESI-Q-TOF-MS² analysis [(+)- catechin, digallic acid and hesperidin] were

submitted to *in silico* prediction approaches with the canonical SMILE strings obtained at PubChem website (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). The toxicology predictions were conducted with a modular toxicological predictive QSAR framework algorithm (Lazar *in silico* toxicology, <https://lazar.in-silico.ch/predict>) based on similarity of structural alerts (Munoz et al., 2013). Absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity (ADMET) parameters were predicted

based on similarity using the algorithm pkCSM (<http://bioberix.bioc.cam.ac.uk/pkcsam/prediction>) (Pires et al., 2015). Physicochemical properties, drug-likeness and other pharmacokinetic characteristics were predicted with SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) *in silico* prediction algorithm (Daina et al., 2017). SwissADME drug-likeness prediction is based on the Lipinski' Rule of Five (Lipinski et al., 2012), which states that poor absorption or permeation is more likely when a

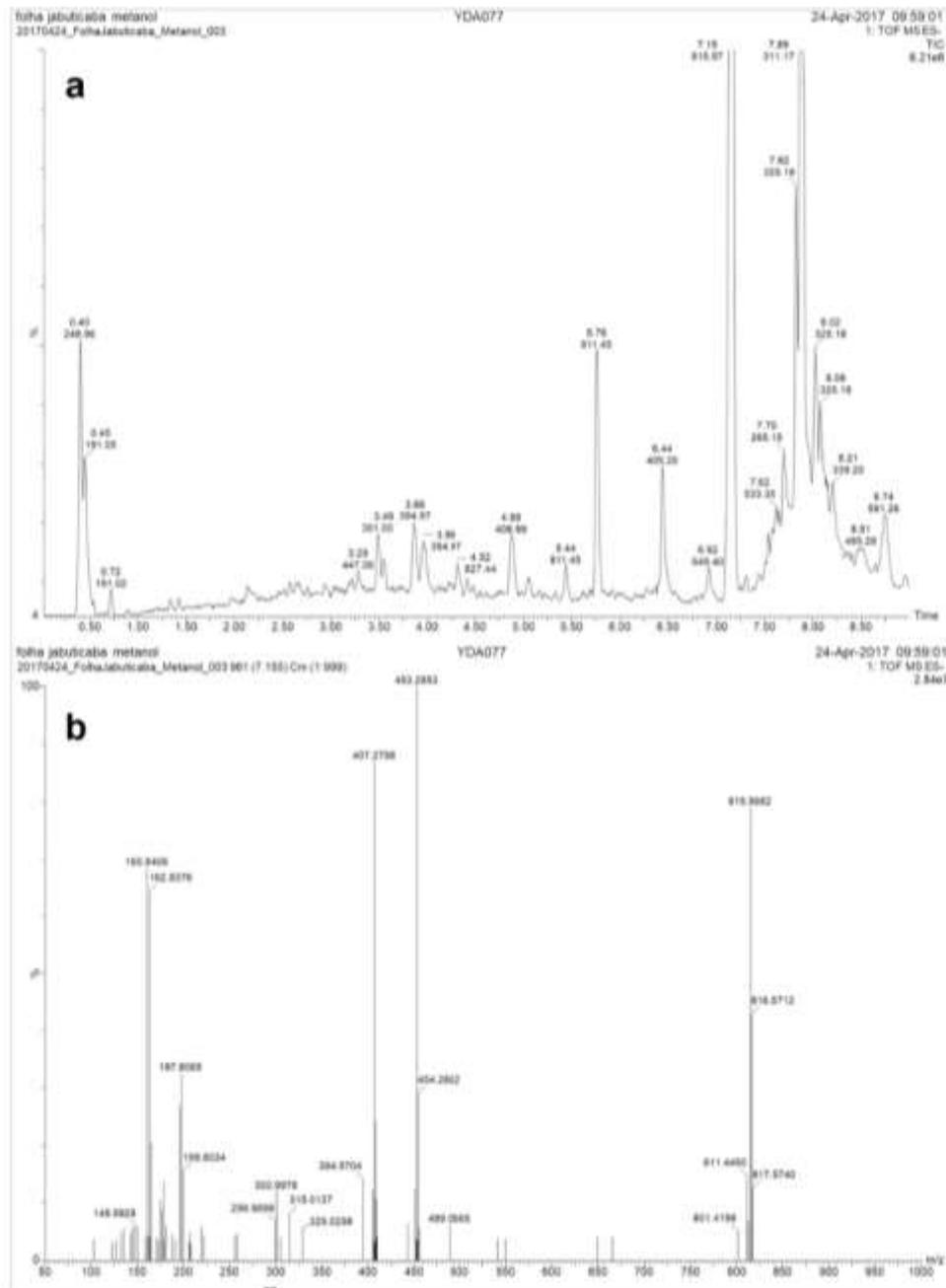


Fig. 1. UPLC-ESI-QTOF-MS² chromatogram (a) and ion spectra (b) of *P. caudiflora* leaf extract (HME).

molecule complies two or more of the following criteria: more than 5 hydrogen H-bond donors (-NH-, -OH); more than 10 H-bond acceptors (-N=, -O-); molecular weight (MW) is greater than 500 Da; and partition coefficient ($\log P_{o/w}$) value is above five.

2.6. Statistical analysis

All assays were performed in triplicate. Metabolomics results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test for comparison of the average between relative ion abundance of phenolic class ($p < 0.05$). Phytochemical statistical analysis was performed using XLSTAT software (Addinsoft, version 2018.2.50452), while other analyses were carried out in GraphPad Prism software (GraphPad Software, version 5.00). *Salmonella*/Microsome test samples were considered mutagenic when MI > 2 and statistical analysis by one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test showed $p < 0.01$, and the samples that presented no cytotoxicity (cell survival $\geq 70\%$ in relation to the negative control) (Araujo-Lima et al., 2018a). For eukaryotic cytotoxicity and CBMN assay, statistical differences between the groups were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's post hoc tests ($p < 0.01$). Trypanocidal results were analyzed by ANOVA and Bonferroni's post hoc tests ($p < 0.01$).

3. Results

3.1. UPLC-QTOF-MS^E metabolomics profile of phenolic compounds

To characterize the phenolic compounds, present in *P. califlora*, a leaf was extracted (HME) and analyzed by UPLC-ESI-QTOF-MS^E (Fig. 1).

A total of 14 phenolic compounds were tentatively identified and comprised as mainly flavonoids (11 compounds), followed by fur by phenolic acids (2 compounds) and other phenolics (1 compound) (Table 1). The tentatively identified flavonoids showed a large variety of chemical structures, with members of six subclasses: flavonols (3 compounds), flavanols (2 compounds), flavanones (3 compounds), flavone, dihydroflavonols and isoflavonoids (1 compound in each class). The HME was composed mainly of three molecules: (+)-catechin (32.4%), digallic acid (27.2%) and hesperidin (24.1%).

Table 1
Phenolic compounds of *P. califlora* leaf extract (HME) identified by UPLC-QTOF-MS^E.

N ^a	Identification	m/z ^b	RT ^c (min)	Molecular Formula	Score	FE ^d	ME ^e	IS ^f	Relative ion abundance (% of total)
Phenolic acids									
C1	Digallic acid	321.0238	3.25	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	37.0	0	-4.44	93.98	20186.40 ± 6363.43 (27.2%)
C2	m-Coumaric acid	163.0404	3.35	C ₉ H ₈ O ₃	49.4	49.9	2.00	99.27	2166.06 ± 195.43 (2.1%)
Flavonoids									
<i>Subclass Flavonols</i>									
C3	Quercetin	301.0341	4.00	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	44.6	32.1	-4.25	95.93	448.77 ± 47.35 (0.4%)
C4	Myricetin	463.0870	3.06	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	53.2	76.4	-2.48	92.56	305.49 ± 17.18 (0.3%)
C5	Myricetin 3'-glucoside	479.0930	2.73	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	39.2	0	-0.21	96.03	366.25 ± 89.33 (0.4%)
C6	Myricetin	317.0288	3.59	C ₁₃ H ₁₄ O ₆	53.8	87.2	-4.67	87.21	121.17 ± 28.24 (0.1%)
<i>Subclass Flavones</i>									
C7	Catechin 5-O-gallate	441.0819	3.51	C ₂₀ H ₁₆ O ₁₀	59.0	98.1	-1.88	99.08	1518.45 ± 425.10 (1.5%)
C8	(+)-Catechin	289.0705	3.62	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	38.0	0	-4.29	95.08	33628.10 ± 6901.57 (32.4%)
<i>Subclass Flavanones</i>									
C9	Luteolin 7'-glucuronide	461.0714	3.84	C ₂₆ H ₂₄ O ₁₂	50.6	68.6	-2.47	87.43	114.55 ± 6.61 (0.1%)
<i>Subclass Flavanols</i>									
C10	Eriodictin	595.1661	2.45	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₅	44.6	29.7	-1.31	94.96	6125.11 ± 1703.06 (5.9%)
C11	Hesperetin	301.0705	3.91	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	38.3	0	-4.12	96.03	2800.55 ± 361.88 (2.7%)
C12	Hesperidin	609.1819	3.92	C ₂₈ H ₂₈ O ₁₆	53.1	79.3	-0.99	87.33	24952.52 ± 6628.16 (24.1%)
<i>Subclass Dihydroflavonols</i>									
C13	Dihydroquercetin 3-O-chamnosoide	449.1079	3.47	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₁	54.5	80.3	-2.20	94.80	162.24 ± 4.98 (0.2%)
Other polyphenols									
C14	Rutin	339.0705	2.98	C ₁₅ H ₁₄ O ₈	42.0	32.5	-4.72	83.13	2808.58 ± 21.86 (2.7%)

^a Experimental mass to charge, m/z.

^b Retention time.

^c Fragmentation score.

^d Mass error.

^e Isotopic similarity. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test for comparison of the average between relative ion abundance of phenolic class ($p < 0.05$).

3.2. Mutagenicity of HME

In relation to the toxicity profile of HME, no mutagenic concentrations were detected in any *S. enterica* strains tested (MI < 2, $p > 0.01$ one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test) regardless of metabolic activation (Table 2).

Positive controls -S9: 4-nitroquinoline-N-oxide (4NQO) (10.0 µg/plate) for TA97, 518 ± 53 revertants, and for TA98, 672 ± 11.3; sodium azide (SA) (5.0 µg/plate) for TA100, 371 ± 117 revertants; mytomicin-C (MMC) (1.0 µg/plate) for TA102, 535 ± 98.1 revertants, and methyl methane sulphonate (MMS) (200 µg/plate) for TA104, 1055 ± 255 revertants. Positive controls + S9: 2-aminoanthracene (2-AA) (100 µg/plate) for TA97 (1081 ± 96), TA98 (771 ± 178) and TA100 (418 ± 58.4) and benzo- α -pyrene (BaP) (50 µg/plate) for TA102 (724 ± 87.2) and TA104 (711 ± 48.8).

Cytotoxicity: cell survival $\leq 70\%$ in relation to the negative control. One-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test ($p < 0.01$).

3.3. Eukaryotic cytotoxicity of HME

In the WST-1 assay, HME induced dose-dependent and time-dependent cytotoxicity to HepG2 cells. The LC₅₀ were 41 ± 3.2 µg/mL at 24 h, 23.3 ± 2.7 µg/mL at 48 h and 1.7 ± 10.7 µg/mL at 72 h (Fig. 2a-c,g). At 24 and 48 h (Fig. 2a and b), cell membrane damage detected by LDH assay was lower than mitochondrial dysfunction detected by WST-1 assay. The LC₅₀ were higher than 500 µg/mL at 24 h, 166.7 ± 6.7 µg/mL at 48 h (Fig. 2g). In contrast, after 72 h (Fig. 2c) of exposure, the difference between cell membrane damage and mitochondrial dysfunction reduced, presenting LC₅₀ 0.93 ± 8.4 µg/mL.

Dose-dependent and time-dependent cytotoxicity was also observed in F C3H cells. In the WST-1 assay, the LC₅₀ values obtained were 2.9 ± 1.4 µg/mL at 24 h, 0.2 ± 1.1 µg/mL at 48 h and 0.1 ± 1.2 µg/mL at 72 h (Fig. 2d-g). Nonetheless, LDH assay did not detect cytotoxicity by cell membrane damage in F C3H cells, regardless the exposure time. The LC₅₀ values obtained for 24, 48 and 72 h were higher than 500 µg/mL.

Table 2
Mean values \pm SD (MI) of revertant colonies (His^+) of *S. enterica* Typhimurium strains in Salmonella/Microsome mutation test after cocultivation with *P. coulflores* leaf extract (HME).

Strain	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	-S9 ^a			+S9 ^b		
		MI ^c	His^+ \pm SD ^d	Survival (%)	MI	His^+ \pm SD	Survival (%)
TA97	0	1.0	216.0 \pm 5.6	100.0	1.0	213.0 \pm 4.2	100.0
	0.05	1.0	230.0 \pm 38.0	100.0	1.0	209.0 \pm 8.1	99.8
	0.5	1.1	227.0 \pm 1.4	99.7	1.0	213.0 \pm 10.3	94.1
	5	1.2	249.0 \pm 4.2	95.3	1.0	221.0 \pm 11.0	100.0
	50	1.2	255.0 \pm 18.4	89.4	1.1	237.0 \pm 11.0	100.0
	500	1.2	256.0 \pm 25.3	79.2	1.2	249.0 \pm 15.1	92.6
TA98	0	1.0	24.0 \pm 5.7	100.0	1.0	33.3 \pm 5.8	100.0
	0.05	1.2	29.3 \pm 4.6	100.0	1.0	32.7 \pm 5.0	100.0
	0.5	1.2	28.3 \pm 5.9	100.0	1.0	34.0 \pm 4.0	100.0
	5	1.4	33.3 \pm 6.1	100.0	0.6	27.0 \pm 1.4	100.0
	50	1.3	36.7 \pm 14.2	100.0	0.7	24.0 \pm 4.0	100.0
	500	1.9	46.0 \pm 1.4	100.0	0.7	22.3 \pm 14.0	100.0
TA100	0	1.0	133.0 \pm 18.4	100.0	1.0	159.0 \pm 29.3	100.0
	0.05	1.2	155.0 \pm 8.1	80.5	1.0	165.0 \pm 15.4	100.0
	0.5	1.2	159.0 \pm 22.9	94.2	1.2	226.0 \pm 40.4	100.0
	5	1.2	160.0 \pm 21.9	82.2	1.2	233.0 \pm 20.0	100.0
	50	1.3	178.0 \pm 5.0	78.2	1.2	223.0 \pm 35.3	100.0
	500	1.3	173.0 \pm 11.8	76.6	1.3	235.0 \pm 48.0	100.0
TA102	0	1.0	188.0 \pm 31.2	100.0	1.0	387.0 \pm 4.4	100.0
	0.05	0.8	157.0 \pm 17.7	100.0	1.0	400.0 \pm 26.3	100.0
	0.5	0.9	171.0 \pm 6.2	100.0	0.9	329.0 \pm 6.6	100.0
	5	0.8	156.0 \pm 8.5	100.0	0.8	351.0 \pm 7.6	99.1
	50	0.8	155.0 \pm 41.9	100.0	0.8	327.0 \pm 38.6	100.0
	500	0.9	178.0 \pm 28.5	100.0	0.8	326.0 \pm 32.6	100.0
TA104	0	1.0	269.0 \pm 4.2	100.0	1.0	567.0 \pm 30.4	100.0
	0.05	1.0	258.0 \pm 14.1	100.0	1.0	560.0 \pm 79.2	86.9
	0.5	1.1	306.0 \pm 2.8	100.0	0.8	445.0 \pm 39.0	86.1
	5	1.1	302.0 \pm 16.3	90.9	0.8	471.0 \pm 40.0	82.8
	50	1.3	347.0 \pm 18.4	100.0	0.8	471.0 \pm 12.7	72.5
	500	1.5	412.0 \pm 19.8	100.0	0.8	472.0 \pm 31.1	74.7

^a -S9: absence of metabolic activation.

^b +S9: presence of metabolic activation.

^c MI: Mutagenicity index.

^d SD: Standard deviation.

3.4. HME micronucleus induction

Fig. 3 shows the results for the CBMN assay using HepG2 cells. After 24 h of exposure to HME, no significant increase in micronucleated cells was observed (Fig. 3a). However, the extract induced significant dose-response reduction on NDI of HepG2 cells (6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $p < 0.05$; 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $p < 0.01$; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $p < 0.001$), which suggests cytotoxic or cytostatic effects (Fig. 3b), corroborating with the results from cytotoxicity assays.

3.5. HME activity against *T. cruzi*

HME exhibited significant *in vitro* trypanocidal activity against the BT form of *T. cruzi*, causing parasites death with EC_{50} at 2 and 24 h of 9.94 \pm 2.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 6.84 \pm 2.54 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively (Fig. 4). BZ exhibited an EC_{50} at 24 h of about 3.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. It is possible to observe a dose-response behavior of HME, by non-linear regression (Q-curves) with $r^2 = 0.99$.

3.6. *In silico* prediction of pharmacokinetics and toxicity

Some of physicochemical properties of the most abundant phenolic compounds present in the composition of HME is showed on Table 3. In addition to the molecular properties, such as the MW, the presence of Cap3 and the contact surface of each molecule, we can also observe

aspects of water solubility, lipophilicity, and drug-likeness characteristics, such as respect for Lipinski's rules (Lipinski et al., 2012) and the Abbot's bioavailability score (Martin, 2005). In addition, the algorithm provides structural alerts for substances with promiscuous substrate behavior (PAINS) and substances with poor pharmacokinetic properties, toxicity, and metabolic instability (Brenk), as well as a lead compound profile (lead-likeness) and accessibility for synthesis, as medicinal chemistry parameters. According to prediction, (+)- catechin respects all of Lipinski's rules, has a good bioavailability, and is considered a lead compound, even with structural alert identification (catechol) both in PAINS and Brenk. Digallic acid was also predicted as a possible lead compound but it violates one of the five Lipinski's rules and presents two structural alerts (catechol and phenol ester) in PAINS and Brenk. Hesperidin broke three rules of Lipinski and is not predicted as a lead compound, mainly because of its MW, structural complexity and lower synthetic accessibility.

Pharmacokinetic predictions of (+)- catechin (Table S1) reveals that the compound is a substrate to P-Glycoprotein and is not permeable to blood-brain barrier (BBB) and central nervous system (CNS). Moreover, apparently this flavanol is not affected by cytochrome P450 (CYP) metabolism. Corroborating our experimental data, the toxicity prediction, among other outcomes, pointed no evidence of mutagenicity and hepatotoxicity for (+)- catechin.

Similarly, the *in silico* analysis of digallic acid showed controversial data on whether the compound is a P-Glycoprotein substrate or not.

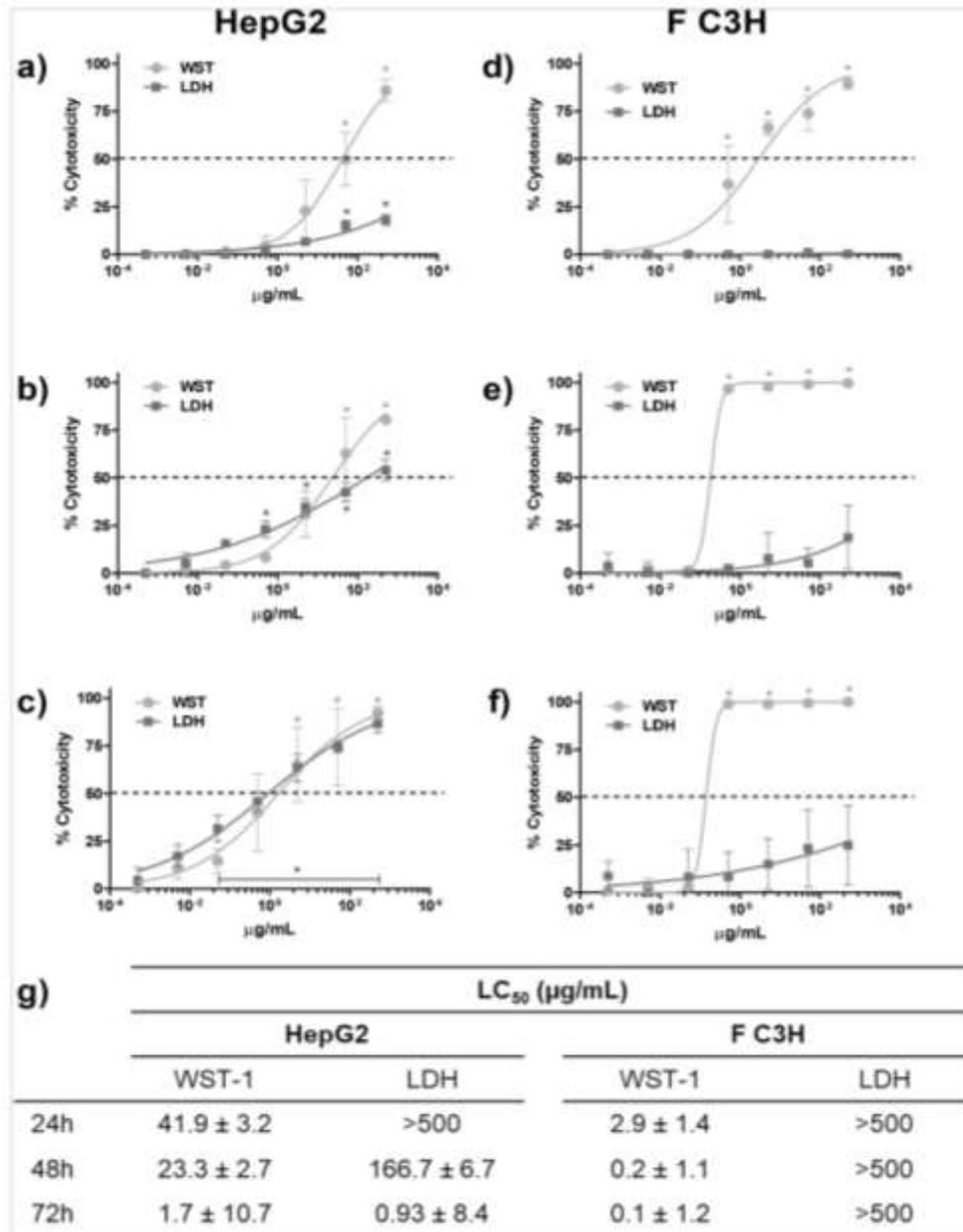


Fig. 2. Eukaryotic cytotoxicity of *P. esculiflora* leaf extract (HME). HepG2 (left) and F C3H (right) cells were incubated with the extract during (a,d) 24 h, (b,e) 48 h and (c,f) 72 h. After exposure, cell membrane damage (LDH assay) and mitochondrial function (WST-1 assay) were measured. The lethal concentration of 50% of cell population (LC₅₀) values (g) were calculated by nonlinear regression fit of dose-response (agonist behavior) curves with R² = 0.99, n = 3; *one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test (p < 0.01).

Besides that, it is predicted as a low gastrointestinal (GI) absorbed compound and not able to cross the BBB nor to be bioavailable on CNS. Digallic acid also is not affected by any CYP isoform on prediction (Table S3). Once again, this phenolic acid is not predicted as mutagenic or carcinogenic, and hepatotoxic compound in both used toxicity

algorithms (Table S4).

The last compound submitted to computational prediction was hesperidin. Its pharmacokinetic properties are available on Table S5. This flavanone is predicted as a bad absorbed compound with low bioavailability and without influence or effect by hepatic metabolism of

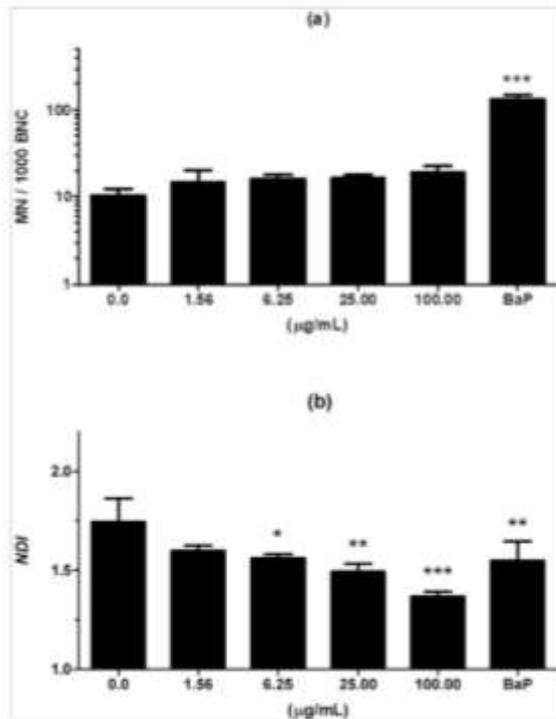


Fig. 3. *P. coulflorea* leaf extract (HME) micronuclei induction in HepG2 cells. After 24 h of exposure, although there was no significant increase in micronucleated (MN) cells (a), the extract reduced the Nuclear Division Indexes (NDI) (b) of HepG2 lineage, indicating cytotoxic or cytostatic effects. BNC: binucleated cells. BaP: benzo-a-pyrene. 3000 cells were scored per treatment for each experiment (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 versus negative control; n = 3 in triplicate; one-way ANOVA followed by a Tukey's post hoc test).

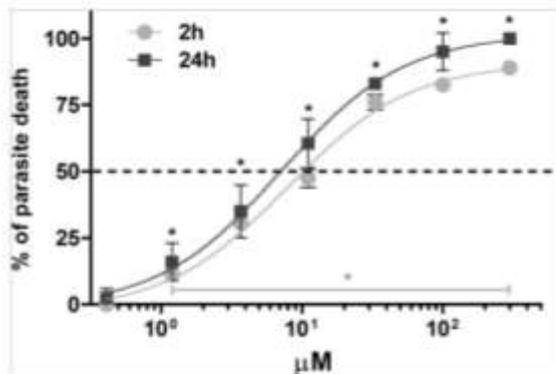


Fig. 4. Dose-response curves of *in vitro* trypanocidal activity of *P. coulflorea* leaf extract (HME) against *T. cruzi* bloodstream trypomastigotes (Y strain, DTU II) after 2 (EC₅₀ = 9.94 ± 2.25 µg/mL) and 24 h and (EC₅₀ = 6.84 ± 2.54 µg/mL) of exposure. The EC₅₀ (50% effective) values were calculated by nonlinear regression fit of dose-response (agonist behavior) curves with R² = 0.99. Results shown as mean ± SD of 3 independent experiments performed in triplicate. *One-way ANOVA and Bonferroni's post hoc tests (p < 0.01).

Table 3
Physicochemical properties of the most abundant compounds ((+)-catechin, digallic acid and hesperidin) present in *P. coulflorea* leaf extract (HME).

