



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

**LYANNA RODRIGUES RIBEIRO**

**EFEITO TRIPANOCIDA DA CHALCONA (2E,4E)-1-(2-HIDROXI-3,4,6-  
TRIMETOXIFENIL)-5-FENILPENTA-2,4-DIEN-1-ONA EM CEPA Y DE**  
*Trypanosoma cruzi*

**FORTALEZA**

**2023**

LYANNA RODRIGUES RIBEIRO

EFEITO TRIPANOCIDA DA CHALCONA (2E,4E)-1-(2-HIDROXI-3,4,6-  
TRIMETOXIFENIL)-5-FENILPENTA-2,4-DIEN-1-ONA EM CEPA Y DE  
*Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Biologia para a saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes.

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)

---

- R369e Ribeiro, Lyanna Rodrigues.  
Efeito tripanocida da chalcona (2E,4E)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)-5-fenilpenta-2,4-dien-1-ona em cepa Y de *Trypanosoma cruzi* / Lyanna Rodrigues Ribeiro. – 2023.  
83 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: Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes.
1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Doença de Chagas. 3. Chalconas. 4. Simulação de Acoplamento Molecular. I. Título.

CDD 615

---

**LYANNA RODRIGUES RIBEIRO**

**EFEITO TRIPANOCIDA DA CHALCONA (2E,4E)-1-(2-HIDROXI-3,4,6-TRIMETOXIFENIL)-5-FENILPENTA-2,4-DIEN-1-ONA EM CEPA Y DE  
*Trypanosoma cruzi***

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

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

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

---

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

*“Aqueles que nos amam  
nunca nos deixam de verdade.”*

*Sirius Black*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter feito meu caminho fazer sentido. Acredito que Ele tenha colocado as pessoas certas na minha vida e cada detalhe foi importante na minha trajetória durante o mestrado.

Agradeço ao pai, Antonio Rodrigues, que faleceu por complicações causadas pela doença de Chagas e foi a razão para eu iniciar a pesquisa nessa área. Apesar disso, ele também foi a razão por eu ter me encontrado no ramo da pesquisa científica e, por isso, sou muito grata. Estou feliz e acredito que eu estou onde devo estar.

À minha mãe, Elenilza Ribeiro, que sempre foi um exemplo de altruísmo para mim e, juntamente com meu pai, sempre me mostrou o valor da educação e dos estudos. A senhora sempre foi um exemplo de força, persistência e determinação. Obrigada pela criação que me fez ser quem eu sou hoje. Meu amor pela senhora é incondicional.

Aos meus irmãos, Leandro Rodrigues e Luana Rodrigues, que sempre me apoiaram e sempre foram meu alicerce. Obrigada pela cumplicidade e a união de vocês. Amo vocês.

Ao Filipe Cunha, pelo companheirismo e cumplicidade. Sou grata pela amizade, pelo carinho e pelo amor que sempre dividiu comigo. Você deixa a minha vida mais leve e mais feliz.

Ao meu orientador, professor Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes, por toda paciência, por sempre me incentivar e, por muitas vezes, ser um amigo. É um exemplo de pesquisador, orientador e educador. Acredito que seja um dom e que, por isso, realiza a profissão com tanta maestria.

À professora Alice, que me acolheu no laboratório e cedeu os recursos que tornaram essa pesquisa possível.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica e do Laboratório de Toxicologia Experimental e Analítica (Emanuel, Brenna, Pedro, professor Tiago, Mateus, Erlânia, Mac, Bruna, Izabell, Ana Júlia, Marcelo, Stephanie, Igor, Helaynne, Yasmin, Felipe Ramon, Felipe Ramos, Natália, Davi, John, Naiara e Glautemberg), por todos os momentos de descontração, ensinamentos, conversas e risadas. Em especial, o Emanuel, por ter me ajudado tantas vezes e por ter se tornado um grande amigo.

Aos meus amigos externos aos laboratórios, por sempre acreditaram em mim e por se alegrarem com as minhas conquistas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, por todo aprendizado e conhecimento.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas que contribuíram para este projeto, mesmo que indiretamente, sou muito grata.

## RESUMO

A doença de Chagas (DC) é uma antropozoonose comum na América Latina, causada pelo agente protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Trata-se de uma doença infecciosa negligenciada, que representa uma ameaça para áreas consideradas não endêmicas. A doença apresenta fases clínicas aguda e crônica, com complicações cardíacas e gastrointestinais graves. Há apenas dois fármacos disponíveis para o tratamento etiológico, Benznidazol (BZN) e Nifurtimox, com eventos adversos frequentes, altas taxas de descontinuação e são pouco eficazes na terapia, fazendo necessária a busca por novas substâncias com atividade tripanocida. As chalconas são substâncias naturais, sintéticas ou semissintéticas, que apresentam diversas propriedades biológicas, dentre elas, a atividade tripanocida. Portanto, são promissoras na pesquisa de atividade antichagásica. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade tripanocida da (2E,4E)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)-5-fenilpenta-2,4-dien-1-ona (CPNC) e os seus mecanismos de ação. Para isso, a citotoxicidade em células hospedeiras LLC-MK2 foi realizada por meio do ensaio de redução do MTT. A partir disso foi estimada a concentração capaz de inibir o crescimento de 50% das células (CC<sub>50</sub>). Em seguida, formas epimastigotas e tripomastigotas foram incubadas com crescentes concentrações de CPNC. O percentual de parasitos viáveis foi determinado por contagem em câmara de Neubauer. Os valores de viabilidade foram usados para calcular a concentração capaz de inibir a proliferação de 50% de epimastigotas (IC<sub>50</sub>) e a concentração capaz de matar 50% dos tripomastigotas (LC<sub>50</sub>). O índice de seletividade (IS) foi calculado pela razão CC<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub>. O efeito anti-amastigota foi avaliado em células LLC-MK2 infectadas, por determinação do percentual de células infectadas e no número de amastigotas no interior de 100 células. Os mecanismos de morte celular foram investigados quanto ao percentual de células necróticas e apoptóticas pela marcação com 7-AAD e anexina V-PE, a produção citoplasmática de espécies reativas de oxigênio (EROs) por DCFH<sub>2</sub>-DA e a alteração no potencial transmembrânico mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) por rodamina 123 (Rho123). Por fim, simulações de docking molecular foram realizadas para avaliação da interação teórica de CPNC com as enzimas tripanotiona redutase e cruzafina. CPNC causou efeito citotóxico em células hospedeiras nas concentrações entre 62,5 e 1000  $\mu\text{M}$ , com CC<sub>50</sub> = 355,5  $\pm$  45,9  $\mu\text{M}$ . Além disso, foi capaz de inibir a proliferação de epimastigotas em todas as concentrações testadas nos três tempos, com IC<sub>50</sub>/24h = 39,9  $\pm$  4,2  $\mu\text{M}$ ; IC<sub>50</sub>/48h = 48,5  $\pm$  3,7  $\mu\text{M}$ ; e IC<sub>50</sub>/72h = 37,8  $\pm$  3,5  $\mu\text{M}$ . Em formas tripomastigotas, foi eficaz em todas as concentrações, com LC<sub>50</sub> = 48,3  $\pm$  13,4  $\mu\text{M}$ , tendo obtido IS = 7,36. Quanto ao efeito anti-amastigota, houve diminuição da quantidade de células infectadas e de número de amastigotas/100 células. Os ensaios de citometria de fluxo demonstraram que o tratamento com CPNC causou perda na integridade da membrana, produção de EROs e redução do  $\Delta\Psi_m$ . Nos ensaios de docking molecular, foi observado que CPNC interagiu com regiões dos sítios catalíticos das duas enzimas testadas, o que pode auxiliar no entendimento dos mecanismos de ação da molécula sobre *Trypanosoma cruzi*. Em conclusão, CPNC apresentou efeito antiparasitário sobre *T. cruzi*, o que a torna promissora para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*; doença de Chagas; chalconas; docking molecular.

## ABSTRACT

Chagas disease (CD) is a common anthroponosis in Latin America, caused by the hemoflagellate protozoan agent *Trypanosoma cruzi*. It is a neglected infectious disease that represents a threat to areas considered non-endemic. The disease has acute and chronic clinical phases, with serious cardiac and gastrointestinal complications. There are only two drugs available for etiologic treatment, Benznidazole (BZN) and Nifurtimox, which have adverse events, high discontinuation rates and are not very effective in therapy, making it necessary to search for new substances with trypanocidal activity. Chalcones are natural, synthetic or semisynthetic substances that have several biological properties, including trypanocidal activity. Therefore, they are promising for researching antichagasic activity. Therefore, the objective of the present work was to evaluate the trypanocidal activity of (2E,4E)-1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl)-5-phenylpenta-2,4-dien-1-one (CPNC) and its mechanisms of action. For this, cytotoxicity in LLC-MK2 host cells was performed using the MTT reduction assay. From this, a concentration capable of inhibiting the growth of 50% of cells (CC50) was estimated. Then, epimastigotes and trypomastigotes were incubated with increasing concentrations of CPNC. The percentage of viable parasites was determined by counting in a Neubauer chamber. Guideline values were used to calculate the concentration capable of inhibiting 50% control of epimastigotes (IC50) and the concentration capable of killing 50% of trypomastigotes (LC50). The selectivity index (SI) was calculated by the ratio CC50/LC50. The anti-mastigote effect was evaluated in LLC-MK2-infected cells by determining the percentage of infected cells and the number of amastigotes within 100 cells. The mechanisms of cell death were investigated regarding the percentage of necrotic and apoptotic cells by labeling with 7-AAD and annexin V-PE, the cytoplasmic production of reactive oxygen species (ROS) by DCFH2-DA, and the change in mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) by rhodamine 123 (Rho123). Finally, molecular docking simulations were performed to evaluate the theoretical interaction of CPNC with the enzymes trypanothione reductase and cruzin. CPNC caused a cytotoxic effect on host cells at concentrations between 62.5 and 1000  $\mu\text{M}$ , with  $\text{CC50} = 355.5 \pm 45.9 \mu\text{M}$ . Furthermore, it was able to inhibit the protection of epimastigotes at all concentrations tested in the three times, with  $\text{IC50}/24\text{h} = 39.9 \pm 4.2 \mu\text{M}$ ;  $\text{IC50}/48\text{h} = 48.5 \pm 3.7 \mu\text{M}$ ; and  $\text{IC50}/72\text{h} = 37.8 \pm 3.5 \mu\text{M}$ . In trypomastigote forms, it was effective at all concentrations, with  $\text{LC50} = 48.3 \pm 13.4 \mu\text{M}$ , obtaining  $\text{IS} = 7.36$ . As for the anti-mastigote effect, there was a decrease in the number of infected cells and the number of amastigotes/100 cells. Flow cytometry assays showed that CPNC treatment caused loss of membrane integrity, ROS production, and a reduction in  $\Delta\Psi_m$ . In molecular docking tests, it was observed that CPNC interacted with regions of the catalytic sites of the two enzymes tested, which may help in understanding the mechanisms of action of the molecule on *Trypanosoma cruzi*. In conclusion, CPNC showed an antiparasitic effect on *T. cruzi*, which is promising for the development of new antichagasic drugs.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*; Chagas disease; chalcones; molecular docking.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**7-AAD** – 7-amino-actinomicina;

**ASN** – asparagina;

**AxPE** – anexina V conjugada com ficoeritrina;

**BZN** – benznidazol;

**BOD** – biochemical oxygen demand;

**CC<sub>50</sub>** - concentração capaz de causar 50% de citotoxicidade;

**CDC** – Centers for Disease Control and Prevention (Centros de Controle e Prevenção de Doenças);

**CYS** – cisteína;

**DC** – Doenças de Chagas;

**DCFH-DA** – diacetato de 2,7-diclorofluoresceína;

**DMEM** - Dulbecco's Modified Eagle Medium;

**DMSO** – dimetilsulfóxido;

**DNA** – ácido desoxirribonucleico;

**EDTA** – ácido etilenodiaminotetracético;

**EPM** – erro padrão da média;

**EROs** – espécies reativas de oxigênio;

**FSC** – forward scatter;

**GLN** – glutamine;

**GLU** – ácido glutâmico;

**GLY** – glicina;

**GR** – glutathione reductase;

**GSSG** – glutathione oxidase;

**HIS** – histidina;

**IC<sub>50</sub>** – concentração capaz de inibir em 50% a proliferação de formas epimastigotas de *T. cruzi*;

**IgG** – imunoglobulina G;

**IFR** – Intensidade de fluorescência relativa;

**ILE** – Isoleucina;

**IFR** – intensidade de fluorescência relativa;

**IS** – Índice de seletividade;

**KB2** – tetrafluorofenoximetil cetona;

**LC<sub>50</sub>** – concentração letal para 50% das formas tripomastigotas de *T. cruzi*;

**LEU** – leucina;

**LIT** – liver infusion tryptose;

**LYS** – lisina;

**MET** – metionina;

**MTT** - brometo de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio;

**NADPH** – fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina reduzido;

**Nfx** – nifurtimox;

**NTR** - nitroredutases tripanossômicas tipo I;

**OMS** – Organização Mundial da Saúde;

**PBS** – solução salina tampão fosfato;

**PCR** – reação em cadeia da polimerase;

**PHE** – fenilalanina;

**PRO** – prolina;

**QUM** – mostarda de quinacrina;

**Rho123** – rodamina 123;

**RMSD** – root mean square deviation;

**RNA** – ácido ribonucleíco;

**SBF** – soro bovino fetal;

**SDS** – dodecilsulfato de sódio;

**SER** – serina;

**SSC** – side scatter;

**TcCr** – Cruzafina de *T. cruzi*;

**TcK2** – eIF2a quinase;

**TcTR** – Tripanotiona redutase de *T. cruzi*;

**THR** – treonina;

**T(S)2** – dissulfeto de tripanotiona;

**T(SH)2** – dihidrotripanotiona;

**TRP** – triptofano;

**TYR** – tirosina.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores estimados de CC50, IC50 e LC50, em $\mu\text{M}$ , de cada substância em estudo.....	51
Tabela 2 - Energia de afinidade e valores de RMSD dos complexos formados pelos ligantes e a enzima tripanotiona redutase obtidos por docking molecular.....	57
Tabela 3 - Interações entre os ligantes com a enzima tripanotiona redutase.....	58
Tabela 4 - Energia de afinidade e valores de RMSD dos complexos formados pelos ligantes e a enzima cruzaina obtidos por docking molecular.....	60
Tabela 5 - Interações entre os ligantes com a enzima cruzaina.....	60

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição global de casos de Doença de Chagas.....	17
Figura 2 - Espécies de triatomíneos importantes no contexto médico.....	19
Figura 3 - Formas evolutivas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	20
Figura 4 - Ciclo evolutivo de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	22
Figura 5 – Reação de condensação de Claisen-Schmidt.....	30
Figura 6 – Representação estrutural das 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenilchalconas.....	31
Figura 7 - Reação de condensação de Claisen-Schmidt em meio alcalino para obtenção da (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)-5-fenilpenta-2,4-dien-1-ona.....	35
Figura 8 - Reação de redução do sal de MTT a sal de formazan.....	36
Figura 9 - Princípio da citometria de fluxo.....	42
Figura 10 - Citotoxicidade em células hospedeiras (LLC-MK2).....	47
Figura 11 - Efeito antiparasitário da chalcona CPNC sobre formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	48
Figura 12 - Efeito antiparasitário do benznidazol sobre formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	49
Figura 13 - Efeito tripanocida sobre formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	50
Figura 14 - Efeito da chalcona CPNC sobre foram amastigotas e células hospedeiras infectadas.....	52
Figura 15 - Perfil de morte celular induzido pela chalcona em estudo sobre as formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> , avaliado por citometria de fluxo.....	54
Figura 16 - Intensidade de fluorescência relativa de formas epimastigotas tratadas com a chalcona CPNC marcadas com DCFH2-DA por citometria de fluxo.....	55

