

AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO DO FÁRMACO BENZNIDAZOL
EM ASSOCIAÇÃO COM O PEPTÍDEO CÍCLICO RCB-4, ISOLADO DE
SEMENTES DE *Ricinus communis*, NO COMBATE AO PROTOZOÁRIO
Trypanosoma cruzi IN VITRO

CARINA DA SILVA LAGRIMANTE DUARTE

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY

RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

ABRIL – 2026

AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO DO FÁRMACO BENZNIDAZOL
EM ASSOCIAÇÃO COM O PEPTÍDEO CÍCLICO RCB-4, ISOLADO DE
SEMENTES DE *Ricinus communis*, NO COMBATE AO PROTOZOÁRIO
Trypanosoma cruzi IN VITRO

CARINA DA SILVA LAGRIMANTE DUARTE

Dissertação apresentada ao Centro de
Biociências e Biotecnologia da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia Vegetal.

Orientador (a): Dr^a. Olga Lima Tavares
Machado

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY

RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

ABRIL – 2026

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP), no Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, sob orientação da Professora Dr^a. Olga Lima Tavares Machado.

Financiamentos: - FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro);

- CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

D812 Duarte, Carina da Silva Lagrimante.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE COMBINATÓRIA DE BENZNIDAZOL E PEPTÍDEO RCB-4, ISOLADO DAS SEMENTES DE *Ricinus communis*, CONTRA *Trypanosoma cruzi*. / Carina da Silva Lagrimante Duarte. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2026.

55 f. : il.

Bibliografia: 48 - 55.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2026.

Orientadora: Olga Lima Tavares Machado.

Coorientadora: Francianne Galossi de Souza.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Benznidazol (BZN). 3. Peptídeo cíclico-RCB-4. 4. *Ricinus communis* (Mamona). I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 660.6

AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO DO FÁRMACO BENZNIDAZOL
EM ASSOCIAÇÃO COM O PEPTÍDEO CÍCLICO RCB-4, ISOLADO DE
SEMENTES DE *Ricinus communis*, NO COMBATE AO PROTOZOÁRIO
Trypanosoma cruzi IN VITRO

CARINA DA SILVA LAGRIMANTE DUARTE

Dissertação apresentada ao Centro de
Biociências e Biotecnologia da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia Vegetal.

Aprovada em 24 de fevereiro de 2026.

Comissão Examinadora:

Natália Deus de Oliveira Crespo (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) – IFF

Clóvis de Paula Santos (D.Sc., Medicina Veterinária Parasitologia Veterinária– UENF

Felipe Figueirôa Moreira (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) – UENF

Francianne Galossi de Souza (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) – UENF
(Coorientadora)

Olga Lima Tavares Machado (D.Sc., Bioquímica) – UENF (Orientadora)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu noivo, Leonardo, pelo amor constante, pelo apoio incondicional e pela paciência ao longo de toda esta trajetória. Obrigada por caminhar ao meu lado, por acreditar em mim mesmo nos momentos de incerteza e por compreender os desafios que fizeram parte deste percurso. Seu incentivo, cuidado e confiança foram essenciais para que este trabalho se tornasse possível.

Esta conquista também é sua.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de tudo, a Deus, por me conceder fé, força e perseverança, sustentando-me em cada etapa desta jornada e guiando meus passos nos momentos mais desafiadores.

À minha mãe, Maria, minha maior referência de amor, dedicação e coragem, por me ensinar que o verdadeiro cuidado transforma vidas e que toda entrega sincera é recompensada com grandes vitórias.

Ao meu pai, Luiz, por ter escolhido me acolher e por me mostrar, com atitudes, que o amor também é construído no coração.

À minha irmã, Márcia, e ao meu cunhado, Carlos, por serem meu alicerce, meu porto seguro e presença constante de apoio incondicional.

Aos meus sobrinhos Kayque, Davi e Maria Júlia, que mesmo à distância iluminam meus dias, renovam minhas forças e dão novo sentido à minha caminhada. Aos meus avós, cujas histórias, valores e ensinamentos seguem sendo fonte eterna de inspiração.

Aos meus sogros, Valéria e Eleonardo, por estarem sempre presentes, acreditarem em mim e me incentivarem com tanto carinho em cada decisão tomada.

Às minhas cunhadas, Karen e Carol, por caminharem ao meu lado em cada desafio e celebrarem comigo cada conquista.

E, de forma muito especial, ao meu noivo, Leonardo, por seu amor, paciência, compreensão e companheirismo, que foram fundamentais para que este trabalho se tornasse possível. Seu apoio constante tornou essa jornada mais leve, segura e cheia de significado.

Meu mais profundo e sincero agradecimento à minha orientadora, Dra. Olga Lima Tavares Machado, pela dedicação incansável, pela orientação precisa, pelo exemplo profissional e, sobretudo, por acreditar no meu potencial mesmo nos momentos mais difíceis. Sua confiança foi decisiva para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

À minha coorientadora, Dra. Francianne Galossi de Souza, pelo apoio valioso, pelas contribuições enriquecedoras e pelo incentivo constante ao meu desenvolvimento científico.

Aos colaboradores, professor Dr. Sérgio Henrique Seabra e Dr. Felipe Figueiroa Moreira, pelos conhecimentos compartilhados, pelas contribuições técnicas e pela generosidade acadêmica ao longo deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e pelo tempo dedicado.

Aos meus amigos de laboratório, Eduarda, Ana Flávia e Eduardo, por todos os momentos vividos, pelas risadas que aliviaram os dias difíceis, pelo apoio nas incertezas e pela parceria que tornou essa caminhada mais humana e especial.

À UENF, por proporcionar um ambiente que favoreceu meu crescimento profissional e acadêmico.

Por fim, agradeço à FAPERJ pela concessão da bolsa de estudos, bem como aos demais órgãos de fomento e ao CNPq pelo financiamento dos projetos de pesquisa que viabilizaram a realização deste trabalho, tornando possível a concretização deste sonho.

A todos, o meu muito obrigada!

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
1. REVISÃO DE LITERATURA: DA DOENÇA DE CHAGAS ÀS NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS	18
1.1. Trypanosoma cruzi (<i>T. cruzi</i>) e seu ciclo de vida	18
1.2. Fármaco Benznidazol	23
1.3. Mecanismo de ação do Benznidazol	25
1.4. Peptídeos antimicrobianos.....	26
1.5. Mecanismo de ação do peptídeo cíclico	31
1.6. Peptídeo cíclico de mamona RCB-4.....	33
1.7. Terapia de combinação	34
2. OBJETIVO	35
2.1. Objetivos Específicos:	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1. Diagrama	36
3.2. Obtenção das sementes	36
3.3. Extração de peptídeos da semente de <i>Ricinus communis</i>	36
3.4. Cromatografia de exclusão molecular	37
3.5. Cromatografia de fase reversa utilizando sistema de alta eficiência (HPLC).....	37
3.6. Dosagem de proteínas	38
3.7. Ensaio antitrypanosomal <i>in vitro</i>	38
4. RESULTADOS	40
4.1. Cromatografia de filtração em gel	40
4.2. Quantificação Proteica	41
4.3. Isolamento dos componentes (FBPM) por HPLC	41
4.4 Efeito tripanocida	42

5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÕES	46
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	47
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação do Triatomíneo (bicho-barbeiro)	19
Figura 2: Representação do <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
Figura 3: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
Figura 4: Fases clínicas da doença de Chagas.....	22
Figura 5: Estrutura molecular de BNZ.....	23
Figura 6: Características comuns de AMP de plantas.....	27
Figura 7: Representação esquemática das principais classes estruturais de peptídeos incluindo: (A) Peptídeos que apresentam uma conformação α -hélices na presença de micelas. (B) Peptídeos de estruturas estendidas. (C) Peptídeos contendo folha β (são tipicamente estabilizados por pontes dissulfeto). (D) Peptídeos contendo α -hélices e folha β . (E) Peptídeos que apresentam configuração cíclica. (α -hélices (laranja), folhas β (verde) e pontes dissulfeto (amarelo)).....	30
Figura 8: Mecanismo de ação dos peptídeos microbianos.....	32
Figura 9: Sequência do RCB-4, obtida por espectrometria de massas. (A) Predição da estrutura secundária; (B) Predição da estrutura 3D.....	34
Figura 10: Diagrama.....	36
Figura 11: Perfil cromatográfico da filtração em gel (Sephadex G-50).....	40
Figura 12: Perfil da dosagem por BCA.....	41
Figura 13: Perfil cromatográfico de isolamento dos peptídeos da FBMM - coluna C18 - (eluição fase móvel A:TFA 0,1% e B: TFA 0,1% + 80% ACN).....	42
Figura 14: Teste de toxicidade sobre as formas epimastigota do parasito <i>T. cruzi</i> , utilizando o peptídeo RCB-4 sintético (S) e natural (N) e o fármaco BENZNIDAZOL (BNZ).....	44

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPs – Peptídeos antimicrobianos

BCA – Ácido bicinconínico

BZN – Benznidazol

BSA – Albumina sérica bovina

EROS – Espécie reativas de oxigênio

FBPM – Fração de baixo peso molecular

MET - Microscopia eletrônica de transmissão

NFX – Nifurtimox

T. cruzi - *Trypanosoma cruzi*

RESUMO

A doença de Chagas, provocada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, permanece como um dos maiores desafios de saúde pública global, sendo classificada pela Organização Mundial da Saúde como uma doença tropical negligenciada que afeta milhões de pessoas. Atualmente, o protocolo terapêutico padrão baseia-se no uso do Benznidazol (BZN) que, embora possua eficácia comprovada, apresenta limitações severas devido à alta incidência de efeitos colaterais adversos. Diante deste cenário, torna-se imperativa a investigação de novas estratégias, com especial atenção às terapias combinatórias que possam potencializar a ação tripanocida, superar possíveis resistências parasitárias e reduzir a toxicidade medicamentosa.

Neste contexto, o presente estudo investigou o potencial efeito sinérgico entre o Benznidazol e o peptídeo cíclico antiparasitário RCB-4, isolado das sementes de *Ricinus communis* (mamona). O processo de isolamento do RCB-4 envolveu o uso de extratos brutos submetidos à cromatografia por filtração em gel (Sephadex G-50), o que permitiu a obtenção de uma fração de baixa massa molecular (FBMM < 10 kDa). Posteriormente, a purificação final do peptídeo, que apresenta massa molecular aproximada de 2.400 Daltons, foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase reversa utilizando coluna C18.

Para avaliar a eficácia da proposta, foram conduzidos ensaios tripanocidas com o parasito no estágio epimastigota. A atividade biológica foi testada individualmente para o BZN, o peptídeo RCB-4 (em suas formas natural e sintética) e, de forma inédita, em formulações combinadas entre o fármaco e o peptídeo. O objetivo central foi identificar possíveis interações sinérgicas em intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas. Os resultados revelaram sinergismo em duas condições específicas: na combinação de 25 µg/mL de BZN com 5 µg/mL do peptídeo após 48 horas de incubação, e na dose de 50 µg/mL de BZN com 10 µg/mL do peptídeo após 24 horas.

Em conclusão, os dados sugerem uma ação conjunta e sinérgica promissora entre o fármaco Benznidazol e o peptídeo cíclico RCB-4 contra as formas epimastigotas do *T. cruzi*. Essa interação indica um caminho viável para otimizar o tratamento da doença de Chagas, uma vez que o sinergismo permite a utilização de dosagens reduzidas de ambos os compostos. Consequentemente, essa abordagem abre perspectivas para o combate ao protozoário de forma mais eficiente, minimizando os

impactos tóxicos e os efeitos adversos associados ao uso isolado e em altas concentrações do Benznidazol.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; Benznidazol (BZN); Peptídeo cíclico RCB-4; *Ricinus communis* (Mamona).

ABSTRACT

Title: Evaluation of the synergistic effect between the cyclic peptide RCB-4 and Benznidazole against epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*.

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, remains a major global public health challenge and is classified by the World Health Organization (WHO) as a neglected tropical disease affecting millions of people. The current standard treatment is based on the drug Benznidazole (BZN), which, despite its proven efficacy, is often limited by significant adverse side effects. In this scenario, the search for new therapeutic strategies—especially combination therapies that can overcome parasite resistance and mitigate drug toxicity—becomes imperative.

