



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

BRENNA PINHEIRO SILVA

EFEITO TRIPANOCIDA DA
(E)-1-(4-AMINOFENIL)-3-(4-NITROFENIL)PROP-2-EN-1-ONA
E AÇÃO SOBRE ENZIMAS DE TRIPANOSSOMATÍDEOS

FORTALEZA

2023

BRENNA PINHEIRO SILVA

EFEITO TRIPANOCIDA DA
(*E*)-1-(4-AMINOFENIL)-3-(4-NITROFENIL)PROP-2-EN-1-ONA
E AÇÃO SOBRE ENZIMAS DE TRIPANOSSOMATÍDEOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Linha de pesquisa: Biologia para a saúde.

Orientador: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S578e Silva, Brenna Pinheiro.
Efeito tripanocida da (E)-1-(4-aminofenil)-3-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-ona e ação sobre enzimas de tripanossomatídeos / Brenna Pinheiro Silva. – 2023.
54 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins .

1. Doença de Chagas. 2. Trypanosoma cruzi. 3. Chalconas. I. Título.

CDD 615

BRENNA PINHEIRO SILVA

EFEITO TRIPANOCIDA DA
(*E*)-1-(4-AMINOFENIL)-3-(4-NITROFENIL)PROP-2-EN-1-ONA
E AÇÃO SOBRE ENZIMAS DE TRIPANOSSOMATÍDEOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Márcia Machado Marinho
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Hélcio da Silva Santos
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

“A felicidade pode ser encontrada, mesmo nos momentos mais sombrios, se alguém apenas se lembrar de acender a luz.”

A. Dumbledore.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e ao apoio financeiro concedido pela CAPES.

À professora Alice Maria Costa Martins, por ter me inserido nesse universo que é a pesquisa, e me orientado ao longo desses anos de iniciação científica e mestrado.

Aos colegas (que passaram e que ainda se fazem presentes) de laboratório (LBFC), pelos saudosos momentos de aprendizado, companheirismo e descontração.

Ao professor Hécio da Silva Santos, pela substância de estudo, e aos professores Emmanuel Silva Marinho e Márcia Machado Marinho, pelas simulações de docking molecular.

À Deus, por me ajudar em mais uma etapa, guiando meus passos tanto nos momentos de calma quanto nos momentos de tempestade.

À minha família (pai, mãe, irmã – meu porto seguro), pelos ensinamentos que moldaram meu caráter e acima de tudo, por todo amor e cuidado ao longo desses anos.

Às minhas meninas Amanda, Ivna e Thiaga, pela amizade que construímos desde a graduação e que eu tenho certeza que é pra vida inteira. Obrigada por estarem sempre presentes – seja dividindo a casa e as responsabilidades da vida adulta, seja vibrando e torcendo pelo sucesso do outro, seja compartilhando as dificuldades e os medos ou rindo das coisas mais bestas em um simples café da tarde.

À minha querida Stephanie, pela parceria e, sobretudo, pela linda amizade que construímos em meio a tantos experimentos e contagens.

À minha querida Márcia, pela relação de carinho e respeito que construímos. Obrigada por toda ajuda e suporte ao longo deste trabalho, mas sobretudo pelos puxões de orelha, pelas palavras acolhedoras nos momentos de dificuldade e pela torcida diante de novos projetos.

E por fim, aos meus queridos Pedro, Will, Igor, Leones, Guilherme, Erlânia, Manoela, Marília, Helayne, Yasmim, Bárbara e Natália, por me mostrarem que eu nunca estive sozinha.

RESUMO

A doença de Chagas é inserida no grupo de doenças tropicais negligenciadas, como uma infecção parasitária causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, acometendo cerca de 6 a 8 milhões de pessoas na América Latina e 2,4 milhões de pessoas no Brasil. O benznidazol (BZN), fármaco de primeira escolha, apresenta eficácia limitada e graves efeitos adversos, tornando urgente a busca por novas ferramentas terapêuticas. O estudo e a identificação de alvos bioquímicos vitais ao *T. cruzi*, constitui uma importante estratégia para o desenvolvimento de inibidores seletivos capazes de interferir nessas vias metabólicas e causar a morte do parasito. Nesse contexto, as chalconas são uma importante classe de compostos naturais que apresentam um amplo espectro de atividades biológicas e cuja estrutura simplificada permite a síntese de análogos, os quais vêm mostrando propriedades vantajosas para o desenvolvimento de fármacos antichagásicos. Logo, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito tripanocida da (*E*)-1-(4-aminofenil)-3-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-ona (CPA4NO₂) e sua ação sobre enzimas de tripanossomatídeos – cruzaina e tripanotiona redutase. Dessa forma, a citotoxicidade foi avaliada sobre as células hospedeiras LLC-MK2, através do método de redução do MTT, e o efeito tripanocida foi avaliado sobre as formas epimastigotas (cultivadas em meio LIT, a 28°C, em estufa BOD) e tripomastigotas (obtidas através da infecção de células LLC-MK2 e cultivadas em meio DMEM, a 37°C e 5% de CO₂) de cepa Y de *T. cruzi*, sendo então determinado o Índice de Seletividade (IS). Além disso, foi realizada a análise computacional das interações envolvendo as substâncias em estudo e as enzimas cruzaina e tripanotiona redutase, por meio dos ensaios de docking molecular. Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados médios de três experimentos independentes foram utilizados para análise estatística (teste one-way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni) com $p < 0,05$. CPA4NO₂ não apresentou citotoxicidade nas concentrações utilizadas (1000 – 15,6 μM), e na investigação do efeito antiparasitário, conseguiu inibir o crescimento das formas epimastigotas nos três tempos testados (IC₅₀ 24h: 171,4 \pm 13,6 μM ; IC₅₀ 48h: 99,44 \pm 4,46 μM ; IC₅₀ 72h: 27,91 \pm 1,48 μM) e reduzir a viabilidade das formas tripomastigotas em quase todas as concentrações testadas, exibindo um valor de LC₅₀ (161,4 \pm 33,9 μM) três vezes menor que o apresentado pelo fármaco de referência. Sendo assim, quando comparada ao BZN, mostrou um IS > 6,19. Através do uso de ferramentas computacionais, foi possível inferir que a chalcona sintética CPA4NO₂ mostrou uma boa interação com as enzimas cruzaina e tripanotiona redutase porém, em sítios possivelmente

alostéricos. Por fim, este trabalho ressalta o potencial biotecnológico da chalcona CPA4NO₂, tornando-a um candidato promissor para o desenvolvimento de novas terapias antichagásicas.

Palavras-chave: Doença de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; Chalconas.

ABSTRACT

Chagas disease is included in the group of neglected tropical diseases, as a parasitic infection caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, affecting approximately 6 to 8 million people in Latin America and 2.4 million people in Brazil. Benznidazole (BZN), the drug of choice, has limited efficacy and serious adverse effects, making the search for new therapeutic tools urgent. The study and identification of vital biochemical targets for *T. cruzi* is an important strategy for the development of selective inhibitors capable of interfering with these metabolic pathways and causing the death of the parasite. In this context, chalcones are an important class of natural compounds that have a wide spectrum of biological activities and whose simplified structure allows the synthesis of analogues, which have shown advantageous properties for the development of antichagasic drugs. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the trypanocidal effect of (*E*)-1-(4-aminophenyl)-3-(4-nitrophenyl)prop-2-en-1-one (CPA4NO₂) and its action on enzymes of trypanosomatids – cruzain and trypanothione reductase. Thus, the cytotoxicity was evaluated on the LLC-MK2 host cells, through the MTT reduction method, and the trypanocidal effect was evaluated on the epimastigotes forms (cultured in LIT medium, at 28°C, in a BOD oven) and trypomastigotes (obtained through the infection of cells LLC-MK2 and cultivated in DMEM medium, at 37°C and 5% of CO₂) of strain Y of *T. cruzi*, being then determined the Index of Selectivity (SI). In addition, computational analysis of the interactions involving the substances under study and the enzymes cruzain and trypanothione reductase was carried out, through molecular docking assays. All tests were performed in triplicate and the mean results of three independent experiments were used for statistical analysis (one-way ANOVA test, with Bonferroni post-test) with $p < 0.05$. CPA4NO₂ did not show cytotoxicity at the concentrations used (1000 – 15.6 μM), and in the investigation of the antiparasitic effect, it was able to inhibit the growth of epimastigotes in the three times tested (IC₅₀ 24h: $171.4 \pm 13.6 \mu\text{M}$; IC₅₀ 48h: $99.44 \pm 4.46 \mu\text{M}$; IC₅₀ 72h: $27.91 \pm 1.48 \mu\text{M}$) and reduce the viability of trypomastigotes in almost all tested concentrations, exhibiting an LC₅₀ value ($161.4 \pm 33.9 \mu\text{M}$) three times lower than that presented by the reference drug. Therefore, when compared to BZN, it showed an IS > 6.19 . Through the use of computational tools, it was possible to infer that the synthetic chalcone CPA4NO₂ showed a good interaction with the enzymes cruzain and trypanothione reductase, however, in possibly allosteric sites. Finally, this work highlights the biotechnological potential of the chalcone CPA4NO₂, making it a promising candidate for the development of new antichagasic therapies.

Keywords: Chagas disease; *Trypanosoma cruzi*; Chalcones.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1	Distribuição da DC no mundo	15
Fig. 2	Manifestações clínicas da DC	17
Fig. 3	Formas celulares do <i>T. cruzi</i>	18
Fig. 4	Ciclo biológico do <i>T. cruzi</i>	19
Fig. 5	Estrutura química dos derivados nitroheterocíclicos NTX e BZN	20
Fig. 6	Estrutura fundamental das chalconas	22
Fig. 7	Estrutura química da CPA4NO ₂	25
Fig. 8	Reação de condensação de Claisen-Schmidt para síntese de chalconas	26
Fig. 9	Representação esquemática do ensaio de citotoxicidade	27
Fig. 10	Representação esquemática do ensaio sobre as formas epimastigotas	28
Fig. 11	Representação esquemática do ensaio sobre as formas tripomastigotas	29
Fig. 12	Citotoxicidade da CPA4NO ₂ em células LLC-MK2	32
Fig. 13	Citotoxicidade do BZN em células LLC-MK2	33
Fig. 14	Efeito da CPA4NO ₂ sobre as formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	34
Fig. 15	Efeito do BZN sobre as formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	35
Fig. 16	Efeito da CPA4NO ₂ sobre as formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	36
Fig. 17	Efeito do BZN sobre as formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	37
Fig. 18	Complexo de interação da enzima cruzaina com os ligantes CPA4NO ₂ , BZN e o inibidor co-cristalizado KB2	41
Fig. 19	Complexo de interação da enzima tripanotiona redutase com os ligantes CPA4NO ₂ , BZN e o inibidor co-cristalizado QUM	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores estimados de CC_{50} , IC_{50} , LC_{50} e IS para CPA4NO ₂ e BZN	38
Tabela 2	Valores de energia de afinidade e RMSD dos complexos formados após simulações de docking frente às enzimas cruzaina e tripanotiona redutase	39
Tabela 3	Interações entre CPA4NO ₂ , BZN e KB2 com a enzima cruzaina	40
Tabela 4	Interações entre CPA4NO ₂ , BZN e QUM com a enzima tripanotiona redutase	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BOD	Biochemical Oxygen Demand
BZN	Benznidazol
CC ₅₀	Concentração Capaz de Reduzir em 50% a Viabilidade Celular
CPA4NO ₂	(<i>E</i>)-1-(4-aminofenil)-3-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-ona
DC	Doença de Chagas
DFT	Teoria de Densidade Funcional
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPM	Erro Padrão da Média
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
IC ₅₀	Concentração Capaz de Inibir em 50% o Crescimento das Formas Epimastigotas
IS	Índice de Seletividade
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico de Pernambuco
LC ₅₀	Concentração Capaz de Matar 50% das Formas Tripomastigotas
LIT	Liver Infusion Tryptose
LGA	Algoritmo Genético Lamarckiano
MEP	Potencial Eletrostático Molecular
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NTR-1	Nitroreductase Tripanossomal Tipo 1
NTX	Nifurtimox
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução Tampão Fosfato
PDB	Protein Data Bank
RMSD	Root Mean Square Deviation
SBF	Soro Bovino Fetal
UECE	Universidade Estadual do Ceará
USP	Universidade de São Paulo
UVA	Universidade Estadual do Vale do Acaraú

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Doença de Chagas	15
1.2	<i>Trypanosoma cruzi</i>	18
1.3	Tratamento farmacológico da doença de Chagas	20
1.4	Novos alvos moleculares empregados no desenvolvimento de fármacos antichagásicos	21
1.5	Chalconas e seu potencial biotecnológico	22
2	JUSTIFICATIVA	23
3	OBJETIVOS	24
3.1	Objetivo geral	24
3.2	Objetivos específicos	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1	Linhagens celulares	25
4.2	Substâncias em estudo	25
4.3	Avaliação da citotoxicidade em células hospedeiras	26
4.4	Avaliação do efeito sobre as formas epimastigotas	27
4.5	Avaliação do efeito sobre as formas tripomastigotas	28
4.6	Docking molecular	29
4.6.1	<i>Obtenção e preparo dos ligantes</i>	30
4.6.2	<i>Obtenção e preparo dos alvos proteicos</i>	30
4.6.3	<i>Simulações de docking molecular</i>	30
4.7	Análise estatística	31
5	RESULTADOS	32
5.1	Citotoxicidade em células LLC-MK2	32
5.2	Efeito sobre as formas epimastigotas	33
5.3	Efeito sobre as formas tripomastigotas	35
5.4	Docking molecular	38
5.4.1	<i>Docking cruzaina</i>	39
5.4.2	<i>Docking tripanotona reductase</i>	41
6	DISCUSSÃO	44
7	CONCLUSÃO	47

REFERÊNCIAS	48
--------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas (DC), também conhecida como tripanossomíase americana, é uma parasitose resultante da infecção pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (FIOCRUZ, 2020).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a DC é considerada uma doença tropical negligenciada, pois afeta sobretudo populações de baixa renda, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade crônicas em países em desenvolvimento (OPAS/OMS, 2021).