Property	(+)-Catechin	Digallic Acid	Hesperidin
Molecule properties			
Formula	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	C ₁₄ H ₁₀ O ₉	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅
Molecular weight	290.27 g/mol	322.22 g/mol	610.56 g/mol
Number heavy atoms	21	23	43
Number of aromatic heavy atoms	12	12	12
Fraction C _{sp} ²	0.20	0.00	0.54
Number of rotatable bonds	1	4	7
Number of H-bond acceptors	6	9	15
Number of H-bond donors	5	6	8
Molar Refractivity	74.33	74.92	141.41
TPSA ^a	110.38 Å ²	164.75 Å ²	234.29 Å ²
Lipophilicity			
Log P _{ow} ^b	0.4 ^b	1.1 ^b	-1.3 ^b
Water Solubility			
Consensus LogS	-2.2	-2.617	-2.73
Drug-likeness			
Lipinski	Yes; 0 violation	Yes; 1 violation: NH ₂ OH ^c >5	3 violations: MW>500, NH ₂ O ^d >10, NH ₂ OH ^e >5
Bioavailability	0.55	0.11	0.17
Toxicity			
Medicinal Chemistry			
PAINS ^f	1 alert: catechol_A	1 alert: catechol_A	0 alert
Besik	1 alert: catechol	2 alerts: catechol, phenol_ester	0 alert
Lead-likeness			
Lead-likeness	Yes	Yes	No; 1 violation: MW > 350
Synthetic accessibility			
Synthetic accessibility	3.50	2.45	6.34

^a TPSA: topological polar surface area.

^b PubChem data.

^c MW: molecular weight.

^d NH₂O: nitrogen or oxygen H-bond acceptor; NH₂OH: nitrogen-hydrogen or oxygen-nitrogen H-bond donors.

^e PAINS: pan-assay interference compounds.

cytochromes P. Anew, its toxicity analysis suggests the compound as non-mutagenic, non-carcinogenic and non-hepatotoxic (Table S6).

Summarizing some pharmacokinetic predictions of physicochemical properties (lipophilicity, size, polarity, solubility, saturation, and flexibility) of the compounds, bioavailability radar charts of the three most abundant compounds on HME show that, in accordance with the other pharmacokinetic predictions, (+)-catechin (Fig. 5a) presented the best profile, with the plots inside the optimal range of properties (pink area), except for insaturations. Digallic acid (Fig. 5b) presented intermediate bioavailability, followed by hesperidin (Fig. 5c), that presented high polarity and MW higher than 500 g/mol. Lastly, Fig. 5d shows a Boiled-Egg graph of gastrointestinal absorption and bioavailability on CNS through BBB permeability, in function of Log P_{ow} and topological polar surface area (TPSA). (+)-Catechin was predicted as actively effluxed by P-Glycoprotein (PGP+) whereas digallic acid was predicted as non-substrate of P-gp (PGP-), not absorbed and not brain penetrating (outside the Egg). Hesperidin (out of the range of the plot) was predicted as not absorbed and not BBB permeable.

4. Discussion

A previous study about phenolic compounds in *P. coulflorea* leaf pointed for a similar phenolic content, measured with Folin-Ciocalteu

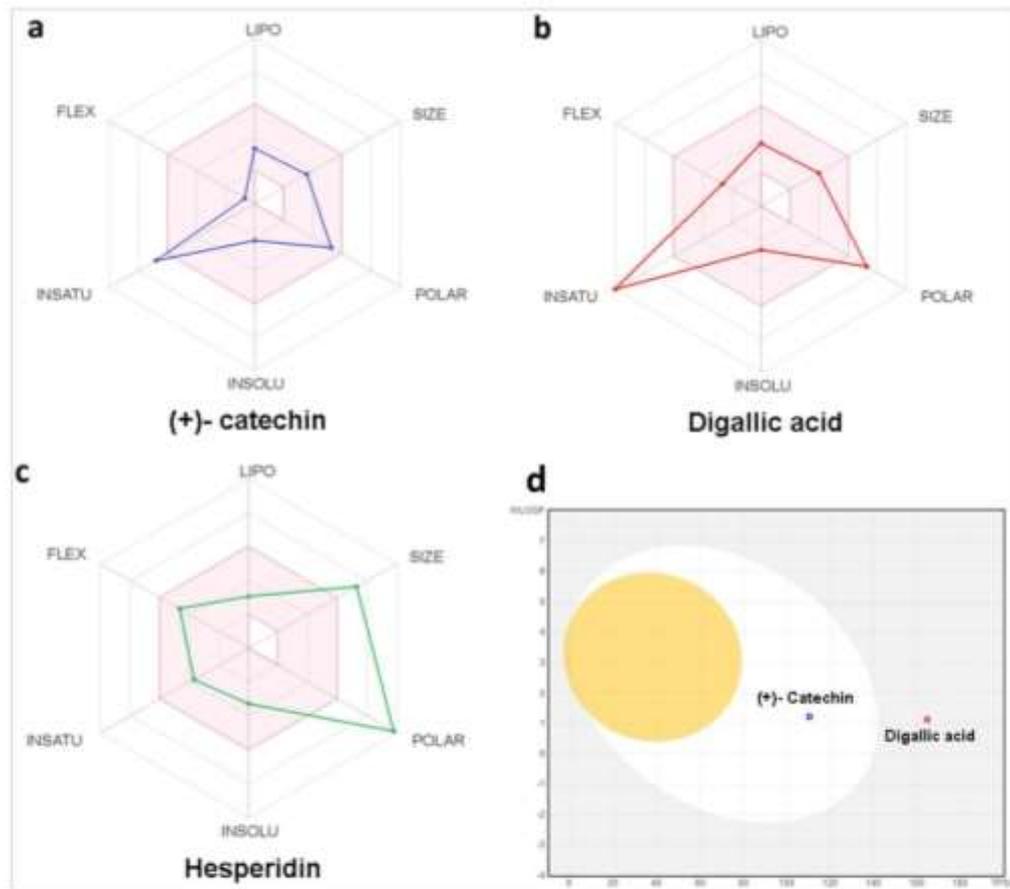


Fig. 5. SwissADME prediction of bioavailability and distribution for the most abundant compounds of *P. cauliflora* leaf extract (HME). Bioavailability radars of physicochemical properties are presented in a) (+)-catechin, b) digallic acid and c) hesperidin. The pink area represents the optimal range for each property: lipophilicity (LIPO), size (SIZE), polarity (POLAR), solubility (INSOLU), saturation (INSATU) and flexibility (FLEX). A Boiled-Egg prediction of gastrointestinal absorption and brain penetration is shown in (d). The white region represents high probability of passive absorption by the gastrointestinal tract (HIA) and the yellow region represents high probability of blood-brain barrier (BBB) penetration. (+)-Catechin (blue dot) was predicted as actively effluxed by P-gp (PGP+) whereas digallic acid (red dot) was predicted as non-substrate of P-gp (PGP-), not absorbed and not brain penetrant (outside the Egg). Hesperidin (out of the range of the plot) was predicted as not absorbed and not BBB permeable (TPSA 234.29 Å, Log P_{ow} -1.1). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

reagent, but a higher antioxidant capacity of the hydromethanolic extract in comparison with the hydroethanolic one (Naspolini et al., 2016). This behavior is possibly explained by the very distinct phenolic profile presented by these extracts. However, a more complete characterization of phenolic compounds was necessary to better understand the potential of this vegetable matrix (Vazzakas et al., 2016). When compared to the phenolic profile described on *P. cauliflora* grape (Donado-Pestana et al., 2018; Inada et al., 2020; Neves et al., 2018), the phenolics in the leaf show some similar molecules with special emphasis on quercetin and its derivatives, ellagic acid and gallic acid. *P. cauliflora*'s leaf also presented flavonols, especially found in peel and seed (Inada et al., 2020). However, the ellagic acid in the fruit is mainly present in the form of its derivatives, which were not detected in the leaves. On the other hand, HME showed a distinguished profile especially due to the presence of flavonones compounds.

Genotoxicity screening is an essential stage of the preclinical evaluation of herbal extracts (Sponchiado et al., 2016). In the *Salmonella*/Microsome assay, HME did not induce mutagenic effects at the analyzed concentrations, likewise, it did not induce the formation of MN in

HepG2 cells, despite presenting phenolic compounds considered mutagenic to TA98 and TA100 when incubated separately, such as quercetin and m-coumaric acid (Resende et al., 2012). The genotoxicity of these flavonoids may be inhibited by accompanying compounds with chemoprotective properties, such as hesperidin (Ahmadi and Staudboerstein, 2016; Calomme et al., 1996), possibly acting antigenotoxic agents, through the modulation of redox status, scavenging of free radicals and activation of antioxidant cell machinery in eukaryotic organisms (Araujo-Lima et al., 2019; Peng et al., 2016; Batista et al., 2016; Roberto et al., 2016). In fact, most studies focus on the antigenotoxic effects of *P. cauliflora*. To our knowledge, there is no available data on the genotoxic potential of the *P. cauliflora* leaf so far. A fruit peel ethanolic fraction toxicological investigation evaluated mutagenic potential on TA98 and TA100, and genotoxic effects using MN and comet assays, but did not present any positive results (Palozzi et al., 2020).

Eukaryotic cytotoxicity was assessed in F C3H and HepG2 cell lines to compare the behavior of cancerous and healthy liver cells exposed to HME. In both WST-1 and LDH assays, HepG2 cells presented not only dose-response behavior, but also responded time-dependently to the

exposure to HME, which means that the extract possibly presents a good druggability profile, even though it is a complex mixture, as are the natural products. Besides that, HepG2 has a capacity to detect hepatotoxicity of 90% compared to a primary hepatocyte culture (Gereys et al., 2012). In contrast, in WST-1 assay, HME inhibited FC3H proliferation in lower concentrations, suggesting a higher sensitivity to mitochondrial dysfunction damage than HepG2 cells. LDH assay did not detect cytotoxicity in FC3H cells, regardless the exposure time, although in HepG2 cells it was more sensitive to detect cell membrane damages in higher exposure times.

The evidence of mitochondrial dysfunction even in the shortest time of exposure followed by the maintenance of membrane integrity suggests that HME may induce cell death by apoptosis. The role of cell death regulatory proteins (Bcl-2, Bcl-xL, Bid and survivin) on HSC-3 oral cancer cells death induction by *P. cauliflora* seeds aqueous extract was earlier investigated (Wang et al., 2014). The extract induced anti-proliferative effect and apoptosis by downregulation of survivin. HME time and dose-dependent cytotoxicity on HepG2 cells, is possibly related to its ability to induce cytostatic effects by reducing NDI in CBMN assay. HepG2, a liver cancer cell line, is also used as a model for the identification of antitumor compounds (Ye et al., 2019), and data corroborate with the antiproliferative properties of *Plinia* species on cancer cell lineages (Wu et al., 2013).

Toxicoinformatics can be considered relevant tools to predict toxicological and toxicokinetic properties for drug development, providing reliable data quickly, conveniently, and free of charge. The *in silico* analyses of the physicochemical, pharmacokinetic and toxicity properties of the most abundant compounds in HME, responsible for almost 90% of the phenolic content identified by UPLC-QTOF-MS², showed that among them, the one with the best physicochemical properties and "drug lead-likeness" profile was (+)-catechin, which is following Lipinski's rules. Digallic acid and hesperidin, both disregarded at least one Lipinski rule and alerts of toxicity and metabolic instability were detected in their structures. In addition, all 3 compounds were predicted to be non-mutagenic, non-carcinogenic and non-hepatotoxic, corroborating the results obtained by us on the wet bench (*in vitro* assays) for the toxicity assessments of HME. Other authors have also used *in silico* and *in vitro* tools to predict the toxicological and pharmacokinetic properties of components abundant in plant extracts with trypanocidal activity (Sepúlveda-Roldán et al., 2019).

The main finding of this study was the HME trypanocidal activity on *T. cruzi* BT forms. Traditionally, *P. cauliflora* leaves are used for the treatment of infectious diseases as flu, diarrhea, dysentery, labyrinthitis and bronchitis (Cruz and Kaplan, 2004; Paiva et al., 2017; Agra et al., 2000). Recently, the first report on the *L. amazonensis* antiparasitic activity of *P. cauliflora* leaf essential oils was described (da Silva et al., 2010). Our results corroborate with the antiparasitic potential of *P. cauliflora* leaf, since HME showed a significant reduction of BT of *T. cruzi* Y strain (DTU II), in low and non-cytotoxic concentrations. The Y strain is considered partially resistant to BZ treatment (Földes and Bencs, 1987), supporting the hypothesis that HME may be used as a safer alternative treatment for CD, including in cases caused by resistant strains.

Other Myrtaceae species presented promising antiparasitic effects. *P. corracampensis* leaf essential oil inhibited *P. falciparum*, showing a high anti-malarial activity and synergistic interaction with chloroquine (Dunst et al., 2014). The dichloromethanolic leaf extract of *M. dubia*, applied in Peruvian traditional medicine to treat malaria was reported for inhibit *P. falciparum* and *L. amazonensis* (Coccoris et al., 2016; do Carmo et al., 2020). Eugenol, a secondary metabolite founded in clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil was active against flagellated forms of *T. cruzi*, being more active against trypomastigote forms than the epimastigotes. Corroborating to this, the ultrastructural analysis of clove essential oil exposed trypomastigotes and epimastigotes through electron microscopy showed swelling of parasite body, followed by nuclear and kinetoplast shrinkage (Santoro et al., 2007).

HME anti-*T. cruzi* activity may also be attributed to the presence of several active components including phenolic compounds, frequently related to antioxidant, antimicrobial and antiparasitic properties of the leaf, bark, and fruit extracts from *P. cauliflora*. Some compounds can complex with membrane lipids, polypeptides, extracellular and soluble proteins, and enzymes, leading to inactivation and function loss. Lipophilic flavonoids may also be able to disrupt microbial membranes (Cosmi, 1999; Silva and Fernandes Júnior, 2010). It was found that flavonoids, besides altering the mitochondrial DNA arrangement, also inhibit enzymes involved in polyamine biosynthesis, essential for parasite growth and differentiation (Cruz et al., 2013). Flavonoids are active against trypanosomatids, presenting leishmanicidal action on *L. peruviana*, *L. braziliensis*, and *L. infantum* (Murin et al., 2009; Rautava-Marcias et al., 2012). Mitru et al. (2000) proposed the mechanism of action of flavonoids on *Leishmania* species, concluding that it involved parasite apoptosis by inducing kinetoplast cleavage.

Furthermore, some natural products act interfering with the redox balance of the parasites, acting either on the respiratory chain or on the cell defenses against oxidative stress (Ruberson et al., 2016; Souza et al., 2010). In agreement, it was observed that the treatment of *L. amazonensis* with quercetin increases ROS production, promotes mitochondrial dysfunction in the parasite and inhibits cell growth (Ponsen-Silva et al., 2011). Quercetin also showed an inhibitory effect on *T. brucei*, the African trypanosomiasis etiological agent (de Souza et al., 2017). Bioassay-guided fractionation is an important tool for the isolation of most active compounds (Ebdoua et al., 2017), helping to elucidate their mechanism of action. Tomazini et al. (2009) isolated pyrano chalcones and a flavone which were able to completely inhibit the enzymatic activity of the protein glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) of *T. cruzi* BT at 100 µg/mL. According to the authors, highly oxygenated flavones appear to possess the structural requirements for inhibiting trypanosomal GAPDH.

Finally, *P. cauliflora* also presents cardioprotective properties (Romão et al., 2019), an interesting characteristic to be investigated in a potential candidate for the treatment of chronic chagasic cardiomyopathy (CCC). Resveratrol is an interesting example of the application of polyphenols in the treatment of CCC. Vilas-Pereira et al. (2016) demonstrated the antioxidant and cardioprotective activity of resveratrol, which was active in the chronic phase of CD by non-trypanocidal mechanisms, reducing cardiophysiological dysfunction and improving heart function in mice. An ideal candidate for CD treatment, should also be active on other evolutionary phases of *T. cruzi*, specially on intracellular amastigotes, considered the most consistent indicator of *in vivo* activity (Croft, 1986). These are important unclear points to be investigated in future studies, since trypanocidal activity may vary due to the protozoan biological complexity (Zingales, 2018).

5. Conclusion

P. cauliflora leaf contains many phenolic compounds firstly described in this work, mostly flavonoids, with known positive effects for human health, supporting its ethnopharmacological use. HME exhibited negative results concerning genotoxicity, induced low cytotoxicity in healthy and cancerous liver cell lines and MN results indicate a possible anti-proliferative effect on HepG2 cells. Besides that, this is the first report of HME inhibitory properties against *T. cruzi* BT (Y strain) in non-cytotoxic or genotoxic concentrations, revealing an innovative source of natural and affordable antiparasitic compounds.

Authors' contribution

CFA-L, MSLF, ECBAG and IF supervised the project. IF, CFA, CFA-L, and ECBAG designed the experiments. CFA-L, BVDG, MCPS and ECBAG firstly wrote the manuscript, with contributions from all authors. IF and MSLF revised and final edited the manuscript. Plant collection and

extraction experiments were performed by MCPS, MPS and ECBAG. UPLC-ESI-Q-TOF-MS² data acquisition and data processing were conducted by MCPS, LOC and MSLF. Mutagenicity, Eukaryotic cell viability, Micronuclei assay in cell cultures assays were conducted by BVDG, EKCD, CAFA and CFA-L. Trypanocidal efficacy assays were conducted by CFA-L. *In silico* predictions were performed by BVDG and CFA-L. All authors critically revised the manuscript and gave their final approval.

Declaration of competing interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors thank to Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) and the Cell Biology Lab crew, headed by Dr Maria de Nazaré Soeiro by the support on trypanocidal analysis and Milena Cristina Barros Santos (UNIRIO) for the support on UPLC-MS² acquisitions. The authors would like to thank the financial support by Coordination of Superior Level Staff Improvement (CAPES) (Code 0001); The Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ), awards: E-26/202.759/2017 (IF), E-26/010.100958/2018 (MSLF), E-26/202/709-2018 (MSLF), E-26/010.002119/2019 (CFA-L and IF), E-26/010.100956/2018 (CFA-L); and The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), awards: 310343/2019-4 (MSLF), 302345/2017-5 (IF).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114217>.

References

- Agra, M. de F., Silva, K.N., Basilio, J.J.L.D., Freitas, P.F. de, Barbosa-Filho, J.M., 2006. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 16, 472–508. <https://doi.org/10.1590/s0102-69532006000300023>.
- Aguilera, E., Alvarez, G., Cercoletto, H., Gonzalez, M., 2019. Polypharmacology in the treatment of chagasic disease. *Curr. Med. Chem.* 26, 4476–4489. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180410101725>.
- Ahmedi, A., Shafiqul-Allah, A., 2016. Oxidative stress and cancer: the role of hesperidin, a citrus natural flavonoid, as a cancer chemoprotective agent. *Nutr. Case. Rep.* 29–39. <https://doi.org/10.1001/014035581.2015.1678822>.
- Araujo-Lima, C.F., Fernandes, A.S., Gomes, E.M., Oliveira, L.L., Matoso, A.F., Antunes, R., Wilhelms, A.E., Aisb, C.A.F., Felzenszwalb, I., 2018a. Antioxidant activity and genotoxic assessment of crabwood (*Azadirachta indica*, *Copaiba guianensis* Aublet) seed oils. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/3246718>, 2018.
- Araujo-Lima, C.F., Perez, R.B., Silva, P.B., Batista, M.M., Aisb, C.A.F., Felzenszwalb, I., Soeiro, M.N.C., 2018b. Repurposing strategy of atorvastatin against *Trypanosoma cruzi* in vitro monotherapy and combined therapy with benznidazole exhibit synergistic trypanocidal activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62, e00979. <https://doi.org/10.1128/AAC.00979-18>, 18.
- Batista, A.G., Ferrazi, A.S., da Cunha, D.C., da Silva, J.K., Cazacin, C.B.E., Correa, L.C., Prado, M.A., Carvalho-Silva, L.B., de Esteves, E.A., Mantierra Júnior, M.R., 2016. Polyphenols, antioxidants, and antimutagenic effects of *Copaifera langsdorffii* fruit. *Food Chem.* 197, 1153–1159. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.093>.
- Calomme, M., Pieters, L., Vlietinck, A., Berghe, D., 1996. Inhibition of bacterial mutagenesis by citrus flavonoids. *Planta Med.* 62, 222–226. <https://doi.org/10.1055/s-2006-95386-4>.
- Clatvalde, E., 2013. Chagas disease drug discovery: toward a new era. *J. Biomol. Screen.* 20, 22–35. <https://doi.org/10.1177/1087057113505085>.
- Correia, V.C. de S., Lima, N.D., Oliveira, F.A. de S., Santos, A.P. dos, de A., Teles, C.B.G., Oliveira Júnior, W.P., 2016. Evolution of the antiplasmodial and leishmanicidal potential of *Myrciaria dubia* (Myrtaceae) extract. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 49, 506–502. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0227-2016>.
- Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 564.
- Cowell, A.N., Winzeles, E.A., 2019. Advances in omics-based methods to identify novel targets for malaria and other parasitic protozoan infections. *Genome Med.* 11, 63. <https://doi.org/10.1186/s13073-019-0673-2>.
- Croft, S.L., 1966. *In vivo* screens in the experimental chemotherapy of leishmaniasis and trypanosomiasis. *Parasitol. Today* 2, 64–69. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(86\)90157-2](https://doi.org/10.1016/0169-4758(86)90157-2).
- Cruz, A.V. de M., Espírito, M.A.C., 2004. Uma medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. *Floresta E Ambiente* 11, 47–52.
- Cruz, E. de M., da Silva, E.R., Maquias, C. de C., Alves, E.S.S., Lorenz, J.F., Reis, M.R.G., Toledo, C.E.M. de, Cruz, F.G., Vianini-Santos, M.A., 2013. Leishmanicidal activity of *Crotophaga pachystachya* flavonoids: arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement. *Phytochemistry* 99, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.01.014>.
- da Silva, V.P., Alves, C.C.F., Miranda, M.L.D., Bretanha, L.C., Bulhões, M.P., Miche, G.A., Silveira, E.V., Martins, C.H.G., Ambrósio, M.A.L.V., de Souza Silva, T., Tavares, D.C., Magalhães, L.G., Silva, F.G., Egan, M.B., 2018. Chemical composition and *in vitro* leishmanicidal, antibacterial and cytotoxic activities of essential oils of the Myrtaceae family occurring in the Cerrado biome. *Inf. Crop. Prod.* 123, 638–645. <https://doi.org/10.1016/j.incrop.2018.07.033>.
- Daina, A., Michielin, O., Zoete, V., 2017. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* 7, 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.
- De Araújo, J.S., Da Silva, C.F., Batista, D.G.J., Da Silva, P.B., Meurer, M.B., Aisb, C.A.F., da Silva, M.F.V., Araújo-Lima, C.F., Saxejee, M., Faridat, A.A., Stephens, C.E., Komar, A., Boykin, D.W., Soeiro, M.N.C., 2014. *In vitro* and *in vivo* studies of the biological activity of novel arylimidazoles against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 4191–4195. <https://doi.org/10.1128/AAC.01403-13>.
- de Souza, C.E.S., da Silva, A.R.P., Gomez, M.C.V., Rolón, M., Coroadó, C., da Costa, J.G. M., Souza, A.E., Rolim, L.A., de Souza, F.H.S., Castilho, H.D.M., 2017. Anti-*Trypanosoma*, anti-*Leishmania* and cytotoxic activities of natural products from *Passiflora lewisiana* Mart. ex DC. and *Passiflora guajana* var. *Pomifera* analysed by LC-MS. *Acta Trop.* 176, 380–384. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.009>.
- de Carmo, M.A.V., Fidélio, M., Sanchez, C.A., Castro, A.P., Camps, I., Colombo, F.A., Marques, M.J., Myuda, T., Grazzino, D., Azevedo, L., 2020. Cassu-camu (*Myrciaria dubia*) seeds as a novel source of bioactive compounds with promising antimalarial and antischistosomicidal properties. *Food Res. Int.* 136, 109334. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109334>.
- Donado-Pestana, C.M., Moura, M.H.C. de, Araújo, R.L., de Lima Santiago, G., de Moraes Barros, H.R., Genovesi, M.I., 2018. Polyphenols from Brazilian native Myrtaceae fruits and their potential health benefits against obesity and its associated complications. *Curr. Opin. Food Sci.* 19, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.01.001>.
- Durant, A.A., Rodrigues, C., Herrera, L., Almanza, A., Santosa, A.I., Spaldadura, C., Gupta, M.P., 2014. Anti-malarial activity and HS-SPME-QC-MS chemical profiling of *Plinia corcovatensis* leaf essential oil. *Malar. J.* 13, 10. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-10>.
- Ehblom, G.U., Igoli, J.O., Katosola, E., Donachie, A.-M., Ess, A., Gray, A.I., de Koning, H.P., 2017. Bioassay-guided isolation of active principles from Nigerian medicinal plants identifies new trypanocides with low toxicity and no cross-resistance to diamidines and azecimils. *J. Ethnopharmacol.* 202, 356–364. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.03.028>.
- Elou, M., 2014. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front. Pharmacol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00177>.
- Farias, D. de P., Nori-Neuma, I.A., de Araújo, F.F., Pastore, G.M., 2020. A critical review of some fruit trees from the Myrtaceae family as promising sources for food applications with functional claims. *Food Chem.* 306, 125630. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125630>.
- Fenech, M., 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.* 2, 1094–1104. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>.
- Filardi, L.S., Bremer, Z., 1967. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 61, 755–759. [https://doi.org/10.1016/0025-2999\(67\)90030-4](https://doi.org/10.1016/0025-2999(67)90030-4).
- Fonseca-Silva, F., Inácio, J.D.F., Canto-Cavallheiro, M.M., Almeida-Amaral, E.E., 2011. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to roscotin induced death in *Leishmania amazonensis*. *Biol One* 6, e14666. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014666>.
- Gonçalves Jr., A., de Souza, P., Lóvero, F.A., dos, R., 2019. *Plinia coulflova* (Mart.) Eausel: a comprehensive ethnopharmacological review of a genuinely Brazilian species. *J. Ethnopharmacol.* 245, 112169. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112169>.
- Gerwe, H.H.J., Timm, E., Gerin, B., Chastoux, H., Depaichin, B.O., Dhalluin, S., Attienar, F.A., 2012. Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxicity. *Cell Biol. Toxicol.* 28, 69–87. <https://doi.org/10.1007/s10565-011-9208-4>.
- Inafo, K.O.P., Nunes, S., Martinez-Blanquez, J.A., Tomás-Barberán, F.A., Ferrone, D., Monteiro, M., 2020. Effect of high hydrostatic pressure and drying methods on phenolic compounds profile of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel and seed. *Food Chem.* 309, 125794. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125794>.
- Inami, E., Ueda-Nakanuma, T., Dias Filho, B.P., Veiga Júnior, V.F., Nakanuma, C.V., 2011. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. *Nat. Prod. Rep.* 28, 809. <https://doi.org/10.1039/c1np00066a>.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J., 2012. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019>.
- Macêdo-Costa, M.R., Diniz, D.N., Carvalho, C.M., Pereira, M. do S.V., Pereira, J.V., Higino, J.S., 2009. Eficácia do extrato de *Myrciaria coulflova* (Mart.) O. Berg. (jaboticaba) sobre bactérias orais. *Rev. Bras. Farmacogn.* 19, 565–571. <https://doi.org/10.1590/S0102-69532009000400010>.