In this context, the present study investigated the potential synergistic effect of an anti-parasitic cyclic peptide, RCB-4, isolated from *Ricinus communis* (castor bean) seeds, in combination with Benznidazole against *Trypanosoma cruzi*. The RCB-4 peptide was isolated from crude castor seed extracts through a purification process involving gel filtration chromatography (Sephadex G-50), resulting in a low molecular mass fraction (LMMF < 10 kDa). Subsequently, this fraction was subjected to reverse-phase HPLC using a C18 column to isolate the RCB-4 peptide, which presented an approximate molecular mass of 2,400 Daltons.

Trypanocidal assays were performed using parasites in the epimastigote stage. Biological activity was evaluated for BZN, the RCB-4 peptide (in both native and synthetic forms) individually, and in formulations combining the drug and the peptide. The objective was to investigate the synergism between BZN and the peptide (natural and synthetic), with observations conducted at 24, 48, 72, and 96-hour intervals. The results evidenced synergism between the compounds under two main conditions: the combination of BZN (25 µg/mL) with the peptide (5 µg/mL) after 48 hours of incubation, and the combination of BZN (50 µg/mL) with the peptide (10 µg/mL) after 24 hours of incubation.

In conclusion, the data suggest a joint and synergistic action between the drug Benznidazole and the cyclic peptide RCB-4 on the epimastigote stage of *Trypanosoma cruzi*. This synergism indicates a potential to improve the efficacy of Chagas disease treatment, allowing for reduced dosages of the components and, consequently,

minimizing the adverse effects associated with Benznidazole in the fight against this protozoan.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; Benznidazole (BZN); Cyclic peptide RCB-4; *Ricinus communis* (Castor bean).

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, representa um dos principais problemas de saúde pública nas Américas, sendo classificada pela Organização Mundial da Saúde como doença tropical negligenciada. Estima-se que afetem 6 a 7 milhões de pessoas, com cerca de 12 mil óbitos anuais, principalmente em regiões de baixa condição socioeconômica. A transmissão ocorre predominantemente por vetores triatomíneos (barbeiros), embora outras vias (transfusional, congênita, oral e acidental) também contribuam para a manutenção do ciclo. No hospedeiro vertebrado, o parasito apresenta formas tripomastigota (sanguínea), amastigota (intracelular) e epimastigota (no vetor), com elevada capacidade de invasão celular e persistência tecidual, especialmente em miocárdio e plexos nervosos entéricos. Isso resulta em fase aguda frequentemente oligossintomática e fase crônica que pode evoluir para cardiomiopatia chagásica, megaesôfago ou megacólon.

O tratamento etiológico atual baseia-se principalmente no benznidazol (BZN), nitroimidazólico ativado por nitroredutases tipo I do parasito, que gera metabólitos reativos (glioxal e radicais livres) capazes de danificar DNA, proteínas e tióis parasitários. Embora eficaz na fase aguda (taxas de cura parasitológica de até 76 %), o fármaco apresenta eficácia reduzida na fase crônica, elevada toxicidade (reações cutâneas, gastrintestinais, neurológicas e hematológicas) e relatos de resistência parasitária. Não existe vacina disponível, e a prevenção primária depende do controle vetorial e da triagem transfusional. Diante dessas limitações, a busca por estratégias terapêuticas combinatórias que potencializem a ação antiparasitária, reduza as doses necessárias e minimizem efeitos adversos torna-se prioritária.

Nesse contexto, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) de origem vegetal emergem como moléculas promissoras. Plantas superiores, ao longo de sua evolução, desenvolveram peptídeos cíclicos estáveis, ricos em cisteína e pontes dissulfeto, que conferem elevada resistência proteolítica e atividade contra patógenos. Estudos anteriores realizados no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP/UENF) identificaram, a partir de sementes de *Ricinus communis* L. (mamona), uma fração de baixa massa molecular (< 3,5 kDa) com atividade tripanocida e toxoplásmica *in vitro*. Por meio de cromatografia de exclusão molecular,

HPLC de fase reversa, sequenciamento N-terminal, espectrometria de massas (MALDI-TOF e LC-MS) e síntese em fase sólida, foi caracterizado o peptídeo cíclico RC-B4, de sequência ARCCLVMPVPPFACVKFCSSA. Esse peptídeo apresentou 90 % de homologia com o peptídeo RC-B1 previamente descrito em análises proteômicas de cultivares de *R. communis*, massa molecular aproximada de 2.400 Da, N-terminal bloqueado e resistência a proteases quando nativo. Ensaios mostraram que o RC-B4 (purificado e sintético) inibe o crescimento de formas extracelulares e intracelulares de *T. cruzi* em até 50 % nas concentrações de 10–15 µg/mL, sem citotoxicidade significativa para células hospedeiras LLC-MK2 nas doses testadas.

A presente dissertação constitui continuação direta desses achados. Partindo da caracterização estrutural e da atividade antiparasitária isolada do RC-B4 obtida por Galossi-de-Souza (2024), o presente trabalho avalia o potencial efeito sinérgico desse peptídeo cíclico (nas formas nativa e sintética) em associação com o benznidazol sobre formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c) *in vitro*.

1. REVISÃO DE LITERATURA: DA DOENÇA DE CHAGAS ÀS NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS

1.1. *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e seu ciclo de vida

A doença de Chagas foi descrita pela primeira vez em 1909 pelo biólogo brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas, durante pesquisas realizadas em uma campanha contra a malária no estado de Minas Gerais. Também denominada Tripanossomíase Americana, trata-se de uma das patologias de mais ampla distribuição no continente americano, ocorrendo desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina e o Chile (NOGUEIRA *et al.*, 2009).

Trypanosoma cruzi é um protozoário parasito intracelular obrigatório e o agente etiológico da doença de Chagas, apresentando elevada capacidade de infecção em diversos tipos celulares do hospedeiro vertebrado. Sua transmissão ao ser humano e a outros mamíferos ocorre principalmente por meio do hospedeiro invertebrado, os triatomíneos da subfamília *Triatominae* (família *Reduviidae*), com destaque para espécies como *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus*, popularmente conhecidos como barbeiros, através de fezes ou urina contaminadas (WHO, 2024; WHO, 2025).

Além do homem, o ciclo do *T. cruzi* envolve uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados, incluindo mamíferos domésticos (como cães e gatos) e silvestres (como roedores, marsupiais — especialmente gambás —, tatus e primatas), que atuam como reservatórios naturais do parasito e desempenham papel fundamental na manutenção e disseminação da infecção nos diferentes ecossistemas. A Figura 1 ilustra um exemplar do inseto popularmente denominado barbeiro, reconhecido como o principal vetor envolvido na disseminação da doença de Chagas.



Figura 1: Representação do Triatomíneo (bicho-barbeiro)
(<https://www.biologianet.com/doencas/doenca-de-chagas.htm>)

A tripanossomíase americana, amplamente conhecida como doença de Chagas, consiste em uma zoonose provocada pelo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (Figura 2). Esse protozoário integra a ordem *Kinetoplastida* e a família *Trypanosomatidae*, grupo que também abrange organismos pertencentes aos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*. Entre suas particularidades estruturais, destaca-se a presença do cinetoplasto, uma região mitocondrial especializada que contém uma rede organizada de DNA circular, conferindo características biológicas singulares a esses parasitos (Donelson *et al.*, 1999).

No que se refere à transmissão, os principais vetores com importância epidemiológica pertencem aos gêneros *Panstrongylus*, *Triatoma* e *Rhodnius*, inseridos na subfamília *Triatominae*, da família Reduviidae. Esse grupo reúne cerca de 148 espécies já descritas, com predominância na América Latina. Entretanto, apenas uma parcela dessas espécies apresenta papel significativo na dinâmica de transmissão da doença, destacando-se *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma sordida*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus*.

A doença de Chagas, uma patologia tropical negligenciada e silenciosa, afeta aproximadamente 6 a 7 milhões de pessoas no mundo, sendo a maioria na América Latina, e causa cerca de 12.000 mortes anualmente (WHO, 2024; 2025).

O mecanismo de transmissão do *T. cruzi* ao homem ocorre através da deposição de fezes e urina do triatomíneo infectado sobre a pele danificada e pelas mucosas do hospedeiro no momento do seu repasto sanguíneo. No entanto, existem

outras formas de transmissão como a transfusão de sangue, transmissão congênita, acidentes de laboratório, transplantes de órgãos e por via oral (Brener *et al.*, 1992).



Figura 2: Representação do *Trypanosoma cruzi*.

(<https://brasilecola.uol.com.br/doencas/doenca-chagas.htm>)

Ao longo de seu ciclo biológico, ilustrado na Figura 3, o *Trypanosoma cruzi* apresenta três estágios evolutivos com distinções estruturais e funcionais bem definidas: tripomastigota, amastigota e epimastigota. No interior do inseto vetor, pertencente à subfamília *Triatominae* (família *Reduviidae*), os parasitos ingeridos durante o repasto sanguíneo deslocam-se até o intestino médio, onde se diferenciam em epimastigotas, formas flageladas caracterizadas por intensa atividade replicativa por divisão binária.

Posteriormente, ao alcançarem a porção posterior do tubo digestório do inseto, esses organismos passam por um processo de diferenciação denominado metaciclogênese, originando os tripomastigotas metacíclicos, que correspondem à forma infectante para o hospedeiro vertebrado. Tais formas são eliminadas juntamente com as excretas do vetor, geralmente durante ou após o repasto.

Uma vez em contato com o hospedeiro, os parasitos podem penetrar através de descontinuidades na pele ou por mucosas, alcançando a corrente circulatória. A partir daí, disseminam-se e invadem diferentes tipos celulares, com predileção por células musculares — especialmente cardíacas e do trato digestório — além de células do sistema mononuclear fagocitário. No ambiente intracelular, ocorre a

transformação em amastigotas, forma arredondada, desprovida de flagelo e adaptada à multiplicação no interior da célula hospedeira.

Após sucessivos ciclos replicativos, essas formas diferenciam-se novamente em tripomastigotas, que promovem a ruptura da célula infectada, sendo então liberados na corrente sanguínea. Esse processo possibilita tanto a infecção de novas células quanto a continuidade do ciclo, caso sejam ingeridos por um novo vetor durante o repasto sanguíneo, assegurando, dessa forma, a manutenção do ciclo biológico do parasito (Ley *et al.*, 1988).

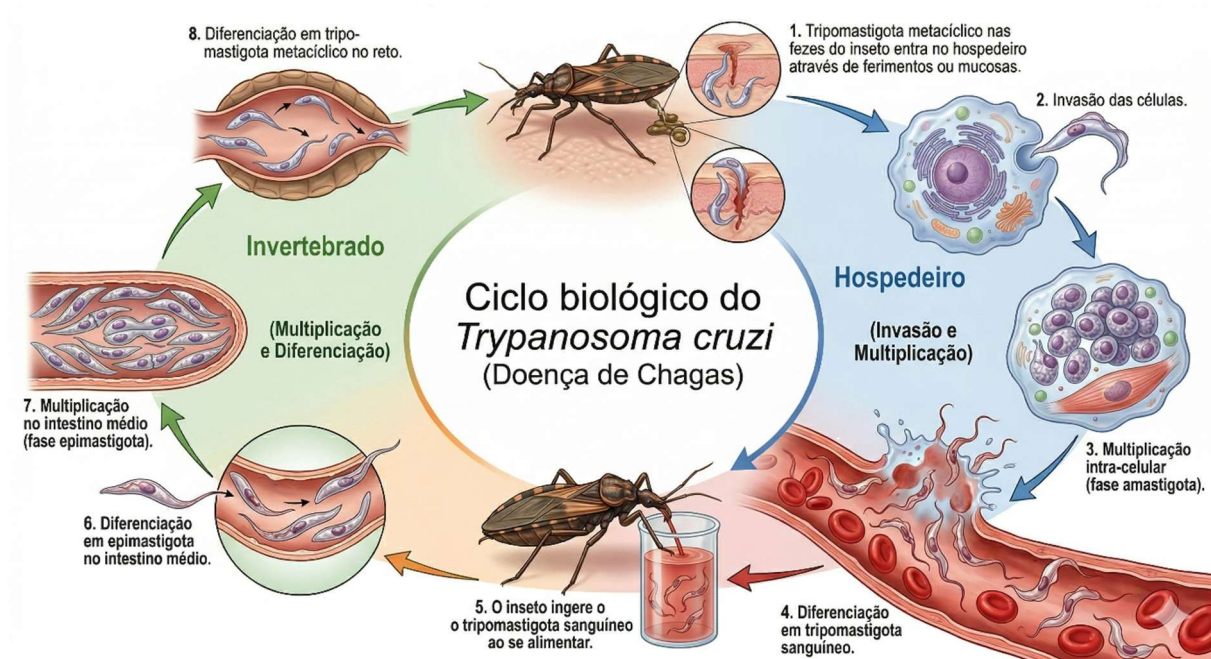


Figura 3: Ciclo Biológico do *Trypanosoma cruzi* (adaptado de CDC).