Atualmente, existem cerca de 6 a 8 milhões de pessoas infectadas em 21 países da América Latina e, aproximadamente, 70 milhões de pessoas no mundo estão em risco de contrair a doença (DNDi, 2022).

Figura 1. Distribuição da DC no mundo.



Fonte: DNDi, 2022.

Devido a rápida mobilidade populacional e crescente urbanização, a DC mostrou uma mudança em seu padrão epidemiológico, espalhando-se para áreas urbanas e para outros

países e continentes. Conforme ilustrado na figura 1, a emigração generalizada de latino-americanos resultou em uma ameaça emergente para áreas historicamente não-endêmicas, incluindo a Europa Ocidental, Estados Unidos, Canadá, Japão e Austrália (CHATELAIN, 2017).

Desde sua descoberta pelo médico sanitarista Carlos Chagas, em 1909, a DC tem sido um grave problema de saúde pública. No Brasil, estima-se que haja 2,4 milhões de pessoas infectadas (BRASIL, 2022), e apesar da notificação compulsória ainda ser restrita a casos agudos da doença, a região Nordeste é considerada a segunda principal área endêmica no país, possuindo alta prevalência no estado do Ceará, principalmente nos municípios da região do Sertão dos Inhamuns (Crateús e Tauá) e Baixo Jaguaribe (Jaguaruana, Limoeiro do Norte e Russas) (CEARÁ, 2021).

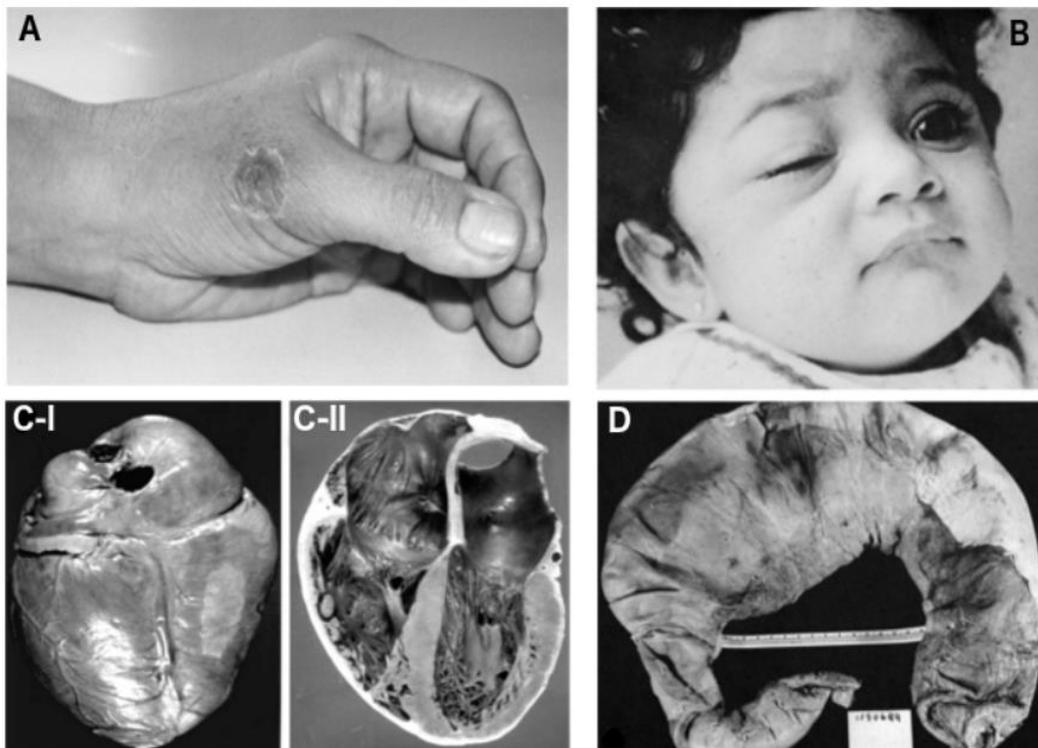
O mecanismo de transmissão do parasito é pela via vetorial, por meio do contato com as fezes do inseto vetor infectado, conhecido popularmente como “barbeiro”. Atualmente, a via oral responde pela quase totalidade dos casos novos ocorridos na última década, através da ingestão de alimentos (caldo de cana e açaí) contaminados com triatomíneos infectados ou suas fezes. Sendo assim, a transmissão pela via oral é a grande responsável pelos surtos de infecção em áreas urbanas, resultando em quadros clínicos agudos e altos índices de mortalidade (BERN *et al.*, 2019; TOSO; VIAL; GALANTI, 2011).

Existem ainda outras formas de transmissão, tais como: transfusão sanguínea, transplante de órgãos ou pela via placentária (CHATELAIN, 2017). Na transfusão sanguínea, o receptor acaba recebendo sangue contaminado com o parasito, no entanto, essa forma de transmissão vem diminuindo em decorrência dos testes realizados pelos hemocentros (GASCON; BERN; PINAZO, 2010). Nos últimos anos, a transmissão por meio de transplante de órgãos vem adquirindo importância devido ao crescente aumento no número de procedimentos, e em decorrência do estado imunossuprimido dos receptores, tal forma de transmissão acaba apresentando manifestações clínicas mais graves (PEREIRA; NAVARRO, 2013). A transmissão vertical ou congênita pode ocorrer em qualquer fase da gestação, ou ainda quando as mucosas do feto entram em contato com o sangue materno infectado durante o parto. Dessa forma, políticas públicas que permitam o amplo acesso ao diagnóstico pré-natal são de grande importância para a detecção precoce da doença e prevenção de complicações para a mãe e para o feto (REQUENA-MÉNDEZ *et al.*, 2015).

Com relação à evolução clínica, a DC possui duas fases distintas: uma fase inicial ou aguda, caracterizada por uma alta parasitemia, e uma fase tardia ou crônica, caracterizada por uma baixa parasitemia (MARCHIORI, 2016). A fase aguda ocorre nas 4-6 semanas após a

infecção, podendo ser assintomática ou vir acompanhada de sintomas inespecíficos, como febre e mal-estar, cefaleia, falta de apetite, mialgias e aumento dos linfonodos (COSTA *et al.*, 2011). No entanto, é característico dessa fase o surgimento do chagoma de inoculação ou do sinal de Romana - sinais clássicos da picada do “barbeiro”, como podem ser vistos na figura 2 (CUNHA-NETO; CHEVILLARD, 2014). Durante a fase crônica da infecção, verifica-se que a grande maioria dos portadores evolui para a forma indeterminada da doença. Tais indivíduos possuem positividade sorológica, contudo, apresentam exames eletrocardiográficos e radiológicos aparentemente normais (CUNHA-FILHO *et al.*, 2012). Aproximadamente 20-30% das pessoas infectadas evoluem para as formas cardíaca e/ou digestiva da DC (AYO *et al.*, 2013). Nesse estágio, a cardiomiopatia é a manifestação clínica mais comum, desenvolvendo-se na maioria dos pacientes que se encontram nessa fase, porém uma minoria pode vir a desenvolver complicações digestivas, como megaesôfago e megacólon (BENCK; KRANSDORF; PATEL, 2018).

Figura 2. Manifestações clínicas da DC.



Legenda: A. Chagoma na superfície dorsal da mão esquerda 21 dias após infecção; B. Criança com sinal clássico de Romana; C. Manifestação cardíaca na fase crônica da doença de Chagas: I. Superfície dilatada do coração chagásico mostrando placas fibrosas e alargamento dos vasos coronários; II. Visão interior de corte cardíaco com dilatação das câmaras direita e esquerda; D. Megacólon de paciente chagásico.

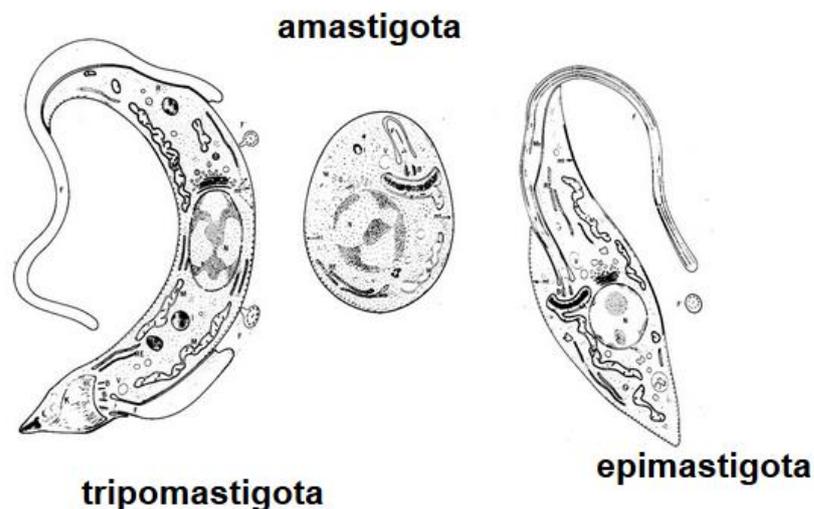
Fonte: www.isradiology.org/tropical_disease

1.2 *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da DC, é considerado um protozoário unicelular e parasito obrigatório, possuindo como estruturas celulares principais – membrana celular, cinetoplasto contendo o DNA mitocondrial, núcleo e flagelo (ACOSTA *et al.*, 2017). É classificado dentro do filo Sarcomastigophora, da classe Zoomastigophora, da ordem Kinetoplastida e da família Trypanosomatidae, desenvolvendo-se em insetos hematófagos da família Reduviidae, em pequenos animais silvestres e nos seres humanos (CHAGAS, 1909).

Durante seu ciclo biológico, o *T. cruzi* apresenta três formas evolutivas principais, como mostra a figura 3. A forma epimastigota, proliferativa e não infectante, encontrada no intestino médio do inseto vetor; e as formas tripomastigota - não proliferativa e infectante, presente na circulação sanguínea, e amastigota - proliferativa intracelular, que se encontram no hospedeiro vertebrado (ADADE *et al.*, 2013).

Figura 3. Formas celulares do *T. cruzi*.

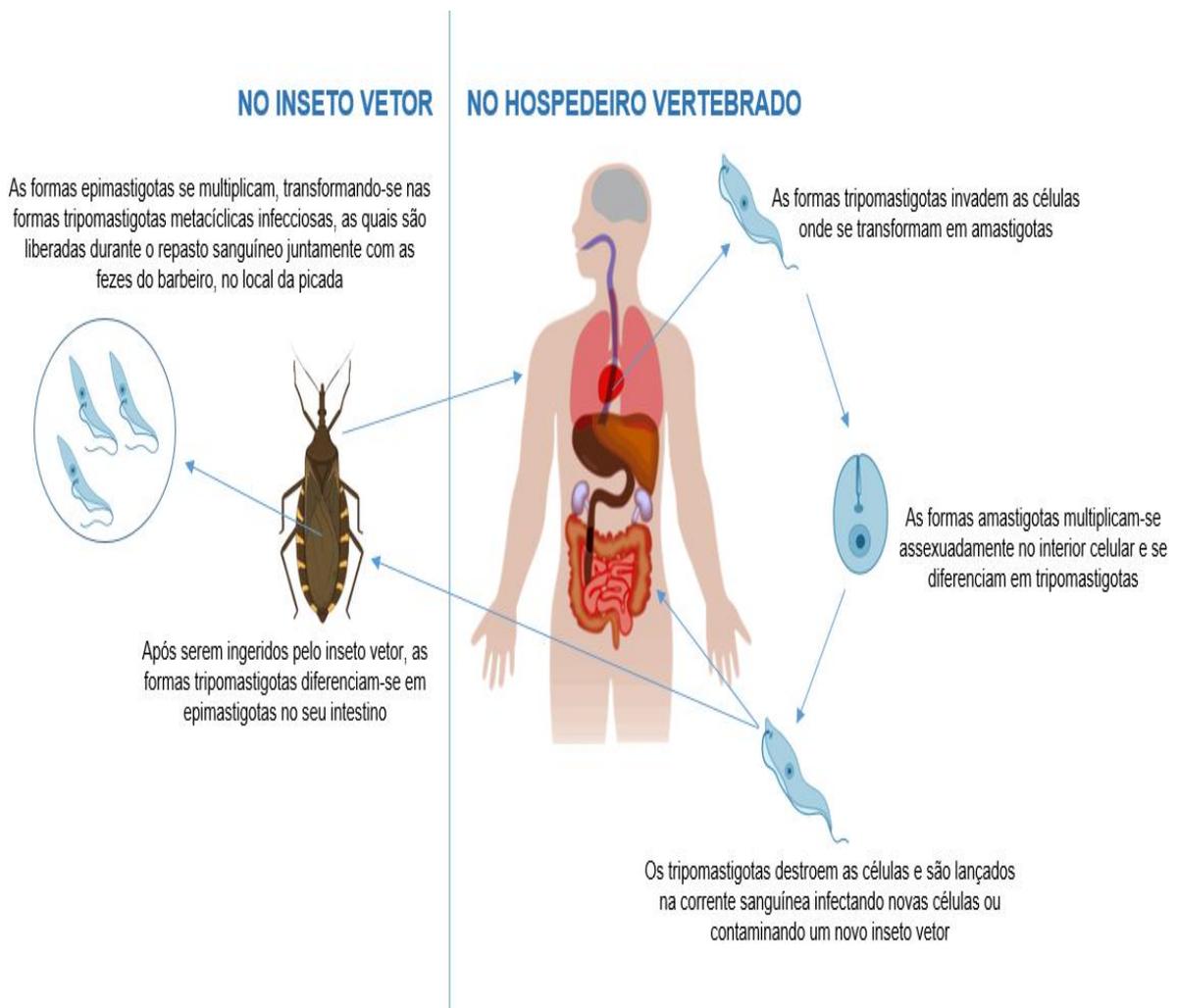


Fonte: www.icb.usp.br

O *T. cruzi* possui um ciclo evolutivo complexo, pois requer passagem obrigatória por um inseto vetor triatomíneo (fase de multiplicação extracelular) e por um hospedeiro vertebrado (fase de multiplicação intracelular) (FRANCISCO *et al.*, 2017). Dessa forma, a infecção chagásica inicia quando o triatomíneo se infecta ao alimentar-se do sangue contaminado de um hospedeiro vertebrado que contém as formas tripomastigotas (MEIRA *et al.*, 2015). De acordo com a figura 4, após serem ingeridos pelo inseto vetor, os tripomastigotas diferenciam-se em epimastigotas no seu intestino médio anterior. Nesse

ambiente, as formas epimastigotas se multiplicam, transformando-se nas formas tripomastigotas metacíclicas infecciosas, as quais são liberadas durante o repasto sanguíneo juntamente com as fezes do barbeiro, no local da picada. No hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos se ligam a receptores de superfície celular levando à formação de um vacúolo parasitóforo onde se transformam nas formas amastigotas. Estas, após sucessivas divisões binárias, diferenciam-se em tripomastigotas, que são lançados na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, podendo infectar novas células ou contaminar um novo inseto vetor durante o repasto sanguíneo (FERREIRA *et al.*, 2022).