Figura 17 - Intensidade de fluorescência relativa de formas epimastigotas tratadas com a chalcona CPNC marcadas com Rho123 por citometria de fluxo.....	56
Figura 18 - Complexo e mapas de interação dos ligantes com a enzima TcTR.....	57
Figura 19 - Complexo e mapas de interação dos ligantes com a enzima cruzaina (TcCr).....	59

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>1.1</b>	<b>Doença de Chagas</b>	<b>16</b>
<b>1.2</b>	<b><i>Trypanosoma cruzi</i>: ciclo de vida</b>	<b>19</b>
<b>1.3</b>	<b>Fisiopatologia da doença de Chagas</b>	<b>22</b>
<b>1.4</b>	<b>Tratamento farmacológico da doença de Chagas</b>	<b>24</b>
1.4.1	Novos alvos terapêuticos para a doença de Chagas	26
1.4.1.1	<i>Cruzaína</i>	27
1.4.1.2	<i>Tripanotiona reductase</i>	28
<b>1.5</b>	<b>Pesquisa de novas moléculas com potencial antichagásico</b>	<b>29</b>
1.5.1	Chalconas	29
1.5.1.1	<i>2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenilchalconas</i>	31
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b>	<b>34</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Obtenção das moléculas</b>	<b>35</b>
<b>4.2</b>	<b>Avaliação da citotoxicidade em células hospedeiras</b>	<b>36</b>
<b>4.3</b>	<b>Efeito antiparasitário sobre formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i></b>	<b>38</b>
<b>4.4</b>	<b>Efeito antiparasitário sobre formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i></b>	<b>39</b>
<b>4.5</b>	<b>Efeito antiamastigota</b>	<b>40</b>
<b>4.6</b>	<b>Ensaio de citometria de fluxo</b>	<b>41</b>
4.6.1	Avaliação do perfil de morte e integridade celular	42
4.6.2	Análise de espécies reativas de oxigênio (EROs) citoplasmáticas	43

4.6.3	Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ )	44
<b>4.7</b>	<b>Estudos in silico</b>	<b>45</b>
4.7.1	Docking molecular	45
<b>4.7</b>	<b>Análise estatística</b>	<b>46</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>47</b>
<b>5.1</b>	<b>Citotoxicidade em células hospedeiras</b>	<b>47</b>
<b>5.2</b>	<b>Efeito antiparasitário sobre formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i></b>	<b>48</b>
<b>5.3</b>	<b>Efeito antiparasitário sobre formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i></b>	<b>49</b>
<b>5.4</b>	<b>Efeito antiamebíota</b>	<b>51</b>
<b>5.5</b>	<b>Ensaio de citometria de fluxo</b>	<b>52</b>
5.5.1	Perfil de morte e integridade celular	53
5.5.2	Espécies reativas de oxigênio (EROs) citoplasmáticas	54
5.5.3	Potencial transmembrânico mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ )	55
<b>5.6</b>	<b>Docking molecular</b>	<b>56</b>
5.6.1	Tripanotona redutase (TcTR)	56
5.6.2	Cruzaína (TcCR)	59
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>72</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>73</b>

# 1 INTRODUÇÃO

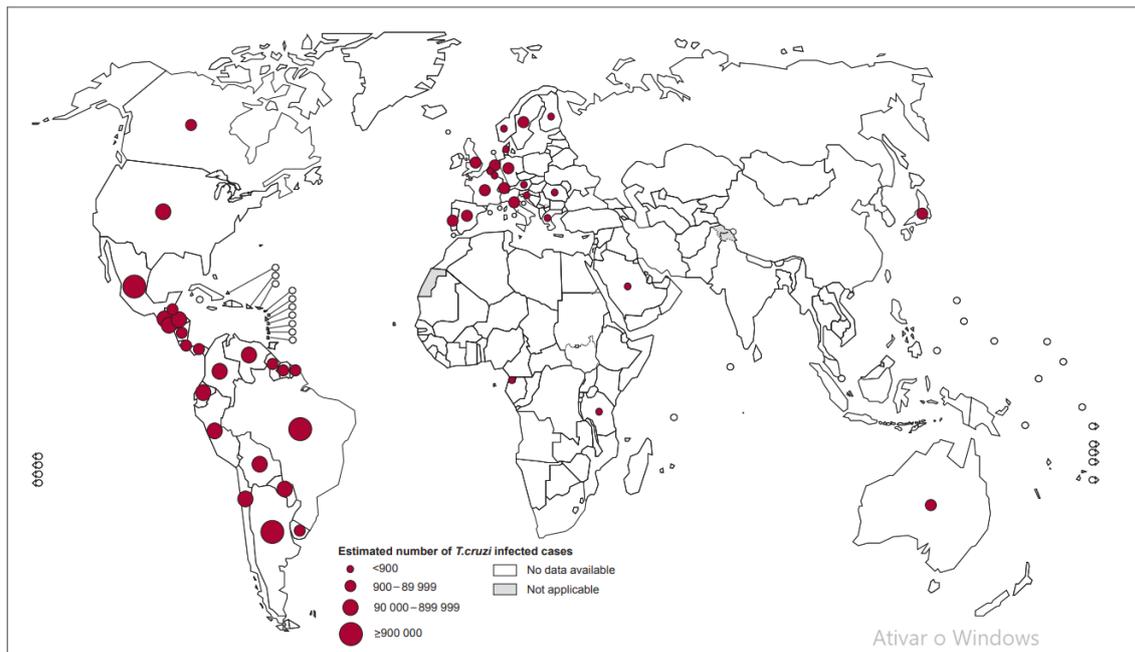
## 1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas (DC) ou Tripanossomíase Americana é uma antropozoonose, uma infecção parasitária, comum no continente americano, causada pelo agente protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. A doença recebeu este nome após ter sido identificada e descrita pelo cientista brasileiro Dr. Carlos Chagas (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Carlos Chagas encontrou os primeiros vestígios da espécie *Trypanosoma* em um sagui, em 1908. Posteriormente, analisou insetos hematófagos, conhecidos popularmente como barbeiros, e encontrou formas epimastigotas nestes insetos. Em abril de 1909, documentou um caso de infecção em uma criança, que apresentava os sintomas clínicos da doença (CHAGAS, 1909; KROPF; SÁ, 2009).

Estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo estejam infectadas com o *T. cruzi*. A DC é encontrada principalmente em áreas endêmicas de 21 países continentais da América Latina, onde é transmitida principalmente quando humanos entram em contato com fezes e/ou urina de insetos vetores infectados. A DC já esteve inteiramente confinada à região das Américas, porém, nas últimas décadas, o padrão epidemiológico da doença passou de uma doença rural para uma doença predominantemente urbana, principalmente devido à mobilidade da população, urbanização e migração. Como consequência, um número crescente de casos foi detectado no Canadá e nos Estados Unidos da América, e em muitos países europeus e alguns africanos, do Mediterrâneo Oriental e do Pacífico Ocidental (Figura 1) (WHO, 2022).

O CDC (Centros de Controle e Prevenção de Doenças) estima que existem mais de 300.000 pessoas infectadas nos Estados Unidos. A maioria dessas pessoas foram infectadas na América Latina, onde a doença de Chagas é encontrada. Embora existam insetos vetores nos Estados Unidos, apenas alguns casos de DC por contato com os insetos foram documentados neste país (CDC, 2022). A principal forma de transmissão nesses locais ocorre Devido ao alto número de pessoas que permanecem sem diagnóstico ou sem tratamento, combinado com as áreas com transmissão ativa remanescente, estima-se que 75 milhões de pessoas estejam em risco de infecção (WHO, 2022).

Figura 1 - Distribuição global de casos de doença de Chagas



Fonte: WHO (2013).

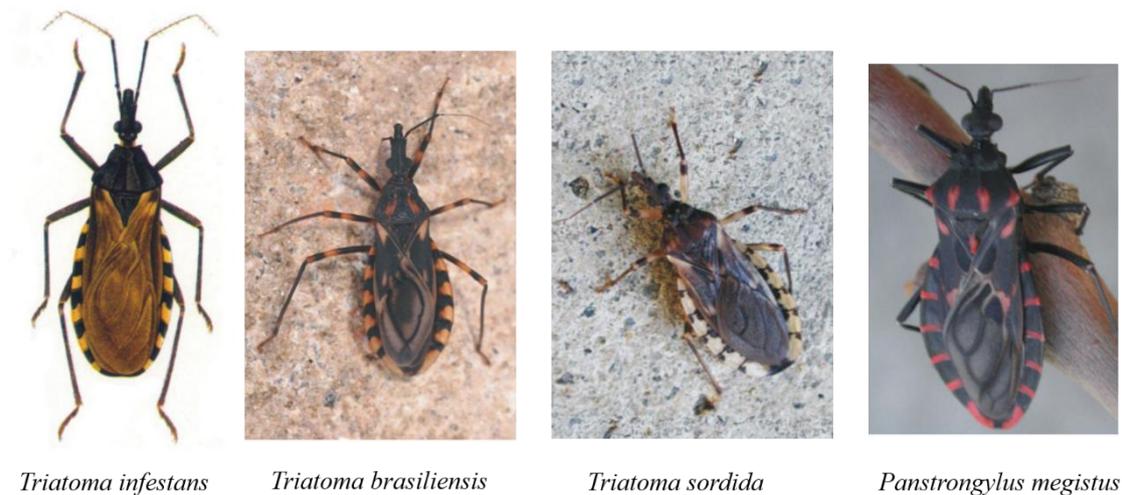
No Brasil, estima-se que 4,6 milhões de pessoas estejam infectadas por *T. cruzi*, com maior prevalência nas regiões Norte e Nordeste, principalmente nos estados do Piauí e do Pará. Este último é responsável pela maior quantidade de casos agudo da DC, principalmente por via oral, através do consumo de produtos naturais como os derivados de açaí, juçara e bacaba (MARTINS-MELO et al., 2014). No estado do Ceará, 962 indivíduos foram infectados entre os anos de 2015 e 2019, dentre esses 430 foram óbitos (COVEP, 2021).

As ações de controle vetorial e transfusional a partir da década de 1970, promoveram alteração do quadro epidemiológico da DC no Brasil. Entretanto, o risco de transmissão vetorial da doença persiste em função da existência de espécies de insetos vetores com elevado potencial de colonização, da presença de reservatórios de *T. cruzi* e da aproximação cada vez mais frequente das populações humanas a esses ambientes. Soma-se a esse quadro a ocorrência de casos e surtos por transmissão oral pela ingestão de alimentos contaminados (caldo de cana, açaí, bacaba, entre outros). Reflexo disso é a elevada carga de mortalidade por DC no país, que representa uma das quatro maiores causas de mortes por doenças infecciosas e parasitárias nos últimos anos (BRASIL, 2019).

A maioria dos indivíduos infectados vive em países latino-americanos e a maior parte da transmissão se deve à exposição ao vetor em habitações precárias em áreas de grande pobreza. A DC é uma doença infecciosa, negligenciada e que representa uma ameaça para áreas consideradas não endêmicas (GARCIA et al., 2015). Dentre as formas de negligência estão o desconhecimento de profissionais e gestores de saúde e de comunidades acerca das condições de risco e identificação de novos casos de DC, levando ao diagnóstico tardio e tratamento inadequado, aumentando a probabilidade de desenvolvimento de formas graves da doença (BRASIL, 2022).

Os mecanismos de transmissão da doença podem ocorrer de forma primária ou secundária. Os mecanismos primários envolvem a transmissão vetorial, transfusão de sangue, transmissão oral, placentária ou congênita e através do canal de parto no momento do nascimento. Mecanismos secundários são considerados menos frequentes, como acidentes de laboratório, manipulação de animais infectados, ingestão de carne crua de animais infectados, transplantes de órgãos de doadores infectados e transmissão sexual (COURA, 2014). Dentre as formas de transmissão, a mais comum é a transmissão vetorial, que ocorre através do contato do homem (hospedeiro definitivo) com o excremento do inseto barbeiro hemíptero hematófago (hospedeiro intermediário), chamado de triatomíneo, pertencentes a subfamília *Triatominae*, da família *Reduviidae*. Os gêneros importantes no contexto médico são *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*. Dentre esses, se destacam as espécies *T. infestans*, *T. brasiliensis*, *T. sordida* e *P. megistus* (SHERLOCK, 2000) (Figura 2).

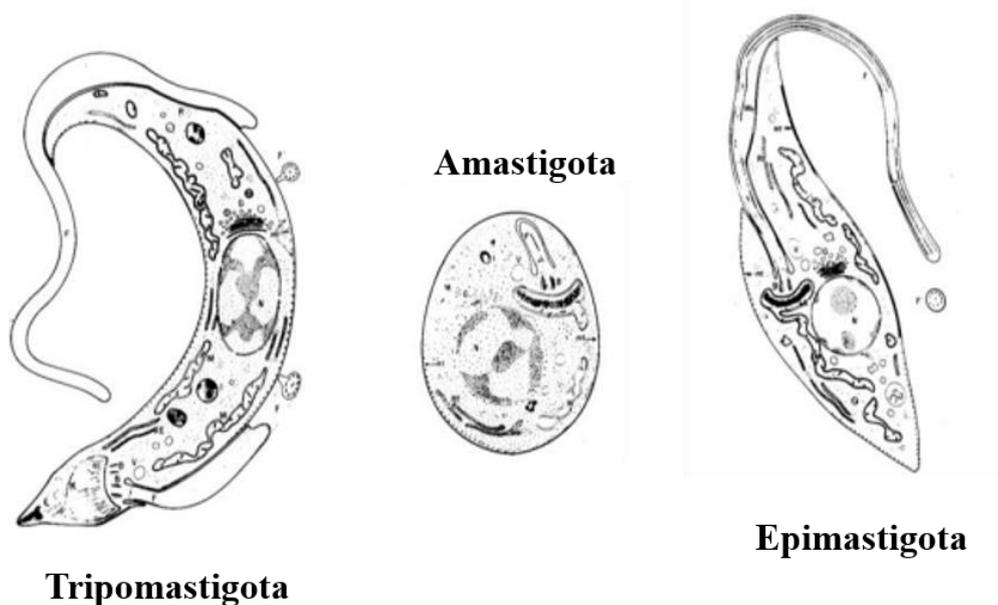
Figura 2 - Espécies de triatomíneos importantes no contexto médico



Fonte: JURBERG et al. (2014).

### 1.2 *Trypanosoma cruzi*: ciclo de vida

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico causador da doença de Chagas. É um flagelado que pertence filo Protozoa, classe Zoomastigophora, da ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae*, caracterizado pela existência de um único flagelo e do cinetoplasto, uma organela contendo DNA e localizada na mitocôndria. Em seu ciclo, o *T. cruzi* apresenta três formas evolutivas (Figura 3), as quais são identificadas morfológicamente pela posição do cinetoplasto com relação ao núcleo da célula e à emergência do flagelo. No tripomastigota (estágio infectante do parasito) o cinetoplasto situa-se na parte posterior do flagelado e o flagelo emerge da chamada bolsa flagelar, de localização próxima ao cinetoplasto; nos epimastigotas (formas de multiplicação do parasito no vetor ou em cultura) o cinetoplasto e a bolsa flagelar estão em posição anterior ao núcleo; por fim, os amastigotas (estágios evolutivos que se multiplicam dentro das células hospedeiras) são organismos arredondados que apresentam inconspícuos flagelos (BRENER, 1997).