Durante a fase aguda da infecção (Figura 4), há uma elevada parasitemia e disseminação tecidual do parasito, acompanhadas por uma robusta resposta imunológica. Nesse período inicial, observa-se intensa circulação de tripomastigotas no sangue periférico, o que favorece a invasão de diferentes tipos celulares e a ampla distribuição do agente pelo organismo. Clinicamente, essa fase pode ser assintomática ou apresentar sinais inespecíficos, como febre prolongada, mal-estar, linfadenomegalia, hepatomegalia e, em alguns casos, manifestações inflamatórias locais, como o sinal de Romaña ou chagoma de inoculação.

Geralmente, o sistema imune do hospedeiro consegue controlar a parasitemia, mas não é eficaz em erradicar completamente o parasito, levando à progressão para a fase crônica da doença. Esse controle parcial está relacionado à ativação de mecanismos imunológicos celulares e humorais, com destaque para a atuação de macrófagos, linfócitos T e produção de citocinas inflamatórias, que reduzem significativamente a carga parasitária circulante, porém permitem a persistência do *Trypanosoma cruzi* em nichos teciduais.

É nesta etapa crônica que podem emergir manifestações clínicas severas como cardiomiopatia chagásica, megaesôfago e megacólon, que são complicações emblemáticas da doença de Chagas (Coura & Borges-Pereira, 2010). A fase crônica pode permanecer por longos períodos na forma indeterminada, sem sinais clínicos evidentes, ou evoluir progressivamente para formas determinadas, caracterizadas por comprometimento cardíaco — incluindo arritmias, insuficiência cardíaca e risco de morte súbita — e alterações do trato digestório, decorrentes da destruição de plexos nervosos entéricos, resultando em distúrbios motores e dilatações patológicas desses órgãos.

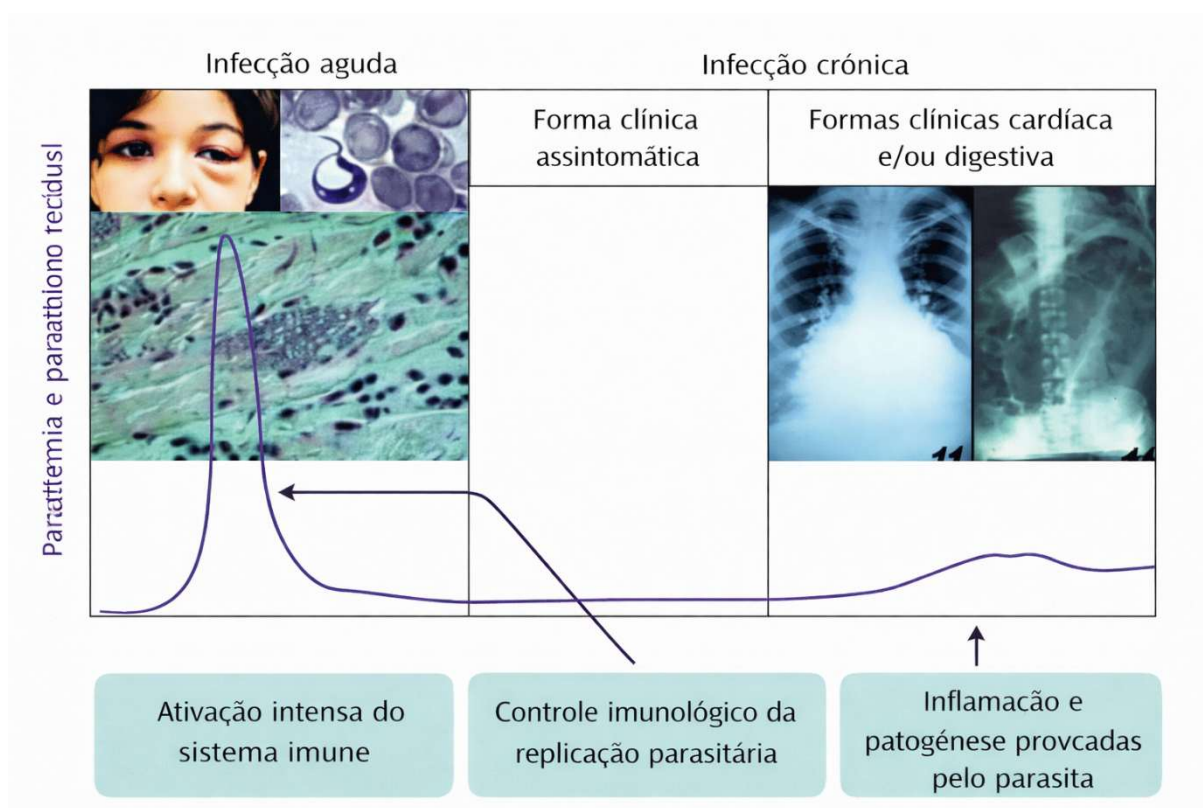


Figura 4: Fases clínicas da doença de Chagas (adaptado de JUNQUEIRA et al., 2010).

Existem medicamentos para o combate ao *T. cruzi* quando invadem o hospedeiro e causam a doença; porém nos deparamos com fator da resistência desses parasitos a essas classes de fármaco (Filardi & Brener, 1987; Austin, *et al.*, 1999). Não há uma vacina efetiva contra a doença de Chagas, a prevenção primária desta doença se faz basicamente pelo controle do vetor e pela prevenção da transmissão transfusional. Uma abordagem utilizada com sucesso no controle da transmissão da doença nas últimas décadas tem sido a eliminação dos vetores domiciliados através do uso de inseticidas. Isto implica na necessidade de identificar novos compostos com ação antiparasitária (Souza *et al.*, 1984).

1.2. Fármaco Benznidazol

No cenário brasileiro, o benznidazol (BZN) consolida-se como a principal alternativa terapêutica disponível para o tratamento etiológico da doença de Chagas. Atualmente, o fármaco é produzido e distribuído pelo Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE), após a cessão dos direitos e da tecnologia de fabricação pela empresa Roche ao governo brasileiro, tornando-o o recurso central no combate ao *Trypanosoma cruzi*. Quimicamente, o benznidazol (Figura 5) apresenta ação direta contra as formas tripomastigotas circulantes e amastigotas intracelulares, sendo que sua eficácia clínica é variável e dependente de fatores como a dosagem administrada, o tempo de tratamento e a fase em que a doença se encontra (Maximiano *et al.*, 2010).

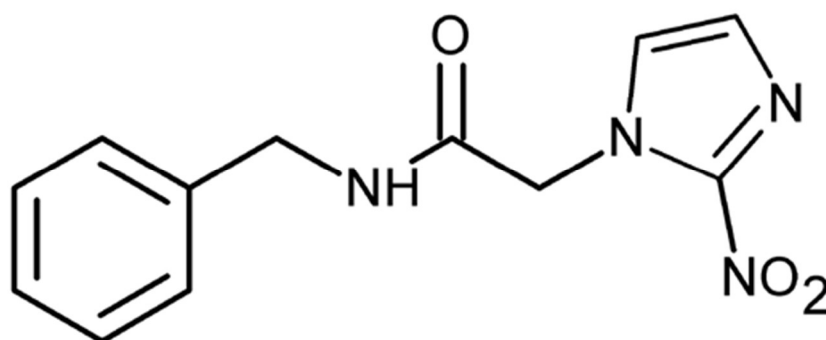


Figura 5: Estrutura molecular de BNZ (Retirado do texto Maximiano *et al.*, 2010)

Derivado do 2-nitroimidazol, o benznidazol atua como um potente antiparasitário com atividade comprovada tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Após a administração por via oral, o composto apresenta uma absorção quase integral pelo trato gastrointestinal, atingindo concentrações plasmáticas máximas (entre 2,22 e 2,8 µg/mL) em um intervalo de 2 a 4 horas. No organismo, cerca de 44% do fármaco circula ligado a proteínas plasmáticas, apresentando uma biotransformação limitada e mantendo-se predominantemente em sua forma inalterada. Com uma meia-vida plasmática estimada em 12 horas, sua eliminação ocorre através da urina e das fezes, tanto na forma original quanto por meio de seus metabólitos (Maximiano *et al.*, 2010).

Apesar de sua importância clínica, a eficácia do benznidazol é frequentemente limitada, especialmente quando administrado na fase crônica da infecção. Na fase aguda, o fármaco demonstra resultados satisfatórios, com taxas de cura parasitológica que alcançam aproximadamente 76%. Entretanto, em casos de infecção crônica recente, como observado em populações infantis, esse índice de cura declina para cerca de 55,8%. Além da variação na resposta terapêutica, o uso do BZN é acompanhado por uma série de reações adversas que podem comprometer a adesão ao tratamento. Entre os sintomas mais relatados estão náuseas, vômitos, tremores, cefaleia, anorexia, perda de peso e eritemas cutâneos, além do risco de discrasias sanguíneas graves, como a leucopenia (Maximiano *et al.*, 2010).

A segurança do uso prolongado do benznidazol também é objeto de preocupação devido ao seu potencial tóxico e mutagênico. Estudos experimentais em modelos bacterianos e protozoários confirmaram a mutagenicidade e toxicidade do composto, levantando questões sobre riscos carcinogênicos em humanos. Evidências clínicas sugerem uma possível relação entre o uso do fármaco e o surgimento de neoplasias malignas, especialmente em pacientes chagásicos submetidos a transplantes cardíacos. Adicionalmente, ensaios com animais, como coelhos infectados pelo *T. cruzi*, demonstraram uma alta prevalência de linfomas malignos após a exposição ao tratamento com BZN (Maximiano *et al.*, 2010).

Existem medicamentos para o combate ao *T. cruzi* quando invadem o hospedeiro e causam a doença, porém nos deparamos com fator da resistência desses parasitos a essas classes de fármacos, até agora descobertas e usadas para combatê-los (Filardi & Brener, 1987; Austin, *et al.*, 1999; Campos *et al.*, 2014). Isto implica na necessidade de identificar novos compostos com ação antiparasitária.

1.3. Mecanismo de ação do Benznidazol

O BZN é ativado enzimaticamente por nitroredutases tripanossômicas tipo I (NTR) no interior do parasito. Essas enzimas são insensíveis ao oxigênio e não possuem homólogos em mamíferos. Em uma série de reações, as NTRs dependentes de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) catalisam a redução do motivo 2 nitroimidazol, formando uma hidroxilamina intermediária. Essa hidroxilamina é posteriormente transformada, por vias não enzimáticas, em glioxal, um metabólito altamente reativo. O glioxal formado é capaz de se ligar covalentemente a proteínas, DNA/RNA e pequenas moléculas como a glutathione. Esses metabólitos reativos são tóxicos para o parasito, resultando em um efeito tripanocida rápido e localizado contra as formas intra e extracelular do *T. cruzi*. Estudos recentes sugerem que a produção de glioxal pode não ser o único mecanismo citotóxico do BZN. A ligação covalente de múltiplos metabólitos reativos a tióis de baixo peso molecular também pode contribuir para sua ação (Petterson; Wyllie, 2014).

Evidências recentes indicam que o BZN age por meio de radicais livres nitrogenados produzidos por nitro-redutases humanas que induzem modificações covalentes de macromoléculas. Esses radicais livres podem danificar o DNA do parasito e exercem efeito inibitório na síntese de proteínas e na síntese do ácido ribonucleico em células de *T. cruzi*. O mecanismo atribuído ao BZN que vem sendo estudado, é a inibição da enzima NADH-fumarato redutase, a qual está presente no *T. cruzi* e catalisa a redução do fumarato gerando succinato (Petterson; Wyllie, 2014).