Figura 4. Ciclo biológico do *T. cruzi*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

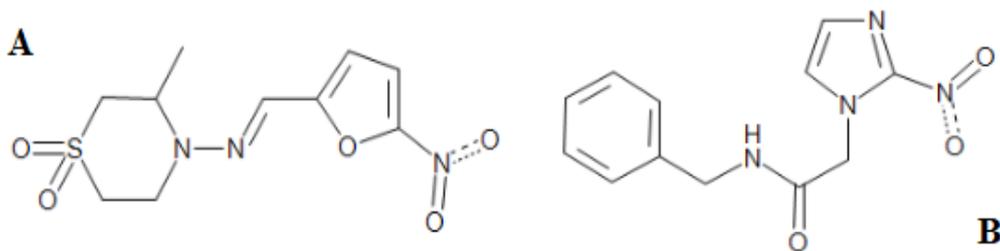
1.3 Tratamento farmacológico da doença de Chagas

Em 1909, era diagnosticada a primeira paciente com DC no Brasil, entretanto mais de um século após seu descobrimento pelo médico sanitário Carlos Chagas, tal enfermidade continua distante das prioridades do mercado farmacêutico (FIOCRUZ, 2020).

O tratamento disponível é limitado a dois fármacos existentes a mais de 50 anos, os derivados nitroheterocíclicos – benznidazol (BZN) e nifurtimox (NTX), desenvolvidos respectivamente pelos laboratórios farmacêuticos Roche e Bayer, conforme mostra a figura 5 (MORILLA; ROMERO, 2015).

No Brasil, foi proibida a comercialização do NTX devido a sua elevada toxicidade. Dessa forma, o único fármaco disponível no país para o tratamento da DC é o BZN, que possui eficácia limitada além de desencadear inúmeros efeitos adversos (JACKSON; WYSSA; CHAPPUIS, 2020).

Figura 5. Estrutura química dos derivados nitroheterocíclicos NTX e BZN.



Legenda: A. Estrutura química do NTX; B. Estrutura química do BZN.
Fonte: FIOCRUZ, 2020.

Mesmo aprovado pelo Ministério da Saúde, o tratamento com BZN possui uma taxa média de cura, entre os casos recentes de infecção, de aproximadamente 80%, porém nas condições em que a doença está cronicada, essa taxa cai para menos de 20% (SESTI-COSTA *et al.*, 2014). Além disso, a necessidade de esquemas posológicos prolongados facilita o surgimento de reações adversas – perda de peso e distúrbios gastrointestinais, reações cutâneas, neuropatia periférica e reações hematológicas, diminuindo a adesão a terapia bem como, a qualidade de vida desses pacientes (HASSLOCHER-MORENO *et al.*, 2012).

Seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado, contudo, estudos indicam que o BZN supostamente atua por meio de radicais livres nitrogenados, os quais agem modificando macromoléculas parasitárias, como por exemplo, o DNA. Além disso, a

produção de metabólitos tóxicos, a partir do processo de biotransformação, afeta a síntese de enzimas importantes para a sobrevivência do *T. cruzi*. No entanto, a existência de cepas naturalmente resistentes vem sendo relatada, representando um desafio para o manejo adequado da DC e para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas que apresentem maior seletividade pelo parasito, diminuindo as complicações causadas no hospedeiro (SALES JÚNIOR, 2017; DNDi, 2022).

1.4 Novos alvos moleculares empregados no desenvolvimento de fármacos antichagásicos

A pesquisa por novas alternativas terapêuticas para o tratamento da DC inclui o estudo de rotas metabólicas que possam ser utilizadas como novos alvos farmacológicos antichagásicos. Tal abordagem compreende duas enzimas consideradas promissoras – cruzaina e tripanotiona redutase – uma vez que exercem papel fundamental na sobrevivência do *T. cruzi* (BATTISTA *et al.*, 2020).

A enzima cruzaina é uma cisteíno-protease cuja expressão ocorre durante todo o ciclo de vida do parasito. Logo, é responsável pela nutrição, desenvolvimento e diferenciação do protozoário bem como, pela sua continuidade através da evasão do sistema imune e invasão de novas células hospedeiras (BARBOSA DA SILVA *et al.*, 2019). No inseto triatomíneo, a cruzaina participa ativamente da transformação das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas, contribuindo diretamente com a virulência das diferentes cepas de *T. cruzi*. Enquanto que, no hospedeiro vertebrado, possui grande importância na fuga à resposta imune do hospedeiro e consequente invasão celular (LOSINNO *et al.*, 2021).

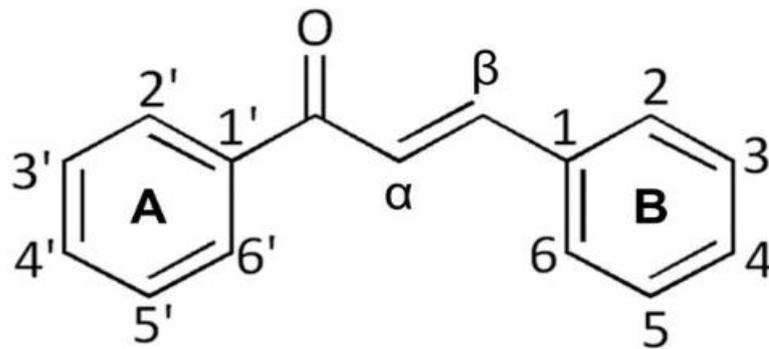
A tripanotiona redutase, por sua vez, é uma flavoenzima que exerce um papel relevante na sobrevivência do parasito, uma vez que atua neutralizando o estresse oxidativo mediado por espécies reativas de oxigênio (ERO) provenientes da resposta imune do hospedeiro (MENDONÇA *et al.*, 2018).

Logo, a identificação de rotas bioquímicas vitais ao *T. cruzi* constitui uma importante estratégia para o desenvolvimento de inibidores seletivos capazes de interferir nessas vias metabólicas e causar a morte do parasito (MIRANDA; SAYÉ, 2019). Nesse cenário, substâncias bioativas de origem vegetal podem servir como protótipos para a obtenção de moléculas antichagásicas promissoras.

1.5 Chalconas e seu potencial biotecnológico

As chalconas são uma importante classe de compostos naturais pertencentes à família dos flavonóides. Dessa forma, compõem um grupo de compostos de cadeia aberta que apresentam um núcleo estrutural fundamental, denominado chalconóide, em que dois anéis aromáticos são conectados por uma cadeia de três carbonos α,β -insaturados contendo uma carbonila, conforme mostra a figura 6 (BANDEIRA *et al.*, 2019).

Figura 6. Estrutura fundamental das chalconas.



Fonte: BANDEIRA *et al.*, 2019.

Tais substâncias vêm despertando o interesse de grupos de pesquisa devido ao seu potencial biotecnológico (KOZLOWSKA *et al.*, 2019), uma vez que apresentam um amplo espectro de atividades biológicas – antioxidante (SULPIZIO *et al.*, 2016), anti-inflamatória (ÖZDEMIR *et al.*, 2015), antitumoral (PONTES *et al.*, 2018), antibacteriana (DA SILVA *et al.*, 2023) e antiparasitária (GONZÁLEZ *et al.*, 2020). Além disso, sua estrutura simplificada permite a adição de diferentes grupos, doadores ou receptores de elétrons, aos anéis aromáticos do núcleo chalconóide, por meio da reação de condensação de Claisen-Schmidt (DE MELO *et al.*, 2018).

Dessa forma, a síntese de análogos de chalconas vem permitindo a obtenção de compostos estruturalmente semelhantes à molécula natural, porém com propriedades vantajosas que no contexto das doenças negligenciadas mostraram atividade contra *Trypanosoma cruzi*, confirmando assim seu potencial como substâncias promissoras no desenvolvimento de fármacos antichagásicos (CAVALCANTE *et al.*, 2022; DE BRITO *et al.*, 2022; MAGALHÃES *et al.*, 2022; MATOS *et al.*, 2022).

2 JUSTIFICATIVA

A DC, infecção parasitária causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é considerada uma doença tropical negligenciada, pois acomete principalmente populações vulneráveis de países subdesenvolvidos, sendo um grave problema de saúde pública (MARTINS-MELO *et al.*, 2019).

Desde sua descoberta, em 1909, a DC causa aproximadamente 14.000 mortes/ano na região das Américas. No entanto, apesar dos esforços no controle da transmissão da doença em diversas áreas endêmicas, a inexistência de um tratamento eficaz, principalmente na sua fase crônica, é ainda um desafio a ser enfrentado (PÉREZ-MOLINA *et al.*, 2009).

No Brasil, o BZN é o único medicamento disponível para o tratamento da DC, porém os graves efeitos colaterais e a longa duração da terapia são barreiras que acabam interferindo na adesão dos pacientes (MORILLO *et al.*, 2015). Sendo assim, torna-se evidente a busca por novos alvos terapêuticos como uma importante estratégia para o desenvolvimento de fármacos antichagásicos mais eficazes e com menos efeitos adversos (CALDAS; SANTOS; NOVAES, 2019).

Nesse contexto, destacam-se as enzimas cruzaina e tripanotiona redutase, as quais possuem papel fundamental na sobrevivência do *T. cruzi*. Desse modo, estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa (CAVALCANTE *et al.*, 2022; DE BRITO *et al.*, 2022; MAGALHÃES *et al.*, 2022; MATOS *et al.*, 2022) vêm demonstrando o potencial biotecnológico das chalconas e de seus análogos sintéticos como possíveis inibidores dessas enzimas.

Para o presente estudo, a adição de um grupo $-NO_2$, na chalcona sintética CPA4NO₂, configura uma importante estratégia, pois confere uma certa similaridade estrutural com o BZN, cujo grupo nitro possui grande contribuição farmacofórica para seu efeito tripanocida mas também, para o surgimento dos efeitos adversos que comprometem a adesão ao tratamento (SALES JÚNIOR *et al.*, 2017). Logo, CPA4NO₂ constitui uma molécula bioativa promissora no planejamento de novas abordagens farmacológicas, mais efetivas e menos tóxicas, para o tratamento da DC (FERREIRA *et al.*, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito tripanocida da CPA4NO₂ e ação sobre enzimas de tripanossomatídeos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade da CPA4NO₂ sobre células LLC-MK2;
- Avaliar o efeito tripanocida da CPA4NO₂ sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*;
- Verificar as possíveis interações da CPA4NO₂ com as enzimas cruzaina e tripanotiona redutase de tripanossomatídeos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

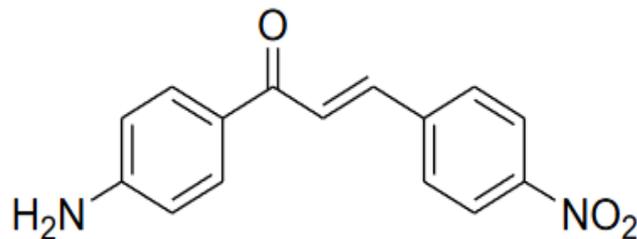
4.1 Linhagens celulares

Neste trabalho foram utilizadas as células LLC-MK2 - linhagem imortalizada de células tubulares renais de macaco (*Macaca mulatta*) - como células hospedeiras, provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), e as formas epimastigotas e tripomastigotas de cepa Y de *T. cruzi*, doadas pelo Laboratório de Bioquímica de Parasitos, da Universidade de São Paulo (USP).

4.2 Substâncias em estudo

A chalcona utilizada no presente estudo, conforme mostra a figura 7, foi sintetizada por meio da reação de Claisen-Schmidt (VOGEL, 1989), a qual inicia com uma condensação aldólica seguida por uma desidratação básica, e cujo mecanismo está descrito na figura 8. Após sua obtenção, CPA4NO₂ foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Síntese Orgânica da Universidade Estadual do Vale do Acaraú (UVA), coordenado pelo professor Dr. Hélcio da Silva Santos, e o BZN, fármaco de referência, foi doado pelo Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE).

Figura 7. Estrutura química da CPA4NO₂.

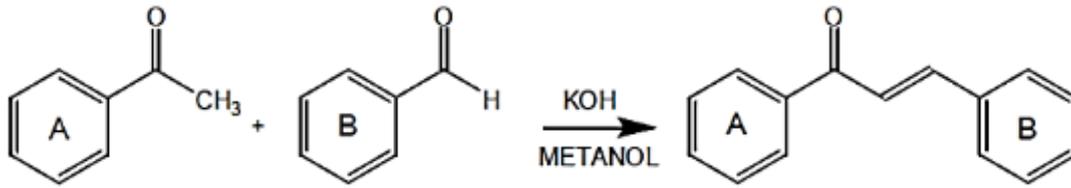


Legenda: Nomenclatura IUPAC: (E)-1-(4-aminofenil)-3-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-ona.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Dessa forma, ambas foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) estéril para obtenção de soluções estoque. Logo, para os ensaios *in vitro*, diluições seriadas foram feitas em solução tampão fosfato (PBS) estéril para obtenção de soluções de trabalho, de modo que a concentração final de DMSO nos grupos experimentais não excedesse 0,5%.