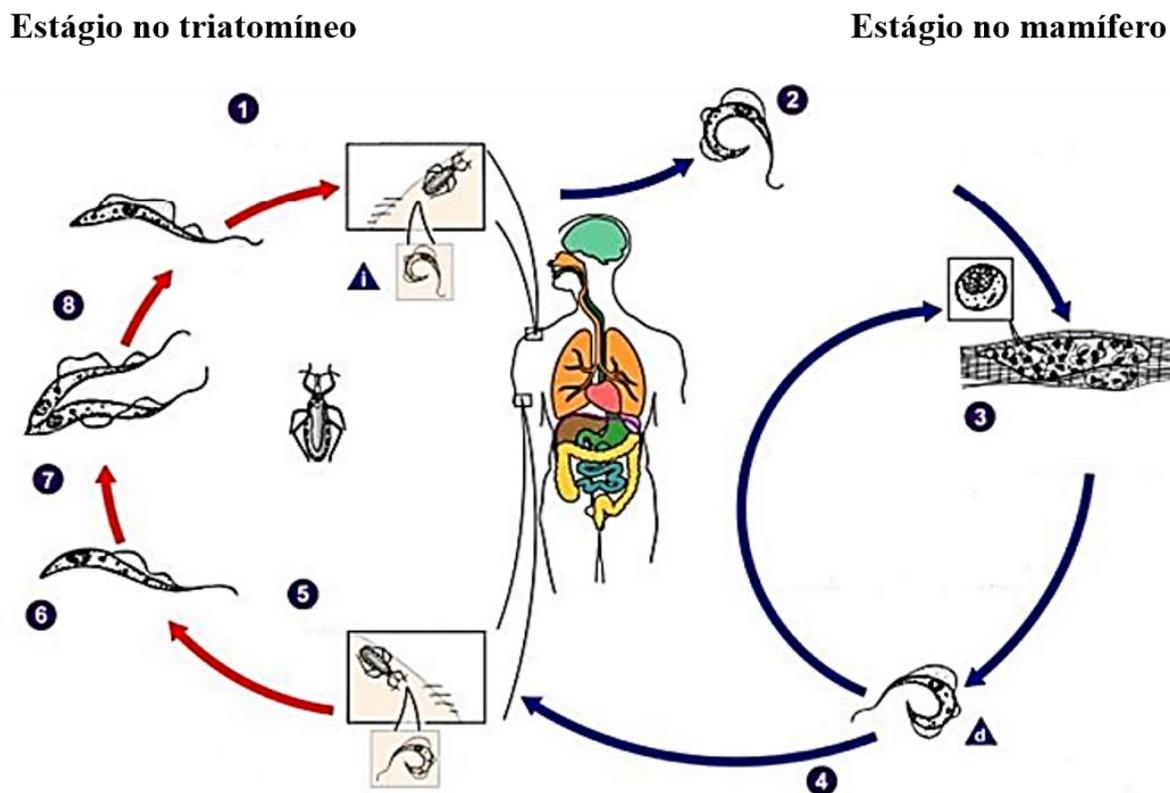
Figura 3 - Formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*

Fonte: DE FREITAS et al. (2019).

A interação entre o parasito e o hospedeiro vertebrado depende da ação de receptores presentes na membrana dos organismos. Na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, o *T. cruzi* é encontrado na forma tripomastigota, que é infectante e pode invadir diferentes tipos celulares (SOUZA, 2002). Tripomastigotas são ubiqüitários e invadem inúmeras células, mas apresenta uma interação peculiar com macrófagos. Epimastigotas fagocitados por macrófagos são destruídos, ao passo que tripomastigotas são interiorizados e cumprem o ciclo evolutivo. No entanto, quando os macrófagos estão ativados, processa-se também a destruição dos parasitos. Dessa forma, macrófagos podem agir como células hospedeiras ou no controle da proliferação do parasito. A interiorização dos tripomastigotas em macrófagos ocorre por fagocitose. A penetração nas demais células ocorre por endocitose, que culmina na formação intracelular de um vacúolo fagocitário, no qual está contido o parasito. Os tripomastigotas transformam-se em amastigotas e somente iniciam sua multiplicação na célula após escaparem do vacúolo fagocitário e passarem ao citosol (BRENER, 1997).

O ciclo de vida do *T. cruzi*, normalmente alterna o parasitismo entre um hospedeiro vertebrado, incluindo o homem e outras espécies de mamíferos, como animais domésticos (cães, gatos, porcos, entre outros) e animais silvestres (roedores, tatu, gambá, macacos); e um hospedeiro invertebrado, que é o inseto vetor hematófago (triatomíneo).

O ciclo do parasito (Figura 4) se inicia por meio do triatomíneo infectado. Durante o repasto sanguíneo, o inseto hematófago deposita suas fezes sobre o hospedeiro, contaminadas com as formas tripomastigotas metacíclicas (formas infectantes) do parasito previamente alojadas em seu intestino posterior. Ao coçar o local da picada, o hospedeiro permite a entrada das formas infectantes, que encontram a corrente sanguínea e buscam células hospedeiras nucleadas como macrófagos, células epiteliais e cardiomiócitos. Depois de se ligar às células hospedeiras, os tripomastigotas são internalizados em um compartimento delimitado por membrana conhecido como vacúolo parasitóforo, do qual eles subsequentemente escapam e se diferenciam em amastigotas, dando início a sua fase replicativa no hospedeiro vertebrado, que se proliferam por divisão binária. Após a replicação, ocorre novamente a diferenciação para tripomastigota, que causam a lise da célula infectada. Com a ruptura da membrana plasmática, os tripomastigotas são liberados na corrente sanguínea e infectam novas células, dando continuação ao ciclo infectante do hospedeiro. Quando o triatomíneo não infectado realiza um repasto sanguíneo em um mamífero infectado, os tripomastigotas sanguíneos atingem o aparelho digestivo do inseto, onde se diferenciam em formas epimastigotas, que se multiplicam na região distal do intestino e após a replicação sofrem o processo de metaciclogênese no intestino posterior, gerando formas tripomastigotas metacíclicas, cumprindo um novo ciclo de infecção no hospedeiro vertebrado ainda não infectado (FERNANDES; ANDREWS, 2012).

Figura 4 - Ciclo evolutivo de *Trypanosoma cruzi*

Legenda: Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi* mostrando as diferentes formas evolutivas do parasito nos hospedeiros vertebrado e invertebrado. Em (1) no repasto sanguíneo o triatomíneo libera as fezes e urina com as formas tripomastigotas metacíclicas, que penetram na lesão ou mucosas como a conjuntiva; (2) Tripomastigotas metacíclicos penetram em diversos tipos de células e transformam-se em amastigotas; (3) Amastigotas multiplicam-se em células de tecidos infectados, e transformam-se em tripomastigotas, ocorre lise da célula parasitada e liberação de tripomastigotas no sangue, os quais podem infectar outras células, transformar-se em amastigotas intracelulares em novos locais de infecção, manifestações clínicas podem resultar desse ciclo infectivo; (4) Amastigotas intracelulares transformam-se em tripomastigotas e são liberados na corrente sanguínea; (5) Repasto sanguíneo (tripomastigotas sanguíneos são adquiridos); (6) Transforma-se em epimastigotas; (7) Ocorre multiplicação das formas epimastigotas no intestino médio do triatomíneo; (8) As formas epimastigotas transformam-se em tripomastigotas metacíclicos, os quais podem ser transmitidos em um novo repasto sanguíneo.

Fonte: adaptada de CDC (2022).

### 1.3 Fisiopatologia da doença de Chagas

A DC apresenta duas fases clínicas distintas: a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* dura cerca de 4-8 semanas, e a fase crônica persiste por toda a vida do hospedeiro (FERNANDES; ANDREWS, 2012). A fase aguda pode

ser assintomática em 90% dos casos, sintomática e, em casos muito raros, fatais. Durante esta fase, um grande número de parasitos estão presentes na corrente sanguínea. Quando ocorrem os sintomas, são febre, mal-estar, astenia, linfonodos aumentados e hepatoesplenomegalia. No entanto, essas manifestações agudas da doença se resolvem espontaneamente em cerca de 90% dos indivíduos infectados (FERNANDES; ANDREWS, 2012; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; RASSI; RASSI; MARINETO, 2010).

Em casos de infecção vetorial, apresentam os sinais de porta de entrada do *T. cruzi*: quando o parasito penetra a pele lesionada, ocasiona erupção cutânea e edema chamado de chagoma de inoculação; quando a pessoa coça a lesão da picada e leva a mãos aos olhos, o parasito penetra a mucosa ocular, causando edema palpebral chamado de sinal de Romaña. Esses sinais aparecem de 4 a 10 dias após a picada e desaparecem espontaneamente em cerca de 1 a 2 meses (FERNANDES; ANDREWS, 2012).

A partir de 2 meses de infecção, a parasitemia tende a cair e a infecção entra numa forma crônica indeterminada ou assintomática. Essa forma apresenta parasitemia baixa, porém com exames parasitológicos e sorológicos positivos e pode permanecer por períodos longos, de 10 a 30 anos após a infecção ou pode evoluir para a forma crônica sintomática ou determinada. É caracterizada por graves complicações cardíacas, digestivas ou cardiodigestivas, que geralmente se desenvolvem de 10 a 30 anos após a infecção inicial. A forma grave de cardiomiopatia da fase crônica da DC leva a insuficiência cardíaca e é a principal causa de morte por insuficiência cardíaca em áreas endêmicas do América latina (FERNANDES; ANDREWS, 2012; GUARNER, 2019).

Como a infecção clínica por *T. cruzi* causa sintomas mínimos ou é assintomática, há um problema de subdiagnóstico, então o paciente dificilmente é diagnosticado e quase nunca é tratado. Ao longo de 1 a 2 meses, a imunidade celular se desenvolve; os sintomas melhoram e a carga parasitária diminui. Na fase crônica, os parasitos permanecem na musculatura do trato gastrointestinal e do miocárdio por anos, desenvolvendo uma resposta imune crônica, que está associada à morte por doença cardíaca de longo prazo em 20 a 30% dos pacientes ou, menos frequentemente, prejudica a motilidade gastrointestinal cronicamente (MILLS, 2020).

O diagnóstico de doença na fase aguda é realizado de forma direta, por visualização microscópica de tripomastigotas no sangue e, ocasionalmente, em outros

fluidos corporais, como líquido cefalorraquidiano. Os parasitos podem ser observados através de um simples exame de sangue fresco ou esfregaço sanguíneo corado com Giemsa. Outros métodos, como de concentração como microhematócrito e os métodos parasitológicos indiretos como PCR, são úteis para o diagnóstico. Como a parasitemia é baixa e intermitente na doença crônica, o acompanhamento parasitológico direto e métodos de diagnóstico baseados em PCR se tornam pouco confiáveis. Portanto, o diagnóstico depende de testes sorológicos através da detecção de anticorpos IgG contra o *T. cruzi* (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

#### **1.4 Tratamento farmacológico da doença de Chagas**

O objetivo do tratamento é erradicar o parasito (tratamento etiológico) e direcionar os sinais e sintomas da doença. Desde o final dos anos 1960 até o início dos anos 1970, dois fármacos nitroheterocíclicos estão disponíveis para o tratamento etiológico da doença de Chagas: um nitrofurano, nifurtimox (Nfx) [3-metil-4(nitrofurfurilidenoamino)tetra-hidro-4H-1,4-tiozina-1,1-dióxido] e um nitroimidazol, benznidazol (BZN) [N-benzil2 nitroimidazol acetamida]. Ambos os fármacos foram associados a alta eficácia terapêutica na fase aguda da infecção, enquanto a eficácia do tratamento etiológico permanece discutível na fase crônica. A eficácia desses compostos nitroheterocíclicos é melhor para as formas extracelulares de *T. cruzi* presentes na fase aguda do que as formas intracelulares que causam a doença crônica (CALDAS; SANTOS; NOVAES, 2019; CASTRO; DEMECCA; BARTEL, 2006).

O tratamento etiológico é fortemente recomendado para todos os casos de infecção aguda, congênita e reativada, para todas as crianças com infecção e para pacientes até 18 anos de idade com doença crônica. O tratamento medicamentoso deve ser oferecido a adultos até 50 anos de idade, sem cardiopatia chagásica avançada. Por outro lado, é contra-indicado durante a gravidez e em pacientes com insuficiência renal ou hepática grave, e não é indicado a pacientes com cardiopatia chagásica avançada ou megaesôfago com comprometimento da deglutição (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). A terapia tripanocida com benznidazol em pacientes em fase crônica, com cardiomiopatia chagásica estabelecida reduziu significativamente a detecção de parasitos séricos, mas não reduziu a deterioração clínica cardíaca ao longo de 5 anos de acompanhamento (MORILLO et al., 2015).

Os efeitos colaterais indesejáveis desses dois fármacos são uma grande desvantagem em seu uso, o que frequentemente forçam a interromper o tratamento (CALDAS; SANTOS; NOVAES, 2019). O nifurtimox foi o primeiro fármaco utilizado e é administrado por via oral por 60-90 dias. A frequência de efeitos adversos com nifurtimox é 43 a 97,5%. Os mais comuns são anorexia, perda de peso, distúrbios neurológicos (irritabilidade, insônia, desorientação, alterações de humor, parestesias, e neuropatia periférica), manifestações digestivas como náuseas e vômitos e, ocasionalmente, febre e erupção cutânea. O tratamento é interrompido em 75% dos casos (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Dessa forma, benznidazol é o fármaco de escolha para o tratamento de DC, pelo seu melhor perfil de tolerabilidade, penetração tecidual e disponibilidade. O BZN foi adotado globalmente como tratamento de primeira linha, incluindo o Brasil, por ser mais tolerável quanto as reações adversas, quando comparadas com o Nifurtimox. Porém, devido às reações adversas e aos longos períodos de tratamento, têm sido associado com baixa taxa de adesão, dificultando a avaliação das respostas ao tratamento. Um estudo associou a ocorrência de reações adversas em pacientes que faziam uso de BZN para tratamento de DC, onde as reações dermatológicas predominaram (prurido, náusea, reação alérgica não especificada, exantema). Outras reações, incluindo anorexia, ansiedade, dispneia, taquicardia, infecção, pré-síncope, visão turva, artralgia e edema foram relatadas (GONTIJO et al., 2020).

O benznidazol tem atividade considerável durante a fase inicial da infecção por *T. cruzi*: a cura sorológica é alcançado em até 100% dos pacientes com doença tratada durante o primeiro ano de vida e em 76% dos pacientes com doença aguda. Na fase crônica, as taxas de cura são muito mais baixas: 60-93% em crianças até 13 anos de idade e 2-40% em adultos com doença crônica tardia. Os efeitos adversos mais comuns envolvem hipersensibilidade, principalmente na forma de erupção cutânea, intolerância digestiva e sintomas como anorexia, astenia, cefaléia e distúrbios do sono. Neuropatia e depressão de medula óssea são considerados raros. O tratamento é descontinuado em 9-30% dos casos (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Quanto ao mecanismo de ação do benznidazol, este se trata de um pró-fármaco, que exerce seus efeitos tripanocidas após ativação enzimática por nitroreduases tripanossômicas tipo I (NTRs), um grupo de enzimas insensíveis ao oxigênio expressas em parasitos protozoários. No processo de bioativação, é gerado um produto,

hidroxilamina, que é convertida em dialdeído glioxal, um produto altamente reativo que forma complexos moleculares a partir de ligações covalentes com DNA, RNA, proteínas e tióis de baixo peso molecular (por exemplo, tripanotona redutase). Isso interfere síntese de novos filamentos de ácidos nucleicos e proteínas e no sistema antioxidante do *T. cruzi* e o parasito fica susceptível a danos oxidativos. É relatado que o BZN induz estresse oxidativo no parasito e pode levar a lesões no DNA (CALDAS; SANTOS; NOVAES, 2019; RAJÃO et al., 2014).

Um problema relacionado ao nifurtimox e ao benznidazol, além das diversas reações adversas atribuídas a terapia medicamentosa, é o desenvolvimento de resistência. Compostos nitroheterocíclicos são pró-fármacos e requerem ativação para mediar a atividade citotóxica. Portanto, fatores que interferem nesse processo pode levar à resistência (WILKINSON et al., 2008). Nifurtimox e benznidazol são pró-fármacos que precisam ser ativados pela mesma enzima, nitroredutase mitocondrial, um fenômeno com potencial para resultar em resistência cruzado (MARTÍN-ESCOLANO et al., 2018).