A função da enzima mencionada é crucial tanto na produção de energia do parasito quanto na remoção de equivalentes redutores. Estudos indicam que, na falta de fumarato, a enzima pode liberar O₂ e que uma inibição parcial pode permitir que elétrons se transfiram para o oxigênio molecular, resultando na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (TURRENS *et al.*, 1996; CHRISTMAS; TURRENS, 2000).

A vulnerabilidade dos parasitos às espécies reativas de oxigênio (EROs) está frequentemente ligada à insuficiência em suas defesas bioquímicas contra os danos causados por essas espécies (LOCATELI *et al.*, 2004; TURRENS, 2004).

O *T. cruzi*, em particular, apresenta níveis reduzidos de glutathione e não possui catalase nem glutathione peroxidase, o que o torna excepcionalmente suscetível ao ataque das EROs e com capacidade limitada para desintoxicar peróxido de

hidrogênio (BOVERIS *et al.*, 1980). A defesa antioxidante do *T. cruzi* é realizada pela enzima tripartitionina redutase, uma flavoenzima dependente de NADPH que catalisa a redução do antioxidante tripartitionina, combatendo o estresse oxidativo intracelular do parasito. Além disso, o BZN demonstrou efeitos imunomoduladores *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*, o que pode influenciar a patogênese da DC em humanos (LOCATELI *et al.*, 2004; TURRENS, 2004).

Em resumo, o BZN representa uma abordagem importante no tratamento da doença de Chagas, embora sua eficácia na fase crônica seja limitada e esteja associada a mecanismos de resistência por parte dos parasitos e efeitos tóxicos sobre o hospedeiro. Por isso, outras estratégias envolvendo, a procura na biodiversidade por produtos naturais bioativos usando bioensaios apropriados é uma alternativa importante (LOCATELI *et al.*, 2004; TURRENS, 2004).

Dados da literatura descrevem que produtos naturais produzidos por plantas, fungos ou outros organismos são a fonte direta para medicamentos disponíveis (NOGUEIRA *et al.*, 2009) entre estes, despontam os peptídeos antimicrobianos, e daremos ênfase aos peptídeos cíclicos.

1.4. Peptídeos antimicrobianos

As plantas superiores desenvolveram uma ampla variedade de mecanismos de defesa para enfrentar estresses físicos, químicos e biológicos. Esses desafios incluem condições como seca, frio, exposição a metais pesados, poluentes e ataques de patógenos, incluindo fungos, bactérias e vírus. Nesse contexto, tais mecanismos podem ser classificados em respostas constitutivas e induzidas, envolvendo barreiras estruturais, como a parede celular e a cutícula, bem como a ativação de vias metabólicas responsáveis pela produção de compostos de defesa, como fitoalexinas, espécies reativas de oxigênio e proteínas específicas (ALTEI *et al.*, 2019).

As proteínas relacionadas à patogênese (PR) foram inicialmente identificadas em folhas de tabaco infectadas pelo vírus do mosaico do tabaco no início dos anos 1970 e posteriormente caracterizadas como proteínas induzidas durante ataques patogênicos (W. F., 2019). Essas proteínas desempenham papel fundamental na resposta imune das plantas, atuando tanto diretamente contra os agentes infecciosos quanto na sinalização e amplificação das respostas de defesa (ALTEI *et al.*, 2019).

As bactérias produzem peptídeos policíclicos, como os lantibióticos, enquanto todos os principais grupos biológicos sintetizam peptídeos circulares, incluindo as bacteriocinas bacterianas, ciclotídeos vegetais e β -defensinas animais. Nos vegetais, os AMPs frequentemente apresentam elevada concentração de resíduos de cisteína, o que favorece a formação de múltiplas pontes dissulfeto — geralmente variando entre duas e seis — responsáveis por conferir elevada estabilidade estrutural, resistência à degradação proteolítica e manutenção da atividade biológica em diferentes condições ambientais (ALTEI *et.al.*, 2019).

Além de sua ação direta, que envolve a desestabilização de membranas celulares, formação de poros e interferência em processos metabólicos essenciais dos patógenos, os AMPs também podem atuar como moléculas sinalizadoras, participando da modulação de vias de defesa e da amplificação da resposta imune vegetal. Dessa forma, esses peptídeos desempenham papel estratégico na proteção contra uma ampla gama de agentes infecciosos, incluindo bactérias, fungos e vírus, contribuindo significativamente para a sobrevivência e adaptação das plantas em ambientes adversos (ALTEI *et.al.*, 2019).

Os AMPs vegetais compartilham várias características com seus análogos em micróbios, insetos e animais. Estes incluem suas formas moleculares distintas, carga positiva e natureza anfipática - todas relacionadas aos seus papéis defensivos primários contra fungos, bactérias e vírus na membrana. Além da riqueza em cisteína, essas características são exemplificadas pelas famílias tioninas e defensinas vegetais (ALTEI *et.al.*, 2019).

A classificação das famílias de AMPs vegetais baseia-se principalmente nos motivos cisteínicos característicos que exibem um padrão definido com um número específico de resíduos não-cisteínicos entre as cisteínas adjacentes. Atualmente existem mais de mil AMPs isolados de um número restrito de espécies vegetais e espera-se que esse número cresça com futuras descobertas (ALTEI *et.al.*, 2019).

A descoberta da gramicidina S, também conhecida como Gramicidina Soviética, em 1944, por Georgii Gause e Maria Brazhnikova, marcou um momento decisivo na evolução dos peptídeos cíclicos (GAUSE; BRAZHNIKOVA, 1944). Este peptídeo, identificado durante a Segunda Guerra Mundial, foi rapidamente incorporado como um antibiótico de relevância no tratamento de soldados feridos. Desde então, diversos peptídeos cíclicos passaram a ser descritos na literatura

científica, muitos dos quais mantêm aplicação terapêutica até a atualidade. Entre esses compostos destacam-se a calcitonina, a octreotida, a ciclosporina A, a nisina, a polimixina, a colistina, a gomesina, o ziconotídeo e a didemina, evidenciando a diversidade estrutural e funcional desse grupo de moléculas bioativas (HAMLEY, 2015; LEE; KIM, 2015).

Os ciclotídeos são peptídeos encontrados em diversas espécies de plantas como, por exemplo, a família *Rubiaceae*, e que apresentam estruturas peculiares, pois possuem conformação circular, possuem várias atividades como uterotônica, antimicrobiana, antihelmíntica, moluscicida, antitumoral, entre outros, mostrando seu grande espectro de ação (ALTEI *et.al.*, 2019).

Encontramos quatro topologias para a ciclização destes peptídeos: Cabeça-cauda; ligação por meio das cadeias laterais; ligação cadeia lateral-cabeça; ou cadeia lateral-cauda (PINTO, *et. al.* 2013). Deve-se considerar que a estrutura tem relação direta com a atividade do composto em estudo; assim os peptídeos desempenham seus papéis dependendo da composição e sequência dos aminoácidos que o formam, bem como, da sua disposição espacial (ALTEI *et.al.*, 2019).

Os AMPs podem ser classificados de algumas diferentes formas, como aqueles que possuem ou não pontes dissulfeto. Os peptídeos mais amplamente caracterizados são aqueles que as possuem, sendo possível observar a presença de cisteínas em número par (4, 6 ou 8) interconectadas formando pontes dissulfeto 6 e que confere alta estabilidade estrutural a condições físico-químicas extremas (Broekaert *et al.*, 1997; Campos *et al.*, 2018). Com base na presença ou ausência dos dois principais elementos da estrutura secundária α -hélices e folhas β , os AMPs são divididos em algumas classes principais: (i) peptídeos contendo α -hélices (magainina, cecropina e catelicidina); (ii) peptídeos de estruturas lineares estendidas (desprovidas de elementos α ou β , mas tipicamente ricas em um aminoácido específico, como Gly, Arg, Trp ou Pro) (indolicidinas); (iii) peptídeos contendo folhas β , frequentemente estabilizadas com uma ou mais pontes dissulfeto (α -defensina 1 de humanos); (iv) peptídeos envolvendo α -hélices e folhas β (defensinas de humanos, mamíferos, invertebrados e plantas); e (v) podem ainda apresentar uma configuração cíclica (ciclotídeos) (Figura 1) (Nguyen *et al.*, 2011; Mojsoska e Jenssen, 2015; Wang, 2015).

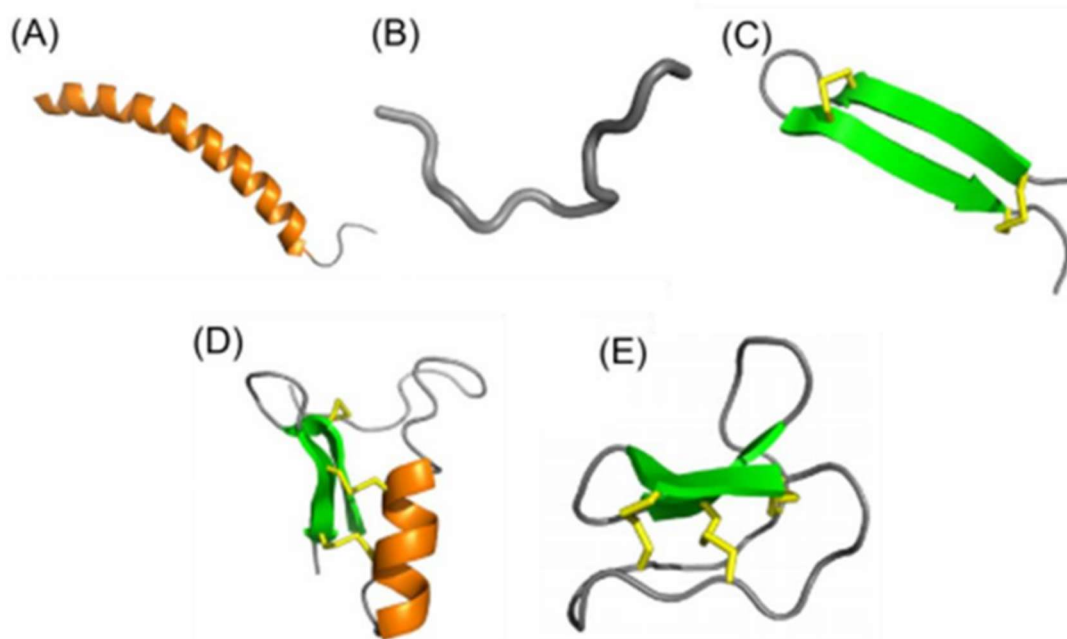


Figura 7: Representação esquemática das principais classes estruturais de peptídeos incluindo: (A) Peptídeos que apresentam uma conformação α -hélices na presença de micelas. (B) Peptídeos de estruturas estendidas. (C) Peptídeos contendo folha β (são tipicamente estabilizados por pontes dissulfeto). (D) Peptídeos contendo α -hélices e folha β . (E) Peptídeos que apresentam configuração cíclica. (α -hélices (laranja), folhas β (verde) e pontes dissulfeto (amarelo). (Adaptada de Koehbach e Craik, 2019).

Há, genericamente, peptídeos ditos lineares e cíclicos. A aplicação de peptídeos lineares como fármacos é potencialmente limitada, pois são susceptíveis à clivagem proteolítica, possuem pobre farmacocinética e pouca biodisponibilidade (PINTO, *et. al.* 2013). Tais limitações não são observadas nos peptídeos cíclicos, o que os fazem atrativos nos estudos de bioprospecção. A interessante topologia do anel cativou a imaginação dos químicos por muitos anos, os quais relacionam os peptídeos cíclicos a outros macrociclos bioativos, sendo os primeiros de particular importância devido à sua estabilidade às proteases o que explicaria seu melhor potencial terapêutico (PINTO, *et. al.* 2013). Isolar, extrair, elucidar e investigar as atividades inerentes a essas moléculas é de grande relevância para a bioprospecção

de produtos naturais (PINTO, *et. al.* 2013). Nas plantas as descobertas desses peptídeos são limitadas a determinados táxons, sendo que os estudos descrevem a ocorrência, composição química e função de peptídeos são cada vez mais frequentes.

Nosso foco de investigação científica incide sobre os peptídeos cíclicos (PC) de pequena dimensão, derivados de fontes botânicas, especificamente das sementes e pólen da planta *Ricinus communis*. A química dos peptídeos cíclicos é um campo de estudo cativante, repleto de desafios intrigantes que demandam solução para que possamos entender completamente sua estrutura e mecanismo de ação. Estes compostos, encontrados em um número limitado de espécies vegetais, despertam grande interesse na indústria farmacêutica devido ao seu vasto leque de atividades biológicas e ao seu potencial como protótipos para o desenvolvimento de novos medicamentos (ALTEI *et.al.*, 2019).