Figura 8. Reação de condensação de Claisen-Schmidt para síntese de chalconas.



Legenda: A reação de Claisen-Schmidt ocorre por meio da condensação entre um benzaldeído e uma acetofenona, usando metanol como solvente e hidróxido de potássio como catalisador.

Fonte: HUO *et al.*, 2021.

4.3 Avaliação da citotoxicidade em células hospedeiras

A citotoxicidade da chalcona em estudo foi investigada em células hospedeiras LLC-MK2 através do ensaio do MTT, método colorimétrico de avaliação da viabilidade celular (MOSMANN, 1983). As células LLC-MK2 foram cultivadas em garrafas estéreis e mantidas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado com 10% de SBF (Soro Bovino Fetal) e antibióticos (penicilina – 200 UI/mL e estreptomicina – 130 mg/mL), em estufa de CO₂ a 37°C, conforme mostra a figura 9.

A verificação do crescimento celular foi realizada através da observação em microscópio invertido, e uma vez atingido o estado de confluência, as células LLC-MK2 foram lavadas com PBS estéril, deslocadas com tripsina e, após determinação da concentração celular por contagem em câmara de Neubauer, em solução de azul de trypan (0,4% m/v), as mesmas foram transferidas para placas estéreis de 96 poços, na concentração de 1x10⁵ células/mL, e incubadas por 24 horas em estufa de CO₂.

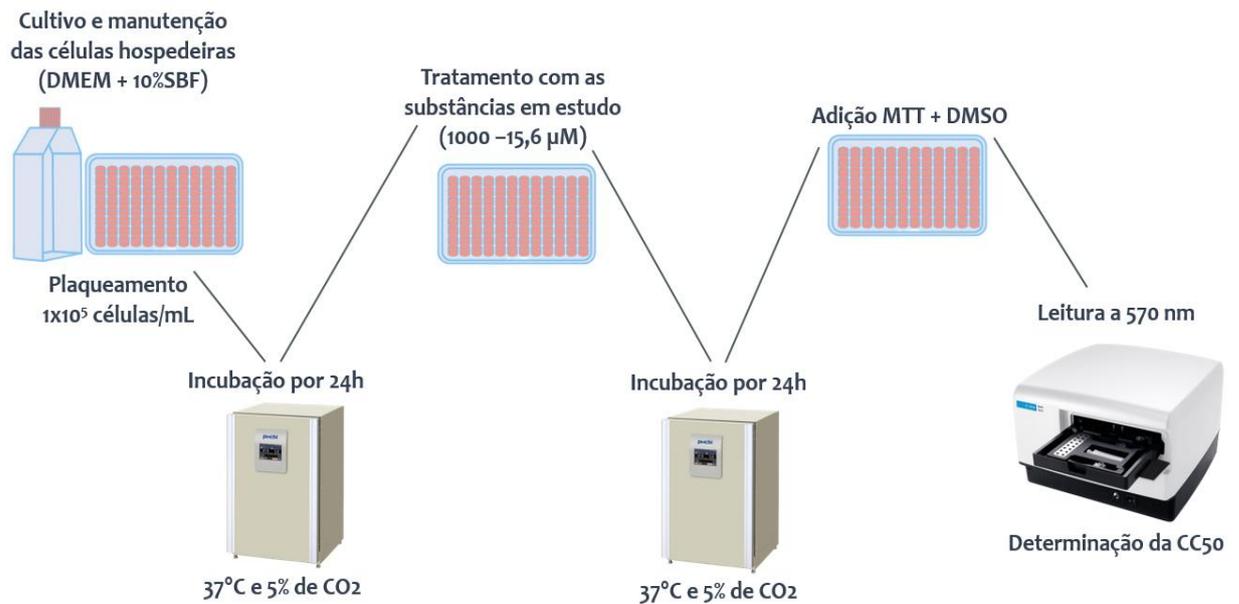
Posteriormente, os poços foram tratados com a CPA4NO₂ e com o BZN, nas concentrações de 1000 – 15,6 µM, e após 24 horas de incubação em estufa de CO₂, cada poço foi lavado com PBS, e em seguida, foi adicionada a solução de MTT (2,5 mg/mL).

O MTT [Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio] é um sal tetrazólio de coloração amarela que, uma vez em contato com células viáveis, é internalizado e reduzido por desidrogenases mitocondriais e citoplasmáticas em cristais de formazan, apresentando coloração roxa.

Dessa forma, após 4 horas de incubação em estufa de CO₂, os cristais de formazan foram solubilizados pela adição de DMSO, um agente surfactante, sendo realizada a leitura por espectrofotometria em leitora de microplacas a 570nm.

Os percentuais de viabilidade celular foram determinados e utilizados para estimar, por regressão não-linear, a CC_{50} – concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular.

Figura 9. Representação esquemática do ensaio de citotoxicidade.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Avaliação do efeito sobre as formas epimastigotas

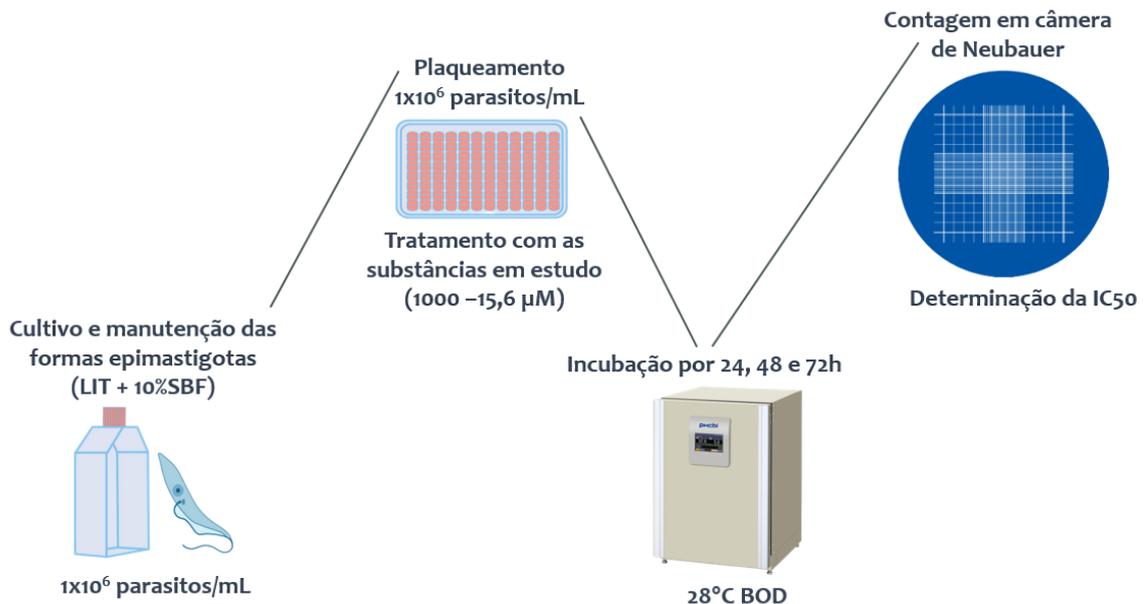
O efeito da chalcona em estudo foi investigado sobre as formas evolutivas proliferativas e não infectantes de cepa Y de *T. cruzi*, presentes no hospedeiro invertebrado (LIMA *et al.*, 2016; MONTEIRO *et al.*, 2020).

As formas epimastigotas foram cultivadas em garrafa de cultivo celular estéril, na concentração de 10^6 parasitos/mL, em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado com 10% de SBF e antibióticos, e mantidas a 28°C em estufa BOD (Biochemical Oxygen Demand), conforme mostra a figura 10.

Para avaliação do efeito, as formas epimastigotas, após atingirem a fase exponencial de crescimento, foram então cultivadas em placa estéril de 96 poços, na concentração de 10^6 parasitos/mL, em meio LIT suplementado com 10% de SBF e antibióticos, e mantidas a 28°C , em estufa BOD, após tratamento com a CPA4NO₂ e com o BZN, nas concentrações de 1000 – 15,6 μM .

Decorridos os tempos de 24, 48 e 72 horas, foi realizada a contagem dos parasitos viáveis em câmara de Neubauer, e os valores da IC₅₀ – concentração capaz de inibir em 50% o crescimento das formas epimastigotas – foram estimados em comparação com o grupo controle não tratado, por regressão não-linear.

Figura 10. Representação esquemática do ensaio sobre as formas epimastigotas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 Avaliação do efeito sobre as formas tripomastigotas

O efeito da chalcona em estudo foi investigado sobre as formas evolutivas não proliferativas e infectantes de cepa Y de *T. cruzi*, presentes no hospedeiro vertebrado, por meio da infecção de células hospedeiras (LIMA *et al.*, 2016; MONTEIRO *et al.*, 2020).

As células LLC-MK2 foram cultivadas em garrafas estéreis, na concentração de 1×10^5 células/mL, em meio DMEM suplementado com 10% de SBF e antibióticos, e incubadas em estufa de CO₂ a 37°C , conforme mostra a figura 11. Após 48 horas, o meio foi trocado por DMEM suplementado com apenas 2% de SBF e as células hospedeiras foram então infectadas com as formas tripomastigotas, na concentração de 2×10^6 parasitos/mL.

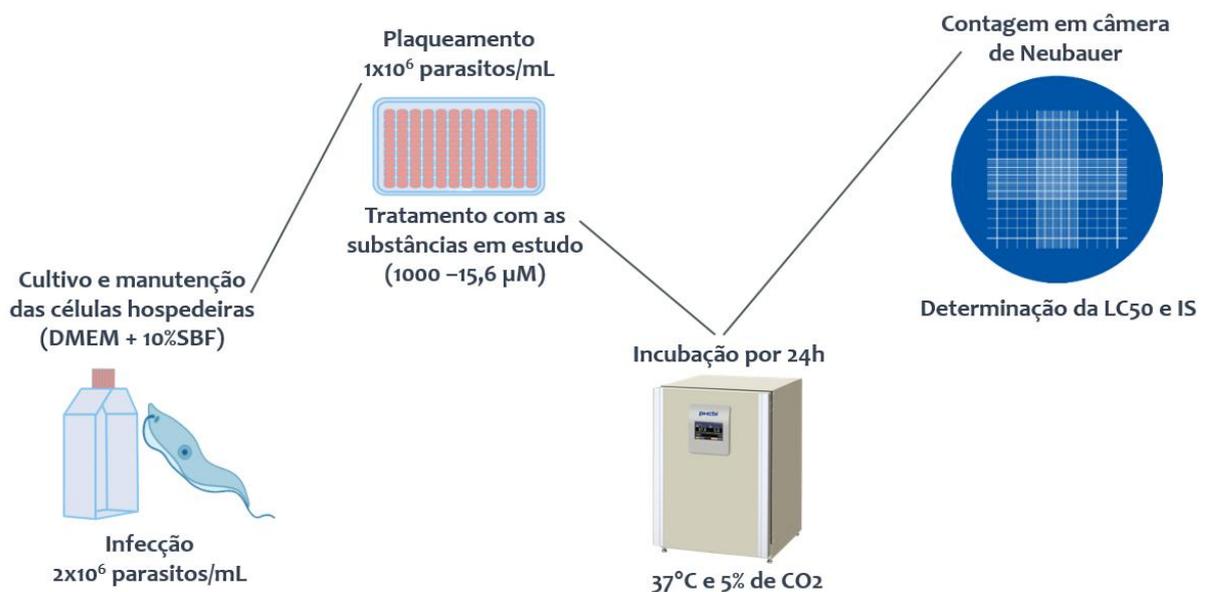
Decorridas 72 horas de incubação em estufa de CO₂, o meio das garrafas infectadas foi substituído, durante cinco dias, e o sobrenadante obtido foi centrifugado (a 2800

rpm, por 7 minutos) para a obtenção das formas tripomastigotas, cuja concentração foi determinada por contagem em câmara de Neubauer.

Dessa forma, para avaliação do efeito, as formas tripomastigotas foram transferidas para placas estéreis de 96 poços, na concentração de 1×10^6 parasitos/mL e tratadas com a CPA4NO₂ e com o BZN, nas concentrações de 1000 – 15,6 μ M.

Após 24 horas em estufa de CO₂, foi realizada a contagem dos parasitos viáveis em câmara de Neubauer, e os valores da LC₅₀ – concentração capaz de matar 50% das formas tripomastigotas – foram estimados em comparação com o grupo controle não tratado, por regressão não-linear. Por fim, também foi possível estimar o índice de seletividade (IS) da CPA4NO₂ e do BZN, através da razão entre a CC₅₀ proveniente das células hospedeiras e a LC₅₀ proveniente das formas tripomastigotas.

Figura 11. Representação esquemática do ensaio sobre as formas tripomastigotas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6 Docking molecular

Os ensaios de docking molecular para avaliação teórica das interações entre a chalcona em estudo e as enzimas cruzaina e tripanotiona redutase de *T. cruzi* foram realizados pelo Grupo de Química Teórica e Eletroquímica da Universidade Estadual do Ceará (UECE), coordenado pelo professor Dr. Emmanuel Silva Marinho.

4.6.1 Obtenção e preparo dos ligantes

Os cálculos químicos quânticos foram realizados utilizando o método da Teoria de Densidade Funcional (DFT). Sendo assim, as moléculas ligantes foram desenhadas através do programa GaussView 5.0, e os cálculos de otimização geométrica foram feitos por meio do programa Gaussian 09. O Potencial Eletrostático Molecular (MEP), para ambas as moléculas, foi calculado e as isosuperfícies foram obtidas utilizando o programa Gabedit (MARINHO *et al.*, 2021).