- Marín, C., Boutealeb-Charki, S., Díaz, J.G., Haertel, O., Rosales, M.J., Pérez-Cordon, G., Gutiérrez-Sánchez, R., Sánchez-Moreno, M., 2009. Antileishmaniasis activity of flavonoids from *Conium maculatum*. *J. Nat. Prod.* 72, 1069–1074. <https://doi.org/10.1021/sp900812z>.
- Maron, D.M., Ames, B.N., 1983. Revised methods for the Ames test mutagenicity test. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* 113, 173–215. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-6](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-6).
- Martín, Y.C., 2005. A bioavailability score. *J. Med. Chem.* 48, 3164–3170. <https://doi.org/10.1021/jm0493202>.
- Mausz, A., Gütlein, M., Knautenberg, M., Vargimmiel, D., Geisels, D., Helm, C., 2013. Izzar: a modular predictive toxicology framework. *Front. Pharmacol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00038>.
- Meiselles, M.N., de Araújo-Jorge, Y.C., Miranda, C.F., de Souza, W., Barbon, H.S., 1986. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cells: ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis in vitro. *Eur. J. Cell Biol.* 41, 196–206.
- Mendes, N. de S., Santos, M.C.P., Santos, M.C.B., Cameron, L.C., Ferreira, M.S.L., Gonçalves, E.C.B.A., 2019. Characterization of pepper (*Capsicum baccatum*) - a potential functional ingredient. *Lebensm. Wiss. Technol.* 112, 108209. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.197>.
- Mitra, B., Saha, A., Chowdhury, S.R., Pal, C., Mandal, S., Mukhopadhyay, S., Bhattacharyya, S., Majumdar, H.K., 2000. *Luteolin*, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing trypanosome II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. *Mol. Med.* 6, 527.
- Napolini, N.F., Seljan, M.P., Santos, M.C.P., Gonçalves, E.C.B.A., 2016. Phytochemical characterization of bioactive compounds on methanolic and ethanolic leaf extracts of *Myrciaria* sp. *Sci. Agropecu.* 7, 103–109. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.02.03>.
- Neri-Nunes, J.A., Soriano Sanchez, R.A., Pereira, A.P.A., Fustros, G.M., 2018. Small Brazilian wild fruits: nutrients, bioactive compounds, health-promotion properties and commercial interest. *Food Res. Int.* 103, 345–360. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.053>.
- Neves, N. de A., Stringheta, P.C., Gómez-Akono, S., Hermandis-Gutiérrez, I., 2018. Flavonoids and ellagic acid derivatives in peel of different species of jaboticaba (*Plinia* spp.) identified by HPLC-DAD-ESI/MSn. *Food Chem.* 252, 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.078>.
- OECD, 2020. Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD. <https://doi.org/10.1787/9789264071247-en>.
- Paiva, K.O., Oliveira, G.L., Farias, D.F.A., Müller, T.S., 2017. Plantas medicinais utilizadas em transtornos do sistema gastrointestinal por mulheres cibeirinhas. *Caraíbas. Bahia. Rev. Fitos 11*. <https://doi.org/10.5935/2446-4773.20170019>.
- Paloni, R.A.C., Lorenço, B.R., Guarnier, L.P., Romão, P.V.M., Marques, A.A.M., Hultmeier, A.P.C.R., Lourenço, E.L.B., Tolouei, S.E.L., da Silva, G.N., Curi, T.Z., Pavesi, M.T., Dalwester, P.R., de Araújo, F.H.S., Ostrowski, S.A., Souza, R.I.C., dos Santos, A.C., de Castilho, P.F., de Oliveira, K.M.P., Nochi, S.R., Silva, D.B., Gasparotto Junior, A., 2020. From general toxicology to DNA disruption: a safety assessment of *Plinia molle* (Mart.) Kuntze. *J. Ethnopharmacol.* 258, 112916. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112916>.
- Peng, K.-Z., Zhang, S.-Y., Zhou, H.-L., 2016. Toxicological evaluation of the flavonoid-rich extract from *Myrica stipes*: subchronic toxicity and genotoxicity studies in mice. *J. Ethnopharmacol.* 192, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.07.012>.
- Pinto, S.R., Heil-Neto, E., Paumgarten, F., Felzenszalk, I., Araújo-Lima, C.F., Martins-Mátes, R., Santos-Oliveira, R., 2018. Cytotoxicity, genotoxicity, transplacental transfer and tissue disposition in pregnant rats mediated by nanoparticles: the case of magnetic core mesoporous silica nanoparticles. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 46, 527–538. <https://doi.org/10.1080/21891401.2018.1460003>.
- Pires, D.E.V., Bhandell, T.L., Ascher, D.B., 2015. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *J. Med. Chem.* 58, 4066–4072. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>.
- Pischni, A.M., Pop, A., Georgescu, C., Turcu, V., Olah, N.E., Măruș, E., 2018. An overview of natural antimicrobials role in food. *Eur. J. Med. Chem.* 143, 922–935. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.025>.
- Ramírez-Macias, I., Marín, C., Díaz, J.G., Rosales, M.J., Gutiérrez-Sánchez, R., Sánchez-Moreno, M., 2012. Leishmanicidal activity of nine novel flavonoids from *Delphinium emphyragm.* *Sci. World J.* 1–10. <https://doi.org/10.1100/2012/203646>, 2012.
- Resende, F.A., Vilgasa, W., dos Santos, L.C., Varanda, E.A., 2012. Mutagenicity of flavonoids assayed by bacterial reverse mutation (AMES) test. *Molecules* 17, 5255–5268. <https://doi.org/10.3390/molecules17055255>.
- Ribeiro, V., Dias, N., Paiva, T., Hagström-Bex, L., Nitz, N., Prates, R., Hecht, M., 2020. Current trends in the pharmacological management of Chagas disease. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 12, 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijdr.2018.11.004>.
- Roberto, M.M., Matsumoto, S.T., Jamal, C.M., Malampina, O., Matin-Mocules, M.A., 2016. Evaluation of the genotoxicity/mutagenicity and antigenotoxicity/antimutagenicity induced by propolis and *Bauhinia dracunculifolia*, by in vitro study with HTC cells. *Toxicol. In Vitro* 33, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.02.005>.
- Robertson, L.J., Devrieschawen, B., Alvario de Noya, E., Noya González, O., Torgerson, P.R., 2016. *Trypanosoma cruzi*: time for international recognition as a foodborne parasite. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 10, e0004656. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004656>.
- Romão, P.V.M., Paloni, R.A.C., Guarnier, L.P., Silva, A.O., Lorenço, B.R., Nochi, S.R., Moura, C., Lourenço, E.L.B., Silva, D.B., Gasparotto Junior, A., 2019. Cardioprotective effects of *Plinia eudiflora* (Mart.) Kuntze in a rabbit model of doxorubicin-induced heart failure. *J. Ethnopharmacol.* 242, 112042. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112042>.
- Santoro, G.F., Cardoso, M.G., Guimarães, L.G.L., Mendonça, L.Z., Soares, M.J., 2007. *Trypanosoma cruzi* activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Exp. Parasitol.* 116, 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.01.016>.
- Sepúlveda-Robles, O., Espinoza-Gutiérrez, B., Gómez-Verjan, J.C., Gurmán-Gutiérrez, S. L., De Ita, M., Silva-Miranda, M., Baptista-Piñón, C.I., Fernández-Ramírez, F., Herrera-Salazar, A., Mata-Rocha, M., Ortega-Hernández, A., Reyes-Chilga, R., 2019. Trypanocidal and toxicological assessment in vitro and in silico of three sesquiterpene lactones from Asteraceae plant species. *Food Chem. Toxicol.* 125, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.12.023>.
- Silva, N., Fernandes Júnior, A., 2010. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 16, 402–413. <https://doi.org/10.1590/S1678-81992010000300006>.
- Sobral, M., 1985. *Albreziol* amantadina em *Plinia* (*Myrtaceae*). *Bol. Mus. Botânica Maric. Curitiba* 63, 1–4.
- Souza, R.O. de S., Souza, P.L., Meneses, R., Sampain, T.L., Tessarolo, L.D., Silva, F.C.O., Pereira, M.G., Martins, A.M.C., 2018. Trypanocidal activity of polysaccharide extract from *Gempea americana* leaves. *J. Ethnopharmacol.* 210, 311–317. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.08.042>.
- Sponchiado, G., Adam, M.L., Silva, C.D., Silva Soley, B., de Mello-Sampayo, C., Calvini, D.A., Correa, C.J., Otaki, M.F., 2016. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: a systematic review. *J. Ethnopharmacol.* 178, 299–296. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.10.026>.
- Summer, L.W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M.H., Beger, R., Daykin, C.A., Fan, T.W.-M., Fieda, O., Goodacre, R., Griffin, J.L., Hausenblas, T., Hardy, N., Harnly, J., Higashi, R., Kopka, J., Lane, A.N., Lindon, J.C., Marriott, P., Nicholls, A.W., Reilly, M.D., Thaden, J.J., Viant, M.R., 2007. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis: chemical analysis working group (CAWG) Metabolomics standards initiative (MSI). *Metabolomics* 3, 211–221. <https://doi.org/10.1007/s11396-007-0082-3>.
- Tomazelo, D.M., Pupo, M.T., Passador, E.A.P., da Silva, M.P., das, G.F., Vieira, P.C., Fernandes, J.B., Rodrigues Fo, E., Oliva, G., Pirani, J.R., 2006. Pyruvo chalcones and a flavone from *Neospartea magnifica* and their *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-inhibitory activities. *Phytochemistry* 55, 643–651. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.08.024>.
- Vazakas, T., Zakynthinos, G., Verpoost, F., 2016. Plant food residues as a source of natural products and functional foods. *Food* 5, 88. <https://doi.org/10.3390/foods5040088>.
- Vilar-Pereira, G., Cuzneiro, V.C., Mata-Santos, H., Vicentino, A.R.R., Ramos, L.P., Glazola, N.L.L., Feijó, D.F., Meyer-Fernandes, J.R., Paula-Neto, H.A., Medel, E., Borza, M.T., Lauer-Vieira, J., Paiva, C.N., 2016. Resveratrol reversion functional chagas heart disease in mice. *PLoS Pathog.* 12, e1005947. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005947>.
- Wang, W.-H., Tsyn, Y.-C., Chen, Z.-S., Lin, C.-G., Yang, M.-H., Yuan, S.-S., Tsai, W.-C., 2014. Evaluation of the antioxidant activity and antiproliferative effect of the jaboticaba (*Myrciaria eudiflora*) seed extracts in oral carcinoma cells. *BioMed Res. Int.* 1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/185946>, 2014.
- Wink, M., 2012. Medicinal plants: a source of anti-parasitic secondary metabolites. *Molecules* 17, 12771–12791. <https://doi.org/10.3390/molecules171112771>.
- Wu, S.-B., Long, C., Kennelly, E.J., 2013. Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. *Food Res. Int.* 54, 148–159. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.023>.
- Ye, Y., Song, Y., Zhuang, J., Wang, G., Ni, J., Xia, W., 2019. Anticancer effects of echinacoside in hepatocellular carcinoma mouse model and HepG2 cells. *J. Cell. Physiol.* 234, 1880–1888. <https://doi.org/10.1002/jcp.27063>.
- Zingales, B., 2018. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnostics and drug sensitivity. *Acta Trop.* 184, 38–52. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>.

Table S1
Comparison between pKCSM and SwissADME pharmacokinetic (ADME) properties prediction of (+)-catechin.

Property	Model name	pKCSM		SwissADME	
		Unit	Prediction	Unit	Prediction
Absorption	Water solubility (consensus)	Numeric (mmol/L)	0.664	Numeric (mmol/L)	6.310
Absorption	GI ^a absorption (human)	Numeric (% Absorbed)	66.773	Categorical (Low/High)	High
Absorption	Skin Permeability	Numeric (log Kp)	-2.735	Numeric (log Kp)	-7.82
Absorption	P-glycoprotein substrate	Categorical (Yes/No)	Yes	Categorical (Yes/No)	Yes
Absorption	P-glycoprotein inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	n.a. ²	—
Distribution	VDss ^b (human)	Numeric (L/kg)	4.656	n.a.	—
Distribution	Fraction unbound (human)	Numeric (Fu)	0.295	n.a.	—
Distribution	BBB ^c permeability	Numeric (log BB)	-1.005	Categorical (Yes/No)	No
Distribution	CNS ^d permeability	Numeric (log PS)	-3.359	n.a.	—
Metabolism	CYP2D6 ^e substrate	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—
Metabolism	CYP3A4 substrate	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—
Metabolism	CYP1A2 inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	Categorical (Yes/No)	No
Metabolism	CYP2C19 inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	Categorical (Yes/No)	No
Metabolism	CYP2C9 inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	Categorical (Yes/No)	No
Metabolism	CYP2D6 inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	Categorical (Yes/No)	No
Metabolism	CYP3A4 inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	Categorical (Yes/No)	No
Excretion	Total Clearance	Numeric (ml/min/kg)	1.510	n.a.	—
Excretion	Renal OCT ^{2f} substrate	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—

^a GI: gastrointestinal. ^b VDss: volume of distribution at steady state. ^c BBB: blood-brain barrier. ^d CNS: central nervous system. ^e CYP: cytochrome 450. ^f OCT: organic cation transporter. ^g n.a.: not analyzed.

Table S2
Comparison between pKCSM and LAZAR toxicity prediction of (+)-catechin.

Model Name	pKCSM		LAZAR	
	Unit	Prediction	Unit	Prediction
AMES toxicity	Categorical (Yes/No)	No	Categorical (Yes/No)	No
hERG ^a I inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—
hERG II inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—
Oral Rat Acute Toxicity (LD ₅₀ ^b)	Numeric (mol/kg)	2.387	n.a.	—
Oral Rat Chronic Toxicity (LOAEL ^c)	Numeric (mg/kg/day)	76.2	Numeric (mg/kg/day)	137.0
Carcinogenicity (Rodents)	n.a. ^d	—	Categorical (Yes/No)	No
Hepatotoxicity	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—
Skin Sensitisation	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—
Maximum tolerated dose (human)	Numeric (mg/kg/day)	1.675	Numeric (mg/kg/day)	2.34
<i>Tetrahymena pyriformis</i> toxicity	Numeric (µg/L)	4.027	n.a.	—
<i>Daphnia magna</i> toxicity	n.a.	—	Numeric (mg/L)	15.8
Fathead minnow toxicity	Numeric (mM)	739.6	Numeric (mM)	0.144

^a hERG: human Ether-a-go-go-Related Gene. ^b LD₅₀: lethal dose of 50%. ^c LOAEL: lowest observed adverse effect level. ^d n.a.: not analyzed.

Table S3
Comparison between pKCSM and SwissADME pharmacokinetic (ADME) properties prediction of digallic acid.

Property	Model name	pKCSM		SwissADME	
		Unit	Prediction	Unit	Prediction
Absorption	Water solubility (cosmoqsar)	Numeric (mmol/L)	1.318	Numeric (mmol/L)	2.415
Absorption	GI absorption (human)	Numeric (% Absorbed)	40.914	Categorical (Low/High)	Low
Absorption	Skin Permeability	Numeric (log Kp)	-2.735	Numeric (log Kp)	-7.50
Absorption	P-glycoprotein substrate	Categorical (Yes/No)	Yes	Categorical (Yes/No)	No
Absorption	P-glycoprotein inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	n.a. [†]	—
Distribution	VD _{ss} [‡] (human)	Numeric (L/kg)	0.296	n.a.	—
Distribution	Fraction unbound (human)	Numeric (Fu)	0.242	n.a.	—
Distribution	BBB [§] permeability	Numeric (log BB)	-1.92	Categorical (Yes/No)	No
Distribution	CNS [¶] permeability	Numeric (log PS)	-3.796	n.a.	—
Metabolism	CYP2D6 ^{**} substrate	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—
Metabolism	CYP3A4 substrate	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—
Metabolism	CYP1A2 inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	Categorical (Yes/No)	Yes
Metabolism	CYP2C19 inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	Categorical (Yes/No)	No
Metabolism	CYP2C9 inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	Categorical (Yes/No)	No
Metabolism	CYP2D6 inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	Categorical (Yes/No)	No
Metabolism	CYP3A4 inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	Categorical (Yes/No)	No
Excretion	Total Clearance	Numeric (ml/min/kg)	2.531	n.a.	—
Excretion	Renal OCT ₂ ^{††} substrate	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—

^{*} GI: gastrointestinal. [†] VD_{ss}: volume of distribution at steady state. [‡] BBB: brain blood barrier. [§] CNS: central nervous system. [¶] CYP: cytochrome. ^{**} OCT: organic cation transporter. ^{††} n.a.: not analyzed.

Table S4
Comparison between pKCSM and LAZAR toxicity prediction of digallic acid.

Model Name	pKCSM		LAZAR	
	Unit	Prediction	Unit	Prediction
AMES toxicity	Categorical (Yes/No)	No	Categorical (Yes/No)	No
hERG ^a I inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—
hERG II inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—
Oral Rat Acute Toxicity (LD ₅₀ ^b)	Numeric (mol/kg)	2.491	n.a.	—
Oral Rat Chronic Toxicity (LOAEL ^c)	Numeric (mg/kg/day)	550.8	n.a.	—
Carcinogenicity (Rodents)	n.a. ^d	—	Categorical (Yes/No)	No
Hepatotoxicity	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—
Skin Sensitisation	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—
Maximum tolerated dose (human)	Numeric (mg/kg/day)	2.606	Numeric (mg/kg/day)	3.63
<i>Tetrahymena pyriformis</i> toxicity	Numeric (µg/L)	1.928	n.a.	—
Fathead minnow toxicity	Numeric (mM)	5.272	Numeric (mM)	0.105

^a hERG: human Ether-a-go-go-Related Gene. ^b LD₅₀: lethal dose of 50%. ^c LOAEL: lowest observed adverse effect level. ^d n.a.: not analyzed.

Table S5
Comparison between pKCSM and SwissADME pharmacokinetic (ADME) properties prediction of hesperidin.

Property	Model name	pKCSM		SwissADME	
		Unit	Prediction	Unit	Prediction
Absorption	Water solubility (consensus)	Numeric (mmol/L)	0.968	Numeric (mmol/L)	1.862
Absorption	GI* absorption (human)	Numeric (% Absorbed)	31.481	Categorical (Low/High)	Low
Absorption	Skin Permeability	Numeric (log Kp)	-2.735	Numeric (log Kp)	-10.12
Absorption	P-glycoprotein substrate	Categorical (Yes/No)	Yes	Categorical (Yes/No)	Yes
Absorption	P-glycoprotein inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	Categorical (Yes/No)	—
Distribution	VDos ³ (human)	Numeric (L/kg)	9.908	n.a.	—
Distribution	Fraction unbound (human)	Numeric (Fu)	0.101	n.a.	—
Distribution	BBB ⁴ permeability	Numeric (log BB)	-1.715	Categorical (Yes/No)	No
Distribution	CNS ⁴ permeability	Numeric (log PS)	-4.807	n.a.	—
Metabolism	CYP2D6 ⁵ substrate	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—
Metabolism	CYP3A4 substrate	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—
Metabolism	CYP1A2 inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	Categorical (Yes/No)	No
Metabolism	CYP2C19 inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	Categorical (Yes/No)	No
Metabolism	CYP2C9 inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	Categorical (Yes/No)	No
Metabolism	CYP2D6 inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	Categorical (Yes/No)	No
Metabolism	CYP3A4 inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	Categorical (Yes/No)	No
Excretion	Total Clearance	Numeric (ml/min/kg)	1.626	n.a.	—
Excretion	Renal OCT2 ⁶ substrate	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—

* GI: gastrointestinal. ³ VDos: volume of distribution at steady state. ⁴ BBB: brain blood barrier. ⁵ CNS: central nervous system. ⁶ CYP: cytochrome. ⁷ OCT: organic cation transporter. ⁸ n.a.: not analyzed.

Table S6
Comparison between pKCSM and LAZAR toxicity prediction of hesperidin.

Model Name	pKCSM		LAZAR	
	Unit	Prediction	Unit	Prediction
AMES toxicity	Categorical (Yes/No)	No	Categorical (Yes/No)	No
hERG ^a I inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—
hERG II inhibitor	Categorical (Yes/No)	Yes	n.a.	—
Oral Rat Acute Toxicity (LD ₅₀ ^b)	Numeric (mol/kg)	2.506	n.a.	—
Oral Rat Chronic Toxicity (LOAEL ^c)	Numeric (mg/kg/day)	1,469	n.a.	—
Carcinogenicity (Rodents)	n.a. ^d	—	Categorical (Yes/No)	No
Hepatotoxicity	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—
Skin Sensitisation	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—
Maximum tolerated dose (human)	Numeric (mg/kg/day)	3.350	Numeric (mg/kg/day)	12.8
<i>Tetrahymena pyriformis</i> toxicity	Numeric (µg/L)	1.928	n.a.	—
Fathead minnow toxicity	Numeric (mM)	1.352 × 10 ⁷	Numeric (mM)	0.0855

^a hERG: human Ether-a-go-go-Related Gene. ^b LD₅₀: lethal dose of 50%. ^c LOAEL: lowest observed adverse effect level. ^d n.a.: not analyzed.

3.2 Proposta de artigo “*In vitro and in silico study of mutagenicity, cytotoxicity and pharmacokinetic properties of novel 3-nitro-1,2,4-triazole-based derivatives*” – a ser submetido

***In vitro* and *in silico* study of mutagenicity, cytotoxicity and pharmacokinetic properties of novel 3-nitro-1,2,4-triazole-based derivatives**

Bárbara Verena Dias Galvão ^a, Cheyene Almeida Celestino Menozzi ^b, Eduardo Kennedy Carrão-Dantas ^a, Lizandra Vitória Santos ^a, Carlos Fernando Araujo-Lima ^{a,*}, Frederico Silva Castelo-Branco ^b, Nubia Boechat ^a, Israel Felzenszwalb ^a

^a Laboratório de Mutagênese Ambiental, Departamento de Biofísica e Biometria, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 20511-010, Brasil

^b Departamento de Síntese de Fármacos, Instituto de Tecnologia em Fármacos, Farmanguinhos – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ 21041-250, Brasil

*Corresponding author. Laboratório de Mutagênese Ambiental, Departamento de Biofísica e Biometria, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Avenida Boulevard 28 de Setembro, 87 Fundos, 4º Andar, 20551-010, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. E-mail address: biomed.carlos@gmail.com (C. F. Araujo-Lima).

Abstract

The 3-nitro-1,2,4-triazole multi-target derivatives have shown promising results in the search for more selective antitrypanosomal drugs, despite nitrocompounds are still related to toxicity issues. This study aimed to investigate pharmacokinetic profile, mutagenicity and cytotoxicity of novel 3-nitro-1,2,4-triazole derivatives. *In silico* predictions of pharmacokinetics and toxicity were conducted on LAZAR, pkCSM and SwissADME. Mutagenicity was assessed by the Ames Test, using strains TA98 and TA100. Hepatotoxicity was determined by WST-1 and LDH assays, against F C3H and HepG2 liver cell lines. The compounds were predicted as potential mutagens with two Brenk' Structural Alerts, and one of them as a probable carcinogen in rats. Besides, they were also predicted as hepatotoxicity inducers and as substrates of CYP450 enzymes related to drug-drug interactions. Complementary, the compounds induced base-pair substitution and frameshift mutations and the function of metabolic activation on mutagenicity was influenced by the type of substituent. The compounds induced mostly cytotoxicity associated to cell membrane damage, with lethal concentrations higher than the trypanocidal concentrations reported previously. The results confirm previous evidence that despite showing improved selectivity, 3-nitro-1,2,4-triazole derivatives may induce DNA damage, even

presenting a large safe threshold between mutagenic and trypanocidal concentrations. Thus, the presented results contribute to the understanding of the role of different substituents in modulating the toxicity of these compounds. Furthermore, the *in silico* tools were efficient in predicting mutagenicity, reaffirming their relevant role in guiding the preclinical research of new drugs for neglected diseases.

Keywords: nitrotriazoles, *Trypanosoma cruzi*, Chagas Disease, mutagenicity, cytotoxicity.

Highlights

- Two novel 3-nitro-1,2,4-triazole-based derivatives were mutagenic on Ames test
- The influence of metabolic activation on mutagenicity differed between compounds
- *In silico* analysis indicated structural alerts for nitro groups and O–N single bond
- One of the derivatives was predicted as a potential carcinogen for rodents
- *In vitro* cytotoxicity was evaluated using HepG2 and F C3H liver cell lines

1. Introduction

Affecting over 7 million people worldwide, Chagas Disease (CD) is a neglected tropical disease, no longer limited by the tropics. With estimated global costs around US\$ 7.2 billion/year [1], CD has become an emerging global public health concern due to the increase of cases in non-endemic regions such as the United States, Canada and some European countries, related to population migration, blood transfusion, organ transplantation and congenital transmission [2]. In Brazil, in the last 15 years, the systematic occurrence of infections related to oral and vector transmission, mainly in the Amazon region, has contributed to the maintenance of a prevalence estimated at 1 million people infected by *Trypanosoma cruzi* [3].

Approximately, 10% of the patients suffer from digestive, neurological or mixed alterations, while 30% develop cardiac disorders, also known as chronic chagasic cardiomyopathy (CCC), the main responsible by the high CD morbimortality. Together, these complications are associated with about 12,000 deaths/year [4,5]. Despite the alarming epidemiological data, more than 100 years after its discovery [6], only two drugs are internationally accepted for CD treatment. The nitroheterocyclic compounds Benznidazole (BZN) and Nifurtimox (NFX) date from the 1970s and are mostly effective in the acute phase

of CD, presenting low cure rates in the chronic form (15-30%) [7,8]. In addition, both are associated with a high frequency of adverse effects of 53% and 85%, for BZN and NFX, respectively, which led to the suspension of the use of NFX in Brazil [9]. Therefore, the need for efficient, cheap drugs without significant adverse effects is urgent [10].

Among several drug discovery strategies in the search for new trypanocidal agents, the design of multi-target compounds has excelled [11]. Several evidences indicated that the inclusion of a nitro group increases the bioactivity of imidazole, thiazole and triazole compounds [12,13]. Among them, 3-nitro-1,2,4-triazole derivatives they have been showing the most promising results. They contain a 1,2,4,-triazole core, which acts on the *T. cruzi* CYP51 enzyme, inhibiting ergosterol biosynthesis [14], and attached to this core, there is a nitro group, which suffer sequential reductions, resulting in the production of toxic metabolites to the parasite [15]. In this sense, Papadopoulou et al. [12,16,17] have been exploring this core, demonstrating that it increases the efficacy and reduces the *in vitro* toxicity of its derivatives, when compared to 2-nitroimidazole and 1,2,4-triazole. They also observed that the addition of a phenyl nucleus improved the anti-*T. cruzi* activity of the compounds, when compared to other aromatic rings.

A derivative that stood out in Papadopoulou et al. [12] investigations was the compound **1**, which showed high selectivity against *T. cruzi* Tulahuén amastigotes. Based on these findings, our group [18] developed the analogue **2** through a viable and low-cost synthetic route, having **1** as its synthesis intermediate. At low concentrations, compound **2** inhibited about 90% of the parasite activity, not inducing toxicity to the host cell, presenting selectivity higher than **1** and BZN (unpublished data).

Despite the promising results, considering the genotoxicity and carcinogenicity issues associated to nitrocompounds [19–21], an essential step before the progression to *in vivo* studies is the mutagenicity assessment. Although previous data reporting that 3-nitro-1,2,4-triazole derivatives are relatively less mutagenic than 2-nitroimidazole and 1,2,4-triazole analogues [16], such evaluations have not yet been conducted for compounds **1** and **2**. The ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) guideline M7 determines that if the data about the classification with respect to mutagenic and carcinogenic potential are not available, an assessment of Structure-Activity Relationships (SAR) approaching bacterial mutagenicity predictions should be performed [35]. Therefore, this study aimed to investigate the pharmacokinetics, cytotoxicity and mutagenicity profile of 3-nitro-1,2,4-triazole-based derivatives, combining *in silico* and *in vitro* models.