1.5. Mecanismo de ação do peptídeo cíclico

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) catiônicos desempenham um papel antibacteriano crucial ao interagir com as membranas bacterianas negativamente carregadas, aumentando assim a permeabilidade da membrana, conforme é indicado na figura 8, o que resulta na lise celular e liberação do conteúdo intracelular. Aproximando-se da membrana citoplasmática através de interações eletrostáticas com a membrana microbiana, os AMPs aderem e interagem com componentes aniônicos da membrana plasmática. Antes dessa etapa, os AMPs devem transpor o polissacarídeo capsular e outros elementos da parede celular, como o LPS em bactérias Gram-negativas e ácido lipoteicoico e peptidoglicano em bactérias Gram-positivas (LEY, V.; ANDREWS, N. W.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V. *et al.*, 1988).

A mudança conformacional dos AMPs e a relação peptídeo-lipídio são fatores determinantes na interação. Pesquisas indicam que os AMPs α -helicoidais se ligam à membrana lipídica aniônica e alteram sua estrutura desorganizada em solução aquosa para uma estrutura α -helicoidal anfifílica, otimizando a interação com a membrana. Em contraste, os peptídeos folhas β mantêm sua conformação estável devido às pontes dissulfeto robustas durante a interação com a membrana.

A proporção peptídeo-lipídio é outro aspecto crítico que influencia a interação dos AMPs com a membrana celular. Em baixas proporções peptídeo-lipídio, os AMPs se alinham paralelamente à superfície da membrana plasmática. À medida que essa proporção aumenta, os AMPs se orientam verticalmente e penetram no núcleo hidrofóbico da membrana. Isso leva à permeabilização da membrana e ao subsequente vazamento de íons intracelulares e metabólitos, culminando na morte celular (LEY, V.; ANDREWS, N. W.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V. *et al.*, 1988).

Modelos hipotéticos explicam a formação de poros na membrana incluem o modelo de aduela de barril, poro toroidal, tapete e agregado. No modelo barril-stave, o aumento na quantidade de AMPs ligados à membrana promove agregação e transformação conformacional. Isso resulta no deslocamento local dos grupos fosfolipídios e no afinamento da membrana (LEY, V.; ANDREWS, N. W.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V. *et al.*, 1988).

Durante a penetração na bicamada fosfolipídica, as regiões hidrofóbicas dos peptídeos α -helicoidais e folhas β se aproximam das regiões hidrofóbicas dos fosfolipídios da membrana. As regiões hidrofílicas das hélices peptídicas ficam voltadas para dentro, formando um lúmen central com várias moléculas helicoidais dispostas paralelamente (LEY, V.; ANDREWS, N. W.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V., 1988).

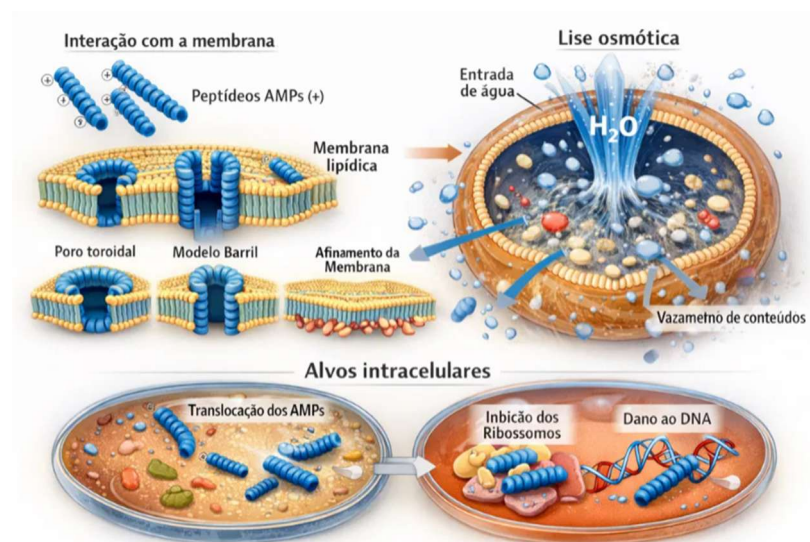


Figura 8: Mecanismo de ação dos peptídeos microbianos (elabora por inteligência artificial, levando em consideração o texto explicativo da tese, 2026).

1.6. Peptídeo cíclico de mamona (RCB-4)

Os peptídeos cíclicos, devido à sua rigidez conformacional, apresentam diversas propriedades vantajosas em comparação com peptídeos lineares. Essa rigidez desempenha um papel crucial na interação com receptores celulares, cujos sítios de ligação possuem complementaridade estrutural com essas moléculas, favorecendo um ajuste mais preciso entre o peptídeo e o receptor. Como consequência, observa-se aumento da afinidade e da seletividade pela molécula-alvo. Além disso, a conformação cíclica contribui para maior estabilidade estrutural, reduzindo a suscetibilidade à degradação por hidrólise enzimática (TAGUCHI; SUGA, 2021; DOUGHERTY *et al.*, 2024; JI *et al.*, 2024).

A rigidez conferida pela ciclização dos peptídeos permite a manutenção de uma conformação estrutural específica, otimizando a interação com seus alvos biológicos. Esse processo pode reduzir a polaridade do composto, favorecendo a permeabilidade através da membrana celular e, conseqüentemente, facilitando a absorção passiva no trato gastrointestinal. Além disso, a rigidez estrutural influencia diretamente a seletividade, uma vez que peptídeos cíclicos podem ser projetados para se encaixar de maneira altamente específica em determinados receptores, minimizando interações indesejadas com outros alvos. Essa característica é particularmente relevante em aplicações terapêuticas, nas quais a alta seletividade contribui para a redução de efeitos adversos. Adicionalmente, a conformação cíclica protege os peptídeos contra a degradação enzimática, aumentando sua estabilidade. Dessa forma, a rigidez conformacional contribui significativamente para a eficácia desses compostos em interações com receptores celulares, destacando seu potencial em aplicações terapêuticas e diagnósticas (TAGUCHI; SUGA, 2021; DOUGHERTY *et al.*, 2024; JI *et al.*, 2024).

Em vista dos aspectos mencionados, surgiu o interesse em explorar as frações da mamona (*Ricinus communis*). Conforme estudo preliminar realizado por Galossi-de-Souza, F. em 2024, uma fração proteica de baixo peso molecular (MM < 10 kDA) extraída das sementes da *Ricinus communis* demonstrou inibir o crescimento dos parasitos *T. cruzi* em 50%, tanto no ambiente intracelular quanto extracelular. Neste estudo, os componentes dessa fração foram isolados e seus efeitos sobre o *T. cruzi* foram avaliados. A determinação da estrutura desses compostos e a compreensão do

seu mecanismo de ação são passos fundamentais para o desenvolvimento de estratégias eficazes contra esses parasitos.

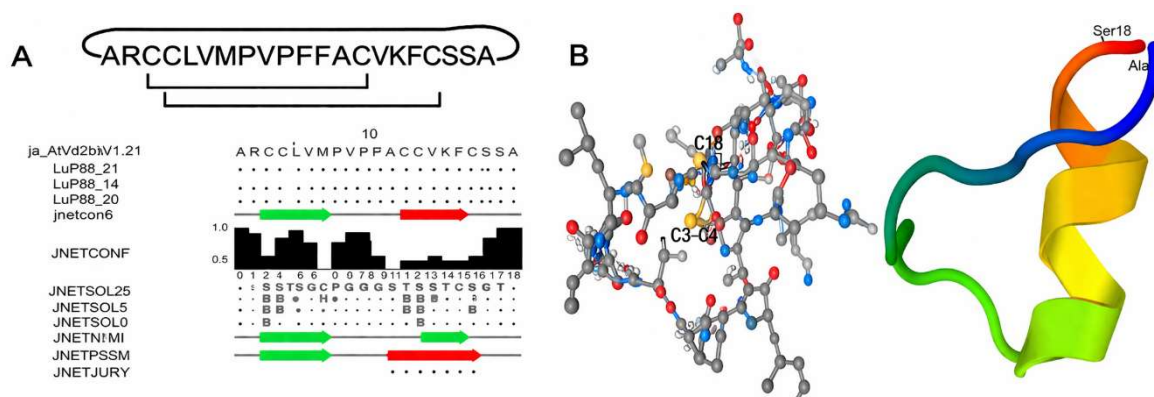


Figura 9: Sequência do RCB-4, obtida por espectrometria de massas. (A)

Predição da estrutura secundária; (B) Predição da estrutura 3D. (Imagem tirada da tese de doutorado de Galossi-de-Souza, F., 2024).

1.7. Terapia de combinação

A terapia combinada é uma estratégia promissora para otimizar a eficácia dos medicamentos. Ela envolve a administração simultânea de pelo menos dois compostos que atuam em diferentes alvos celulares e vias metabólicas. Essa abordagem oferece vantagens significativas, como a: redução de concentrações e doses onde a combinação de medicamentos permitem reduzir as concentrações individuais, minimizando assim os efeitos tóxicos; seguindo com a minimização da resistência que ao atuar em múltiplos alvos, a terapia combinada pode diminuir o risco de desenvolvimento de resistência aos medicamentos e, por fim, a sinergia de efeitos onde a interação entre os compostos podem potencializar seus efeitos, resultando em melhores resultados clínicos. Um exemplo relevante é a terapia combinada no tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Nesse caso, a combinação de diferentes antirretrovirais é mais eficaz do que o uso isolado de um único medicamento (FIVELMAN; ADAGU; WARHURST, 2004).

A pesquisa de compostos tripanocidas voltados ao combate da doença de Chagas tem recebido crescente atenção. Nesse contexto, a combinação de diferentes agentes terapêuticos tem se mostrado uma estratégia promissora, uma vez que pode

aumentar a eficácia do tratamento, reduzir a toxicidade associada às altas doses e minimizar o desenvolvimento de resistência parasitária (FREIRE *et al.*, 2024).

2. OBJETIVO

Avaliar o efeito sinérgico do fármaco benznidazol combinado com o peptídeo cíclico RCB-4, isolado de sementes de *Ricinus communis*, no combate ao protozoário *Trypanosoma cruzi*.

2.1. Objetivos Específicos

- A- Observar a concentração inibitória separadamente do Peptídeo RCB-4 natural e obtido por síntese no estado sólido e do Fármaco benznidazol sob o desenvolvimento dos parasitos, *in vitro*;
- B- B- Associar o peptídeo cíclico RCB-4 ao fármaco benznidazol em ensaios de citotoxicidade utilizando células LLC-MK2;
- C- C- Avaliar a ação do peptídeo cíclico RCB-4 associado ao fármaco benznidazol sobre o parasito *Trypanosoma cruzi*.

3.0. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Diagrama



Figura 10: Diagrama (DUARTE, 2026).

3.2. Obtenção das sementes

As sementes de *Ricinus communis* foram fornecidas pela “Empresa Brasileira de Pesquisa e Agricultura (Embrapa)” – Campinas, São Paulo.

3.3. Extração de peptídeos da semente de *Ricinus communis*

A extração foi realizada segundo o protocolo descrito por Craik et. Al. (2012). As sementes foram abertas, descascadas e somente o cotilédone foi utilizado. Um total de 200g foi macerada com auxílio de um cadinho e um pistilo, de forma seca até a transformação deste em uma massa bruta oleaginosa.

Em seguida foi adicionado o composto químico Hexano em uma proporção de 1:5 até cobrir toda a massa. O mesmo volume de diclorometano foi adicionado e

deixado sob agitação por 12 horas em temperatura ambiente. Em seguida disponibilizamos as amostras em tubos de plástico tipo Falcon TPP (50mL).

Os tubos, contendo cerca de 20 mL foram centrifugados a 14.000 x g por 30 min e a 4 °C. O sobrenadante foi coletado, submetido ao processo da centrifugação. Disponibilizamos o farelo resultante em um papel absorvente, levamos para a estufa por 24h até formar uma massa mais consistente. O volume final foi armazenado em geladeira a 4° C.