A falta de políticas públicas, o desinteresse da indústria farmacêutica, a natureza de longo prazo da DC e sua patologia complexa resultaram na falta de medicamentos adequados para tratamentos eficazes (MARTÍN-ESCOLANO et al., 2018). Por isso, é uma prioridade importante o desenvolvimento de agentes antiprotozoários com melhor perfil de segurança e amplamente eficazes.

#### 1.4.1 Novos alvos terapêuticos para o tratamento da doença de Chagas

No início da pesquisa de fármacos antichagásicos, foram testadas substâncias e moléculas que resultassem em mudanças clínicas nos pacientes. Com o passar do tempo, essa pesquisa evoluiu para modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* contra o agente etiológico da doença (DIAS et al., 2009). Nos últimos anos, foram obtidos avanços significativos sobre os aspectos biológicos, genéticos e evolucionários de *T. cruzi*. O sequenciamento genético do genoma deste parasito permitiu a identificação de diversos alvos macro e micromoleculares promissores, como as enzimas importantes para o metabolismo parasitário (SOEIRO; CASTRO, 2011).

#### 1.4.1.1 Cruzaína

Nas últimas duas décadas, uma das estratégias mais relevantes é o desenvolvimento de inibidores de ação farmacológica em alvos exclusivos do parasito, como é o caso do enzima cruzaína, que é uma cisteína-protease abundante em *T. cruzi*, e essencial para o seu metabolismo. Atualmente, a cruzaína continua a ser um dos alvos mais relevantes para o desenho de novos fármacos antichagásicos, uma vez que tem sido validado através de estudos bioquímicos e modelos *in vivo* (DELGADO-MALDONADO et al., 2022).

A cruzaína é uma cisteína protease da família da papaína que é dobrada em dois domínios. Um é predominantemente alfa-helicoidal e o outro consiste em extensas interações de folha beta antiparalelas. O sítio ativo é encontrado na fenda na interface dos dois domínios e dentro desta fenda está, espera-se, a tríade catalítica de resíduos Cys25, His159 e Asn175 e locais de ligação de substrato. A cruzaína é expressa em todos os estágios do ciclo de vida de *T. cruzi*, tendo sua atividade pelo menos 10 vezes maior em epimastigotas, em comparação com as outras formas do parasito. É localizada no lisossomo, no reservossoma pré-lisossomal, na bolsa flagelar e na membrana plasmática de epimastigotas e amastigotas (SAJID et al., 2011).

Com referência às possíveis funções da enzima, além de contribuir para a renovação geral de proteínas como processamento de nutrientes, a cruzaína pode desempenhar vários papéis essenciais adicionais. Há uma possível participação da enzima na penetração do tripomastigota na célula hospedeira, na defesa do parasito contra o sistema imunológico do mamífero e em processos de diferenciação que levam de um estágio ao próximo no ciclo de vida do parasito (CAZZULO; STOKA; TURK, 2001; SAJID et al., 2011). Inibidores desta enzima se mostraram capazes de bloquear a replicação intracelular de amastigotas e sua diferenciação para tripomastigotas (HARTH et al., 1993; MEIRELLES et al., 1992). Além disso, também inibiram a diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos (BONALDO et al., 1991), sugerindo que os processos mais afetados pelos inibidores foram a diferenciação durante as etapas do ciclo de vida do parasito (CAZZULO; STOKA; TURK, 2001).

#### 1.4.1.2 *Tripanotiona reductase*

Os tripanossomatídeos são susceptíveis a compostos que alteram o equilíbrio redox. Um exemplo disso é o Nifurtimox, que induz estresse oxidativo no parasito ao inibir enzimas que participam desse sistema e agem como antioxidantes para a proteção do parasito contra espécies reativas de oxigênio. A tripanotiona reductase de *T. cruzi* é uma enzima chave no metabolismo antioxidante deste parasito (JOCKERS-SCHERUBL; SCHIRMER; KRAUTH-SIEGEL, 1989). Esta enzima desempenha um papel central no sistema redox do *T. cruzi*, servindo como a enzima responsável pela redução da tripanotiona após sua oxidação, contribuindo para o alívio do estresse oxidativo (GONZÁLEZ-GONZÁLEZ et al., 2022).

A Tripanotiona Redutase é uma flavoenzima dependente de NADPH que desempenha um papel importante na sobrevivência dos parasitos porque protege contra o dano oxidativo mediado pelo sistema imunológico após a infecção no hospedeiro mamífero. Regula o estresse oxidativo e está envolvido no metabolismo do parasito pela redução dissulfeto de tripanotiona (T[S]2) na forma de ditiol, dihidrotriplanotiona (T[SH]2). Assim, o T[SH]2 é oxidado pela eliminação de espécies reativa de oxigênio, que é subsequentemente reduzido pela tripanotiona reductase para manter a homeostase redox. Além disso, desempenha uma variedade de funções: homeostase do ascorbato, trocas de tiol/dissulfeto, conjugação de metal e fármacos, síntese de desoxirribonucleotídeos e redução de hidroperóxidos. Portanto, esta enzima é um alvo potencial para o tratamento da DC (BELTRAN-HORTELANO; PEREZ-SILANES; GALIANO, 2017; H.W. RIVAROLA; P.A. PAGLINI-OLIVA, 2002).

O sistema redox dos tripanossomas, baseado nas enzimas tripanotiona e tripanotiona reductase é análogo ao sistema de defesa redox dos mamíferos, baseado nas enzimas glutathione oxidase (GSSG) e glutathione reductase (GR). Semelhanças com a glutathione sugeriram que esses metabólitos podem ter uma função biológica semelhante na eliminação de radicais livres e espécies reativas ao oxigênio, formadas por processos metabólicos ou quando os parasitos são submetidos ao estresse oxidativo pela resposta imune do hospedeiro. Porém, cada enzima é específica para seu substrato cognato, apesar das similaridades estruturais e de mecanismo (H.W. RIVAROLA; P.A. PAGLINI-OLIVA, 2002). Desta forma, é possível inibir a proteção do parasito contra estresse oxidativo e não afetar o equilíbrio redox humano.

## 1.5 Pesquisa de novas moléculas com potencial antichagásico

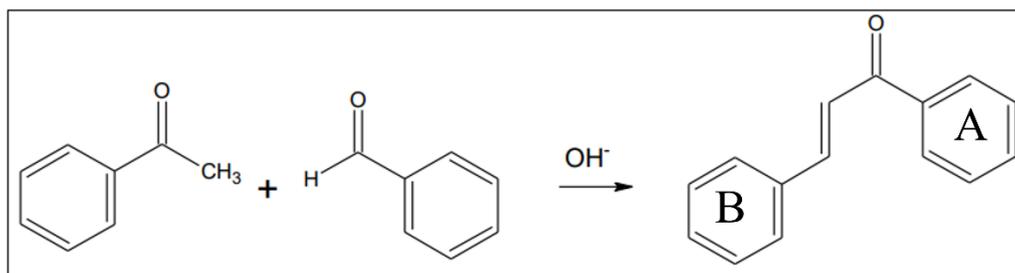
As opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de doenças tropicais negligenciadas são obsoletas, apresentam alta toxicidade, têm eficácia questionável e há relatos de resistência. Portanto, a descoberta de novas moléculas ativas seguras, eficazes e acessíveis é urgentemente necessária (GIAROLLA; FERREIRA, 2015). Os dois medicamentos atualmente disponíveis para seu tratamento – benznidazol e nifurtimox – foram comercializadas há 50 anos. Embora sejam muito eficazes para infecções agudas e recentes e para a prevenção da transmissão materno-fetal, sua eficácia diminui em pessoas com infecção crônica, especialmente aquelas com mais de 18 anos de idade. Na presença de envolvimento visceral, o tratamento parasiticida é de pouco ou nenhum valor. O perfil de segurança de ambos os fármacos está longe do ideal, com eventos adversos frequentes e altas taxas de descontinuação, principalmente em adultos. Até agora, novas substâncias e novas estratégias não demonstraram melhorar os resultados dos nitroimidazóis atuais (PÉREZ-MOLINA et al., 2021). A partir disso, diversos estudos tem sido traçados em busca de novas moléculas com atividade contra *T. cruzi*. Produtos naturais e seus derivados sintéticos são uma fonte de fármacos para diversas áreas terapêuticas.

### 1.5.1 Chalconas

Chalconas são cetonas aromáticas com um núcleo de dois anéis aromáticos ligados por uma cadeia  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada, precursoras dos flavonóides e isoflavonóides, presentes em uma variedade de plantas. Dessa forma, ocorrem naturalmente ou podem ser sintetizadas facilmente por reações de condensação em meio ácido ou básico, como na reação de condensação de Claisen-Schmidt (BOECK et al., 2006; MASTACHI-LOZA et al., 2022). Por isso, tornam-se alvo de pesquisa acadêmica e industrial.

A reação de Claisen-Schmidt (Figura 5) é uma condensação aldólica cruzada que realiza a condensação de cetonas aromáticas com aldeídos aromáticos (como o benzaldeído, cinamaldeído e outros derivados). Essas reações são viáveis na prática em presença de bases, pois sob tais condições as cetonas não se autocondensam consideravelmente (WINTER, 2016).

Figura 5 – Reação de condensação de Claisen-Schmidt



Legenda: A reação de condensação de Claisen-Schmidt acontece em meio básico, produzindo a chalcona (representada à direita). Os anéis aromáticos A e B da chalcona estão representados na imagem.

Fonte: WINTER (2016).

As chalconas possuem um sistema conjugado de carbonila com dois centros eletrofílicos que são comumente usados para adições nucleofílicas. Os compostos de chalcona existem como isômeros trans e cis, sendo os isômeros trans termodinamicamente mais estáveis, devido à ausência de interações estéricas entre o anel A e o grupo carbonila (MASTACHI-LOZA et al., 2022; ZHUANG et al., 2017).

Na natureza, as chalconas contribuem para a pigmentação de flores amarelas a vermelhas e desempenham papéis protetores nas plantas. O grupo funcional cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada é responsável por contribuir para a coloração das chalconas, além de ser considerado responsável pela atividades medicinais e biológicas desta classe (ALBUQUERQUE et al., 2015; GAONKAR; VIGNESH, 2017; RANI et al., 2019), e pela interação com alvos enzimáticos (ZHOU, 2015). Este grupo funcional é um potencial aceptor de Michael. Aceptores de Michael, contendo um eletrófilo, são geralmente biologicamente ativos. Eles estão envolvidos na regulação de muitas vias de sinalização nas células e podem desempenhar um papel importante nas suas atividades biológicas (ZHUANG et al., 2017).

Assim, as chalconas exibem um amplo espectro de atividades biológicas (MATTHEE et al., 2022; RAMMOHAN et al., 2020), como leishmanicida (BOECK et al., 2006), antiinflamatória e contra células cancerígenas (CONSTANTINESCU; LUNGU, 2021; WON et al., 2005), tripanocida e inibitória contra a enzima cruzaina de *T. cruzi* (DE OLIVEIRA et al., 2022), antimicrobiana (OKOLO et al., 2021), antioxidante (MITTAL; VASHISTHA; DAS, 2022), antimalária e imunomodulatória (CHENG et al., 2020; SINHA et al., 2022). Assim, esse grupo de moléculas mostra um

potencial efeito promissor na pesquisa de novos fármacos com atividade antichagásica (MAGALHÃES et al., 2022; MATOS et al., 2022).

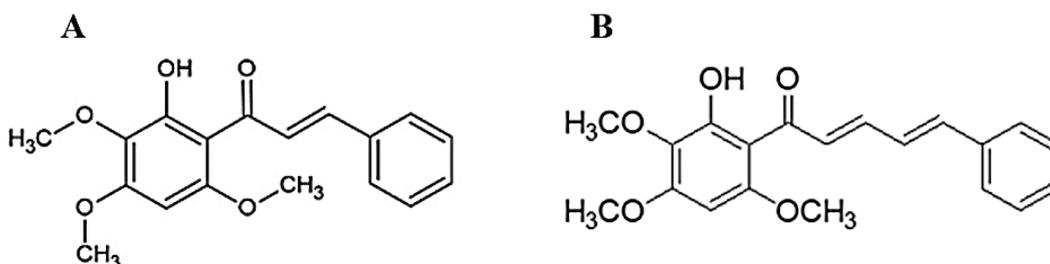
#### 1.5.1.1 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenilchalconas

Tendo em vista as potencialidades das chalconas, um grupo inovador de chalconas foi recentemente sintetizado, utilizando a acetofenona (1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)etan-1-ona) isolada de *Croton anisodontus* (marmeleiro-cravo). Essa planta é um arbusto característico da caatinga brasileira que tem sido estudada quanto às suas potencialidades terapêuticas (SANTIAGO et al., 2020). Essa acetofenona vem sendo estudada em diversas áreas, como na atividade imunomodulatória (CHIARADIA et al., 2008), ansiolítica (DA SILVA et al., 2021), antimicrobiana (OLIVEIRA et al., 2014) e antioxidante (EMAMI et al., 2018; WANG et al., 2018).

A chalcona protótipo desse grupo foi nomeada CPNB ((*E*)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona) (Figura 6A), a partir da condensação da acetofenona de *C. anisodontus* com benzaldeído. Essa molécula, apesar de possuir efeito tripanocida, apresentou citotoxicidade evidente (MAGALHÃES et al., 2022), limitando sua aplicabilidade em modelos experimentais.

Dessa forma, objetivando reduzir a toxicidade e/ou potencializar o efeito tripanocida, foi sintetizada a molécula (2*E*,4*E*)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)-5-fenilpenta-2,4-dien-1-ona (CPNC), em que o benzaldeído foi substituído pelo cinamaldeído. Dessa forma, CPNC apresenta estrutura similar à de CPNB, mas com alongamento na cadeia alifática (Figura 6B).

Figura 6 – Representação estrutural das 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenilchalconas



Legenda: A – ((*E*)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona) (CPNB); B – (2*E*,4*E*)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)-5-fenilpenta-2,4-dien-1-ona (CPNC).

Fonte: Elaborado pela autora.

## 2 JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas (DC) é uma doença tropical inserida no grupo de doenças negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do Ministério da Saúde do Brasil (MS), apresentando elevada prevalência e expressiva carga de morbimortalidade (MARTINS-MELO et al., 2016), com apenas dois medicamentos disponíveis para o tratamento etiológico, benznidazol e nifurtimox, há 50 anos. Ambos não apresentam perfil ideal para uma terapia eficaz e segura ao paciente, causando reações adversas que levam à interrupção do tratamento e falha terapêutica. Sendo assim, é importante a busca por novas opções farmacológicas que sejam seguras e eficazes para o paciente infectado, que promovam uma ação tripanocida com baixa toxicidade para o paciente e que possam substituir e/ou complementar a terapêutica atual.

Nesse contexto, grande atenção tem se dado à identificação de rotas metabólicas específicas de tripanossomatídeos, que possam ser exploradas como alvos terapêuticos seletivos de moléculas bioativas. Dentre eles, destacam-se as enzimas cruzaina e tripanotiona redutase, que exercem funções essenciais para a sobrevivência e diferenciação do parasito durante seu ciclo biológico. Moléculas capazes de interferir nesses mecanismos são candidatas promissoras para o desenvolvimento de fármacos antichagásicos eficazes e seletivos.

Na busca de novas substâncias, as chalconas tem despertado o interesse por seu potencial químico-farmacêutico. Essas moléculas podem ser de origem natural ou sintética e tem demonstrado uma grande diversidade de efeitos biológicos, incluindo atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, citotóxica, antitumoral e quimiopreventiva. Plantas ricas em chalconas têm sido frequentemente usadas na medicina tradicional, e as chalconas tem recebido foco importante nessas pesquisas. Isso se dá por serem moléculas estruturalmente simples e de fácil síntese, o que permite o desenvolvimento de moléculas com diferentes substituintes e características estruturais. Dessa forma, é possível avaliar a relação estrutura-atividade desse grupo de moléculas frente a diferentes atividades biológicas de interesse farmacológico.