2. Material and Methods

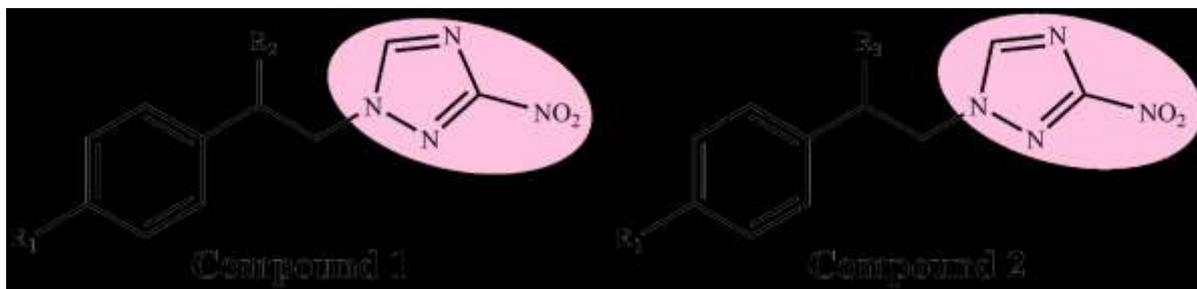
2.1 Chemicals

Dimethyl sulfoxide (DMSO; $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$; purity: $\geq 99\%$; CAS 67-68-5) was acquired from Merck (Darmstadt, HE, Germany). Oxoid nutrient broth No. 2 (catalog #CM0067B) was purchased from Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, CA, USA). Reagents for cell culture, penicillin-streptomycin, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS), Trypsin-EDTA 1X (catalog #T3924) and Trypan Blue (0.4%; CAS 93595); Cell Proliferation Reagent WST-1, Cytotoxicity Detection Kit (LDH), ampicillin ($\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$; purity: $\geq 99\%$; CAS 69-53-4), 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO; $\text{C}_9\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_3$; purity: $\geq 98\%$; CAS 56-57-5), sodium azide (SA; NaN_3 ; purity: $\geq 99\%$; CAS 26628-22-8), 2-aminoanthracene (2-AA; $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}$; purity: $\geq 96\%$; CAS 613-13-8), Triton™ X-100 (catalog #93443) and other chemicals of analytical grade were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Lyophilized Aroclor 1254-induced rat liver S9 fraction (S9; catalog #11-01L.2) was acquired from Molecular Toxicology (Boone, NC, USA).

2.2 Compounds

The 3-nitro-1,2,4-triazole derivatives (Figure 1) were provided by Dr. Nubia Boechat (Laboratório de Síntese Orgânica, Instituto de Tecnologia em Fármacos, Farmanguinhos – FIOCRUZ). The compounds were synthesized through a simple and inexpensive synthetic route, and characterized by gas chromatography-coupled electron ionization mass spectrometry, high resolution electrospray ionization mass spectrometry, Fourier transform infrared spectroscopy, ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance and their two-dimensional homonuclear H/H or heteronuclear H/ ^{13}C techniques, were performed as described by Menozzi [18]. Stock solutions were prepared by dilution in DMSO.

Fig. 1. Chemical structure of the 3-nitro-1,2,4-triazole-based derivatives.



2.3 Bacterial strains

Initially, the histidine-dependent (*his⁻*) strains TA98 and TA100 of *Salmonella typhimurium* were checked for genotype confirmation [22]. For the mutagenicity assays, the strains were inoculated in 10 mL of Oxoid nutrient broth No. 2 containing 25 µg/mL ampicillin, and incubated overnight (15-18 h) at 37±1 °C, on an orbital shaker (CT-712, Cientec, Belo Horizonte, MG, BR) at 150 rpm, to obtain approximately a concentration of 1-2 × 10⁹ cells/mL, confirmed by titration in nutrient agar plates.

2.4 Cell culture

Human hepatocellular carcinoma HepG2 (ATCC #HB-8065) and mouse liver fibroblast F C3H (BCRJ #0082) cell lines were grown in DMEM supplemented with 10% FBS, sodium bicarbonate 3.7 g/L, 100 µg/mL penicillin-streptomycin. The cells, maintained in T25/175 cm² flasks at standard conditions (37±1 °C, 95% relative humidity and 5% CO₂), were split each time they reached 80–90% confluence, using a solution containing 0,05% Trypsin and 0,02% EDTA. Trypan Blue exclusion method was used for viable cells counting in a Neubauer's chamber.

2.5 In silico study of physicochemical and ADMET properties

The chemical structures of the compounds were designed by the ChemDraw® JS platform (<https://chemdrawdirect.perkinelmer.cloud/js/sample/index.html>) to obtain the SMILES sequences (Simplified Molecular Data Line Input System). The predictions were performed applying three Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) algorithms. Toxicological properties were predicted with the LAZAR algorithm (<https://lazar.in-silico.ch/predict>), a modular predictive toxicology framework based on similarity of chemical

alerts [23]. The physicochemical and pharmacokinetic properties, such as absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADMET), were evaluated by the pkCSM algorithm (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/prediction>) [24] and by the SwissADME tool (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/prediction>) [25]. SwissADME was also used for prediction of drug-likeness and medicinal chemistry friendliness. The prediction of drug-likeness by SwissADME is based on the Lipinski's Rule of Five [26], which states that poor absorption or permeation of a molecule is more likely when it fulfills two or more of the following criteria: more from 5 hydrogen bond donors (–NH–, –OH); more than 10 hydrogen bond acceptors (–N=, –O–); the molecular weight is greater than 500 Da; and the value of the partition coefficient (Clog P) is higher than five.

2.6 Mutagenicity assay

The pre-incubation method of Ames test was carried out according to standard protocols previously described [22,27]. DMSO was used as negative control. Positive controls without metabolic activation (–S9) were 4-NQO (0.5 µg/plate) for TA98 and SA (5 µg/plate) for TA100. With metabolic activation (+S9): 2-AA (5 µg/plate) for both strains. Briefly, 100 µL of stationary growth cultures of each strain ($1-2 \times 10^9$ cells/mL) were pre-incubated for 20 min on an orbital shaker (150 rpm) at 37 ± 1 °C, with 500 µL of 0.2 M phosphate buffer pH 7.4, or 500 µL of S9 mix (4%), and 100 µL of compounds dilutions (0.05-500 µM) or controls. After incubation, 2 mL top agar (0.7% agar, 0.5% NaCl, 0.05 mM L-histidine and D-biotin) at 45 ± 3 °C were added and gently mixed. The final mixtures were poured on glucose minimal agar plates (1.5% agar, 10 g/L MgSO₄·7H₂O; 100 g/L C₆H₈O₇·H₂O; 500 g/L K₂HPO₄; 175 g/L Na(NH₄)HPO₄·4H₂O, 2% glucose) and incubated for 72 h at 37 ± 1 °C. The results were expressed as mean revertant colonies (*His*⁺) per plate, standard deviation (SD) and mutagenicity index (MI), calculated as the ratio between the number of colonies in the test group and the number of colonies in the negative control group [28].

2.7 Cytotoxicity assays

The water-soluble tetrazolium (WST-1) and the lactate dehydrogenase (LDH) cytotoxicity assays were conducted in accordance with the manufacturer specifications [29,30]. HepG2 and F C3H cells, seeded in a 96-well flat-bottomed plate at a density of 1×10^4 cells/well, were treated with the compounds at different concentrations (3.3-2,400 µM) for 24, 48 and 72 h at standard conditions. DMSO 1% was used as the negative control and Triton X-

100 4% as the positive control. After exposure, the supernatant was replaced by 100 μ L of WST-1 2% in DMEM and incubated for 3 h in the dark at standard conditions. The absorbance was measured at 440 nm on a microplate reader (Polaris, Celer, MG, Brazil). For the LDH assay, after treatment, 75 μ L of supernatant from each well was transferred to a 96-well flat-bottomed plate and 75 μ L of reaction mixture freshly prepared were added to each well. After 30 min of incubation in the dark at room temperature, the absorbance was measured at 492 nm. The results were expressed as percentage of cytotoxicity, calculated according to the kit protocols.

2.9 Statistical analysis

All assays were performed in triplicate and repeated at least two times. Statistical analyses were carried out in GraphPad Prism software (version 5.00, GraphPad Software, USA). Samples were considered mutagenic when a dose-dependent increase in the number of revertants was observed, $MI > 2$ and statistical analysis by one-way ANOVA followed by Dunnet's post hoc test showed $p < 0.01$. The lethal concentration for 50% (LC_{50}) was calculated by non-linear regression of log dose *versus* normalized response (agonist behavior). For cytotoxicity assays, statistical differences between the groups were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's post hoc tests ($p < 0.05$).

3. Results

3.1 *In silico* physicochemical and ADMET profile prediction

The physicochemical, drug-likeness and Medicinal Chemistry properties of the compounds obtained by prediction are summarized in Table 1. For being analogous, the compounds have generally similar physicochemical characteristics, distinguishable by slight variations in molecular weight, fraction Csp^3 , H-bond donors, molar refractivity, topological polar surface area (TPSA), lipophilicity and water solubility. These variations are graphically represented in the Bioavailability Radars in Fig. 2b-c. In this model, pink area represents the range of optimal values for each property (lipophilicity: $-0.7 \leq \text{Log } P_{o/w} \leq +6.0$, size: $150 \leq MW \leq 500$ g/mol, polarity: $20 \leq \text{TPSA} \leq 130$ Å, solubility: $\text{LogS} \leq 6$, saturation: fraction $Csp^3 \geq 0.25$, and flexibility: ≤ 9 rotatable bonds [25]). From these properties, only insaturation point is out of the pink area, since the compounds have a fraction $Csp^3 < 0.25$ (Table 1).

Table 1
Physicochemical properties obtained from *in silico* predictions for compounds **1** and **2**.

Property	Compound 1	Compound 2
Molecule properties		
Molecular weight	308.29 g/mol	310.31 g/mol
Number heavy atWHO	23	23
Number of aromatic heavy atWHO	17	17
Fraction Csp ³	0.06	0.12
Number of rotatable bonds	5	5
Number of H-bond acceptors	5	5
Number of H-bond donors	0	1
Molar refractivity	86.26	86
TPSA ^a	93.6 Å ²	96.76 Å ²
Lipophilicity		
Log Po/w	3.3 ^b	1.67
Water Solubility		
Consensus LogS	0.026	0.204
Drug-likeness		
Lipinski	Yes; 0 violation	Yes; 0 violation
Bioavailability Score	0.55	0.55
Medicinal Chemistry		
PAINS ^c	0 alert	0 alert
Brenk' Structural Alerts	2 alerts: nitro group, oxygen-nitrogen single bond	2 alerts: nitro group, oxygen-nitrogen single bond
Lead-likeness	Yes	Yes
Synthetic accessibility	2.66	3.29

^a TPSA: topological polar surface area. ^b Data from PubChem. ^c PAINS: pan-assay interference compounds.

According to the BOILED-Egg (Fig. 2a), both derivatives are highly probable of passive gastrointestinal (GI) absorption, but not considered passive blood-brain barrier (BBB) penetrants, results confirmed in pkCSM prediction (Table S1,S2). The compounds were predicted as non-substrates to active efflux (PGP⁻) of P-glycoprotein (P-gp), but are potential P-gp inhibitors. In drug-likeness predictions (Table 1), the compounds comply with all Lipinski's rules and have the same bioavailability score (0.55). The compounds were considered lead compounds, although presenting two Brenk' Structural Alerts (BSA) for nitro groups and oxygen-nitrogen single bond. The synthetic accessibility (SA) score ranged from 2.66 to 3.29, for **1** and **2**, respectively.

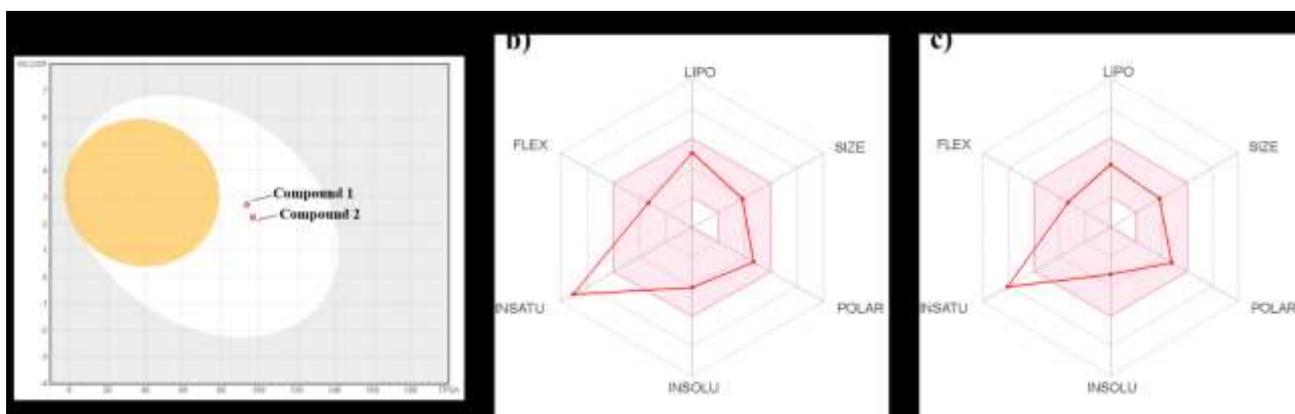


Fig. 2. SwissADME prediction of bioavailability and distribution for compounds **1** and **2**. A Boiled-Egg prediction of gastrointestinal absorption (GI) and blood-brain barrier (BBB) penetration is shown in (a). The white region represents high probability of passive GI absorption and the yellow region represents high probability of BBB penetration. Both compounds were predicted as GI absorbed, non-substrates of P-glycoprotein (PGP⁻) and not BBB penetrants (**1**: TPSA 93.6 Å, Log P_{o/w} 3.3; **2**: TPSA 96.76 Å, Log P_{o/w} 1.67). Bioavailability radars of physicochemical properties are presented in b) **1** and c) **2**. The pink area represents the drug-likeness optimal range for each property: lipophilicity (LIPO), size (SIZE), polarity (POLAR), solubility (INSOLU), saturation (INSATU) and flexibility (FLEX).

Tables S1 and S2 summarize the pharmacokinetic properties predicted with pkCSM and SwissADME. The compounds presented a relatively low skin permeability coefficient (K_p) of -2.67 and were predicted as non-sensitizers (data not show). Volume of distribution at steady state (VD_{ss}) was between 0.371-0.465 L/kg, and fraction unbound was between 0.058-0.071. In relation to metabolism by cytochrome P450 (CYP450) enzymes, both were predicted as

CYP3A4 substrates and as CYP1A2, CYP2C19 and CYP2C9 inhibitors. The compounds presented a total clearance index of ~1.5 and were not predicted as renal OCT2 substrates.

The prediction of toxicity properties (Table S3,S4) indicated both compounds as potential mutagens on Ames test and hepatotoxicity inducers, but not hERG inhibitors. Oral rat acute toxicity (LD_{50} , median lethal dose, rat) was 2.592 and 2.627 mol/kg, for **1** and **2**, respectively. Oral rat chronic toxicity (LOAEL, lowest observed adverse effect level, rat) of **1** (27.6 mg/kg/day) was 2-fold higher than **2** (13.8 mg/kg/day). Maximum tolerated dose (MTD, human) ranged from 2.023 and 1.803 mg/kg/day in pkCSM, LAZAR was only able to predict this value for **1** (17.6 mg/kg/day). LAZAR was not efficient in predicting most of the parameters for not finding similar substances for threshold 0.2 with experimental data in the training dataset. However, it predicted **1** as a potential carcinogen in rodents. Regarding the bioindicator models, IGC_{50} (negative logarithm of 50% growth inhibitory concentration) ranged from 0.532 to 0.517 log $\mu\text{g/L}$ for *Tetrahymena pyriformis*, and LC_{50} ranged from 0.031 to 7.145 mM for fathead minnow (*Pimephales promelas*), to **1** and **2** respectively.

Table 2Dose response data for mutagenicity of compounds **1** and **2** on *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100.

Metabolic condition	(μM)	Compound 1		Compound 2	
		TA98	TA100	TA98	TA100
-S9 ^a	0	37 ± 9 (1.0)	189 ± 21 (1.0)	43 ± 6 (1.0)	107 ± 4 (1.0)
	0.05	212 ± 11 (5.7) ^{c3}	189 ± 30 (1.0)	37 ± 4 (0.9)	93 ± 13 (0.9)
	0.5	249 ± 13 (6.7) ^{c3}	191 ± 12 (1.0)	39 ± 3 (0.9)	113 ± 2 (1.0)
	5	265 ± 15 (7.1) ^{c3}	159 ± 4 (0.8)	39 ± 6 (0.9)	116 ± 8 (1.1)
	50	271 ± 13 (7.3) ^{c3}	152 ± 11 (0.8)	37 ± 1 (0.9)	124 ± 9 (1.2)
	500	547 ± 44 (14.7) ^{c3}	137 ± 13 (0.7)	46 ± 6 (1.1)	204 ± 23 (1.9)
+S9 ^b	0	35 ± 1 (1.0)	207 ± 14 (1.0)	36 ± 3 (1.0)	83 ± 4 (1.0)
	0.05	28 ± 11 (0.8)	227 ± 13 (1.1)	37 ± 5 (1.0)	102 ± 7 (1.2) ^{c2}
	0.5	27 ± 1 (0.8)	243 ± 10 (1.2)	48 ± 3 (1.3)	111 ± 8 (1.3) ^{c3}
	5	37 ± 1 (1.1)	213 ± 14 (1.0)	51 ± 3 (1.4)	127 ± 7 (1.5) ^{c3}
	50	33 ± 9 (1.0)	186 ± 8 (0.9)	61 ± 10 (1.7) ^{c2}	160 ± 6 (1.9) ^{c3}
	500	29 ± 5 (0.8)	164 ± 20 (0.8)	118 ± 10 (3.3) ^{c3}	257 ± 7 (3.1) ^{c3}

SD: standard deviation. MI: mutagenicity index. ^a -S9: absence of metabolic activation. ^b +S9: presence of metabolic activation. ^c Statistically significant differences analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnet's post hoc test (^{c1}p < 0.05; ^{c2}p < 0.01; ^{c3}p < 0.001 versus negative control; n = 3 in triplicate). Positive responses marked in bold when MI ≥ 2.

3.2 Mutagenicity induction in TA98 and TA100

Compound **1** (-S9) induced a statistically significant ($p < 0.01$) dose-dependent mutagenic response in TA98 for all concentrations tested, with the MI ranging from 5.7-14.7 (Table 3). Compound **2** (-S9) induced a 2-fold increase in the mean revertants compared to the negative control, presenting a MI of 1.9 at the highest concentration (500 μM), close to the value needed to be considered mutagenic (2.0), however no statistical significance was indicated. With S9, **2** triggered significant mutagenic events in both strains; for TA100, a significant dose-dependent curve was observed, with the MI ranging from 1.2-3.1, while for TA98 the highest concentrations (50 μM , IM 1.7; 500 μM , IM 3.3) were significant. Besides, **1** induced deviation from linearity in TA98 and 100 (+S9) and a decreasing linearity in TA100 (-S9), due to toxicity at the highest doses. Positive controls -S9 (revertants \pm SD): 4-nitroquinoline-N-oxide (4-NQO) (0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$) for TA98 (529 ± 39); sodium azide (SA) (5 $\mu\text{g}/\text{plate}$) for TA100 (707 ± 36). Positive controls +S9: 2-aminoanthracene (2-AA) (5 $\mu\text{g}/\text{plate}$) for TA98 (179 ± 7) and TA100 ($1,000 \pm 207$).

3.3 In vitro hepatotoxicity profile

Fig. 3 shows the dose-response curves (Fig. 3a-l) and LC_{50} values (Fig. 3m) obtained from the cytotoxicity assays. In the WST-1 assay the compounds less effective in inducing mitochondrial dysfunction damages at the tested concentrations, with exception for compound **2** on HepG2 with, LC_{50} , 24 h $1,202 \pm 1 \mu\text{M}$ and LC_{50} , 72 h $171,1 \pm 1 \mu\text{M}$ (Fig. 3j,l,m). Both normal and cancer cell lines presented mostly membrane damage cytotoxicity measured by LDH assay. F C3H was more sensitive to compound **1** after 48 h of exposure LC_{50} $4.9 \pm 1 \mu\text{M}$ (Fig. 3b,m), while HepG2 was more sensitive to compound **2** after 48 h of exposure LC_{50} $325.5 \pm 2 \mu\text{M}$ (Fig. 3k,m). With exception to HepG2 treated with **1**, LDH 48 h assays presented deviation from linearity when compared with other exposure times.

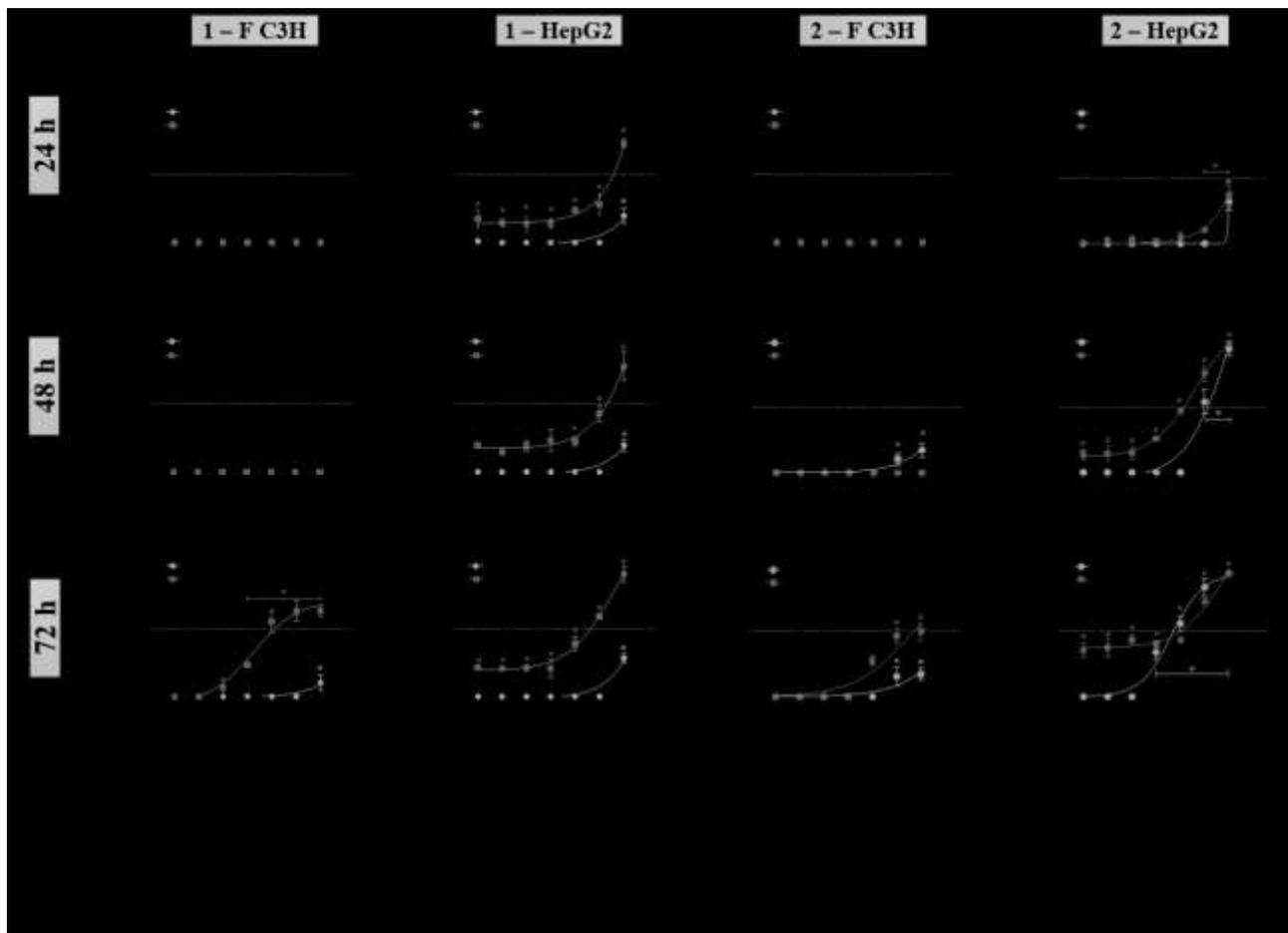


Fig. 3. Eukaryotic cytotoxicity of compounds **1** and **2**. Left columns represent F C3H (**a-c**) and HepG2 (**d-f**) cells exposed to compound **1**. Right columns represent F C3H (**g-i**) and HepG2 (**j-l**) cells exposed to compound **2**. After 24, 48 and 72 h of exposure, mitochondrial function (WST-1 assay, light gray) and cell membrane damage (LDH assay, dark gray) were measured. $n = 3$; *one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test ($p < 0.05$). ^a LC_{50} : The lethal concentration for 50% of cells (**m**), was calculated by non-linear regression of log dose versus normalized response (agonist behavior).

4. Discussion

Since oral route remains the most acceptable administration method, considering patient comfort and compliance, the focus of pharmaceutical research has been drugs with good oral availability, to be administered in a single dose, with few or no side effects and low dosage [31]. In this sense, *in silico* ADMET studies at drug discovery early stages can help to decrease pharmacokinetics related failures in later phases of development [32]. The only unfulfilled criteria for the compounds to fully fit within the Bioavailability Radar was the low fraction C_{sp}^3 , a saturation-based measure of complexity. For Lovering et al. [33], molecules with greater saturation are more likely to succeed from discovery to drug stage, associated with the increase of receptor/ligand complementarity, improvement of physical characteristics, such as solubility, and improvement of potency and selectivity for a given target, mitigating off-target effects.

The compounds are likely not BBB penetrants, minimizing potential neurotoxic effects on the CNS through this gateway, but also reducing the possibility of application in nervous manifestations of diseases caused by trypanosomatids [34–38]. In contrast, in terms of active transport, they were not predicted as P-gp substrates but are potential P-gp inhibitors, interesting characteristics for trypanocidal candidates, since they are likely to be able to escape the resistance mechanism related to this transporter. P-gp (ABCB1), is an efflux transmembrane protein member of ATP-binding cassette transporters (ABC-transporters), associated with the xenobiotics defense mechanism [39,40] and with multi-drug resistance phenotypes [41] in protozoan parasites, including *T. cruzi* [42–45]. Additionally, the compounds are not probable hERG-related cardiotoxicity inducers, a desirable feature for an anti-chagasic candidates, since hERG-induced arrhythmia could aggravate CCC [46].

Regarding cytotoxicity, Papadopoulou et al. [12] assessed the activity of compound **1** on L6 cells (rat skeletal myoblasts) in AlamarBlue assay, also measuring mitochondrial function, obtaining a LC_{50} of 219.5 μ M after 72 h of incubation. Compound **2**, was evaluated by Menozzi [18] on L929 murine fibroblasts in AlamarBlue assay for 96 h, obtaining $LC_{50} > 200$ and $> 1,600$ μ M (SI: 958 and 4.32×10^6), for compounds **1** and **2**, respectively. L6 and L929 cells present different metabolic capability when compared to liver cell lines as F C3H and HepG2, applied as hepatotoxicity indicators, and are often employed as *T. cruzi* host cells, therefore being evaluated for longer periods of incubation [47,48]. For comparison purposes, in the higher exposure period evaluated in the present study, **1** was less cytotoxic to both cell lines, and both compounds induced mostly cell membrane damages. Nonetheless, the LC_{50} values are still higher than the reported IC_{50} values, confirming the greater selectivity of the

compounds for the parasite.