3.4. Cromatografia de exclusão molecular

O extrato proteico (1 mL) obtido foi submetido à cromatografia de filtração em gel (exclusão por tamanho), utilizando resina Sephadex G-50 previamente equilibrada em TFA 0,1%, conforme descrito por Porath e Flodin (1959). As amostras foram eluídas com TFA 0,1%, sob fluxo de 1,0 mL/min, com coleta de frações de 1,0 mL, sendo o monitoramento realizado a 220 nm. A fração correspondente à massa molecular inferior a 10.000 Dalton (FBPM) foi submetida a uma nova etapa de cromatografia de filtração em gel, utilizando resina Sephadex G-10 equilibrada em TFA 0,1%, seguindo o mesmo princípio metodológico descrito por Andrews (1964). As amostras foram eluídas nas mesmas condições (fluxo de 1,0 mL/min), monitoradas a 220 nm, com coleta de frações de 1,0 mL.

3.5. Cromatografia de fase reversa utilizando sistema de alta eficiência (HPLC)

A fração de baixo peso molecular (MW < 10 kDa) foi submetida a um novo processo de purificação por cromatografia líquida de fase reversa (coluna C18), técnica baseada na interação hidrofóbica entre os analitos e a fase estacionária apolar, conforme descrito por Horváth *et al.*, (1967). Foram utilizadas como fase móvel A (H₂O + TFA 0,1%) e fase móvel B (H₂O + TFA 0,1% + ACN 80%), sistema amplamente empregado para separação de peptídeos devido à capacidade do acetonitrilo em modular a eluição conforme a hidrofobicidade das moléculas, conforme discutido por Snyder e Kirkland (1979).

Os peptídeos isolados foram concentrados em centrífuga a vácuo (SpeedVac, Savant – Modelo SC1110), procedimento recomendado para remoção de solventes voláteis sem degradação dos compostos, conforme princípios descritos por Scopes

(1994), e posteriormente armazenados para análises futuras. Durante a eluição, foi empregado um gradiente de solventes, estratégia fundamental na RP-HPLC para promover a separação eficiente de compostos com diferentes graus de hidrofobicidade.

Tempo (min.)	Concentração de B (%)
0.01	0
10.00	0
25.00	15
50.00	100
52.00	100
55.00	0
60.00	Interrupção

Tabela 1: Gradiente de eluição conforme descrito por Galossi-de-Souza, F., 2022).

3.6. Dosagem de proteínas

A determinação da concentração de proteínas das amostras foi feita pelo método de BCA - Ácido Bicinconínico (Smith *et al.*, 1985), sendo utilizada a BSA (albumina sérica bovina) como padrão. As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro modelo UV-VIS *Spectrophotometer Shimadzu*, a $\lambda 595\text{nm}$.

3.7. Ensaio antitrypanosomal *in vitro*

Parasitas epimastigotas de *T. cruzi* (1×10^6) foram adicionados nos frascos de cultura contendo LIT suplementado com FBS. Foram adicionados 10 $\mu\text{g/mL}$ dos compostos peptídeo cíclico e fármaco (Benznidazol) e os parasitos foram

quantificados a cada 24 h até 96 h de tratamento. A quantificação dos parasitos foi realizada em uma câmara de Neubauer em triplicata. Os parasitos foram tratados também em diferentes concentrações (5, 10 15 e 20 µg/mL) do peptídeo cíclico e fármaco (Benznidazol). Os resultados foram mostrados como a porcentagem de crescimento do parasito em diferentes concentrações dos compostos peptídicos em um período de tratamento distinto.

Para calcular a porcentagem de crescimento do parasito o número de parasitos do controle não tratado foi ajustado para 100% e os valores dos parasitos tratados com concentrações distintas dos compostos foram derivados proporcionalmente.

Para os cálculos da concentração que inibe o crescimento do parasito em 50% (IC50), a porcentagem de crescimento do parasito foi plotada em função da concentração utilizada dos compostos e uma curva de regressão não linear foi calculada. As análises de regressão foram realizadas usando o software Sigma Plot 8.0 (Systat Software Inc., Chicago, IL, EUA). Eventualmente, nos tempos de tratamento mais longos o número IC50 foi extrapolado com base nas curvas de regressão calculadas com Sigma Plot 8.0 software (Systat Software Inc., Chicago, IL, EUA).

Os resultados dos cálculos de IC50 foram apresentados como média $\pm$ SD de três réplicas biológicas independentes.

4.0 RESULTADOS

4.1. Cromatografia de filtração em gel

Após realizar a cromatografia em Sephadex G-50, obtivemos três frações proteicas (figura 11): Fração 1, foram coletadas nos tubos 21 ao 44, resultando na fração de massa molecular (MM) > 35 kDa, enriquecida em ricina; Fração 2, foram coletadas nos tubos 45 ao 65, resultando na fração 35 > MM > 10 kDa, região onde se encontram as albuminas 2S; e Fração 3, foram coletadas nos tubos 65 ao 95, resultando na fração de massa molecular. A fração FBPM foi armazenada para futuras pesquisas.

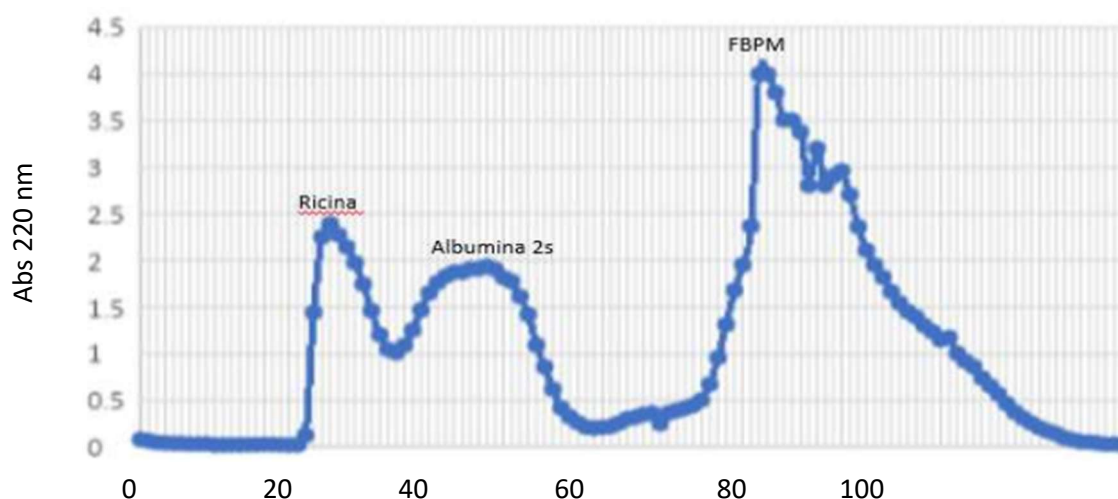


Figura 11: Perfil cromatográfico da filtração do estado proteico de sementes de *Ricinus communis* em gel

4.2. Quantificação Proteica

Empregamos o método BCA e a curva padrão é apresentada na Figura 12. O teor de proteínas na FBPM foi de 12,68 µg em 10 µL de amostra empregada no ensaio. Como o volume total da FBPM foi de 30 mL recuperamos aproximadamente 36 mg de proteína.

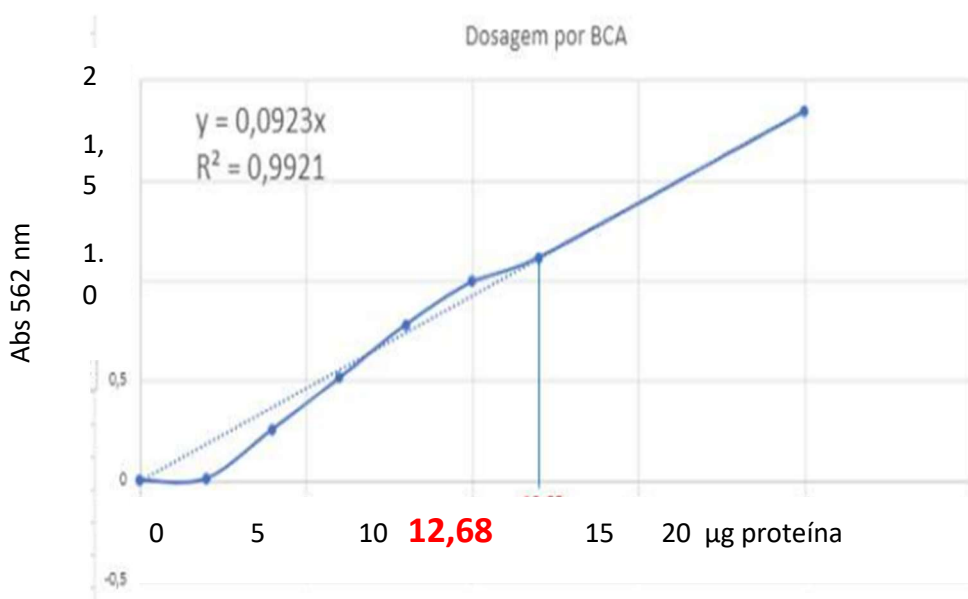


Figura 12: Dosagem de proteínas pelo método BCA - Curva padrão empregando albumina sérica bovina.

4.3. Isolamento dos componentes (FBPM) por HPLC

A cromatografia em fase reversa de alta eficiência (HPLC) da fração de baixo peso molecular (FBPM), obtida após cromatografia de exclusão molecular, permitiu a separação eficiente dos componentes presentes na amostra. O perfil cromatográfico obtido, monitorado a 220 nm em coluna C18 com gradiente de eluição (fase móvel A: TFA 0,1 % e fase móvel B: TFA 0,1 % + 80 % acetonitrila), é apresentado na Figura 13.

Observou-se a eluição de um pico majoritário e afiado em aproximadamente 8 minutos, correspondente à ricinina, um alcaloide não proteico abundantemente presente nas sementes de *Ricinus communis*. Em seguida, detectou-se um pico bem

definido em torno de 33 minutos, o qual foi identificado como o peptídeo cíclico RCB-4. As frações correspondentes a este pico foram coletadas manualmente, concentradas em SpeedVac e armazenadas a -20°C para utilização nos ensaios biológicos subsequentes.

Este resultado demonstra a eficiência da purificação por HPLC, permitindo a separação nítida entre a ricinina e o peptídeo de interesse com base nas diferenças de hidrofobicidade dos compostos, e confirma a obtenção de RCB-4 em grau de pureza adequado para os testes de atividade tripanocida.

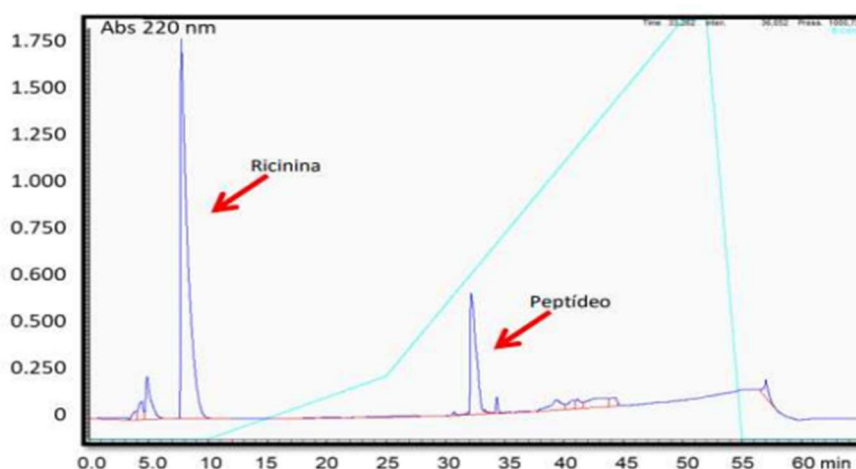


Figura 13: Perfil cromatográfico de isolamento dos peptídeos da FBMM - coluna C18 - (eluição fase móvel A:TFA 0,1% e B: TFA 0,1% + 80% ACN)

4.4 Efeito tripanocida

A Figura 14 apresenta os resultados da atividade tripanocida obtidos quando formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Dm28c) foram incubadas na presença do benznidazol (BZN), do peptídeo RCB-4 natural (RCB-4 N) e do peptídeo RCB-4 obtido por síntese em fase sólida (RCB-4 S), utilizados isoladamente ou em associação (BZN + RCB-4). Os ensaios foram realizados nas concentrações de 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ para o peptídeo (natural e sintético) e nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ para o BZN.