4.6.2 Obtenção e preparo dos alvos proteicos

Para estudar o possível mecanismo de ação da chalcona em estudo sobre o *T. cruzi*, foram realizadas simulações de docking molecular entre o ligante e as enzimas cruzaina e tripanotiona redutase, fundamentais no ciclo evolutivo do parasito.

As estruturas proteicas foram então obtidas no repositório Protein Data Bank – PDB (<https://www.rcsb.org/>). Dessa forma, a estrutura da enzima cruzaina foi identificada como “Estrutura cristalina da cruzaina de *T. cruzi* em complexo com o inibidor tetrafluorofenoximetil cetona” (PDB 3IUT), e a estrutura da enzima tripanotiona redutase foi identificada como “Estrutura cristalina da tripanotiona redutase de *T. cruzi* em complexo com o inibidor mostarda de quinacrina” (PDB 1GXF). Ambas foram determinadas pelo método de difração de raio-X, com valores de resolução de 1,20 e 2,70 Å, respectivamente (BRAK *et al.*, 2010; SARAVANAMUTHU *et al.*, 2004).

4.6.3 Simulações de docking molecular

Para a realização das simulações de docking molecular, foi escolhido o algoritmo genético lamarckiano (LGA), o qual é utilizado pelo programa AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2010). Dessa forma, para determinar o espaço de simulação, o grid box para cada proteína foi centralizado de forma a englobar todas as cadeias proteicas.

Para a enzima cruzaina, o grid box foi centralizado nas coordenadas 116 Å x 106 Å x 126 Å, com dimensões x, y, z equivalentes a 6,612, -0,436 e 8,052, respectivamente. Para a enzima tripanotiona redutase, o grid box foi centralizado nas coordenadas 126 Å x 90 Å x 126 Å, com dimensões x, y, z equivalentes a 44,196, 3,102 e -0,054, respectivamente. Ambos

os grids foram centralizados de forma que a cadeia proteica ficasse totalmente dentro do espaço de simulação computacional.

Como forma de preparação da estrutura proteica, foi utilizada a metodologia proposta por Yan e colaboradores (2014), onde foram removidas as moléculas de água e cargas de Gasteiger, sendo então adicionados átomos de hidrogênio essenciais, através do programa AutoDock Tools (HUEY; MORRIS; FORLI, 2009).

De acordo com o protocolo padrão, foram realizadas 50 simulações independentes, sendo possível obter 20 poses por simulação (MARINHO *et al.*, 2020). Logo, para melhorar o refinamento dos acoplamentos, o critério de *exhaustiveness* foi modificado de forma a manter rígida a estrutura da proteína, enquanto todas as ligações e torções dos ligantes foram ajustadas para girar em torno dela (NGUYEN *et al.*, 2017).

Com o intuito de avaliar a estabilidade dos complexos formados nas simulações, foi utilizada a energia de afinidade (ΔG), a qual possui como parâmetro de idealidade valores inferiores a -6,0 kcal/mol (SHITYAKOV; FORSTER, 2014). Por fim, como critério de seleção da “best pose”, foi utilizado o parâmetro estatístico denominado de RMSD - Root Mean Square Deviation, tendo como valores ideais os inferiores a 2 Å (YUSUF *et al.*, 2008).

4.7 Análise estatística

Em todos os ensaios foram realizados três experimentos independentes, em triplicata, e os resultados foram expressos como sendo a média \pm o erro padrão da média (EPM). As análises de significância foram realizadas através do teste one-way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, no programa GraphPad Prism, versão 5.0 para Windows, sendo considerado $p < 0,05$ como critério de significância.

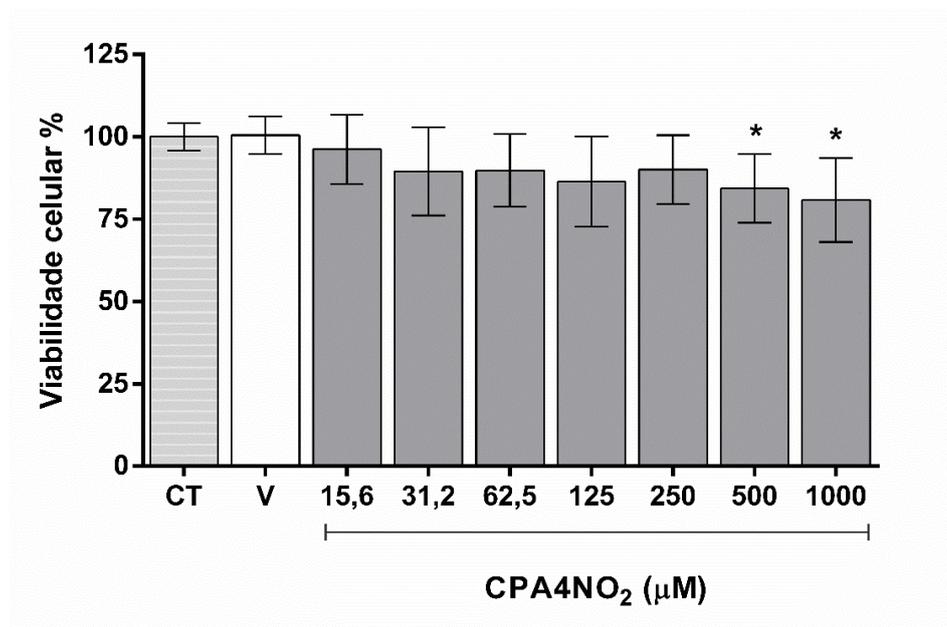
5 RESULTADOS

5.1 Citotoxicidade em células LLC-MK2

Com o intuito de avaliar a citotoxicidade da CPA4NO₂ em células hospedeiras, foi realizado o ensaio do MTT nas concentrações de 1000 – 15,6 µM.

Conforme observado na figura 12, CPA4NO₂ não apresentou citotoxicidade nas concentrações utilizadas, apresentando um valor de CC₅₀ >1000 µM.

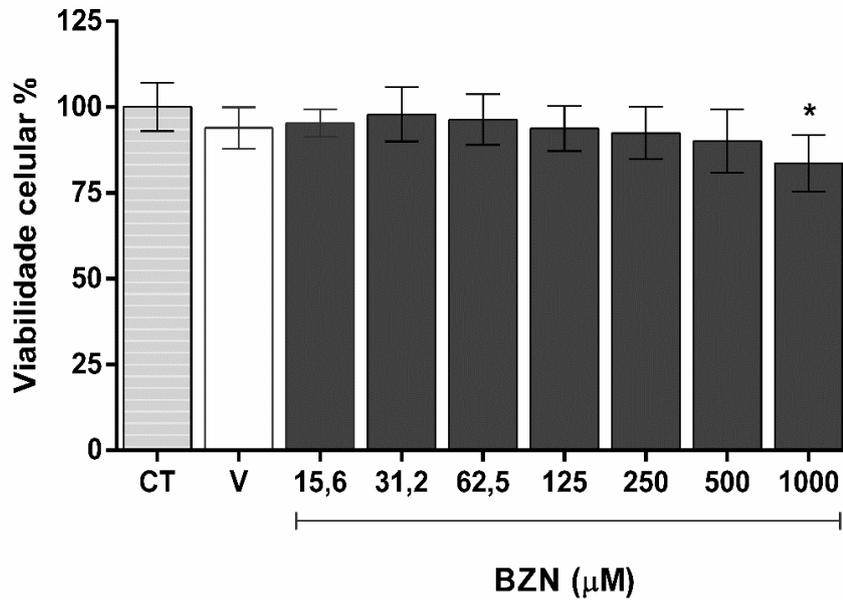
Figura 12. Citotoxicidade da CPA4NO₂ em células LLC-MK2.



Legenda: CT – grupo controle; V – veículo (DMSO 0,5%). *p<0,05 em relação ao grupo controle.
Fonte: Elaborado pelo autor.

O mesmo ensaio foi aplicado ao BZN, o qual mostrou um resultado semelhante a CPA4NO₂, não apresentando citotoxicidade nas concentrações utilizadas e exibindo um valor de CC₅₀ >1000 µM, conforme observado na figura 13.

Figura 13. Citotoxicidade do BZN em células LLC-MK2.

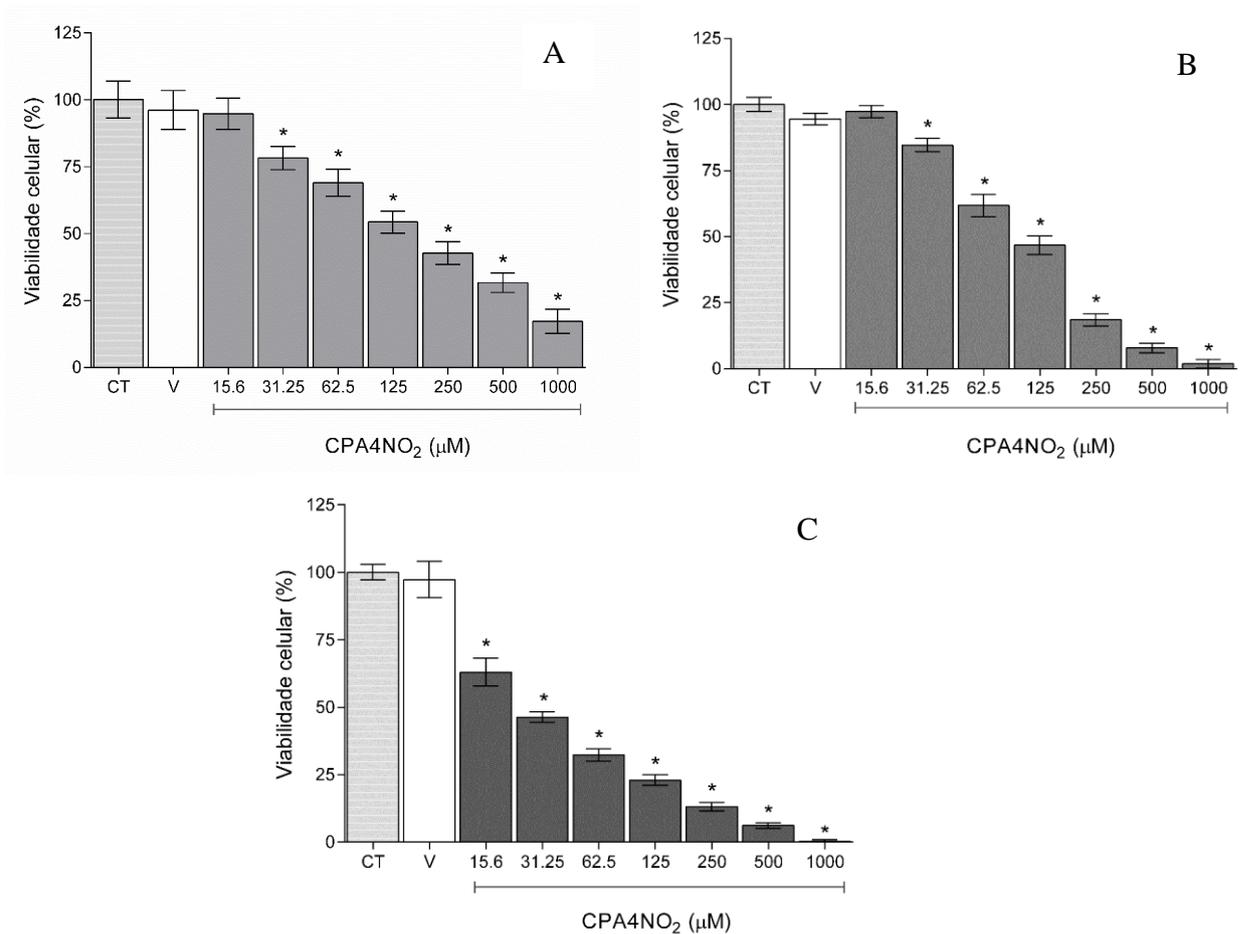


Legenda: CT – grupo controle; V – veículo (DMSO 0,5%). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Efeito sobre as formas epimastigotas

A avaliação do efeito da CPA4NO₂ foi realizada sobre as formas epimastigotas após 24, 48 e 72 horas de tratamento, nas concentrações de 1000 – 15,6 µM, conforme pode ser visto na figura 14. Sendo assim, CPA4NO₂ apresentou os seguintes valores de IC₅₀ (24h: 171,4 ± 13,6 µM; 48h: 99,44 ± 4,46 µM; 72h: 27,91 ± 1,48 µM).

Figura 14. Efeito da CPA4NO₂ sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi*.