Recentemente, uma chalcona (CPNB) derivada da acetofenona isolada de *Croton anisodontus* demonstrou seu efeito tripanocida, reiterando a importância desse grupo para a pesquisa de fármacos antichagásicos. Apesar disso, apresentou toxicidade evidente na

faixa de concentrações testadas, o que impediu sua utilização em experimentos posteriores.

Por conta disso, foi sintetizada a chalcona (2E,4E)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)-5-fenilpenta-2,4-dien-1-ona (CPNC), molécula análoga à CPNB com aumento da cadeia alifática, com o intuito de reduzir a toxicidade e/ou potencializar seu efeito tripanocida. O presente estudo, por sua vez, visou avaliar o efeito dessa molécula sobre as formas de vida de *Trypanosoma cruzi*, investigando a influência do alongamento da cadeia alifática sobre esse efeito, incluindo a sua seletividade sobre o parasito em relação às células hospedeiras e os mecanismos de ação envolvidos.

Os resultados obtidos poderão ser úteis no entendimento da fisiopatologia da DC e na participação de enzimas específicas na sobrevivência do parasito, bem como a relevância dessas rotas enzimáticas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Além disso, os dados contribuirão para a compreensão da potencialidade terapêutica das chalconas e das características químicas mais promissoras para o desenvolvimento de fármacos eficazes e seguros para a DC.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito tripanocida da chalcona (2*E*,4*E*)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)-5-fenilpenta-2,4-dien-1-ona (CPNC) em cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade de CPNC sobre células hospedeiras;
- Investigar o potencial efeito tripanocida nas formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi*;
- Analisar o mecanismo de morte celular induzido por CPNC em *T. cruzi*;
- Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio em *T. cruzi* após tratamento com CPNC;
- Estudar o efeito da chalcona CPNC sobre o potencial transmembrânico mitocondrial de *T. cruzi*;
- Avaliar a interação *in silico* de CPNC sobre as enzimas tripanotiona redutase e cruzaina de *Trypanosoma cruzi*.

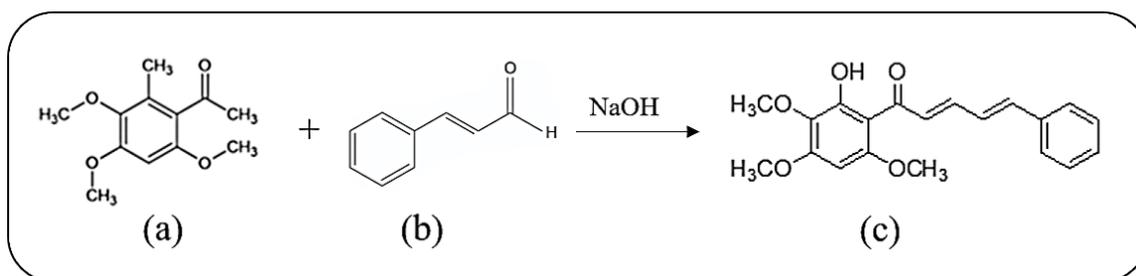
## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Obtenção das moléculas

A molécula em estudo, (2*E*,4*E*)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)-5-fenilpenta-2,4-dien-1-ona (CPNC) foi cedida pelo Laboratório de Síntese Orgânica, da Universidade Estadual do Vale do Acaraú (UVA), coordenado pelo Prof. Dr. Hércio Silva dos Santos. É uma chalcona sintetizada a partir de uma molécula de acetofenona, de nome 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona, extraída e isolada da planta *Croton anisodontus*, uma espécie nativa da caatinga do Nordeste brasileiro, da família Euphorbiaceae (SANTIAGO et al., 2018).

O preparo foi feito conforme descrito por Silva e colaboradores (2020), por uma reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt em meio básico (Figura 7). A 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona (200 mg) foi solubilizada em etanol (8 mL), para 2 mmol de solução, e adicionou-se a solução aquosa de NaOH 50%. Depois de alguns minutos foi adicionado o benzaldeído (0,95 mmol). A reação foi mantida à temperatura ambiente por 2 horas. Após o término da reação foi utilizado HCl 1:1 para precipitação do produto. Em seguida o produto foi filtrado em um funil de Buchner. O produto obtido foi um sólido de massa molar 340 g/mol.

Figura 7 - Reação de condensação de Claisen-Schmidt em meio alcalino para obtenção da (2*E*,4*E*)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)-5-fenilpenta-2,4-dien-1-ona.



Legenda: (a) 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona; (b) cinamaldeído; (c) (2*E*,4*E*)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)-5-fenilpenta-2,4-dien-1-ona

Fonte: Elaborada pela autora.

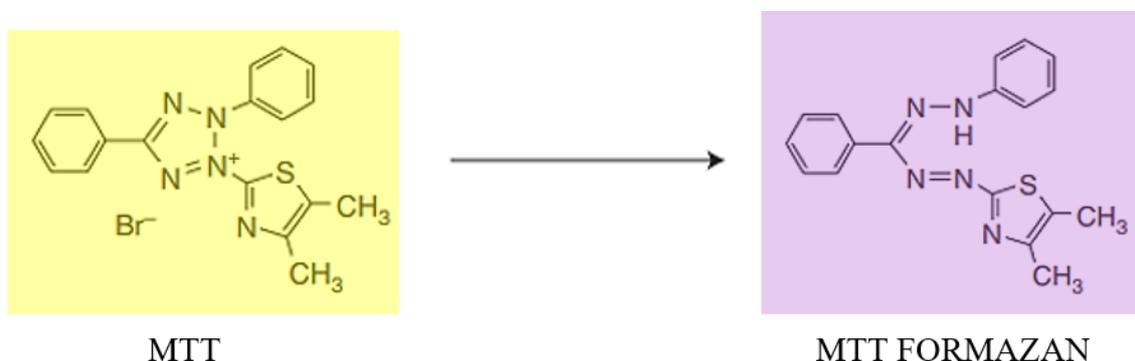
O benznidazol (BZN) foi o fármaco de referência utilizado para comparação. Foi doado pelo Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE).

Com as substâncias puras (CPNC e BZN) foram preparadas soluções estoque na concentração de 0,2 M, diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) estéril. Para os ensaios, foram preparadas soluções de trabalho diluições em solução tampão fosfato estéril (PBS, constituído de NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM; pH 7,4), de modo que a concentração de DMSO nos grupos experimentais não excedesse 0,5%.

#### 4.2 Avaliação da citotoxicidade em células hospedeiras

A citotoxicidade da molécula foi avaliada por meio do ensaio de redução do MTT [Brometo de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio], em células LLC-MK2. O MTT é um sal de tetrazólio de cor amarela que, quando em contato com células viáveis, é endocitado e clivado por enzimas desidrogenases do citoplasma e das mitocôndrias da célula, produzindo um sal de cor azul violácea, insolúvel em meio aquoso, chamado formazan (Figura 8). Em seguida, os cristais de formazan são excitados e podem ser solubilizados por agentes surfactantes como o dodecilsulfato de sódio (SDS) e o dimetilsulfóxido (DMSO). Células não-viáveis perdem a capacidade metabólica de internalizar e clivar o MTT. A concentração de formazan produzido é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis e é medida pela leitura da absorbância a 570 nm (MOSMANN, 1983).

Figura 8 - Reação de redução do sal de MTT a sal de formazan.



Fonte: Adaptado de KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, (2018).

A linhagem celular LLC-MK2 é derivada de uma suspensão de células preparada a partir do tecido renal excisado de seis macacos rhesus adultos, da espécie *Macaca mulatta*. As células exibem morfologia epitelial, com propriedades aderentes. Foram compradas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, pH 7,4), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), penicilina (200 UI/mL) e estreptomicina (130 mg/L). Foram cultivadas sob condições ideais, em garrafas plásticas pequenas estéreis de 75 cm<sup>2</sup> em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. O crescimento das células foi acompanhado diariamente através da observação por microscópio invertido. Ao atingir a confluência, as células foram deslocadas e congeladas em SBF (95%) e DMSO (5%) ou usadas nos experimentos.

Para os experimentos de citotoxicidade, as células foram deslocadas da garrafa com 1 mL de tripsina/EDTA (0,25 %) por 10 minutos a 37 °C, transferidas para tubo cônico e centrifugadas (4000 RPM por 5 minutos). O sobrenadante foi descartado, o pellet foi ressuspenso em 1mL de meio DMEM e a concentração de células foi determinada por meio da contagem em câmara de Neubauer, utilizando o corante vital Azul de Trypan.

A densidade celular foi ajustada para 1×10<sup>5</sup> células/mL. As células foram transferidas para placas de 96 poços (200 µL/poço) e incubadas *overnight* a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, os poços foram tratados com CPNC ou BZN (15,62 a 1000µM). Como grupo controle, foram usados poços com células não tratadas; como veículo, poços contendo DMSO (0,5 % em meio de cultura).

Após 24 horas de tratamento, o meio foi retirado e as células foram lavadas com 150µL de PBS. Em seguida, foram adicionados 100 µL de MTT (0,25 mg/mL) e as placas foram incubadas por 03 horas. Em seguida, as placas foram centrifugadas (4000 RPM por 5 minutos), o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100µL de DMSO. A placa foi agitada por 30 minutos para completa solubilização dos cristais de formazan e, por fim, foi realizada a leitura espectrofotométrica em leitora de microplacas, a 570nm. Para o cálculo da viabilidade celular, a média das absorbâncias do grupo controle foi considerada como sendo 100 % de viabilidade e os demais grupos receberam valor proporcional calculados como na equação abaixo.

$$\%Viabilidade\ celular = \frac{(At - Ab)}{(Ac - Ab)} \times 100$$

Em que:

At é a absorvância do poço teste;

Ac é a média das absorvâncias dos poços controle, que não foram submetidos ao tratamento;

Ab é a média das absorvâncias dos poços do branco.

Os valores percentuais de viabilidade celular foram analisados por regressão não-linear para estimativa da concentração capaz de causar 50% de citotoxicidade (CC<sub>50</sub>) sobre as células LLC-MK2.

### 4.3 Efeito antiparasitário sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

As formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y foram doadas pelo Laboratório de Bioquímica de Parasitos da Universidade de São Paulo (USP) e cultivadas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*, com NaCl 4 g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 11,6 g/L; KCl 0,4 g/L; glicose 2,2 g/L; triptose 5 g/L; infusão de fígado 5 g/L; hemina 25 mg/L; pH 7,4) suplementado com 10% de SBF, penicilina (200 UI/mL) e estreptomicina (50 mg/L). As culturas foram mantidas a 28 ± 1 °C em estufa BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) em garrafas estéreis (ARAÚJO-JORGE; CASTRO, 2000b).

A partir da cultura de epimastigotas, na fase exponencial de crescimento, foram feitas diluições e levadas a câmara de Neubauer para serem contadas e determinada a densidade dessa cultura por meio da seguinte equação:

$$\text{Densidade parasitária} = \text{parasitas contados} \times 5 \times 10^4 \times fd$$

Em que *fd* representa o fator de diluição e a densidade celular é dada em parasitos/mL.

Depois disso, foram diluídos em meio LIT para uma concentração de 1 x 10<sup>6</sup> parasitos/mL e transferidos para uma placa 96 poços contendo as concentrações (31,2 a 1000 µM) de CPNC em triplicata. Como fármaco de referência, foi utilizado o benznidazol nas mesmas concentrações (31,2 a 1000 µM). Adicionalmente, os parasitos foram tratados apenas com DMSO 0,5%, utilizado como veículo para diluir as substâncias. Além disso, como controle negativo, foram plaqueados parasitos somente com o meio de cultura (LIT), sem tratamento, sendo considerados como 100% de viabilidade.

As placas foram incubadas em estufa BOD. Após 24, 48 e 72 horas de incubação, alíquotas foram colhidas para contagem de parasitos viáveis. Foram considerados parasitos viáveis aqueles com morfologia típica e mobilidade (LIMA et al., 2016; MENEZES et al., 2012). A concentração de parasitos foi calculada e a viabilidade celular foi calculada conforme descrito abaixo:

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{C}{CT} \times 100$$

Em que:

*C* corresponde a densidade de parasitos viáveis (parasitos/mL);

*CT* é a média da densidade de parasitos viáveis do grupo controle.

Os percentuais de viabilidade foram usados para estimar a concentração necessária para inibir o crescimento de 50% da população de epimastigotas (IC<sub>50</sub>) por regressão não-linear.

#### **4.4 Efeito antiparasitário sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi***

As formas tripomastigotas foram obtidas a partir do sobrenadante de células hospedeiras infectadas (LIMA et al., 2016). Para isso, células LLC-MK2 foram cultivadas na concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL em garrafas estéreis com 25 cm<sup>2</sup> de área de cultivo em meio DMEM suplementado com 10% de SBF. Após dois dias de cultivo, o meio de cultura foi substituído por DMEM suplementado com 2 % de SBF e foram acrescidos  $2 \times 10^6$  tripomastigotas/mL. A partir do 3º dia desse procedimento, o meio de cultura era trocado por um meio DMEM 2% SBF novo e o sobrenadante era coletado e centrifugado (2800 RPM por 7 minutos) para obtenção dos tripomastigotas. A densidade celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer, e os tripomastigotas obtidos foram utilizados para os ensaios de avaliação do efeito tripanocida e para obtenção de formas amastigotas.

Para avaliação do efeito tripanocida, as formas tripomastigotas colhidas foram concentradas numa densidade de  $1 \times 10^6$  parasitos/mL, como foi feito com as formas epimastigotas, e transferidas para uma placa de 96 poços contendo diferentes concentrações da substância em estudo (31,2 a 1000 µM). O benznidazol foi utilizado nas

mesmas concentrações (31,2 a 1000 $\mu$ M), para fins de comparação, como fármaco de referência. Parasitos do grupo controle negativo foram mantidos sem tratamento, sendo considerados como 100% de viabilidade, e, como grupo veículo, foram utilizados parasitos tratados com DMSO 0,5%.

Após 24 horas de incubação em estufa de CO<sub>2</sub>, alíquotas dos poços foram transferidas para a câmara de Neubauer para contagem. Os valores obtidos foram anotados para a determinar a quantidade de parasitos viáveis em cada poço, da mesma forma como realizado para epimastigotas. A partir dos valores percentuais, a concentração capaz de matar 50% da população de tripomastigotas (LC<sub>50</sub>) foi estimada por regressão não-linear.

Além disso, foi calculado o índice de seletividade (IS) da CPNC sobre formas tripomastigotas em relação às células hospedeiras (LLC-MK2), usando a fórmula:

$$\text{Índice de Seletividade (IS)} = \frac{CC_{50}}{LC_{50}}$$

Em que:

CC<sub>50</sub> é a concentração que reduz em 50% a viabilidade de células LLC-MK2, causando toxicidade nestas;

LC<sub>50</sub> é a concentração que causa 50% de morte em tripomastigotas.

#### 4.5 Efeito antiamastigota

Para avaliação do efeito antiamastigota, células LLC-MK2 (1 x 10<sup>5</sup> células/mL) foram cultivadas em placas de 24 poços sobre lamínulas estéreis de 13 mm de diâmetro, com meio DMEM com 10% SBF e incubadas em estufa de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas, o meio de cultura foi trocado por DMEM com 2 % SBF, as células foram infectadas com tripomastigotas (2 x 10<sup>6</sup> células/mL) e incubadas por 48 horas em estufa de CO<sub>2</sub>. Depois disso, foram tratadas com CPNC (concentrações). As concentrações foram escolhidas a partir dos resultados de citotoxicidade e do efeito tripanocida.