Observou-se uma redução dose-dependente do crescimento parasitário em todos os tratamentos testados. Na Figura 14A, o BZN na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$

reduziu o crescimento do parasito entre 20 % e 50 % após 96 horas de incubação. Nessas mesmas condições, o peptídeo RCB-4 (N ou S), na concentração de 5 µg/mL, promoveu redução de aproximadamente 30 %. A combinação BZN (25 µg/mL) + RCB-4 (5 µg/mL) evidenciou potencialização da ação tripanocida, especialmente evidente nos tempos iniciais de incubação (até 48 horas).

Na Figura 14B, o BZN a 50 µg/mL isolado inibiu o crescimento em cerca de 60%, enquanto o peptídeo RCB-4 (N ou S) a 10 µg/mL reduziu o crescimento em aproximadamente 40 % após 96 horas. Um claro efeito sinérgico foi observado já nas primeiras 24 horas de incubação, quando a associação BZN (50 µg/mL) + RCB-4 (10 µg/mL) resultou em redução de 15 %, superior aos 10 % obtidos com o BZN isolado.

Em concentrações elevadas (BZN a 100 µg/mL e peptídeo RCB-4 a 20 µg/mL), observou-se inibição do crescimento parasitário superior a 80% para o BZN e aproximadamente 40% para o peptídeo. Contudo, tais níveis estão associados a maior potencial de citotoxicidade, evidenciando a vantagem das combinações em menores doses, nas quais o efeito sinérgico promove maior eficácia antiparasitária com redução da quantidade de cada composto.

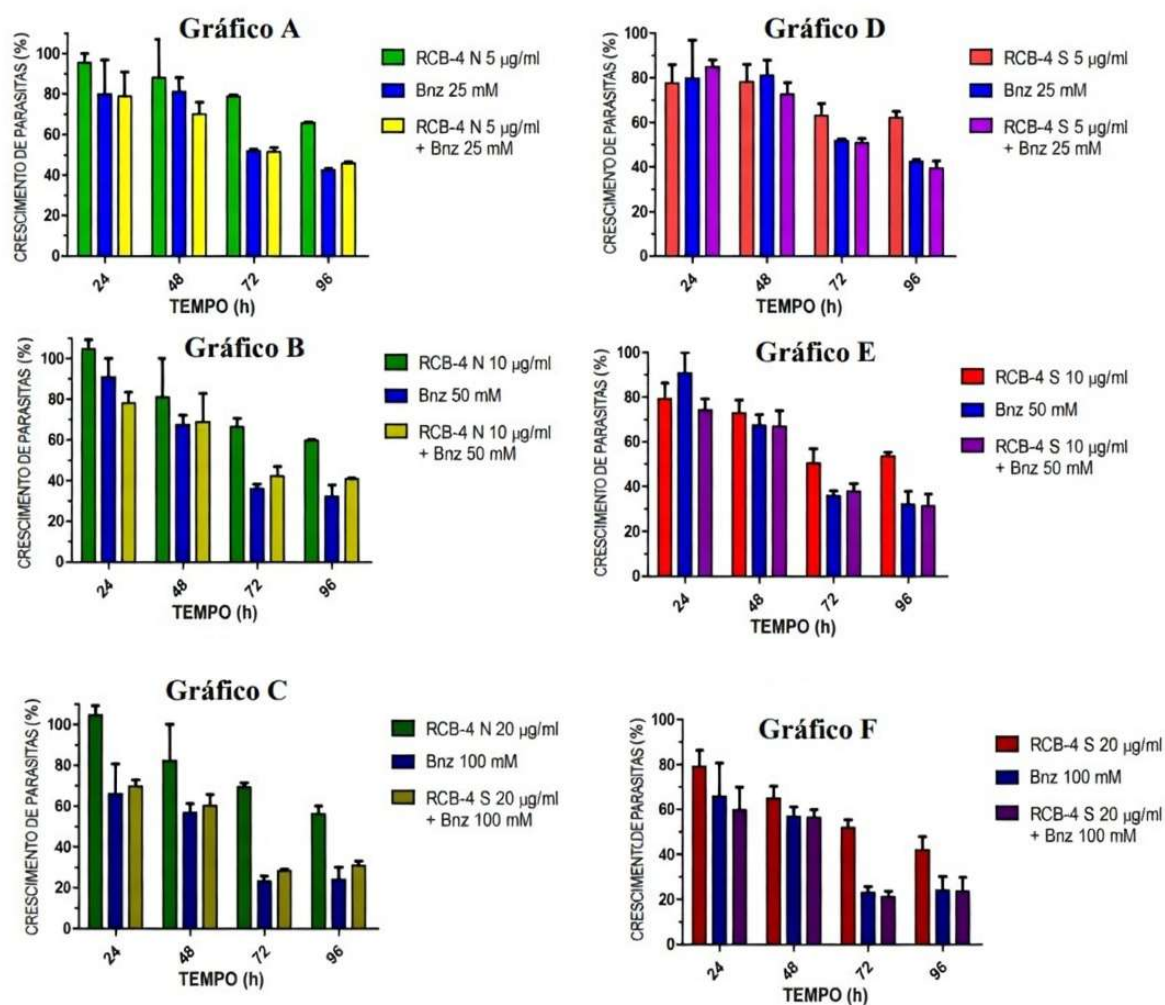


Figura 14: Teste de toxicidade sobre as formas epimastigota do parasito *T. cruzi*, utilizando o peptídeo RCB-4 sintético (S) e natural (N) e o fármaco BENZNIDAZOL (BNZ).

5. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar o efeito sinérgico do fármaco benznidazol em associação com o peptídeo cíclico RCB-4 (nas formas natural e sintética), isolado das sementes de *Ricinus communis* L., sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Dm28c) *in vitro*. Conforme proposto na pergunta de pesquisa, os resultados obtidos confirmam que o peptídeo RCB-4 exerce, um potencial, efeito sinérgico com o benznidazol.

Especificamente, as associações BZN (25 µg/mL) + RCB-4 (5 µg/mL) e BZN (50 µg/mL) + RCB-4 (10 µg/mL) promoveram maior inibição do crescimento parasitário quando comparadas ao uso isolado de cada composto, com destaque para os tempos iniciais de incubação (24 e 48 horas). Esses achados demonstram que a combinação permite alcançar maior eficácia antiparasitária com doses menores de cada agente, atendendo diretamente à limitação central do benznidazol — sua elevada toxicidade e reduzida eficácia em doses terapêuticas convencionais.

O trabalho de Galossi-de-Souza, F. *et al.* (2024) mostra o isolamento e a caracterização do peptídeo cíclico RCB-4, principal componente da fração de baixa massa molecular extraída das sementes de *Ricinus communis* e confirma sua atividade antiparasitária frente ao *T. cruzi*. O mesmo trabalho, também demonstra a dose segura de uso do peptídeo RCB-4 sobre as células hospedeiras LLC-MK2, que é de 15 µg/mL. Os resultados do presente estudo corroboram e ampliam esses achados. Como ilustrado na Figura 14, tanto o RCB-4 (natural e sintético) quanto o benznidazol promoveram redução dose- e tempo-dependente do crescimento das formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Resultados semelhantes têm sido relatados em estudos que avaliam terapias combinadas para a Doença de Chagas, nos quais a associação de moléculas com diferentes mecanismos de ação contribui para o aumento da eficácia terapêutica e para a redução da toxicidade. Martins *et al.* (2015) demonstraram que a combinação benznidazol/itraconazol foi quatro vezes mais efetiva que cada droga isolada, com redução significativa do número de dias de tratamento. De forma semelhante, Mazzeti *et al.* (2021) evidenciaram que a terapia combinada usando compostos nitro melhora a eficácia do tratamento experimental da doença de Chagas.

González *et al.* (2023) reportaram que tratamentos combinados de curta duração podem ser eficazes contra a doença de Chagas crônica experimental. Estudos com peptídeos antimicrobianos também demonstraram potencial sinérgico: Fieck *et al.* (2010) evidenciaram citotoxicidade sinérgica de múltiplos peptídeos antimicrobianos anfipáticos contra *T. cruzi*, enquanto Adade *et al.* (2013) e Souza *et al.* (2016) demonstraram que peptídeos como melitina e temporizina apresentam forte atividade tripanocida com baixa toxicidade para células hospedeiras. Ribeiro *et al.* (2023) destacaram o potencial terapêutico de peptídeos cíclicos como agentes

antiparasitários, reforçando a relevância de moléculas com estrutura cíclica, como o RCB-4, no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Esses achados corroboram os resultados do presente estudo e reforçam a importância da investigação de terapias combinadas envolvendo peptídeos bioativos e fármacos convencionais como estratégia promissora para otimizar o tratamento da doença de Chagas.

Assim, os resultados do presente estudo demonstram que o peptídeo cíclico RCB-4, isolado das sementes de *Ricinus communis* L., atua em sinergismo com o benznidazol, mostrando potencial atividade tripanocida contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Dm28c) *in vitro*. Essa combinação permitiu maior inibição parasitária com doses menores de cada composto, ao mesmo tempo em que manteve baixa citotoxicidade sobre as células hospedeiras LLC-MK2.

Tais achados representam uma contribuição para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra a doença de Chagas, ao evidenciar o potencial de um peptídeo cíclico vegetal como adjuvante ao benznidazol — principal fármaco disponível atualmente. O presente trabalho abre perspectivas para estudos futuros, incluindo a elucidação dos mecanismos de ação da associação, avaliações em modelos *in vivo* e ensaios de toxicidade crônica, com o objetivo de avançar rumo a uma terapia mais eficaz e segura para a tripanossomíase americana.

6. CONCLUSÕES

Os dados apresentados fornecem evidências de que a combinação do peptídeo RCB-4 com o Benznidazol constitui uma possível estratégia terapêutica inovadora e promissora. O sinergismo observado reforça o potencial de peptídeos bioativos como adjuvantes no tratamento da Doença de Chagas, abrindo novos caminhos para o desenvolvimento de regimes terapêuticos mais eficazes, seguros e que possam, em última análise, melhorar a qualidade de vida dos pacientes afetados por esta doença negligenciada.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos no presente estudo abrem diversas perspectivas promissoras para o avanço do peptídeo cíclico RCB-4 como adjuvante terapêutico na doença de Chagas. A demonstração de sinergismo com o benznidazol em doses reduzidas, associada à baixa citotoxicidade sobre células hospedeiras LLC-MK2, indica que essa combinação pode constituir uma estratégia viável para superar as limitações atuais do tratamento convencional, permitindo maior eficácia antiparasitária com menor toxicidade.

Dentre as próximas etapas recomendadas, destacam-se a elucidação dos mecanismos de ação da associação, a natureza exata do sinergismo com o benznidazol, utilizando técnicas como microscopia de fluorescência, análise de espécies reativas de oxigênio e abordagens transcriptômicas. Além disso, é fundamental avaliar a eficácia da combinação contra as diferentes formas do parasito, especialmente tripomastigotas sanguíneas e amastigotas intracelulares, em modelos de infecção celular. Estudos *in vivo*, incluindo ensaios de eficácia terapêutica, farmacocinética, biodistribuição e toxicidade aguda e subcrônica em modelos murinos de infecção aguda e crônica por *T. cruzi*, serão essenciais para validar o potencial clínico da associação. Paralelamente, o desenvolvimento de formulações avançadas, como nanopartículas ou sistemas de liberação controlada, poderá melhorar a estabilidade, biodisponibilidade e seletividade do peptídeo, ao mesmo tempo em que se avança no escalonamento da síntese do RCB-4. Por fim, a ampliação do espectro de ação do peptídeo, investigando sua atividade contra cepas resistentes ao benznidazol e contra outros protozoários de importância médica, como *Toxoplasma gondii*, poderá consolidar seu valor biotecnológico.

A continuidade dessas investigações poderá posicionar o RCB-4 como uma molécula candidata ao desenvolvimento de novos protocolos terapêuticos mais eficazes e seguros, representando uma contribuição significativa para o enfrentamento da doença de Chagas, uma das principais doenças tropicais negligenciadas no mundo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADADE, C. M.; OLIVEIRA, I. R. S.; PAIS, J. A. R.; SOUTO-PADRÓN, T. Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. *Toxicon*, v. 69, p. 227-239, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.03.011>

ALTEI, W. F. Estudo químico de *Jatropha curcas* e de *J. gossypifolia* nativas e cultivadas: Avaliação de ciclopeptídeos em função de habitat e hábito: prospecção e atividade biológica. 2019. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Araraquara, SP, 2019.