In silico tools for prediction of mutagenicity are an established and useful method to determine initial steps in the identification of DNA reactive agents, aiming to limit potential carcinogenic risks [49]. The first predictive indicator of the mutagenicity of the compounds was the BSA [25], a list containing 105 fragments related with unwanted characteristics, such as toxicity, chemical reactivity, metabolic instability or unfavorable pharmacokinetic properties [50]. Both compounds presented two BSA for nitro groups and oxygen-nitrogen single bond. Ashby and Tennant [20] earlier described definitive relationship among chemical structure, *Salmonella* mutagenicity and rodents carcinogenicity, associating alerts for DNA reactive chemical groups, such as amino/nitro types, including substituents as $-\text{NO}_2$ and $-\text{NO}$. They also demonstrated that 70% of this group were rodent carcinogens, 86% were mutagenic to *Salmonella*, and that the *Salmonella* assay showed high sensitivity for structurally alerting chemicals.

Complementary, the mutagenic potential predicted for the compounds was confirmed by *in vitro* experiments with TA98 and TA100. Considering the limited availability of the compounds, the strains were chosen for their ability to detect 93% of the bacterial mutagens detected collectively by all the TG471-recommended bacterial strains [51,52], reducing cost, time and redundancy of the results. The pre-incubation method, more sensitive to nitrocompounds [53], was effective in detect mutagenicity, since it allows a higher probability of short-lived mutagenic metabolites to react with the tester strains in the small volume of pre-incubation mixture, and consequently higher concentration of S9 mix [54–58].

According to our results, TA98 was more sensitive to detect mutagenicity induced by **1** since the lowest concentrations, indicating frameshift mutations affecting reading frames of nearby repetitive $-\text{C}-\text{G}-\text{C}-\text{G}-\text{C}-\text{G}-\text{C}-\text{G}-$ sequences [59], a characteristic reversion for nitro-aromatic mutagens [27]. Moreover, S9 addition was not necessary to identify DNA damage by compound **1**, suggesting it may act as a direct mutagen or be activated by endogenous bacterial enzymes, as acetyltransferase and nitroreductase [60]. The cytotoxicity of **1** more pronounced on TA100, is possibly related to its genetic background, more sensitive than TA98 to the cytotoxic effects of chemicals [61]. On the other hand, the strains were less sensitive to **2**, which required higher concentrations and metabolic activation to induce frameshift and base-pair substitution [22,62]. Considering the predictive relation of positive mutagens in this assay with rodents carcinogenicity [63], **2** was predicted as a potential carcinogen in rodents.

Mostly, nitroheterocyclic compounds act as pro-drugs, which need to be activated to

exert their bioactivity [64], such as nifurtimox and BZN, activated by an oxygen-insensitive type I nitroreductase (INR), expressed in trypanosomes but absent in mammalian cells. INR fragments the heterocyclic ring by carrying out a series of two-electron reduction reactions, resulting in the production of toxic metabolites [66]. In 2-nitroimidazoles, the hydroxylamine metabolite may undergo rearrangement and hydration, producing a dihydro-dihydroxyimidazole, which after decomposition, releases glyoxal. The latter two products interact with biomolecules, including DNA, forming adducts and thiols [67,68]. Papadopoulou et al. [69] showed that 3-nitro-1,2,4-triazoles are also INR substrates, therefore, it is possible that they have a similar mechanism of action in terms of interaction with the parasite DNA.

As well as 3-nitro-1,2,4-triazoles act as pro-drugs, they also may act as pro-mutagens, inducing mutations after S9 metabolization. S9 fractions contain both microsomal and cytosolic fractions, combining phase I and phase II enzymes [70], including CYP450 members [71]. According to our *in silico* predictions, both compounds are not CYP3A4 inhibitors such as azoles, including ketoconazole and fluconazole [72], but are potential CYP3A4 substrates, which may play a role on the mutagenic activity of **2**. Further, the compounds were predicted as potential CYP1A2, CYP2C19 and CYP2C9 inhibitors, pointing out that in addition to unwanted effects related to mutagenicity, the compounds may lead to drug-drug interactions [73].

Although there are many data available on nitroimidazoles, studies addressing the mutagenicity of nitrotriazoles are still scarce. To our knowledge, this is the first report of mutagenic potential of 3-nitro-1,2,4-triazoles on TA98 and TA100. Papadopoulou et al. [16] evaluated the mutagenicity of a 3-nitrotriazole-based benzylamide with excellent *in vivo* antichagasic activity (IC_{50} 0.113 μ M) using TA98 and TA7001–7006, a set of mixed strains, each of which carries a unique missense mutation in the histidine biosynthetic operon [74]. The compound induced mutation for the mixed strains with S9 at the highest concentration (1000 μ g/mL), toxic to L6 cells (rat skeletal myoblasts). However, at the absence of linear dose-response, the authors assumed the existence of a safe threshold. They also observed that 2-nitroimidazole compounds were associated with mutagenic activity in a greater degree than 3-nitrotriazoles.

In megazol, the mutagenic activity is associated with the reduction of the nitro group at position 5 of the nitroimidazole ring [75]. However, Boechat et al. [19] demonstrated that the nitro group is not solely responsible for nitroimidazoles genotoxic activity, showing the importance of the study of nitroderivatives to understand which substitutions can reduce or

eliminate mutagenic effects, maintaining the trypanocidal potential. It is also important to emphasize that despite the high predictive value for rodent carcinogenicity when a positive response is obtained, mutagenicity in *S. typhimurium* strains is not necessarily translated to mutagenicity in humans [16]. For instance, despite BZN mutagenicity in humans has never been reported, it shows significant mutagenicity at relatively low concentrations ($> 50 \mu\text{g/ml}$) for TA98 [76] and TA100 [77]. Furthermore, in a mutagenicity study with the serum and urine from guinea pigs, Ferreira et al. [78] demonstrated that BZN is not metabolized by the mammalian host into stable mutagenic derivatives detectable by *S. typhimurium* strains, suggesting reduced risk of potential carcinogenic effects in humans. Thus, considering the promising selectivity of 3-nitro-1,2,4-triazoles derivatives, their genotoxic potential must be better enlightened using different models of assessment [79], providing information on the best substituents for the development of safer and more effective prototypes of trypanocidal compound.

5. Conclusion

In summary, we demonstrated that the type of substituent bonded to the 3-nitro-1,2,4-triazole derivatives has a significant influence on their toxicity profile. Compound **1** was mutagenic to all concentrations tested for TA98 without metabolic activation, while both tested strains were less sensitive to compound **2**, which only induced mutations at highest concentrations. These findings stimulate further studies, to better understand the extension of the DNA damage induced by the compounds, aiming at a better understanding of the mechanisms and magnitude of the effects observed in this study. Additionally, we observed a large safe threshold between **2** mutagenic and trypanocidal concentrations, which may be applied in future evaluations of the trypanocidal efficacy of the compounds in other evolutive forms and in the *in vivo* model of *T. cruzi* infection.

Author's Contribution

CFA-L and IF supervised the project and designed the experiments. BVDG firstly wrote the manuscript, with contributions from all authors. IF, CFA-L revised and final edited the manuscript. The compounds were synthesized and characterized by CACM, FSC-B and NB. *In silico* predictions and statistical analysis were performed by BVDG. Mutagenicity assays were conducted by BVDG, EKC-D and LVS. Eukaryotic cytotoxicity assay was conducted by BVDG, LVS and CFA-L. All authors critically revised the manuscript and gave their final

approval.

Declaration of competing interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank to Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) and Organic Synthesis Lab crew, headed by Dr Nubia Boechat for providing and characterizing the compounds. The authors thank the financial support by Coordination of Superior Level Staff Improvement (CAPES) (Code 0001); The Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ), awards: E-26/202.759/2017 (IF), E-26/010.002119/2019 (CFA-L and IF), E-26/010.100956/2018 (CFA-L); and The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), awards: 302345/2017-5 (IF).

References

- [1] B.Y. Lee, K.M. Bacon, M.E. Bottazzi, P.J. Hotez, Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model, *Lancet Infect. Dis.* 13 (2013) 342–348. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70002-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70002-1).
- [2] N. Elkheir, J. Carter, A. García-Mingo, P. Chiodini, Chagas disease in non-endemic settings, *BMJ.* 373 (2021) n901. <https://doi.org/10.1136/bmj.n901>.
- [3] M. da S. BRASIL, Boletim epidemiológico: Doença de Chagas, (2021). https://www.gov.br/saude/ptbr/media/pdf/2021/abril/14/boletim_especial_chagas_14abr_21_b.pdf.
- [4] WHO, Chagas disease (American trypanosomiasis), World Health Organ. (2020). <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/chagas-disease> (accessed October 31, 2021).
- [5] WHO, Chagas disease, World Health Organ. (2021). [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)) (accessed October 31, 2021).
- [6] C. Chagas, Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1 (1909) 159–218. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761909000200008>.
- [7] C. Bern, Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease, *N. Engl. J. Med.* 364 (2011) 2527–2534. <https://doi.org/10.1056/NEJMct1014204>.
- [8] D.L. Fabbro, M.L. Streiger, E.D. Arias, M.L. Bizai, M. del Barco, N.A. Amicone, Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe city (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 40 (2007) 1–10. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822007000100001>.
- [9] M. da S. BRASIL, Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença de Chagas,

- Ministério da Saúde, Brasília, DF, 2018. http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2018/Recomendacao/Relatorio_PCDT_Doenca_de_Chagas.pdf.
- [10] W. Apt, Treatment of Chagas disease, in: *Am. Trypanos. Chagas Dis.*, Elsevier, 2017: pp. 751–771. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00032-0>.
- [11] J. de O. Viana, M.B. Félix, M. dos S. Maia, V. de L. Serafim, L. Scotti, M.T. Scotti, Drug discovery and computational strategies in the multitarget drugs era, *Braz. J. Pharm. Sci.* 54 (2018). <https://doi.org/10.1590/s2175-97902018000001010>.
- [12] M.V. Papadopoulou, W.D. Bloomer, G.I. Lepesheva, H.S. Rosenzweig, M. Kaiser, B. Aguilera-Venegas, S.R. Wilkinson, E. Chatelain, J.-R. Ioset, Novel 3-Nitrotriazole-Based Amides and Carbinols as Bifunctional Antichagasic Agents, *J. Med. Chem.* 58 (2015) 1307–1319. <https://doi.org/10.1021/jm5015742>.
- [13] C. Nava-Zuazo, F. Chávez-Silva, R. Moo-Puc, M.J. Chan-Bacab, B.O. Ortega-Morales, H. Moreno-Díaz, D. Díaz-Coutiño, E. Hernández-Núñez, G. Navarrete-Vázquez, 2-Acylamino-5-nitro-1,3-thiazoles: Preparation and *in vitro* bioevaluation against four neglected protozoan parasites, *Bioorg. Med. Chem.* 22 (2014) 1626–1633. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.01.029>.
- [14] V. Sueth-Santiago, D. Decote-Ricardo, A. Morrot, C.G. Freire-de-Lima, M.E.F. Lima, Challenges in the chemotherapy of Chagas disease: Looking for possibilities related to the differences and similarities between the parasite and host, *World J. Biol. Chem.* 8 (2017) 57. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v8.i1.57>.
- [15] S. Patterson, S. Wyllie, Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects, *Trends Parasitol.* 30 (2014) 289–298. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.04.003>.
- [16] M.V. Papadopoulou, W.D. Bloomer, H.S. Rosenzweig, R. Ashworth, S.R. Wilkinson, M. Kaiser, G. Andriani, A. Rodriguez, Novel 3-nitro-1H-1,2,4-triazole-based compounds as potential anti-Chagasic drugs: *in vivo* studies, *Future Med. Chem.* 5 (2013) 1763–1776. <https://doi.org/10.4155/fmc.13.108>.
- [17] M.V. Papadopoulou, W.D. Bloomer, H.S. Rosenzweig, E. Chatelain, M. Kaiser, S.R. Wilkinson, C. McKenzie, J.-R. Ioset, Novel 3-Nitro-1H-1,2,4-triazole-based Amides and Sulfonamides as Potential anti-Trypanosomal Agents, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 5554–5565. <https://doi.org/10.1021/jm300508n>.
- [18] C.A.C. Menozzi, Obtenção de novos derivados contendo os grupos bifenila e 3-nitro-1,2,4-triazol como agentes anti-*Trypanosoma cruzi*, Dissertação (Mestrado em Farmacologia e Química Medicinal), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2019.
- [19] N. Boechat, A.S. Carvalho, K. Salomão, S.L. de Castro, C.F. Araujo-Lima, F.V. Mello, I. Felzenszwalb, C.A. Aiub, T.R. Conde, H.P. Zamith, R. Skupin, G. Haufe, Studies of genotoxicity and mutagenicity of nitroimidazoles: demystifying this critical relationship with the nitro group, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 110 (2015) 492–499. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140248>.
- [20] J. Ashby, R.W. Tennant, Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP, *Mutat. Res. Genet. Toxicol.* 257 (1991) 229–306. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(91\)90003-E](https://doi.org/10.1016/0165-1110(91)90003-E).
- [21] P. Kovacic, R. Somanathan, Nitroaromatic compounds: Environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism: Nitro aromatic pollutants, *J. Appl. Toxicol.* 34 (2014) 810–824. <https://doi.org/10.1002/jat.2980>.
- [22] K. Mortelmans, E. Zeiger, The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 455 (2000) 29–60.

- 5107(00)00064-6.
- [23] A. Maunz, M. Gütlein, M. Rautenberg, D. Vorgrimmler, D. Gebele, C. Helma, Iazar: a modular predictive toxicology framework, *Front. Pharmacol.* 4 (2013). <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00038>.
- [24] D.E.V. Pires, T.L. Blundell, D.B. Ascher, pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures, *J. Med. Chem.* 58 (2015) 4066–4072. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>.
- [25] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules, *Sci. Rep.* 7 (2017) 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.
- [26] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019>.
- [27] D.M. Maron, B.N. Ames, Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* 113 (1983) 173–215. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9).
- [28] K.C. Chu, K.M. Patel, A.H. Lin, R.E. Tarone, M.S. Linhart, V.C. Dunkel, Evaluating statistical analyses and reproducibility of microbial mutagenicity assays, *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* 85 (1981) 119–132. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(81\)90027-3](https://doi.org/10.1016/0165-1161(81)90027-3).
- [29] Roche, Cell Proliferation Reagent WST-1, (2021). <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/350/519/cellprorobul.pdf>.
- [30] Roche, Cytotoxicity Detection Kit (LDH), (2016). <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/215/534/11644793001bul.pdf>.
- [31] O. Ursu, A. Rayan, A. Goldblum, T.I. Oprea, Understanding drug-likeness, *WIREs Comput. Mol. Sci.* 1 (2011) 760–781. <https://doi.org/10.1002/wcms.52>.
- [32] A. Daina, V. Zoete, A BOILED-Egg to Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules, *ChemMedChem.* 11 (2016). <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600182>.
- [33] F. Lovering, J. Bikker, C. Humblet, Escape from Flatland: Increasing Saturation as an Approach to Improving Clinical Success, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 6752–6756. <https://doi.org/10.1021/jm901241e>.
- [34] W. Masocha, K. Kristensson, Human African trypanosomiasis: How do the parasites enter and cause dysfunctions of the nervous system in murine models?, *Brain Res. Bull.* 145 (2019) 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.05.022>.
- [35] A. Alencar, Encefalopatia crônica chagásica, *J. Bras. Neurol.* 18 (1982) 7–12.
- [36] J. Oliveira-Filho, R.M. Vieira-de-Melo, P.S.O. Reis, A.M. Lacerda, I.S. Neville, C. Cincura, D.F. Menezes, L.C. Viana, P.A.P. Jesus, A.A. Lopes, F.J.F.B. Reis, K.L. Furie, Chagas disease is independently associated with brain atrophy, *J. Neurol.* 256 (2009) 1363–1365. <https://doi.org/10.1007/s00415-009-5105-7>.
- [37] M.O. Py, Neurologic Manifestations of Chagas Disease, *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 11 (2011) 536–542. <https://doi.org/10.1007/s11910-011-0225-8>.
- [38] A. Silva, G. Vilar, A. Souza, R. Silva, M. Rocha, J. Lannes-Vieira, *Trypanosoma cruzi*-Induced Central Nervous System Alterations: From the Entry of Inflammatory Cells to Potential Cognitive and Psychiatric Abnormalities, *J. Neuroparasitology.* 1 (2010). <https://doi.org/10.4303/jnp/N100901>.

- [39] F. Broccatelli, E. Carosati, A. Neri, M. Frosini, L. Goracci, T.I. Oprea, G. Cruciani, A Novel Approach for Predicting P-glycoprotein (ABCB1) Inhibition Using Molecular Interaction Fields, *J. Med. Chem.* 54 (2011) 1740–1751. <https://doi.org/10.1021/jm101421d>.
- [40] F. Montanari, G.F. Ecker, Prediction of drug–ABC-transporter interaction — Recent advances and future challenges, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 86 (2015) 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.03.001>.
- [41] A.H. Schinkel, J.W. Jonker, Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55 (2003) 3–29. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(02\)00169-2](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00169-2).
- [42] M.C.O. Campos, D.B. Castro-Pinto, G.A. Ribeiro, M.M. Berredo-Pinho, L.H.F. Gomes, M.S. da Silva Bellieny, C.M. Goulart, Á. Echevarria, L.L. Leon, P-glycoprotein efflux pump plays an important role in *Trypanosoma cruzi* drug resistance, *Parasitol. Res.* 112 (2013) 2341–2351. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3398-z>.
- [43] J. Franco, R.C. Ferreira, S. Jenne, B. Zingales, ABCG-like transporter of *Trypanosoma cruzi* involved in benznidazole resistance: Gene polymorphisms disclose inter-strain intragenic recombination in hybrid isolates, *Infect. Genet. Evol.* 31 (2015) 198–208. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.01.030>.
- [44] P.K. Pramanik, M.N. Alam, D. Roy Chowdhury, T. Chakraborti, Drug Resistance in Protozoan Parasites: An Incessant Wrestle for Survival, *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 18 (2019) 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.01.023>.
- [45] B. Zingales, R.G.A. Araujo, M. Moreno, J. Franco, P.H.N. Aguiar, S.L. Nunes, M.N. Silva, S. Jenne, C.R. Machado, A. Brandão, A novel ABCG-like transporter of *Trypanosoma cruzi* is involved in natural resistance to benznidazole, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 110 (2015) 433–444. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140407>.
- [46] A. Rassi, J.A. Marin, A. Rassi, Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of etiological treatment following the Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 112 (2017) 224–235. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160334>.
- [47] H.H.J. Gerets, K. Tilmant, B. Gerin, H. Chanteux, B.O. Depelchin, S. Dhalluin, F.A. Atienzar, Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins, *Cell Biol. Toxicol.* 28 (2012) 69–87. <https://doi.org/10.1007/s10565-011-9208-4>.
- [48] B.V.D. Galvão, C.F. Araujo-Lima, M.C. Pereira dos Santos, M.P. Seljan, E.K. Carrão-Dantas, C.A. Fortes Aiub, L.C. Cameron, M.S. Larráz Ferreira, E.C. Branco de Andrade Goncalves, I. Felzenszwalb, *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Jaboticaba) leaf extract: *in vitro* anti-*Trypanosoma cruzi* activity, toxicity assessment and phenolic-targeted UPLC-MSE metabolomic analysis, *J. Ethnopharmacol.* (2021) 114217. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114217>.
- [49] J.D. Wichard, *In silico* prediction of genotoxicity, *Food Chem. Toxicol.* 106 (2017) 595–599. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.12.013>.
- [50] R. Brenk, A. Schipani, D. James, A. Krasowski, I.H. Gilbert, J. Frearson, P.G. Wyatt, Lessons Learnt from Assembling Screening Libraries for Drug Discovery for Neglected Diseases, *ChemMedChem.* 3 (2008) 435–444. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200700139>.
- [51] R.V. Williams, D.M. DeMarini, L.F. Stankowski, P.A. Escobar, E. Zeiger, J. Howe, R. Elespuru, K.P. Cross, Are all bacterial strains required by OECD mutagenicity test guideline TG471 needed?, *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 848 (2019) 503081. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.503081>.

- [52] OECD, Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD, 2020. <https://doi.org/10.1787/9789264071247-en>.
- [53] D. Gatehouse, S. Haworth, T. Cebula, E. Gocke, L. Kier, T. Matsushima, C. Melcion, T. Nohmi, T. Ohta, S. Venitt, E. Zeiger, Recommendations for the performance of bacterial mutation assays, *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* 312 (1994) 217–233. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(94\)90037-X](https://doi.org/10.1016/0165-1161(94)90037-X).
- [54] S. Haworth, T. Lawlor, K. Mortelmans, W. Speck, E. Zeiger, *Salmonella* mutagenicity test results for 250 chemicals, *Environ. Mutagen.* 5 Suppl 1 (1983) 1–142.
- [55] K. Mortelmans, S. Haworth, T. Lawlor, W. Speck, B. Tainer, E. Zeiger, *Salmonella* mutagenicity tests: II. Results from the testing of 270 chemicals, *Environ. Mutagen.* 8 Suppl 7 (1986) 1–119.
- [56] T. Yahagi, M. Degawa, Y. Seino, T. Matsushima, M. Nagao, T. Sugimura, Y. Hashimoto, Mutagenicity of carcinogenic azo dyes and their derivatives, *Cancer Lett.* 1 (1975) 91–96. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(75\)95563-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(75)95563-9).
- [57] E. Zeiger, B. Anderson, S. Haworth, T. Lawlor, K. Mortelmans, W. Speck, *Salmonella* mutagenicity tests: III. Results from the testing of 255 chemicals, *Environ. Mutagen.* 9 Suppl 9 (1987) 1–109.
- [58] E. Zeiger, R.S. Chhabra, B.H. Margolin, Effects of the hepatic S9 fraction from aroclor-1254-treated rats on the mutagenicity of benzo[a]pyrene and 2-aminoanthracene in the *Salmonella*/microsome assay, *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* 64 (1979) 379–389. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(79\)90108-0](https://doi.org/10.1016/0165-1161(79)90108-0).
- [59] K. Isono, J. Yourno, Chemical Carcinogens as Frameshift Mutagens: *Salmonella* DNA Sequence Sensitive to Mutagenesis by Polycyclic Carcinogens, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71 (1974) 1612–1617.
- [60] F. Kummrow, C.M. Rech, C.A. Coimbra, D.A. Roubicek, G. de A. Umbuzeiro, Comparison of the mutagenic activity of XAD4 and blue rayon extracts of surface water and related drinking water samples, *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 541 (2003) 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.07.011>.
- [61] J. Jurado, E. Alejandro-Durán, C. Pueyo, Genetic differences between the standard Ames tester strains TA100 and TA98, *Mutagenesis.* 8 (1993) 527–532. <https://doi.org/10.1093/mutage/8.6.527>.
- [62] W. Barnes, Base-sequence analysis of his⁺ revertants of the hisG46 missense mutation in *Salmonella typhimurium*, *Env. Mutagen.* 4 (1982) 297.
- [63] J. McCann, E. Choi, E. Yamasaki, B.N. Ames, Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72 (1975) 5135–5139. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.12.5135>.
- [64] A.S. de Carvalho, K. Salomão, S.L. de Castro, T.R. Conde, H.P. da S. Zamith, E.R. Caffarena, B.S. Hall, S.R. Wilkinson, N. Boechat, Megazol and its bioisostere 4H-1,2,4-triazole: comparing the trypanocidal, cytotoxic and genotoxic activities and their *in vitro* and *in silico* interactions with the *Trypanosoma brucei* nitroreductase enzyme, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 109 (2014) 315–323. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140497>.
- [65] A.S. de Carvalho, R. Menna-Barreto, N. Romeiro, S. de Castro, N. Boechat, Design, Synthesis and Activity Against *Trypanosoma cruzi* of Azaheterocyclic Analogs of Megazol, *Med. Chem.* 3 (2007) 460–465. <https://doi.org/10.2174/157340607781745519>.
- [66] S.R. Wilkinson, C. Bot, J.M. Kelly, B.S. Hall, Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives, *Curr. Top. Med. Chem.* 11 (2011) 2072–2084. <https://doi.org/10.2174/156802611796575894>.
- [67] G.F. Whitmore, A.J. Varghese, S. Gulyas, Reaction of 2-nitroimidazole metabolites with guanine and possible biological consequences, *IARC Sci. Publ.* (1986) 185–196.

- [68] G.F. Whitmore, A.J. Varghese, The biological properties of reduced nitroheterocyclics and possible underlying biochemical mechanisms, *Biochem. Pharmacol.* 35 (1986) 97–103. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(86\)90565-4](https://doi.org/10.1016/0006-2952(86)90565-4).
- [69] M.V. Papadopoulou, W.D. Bloomer, H.S. Rosenzweig, I.P. O’Shea, S.R. Wilkinson, M. Kaiser, E. Chatelain, J.-R. Ioset, Discovery of potent nitrotriazole-based antitrypanosomal agents: *In vitro* and *in vivo* evaluation, *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 6467–6476. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.08.014>.
- [70] Y. Parmentier, M.-J. Bossant, M. Bertrand, B. Walther, 5.10 - *In vitro* Studies of Drug Metabolism, in: J.B. Taylor, D.J. Triggle (Eds.), *Compr. Med. Chem. II*, Elsevier, Oxford, 2007: pp. 231–257. <https://doi.org/10.1016/B0-08-045044-X/00125-5>.
- [71] A.W. Hayes, Principles and methods of toxicology, Raven Press, New York, 1994.
- [72] R.G. Tirona, R.B. Kim, Introduction to Clinical Pharmacology, in: *Clin. Transl. Sci.*, Elsevier, 2017: pp. 365–388. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802101-9.00020-X>.
- [73] M.F. Paine, H.L. Hart, S.S. Ludington, R.L. Haining, A.E. Rettie, D.C. Zeldin, The human intestinal cytochrome P450, *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 34 (2006) 880–886. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.008672>.
- [74] P. Gee, D.M. Maron, B.N. Ames, Detection and classification of mutagens: a set of base-specific *Salmonella* tester strains, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 11606–11610. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.24.11606>.
- [75] F. Nessler, S. Brugier, M.-A. Mouriès, F. Le Curieux, D. Marzin, *In vitro* and *in vivo* chromosomal aberrations induced by megalol, *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 560 (2004) 147–158. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.02.013>.
- [76] M. Cabrera, M.L. Lavaggi, P. Hernández, A. Merlino, A. Gerpe, W. Porcal, M. Boiani, A. Ferreira, A. Monge, A.L. de Cerain, M. González, H. Cerecetto, Cytotoxic, mutagenic and genotoxic effects of new anti-*T. cruzi* 5-phenylethylbenzofuroxans. Contribution of phase I metabolites on the mutagenicity induction, *Toxicol. Lett.* 190 (2009) 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.07.006>.
- [77] R. Nagel, Genotoxicity studies with two antichagasic drugs, *Mutat. Res. Lett.* 191 (1987) 17–20. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(87\)90164-3](https://doi.org/10.1016/0165-7992(87)90164-3).
- [78] R.C. Ferreira, M.E. de Melo, M.A. Moraes Júnior, L.C. Ferreira, Evaluation of genotoxic activity in the blood and urine of guinea pigs treated with nifurtimox and benzimidazole, *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol.* 21 (1988) 1069–1077.
- [79] R. Corvi, F. Madia, *In vitro* genotoxicity testing—Can the performance be enhanced?, *Food Chem. Toxicol.* 106 (2017) 600–608. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.08.024>.