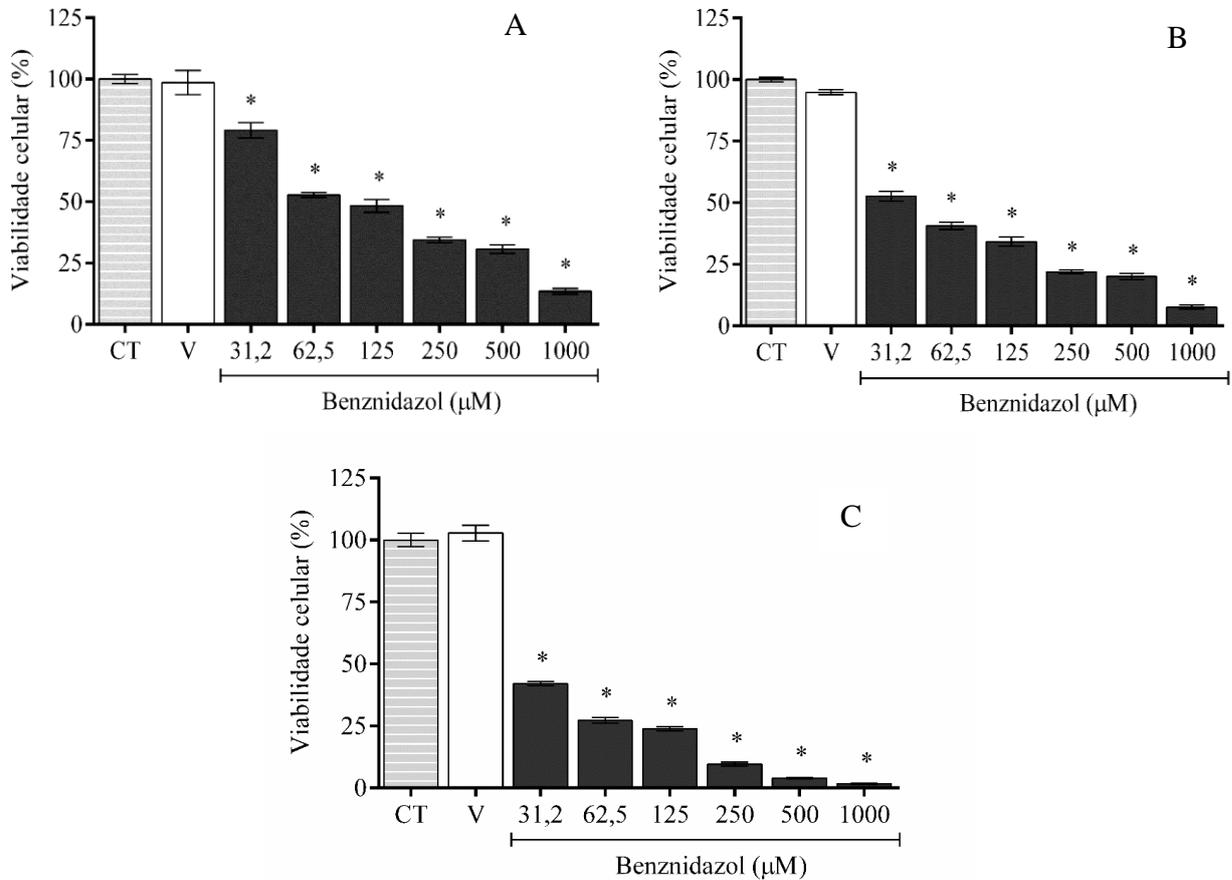


Legenda: A: efeito em 24 horas; B: efeito em 48 horas; C: efeito em 72 horas. CT – grupo controle; V – veículo (DMSO 0,5%). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O mesmo ensaio foi aplicado ao BZN, conforme pode ser visto na figura 15. Embora tenha apresentado valores de IC₅₀ (24h: $115,1 \pm 16,32 \mu\text{M}$; 48h: $37,24 \pm 5,55 \mu\text{M}$; 72h: $22,08 \pm 2,92 \mu\text{M}$) um pouco melhores do que CPA4NO₂, ambas as substâncias exibem efeito no crescimento parasitário nos três tempos em que foram realizados os ensaios.

Figura 15. Efeito do BZN sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi*.



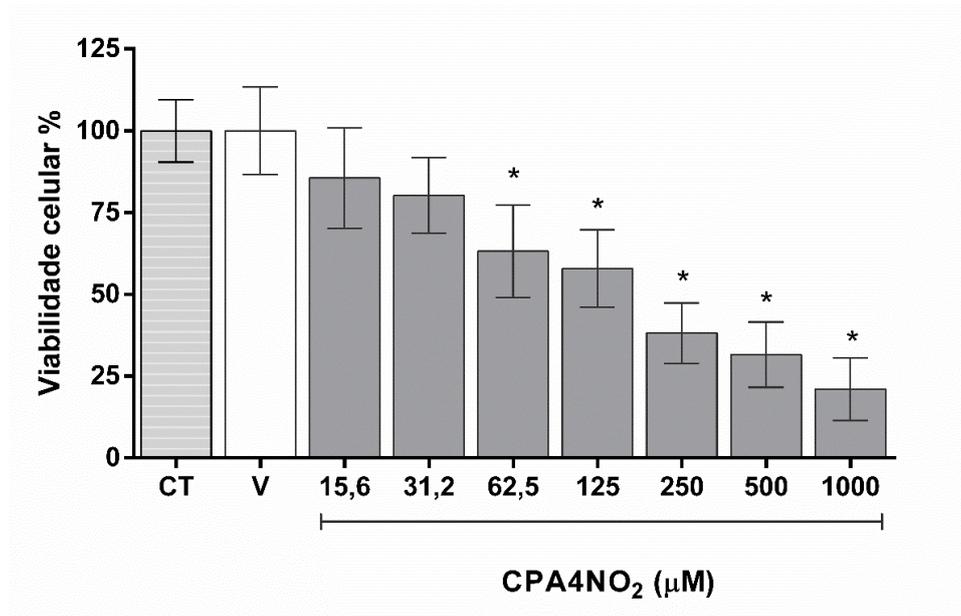
Legenda: A: efeito em 24 horas; B: efeito em 48 horas; C: efeito em 72 horas. CT – grupo controle; V – veículo (DMSO 0,5%). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Efeito sobre as formas tripomastigotas

A avaliação do efeito da CPA4NO₂ foi realizada sobre as formas tripomastigotas após 24 horas de tratamento, nas concentrações de 1000 – 15,6 µM. Sendo assim, CPA4NO₂ apresentou um valor de LC₅₀ de 161,4 ± 33,9 µM, exibindo um efeito significativo nas concentrações de 1000 – 62,5 µM, conforme pode ser visto na figura 16.

Figura 16. Efeito da CPA4NO₂ sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

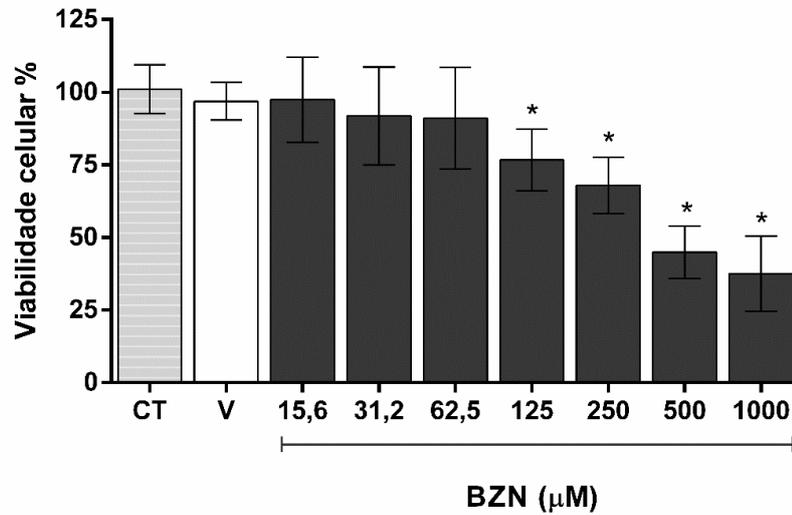


Legenda: CT – grupo controle; V – veículo (DMSO 0,5%). *p<0,05 em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Esse valor de LC₅₀ mostrou-se 3x menor quando comparado ao BZN que apresentou, nas mesmas concentrações testadas, uma LC₅₀ de 490 ± 103,9 µM, conforme mostra a figura 17.

Figura 17. Efeito do BZN sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi*.



Legenda: CT – grupo controle; V – veículo (DMSO 0,5%). *p<0,05 em relação ao grupo controle.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Sendo assim, obtidos os valores de CC_{50} , provenientes do ensaio de citotoxicidade em células LLC-MK2, e os valores de LC_{50} , provenientes do ensaio sobre as formas tripomastigotas, foi possível estimar a seletividade para ambas as substâncias testadas.

Logo, de acordo com a tabela 1, CPA4NO₂ apresentou um IS > 6,19 enquanto que o BZN um IS > 2,04, mostrando uma melhor seletividade ao parasito do que o fármaco de referência.

Tabela 1. Valores estimados de CC₅₀, IC₅₀, LC₅₀ e IS para CPA4NO₂ e BZN.

SUBSTÂNCIA	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
CPA4NO₂			
CC50 (LLC-MK2)	>1000 µM		
IC50 (EPI)	171,4 ± 13,6 µM	99,44 ± 4,46 µM	27,91 ± 1,48 µM
LC50 (TRIPO)	161,4 ± 33,9 µM		
IS	>6,19		
BZN			
CC50 (LLC-MK2)	>1000 µM		
IC50 (EPI)	115,1 ± 16,32 µM	37,24 ± 5,55 µM	22,08 ± 2,92 µM
LC50 (TRIPO)	490 ± 103,9 µM		
IS	>2,04		

Legenda: CC₅₀: concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular; IC₅₀: concentração capaz de inibir em 50% o crescimento das formas epimastigotas; LC₅₀: concentração capaz de matar 50% das formas tripomastigotas; IS: índice de seletividade.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Docking molecular

Para validação estatística dos resultados das simulações e escolha da “best pose” foi utilizado o RMSD, o qual é calculado com base na medida da distância média entre átomos de dois ligantes, possuindo como critério de aceitação valores inferiores a 2 Å.

Dessa forma, todas as simulações realizadas apresentaram valores de RMSD inferiores a 2 Å, com destaque para os complexos CPA4NO₂-cruzaína e CPA4NO₂-tripanotiona redutase que exibiram valores de RMSD na ordem de 0,708 e 1,539 Å, respectivamente, conforme observado na tabela 2.

Tabela 2. Valores de energia de afinidade e RMSD dos complexos formados após simulações de docking frente às enzimas cruzaina e tripanotiona redutase.

Complexo	Energia (kcal/mol)	RMSD (Å)
CPA4NO ₂ -cruzaína	-6,7	0,708
BZN-cruzaína	-6,1	1,728
KB2-cruzaína*	-5,6	1,292
CPA4NO ₂ -tripanotiona redutase	-7,9	1,539
BZN-tripanotiona redutase	-7,4	1,526
QUM-tripanotiona redutase*	-6,1	1,372

Legenda: *KB2 e QUM: Ligantes co-cristalizados (redocking).

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4.1 Docking Cruzaína

Com relação a energia de afinidade, o complexo CPA4NO₂-cruzaína apresentou -6,7 kcal/mol, enquanto que os complexos BZN-cruzaína e KB2-cruzaína apresentaram -6,1 e -5,6 kcal/mol, respectivamente.

Com relação as interações envolvidas na formação do complexo proteína-ligante, foi possível identificar que o complexo CPA4NO₂-cruzaína é formado por três interações hidrofóbicas, envolvendo os resíduos Phe 39A (3,65 Å), Leu 40A (3,86 Å) e Pro 44A (3,65 Å), e uma interação do tipo π -stacking, envolvendo o resíduo de cadeia lateral aromática Phe 39A (4,17 Å).

Com relação ao complexo BZN-cruzaína, foi possível observar que o mesmo é formado por quatro interações hidrofóbicas, envolvendo os resíduos Trp 184A (3,52; 3,67 e 3,78 Å) e Trp 188A (3,99 Å), uma ligação de hidrogênio com o resíduo Gln 21A (3,54 Å) e por uma interação do tipo π -stacking, envolvendo o resíduo Trp 184A (4,54 Å).

As simulações de redocking indicaram que o complexo KB2-cruzaína é formado por duas interações hidrofóbicas com o resíduo Leu 67A (3,59 e 3,88 Å), e por quatro ligações de hidrogênio envolvendo os resíduos Gln 19A (2,28 Å), Cys 25A (2,18 Å) e Gly 66A (1,87 e 2,27Å), conforme pode ser observado na tabela 3.

Tabela 3. Interações entre CPA4NO₂, BZN e KB2 com a enzima cruzaina.

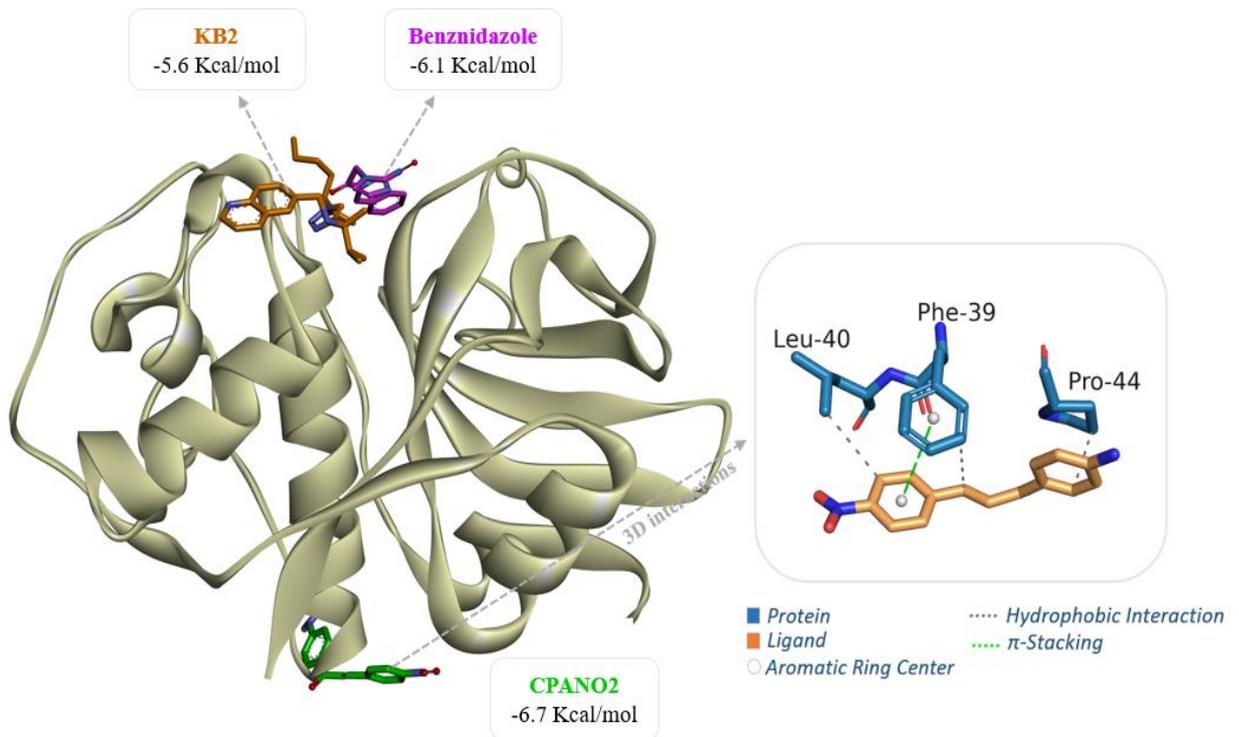
Ligante	Receptor	Interação	Distancia (Å)
CPA4NO ₂	Phe 39A	Hidrofóbica	3,65
	Leu 40A	Hidrofóbica	3,86
	Pro 44A	Hidrofóbica	3,65
	Phe 39A	π -stacking	4,17
BZN	Trp 184A	Hidrofóbica	3,52
	Trp 184A	Hidrofóbica	3,78
	Trp 184A	Hidrofóbica	3,67
	Trp 188A	Hidrofóbica	3,99
	Gln 21A	Ligação de H	3,54
	Trp 184A	π -stacking	4,54
KB2*	Leu 67A	Hidrofóbica	3,88
	Leu 67A	Hidrofóbica	3,59
	Gln 19A	Ligação de H	2,28
	Cys 25A	Ligação de H	2,18
	Gly 66A	Ligação de H	1,87
	Gly 66A	Ligação de H	2,27

Legenda: *KB2: Ligante co-cristalizado (redocking).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Dessa forma, foi observado que CPA4NO₂ acoplou em uma região diferente do sítio do inibidor co-cristalizado KB2 da proteína cruzaina, conforme mostra a figura 18.