ARAUJO-LIMA, C. F.; PERES, R. B.; SILVA, P. B.; MARTINS, T. M.; LOPES, S. C. P.; GUEDES, H. L. M.; COUTINHO, M. C. S.; CASTRO, H. C.; RODRIGUES, C. R.; NETO, V. F.; ECHEVARRIA, A. Repurposing Strategy of Atorvastatin against *Trypanosoma cruzi*: *In Vitro* Monotherapy and Combined Therapy with Benznidazole Exhibit Synergistic Trypanocidal Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 62, n. 9, p. e00979-18, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00979-18>

AUSTIN, J. R.; BRENER, Z.; FILARDI, L. S. Drug resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, n. 2, p. 229-233, 1999.

BOCCHI, E. A.; BACAL, F.; AULER JÚNIOR, J. O.; CARMONE, M. J.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Inhaled nitric oxide leading to pulmonary edema in stable severe heart failure. *American Journal of Cardiology*, v. 74, n. 1, p. 70-72, 1994.

BOVERIS, A.; CADENAS, E.; STOPPANI, A. O. M. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochemical Journal*, v. 156, n. 3, p. 435- 444, 1976.

BRENER, Z.; ALMEIDA, M. G.; CUNHA, M. P. *Trypanosoma cruzi*: life cycle and transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 87, n. 1, p. 1-10, 1992.

CDC. Parasites - Chagas Disease. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/index.html>. Acesso em: 8 fev. 2026.

CHRISTMAS, P.; TURRENS, J. F. *Trypanosoma cruzi* NADH-fumarate reductase: a potential target for new chemotherapeutic agents. Trends in Parasitology, v. 16, n. 1, p. 1-2, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(99\)01592-2](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(99)01592-2)

CORREIA, R. S.; *et al.* Características comuns de AMP de plantas. In: Peptídeos antimicrobianos de plantas: uma revisão. [S.l.: s.n.], 2019. (Informação completa da referência não disponível, necessita ser complementada pela autora).

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: a historical overview. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 105, n. 3, p. 345-350, 2010.

CRAIK, D. J.; *et al.* Protocolo de extração de peptídeos. Journal of Natural Products, v. 75, n. 5, p. 863-870, 2012. (Informação completa da referência não disponível, necessita ser complementada pela autora).

DE MELO, G. D.; FERNANDES, W. B.; MOREIRA, D. R. M.; SIQUEIRA-NETO, J. L.; FREITAS-JUNIOR, L. H.; SOARES, M. B. P.; VILLELA, F. S. *In vivo* synergy between *Trypanosoma cruzi* proline racemase inhibitor and benznidazole. Biochemical Pharmacology, v. 201, p. 115092, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115092>

DINIZ, L. F. Avaliação do efeito do tratamento com benznidazol em combinação com derivados azólicos na infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, 2013.

DONELSON, J. E.; GARDNER, M. J.; EL-SAYED, N. M. More surprises from Kinetoplastida. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 96, n. 6, p. 2579-2581, 1999.

FIECK, A.; HURWITZ, I.; KANG, A. S.; DURVASULA, R. *Trypanosoma cruzi*: Synergistic cytotoxicity of multiple amphipathic anti-microbial peptides to *T. cruzi* and potential bacterial hosts. *Experimental Parasitology*, v. 125, n. 4, p. 342-347, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.02.016>

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 81, n. 5, p. 755-759, 1987.

FILHO, J. G. O. OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS A PARTIR DE SUBPRODUTO DO ALGODÃO PARA APLICAÇÃO EM FILMES ATIVOS E BIODEGRADÁVEIS. 2018. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – IF Goiano, Campus Rio Verde, GO, 2018.

FIVELMAN, Q. L.; ADAGU, I. S.; WARHURST, C. W. Modified Fixed-Ratio Isobologram Method for Studying *in vitro* Interactions between Atovaquone and Proguanil or Dihydroartemisinin against Drug-Resistant Strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 11, p. 4097-4102, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.48.11.4097-4102.2004>

FREIRE, E. S.; LIMA, M. M.; SILVA, L. H. P.; SANTOS, A. O. New Drugs and Promising Drug Combinations in the Treatment of Chagas Disease in Brazil: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Archives of Medical Research*, v. 56, n. 1, p. 103084, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2024.103084>

GALOSSY-DE-SOUZA, Francianne et al. RCB-4, a novel cyclic peptide, from *Ricinus communis* with anti-*Trypanosoma cruzi* activities. **Journal of Molecular Structure**, v. 1302, p. 137405, 2024.

GALOSSY-DE-SOUZA, F. IDENTIFICAÇÃO DE UM PEPTÍDEO CÍCLICO, ISOLADO DAS SEMENTES DE MAMONA (*RICINUS COMMUNIS*) COM ATIVIDADE PARASITÁRIA (*TRYPANOSOMA CRUZI* e *TOXOPLASMA GONDII*). 2022. Tese

(Doutorado em Biociências e Biotecnologia) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

GONZÁLEZ, S.; SALADO, I. G.; NOHARA, L. L.; BATISTA, M. M.; MCCAMMICK, E. M.; MORAES, C. B.; SIQUEIRA-NETO, J. L.; FREITAS-JUNIOR, L. H.; MCKENZIE, C.; SMITH, V.; RILEY, J.; FERREIRA, R. S.; SOEIRO, M. N. C.; FIANDOR, J. M.; MARTIN, J. J.; GILBERT, I. H. Short-course combination treatment for experimental chronic Chagas disease. *Science Translational Medicine*, v. 15, n. 726, p. eadg8105, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.adg8105>

GOIJMAN, S. G.; *et al.* Damage of *Trypanosoma cruzi* deoxyribonucleic acid by nitroheterocyclic drugs. *Biochemical Pharmacology*, v. 34, n. 14, p. 2487-2491, 1985.

JOCKERS-SCHERUBL, M. C.; SCHIRMER, R. H.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*: catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds. *European Journal of Biochemistry*, v. 180, n. 2, p. 267-272, 1989.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; KELLEY, R. O. *Histologia Básica*. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

KOROLKOVAS, A. *Dicionário Terapêutico Guanabara 1997/1998*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 509 p.

LACAVA, Z. G.; LUNA, H. The anticlastogenic effect of tocopherol in peritoneal macrophages of benznidazole-treated and ovariectomized mice. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, v. 305, n. 2, p. 145-150, 1994.

LAZARDI, K.; URBINA, J. A.; DE SOUZA, W. Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 34, n. 11, p. 2097-2105, 1990.

LEY, V.; ANDREWS, N. W.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *Journal of Experimental Medicine*, v. 168, n. 2, p. 649-659, 1988.

LOCATELI, J. C.; PEREIRA, M. C.; FERREIRA, R. S.; CUNHA, R. L. O. R.; SILVA, M. S.; TEIXEIRA, S. M. R.; MENEZES, M. C. Oxidative stress in *Trypanosoma cruzi*: a target for chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 5, p. 551- 558, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000500015>

L. BOIANI *et al.* *In vivo* studies of 5-arylethenylbenzofuroxans in acute murine models of Chagas' disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 43, n. 10, p. 2087-2093, 2008.

MARIN-NETO, J. A.; RASSI JR, J.; AVEZUM, A. JR.; MATTOS, A. C.; RASSI, A. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 1, p. 319-324, 2009.

MARTINS, T. A. F.; DINIZ, L. F.; MAZZETI, A. L.; NASCIMENTO, A. F. S.; CALDAS, S.; CALDAS, I. S.; ANDRADE, I. M.; RIBEIRO, I.; BAHIA, M. T. Benznidazole/Itraconazole Combination Treatment Enhances Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity in Experimental Chagas Disease. *PLoS ONE*, v. 10, n. 6, p. e0128707, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128707>

MAZZETI, A. L.; DINIZ, L. F.; GONÇALVES, K. R.; NASCIMENTO, A. F. S.; SPOSITO, P. A. F.; MOSQUEIRA, V. C. F.; BAHIA, M. T. Combination therapy using nitro compounds improves the efficacy of experimental Chagas disease treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 65, n. 6, p. e02264-18, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.02264-18>

NEVES, N. C. CICLOTÍDEOS: ORIGEM, ESTRUTURA E FUNÇÕES SECUNDÁRIAS, UMA REVISÃO NARRATIVA. 2018. Trabalho de Conclusão de

Curso (Graduação em Biomedicina) – Faculdade de Ciências de Educação e da Saúde, Centro Universitário de Brasília, Brasília, DF, 2018.

NOGUEIRA, F. B. ESTUDO DOS GENES QUE CODIFICAM AS PROTEÍNAS ANTIOXIDANTES EM POPULAÇÕES DO *Trypanosoma cruzi* SENSÍVEIS E RESISTENTES AO BENZNIDAZOL. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, MG, 2009.

OLIVEIRA, G. A. V. PURIFICAÇÃO DE RICINA, CARACTERIZAÇÃO AMPEROMÉTRICA DE ATIVIDADE, E NOVOS CANDIDATOS A INIBIDORES. 2020. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Chagas disease. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease>. Acesso em: 8 fev. 2026.

PINTO, M. E. F. PEPTÍDEOS CÍCLICOS EM ESPÉCIE DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO E UMA CULTIVADA: CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA. 2013. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Araraquara, SP, 2013.

PLANER, J. D.; HULVERSON, M. A.; ARIF, J. A.; RANADE, R. M.; DON, R.; BUCKNER, F. S. Synergy Testing of FDA-Approved Drugs Identifies Potent Drug Combinations against *Trypanosoma cruzi*. PLOS Neglected Tropical Diseases, v. 8, n. 7, p. e2977, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002977>

RIBEIRO, R.; COSTA, L.; PINTO, E.; SOUSA, E.; FERNANDES, C. Therapeutic Potential of Marine-Derived Cyclic Peptides as Antiparasitic Agents. Marine Drugs, v. 21, n. 12, p. 609, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/md21120609>

RIBEIRO, R.; PINTO, E.; FERNANDES, C.; SOUSA, E. Marine Cyclic Peptides: Antimicrobial Activity and Synthetic Strategies. *Marine Drugs*, v. 20, n. 6, p. 397, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/md20060397>

ROJAS-PIRELA, M.; KEMMERLING, U.; QUIÑONES, W.; MICHELS, P. A. M.; CÁCERES, A. J. Antimicrobial Peptides (AMPs): Potential Therapeutic Strategy against *Trypanosomiasis*? *Biomolecules*, v. 13, n. 4, p. 599, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom13040599>

SMITH, P. K.; *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

SOUZA, A. G.; VALERIO-WANDERLEY, D. M.; DURALLI, G. M.; ANDRADE, J. C. P. Consolidation of the control of Chagas' disease vectors in the state of São Paulo. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 79, n. 1, p. 125-131, 1984.

SOUZA, A. L. A.; FARIA, R. X.; CALABRESE, K. S.; HARDOIM, D. J.; TANIWAKI, N. N.; ALVES, L. A.; DE SIMONE, S. G. Temporizin and Temporizin-1 Peptides as Novel Candidates for Eliminating *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE*, v. 11, n. 7, p. e0157673, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157673>

STOPPANI, A. O. M. Quimioterapia de la enfermedad de Chagas. *Medicina*, v. 59, n. 2, p. 147-165, 1999.

TEIXEIRA, A. R. L.; CORDOBA, J. C.; SOUTO MAIOR, I. C.; *et al.* Chagas's disease: lymphoma growth in rabbits treated with benznidazole. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 43, n. 2, p. 146-158, 1990.

TURRENS, J. F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 25, n. 1-2, p. 211-220, 2004.

TURRENS, J. F.; WATTS JR., B. P.; ZHONG, L.; DOCAMPO, R. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *T-brucei* NADH fumarate reductase by benzindazole and anthelmintic imidazole derivatives. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 82, n. 1, p. 125-129, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(96\)02704-2](https://doi.org/10.1016/0166-6851(96)02704-2)

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitology*, v. 19, n. 11, p. 495-501, 2003.

URBINA, J. A.; LAZARDI, K.; AGUIRRE, T.; PIRAS, M. M.; PIRAS, R. Antiproliferative synergism of the allylamine SF-86327 and ketoconazole on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 32, n. 8, p. 1237-1242, 1988.