Table S1Comparison between pKCSM and SwissADME pharmacokinetic (ADME) properties prediction of compound **1**.

Property	pKCSM			SwissADME	
	Model name	Unit	Prediction	Unit	Prediction
Absorption	Water solubility (consensus)	Numeric (mmol/L)	0.029	Numeric (mmol/L)	0.026
Absorption	GI ^a absorption (human)	Numeric (% Absorbed)	95.654	Categorical (Low/High)	High
Absorption	Skin Permeability	Numeric (log Kp)	-2.670	Numeric (log Kp)	-5.840
Absorption	P-glycoprotein substrate	Categorical (Yes/No)	No	Categorical (Yes/No)	No
Absorption	P-glycoprotein inhibitor	Categorical (Yes/No)	Yes	n.a. ^g	—
Distribution	VDss ^b (human)	Numeric (L/kg)	0.371	n.a.	—
Distribution	Fraction unbound (human)	Numeric (Fu)	0.058	n.a.	—
Distribution	BBB ^c permeability	Numeric (log BB)	-0.818	Categorical (Yes/No)	No
Distribution	CNS ^d permeability	Numeric (log PS)	-2.292	n.a.	—
Metabolism	CYP2D6 ^e substrate	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—
Metabolism	CYP3A4 substrate	Categorical (Yes/No)	Yes	n.a.	—
Metabolism	CYP1A2 inhibitor	Categorical (Yes/No)	Yes	Categorical (Yes/No)	Yes
Metabolism	CYP2C19 inhibitor	Categorical (Yes/No)	Yes	Categorical (Yes/No)	Yes
Metabolism	CYP2C9 inhibitor	Categorical (Yes/No)	Yes	Categorical (Yes/No)	Yes
Metabolism	CYP2D6 inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	Categorical (Yes/No)	No
Metabolism	CYP3A4 inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	Categorical (Yes/No)	No
Excretion	Total Clearance	Numeric (ml/min/kg)	1.556	n.a.	—
Excretion	Renal OCT2 ^f substrate	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—

^a GI: gastrointestinal. ^b VDss: volume of distribution at steady state. ^c BBB: blood-brain barrier. ^d CNS: central nervous system. ^e CYP: cytochrome P450. ^f OCT: organic cation transporter. ^g n.a.: not analyzed.

Table S2

Comparison between pKCSM and LAZAR toxicity prediction of compound 1.

Model Name	pKCMS		LAZAR	
	Unit	Prediction	Unit	Prediction
Ames toxicity	Categorical (Yes/No)	Yes	Categorical (Yes/No)	Yes
hERG ^a I inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—
hERG II inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—
Oral Rat Acute Toxicity (LD ₅₀ ^b)	Numeric (mol/kg)	2.592	n.a.	—
Oral Rat Chronic Toxicity (LOAEL ^c)	Numeric (mg/kg/day)	27.6	n.a.	—
Carcinogenicity (Rodents)	n.a. ^e	—	Categorical (Yes/No)	No
Hepatotoxicity	Categorical (Yes/No)	Yes	n.a.	—
Skin Sensitization	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—
Maximum tolerated dose (human)	Numeric (mg/kg/day)	2.023	Numeric (mg/kg/day)	17.6
<i>Tetrahymena pyriformis</i> toxicity (pIGC ₅₀ ^d)	Numeric (log µg/L)	0.532	n.a.	—
Fathead minnow toxicity	Numeric (mM)	7.145	Numeric (mM)	0.206

^a hERG: human Ether-a-go-go-Related Gene. ^b LD₅₀: median lethal dose. ^c LOAEL: lowest observed adverse effect level. ^d pIGC₅₀: negative logarithm of 50% growth inhibitory concentration. ^e n.a.: not analyzed.

Table S3Comparison between pKCSM and SwissADME pharmacokinetic (ADME) properties prediction of compound **2**.

Property	Model name	pKCMS		SwissADME	
		Unit	Prediction	Unit	Prediction
Absorption	Water solubility (consensus)	Numeric (mmol/L)	0.07	Numeric (mmol/L)	0.204
Absorption	GI absorption (human)	Numeric (% Absorbed)	90.867	Categorical (Low/High)	High
Absorption	Skin Permeability	Numeric (log Kp)	-2.679	Numeric (log Kp)	-6.84
Absorption	P-glycoprotein substrate	Categorical (Yes/No)	No	Categorical (Yes/No)	No
Absorption	P-glycoprotein inhibitor	Categorical (Yes/No)	Yes	n.a. ^g	—
Distribution	VDss ^b (human)	Numeric (L/kg)	0.465	n.a.	—
Distribution	Fraction unbound (human)	Numeric (Fu)	0.071	n.a.	—
Distribution	BBB ^c permeability	Numeric (log BB)	-0.831	Categorical (Yes/No)	No
Distribution	CNS ^d permeability	Numeric (log PS)	-2.454	n.a.	—
Metabolism	CYP2D6 ^e substrate	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—
Metabolism	CYP3A4 substrate	Categorical (Yes/No)	Yes	n.a.	—
Metabolism	CYP1A2 inhibitor	Categorical (Yes/No)	Yes	Categorical (Yes/No)	No
Metabolism	CYP2C19 inhibitor	Categorical (Yes/No)	Yes	Categorical (Yes/No)	Yes
Metabolism	CYP2C9 inhibitor	Categorical (Yes/No)	Yes	Categorical (Yes/No)	Yes
Metabolism	CYP2D6 inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	Categorical (Yes/No)	No
Metabolism	CYP3A4 inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	Categorical (Yes/No)	No
Excretion	Total Clearance	Numeric (ml/min/kg)	1.51	n.a.	—
Excretion	Renal OCT2 ^f substrate	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—

^a GI: gastrointestinal. ^b VDss: volume of distribution at steady state. ^c BBB: brain blood barrier. ^d CNS: central nervous system. ^e CYP: cytochrome P450. ^f OCT: organic cation transporter. ^g n.a.: not analyzed.

Table S4

Comparison between pKCSM and LAZAR toxicity prediction of compound 2.

Model Name	pKCMS		LAZAR	
	Unit	Prediction	Unit	Prediction
Ames toxicity	Categorical (Yes/No)	Yes	Categorical (Yes/No)	Yes
hERG ^a I inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—
hERG II inhibitor	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—
Oral Rat Acute Toxicity (LD ₅₀ ^b)	Numeric (mol/kg)	2.627	n.a.	—
Oral Rat Chronic Toxicity (LOAEL ^c)	Numeric (mg/kg/day)	13.8	n.a.	—
Carcinogenicity (Rodents)	n.a. ^e	—	Categorical (Yes/No)	Yes
Hepatotoxicity	Categorical (Yes/No)	Yes	n.a.	—
Skin Sensitization	Categorical (Yes/No)	No	n.a.	—
Maximum tolerated dose (human)	Numeric (mg/kg/day)	1.803	n.a.	—
<i>Tetrahymena pyriformis</i> toxicity (pIGC ₅₀ ^d)	Numeric (log µg/L)	0.517	n.a.	—
Fathead minnow toxicity	Numeric (mM)	0.032	n.a.	—

^a hERG: human Ether-a-go-go-Related Gene. ^b LD₅₀: median lethal dose. ^c LOAEL: lowest observed adverse effect level. ^d pIGC₅₀: negative logarithm of 50% growth inhibitory concentration. ^e n.a.: not analyzed.

4 DISCUSSÃO

O primeiro trabalho apresentado nesta dissertação explorou a atividade tripanocida e perfil fenólico, farmacocinético e toxicológico do extrato hidrometanólico da folha de *P. cauliflora*. O tipo de sistema-solvente e polaridade influenciam diretamente no rendimento, composição e capacidade antioxidante de um extrato. Esta última está relacionada a transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio e a presença de compostos não antioxidantes, que pode variar em função da matriz vegetal utilizada (MOURE et al., 2001; PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006). O metanol é um solvente amplamente empregado para extração de fitoquímicos, tendo o sistema-solvente metanol/água a 20% (v/v) uma maior eficiência de extração de fenólicos antioxidantes (DA SILVA et al., 2017). Investigações preliminares conduzidas por Napolini et al. (2016) demonstraram que o extrato hidrometanólico (80:20) da folha de *P. cauliflora* possuía maior conteúdo fenólico e capacidade antioxidante que o hidroetanólico (40:60), motivando sua escolha para estudo no item 3.1.

Segundo a caracterização metabolômica, o extrato era majoritariamente composto por flavonoides, sobretudo (+)- catequina, ácido digálico e hesperidina. Corroborando com Napolini et al. (2016), o conteúdo fenólico diferiu daquele obtido pela extração hidroetanólica. Apesar de apresentar constituintes similares ao fruto, como quercetina e derivados, o extrato das folhas se diferenciou especialmente pela ausência de ácido elágico e presença de flavononas (DONADO-PESTANA et al., 2018; NEVES et al., 2018; INADA et al., 2020). Especificidades na variedade e abundância dos compostos se relacionam a diferenças de propriedades biológicas entre as partes da planta (GASPAROTTO; DE SOUZA; LÍVERO, 2019).

A partir disso, os três constituintes mais abundantes foram submetidos a análise *in silico*. Um dos primeiros parâmetros considerados na escolha de moléculas a serem priorizadas para síntese é o *score* de acessibilidade sintética (SA), que estima a facilidade de síntese (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017), um ponto relevante no desenvolvimento de fármacos de menor custo para doenças negligenciadas (DNDI, 2008). O SA predito no *SwissADME* é baseado na correlação da facilidade de síntese com a frequência de fragmentos em moléculas “realmente” sintetizáveis, resultando numa escala de 1 (muito fácil) a 10 (muito difícil). Entre as três moléculas, o ácido digálico e a (+)- catequina tiveram os menores AS, relativamente baixos, além de apresentarem melhor perfil de *lead-likeness*.

Outro fator a ser planejado é a rota de administração baseando-se em propriedades farmacocinéticas. A via oral permanece como a mais aceitável, considerando o conforto do paciente, acessibilidade e simplicidade de utilização em áreas remotas (DNDI, 2012). Logo, as pesquisas farmacêuticas focam em fármacos com boa disponibilidade oral, para administração de dose única, com poucos ou nenhum efeito adverso (URSU et al., 2011). Nesse sentido, estudos ADMET *in silico* nas fases iniciais da descoberta de fármacos podem ajudar a reduzir falhas relacionadas a farmacocinética em fases tardias do desenvolvimento (DAINA; ZOETE, 2016).

Um parâmetro de biodisponibilidade oral frequentemente utilizado é a regra de Lipinski (2012), que descreve propriedades que definem a probabilidade de uma molécula se tornar um fármaco oralmente disponível, conhecidas como *drug-likeness* (similaridade a fármaco). Entre os fenólicos analisados, a (+)- catequina foi a única molécula que cumpriu a regra de Lipinski, em acordo com seu *score* de biodisponibilidade de 0.55, que indica uma probabilidade de ter ao menos 10% de biodisponibilidade oral em ratos ou em permeabilidade mensurável em células epiteliais de intestino humano Caco-2 (MARTIN, 2005). Apesar da hesperidina ser a única a não apresentar alertas estruturais para fragmentos indutores de toxicidade, instabilidade metabólica, ou de falsos positivos em ensaios biológicos, ela não apresentou indicadores adequados de SA, *drug-likeness* e *lead-likeness*.

Em continuidade, os compostos foram preditos como não-mutagênicos e não-carcinogênicos, e nos ensaios *in vitro*, o extrato não induziu mutações pontuais em *S. Typhimurium*, independentemente de ativação metabólica, e também não produziu aumento na frequência de micronúcleos. Até então, não havia nenhuma informação publicada sobre a genotoxicidade das folhas de *P. cauliflora*, porém os dados disponíveis sobre seus constituintes, os descrevem como agentes quimiopreventivos e não genotóxicos (AHMADI; SHADBOORESTAN, 2016; CALOMME et al., 1996). Recentemente, a casca da fruta e sementes de *P. cauliflora* têm sido investigadas. Palozzi et al. (2020) investigou uma fração etanólica das cascas do fruto de *P. cauliflora*, sem observar toxicidade significativa nos ensaios de cometa, micronúcleo *in vivo* e teste de Ames com TA98 e TA100. A pedunculagina, uma elagitanina isolada das sementes, não induziu mutações, porém protegeu *S. Typhimurium* contra danos no DNA induzidos por agentes mutagênicos (SILVA FERNANDES et al., 2021). Por outro lado, a pedunculagina foi citotóxica e genotóxica em linfócitos humanos, apesar de reduzir a danos induzidos pela doxorubicina no co- e pós-tratamento.

As linhagens hepáticas avaliadas foram mais sensíveis à disfunção mitocondrial, que associada a manutenção da integridade da membrana, pode sugerir morte celular por apoptose, evento mais desejável para HepG2, mas que entretanto foi mais evidente em F C3H. Wang et al. (2014) estudaram o papel das proteínas regulatórias Bcl-2, Bcl-xL, Bid e survivina na morte de células de carcinoma escamoso oral humano (HSC-3) expostas ao extrato aquoso de sementes de *P. cauliflora*, que induziu efeito antiproliferativo e apoptose por regulação negativa da survivina. No item 3.1, o extrato exibiu efeitos citotóxicos e citostáticos sobre HepG2 em concentrações não-mutagênicas, reforçando evidências acerca do potencial antitumoral de *P. cauliflora* (WU; LONG; KENNELLY, 2013; WANG et al., 2014; YE et al., 2019).

Poucos PN avaliados contra *T. cruzi* são eficazes a uma concentração de 10 µg/mL, considerando que o IC₅₀ para NFX e BZN é inferior a 3 µg/mL (APT, 2017). Isto posto, o principal achado deste trabalho foi a atividade inibitória do extrato sobre tripomastigotas sanguíneas em baixas concentrações, adicionando uma nova atividade ao conjunto de propriedades antimicrobianas descritas para *P. cauliflora* (CARVALHO et al., 2009; SOUZA-MOREIRA et al., 2011; CHAVASCO et al., 2014). A ação inibitória do óleo essencial da folha foi previamente descrita para promastigotas de *L. amazonensis* (DA SILVA et al., 2018), mas esta é a primeira publicação descrevendo sua ação fenotípica sobre *T. cruzi*.

Outros membros da família Myrtaceae também apresentam potencial anti-protozoário, incluindo espécies dos gêneros *Plinia* e *Myrciaria*, que formam um grupo monofilético denominado “Complexo *Plinia*” (DE SOUSA, 2009). Durant et al. (2014) estudaram o óleo essencial da folha de *P. cerrocampensis*, demonstrando sua alta atividade antimalárica e ação sinérgica com a cloroquina. *M. dubia*, popularmente conhecida como camu-camu ou jabuticaba da Amazônia (MUNIZ, 2020), é utilizada na medicina tradicional peruana para tratamento da malária. O extrato diclorometanólico de suas folhas apresentou atividade leishmanicida e antiplasmódica, em cepa de *P. falciparum* resistente a cloroquina (W2), em concentrações não citotóxicas para HepG2 (CORREIA et al., 2016). Suas sementes também possuem atividade antiplasmódica sobre a cepa W2 (DO CARMO et al., 2020).

A ação antiparasitária dessas espécies está possivelmente associada à presença de compostos fenólicos relacionados às propriedades antioxidantes e antimicrobianas de extratos da folha, cascas e fruta de *P. cauliflora* (MARÍN et al., 2009; RAMÍREZ-MACÍAS et al., 2012). Os mecanismos descritos para estes compostos, incluem formação de complexos com macromoléculas, levando a inativação ou perda de função de proteínas e enzimas; danos a membrana induzidos por flavonoides lipofílicos; rearranjo de DNA mitocondrial; e indução de

danos ao cinetoplasto (COWAN, 1999; MITTRA et al., 2000; SILVA; FERNANDES JÚNIOR, 2010; RAMÍREZ-MACÍAS et al., 2012; CRUZ et al., 2013). Além disso, alguns PN afetam o equilíbrio redox do parasito, atuando sobre a cadeia respiratória e defesas celulares contra estresse oxidativo (SOUZA et al., 2018).

O segundo trabalho apresentado nesta dissertação investigou a mutagenicidade e citotoxicidade *in vitro* de dois derivados 3-nitro-1,2,4-triazólicos, além de avaliar suas propriedades físico-químicas e farmacocinéticas por predição *in silico*. O baixo SA predito para os derivados está de acordo com a rota sintética viável e de baixo custo, com apenas 2 a 3 etapas proposta por Menozzi (2019). Ambos cumpriram a regra de Lipinski, apresentando propriedades físico-químicas compatíveis com um perfil farmacocinético aceitável (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). Entretanto, de acordo com o gráfico Radar de Biodisponibilidade, os derivados não foram completamente estimados como similares à fármaco por apresentarem um desvio no perfil ótimo de propriedades físico-químicas devido a um alto número de insaturações e conseqüentemente, uma baixa fração Csp^3 .

A fração Csp^3 , calculada pela razão entre carbonos hibridizados sp^3 e o total de carbonos da molécula, é uma medida de complexidade baseada em saturações, uma propriedade que permite o desenvolvimento de moléculas estruturalmente mais complexas, explorando espaços químicos mais diversos, sem aumentar significativamente a massa molecular (LOVERING; BIKKER; HUMBLET, 2009; DAINA; ZOETE, 2016). Moléculas mais saturadas são mais prováveis de avançarem do desenvolvimento ao estágio de fármaco, pela melhoria de atributos como aumento da complementaridade receptor/ligante, melhoria de características físico-químicas, como solubilidade, e aumento da potência e seletividade para um dado alvo. Por outro lado, neste caso, a manutenção deste número de insaturações é necessária pelos benefícios conferidos aos derivados pela presença da bifênica.

A absorção gastrointestinal (GI) tem um papel importante na biodisponibilidade, e o primeiro passo para absorção de fármacos é sua dissolução no fluido GI para posterior permeação da membrana intestinal (NEWBY; FREITAS; GHAFOURIAN, 2015). Logo, a permeabilidade e solubilidade são propriedades físico-químicas chave nesse processo, permitindo que a polaridade (LogP e TPSA) seja aplicada em preditores de absorção GI. De acordo com os parâmetros de Daina e Zoete (2016) para o modelo *BOILED-Egg* (TPSA < 142 Å e LogP entre -2,3 e +6,8), os compostos têm uma alta probabilidade de serem absorvidos pelo trato GI.

Apesar de ser uma porta de entrada para efeitos neurotóxicos, a permeação da barreira hematoencefálica (BBB) é essencial para a distribuição de fármacos que atuam no sistema nervoso central (SNC). O BZN foi previamente detectado no cérebro de camundongos, sugerindo sua capacidade de atravessar a BBB (PERIN et al., 2017), para exercer ações como melhora da perda de memória, associada à carga parasitária no SNC e redução do estresse oxidativo no modelo experimental crônico da infecção por *T. cruzi* (VILAR-PEREIRA et al., 2016).

Contudo, a neurotoxicidade do BZN foi observada em cães tratados por via oral, que apresentaram encefalopatia e distúrbios clínicos, patológicos e neurológicos (FLORES-VIEIRA et al., 1997; FLORES-VIEIRA; BARREIRA, 1997). Em 3.2, os derivados foram preditos como não permeantes da BBB, reduzindo potenciais efeitos neurotóxicos no SNC. Por outro lado, esse dado reduz a possibilidade de aplicação nas manifestações nervosas da DC, que apesar de vários indícios de sua existência haverem sido descritos (ALENCAR, 1982; OLIVEIRA-FILHO et al., 2009; SILVA et al., 2010; PY, 2011), ainda permanece como um tema de debate devido à falta de evidências histopatológicas (PITTELLA, 2009), mas são bem aceitos para tripanossomíase africana (MASOCHA; KRISTENSSON, 2019).

A P-gp (ABCB1), é uma glicoproteína transmembrana da família de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), que atua no efluxo ativo através de membranas biológicas, um mecanismo de defesa a xenobióticos (BROCCATELLI et al., 2011; MONTANARI; ECKER, 2015). No entanto, também está associada a fenótipos de multirresistência à fármacos (MDR) (SCHINKEL; JONKER, 2003) em parasitos protozoários (WILSON et al., 1993; GAMARRO et al., 1994; GUEIROS et al., 1995; SAUVAGE et al., 2009). Leprohon et al. (2006) identificaram 28 genes ABC no genoma do *T. cruzi*. Desde então, a participação da P-gp na MDR da espécie vem sendo estudada.

Campos et al. (2013) investigaram a expressão e atividade da P-gp em fenótipos resistentes induzidos, verificando aumento da atividade de efluxo da P-gp, reversão dos fenótipos resistentes na presença de inibidores da P-gp e superexpressão dos genes TcPGP1 e TcPGP2, renomeados TcABCC6 e TcABCC2 por pertencer à família ABCC (SAUVAGE et al., 2009). Da mesma forma, o gene TcABCG1 também está envolvido na resistência ao BZN (FRANCO et al., 2015; ZINGALES et al., 2015; PRAMANIK et al., 2019). Embora o papel da P-gp na resistência a fármacos em *T. cruzi* não tenha sido totalmente elucidado até o momento, fármacos não sujeitos à ação da P-gp, como previsto para os derivados, podem ser candidatos desejáveis, já que podem ser capazes para escapar deste mecanismo de resistência.

Os derivados foram preditos não-substratos para P-gp e substratos de CYP3A4, frequentemente expressas nos mesmos tecidos, de forma que as taxa de efluxo e biotransformação mediadas por elas pode determinar a exposição desses substratos ao metabolismo. Esta interação afeta a biodisponibilidade de fármacos coadministrados com moduladores da P-gp (BENET, 2009). Assim, a inibição da P-gp pode ser aplicada para superar a resistência farmacológica e melhorar a eficácia da terapia (DARBY; CALLAGHAN; M. MCMAHON, 2011). Complementarmente, os compostos foram previstos como inibidores de P-gp. A inibição dos transportadores ABCC tem sido estudada na cepa Y de *T. cruzi*. Da Costa et al. (2018) observaram que esses inibidores reduzem a viabilidade de epimastigotas e tripomastigotas, relacionada ao envolvimento da ABCC na biodisponibilidade de diversos endobióticos relacionados à sobrevivência do parasita no hospedeiro. Da mesma forma, Campos et al. (2013) demonstraram a reversão de fenótipos resistentes mediados por inibidores da gp-P.

As enzimas metabolizadoras de fase I, especialmente, CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9 e CYP2C19 estão associadas à transformação metabólica da maioria dos medicamentos prescritos, e sua inibição é frequentemente responsável por interações medicamentosas relacionadas à farmacocinética (HOLLENBERG, 2002; HUANG et al., 2008), induzindo efeitos tóxicos ou adversos associados à baixa depuração e acúmulo do fármaco ou de seus metabólitos (KIRCHMAIR et al., 2015).

A CYP3A4 é considerada a enzima P450 mais importante, por estar envolvida no metabolismo de cerca de 50% dos medicamentos clinicamente relevantes (NAKAJIMA; YOKOI, 2014). CYP3A4 representa 15-20% do conteúdo de CYP hepático (KAWAKAMI et al., 2011), sendo um componente relevante do efeito de primeira passagem oral. Agentes antifúngicos azólicos, como cetoconazol, itraconazol e fluconazol são inibidores potentes da CYP3A4 *in vivo* (TIRONA; KIM, 2017). Embora os derivados avaliados neste trabalho pertençam à classe dos azóis, eles foram preditos como prováveis substratos do CYP3A4, mas não como seus inibidores, sugerindo que possam ser metabolizados por esta enzima, sem alterar os efeitos de outros substratos por inibição enzimática.

Os derivados foram previstos como potenciais inibidores de CYP1A2, CYP2C19 e CYP2C9. CYP2C9 é a segunda CYP hepática mais expressa (PAINE et al., 2006) e metaboliza S-varfarina e fármacos anti-inflamatórios não esteroidais, enquanto que substratos importantes da CYP2C19 incluem fenitoína, omeprazol e clopidogrel. CYP2D6 corresponde a apenas ~3% do conteúdo de CYP hepático, embora metabolize cerca de 20% dos medicamentos. Sua

inibição está relacionada às interações com substratos, como paroxetina, propranolol, metoprolol, timolol, codeína e tamoxifeno (TIRONA; KIM, 2017). Portanto, o conhecimento da relação dos compostos com essas enzimas é essencial na previsão de interações fármaco-fármaco.

Este trabalho também realizou a predição de parâmetros relevantes em estudos de toxicidade, como LOAEL, LD₅₀ e MTD. LOAEL, é a menor dose em que os efeitos observados no grupo tratado implicam em efeito adverso ao indivíduo, utilizada em conjunto com outros parâmetros toxicológicos para definir uma faixa de dose (OCHOA, 2002). Em termos de toxicidade aguda, a DL₅₀ ou CL₅₀ (dose ou concentração letal média) define a dose de um agente químico, físico ou biológico necessária para matar metade dos indivíduos de um grupo de teste após uma duração de teste especificada e representa um parâmetro importante para a predição da dose letal humana, orientando quais outras doses poderiam ser utilizadas em experimentos de toxicidade subaguda e crônica (TEKE; KUETE, 2014).

Comparando os valores obtidos com predições realizadas por Nefertiti et al. (2018) usando pkCSM, o LOAEL (ratos) previstos para os derivados NTZ foram menores e o LD₅₀ (ratos) foram ligeiramente maiores do que os valores previstos para o BZN. Com base na Escala de Classes de Toxicidade de Hodge e Sterner (1949), ambos os derivados podem ser classificados como relativamente inofensivos (> 15 g/ kg). Esta escala sugere ainda que a provável dose letal para humanos para uma classe relativamente inofensiva é ≈ 1 L. A utilidade da escala é meramente qualitativa, pois a toxicidade intrínseca de uma substância varia de acordo com fatores relacionados ao agente químico, ao organismo e à exposição.

MTD (humano) é a maior dose que induz exposições nas quais os efeitos tóxicos da substância serão maximizados, sem potencialmente comprometer a sobrevivência em longo prazo do indivíduo (OCHOA, 2002), sendo útil definir a dose a ser administrada na fase 1 dos ensaios clínicos. O MTD (humano) para os compostos foi ≈ 5 vezes menor do que o predito para o BZN, 9,638 mol/kg (NEFERTITI et al., 2018). Para fins de comparação, a dose diária máxima recomendada de BZN para adultos (LAFEPE, 2018) é de 5-7 mg/kg (0,0192-0,0269 mM/kg).

hERG é um gene humano que codifica um canal de potássio cardíaco que, quando inibido, resulta em síndrome do intervalo QT longo que pode levar a arritmia ventricular fatal e morte súbita (SANGUINETTI; TRISTANI-FIROUZI, 2006). Ambos os derivados foram preditos como não indutores de cardiotoxicidade relacionada ao *hERG*, característica desejável para candidatos a anti-chagásicos, uma vez que a arritmia pode agravar o quadro de um paciente com cardiomiopatia chagásica crônica (RASSI; MARIN; RASSI, 2017).

As ferramentas *in silico* para predição de mutagenicidade fornecem um método estabelecido e validado para determinar a etapa inicial na identificação de agentes reativos de DNA, com o objetivo de limitar potenciais riscos carcinogênicos (WICHARD, 2017). A diretriz M7 do ICH (Conselho Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos para Uso Humano) determina que, se os dados sobre a classificação com respeito ao potencial mutagênico e carcinogênico não estiverem disponíveis, uma avaliação das Relações Estrutura-Atividade (SAR), incluindo descritores de mutagenicidade em procarioto, devem ser realizadas (ICH, 2017).