Figura 18. Complexo de interação da enzima cruzaina com os ligantes CPA4NO₂, BZN e o inibidor co-cristalizado KB2.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4.2 Docking *Tripanotonia reductase*

Com relação a energia de afinidade, o complexo CPA4NO₂-tripanotonia reductase apresentou -7,9 kcal/mol, enquanto que os complexos BZN-tripanotonia reductase e QUM-tripanotonia reductase apresentaram -7,4 e -6,1 kcal/mol, respectivamente.

Com relação as interações envolvidas na formação do complexo proteína-ligante, foi possível identificar que o complexo CPA4NO₂-tripanotonia reductase é formado por três interações hidrofóbicas, envolvendo os resíduos Thr 52A (3,67 Å), Phe 199A (3,85 Å) e Ala 338A (3,49 Å), e por uma ligação de hidrogênio com o resíduo Thr 335A (2,30 Å).

Com relação ao complexo BZN-tripanotonia reductase, foi possível identificar duas ligações de hidrogênio com o resíduo Thr 335B (2,76 e 2,95 Å), uma interação do tipo π -stacking com o resíduo de cadeia lateral aromática Phe 199B (5,00 Å) e uma interação hidrofóbica com a Ile 200B (3,60 Å).

As simulações de redocking envolvendo o inibidor co-cristalizado QUM, identificaram a presença de duas interações com o resíduo Tyr 111B - uma hidrofóbica com distância de 3,32 Å e uma ligação de hidrogênio na ordem de 3,22 Å, além de duas ligações

com halogênio envolvendo a cadeia lateral do resíduo Ser 100B (3,15 e 3,61 Å), conforme pode ser visto na tabela 4.

Tabela 4. Interações entre CPA4NO₂, BZN e QUM com a enzima tripanotiona redutase.

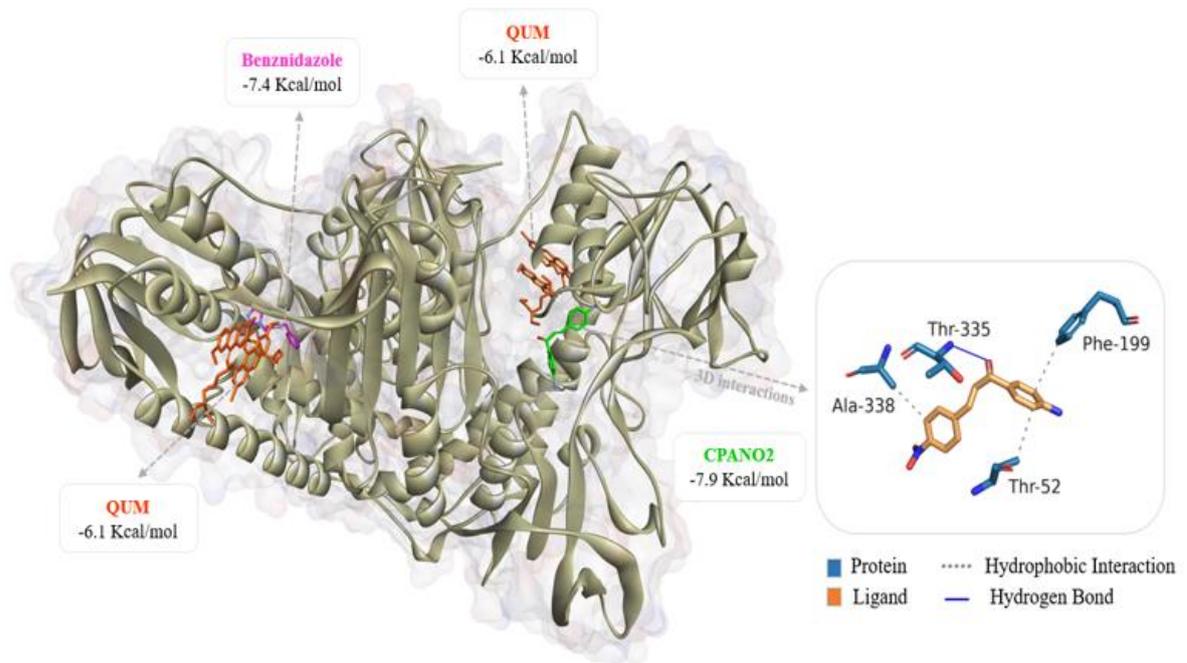
Ligante	Receptor	Interação	Distancia (Å)
CPA4NO ₂	Thr 52A	Hidrofóbica	3,67
	Phe 199A	Hidrofóbica	3,85
	Ala 338A	Hidrofóbica	3,49
	Thr 335A	Ligação de H	2,30
BZN	Ile 200B	Hidrofóbica	3,60
	Thr 335B	Ligação de H	2,95
	Thr 335B	Ligação de H	2,76
	Phe 199B	π -stacking	5,00
QUM*	Tyr 111B	Hidrofóbica	3,32
	Tyr 111B	Ligação de H	3,22
	Ser 100B	Lig. com halogênio	3,15
	Ser 100B	Lig. com halogênio	3,61

Legenda: *QUM: Ligante co-cristalizado (redocking).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Dessa forma, foi observado que a CPA4NO₂ acoplou em uma região diferente do sítio do inibidor co-cristalizado QUM da proteína tripanotiona redutase, conforme mostra a figura 19.

Figura 19. Complexo de interação da enzima tripanotiona redutase com os ligantes CPA4NO₂, BZN e o inibidor co-cristalizado QUM.



Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

A DC tem sido um grave problema de saúde pública, afetando a vida de milhões de pessoas em todo o mundo. Devido ao número limitado de medicamentos disponíveis, aos efeitos adversos desencadeados por eles e a ocorrência da resistência parasitária, torna-se urgente a necessidade de novas estratégias terapêuticas (TESSAROLO *et al.*, 2018).

As chalconas são produtos naturais que apresentam um potencial farmacológico diversificado – antioxidante, anti-inflamatório, antiproliferativo e antimicrobiano, tendo sido ao longo dos anos, uma forte inspiração para o design de novos medicamentos (SEIDEL, 2020). Suas características estruturais permitem a síntese de análogos sintéticos, os quais vêm demonstrando atividade biológica semelhante aos seus equivalentes naturais, no entanto, com potência aumentada e toxicidade reduzida (JASIM *et al.*, 2021). Sendo assim, devido sua versatilidade, chalconas naturais e sintéticas têm sido utilizadas no contexto das doenças negligenciadas entre elas, DC (CAVALCANTE *et al.*, 2022; DE BRITO *et al.*, 2022; MAGALHÃES *et al.*, 2022; MATOS *et al.*, 2022), leishmaniose (SOUZA *et al.*, 2020) e malária (REETA *et al.*, 2019).

Neste trabalho, foram realizados estudos *in vitro* e *in silico* com o intuito de avaliar os efeitos da CPA4NO₂ sobre células hospedeiras e sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas de cepa Y de *T. cruzi*, bem como sua interação teórica com as enzimas cruzafina e tripanotona reductase.

A avaliação da viabilidade celular foi realizada através do ensaio de redução do MTT, utilizando as células hospedeiras LLC-MK2. As mesmas constituem uma linhagem bem estabelecida para a obtenção das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, pois possuem boa adesão e alto percentual de internalização das formas parasitárias (MEIRA *et al.*, 2015). Sendo assim, foi observado que CPA4NO₂ não apresentou citotoxicidade. Tal fato pode ser explicado pelo seu efeito antioxidante, o qual tem relação direta com sua estrutura química (SULPIZIO *et al.*, 2016).

Estudos mostraram que a presença de um grupo –NH₂ (grupo doador de elétrons) no anel A de aminofenilchalconas *para* substituídas apresentaram maior citotoxicidade em relação às *orto* e *meta* substituídas. No entanto, a adição do grupo –NO₂ (grupo retirador de elétrons) no anel B mostrou efeito inverso, sendo capaz de reduzir a citotoxicidade (IRFAN *et al.*, 2020; KOZLOWSKA *et al.*, 2019).

Na investigação do efeito antiparasitário foi utilizada a cepa Y de *T. cruzi*, linhagem que apresenta resistência ao BZN, e que constitui um modelo importante para o

estudo da atividade antichagásica (MENEZES *et al.*, 2019). Dessa forma, com relação às formas epimastigotas – proliferativas e não infectantes, presentes no inseto vetor triatomíneo, CPA4NO₂ conseguiu inibir o crescimento parasitário nos três tempos testados. Embora tenha apresentado valores inferiores ao BZN, CPA4NO₂ quando testada sobre as formas tripomastigotas – não proliferativas e infectantes, presentes no hospedeiro vertebrado e que desempenham papel relevante na fase aguda da DC, mostrou redução da atividade parasitária em quase todas as concentrações testadas, exibindo um valor de LC50 três vezes menor que o apresentado pelo fármaco de referência.

De acordo com Matos e colaboradores (2022), a chalcona sintética CPN3NO₂ também exibiu efeito significativo sobre as formas tripomastigotas *de T. cruzi*, indicando que a presença do grupo –NO₂ no anel B parece influenciar positivamente na atividade biológica, aumentando assim a seletividade desses compostos pelo parasito.

Para que uma substância seja considerada promissora é necessário que apresente seletividade sobre as células-alvo sem provocar lesão expressiva sobre as células hospedeiras (PENA; SCARONE; SERRA, 2015). Sendo assim, quando comparada ao BZN, cuja seletividade foi maior que 2,04, CPA4NO₂ mostrou um IS > 6,19.

Embora o valor encontrado seja inferior ao preconizado pela OMS (NWAKA; HUDSON, 2006), a qual recomenda um IS > 50 para que um candidato a substância antichagásica seja considerado promissor, este trabalho contribui para o desenvolvimento de novas moléculas, através da utilização de rotas sintéticas, que apresentem toxicidade reduzida e maior seletividade pelo protozoário.

A identificação de rotas metabólicas consideradas específicas para o *T. cruzi* é uma importante estratégia para o desenvolvimento de inibidores seletivos capazes de causar a morte do parasito (PALOS *et al.*, 2017). Dessa forma, através do uso de ferramentas computacionais, como o docking molecular, foi possível obter informações acerca do mecanismo de interação da CPA4NO₂ com as principais enzimas envolvidas na sobrevivência do parasito – cruzafina e tripanotona redutase.

De acordo com as simulações realizadas, foi verificado que o complexo CPA4NO₂-cruzafina é formado por interações hidrofóbicas e por uma ligação π -stacking, envolvendo os resíduos de aminoácidos Phe 39, Leu 40 e Pro 44. Dessa forma, a chalcona em estudo apresentou uma maior afinidade (-6,7 kcal/mol) pela enzima cruzafina quando comparada ao BZN e ao inibidor co-cristalizado KB2. Porém, tais interações ocorreram em uma região diferente do sítio do inibidor KB2.

No trabalho de Matos e colaboradores (2022), por meio do docking molecular, também foi observada uma alta energia de afinidade (-6,9 kcal/mol) entre a chalcona CPA4NO₂ e a enzima cruzaina, indicando uma interação melhor do que com o BZN.

Dando continuidade as simulações realizadas, foi verificado que o complexo CPA4NO₂-tripanotiona redutase é formado por interações hidrofóbicas e por uma ligação de hidrogênio, envolvendo os resíduos de aminoácidos Ala 338, Thr 335, Phe 199 e Thr 52. Dessa forma, a chalcona em estudo apresentou uma maior afinidade (-7,9 kcal/mol) pela enzima tripanotiona redutase quando comparada ao BZN e ao inibidor co-cristalizado QUM. Porém, tais interações ocorreram em uma região diferente do sítio do inibidor QUM.

Segundo De Brito e colaboradores (2022), por meio do docking molecular, foi observada uma alta energia de afinidade (-7,2 kcal/mol) entre a chalcona BNZTHP e a enzima tripanotiona redutase, indicando uma interação melhor do que com o inibidor QUM.