Após 24 horas de tratamento, as lamínulas foram retiradas dos poços, lavadas com PBS e fixadas com solução de Bouin por 5 minutos. A seguir, foram lavadas com PBS e

desidratadas com metanol por 2 minutos. Logo depois, foram coradas com uma solução de corante Giemsa (5% v/v em água destilada) durante 30 minutos. Finalmente, as lamínulas foram lavadas com PBS para remoção do excesso de corante, secadas e coladas em lâmina utilizando entelan (ARAÚJO-JORGE, T; DE CASTRO, 2010).

O efeito anti-amastigota se deu por contagem em microscópio óptico. Em cada lamínula, foram contadas 300 células, para determinação do número de células infectadas e células não infectadas. Das células infectadas, foram contados os amastigotas no interior dessas células. Os resultados foram expressos como percentual de células infectadas e quantidade de amastigotas em 100 células (MONTEIRO et al., 2020).

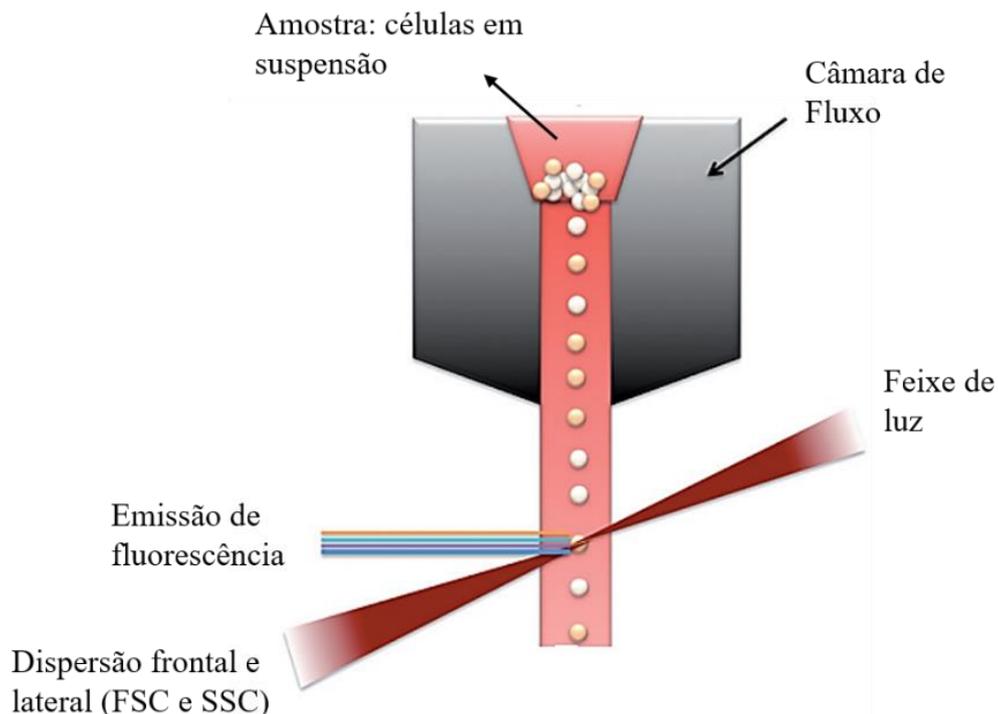
#### **4.6 Ensaios de Citometria de Fluxo**

A citometria de fluxo foi utilizada para avaliar os mecanismos envolvidos no efeito antiparasitário da molécula em estudo. Essa técnica tem a capacidade de analisar as características de uma célula ou de qualquer outra partícula em uma corrente de fluido quando passam através de uma fonte de luz. O princípio desta técnica é baseado na dispersão da luz e na emissão de fluorescência que ocorre quando um feixe de luz atinge as células que se movem em um fluxo de fluido direcionado (MANOHAR; SHAH; NAIR, 2021).

Nesse processo, as células são injetadas no centro de um feixe de solução salina em fluxo contínuo (Figura 9). Dessa forma, elas são forçadas a passar individualmente pela câmara de leitura, atravessando um ou mais feixes de luz de comprimento de onda específicos. A luz é desviada em torno das bordas da célula depois que esta é atingida pelo laser e, então, ocorrem dois tipos de dispersão de luz: dispersão frontal, chamada de FSC (Forward Scatter), que é usada como medida do tamanho da célula; e dispersão lateral, chamada de Side Scatter (SSC), que ocorre devido à presença de estruturas intracelulares, como organelas, núcleo e grânulos, permitindo a avaliação da complexidade ou granulosidade celular. Além disso, quando células ou outras partículas são marcadas com moléculas fluorescentes, o feixe luminoso provoca a excitação dessas moléculas e consequente emissão de luz em um comprimento de onda diferente. Assim, é possível analisar as células quanto à presença de marcadores citoplasmáticos e de membrana específicos, além de permitir a detecção de mediadores intracelulares

relacionados ao metabolismo normal e/ou patológico (ADAN et al., 2017; WLOODKOWIC; SKOMMER; DARZYNKIEWICZ, 2012).

Figura 9 - Princípio da citometria de fluxo.



Fonte: Adaptado de ADAN et al., (2017).

#### 4.6.1 Avaliação do perfil de morte e integridade celular

Para avaliar o perfil de morte causado por CPNC, foram utilizadas as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e os marcadores 7-Amino-Actinomicina D (7-AAD) e Anexina V conjugada com Ficoeritrina (AxPE). O 7-AAD é uma molécula capaz de se ligar à molécula de DNA, porém não consegue ultrapassar membranas celulares íntegras. Dessa forma, uma alta marcação para 7-AAD sinaliza que houve perda da integridade de membrana, característica indicativa de fenômenos necróticos. A anexina V é uma proteína que, na presença de íons cálcio, tem alta afinidade pela fosfatidilserina, molécula externalizada pela célula no processo de apoptose. Assim, ao se ligar a fosfatidilserina, marca células em indução de mecanismo de morte celular programada.

Para avaliar esse efeito, as formas epimastigotas foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de  $1 \times 10^6$  parasitos/mL e tratados com CPNC (250 e 500  $\mu$ M).

Após 24 horas de incubação em estufa BOD, o conteúdo dos poços foi transferido para tubos plásticos, centrifugados (2800 rpm/7 minutos a 2 °C), lavados com tampão de ligação (HEPES 10 mM; NaCl 140 mM; CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM; pH 7,4) e marcados com kit comercial (100 µL de tampão de ligação + 5 µL de 7-AAD + 5 µL de AxV PE) (Annexin V/PE Apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences) conforme as instruções do fabricante. Passados 15 minutos de incubação no escuro, foram adicionados 400 µL do tampão de ligação em cada tubo e estes foram levados para leitura no equipamento FACSCalibur com os detectores FL<sub>2</sub> (fluorescência laranja, de 564-606 nm) e FL<sub>3</sub> (fluorescência vermelha, de 675-710 nm) para AxV PE e 7-AAD, respectivamente (BD Biosciences, New Jersey, USA).

Em cada grupo, foram adquiridos pelo menos 10.000 eventos, que foram classificados em quatro categorias: células viáveis (baixa marcação para ambos os fluorocromos), células em necrose (alta marcação para 7-AAD), células em processo de apoptose (alta marcação para AxV PE) e células duplamente marcadas (não é possível determinar o mecanismo de morte envolvido).

#### 4.6.2 Análise de espécies reativas de oxigênio (EROs) citoplasmáticas

Para avaliar o acúmulo na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), foi utilizado o marcador diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA). Este marcador, por apresentar características lipofílicas, consegue atravessar a membrana plasmática das células e, uma vez internalizada nas células, é desacetilada por esterases citoplasmáticas em uma molécula incapaz de atravessar a membrana para o espaço extracelular (DCFH). DCFH reage com EROs citoplasmáticas produzindo DCF, que emite fluorescência verde, de forma que a intensidade de fluorescência emitida pela célula é diretamente proporcional à concentração citoplasmática de EROs.

1 x 10<sup>6</sup> epimastigotas/mL foram plaqueados em placas de 24 poços e tratados com CPNC (250 e 500 µM). Após 03 horas de tratamento, foram marcados com DCFH<sub>2</sub>-DA (concentração final de 20 µM em DMSO) e as placas incubadas no escuro na estufa BOD. Depois de 24 horas de tratamento, o conteúdo dos poços foi transferido para tubos de citometria, centrifugadas (2800 rpm/ 7 minutos), lavados 2x, ressuspensos em 500 µL de PBS e levados para leitura no equipamento FACSCalibur.

Na leitura, foram adquiridos 10.000 eventos. O acúmulo de EROS no citoplasma dos parasitos foi dado através da intensidade de fluorescência relativa (IFR), calculado a partir da média geométrica da intensidade de fluorescência dos grupos testes comparados ao grupo controle, conforme a equação (KESSLER et al., 2013):

$$IFR = \frac{mTESTE}{mCONTROLE}$$

Em que:

mTESTE é a Média geométrica do grupo tratado;

mCONTROLE é a Média geométrica do grupo controle.

#### 4.6.3 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )

O potencial transmembrânico mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) consiste na diferença de carga entre as membranas interna e externa da mitocôndria e foi avaliado utilizando o corante fluorescente rodamina 123 (Rho123). A Rho123 se acumula no espaço mitocondrial por afinidade com os íons hidrogênio, emitindo fluorescência vermelha. Quando ocorre alteração no potencial transmembrânico mitocondrial, há uma redução desses íons, o que reduz o acúmulo de Rho123 na mitocôndria e aumenta este marcador no citoplasma da célula, emitindo fluorescência verde.

Para isso, formas epimastigotas, na concentração de  $1 \times 10^6$  parasitos/mL, foram plaqueados em placas de 24 poços, com concentrações seriadas de CPNC (250 e 500  $\mu$ M) e incubados por 24 horas. Após isso, o conteúdo dos poços foi transferido para tubos de citometria, que foram centrifugados (2800 rpm/ 7 minutos) e lavados com PBS por 2 vezes. Em seguida, as células foram marcadas com Rho123 (concentração final de 10  $\mu$ g/mL), e incubadas durante 30 minutos no escuro. Depois foram novamente lavadas com PBS mais 2 vezes, ressuspensas em 500  $\mu$ L de PBS e levadas para leitura no equipamento FACSCalibur, utilizando o detector FL<sub>2</sub>. Na leitura, foram adquiridos pelo menos 10.000 eventos e os dados foram expressos na forma de IFR.

## 4.7 Estudos *in silico*

Os ensaios de docking molecular foram realizados para avaliar as interações teóricas entre a chalcona em estudo (CPNC) e as seguintes enzimas, importantes para o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*: cruzaina (TcCr) e tripanotona redutase (TcTR). Como molécula para comparação, foi utilizado o benznidazol. Os ensaios *in silico* foram realizados pelo Grupo de Química Teórica e Eletroquímica (GQTE), da Universidade Estadual do Ceará, coordenado pelo professor Dr. Emmanuel Silva Marinho.

As estruturas 2D de CPNC, do benznidazol e dos inibidores co-cristalizados foram desenhadas utilizando o *software* MarvinSkech<sup>®</sup> (<https://chemaxon.com/products/marvin>) (CSIZMADIA, 1999). As estruturas tridimensionais foram otimizadas utilizando o *software* Gaussian 09 através do método de Teoria do Funcional da Densidade (*Density Functional Theory*, DFT) (MARINHO et al., 2021).

As estruturas cristalográficas dos alvos proteicos foram obtidas do repositório Protein Data Bank – RCSB (<https://www.rcsb.org/>), complexadas aos seus respectivos inibidores. A TcTR está complexada com o inibidor mostarda de quinacrina (QUM) (PDB: 1GXF) (SARAVANAMUTHU et al., 2004). E a TcCr em complexo com o inibidor tetrafluorofenoximetil cetona (KB2) (PDB: 3IUT) (BRAK et al., 2010).

O preparo dos alvos foi realizado utilizando os softwares AutoDock Tools<sup>®</sup> (<http://autodock.scripps.edu/resources/adt>) e UCSF Chimera<sup>®</sup> (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>), onde foram removidos moléculas de água, ligantes interferentes e foram adicionados hidrogênios polares (PETTERSEN et al., 2004).

### 4.7.1 Docking Molecular

As simulações de docking molecular foram realizadas pelo programa AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2010). Nestes ensaios, o grid box foi centralizado conforme descrito por MARINHO e colaboradores (2021). As coordenadas para a TcTR foram 126 Å x 90 Å x 126 Å, com dimensões (x, y, z) = (44,196; 3,102; -0,054). E para a TcCr, as coordenadas foram 116 Å x 106 Å x 126 Å, com dimensões (x, y, z) = (6,612; -0,436; 8,052). Para cada simulação com cada alvo, cinquenta simulações independentes foram

realizadas, obtendo vinte poses cada, utilizando como 64 o critério de *exhaustiveness* (MARINHO et al., 2020).

A energia de afinidade ( $\Delta G$ ) foi utilizada como parâmetro para avaliação da estabilidade do complexo ligante-proteína, sendo idealmente selecionadas aquelas simulações cujos valores de  $\Delta G$  fossem menores que  $-6,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$  (SHITYAKOV; FÖRSTER, 2014).

A validação estatística das simulações foi feita por meio da medida do RMSD (*Root Mean Square Deviation*), utilizando como critério de aceitabilidade, valores de  $\text{RMSD} < 2,0 \text{ \AA}$  (KADELA-TOMANEK et al., 2021). Além disso, o modelo de simulação foi validado pelo redocking, onde os inibidores co-cristalizados (KB2 e QUM) no registro PDB foram submetidos à simulação de docking. Para critérios de comparação, também foram realizadas as simulações com o benznizadol.

Os tipos de interação ligante-proteína foram avaliados, e as interações de hidrogênio foram classificadas de acordo com as distâncias entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos, sendo classificadas como fortes (entre  $2,50 \text{ \AA}$  e  $3,10 \text{ \AA}$ ), intermediárias (entre  $3,10 \text{ \AA}$  e  $3,55 \text{ \AA}$ ) e fracas ( $>3,55 \text{ \AA}$ ) (IMBERTY et al., 1991). Estas análises foram realizadas com os softwares BIOVIA Discovery Visualizer<sup>®</sup> (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>) (VISUALIZER D.S., 2005) e UCSF Chimera<sup>®</sup> (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) (PETTERSEN et al., 2004).

#### 4.8 Análise Estatística

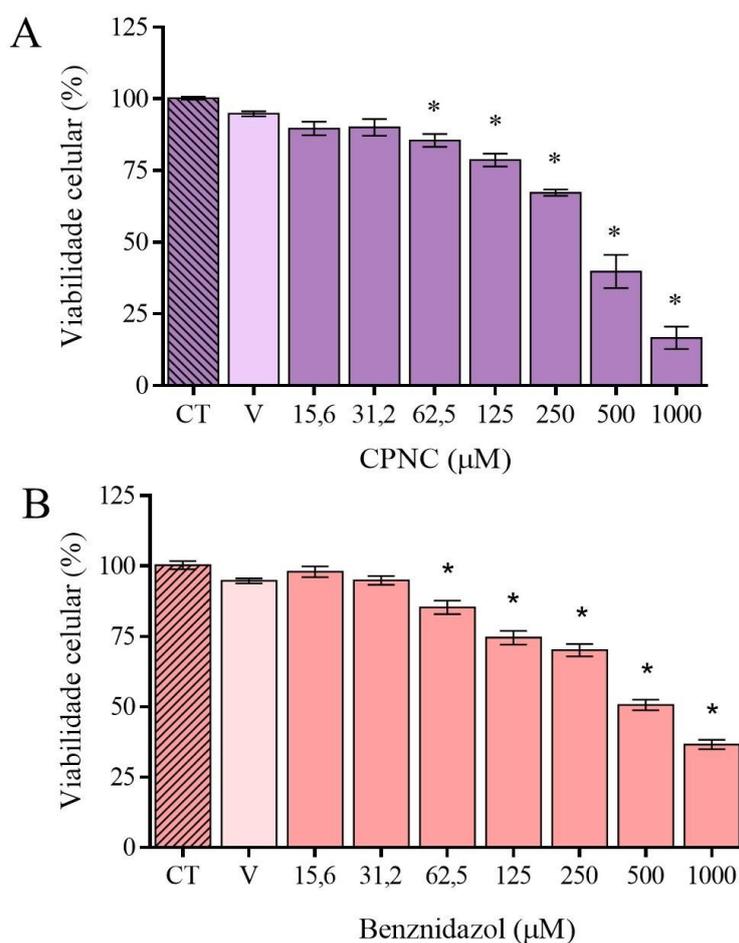
Os experimentos foram realizados em triplicada, com  $n=3$ . Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade, para aplicação de testes estatísticos paramétricos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), com análise estatística feita por *one-way* ANOVA, com pós-teste de Dunnet e, como critério de significância,  $p < 0,05$ . As análises foram feitas utilizando os softwares Microsoft Office<sup>®</sup> Excel 2019 e GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 6.0.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Citotoxicidade em células hospedeiras

As células hospedeiras utilizadas foram as da linhagem LLC-MK2. Estas foram submetidas ao teste de citotoxicidade, por meio do ensaio de redução do sal MTT, para avaliar o efeito citotóxico da chalcona. Os resultados deste experimento estão descritos na Figura 10.