O primeiro indicador preditivo da mutagenicidade dos derivados foi o Alerta Estrutural de Brenk, uma conjunto contendo 105 fragmentos relacionados a características indesejáveis, como toxicidade, reatividade química, instabilidade metabólica ou propriedades farmacocinéticas desfavoráveis (BRENK et al., 2008). Ambos os derivados apresentaram dois alertas para grupos nitro e ligação simples oxigênio-nitrogênio. Ashby e Tennant (1991) discutiram anteriormente a relação entre estrutura química, mutagenicidade em *Salmonella* e carcinogenicidade em roedores, associando alertas para produtos químicos reativos com o DNA. Um dos grupos químicos de alerta definidos foram os tipos amino/nitro, incluindo substituintes como $-NO_2$ e $-NO$, previstos para derivados. Os autores demonstraram que 70% desse grupo era cancerígenos para roedores, 86% era mutagênicos no ensaio de *Salmonella*, que mostrou alta sensibilidade para moléculas com alertas estruturais. Complementarmente, no presente estudo, ambos os compostos foram preditos como mutagênicos no teste de Ames.

As predições de mutagenicidade foram confirmadas nos experimentos *in vitro* utilizando as linhagens TA98 e TA100, que possuem sensibilidade de detecção de até 93% (WILLIAMS et al., 2019), reduzindo custos, tempo e redundância dos resultados. O ensaio foi conduzido pelo método de pré-incubação, mais sensível à mutagenicidade dos nitrocompostos (GATEHOUSE et al., 1994), permitindo uma maior probabilidade de metabólitos mutagênicos de curta duração reagirem com as linhagens-teste em menores volumes da mistura de pré-incubação e, conseqüentemente, maior concentração da fração S9 (YAHAGI et al., 1975; HAWORTH et al., 1983; MORTELMANS, K. et al., 1986).

A cetona PCBN 009/17, induziu a reversão da mutação *hisD3052* da TA98, que identifica deslocamentos de quadro de leitura próximos à sequências repetitivas $-C-G-C-G-C-G-C-G-$ (ISONO; YOURNO, 1974), uma reversão característica de agentes mutagênicos nitroaromáticos (MARON; AMES, 1983). A TA98 foi altamente sensível a este derivado, detectando danos a partir da menor concentração testada. Além disso, o PCBN 009/17 induziu

mutações sem a necessidade de metabolização pelo S9 (-S9) para interagir com o DNA, sugerindo sua atuação como um agente mutagênico direto ou, que possa ser ativado por enzimas bacterianas endógenas, como Acetiltransferases e Nitroredutase (KUMMROW et al., 2003). Este mesmo derivado induziu citotoxicidade sobre TA98 (-S9) e sobre TA100 em ambas as condições metabólicas. Para Jurado et al. (1993), o *background* genético da TA100 parece ser mais sensível do que o TA98 aos efeitos citotóxicos de agentes químicos.

Por outro lado, nas concentrações mais altas, o PCBN 012/17, diferenciado por um grupo hidroxila, necessitou de ativação metabólica para induzir não só a mutação TA98, mas também a reversão da mutação *hisG46* da TA100, revertida por mutações de substituição de pares de bases (BARNES, 1982; MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Considerando a relação preditiva de agentes mutagênicos neste ensaio com a carcinogenicidade em roedores (MCCANN et al., 1975), também observamos que o PCBN 012/17 foi previsto como um potencial carcinógeno para roedores.

Compostos tripanocidas nitro-heterocíclicos, como NFX e BZN, são ativados pela NRI, resultando na produção de metabólitos tóxicos (WILKINSON et al., 2011). Nos 2-nitroimidazóis, o metabólito da hidroxilamina pode sofrer rearranjo e hidratação, produzindo um di-hidro-di-hidroxiimidazol que, após decomposição, libera glioxal. Os dois últimos produtos interagem com biomoléculas, incluindo DNA, formando adutos e tíóis (WHITMORE; VARGHESE, 1986; WHITMORE; VARGHESE; GULYAS, 1986). Papadopoulou et al. (PAPADOPOULOU et al., 2015b) mostraram que os 3-nitro-1,2,4-triazóis também são substratos do INR, portanto, é possível que tenham um mecanismo de ação semelhante relacionado à interação com o DNA do parasita.

O derivado PCBN 012/17 atuou como pró-mutagênico, induzindo mutações após metabolização pelo S9. O sistema S9 contém frações microssomais e citosólicas, combinando enzimas de fase I e fase II, incluindo seus cofatores (PARMENTIER et al., 2007). Assim, além de CYP450s e uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferases, a fração S9 também contém as enzimas citosólicas, como Aldeído oxidase, Xantina oxidase, Sulfotransferases, Metiltransferases, N-acetiltransferases e Glutathione transferases (HAYES, 1994). De acordo com nossas predições *in silico*, ambos os compostos são substratos potenciais da CYP3A4.

Embora existam muitos dados disponíveis sobre os nitroimidazóis, os estudos que abordam a mutagenicidade dos NTZ ainda são escassos. Papadopoulou et al. (2013) avaliaram a mutagenicidade de uma benzilamida à base de 3-nitrotriazol (N-[4-(3-Nitro-1H-1,2,4-triazol-1-il)butil]-4-(trifluorometoxi)benzamida) com excelente atividade antichagásica *in vivo* (IC₅₀

0,113 μM) usando TA98 e TA7001-7006, um conjunto de cepas mistas, cada uma das quais carrega uma mutação *missense* única no operon da histidina (GEE; MARON; AMES, 1994). Foi observado que esta benzilamida não foi mutagênica para TA98, e apenas induziu mutação para as cepas mistas com S9 na concentração mais alta (1000 $\mu\text{g/mL}$), tóxica para células L6 (mioblastos esqueléticos de rato). Na ausência de dose-resposta linear, os autores presumiram a existência de um limite seguro, e também observaram que os compostos 2-nitroimidazol estão associados à atividade mutagênica em um grau maior do que os 3-nitrotriazóis.

No megazol, a atividade mutagênica está associada à redução do grupo nitro na posição 5 do anel nitroimidazol (NESSLANY et al., 2004). No entanto, Boechat et al. (2015) demonstraram que o grupo nitro não é o único responsável pela atividade genotóxica dos nitroimidazóis, mostrando a importância do estudo de nitroazóis, para entender quais substituições podem reduzir ou eliminar seus efeitos mutagênicos, mantendo o potencial tripanocida. Também é importante enfatizar que, apesar do alto valor preditivo para carcinogenicidade em roedores quando uma resposta positiva é obtida, mutagenicidade em *S. Typhimurium* não é necessariamente traduzida em mutagenicidade em humanos (PAPADOPOULOU et al., 2013).

Apesar da mutagenicidade do BZN em humanos nunca ter sido relatada, ele induz mutagenicidade significativa em concentrações relativamente baixas ($> 50 \mu\text{g} / \text{ml}$) para TA98 (CABRERA et al., 2009) e TA100 (NAGEL, 1987). Em um estudo de mutagenicidade com soro e urina de roedores (*Cavia porcellus*), Ferreira et al. (1988) demonstraram que o BZN não é metabolizado pelo hospedeiro mamífero em derivados mutagênicos estáveis detectáveis por *S. Typhimurium*, sugerindo risco reduzido de potenciais efeitos carcinogênicos em humanos. Portanto, é interessante que os derivados 3-nitro-1,2,4-triazólicos continuem a ser usados como protótipos de compostos tripanocidas mais seguros e eficazes considerando sua seletividade (PAPADOPOULOU; BLOOMER; LEPESHEVA; et al., 2015; MENOZZI, 2019).

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Apesar da origem natural, produtos como o extrato de *P. cauliflora* pode induzir danos em células hepáticas, evidenciando a relevância de avaliações toxicológicas, regulamentações e iniciativas que garantam à população o acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. Por outro lado, as folhas de *P. cauliflora* são uma fonte potencial de moléculas ativas sobre *T. cruzi*, que podem ser empregadas como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos, reforçando a importância da preservação do conhecimento etnofarmacológico, e da valorização e promoção do uso sustentável da biodiversidade, como uma fonte acessível de tratamentos alternativos mais acessíveis para doenças negligenciadas.

Os derivados 3-nitro-1,2,4-triazólicos têm exibido resultados promissores no desenvolvimento de medicamentos menos tóxicos e mais ativos sobre *T. cruzi*, entretanto, a mutagenicidade desses compostos ainda é uma preocupação. Conforme demonstrado neste trabalho e em estudos prévios, modificações estruturais mínimas, obtidas a partir de reações simples e de baixo custo, são capazes modular significativamente a potência e toxicidade dos derivados, reduzindo seu potencial mutagênico. Apresentando maior seletividade, o derivado PCBN 012/17 foi considerado um composto líder para otimizações e prosseguimento para investigação de genotoxicidade em modelo eucarioto e atividade tripanocida *in vivo* e *in vitro* em outras formas evolutivas de *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS

- ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell proliferation and cytotoxicity assays. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 14, p. 1213–1221, 2016.
- AGRA, M. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 472–508, set. 2008.
- AHMADI, A.; SHADBOORESTAN, A. Oxidative stress and cancer; the role of hesperidin, a citrus natural bioflavonoid, as a cancer chemoprotective agent. **Nutrition and Cancer**, v. 68, n. 1, p. 29–39, 2 jan. 2016.
- ALENCAR, A. Encefalopatia crônica chagásica. **Jornal Brasileiro de Neurologia**, v. 18, p. 7–12, 1982.
- ALMAZROO, O. A.; MIAH, M. K.; VENKATARAMANAN, R. Drug metabolism in the liver. **Clinics in Liver Disease**, v. 21, n. 1, p. 1–20, fev. 2017.
- ALTMAN, F. P. Studies on the reduction of tetrazodium salts: III. The products of chemical and enzymic reduction. **Histochemistry**, v. 38, n. 2, p. 155–171, 1974.
- AMES, B. N. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. In: HOLLAENDER, A. (Ed.). **Chemical Mutagens**. Boston, MA: Springer US, 1971. p. 267–282.
- AMSLINGER, S. The tunable functionality of α,β -unsaturated carbonyl compounds enables their differential application in biological systems. **ChemMedChem**, v. 5, n. 3, p. 351–356, 2010.
- ANDRADE, S. G.; FIGUEIRA, R. M. Estudo experimental sobre a ação terapêutica da droga Ro 7-1051 na infecção por diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 19, p. 335–341, 1977.
- ANTEL, J. Integration of combinatorial chemistry and structure-based drug design. **Current Opinion in Drug Discovery & Development**, v. 2, n. 3, p. 224–233, maio 1999.
- ANTWI, C. A. et al. *In vitro* activity and mode of action of phenolic compounds on *Leishmania donovani*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, p. e0007206, 25 fev. 2019.
- APT, W. Treatment of Chagas disease. In: **American Trypanosomiasis Chagas Disease**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 751–771.
- ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. Role of human liver microsomes in *in vitro* metabolism of drugs: a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 6, p. 1699–1722, mar. 2010.

ASHBY, J.; TENNANT, R. W. Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 257, n. 3, p. 229–306, 1 maio 1991.

ASLANTÜRK, Ö. S. *In vitro* cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. In: LARRAMENDY, M. L.; SOLONESKI, S. (Eds.). **Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World**. [s.l.] InTech, 2018.

AVARIA, A. et al. Population movements, borders, and Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 116, p. e2 10151, 20 maio 2021.

AVORN, J. The \$2.6 billion pill: methodologic and policy considerations. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 20, p. 1877–1879, 14 maio 2015.

AZEVEDO, A. L. **Doença de Chagas, a mais brasileira das doenças**. Disponível em: <<https://oglobo.globo.com/brasil/doenca-de-chagas-mais-brasileira-das-doencas-22928013>>. Acesso em: 14 nov. 2021.

BARNES, W. Base-sequence analysis of *his*⁺ revertants of the *hisG46* missense mutation in *Salmonella typhimurium*. **Environ. Mutagen**, v. 4, p. 297, 1982.

BARRAL NETO, M. Uso prévio do Ro 7-1051 na doença de Chagas experimental em camundongos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 14, p. 7–11, jun. 1981.

BARRETT-BEE, K.; RYDER, N. Biochemical aspects of ergosterol biosynthesis inhibition. In: SUTCLIFFE, J. A.; GEORGOPAPADAKOU, N. H. (Eds.). **Emerging Targets in Antibacterial and Antifungal Chemotherapy**. Boston, MA: Springer US, 1992. p. 410–436.

BENAIM, G. et al. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 892–899, 9 fev. 2006.

BENET, L. Z. The drug transporter–metabolism alliance: uncovering and defining the interplay. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 6, p. 1631–1643, 7 dez. 2009.

BERN, C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 26, p. 2527–2534, 30 jun. 2011.

BOECHAT, N. et al. Studies of genotoxicity and mutagenicity of nitroimidazoles: demystifying this critical relationship with the nitro group. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 492–499, 26 mai. 2015.

BONNEY, K. M. Chagas disease in the 21st Century: a public health success or an emerging threat? **Parasite**, v. 21, p. 11, 2014.

BOOTH, L.-A.; SMITH, T. K. Lipid metabolism in *Trypanosoma cruzi*: A review. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 240, p. 111324, nov. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença de Chagas**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2018. Disponível em: <http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2018/Recomendacao/Relatorio_PCDT_Doenca_de_Chagas.pdf>.

BRENK, R. et al. Lessons learnt from assembling screening libraries for drug discovery for neglected diseases. **ChemMedChem**, v. 3, n. 3, p. 435–444, 14 mar. 2008.

BROCCATELLI, F. et al. A novel approach for predicting P-glycoprotein (ABCB1) inhibition using molecular interaction fields. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 1740–1751, 24 mar. 2011.

BROWN, G. D. The biosynthesis of steroids and triterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 15, n. 6, p. 653, 1998.

BUCKLE, D. R. et al. Glossary of terms used in medicinal chemistry. Part II (IUPAC Recommendations 2013). **Pure and Applied Chemistry**, v. 85, n. 8, p. 1725–1758, 31 jul. 2013.

BUCKNER, F. S. et al. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2592–2597, nov. 1996.

BUCKNER, F. S. Sterol 14-demethylase inhibitors for *Trypanosoma cruzi* infections. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 625, p. 61–80, 2008.

BUCKNER, F.; URBINA, J. A. Recent developments in sterol 14-demethylase inhibitors for Chagas Disease. **International journal for parasitology, drugs and drug resistance**, v. 2, p. 236–242, 1 dez. 2012.

BUSCHINI, A. et al. Genotoxicity reevaluation of three commercial nitroheterocyclic drugs: nifurtimox, benznidazole, and metronidazole. **Journal of Parasitology Research**, v. 2009, p. e463575, 21 out. 2009.

CABRERA, M. et al. Cytotoxic, mutagenic and genotoxic effects of new anti-*T. cruzi* 5-phenylethenylbenzofuroxans. Contribution of phase I metabolites on the mutagenicity induction. **Toxicology Letters**, v. 190, n. 2, p. 140–149, 28 out. 2009.

CALIXTO JÚNIOR, J. T. et al. Phenolic composition and antiparasitic activity of plants from the Brazilian Northeast “Cerrado”. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 3, p. 434–440, 1 maio 2016.

CALOMME, M. et al. Inhibition of bacterial mutagenesis by citrus flavonoids. **Planta Medica**, v. 62, n. 03, p. 222–226, jun. 1996.

CAMPOS, M. C. O. et al. P-glycoprotein efflux pump plays an important role in *Trypanosoma cruzi* drug resistance. **Parasitology Research**, v. 112, n. 6, p. 2341–2351, 2013.

CAMPOS, R. et al. Evaluation of the therapeutic activity of fluconazole in acute experimental infection caused by *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Hospital das Clínicas**, v. 47, n. 4, p. 174–175, ago. 1992.

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

CARVALHO, C. M. et al. Efeito antimicrobiano *in vitro* do extrato de jabuticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.)O.Berg.] sobre *Streptococcus* da cavidade oral. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 1, p. 79–83, 2009.

CARVALHO, A. S. DE et al. Megazol and its bioisostere 4H-1,2,4-triazole: comparing the trypanocidal, cytotoxic and genotoxic activities and their *in vitro* and *in silico* interactions with the *Trypanosoma brucei* nitroreductase enzyme. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 3, p. 315–323, 18 mar. 2014.

CASTELO-BRANCO, F. S. **Derivados Acílicos da Isoniazida e Novos 1,2,4-triazóis: Contribuições na Luta Contra a Tuberculose e a Doença de Chagas**. Tese (Doutorado em Química) - Rio de Janeiro: Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2015.

CASTILLO-RIQUELME, M. Chagas disease in non-endemic countries. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 4, p. e379–e380, 1 abr. 2017.

CASULLI, A. New global targets for NTDs in the WHO roadmap 2021–2030. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 5, p. e0009373, 13 maio 2021.

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

CHAGAS, C. R. J. DAS. *Trypanosoma minasense*. **Brazil-Médico**, n. 48, 1908.

CHATELAIN, E. Chagas Disease drug discovery: toward a new era. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 20, n. 1, p. 22–35, jan. 2015.

CHAVASCO, J. M. et al. Evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of plant extracts from Southern Minas Gerais Cerrado. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 1, p. 13–20, 2014.

CHENG, F. et al. admetSAR: A comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 11, p. 3099–3105, 26 nov. 2012.

CORONEL, M. V. P. et al. Adverse systemic reaction to benznidazole. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, p. 145–147, fev. 2017.

- CORREIA, V. C. DE S. et al. Evaluation of the antiplasmodial and leishmanicidal potential of *Myrciaria dubia* (Myrtaceae) extract. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 5, p. 586–592, out. 2016.
- COSAR, C. et al. Nitro-imidazoles--chemotherapeutic preparation and activity. **Arzneimittel-Forschung**, v. 16, n. 1, p. 23–29, jan. 1966.
- COSAR, C.; JULOU, L. Activity of (hydroxy-2'ethyl)-1 methyl- 2 nitro-5 imidazole (8823, R.P.) in Experimental *Trichomonas vaginalis* Infections. **Ann. Inst. Pasteur**, v. 96, n. 2, p. 238–41, 1959.
- COSENTINO, R. O.; AGÜERO, F. Genetic profiling of the isoprenoid and sterol biosynthesis pathway genes of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e96762, 14 maio 2014.
- COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission: the vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 277–282, 2015.
- COURA, J. R.; CASTRO, S. L. DE. A critical review on Chagas Disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 3–24, jan. 2002.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564, out. 1999.
- COWELL, A. N.; WINZELER, E. A. Advances in omics-based methods to identify novel targets for malaria and other parasitic protozoan infections. **Genome Medicine**, v. 11, n. 1, p. 63, dez. 2019.
- CRUZ, A. V. DE M.; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomaceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 47–52, 2004.
- CRUZ, E. DE M. et al. Leishmanicidal activity of *Cecropia pachystachya* flavonoids: Arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement. **Phytochemistry**, v. 89, p. 71–77, maio 2013.
- DA COSTA, K. M. et al. Functional characterization of ABCC proteins from *Trypanosoma cruzi* and their involvement with thiol transport. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 205, 14 fev. 2018.
- DA LANA, M.; TAFURI, W. L.; BARTHOLOMEU, D. C. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: NEVES, D. P. (Ed.). **Parasitologia Humana**. 13. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2016. p. 91–117.
- DA SILVA, C. F. G. et al. Optimization of the extraction process of phenolic antioxidant compounds of jelly (*Solanum gilo* Radi) and application in the oxidative stability of soybean oil. **Revista Virtual de Química**, p. 729–739, 2017.

DA SILVA, V. P. et al. Chemical composition and *in vitro* leishmanicidal, antibacterial and cytotoxic activities of essential oils of the Myrtaceae family occurring in the Cerrado biome. **Industrial Crops and Products**, v. 123, p. 638–645, nov. 2018.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 42717, maio 2017.

DAINA, A.; ZOETE, V. A BOILED-Egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. **ChemMedChem**, v. 11, 1 maio 2016.

DARBY, R. A. J.; CALLAGHAN, R.; M. MCMAHON, R. P-glycoprotein inhibition: the past, the present and the future. **Current Drug Metabolism**, v. 12, n. 8, p. 722–731, 1 out. 2011.

DE OLIVEIRA, C. et al. Structure of cruzipain/cruzain inhibitors isolated from *Bauhinia bauhinioides* seeds. **Biological Chemistry**, v. 382, n. 5, p. 847–852, maio 2001.

DE OLIVEIRA, I. M.; HENRIQUES, J. A. P.; BONATTO, D. *In silico* identification of a new group of specific bacterial and fungal nitroreductases-like proteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 355, n. 4, p. 919–925, 20 abr. 2007.

DE SOUSA, C. **Filogenia molecular das jabuticabas: elucidando relações evolutivas e identidade genérica de um fruto genuinamente brasileiro**. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - Brasília: Universidade Católica de Brasília, 2009.

DEEKS, E. D. Fexinidazole: First global approval. **Drugs**, v. 79, n. 2, p. 215–220, fev. 2019.

DNDI. Fexinidazole: a rediscovered compound progresses as a preclinical drug candidate for HAT. **DNDi Nwesletter**, n. 16, 2008.

DNDI. **Relatório Anual América Latina 2011-2012: Da descoberta ao acesso para pacientes negligenciados**. Rio de Janeiro: Drugs for Neglected Diseases initiative, 2012. Disponível em: <https://www.dndial.org/wp-content/uploads/2009/10/ar12_POR.pdf>.

DNDI. **Doença de Chagas | DNDi América Latina**. Disponível em: <<https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/>>. Acesso em: 14 nov. 2021.

DNDI. **Research and development | DNDi**. Disponível em: <<https://dndi.org/research-development/>>. Acesso em: 13 nov. 2021.

DO CARMO, M. A. V. et al. Camu-camu (*Myrciaria dubia*) seeds as a novel source of bioactive compounds with promising antimalarial and antischistosomicidal properties. **Food Research International**, v. 136, p. 109334, out. 2020.

DONADO-PESTANA, C. M. et al. Polyphenols from Brazilian native Myrtaceae fruits and their potential health benefits against obesity and its associated complications. **Current Opinion in Food Science**, v. 19, p. 42–49, fev. 2018.

DUFOURC, E. J. Sterols and membrane dynamics. **Journal of Chemical Biology**, v. 1, n. 1–4, p. 63–77, nov. 2008.

DUPONT, J. L. LIPIDS | Chemistry and Classification. In: **Encyclopedia of Human Nutrition**. [s.l.] Elsevier, 2005. p. 126–132.

DURANT, A. A. et al. Anti-malarial activity and HS-SPME-GC-MS chemical profiling of *Plinia cerrocampaensis* leaf essential oil. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 18, dez. 2014.

EKOR, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, 2014.

EVENS, F.; NIEMEGERES, K.; PACKCHANIAN, A. Nitrofurazone therapy of *Trypanosoma gambiense* Sleeping Sickness in man. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6, n. 4, p. 665–678, 1 jul. 1957.

FABBRO, D. L. et al. Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe city (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 1–10, fev. 2007.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084–1104, maio 2007.

FERREIRA, R. C. et al. Evaluation of genotoxic activity in the blood and urine of guinea pigs treated with nifurtimox and benznidazole. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, n. 5, p. 1069–1077, 1988.

FERREIRA, R. C.; FERREIRA, L. C. Mutagenicity of nifurtimox and benznidazole in the *Salmonella*/microsome assay. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 19, n. 1, p. 19–25, 1986.

FIELD, M. C. et al. Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. **Nature reviews. Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 217–231, fev. 2017.

FLORES-VIEIRA, C. L. L. et al. Experimental benznidazole encephalopathy: II. Electroencephalographic and morphological alterations. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 150, n. 1, p. 13–25, set. 1997.

FLORES-VIEIRA, C. L. L.; BARREIRA, A. A. Experimental benznidazole encephalopathy: **Journal of the Neurological Sciences**, v. 150, n. 1, p. 3–11, set. 1997.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Benznidazole tablets, for oral use. p. 21, 2017.

FRANÇA, R. R. F. et al. Potent inhibitors of the enzyme sterol 14 α -demethylase against *Trypanosoma cruzi*. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 5, 2014.

FRANÇA, T. C. C.; FIGUEROA-VILLAR, M. G. DOS S. E J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1271–1278, 2008.

- FRANCO, J. et al. ABCG-like transporter of *Trypanosoma cruzi* involved in benznidazole resistance: Gene polymorphisms disclose inter-strain intragenic recombination in hybrid isolates. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 31, p. 198–208, 1 abr. 2015.
- GALVÃO, B. V. D. et al. *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Jaboticaba) leaf extract: *in vitro* anti-*Trypanosoma cruzi* activity, toxicity assessment and phenolic-targeted UPLC-MSE metabolomic analysis. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 114217, 24 maio 2021.
- GAMARRO, F. et al. P-Glycoprotein overexpression in methotrexate-resistant *Leishmania tropica*. **Biochemical Pharmacology**, v. 47, n. 11, p. 1939–1947, 1 jun. 1994.
- GASPAROTTO, A., Jr.; DE SOUZA, P.; LÍVERO, F. A. DOS R. *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel: A comprehensive ethnopharmacological review of a genuinely Brazilian species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 245, p. 112169, dez. 2019.
- GATEHOUSE, D. et al. Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 312, n. 3, p. 217–233, jun. 1994.
- GEE, P.; MARON, D. M.; AMES, B. N. Detection and classification of mutagens: a set of base-specific *Salmonella* tester strains. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 24, p. 11606–11610, 22 nov. 1994.
- GERETS, H. H. J. et al. Selection of cytotoxicity markers for the screening of new chemical entities in a pharmaceutical context: A preliminary study using a multiplexing approach. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 2, p. 319–332, 1 mar. 2009.
- GERETS, H. H. J. et al. Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. **Cell Biology and Toxicology**, v. 28, n. 2, p. 69–87, abr. 2012.
- GODOY NETTO, A. V. DE; FREM, R. C. G.; MAURO, A. E. A química supramolecular de complexos pirazólicos. **Química Nova**, v. 31, p. 1208–1217, 2008.
- GUEDES, P. M. DA M. et al. Activity of the new triazole derivative albaconazole against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in dog hosts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4286–4292, nov. 2004.
- GUEIROS, F. J. et al. *Leishmania amazonensis*: multidrug resistance in vinblastine-resistant promastigotes is associated with Rhodamine 123 efflux, DNA amplification, and RNA overexpression of a *Leishmania* *mdr1* Gene. **Experimental Parasitology**, v. 81, n. 4, p. 480–490, 1 dez. 1995.
- GUENGERICH, F. P. Cytochrome p450 and chemical toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 70–83, jan. 2008.
- GULIN, J. E. N. et al. *In vitro* and *in vivo* activity of voriconazole and benznidazole combination on *Trypanosoma cruzi* infection models. **Acta Tropica**, v. 211, p. 105606, 1 nov. 2020.

GUPTA, A. Lipids. In: GUPTA, A. (Ed.). **Comprehensive Biochemistry for Dentistry**. Singapore: Springer Singapore, 2019. p. 123–144.

GUPTA, P. K. Chapter 13 - Genotoxicity. In: GUPTA, P. K. (Ed.). **Fundamentals of Toxicology**. [s.l.] Academic Press, 2016. p. 151–164.