O BZN é um dos medicamentos que podem ser utilizados na terapia antichagásica. Seu mecanismo de ação ainda não é bem elucidado, porém por ser um composto nitroheterocíclico necessita de nitroredutases para exercer seu efeito. Tais enzimas, como a NTR-1 (nitroredutase tripanossomal tipo 1), uma vez ativadas afetam macromoléculas importantes para a sobrevivência do parasito, sendo também responsáveis por produzir metabólitos tóxicos, os quais acabam desencadeando efeitos adversos que comprometem a adesão do paciente ao tratamento. Além disso, estudos mostram que mutações nessas nitroredutases vem sendo associadas a existência de cepas resistentes ao BZN (WILKINSON *et al.*, 2011; SALES JÚNIOR *et al.*, 2017). Desse modo, quando comparada ao fármaco de referência, CPA4NO₂ pode ser considerada um protótipo promissor para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas para o tratamento da DC, pois foi capaz de reduzir o crescimento e a viabilidade parasitária sem causar citotoxicidade em células hospedeiras.

7 CONCLUSÃO

A chalcona sintética CPA4NO₂ quando testada sobre as células hospedeiras LLC-MK2 não foi capaz de causar citotoxicidade. Além disso, a mesma apresentou efeito sobre as formas epimastigotas, sendo capaz de inibir o crescimento nos três tempos testados, e sobre as formas tripomastigotas, sendo capaz de reduzir significativamente a viabilidade parasitária.

A partir dos estudos envolvendo docking molecular, foi possível inferir que CPA4NO₂ mostrou uma boa interação com as enzimas cruzaina e tripanotiona redutase, porém em sítios possivelmente alostéricos.

Por fim, este trabalho ressalta o potencial biotecnológico das chalconas e seus análogos sintéticos, evidenciando a necessidade de estudos posteriores com o intuito de tornar a CPA4NO₂ um candidato promissor no desenvolvimento de fármacos antichagásicos.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, N. et al. Hosts and vectors of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in the Chagas disease endemic region of the Paraguayan Chaco. **Parasitology**, v. 144, n. 7, p. 884-898, 2017.
- ADADE, C. M. et al. Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. **Toxicon**, v. 69, p. 227–239, 2013.
- AYO, C. M. et al. Genetic susceptibility to Chagas disease: an overview about the infection and about the association between disease and the immune response genes. **BioMed research international**, 2013.
- BANDEIRA, P. N. et al. Synthesis, structural characterization, and cytotoxic evaluation of chalcone derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 28, n. 11, p. 2037–2049, 2019.
- BARBOSA DA SILVA, E. et al. Cruzain structures: apocruzain and cruzain bound to S-methyl thiomethanesulfonate and implications for drug design. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications**, v. 75, n. 6, p. 419-427, 2019.
- BATTISTA, T. et al. Targeting Trypanothione Reductase, a Key Enzyme in the Redox Trypanosomatid Metabolism, to Develop New Drugs against Leishmaniasis and Trypanosomiasis. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 8, 2020.
- BENCK, L.; KRANSDORF, E.; PATEL, J. Diagnosis and management of Chagas cardiomyopathy in the United States. **Current cardiology reports**, v. 20, n. 12, p. 1-8, 2018.
- BERN, C. et al. Chagas disease in the United States: a public health approach. **Clinical microbiology reviews**, v. 33, n. 1, 2019.
- BRAK, K. et al. Nonpeptidic tetrafluorophenoxymethyl ketone cruzain inhibitors as promising new leads for Chagas disease chemotherapy. **Journal of medicinal chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1763-1773, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Doença de Chagas. **Boletim Epidemiológico**, v. 2, 2022.
- CALDAS, I. S.; SANTOS, E. G.; NOVAES, R. D. An evaluation of benznidazole as a Chagas disease therapeutic. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 20, n. 15, p. 1797-1807, 2019.
- CAVALCANTE, C. H. L. et al. Antichagasic evaluation, molecular docking and ADMET properties of the chalcone (2 E)-3-(2-fluorophenyl)-1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one against *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics**, p. 1-17, 2022.
- CEARÁ. Secretaria de Saúde do Governo do Estado do Ceará. Doenças Tropicais Negligenciadas. **Boletim Epidemiológico**, 2021.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze 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**, 1909.

CHATELAIN, E. Chagas Disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? **Computational and Structural Biotechnology Journal**, 2017.

COSTA, M. et al. Doença de chagas: uma revisão bibliográfica. **Biological Sciences**, 2011.

CUNHA-FILHO, M. et al. Recentes avanços no tratamento da doença de Chagas. **Brasília Med**, v. 49, n. 4, p. 279–283, 2012.

CUNHA-NETO, E.; CHEVILLARD, C. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. *Mediators of inflammation*, 2014.

DA SILVA, L. et al. Antibacterial potential of chalcones and its derivatives against *Staphylococcus aureus*. **3 Biotech**, v. 13(1), p. 1-30, 2023.

DE BRITO, D. H. A. et al. Synthesis, structural and spectroscopic analysis, and antiproliferative activity of chalcone derivate (E)-1-(4-aminophenyl)-3-(benzo [b] thiophen-2-yl) prop-2-en-1-one in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Molecular Structure**, v. 1253, 2022.

DE MELLO, Marcos Vinícius Palmeira et al. A comprehensive review of chalcone derivatives as antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 150, p. 920-929, 2018.

DNDI. Drugs for Neglected Diseases Initiative. Disponível em <<https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/>>. Acesso em 08 fev. 2022.

FERREIRA, M. K. A. et al. Chalcones pharmacological potential: a brief review. **Revista Virtual de Química**, v.10, 2018.

FERREIRA, R. R. et al. The Search for Biomarkers and Treatments in Chagas Disease: Insights From TGF-Beta Studies and Immunogenetics. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, p. 1310, 2022.

FIOCRUZ. Portal da Doença de Chagas. Disponível em <<http://chagas.fiocruz.br/>>. Acesso em 05 fev. 2020.

FRANCISCO, A. F. et al. Biological factors that impinge on Chagas disease drug development. **Parasitology**, v. 144, n. 14, p. 1871–1880, 2017.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 22–27, 2010.

GONZÁLEZ, L. A. et al. Effect of substituents in the A and B rings of chalcones on antiparasite activity. **Archiv der Pharmazie**, v. 353, n. 12, 2020.

HASSLOCHER-MORENO, A. M. et al. Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 5, p. 1261-1266, 2012.

HUEY, R.; MORRIS, G. M.; FORLI, S. Using AutoDock 4 and AutoDock vina with

AutoDockTools: a tutorial. **The Scripps Research Institute Molecular Graphics Laboratory**, v. 10550, 2009.

HUO, P. C. et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel chalcone-like compounds as potent and reversible pancreatic lipase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 29, p. 115853, 2021.

IRFAN, R. et al. A Comprehensive Review of Aminochoalcones. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 22, 2020.

JACKSON, Y.; WYSSA, B.; CHAPPUIS, F. Tolerance to nifurtimox and benznidazole in adult patients with chronic Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 3, p. 690-696, 2020.

JASIM, H. A. et al. Chalcones: Synthetic Chemistry Follows Where Nature Leads. **Biomolecules**, 2021.

KOZŁOWSKA, J. et al. Synthesis and biological evaluation of novel aminochoalcones as potential anticancer and antimicrobial agents. **Molecules**, v. 24, n. 22, 2019.

LIMA, D. B. et al. Antiparasitic effect of *Dinoponera quadriceps* giant ant venom. **Toxicon**, v. 120, p. 128–132, 2016.

LOSINNO, A. D. et al. Induction of autophagy increases the proteolytic activity of reservosomes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Autophagy**, v. 17, n. 2, p. 439-456, 2021.

MAGALHÃES, E. P. et al. Chloride substitution on 2-hydroxy-3, 4, 6-trimethoxyphenylchalcones improves in vitro selectivity on *Trypanosoma cruzi* strain Y. **Chemico-Biological Interactions**, v. 361, 2022.

MARCHIORI, E. Chagas disease : a tropical infection of interest to the radiologist. **Radiol Bras**, v. 49, n. 6, p. 2016–2017, 2016.

MARINHO, E. M. et al. Virtual screening based on molecular docking of possible inhibitors of Covid-19 main protease. **Microbial Pathogenesis**, v. 148, 2020.

MARINHO, M. M. et al. Quantum computational investigations and molecular docking studies on amentoflavone. **Heliyon**, v. 7, n. 1, 2021.

MARTINS-MELO, F. R. et al. Levels and trends in Chagas disease-related mortality in Brazil, 2000–2019. **Acta Tropica**, v. 220, p. 105948, 2019.

MATOS, G. C. et al. Quantum mechanical, molecular docking, molecular dynamics, ADMET and antiproliferative activity on *Trypanosoma cruzi* (Y strain) of chalcone (E)-1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl)-3-(3-nitrophenyl)prop-2-en-1-one derived from natural product. **Physical Chemistry Chemical Physics**, 2022.

MEIRA, C. S. et al. In vitro and in vivo antiparasitic activity of *Physalis angulata* L. concentrated ethanolic extract against *Trypanosoma cruzi*. **Phytomedicine**:

international journal of phytotherapy and phytopharmacology, v. 22, p. 969–74, 2015.

MENDONÇA, A. A. S. et al. Relevance of trypanothione reductase inhibitors on *Trypanosoma cruzi* infection: A systematic review, meta-analysis, and in silico integrated approach. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2018.

MENEZES, R. R. P. B. et al. Antiparasitic effect of (-)- α -bisabolol against *Trypanosoma cruzi* Y strain forms. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 2019.

MIRANDA, M. R.; SAYÉ, M. M. Chagas Disease Treatment: From New Therapeutic Targets to Drug Discovery and Repositioning. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 36, p. 6517–6518, 2019.

MONTEIRO, M. L. et al. Antichagasic effect of hemocyanin derived from antimicrobial peptides of *penaeus monodon* shrimp. **Experimental parasitology**, v. 215, p. 107930, 2020.

MORILLA, M. J.; ROMERO, E. L. Nanomedicines against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. **Nanomedicine**, v. 10, p. 465–481, 2015.

MORILLO, C. A. et al. Randomized trial of benznidazole for chronic chagas's cardiomyopathy. **The new england journal of medicine**, v. 373, p. 1295-1306, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

NGUYEN, D. D. et al. Rigidity strengthening: A mechanism for protein–ligand binding. **Journal of chemical information and modeling**, v. 57, n. 7, p. 1715-1721, 2017.

NWAKA, S.; HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 11, p. 941–955, 2006.

OMS. Pan American Health Organization. Disponível em < <http://www.paho.org> >. Acesso em 07 fev. 2021.

ÖZDEMİR, A. et al. Synthesis and evaluation of new indole-based chalcones as potential antiinflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 89, p. 304-9, 2015.

PALOS, I. et al. Repositioning FDA drugs as potential cruzain inhibitors from *Trypanosoma cruzi*: Virtual screening, in vitro and in vivo studies. **Molecules**, v. 22, n. 6, 2017.

PEÑA, S., SCARONE, L., SERRA, G. Macrocycles as potential therapeutic agents in neglected diseases. **Future Medicinal Chemistry**, v.7(3), p. 355-82, 2015.

PEREIRA, P. C. M.; NAVARRO, E. C. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. **The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 19, n. 1, p. 34, 2013.

PEREZ-MOLINA, J. A et al. Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 6, p. 1139–1147, 2009.

PONTES, O. et al. Exploitation of new chalcones and 4H-chromenes as agentes for cancer treatment. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 101-114, 2018.

REETA et al. Synthesis of novel chalcones through palladium-catalyzed CO crosscoupling reaction of bromo-chalcones with ethyl acetohydroxamate and their antiplasmodial evaluation against Plasmodium falcipuram in vitro. **Bioorganic chemistry**, v. 86, p. 631–640, 2019.

REQUENA-MÉNDEZ, A. et al. Prevalence of Chagas Disease in LatinAmerican Migrants Living in Europe: A Systematic Review and Meta-analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, 2015.

SALES JÚNIOR, P. A. et al. Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, p. 1289-1303, 2017.

SARAVANAMUTHU, A. et al. Two interacting binding sites for quinacrine derivatives in the active site of trypanothione reductase: a template for drug design. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 28, p. 29493-29500, 2004.

SEIDEL, V. Plant-Derived Chemicals: A Source of Inspiration for New Drugs. **Plants**, 2020.

SESTI-COSTA, R. et al. Ruthenium Complex with Benznidazole and Nitric Oxide as a New Candidate for the Treatment of Chagas Disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, 2014.

SHITYAKOV, S.; FÖRSTER, C. In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood–brain barrier choline transporter. **Advances and applications in bioinformatics and chemistry: AABC**, v. 7, p. 23, 2014.

SOUZA, J. M. et al. Licochalcone a Exhibits Leishmanicidal Activity in vitro and in Experimental Model of Leishmania (Leishmania) Infantum. **Frontiers in veterinary science**, v. 7, p. 527, 2020.

SULPIZIO, C. et al. Synthesis, structure, and antioxidant activity of methoxy- and hydroxyl-substituted 2'-aminochalcones. **Monatshefte fur Chemie**, v. 147, n. 10, p. 1747–1757, 2016.

TESSAROLO, L. D. et al. Nanoencapsulation of benznidazole in calcium carbonate increases its selectivity to Trypanosoma cruzi. **Parasitology**, v. 145, n. 9, p. 1191–1198, 2018.

TOSO, A. M.; VIAL, F. U.; GALANTI, Norbel. Oral transmission of Chagas' disease. **Revista médica de Chile**, v. 139, n. 2, p. 258-266, 2011.

TROTT, O., OLSON, A. J. Software news and update AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function. **Efficient Optimization, and Multithreading**, 2010.

VOGEL, A. I. Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry, 5 ed. New York: John Wiley & Sons, 1989.

WILKINSON, S. R. et al. Tripanocidal Activity of Nitroaromatic Prodrugs: Current Treatments and Future Perspectives. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 2072-2084, 2011.

YAN, J. et al. α -Glucosidase inhibition by luteolin: Kinetics, interaction and molecular docking. **International journal of biological macromolecules**, v. 64, p. 213-223, 2014.

YUSUF, D. et al. An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. **Journal of chemical information and modeling**, v. 48, n. 7, p. 1411-1422, 2008.