Figura 10 - Citotoxicidade em células hospedeiras (LLC-MK2).



Legenda – Resultado após 24 horas de tratamento com CPNC (A) e BZN (B). CT: controle; V: veículo (DMSO 0,5%). \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborada pela autora.

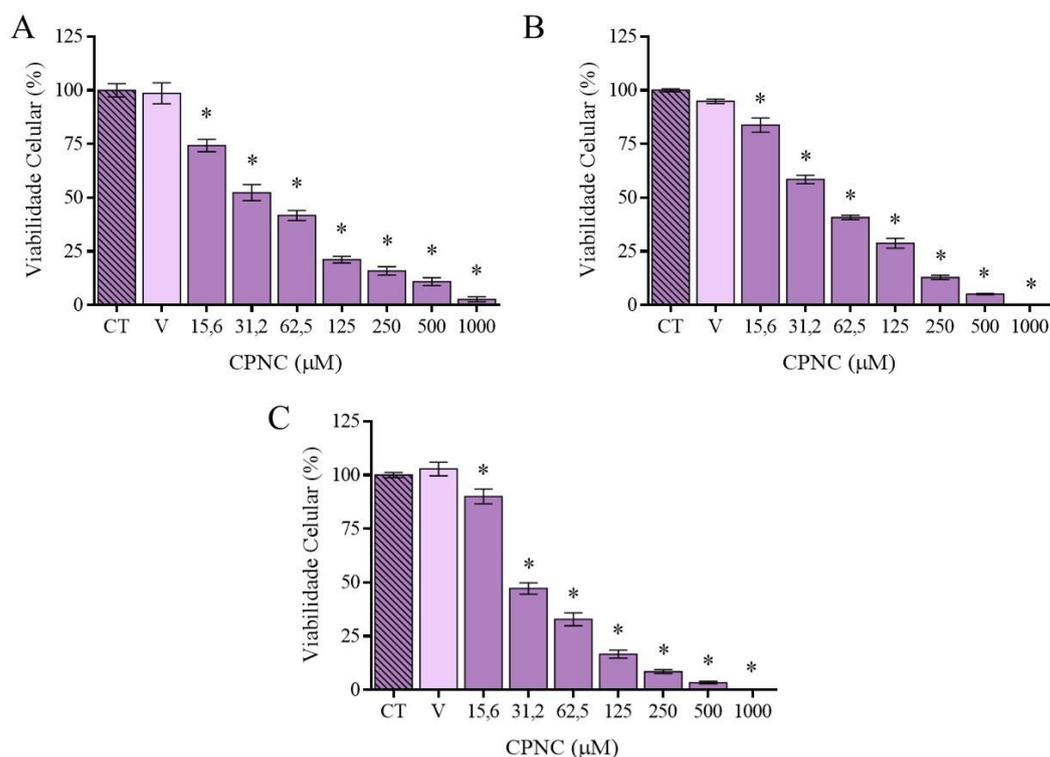
De acordo com os valores mostrados, a molécula apresentou citotoxicidade significativa nas concentrações de 62,5 a 1000  $\mu\text{M}$  em comparação ao grupo controle, apresentando valor de  $\text{CC}_{50} = 355,5 \pm 45,9 \mu\text{M}$ . O benznidazol, testado para fins de comparação, também causou efeito citotóxico nas mesmas concentrações, com valor estimado de  $\text{CC}_{50} = 537,80 \pm 57,80 \mu\text{M}$  (Tabela 1).

## 5.2 Efeito antiparasitário sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

As formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram utilizadas para avaliar o efeito antiproliferativo de CPNC sobre *T. cruzi*. O efeito foi avaliado por meio da determinação do percentual de parasitos viáveis após 24, 48 e 72 horas de tratamento.

Foi observado que CPNC causou efeito inibitório em todas as concentrações (Figura 11) testadas, nos três tempos, com  $\text{IC}_{50}/24\text{h} = 39,9 \pm 4,2 \mu\text{M}$ ;  $\text{IC}_{50}/48\text{h} = 48,5 \pm 3,7 \mu\text{M}$ ;  $\text{IC}_{50}/72\text{h} = 37,8 \pm 3,5 \mu\text{M}$  (Tabela 1).

Figura 11 - Efeito antiparasitário da chalcona CPNC sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

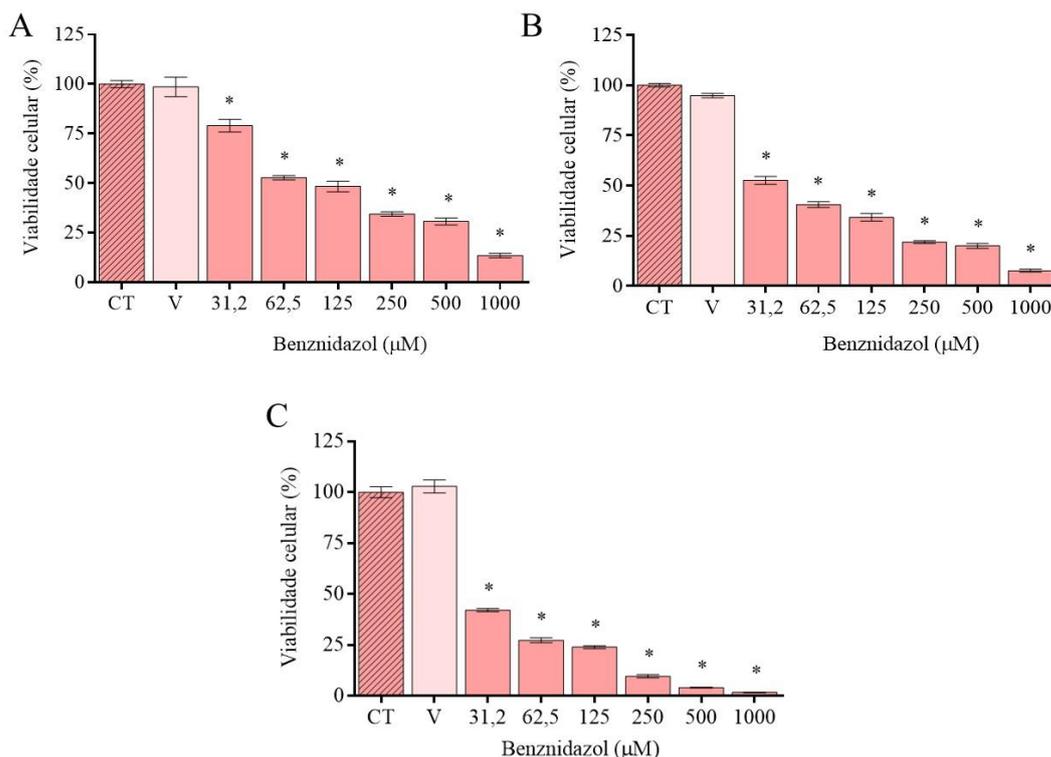


Legenda – Resultado gerado após tratamento de 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C). CT: controle; V: veículo (DMSO 0,5%). \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborada pela autora.

O efeito antiparasitário também foi avaliado para BZN, para fins de comparação com o fármaco referência para tratamento da doença de Chagas. Conforme apresentado na Figura 12, BZN também apresentou efeito nos três tempos testados, com  $IC_{50}/24h = 112,5 \pm 16,0 \mu M$ ;  $IC_{50}/48h = 37,2 \pm 5,6 \mu M$ ;  $IC_{50}/72h = 22,1 \pm 2,9 \mu M$  (Tabela 1).

Figura 12 - Efeito antiparasitário do benznidazol sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.



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

Fonte: Elaborada pela autora.

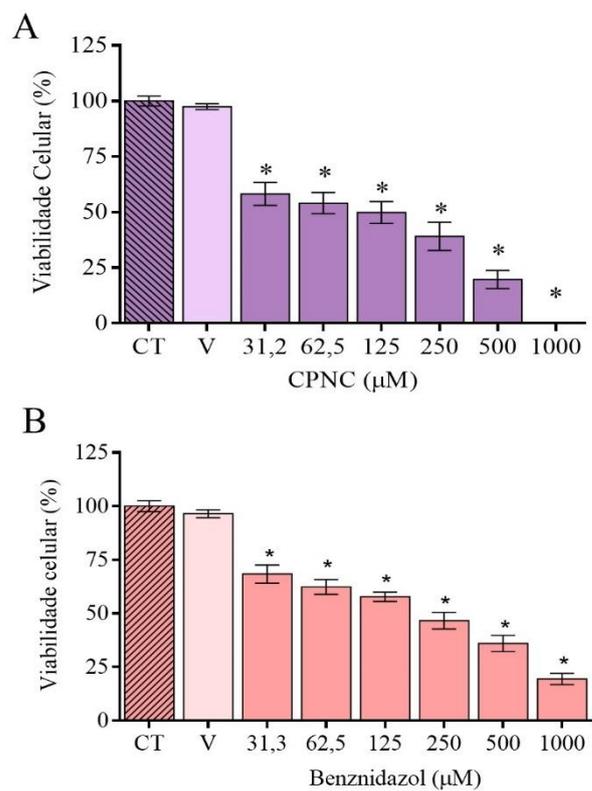
### 5.3 Efeito antiparasitário sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

A atividade tripanocida da CPNC foi avaliada por meio da contagem dos parasitos tratados com diferentes concentrações por 24 horas. Além disso, foi comparada ao benznidazol, utilizado como fármaco referência para o tratamento.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 13A, todas as concentrações testadas diminuíram a viabilidade dos parasitos (31,2 a 1000 µM), apresentando  $LC_{50} = 48,3 \pm 13,4 \mu M$ . O efeito foi superior ao encontrado para BZN (Figura 13B), que

apresentou  $LC_{50} = 161,4 \pm 31,7 \mu\text{M}$ . A partir desses valores e de  $CC_{50}$ , foi calculado o IS (Tabela 1), onde o de CPNC foi 2,21x maior que o de BZN, sendo 7,36 e 3,33, respectivamente.

Figura 13 - Efeito tripanocida sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.



Legenda – Resultado após 24 horas de tratamento com CPNC (A) e BZN (B). CT: controle; V: veículo (DMSO 0,5%). \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 1 - Valores estimados de CC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> e LC<sub>50</sub>, em µM, de cada substância em estudo.

	CC <sub>50</sub> (LLC-MK2)	IC <sub>50</sub> (Epimastigotas)			LC <sub>50</sub> (Tripomastigotas)	Índice de Seletividade (IS)
		24 horas	48 horas	72 horas		
CPNC	355,5 ± 45,9	39,9 ± 4,2	48,5 ± 3,7	37,8 ± 3,5	48,3 ± 13,4	7,36
BZN	537,8 ± 57,8	112,5 ± 16,0	37,2 ± 5,6	22,1 ± 2,9	161,4 ± 31,7	3,33

Legenda – CC<sub>50</sub>: Concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade de células hospedeiras (LLC-MK2); IC<sub>50</sub>: Concentração capaz de inibir em 50% a proliferação de formas epimastigotas; LC<sub>50</sub>: Concentração capaz de reduzir em 50% a quantidade das formas tripomastigotas viáveis.

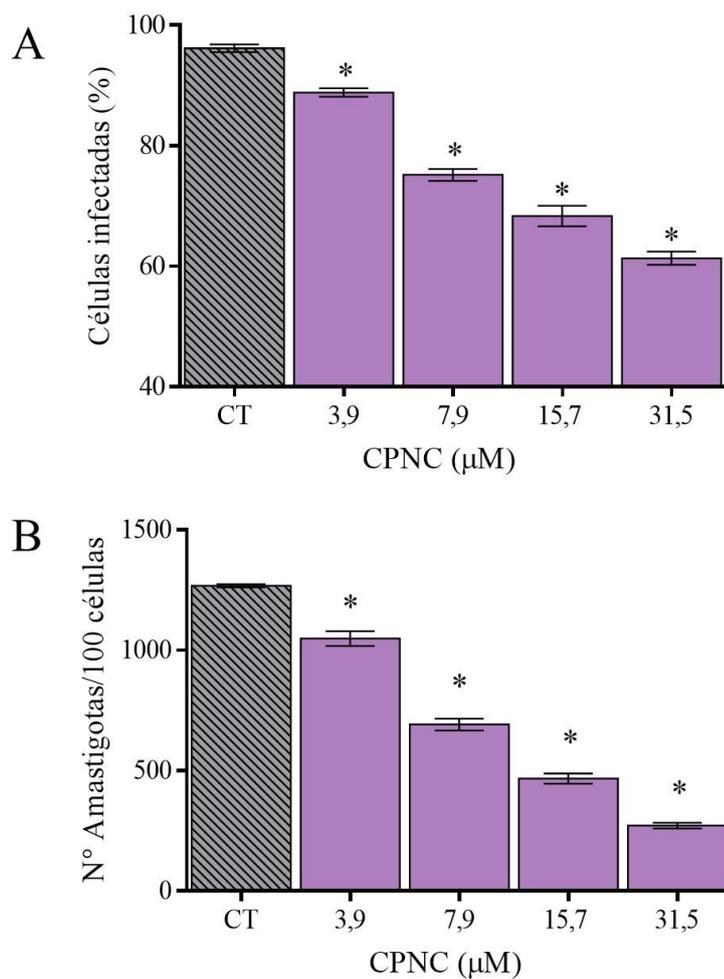
Fonte: Elaborada pela autora.

#### 5.4 Efeito antiamastigota

O efeito antiamastigota foi avaliado por contagem de células hospedeiras LLC-MK2 infectadas com formas infectantes de *Trypanosoma cruzi*. Para esse ensaio, foram selecionadas as concentrações de CPNC que não apresentaram toxicidade nas células hospedeiras. Nesse experimento, foram contadas a quantidade de células infectadas e a quantidade de amastigotas no interior das células. Esses resultados estão apresentados na Figura 14.

Todas as concentrações testadas (3,9 a 31,5 µM) foram capazes de reduzir o percentual de células infectadas. Além disso, houve uma redução significativa no número de amastigotas intracelulares (Figura 14B).

Figura 14 - Efeito da chalcona CPNC sobre foram amastigotas e células hospedeiras infectadas.



Legenda – (A) número de células infectadas após 24 de tratamento com CPNC. (B) número de amastigotas no interior das células infectadas, após 24 horas de tratamento. CT: controle; V: veículo (DMSO 0,5%). \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborada pela autora.