HACKER, M. Chapter 1 - History of Pharmacology: From Antiquity to the Twentieth Century. In: HACKER, M.; MESSER, W.; BACHMANN, K. (Eds.). **Pharmacology**. San Diego: Academic Press, 2009. p. 1–7.

HAWORTH, S. et al. *Salmonella* mutagenicity test results for 250 chemicals. **Environmental Mutagenesis**, v. 5 Suppl 1, p. 1–142, 1983.

HAYES, A. W. **Principles and methods of toxicology**. New York: Raven Press, 1994.

HODGE, H. C.; STERNER, J. H. Tabulation of toxicity classes. **American Industrial Hygiene Association Quarterly**, v. 10, n. 4, p. 93–96, 1 dez. 1949.

HOLLENBERG, P. F. Characteristics and common properties of inhibitors, inducers, and activators of CYP enzymes. **Drug Metabolism Reviews**, v. 34, n. 1–2, p. 17–35, maio 2002.

HOU, T.; WANG, J. Structure – ADME relationship: still a long way to go? **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 4, n. 6, p. 759–770, 1 jun. 2008.

HUANG, S.-M. et al. New era in drug interaction evaluation: US Food and Drug Administration update on CYP enzymes, transporters, and the guidance process. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 48, n. 6, p. 662–670, jun. 2008.

IANNI, B. M.; MADY, C. Terapêutica da forma crônica da doença de chagas. É eficaz o tratamento etiológico? **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 70, p. 59–61, jan. 1998.

ICH. **Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk**, 2017. Disponível em: <http://www.gcpunion.org/web/static/articles/catalog_ff8080815702574c01570866f936002a/article_5b6a85126817a7bc0168eee8b18c0238/5b6a85126817a7bc0168eee8b18e023f.pdf>.

INADA, K. O. P. et al. Effect of high hydrostatic pressure and drying methods on phenolic compounds profile of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel and seed. **Food Chemistry**, v. 309, p. 125794, mar. 2020.

ISONO, K.; YOURNO, J. Chemical carcinogens as frameshift mutagens: *Salmonella* DNA sequence sensitive to mutagenesis by polycyclic carcinogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 71, n. 5, p. 1612–1617, mai. 1974.

IZUMI, E. et al. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 4, p. 809, 2011.

JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, v. 461, n. 7267, p. 1071–1078, out. 2009.

JAIN, M.; BANDYOPADHYAY, D.; SUNDAR, R. Scientific and regulatory considerations in the development of *In vitro* techniques for Toxicology. In: **In Vitro Toxicology**. [s.l: s.n.]. p. 165–185.

JIA, L.; LIU, X. The conduct of drug metabolism studies considered good practice (II): *In vitro* experiments. **Current drug metabolism**, v. 8, n. 8, p. 822–829, dez. 2007.

JURADO, J.; ALEJANDRE-DURÁN, E.; PUEYO, C. Genetic differences between the standard Ames tester strains TA100 and TA98. **Mutagenesis**, v. 8, n. 6, p. 527–532, 1993.

KAWAKAMI, H. et al. Simultaneous absolute quantification of 11 Cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes by liquid chromatography tandem mass spectrometry with *In silico* target peptide selection. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 1, p. 341–352, jan. 2011.

KIRCHMAIR, J. et al. Predicting drug metabolism: experiment and/or computation? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 6, p. 387–404, jun. 2015.

KOLA, I.; LANDIS, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 8, p. 711–716, ago. 2004.

KUMAR, V. **Robbins & Cotran Patologia: Bases patológicas das doenças**. 9ª ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2020.

KUMMROW, F. et al. Comparison of the mutagenic activity of XAD4 and blue rayon extracts of surface water and related drinking water samples. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 541, n. 1, p. 103–113, 10 nov. 2003.

LAFEPE. **Bula LAFEPE Benzonidazol**, 2018. Disponível em: <https://www.lafepe.pe.gov.br/wp-content/uploads/2018/08/benznidazol_bula_profissional_bilingue.pdf>

LANNES-VIEIRA, J. **Portal Chagas: Doença**. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/sessao/doenca/>>. Acesso em: 22 nov. 2021.

LAURELLA, L. C. et al. *In vitro* Evaluation of antiprotozoal and antiviral activities of extracts from argentinean *Mikania* species. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. e121253, 31 jul. 2012.

LEPESHEVA, G. I.; VILLALTA, F.; WATERMAN, M. R. Targeting *Trypanosoma cruzi* Sterol 14 α -Demethylase (CYP51). **Advances in parasitology**, v. 75, p. 65–87, 2011.

LEPESHEVA, G. I.; VIRUS, C.; WATERMAN, M. R. Conservation in the CYP51 family. Role of the B' helix/BC loop and helices F and G in enzymatic function. **Biochemistry**, v. 42, n. 30, p. 9091–9101, 5 ago. 2003.

LEPROHON, P. et al. Modulation of *Leishmania* ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 10, p. 1713–1725, out. 2006.

LIDANI, K. C. F. et al. Chagas Disease: from discovery to a worldwide health problem. **Frontiers in Public Health**, v. 7, p. 166, 2019.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 4–17, dez. 2012.

LORENZI, H. **Arvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. [s.l.] Editora Plantarum, 1992.

LOVERING, F.; BIKKER, J.; HUMBLET, C. Escape from Flatland: increasing saturation as an approach to improving clinical success. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 21, p. 6752–6756, 12 nov. 2009.

MANTOVANI, M. S. et al. Teste de Micronúcleos: *In vitro* e *In vivo*. In: **Da Toxicogenética à Toxicogenômica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2021. p. 139–168.

MARÍN, C. et al. Antileishmaniasis Activity of Flavonoids from *Consolida oliveriana*. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 6, p. 1069–1074, 26 jun. 2009.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 113, n. 3–4, p. 173–215, mar. 1983.

MARTIN, Y. C. A bioavailability score. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 9, p. 3164–3170, 5 maio 2005.

MASOCHA, W.; KRISTENSSON, K. Human African trypanosomiasis: How do the parasites enter and cause dysfunctions of the nervous system in murine models? **Brain Research Bulletin**, Brain Disorders Endemic to Africa. v. 145, p. 18–29, 1 fev. 2019.

MAUNZ, A. et al. Iazar: a modular predictive toxicology framework. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, 2013.

MAYA, J. D. et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, Second Special Issue of CBP dedicated to “The Face of Latin American Comparative Biochemistry and Physiology” organized by Marcelo Hermes-Lima (Brazil) and co-edited by Carlos Navas (Brazil), Rene Beleboni (Brazil), Tania Zenteno-Savín (Mexico) and the Editors of CBP. v. 146, n. 4, p. 601–620, 1 abr. 2007.

MCCABE, R. Failure of ketoconazole to cure chronic murine Chagas’ disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 158, n. 6, p. 1408–1409, 1 dez. 1988.

MCCABE, R. E.; REMINGTON, J. S.; ARAUJO, F. G. *In vitro* and *in vivo* effects of itraconazole against *Trypanosoma cruzi*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, n. 2, p. 280–284, mar. 1986.

- MCCANN, J. et al. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 12, p. 5135–5139, 1 dez. 1975.
- MCCLELLAND, R. A.; PANICUCCI, R.; RAUTH, A. M. **Electrophilic intermediate in the reactions of a 2-(hydroxyamino)imidazole. A model for biological effects of reduced nitroimidazoles**. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ja00292a053>>. Acesso em: 7 nov. 2021.
- MEANWELL, N. A. Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 2529–2591, 28 abr. 2011.
- MELLO, F. DO V. C. E et al. Evaluation of genotoxic effects of new molecules with possible trypanocidal activity for Chagas disease treatment. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1–8, 2013.
- MELO, R. DE F. P.; GUARNERI, A. A.; SILBER, A. M. The influence of environmental cues on the development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae vector. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 27, 2020.
- MENOZZI, C. A. C. **Obtenção de novos derivados contendo os grupos bifênila e 3-nitro-1,2,4-triazol como agentes anti-*Trypanosoma cruzi***. Dissertação (Mestrado em Farmacologia e Química Medicinal) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.
- MERLOT, C. Computational toxicology: a tool for early safety evaluation. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 1, p. 16–22, 1 jan. 2010.
- MIGNANI, S. et al. Why and how have drug discovery strategies in pharma changed? What are the new mindsets? **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 2, p. 239–249, fev. 2016.
- MITTRA, B. et al. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. **Molecular Medicine**, v. 6, n. 6, p. 527, jun. 2000.
- MOLINA, I. et al. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 20, p. 1899–1908, 15 maio 2014.
- MOLINA, J. et al. Activities of the triazole derivative SCH 56592 (Posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 1, p. 150–155, jan. 2000.
- MONTANARI, F.; ECKER, G. F. Prediction of drug–ABC-transporter interaction: Recent advances and future challenges. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 86, p. 17–26, jun. 2015.
- MORELLO, A. et al. Trypanocidal effect of boldine and related alkaloids upon several strains of *Trypanosoma cruzi*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 107, n. 3, p. 367–371, mar. 1994.

MORETTI, N. S.; MORTARA, R. A.; SCHENKMAN, S. *Trypanosoma cruzi*. **Trends in Parasitology**, v. 36, n. 4, p. 404–405, abr. 2020.

MORPHY, R.; RANKOVIC, Z. Designed multiple ligands: an emerging drug discovery paradigm. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 21, p. 6523–6543, 1 out. 2005.

MORTELMANS, K. et al. *Salmonella* mutagenicity tests: II. Results from the testing of 270 chemicals. **Environmental Mutagenesis**, v. 8 Suppl 7, p. 1–119, 1986.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1–2, p. 29–60, nov. 2000.

MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, n. 2, p. 145–171, 1 fev. 2001.

MUNIZ, H. J. T. **Caçari** (*Myrciaria dubia*). Disponível em: <<https://www.colecionandofrutas.com.br/myrciariadubia.htm>>. Acesso em: 20 dez. 2021.

NAGEL, R. Genotoxicity studies with two antichagasic drugs. **Mutation Research Letters**, v. 191, n. 1, p. 17–20, maio 1987.

NAKAD, R.; SCHUMACHER, B. DNA damage response and immune defense: links and mechanisms. **Frontiers in Genetics**, v. 7, p. 147, 9 ago. 2016.

NAKAJIMA, M.; YOKOI, T. MicroRNA: regulation of P450 and Pharmacogenetics. In: **Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine**. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 385–401.

NASPOLINI, N. F. et al. Phytochemical characterization of bioactive compounds on methanolic and ethanolic leaf extracts of *Myrciaria* sp. **Scientia Agropecuaria**, v. 7, n. 2, p. 103–109, 30 jun. 2016.

NDJONKA, D. et al. Natural products as a source for treating neglected parasitic diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 3395–3439, 6 fev. 2013.

NEFERTITI, A. S. G. et al. *In vitro* and *in vivo* studies of the trypanocidal effect of novel quinolines. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 2, fev. 2018.

NEPALI, K.; LEE, H.-Y.; LIOU, J.-P. Nitro-group-containing drugs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 6, p. 2851–2893, 28 mar. 2019.

NERI-NUMA, I. A. et al. Small Brazilian wild fruits: Nutrients, bioactive compounds, health-promotion properties and commercial interest. **Food Research International**, v. 103, p. 345–360, jan. 2018.

NESSLANY, F. et al. *In vitro* and *in vivo* chromosomal aberrations induced by megazol. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 560, n. 2, p. 147–158, 13 jun. 2004.

NEVES, N. DE A. et al. Flavonols and ellagic acid derivatives in peels of different species of jaboticaba (*Plinia* spp.) identified by HPLC-DAD-ESI/MSn. **Food Chemistry**, v. 252, p. 61–71, jun. 2018.

NEWBY, D.; FREITAS, A. A.; GHAFOURIAN, T. Decision trees to characterize the roles of permeability and solubility on the prediction of oral absorption. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 90, p. 751–765, 27 jan. 2015.

NOËL, F. Hit, lead, drug candidate / Substância ativa, protótipo, candidato a fármaco. In: NOËL, F. **Glossário Semântico de Farmacologia**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2013.

NOGACKA, A. M. et al. Xenobiotics formed during food processing: their relation with the intestinal microbiota and colorectal cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 8, p. E2051, 25 abr. 2019.

O'BRIEN, P. J. et al. High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with *in vitro* cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. **Archives of Toxicology**, v. 80, n. 9, p. 580–604, set. 2006.

OCHOA, R. Pathology issues in the design of Toxicology studies. In: **Handbook of Toxicologic Pathology**. [s.l.] Elsevier, 2002. v. 1p. 307–326.

OECD. **Guidance Document on Revisions to OECD Genetic Toxicology Test Guidelines**. OECD, 2015. Disponível em: <<https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/Genetic%20Toxicology%20Guidance%20Document%20Aug%2031%202015.pdf>>

OECD. **Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test**. Paris: OECD, 2016.

OECD. **Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test**. Paris: OECD, 2020.

OLIVEIRA-FILHO, J. et al. Chagas disease is independently associated with brain atrophy. **Journal of Neurology**, v. 256, n. 8, p. 1363–1365, ago. 2009.

ONYEKWELU, K. C. **Life Cycle of *Trypanosoma cruzi* in the Invertebrate and the Vertebrate Hosts**. [s.l.] IntechOpen, 2019.

PAHO. **Chagas disease - PAHO/WHO | Pan American Health Organization**. Disponível em: <<https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease>>. Acesso em: 22 nov. 2021.

PAINE, M. F. et al. The human intestinal cytochrome P450 “PIE”. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v. 34, n. 5, p. 880–886, maio 2006.

PAIVA, K. O. et al. Plantas medicinais utilizadas em transtornos do sistema geniturinário por mulheres ribeirinhas, Caravelas, Bahia. **Revista Fitos**, v. 11, 2017.

PALOZI, R. A. C. et al. From general toxicology to DNA disruption: A safety assessment of *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 258, p. 112916, ago. 2020.

- PANICUCCI, R.; MCCLELLAND, R. A. 4,5-Dihydro-4,5-dihydroxyimidazoles as products of the reduction of 2-nitroimidazoles. HPLC assay and demonstration of equilibrium transfer of glyoxal to guanine. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 67, n. 12, p. 2128–2135, 1 dez. 1989.
- PAPADOPOULOU, M. V. et al. Novel 3-Nitro-1H-1,2,4-triazole-based amides and sulfonamides as potential anti-trypanosomal agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 5554–5565, 14 jun. 2012.
- PAPADOPOULOU, M. V. et al. Novel 3-nitro-1H-1,2,4-triazole-based compounds as potential anti-Chagasic drugs: *in vivo* studies. **Future medicinal chemistry**, v. 5, n. 15, p. 1763–1776, out. 2013.
- PAPADOPOULOU, M. V. et al. Novel 3-nitrotriazole-based amides and carbinols as bifunctional antichagasic agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 3, p. 1307–1319, 12 fev. 2015a.
- PAPADOPOULOU, M. V. et al. Discovery of potent nitrotriazole-based antitrypanosomal agents: *In vitro* and *in vivo* evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 19, p. 6467–6476, out. 2015b.
- PAPADOPOULOU, M. V. et al. Nitrotriazole-based compounds as antichagasic agents in a long-treatment *in vivo* assay. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. e02717-16, 24 abr. 2017.
- PARMENTIER, Y. et al. 5.10 - *In vitro* studies of drug metabolism. In: TAYLOR, J. B.; TRIGGLE, D. J. (Eds.). **Comprehensive Medicinal Chemistry II**. Oxford: Elsevier, 2007. p. 231–257.
- PATTERSON, S.; WYLLIE, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 6, p. 289–298, jun. 2014.
- PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, n. 7, p. 791–800, 1 ago. 2006.
- PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82–94, jan. 2018.
- PERIN, L. et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of benznidazole after oral administration in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, abr. 2017.
- PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066–4072, 14 maio 2015.
- PITOMBEIRA, M. **Novos 2-nitroimidazol-N-acilhidrazonas análogos de benzonidazol como agentes anti-Tripanosoma cruzi**. Dissertação (Mestrado em Pós-Graduação em

Farmacologia e Química Medicinal) - Rio de Janeiro: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2019.

PITTELLA, J. E. H. Central nervous system involvement in Chagas disease: A hundred-year-old history. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 10, p. 973–978, 1 out. 2009.

PLOŠNIK, A.; VRAČKO, M.; DOLENC, M. S. Mutagenic and carcinogenic structural alerts and their mechanisms of action. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 67, n. 3, p. 169–182, 1 set. 2016.

POLI, P. et al. Cytotoxic and genotoxic effects of megalzol, an anti-Chagas' disease drug, assessed by different short-term tests. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, n. 11, p. 1617–1627, 1 dez. 2002.

PRÄBST, K. et al. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1601, p. 1–17, 2017.

PRAMANIK, P. K. et al. Drug resistance in protozoan parasites: an incessant wrestle for survival. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 18, p. 1–11, 1 set. 2019.

PRIVAL, M.; ZEIGER, E. Chemicals mutagenic in *Salmonella typhimurium* strain TA1535 but not in TA100. **Mutation research**, v. 412, p. 251–60, 1 mar. 1998.

PROEKT, A.; HEMMING, H. C. Mechanisms of drug action. In: **Pharmacology and Physiology for Anesthesia**. [s.l.] Elsevier, 2013. p. 3–19.

PY, M. O. Neurologic manifestations of Chagas disease. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 11, n. 6, p. 536–542, dez. 2011.

RAETHER, W.; SEIDENATH, H. The activity of fexinidazole (HOE 239) against experimental infections with *Trypanosoma cruzi*, trichomonads and *Entamoeba histolytica*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 77, n. 1, p. 13–26, fev. 1983.

RAMÍREZ-MACÍAS, I. et al. Leishmanicidal Activity of Nine Novel Flavonoids from *Delphinium staphisagria*. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–10, 2012.

RASSI, A. Tratamento etiologico da doenca de Chagas. **Arq. bras. cardiol**, p. 277–81, 1982.

RASSI, A.; MARIN, J. A.; RASSI, A. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 3, p. 224–235, mar. 2017.

ROCHE. **Cytotoxicity Detection Kit (LDH)**, 2016. Disponível em:
<<https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/215/534/11644793001bul.pdf>>

- ROCHE. **Cell Proliferation Reagent WST-1**, 2021. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/350/519/cellprorobul.pdf>>
- ROUBICEK, D. A. et al. Teste de Ames. In: **Da Toxicogenética à Toxicogenômica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2021. p. 83–138.
- SACCARO JÚNIOR, N. L. Bioprospecção e desenvolvimento sustentável. n. 73, 2012.
- SALES JUNIOR, P. A. et al. Experimental and clinical treatment of Chagas disease: a review. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 5, p. 1289–1303, 8 nov. 2017.
- SANGUINETTI, M. C.; TRISTANI-FIROUZI, M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. **Nature**, v. 440, n. 7083, p. 463–469, 23 mar. 2006.
- SAUVAGE, V. et al. The role of ATP-binding cassette (ABC) proteins in protozoan parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 167, n. 2, p. 81–94, out. 2009.
- SCHINKEL, A. H.; JONKER, J. W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 1, p. 3–29, 21 jan. 2003.
- SILVA, A. et al. *Trypanosoma cruzi*-induced central nervous system alterations: from the entry of inflammatory cells to potential cognitive and psychiatric abnormalities. **Journal of Neuroparasitology**, v. 1, 1 jan. 2010.
- SILVA, R. N. DA. O controle da doença de Chagas em Sergipe no período de 1998-2015. f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, Aracaju, 2019.
- SILVA FERNANDES, A. et al. Pedunculagin isolated from *Plinia cauliflora* seeds exhibits genotoxic, antigenotoxic and cytotoxic effects in bacteria and human lymphocytes. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 0, n. 0, p. 1–11, 7 dez. 2021.
- SILVA, N.; FERNANDES JÚNIOR, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 3, p. 402–413, 2010.
- SLATER, T. F. Reduced diphosphopyridine nucleotide: Neotetrazolium Reductase. **Nature**, v. 183, n. 4676, p. 1679–1680, jun. 1959.
- SOBRAL, M. Alterações nomenclaturais em *Plinia* (Myrtaceae). **Boletim do Museu Botânico Municipal (Curitiba)**, v. 63, p. 1–4, 1985.
- SOEIRO, M. N. C.; DE CASTRO, S. L. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 13, n. 1, p. 105–121, jan. 2009.
- SOUZA, R. O. DA S. et al. Trypanocidal activity of polysaccharide extract from *Genipa americana* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 210, p. 311–317, jan. 2018.

- SOUZA-MOREIRA, T. et al. Anti-*Candida* targets and cytotoxicity of casuarinin isolated from *Plinia cauliflora* Leaves in a Bioactivity-Guided Study. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 8095–8108, jul. 2013.
- SOUZA-MOREIRA, T. M. et al. Chemical and Antidiarrheal studies of *Plinia cauliflora*. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 12, p. 1590–1596, dez. 2011.
- STREIGER, M. L. et al. Longitudinal study and specific chemotherapy in children with chronic Chagas' disease, residing in a low endemicity area of Argentina. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 37, n. 5, p. 365–375, out. 2004.
- SUETH-SANTIAGO, V. et al. CYP51: Is it a Good Idea? **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 2, 2015.
- SUETH-SANTIAGO, V. et al. Challenges in the chemotherapy of Chagas disease: Looking for possibilities related to the differences and similarities between the parasite and host. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 57, 2017.
- SÜLSEN, V. P. et al. Trypanocidal and leishmanicidal activities of sesquiterpene lactones from *Ambrosia tenuifolia* Sprengel (Asteraceae). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 7, p. 2415–2419, 1 jul. 2008.
- TEKE, G. N.; KUETE, V. Acute and subacute toxicities of African medicinal plants. In: **Toxicological Survey of African Medicinal Plants**. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 63–98.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Cytotoxicity Assays**. Disponível em: <<http://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cell-analysis/cell-viability-and-regulation/cytotoxicity.html>>. Acesso em: 20 dez. 2021.
- THORNALLEY, P. J. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems - role in ageing and disease. **Drug metabolism and drug interactions**, v. 23, n. 1–2, p. 125–150, 2008.
- TINDALL, B. J. et al. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. Pt 1, p. 521–524, jan. 2005.
- TIRONA, R. G.; KIM, R. B. Introduction to Clinical Pharmacology. In: **Clinical and Translational Science**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 365–388.
- TUFTS CENTER FOR THE STUDY OF DRUG DEVELOPMENT. **How the Tufts Center for the Study of Drug Development pegged the cost of a new drug at \$2.6 billion**, 2014. Disponível em: <http://csdd.tufts.edu/files/uploads/cost_study_backgrounder.pdf>
- TURKEZ, H.; ARSLAN, M. E.; OZDEMIR, O. Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, v. 13, n. 10, p. 1089–1098, 2017.

- URBINA, J. A. et al. Mevinolin (lovastatin) potentiates the antiproliferative effects of ketoconazole and terbinafine against *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*: *In vitro* and *in vivo* studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 3, p. 580–591, mar. 1993.
- URBINA, J. A. et al. *In vitro* antiproliferative effects and mechanism of action of the new triazole derivative UR-9825 against the protozoan parasite *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 9, p. 2498–2502, set. 2000.
- URBINA, J. A. et al. *In vitro* and *in vivo* activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21, n. 1, p. 27–38, 1 jan. 2003.
- URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 55–68, jul. 2010.
- URBINA, J. A. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic Chagas disease: advances, challenges and perspectives. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 149–156, jan. 2015.
- URSU, O. et al. Understanding drug- likeness. **WIREs Computational Molecular Science**, v. 1, n. 5, p. 760–781, set. 2011.
- VAN DEN HOF, W. F. P. M. et al. Classification of hepatotoxicants using HepG2 Cells: a proof of principle study. **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, n. 3, p. 433–442, 17 mar. 2014.
- VARELA, J. et al. *In vivo* Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of hydro-ethanolic extract and isolated active principles from *Aristeguietia glutinosa* and mechanism of action studies. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 8488–8502, 23 jun. 2014.
- VILAR-PEREIRA, G. et al. Resveratrol reverses functional Chagas heart disease in mice. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 10, p. e1005947, 27 out. 2016.
- VINKEN, M.; BLAAUBOER, B. J. *In vitro* testing of basal cytotoxicity: Establishment of an adverse outcome pathway from chemical insult to cell death. **Toxicology in Vitro**, v. 39, p. 104–110, mar. 2017.
- VINKEN, M.; HENGSTLER, J. G. Characterization of hepatocyte-based *In vitro* systems for reliable toxicity testing. **Archives of Toxicology**, v. 92, n. 10, p. 2981–2986, 1 out. 2018.
- VIOTTI, R. 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, mar. 2009.
- WANG, W.-H. et al. Evaluation of the antioxidant activity and antiproliferative effect of the jaboricaba (*Myrciaria cauliflora*) seed extracts in oral carcinoma cells. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–7, 2014.
- WESTERINK, W. M. A.; SCHOONEN, W. G. E. J. Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells.

Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA, v. 21, n. 8, p. 1592–1602, dez. 2007.

WHITMORE, G. F.; VARGHESE, A. J. The biological properties of reduced nitroheterocyclics and possible underlying biochemical mechanisms. **Biochemical Pharmacology**, v. 35, n. 1, p. 97–103, 1 jan. 1986.

WHITMORE, G. F.; VARGHESE, A. J.; GULYAS, S. Reaction of 2-nitroimidazole metabolites with guanine and possible biological consequences. **IARC scientific publications**, n. 70, p. 185–196, 1986.

WHO (ED.). **Control of chagas disease: second report of the WHO Expert Committee**. Geneva: WHO, 2002.

WHO. **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases**. Geneva: World Health Organization, 2010.

WHO. **Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases**. Geneva: World Health Organization, 2017.

WHO. **Global distribution of cases of Chagas disease, based on official estimates, 2018, 2020**. Disponível em: <<https://www.who.int/docs/default-source/ntds/chagas-disease/chagas-2018-cases.pdf>>. Acesso em: 22 nov. 2021

WHO. **Chagas disease**. Disponível em: <[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))>. Acesso em: 31 out. 2021.

WICHARD, J. D. *In silico* prediction of genotoxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 106, p. 595–599, ago. 2017.

WILKINSON, S. R. et al. Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 16, p. 2072–2084, 2011.

WILLIAMS, B. L.; GOODWIN, T. W.; RYLEY, J. F. The sterol content of some protozoa. **The Journal of Protozoology**, v. 13, n. 2, p. 227–230, maio 1966.

WILLIAMS, R. V. et al. Are all bacterial strains required by OECD mutagenicity test guideline TG471 needed? **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 848, p. 503081, dez. 2019.

WILSON, C. M. et al. Amplification of *pfmdr1* associated with mefloquine and halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 57, n. 1, p. 151–160, jan. 1993.

WU, S.-B.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Phytochemistry and health benefits of jaboricaba, an emerging fruit crop from Brazil. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 148–159, nov. 2013.

YAHAGI, T. et al. Mutagenicity of carcinogenic azo dyes and their derivatives. **Cancer Letters**, v. 1, p. 91–96, 1 jan. 1975.

YE, Y. et al. Anticancer effects of echinacoside in hepatocellular carcinoma mouse model and HepG2 cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 2, p. 1880–1888, fev. 2019.

ZANGER, U. M.; SCHWAB, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 138, n. 1, p. 103–141, abr. 2013.

ZHANG, L. et al. The strategies and techniques of drug discovery from natural products. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 216, p. 107686, dez. 2020.

ZINGALES, B. et al. A novel ABCG-like transporter of *Trypanosoma cruzi* is involved in natural resistance to benznidazole. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 433–444, maio 2015.