### 5.5 Ensaios de Citometria de Fluxo

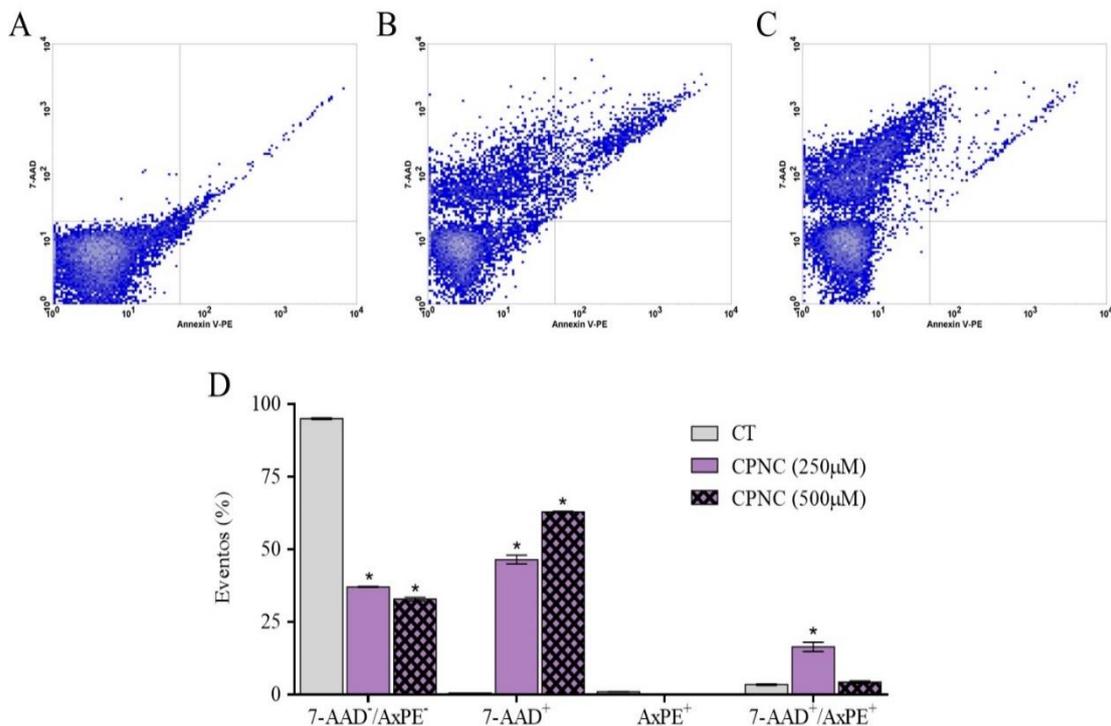
Os ensaios de citometria de fluxo foram utilizados para observar o comportamento das formas epimastigotas de *T. cruzi* em tratamento com a chalcona, quanto ao perfil de morte celular, indução da formação de EROs e alteração no potencial transmembrânico mitocondrial.

### 5.5.1 Perfil de morte e integridade celular

O perfil de morte foi observado por meio do uso de dois marcadores, 7-AAD e AxPE, e os resultados estão apresentados na Figura 15. As concentrações de tratamento utilizadas foram de 250 e 500  $\mu\text{M}$ . A organização das marcações é de 7-AAD<sup>-</sup>/AxPE<sup>-</sup>, para células não marcadas ou com baixo nível de marcação, ou seja, células viáveis; 7-AAD<sup>+</sup>/AxPE<sup>-</sup> para células marcadas apenas com 7-AAD, células em processo de necrose; 7-AAD<sup>-</sup>/AxPE<sup>+</sup> para células marcadas apenas com anexina V-PE, indicando células em processo de apoptose; e por fim, 7-AAD<sup>+</sup>/AxPE<sup>+</sup> para dupla marcação, ou seja, células marcadas ambos os fluorocromos.

A Figura 15A representa a marcação do controle, sem tratamento com a molécula em estudo. Nessa imagem é possível visualizar um baixo nível de marcação e que as células estão concentradas no canto inferior esquerdo, indicando células não necróticas e não apoptóticas. Na Figura 15B ocorre o contrário, pois há um grande número de células marcadas com 7-AAD, na concentração de 250  $\mu\text{M}$ . Quando a concentração da chalcona aumentou para 500  $\mu\text{M}$  (Figura 15C), também houve aumento da fluorescência de 7-AAD, apontando uma indução de morte celular por necrose. Em ambas as concentrações houve baixa marcação de anexina V-PE, indicando que as células marcadas não estavam em processo de morte celular por apoptose.

Figura 15 - Perfil de morte celular induzido pela chalcona em estudo sobre as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, avaliado por citometria de fluxo.



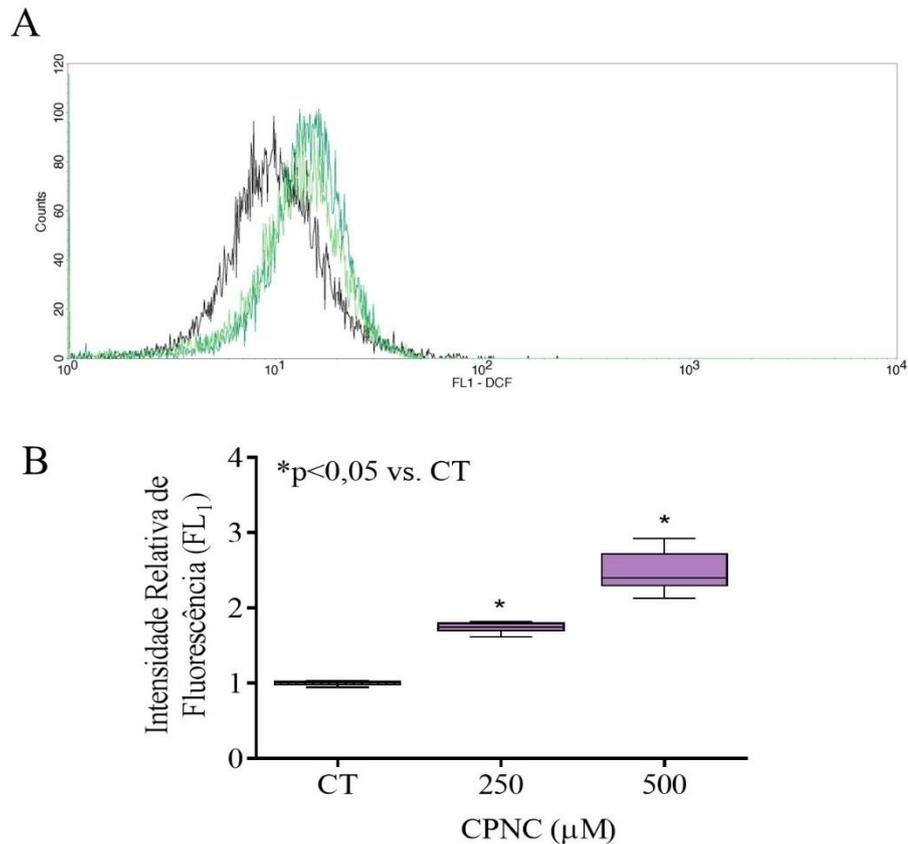
Legenda: Nos gráficos de dot-plot em A (grupo controle, sem tratamento), B (grupo teste, com tratamento com 250 μM de CPNC) e C (grupo teste, com tratamento com 500 μM de CPNC), têm-se o comportamento das populações mediante tratamento com CPNC. Na figura D, tem-se os resultados apresentados como média ± EPM, com \*p<0,05 em relação ao grupo controle (CT).

### 5.5.2 Espécies reativas de oxigênio (EROs) citoplasmáticas

O aumento da produção de EROs foi mensurado por meio da marcação com o DCFH-DA e sua fluorescência é exposta em um histograma. O resultado pode ser notado pelo aumento da intensidade da fluorescência e pelo desvio à direita do histograma (Figura 16).

O histograma gerado pelo tratamento com a chalcona pode ser visualizado na Figura 16A. Com a concentração de 250 μM houve um aumento significativo das EROs, pois é visível que houve um desvio à direita do gráfico. Esse resultado é ainda mais notável com o tratamento de 500 μM, indicando um aumento de EROs com o aumento da concentração do tratamento.

Figura 16 - Intensidade de fluorescência relativa de formas epimastigotas tratadas com a chalcona CPNC marcadas com DCFH2-DA por citometria de fluxo.



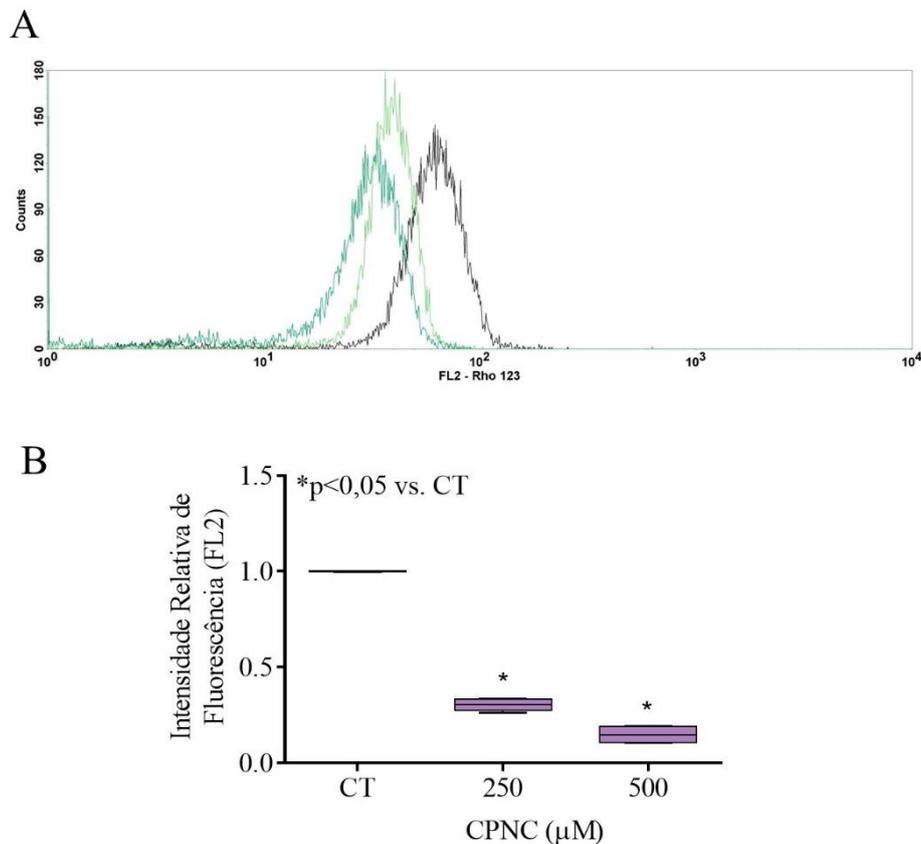
Legenda: CT – controle. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Elaborada pela autora.

### 5.5.3 Potencial transmembrânico mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )

O último ensaio de citometria de fluxo foi realizado para avaliar o efeito do tratamento sobre o potencial transmembrânico mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Esse resultado é dado pelo desvio à esquerda visualizado no gráfico de histograma gerado, apontando uma redução no  $\Delta\Psi_m$ . Resultado este causado pelo tratamento com a chalcona (Figura 17), nas concentrações de 250 e 500  $\mu\text{M}$ . Nas duas concentrações houve diminuição no potencial transmembrânico da mitocôndria do parasito. A Figura 17B mostra também uma redução na intensidade da fluorescência, apontando que houve redução.

Figura 17 - Intensidade de fluorescência relativa de formas epimastigotas tratadas com a chalcona CPNC marcadas com Rho123 por citometria de fluxo.



Legenda: CT – controle. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Elaborada pela autora.

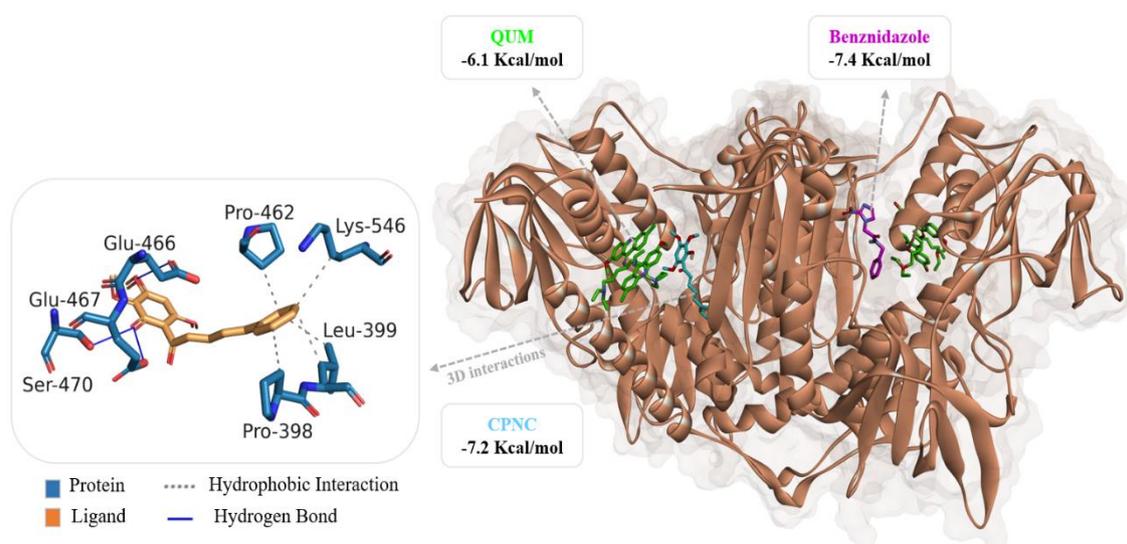
## 5.6 Docking molecular

### 5.6.1 Tripanotiona redutase (TcTR)

As interações entre a molécula de CPNC, BZN e o inibidor QUM com a enzima TcTR estão dispostas na Figura 18, assim as energias de afinidade e os valores de RMSD estão apresentadas na Tabela 2. As interações atenderam o critério de aceitabilidade, com  $\text{RMSD} < 2,0 \text{ \AA}$ .

Na Figura 18, é possível visualizar que CPNC interagiu no mesmo sítio que QUM, com energia de afinidade maior do que a observada para o inibidor cocrystalizado. BZN interagiu com outra subunidade da enzima, assim como a molécula de QUM.

Figura 18 - Complexo e mapas de interação dos ligantes com a enzima TcTR.



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 2 - Energia de afinidade e valores de RMSD dos complexos formados pelos ligantes e a enzima tripanotona redutase obtidos por docking molecular.

Ligantes	Tripanotiona Redutase (TcTR)	
	Energia de afinidade (Kcal/mol)	RMSD (Å)
CPNC	-7,2	1,684
BZN	-7,4	1,362
QUM	-6.1	0,825

Legenda – QUM: mostarda de quinacrina; RMSD (*Root Mean Square Deviation*).

Fonte: Elaborado pela autora.

Quanto aos tipos de interações, como mostra na Tabela 3, CPNC formou interações hidrofóbicas entre seu anel B e os resíduos de aminoácidos PRO398A, LEU399A, PRO462A e LYS546B da enzima. Formou ligações de hidrogênio entre o grupo 2-hidroxi do anel A com os resíduos GLU467A e SER470A. E ocorreram ligações de hidrogênio entre a porção 4-metoxi do anel A de CPNC e o resíduo GLU466A da enzima.

BZN formou interações hidrofóbicas com o resíduo ILE200B, ligação de hidrogênio com o resíduo THR335B e uma interação do tipo  $\pi$ -stacking com o resíduo PHE199B.

O inibidor QUM formou interações hidrofóbicas nos resíduos TYR111A e ILE339A, ligação de hidrogênio com o resíduo TYR111A e uma ligação halogênica com o resíduo SER110A.

Tabela 3 - Interações entre os ligantes com a enzima tripanotona redutase.

<b>Ligantes</b>	<b>Resíduos de Aminoácido</b>	<b>Interação</b>	<b>Distância (Å)</b>
CPNC	PRO398A	Interação Hidrofóbica	3,90
	PRO462A	Interação Hidrofóbica	3,53
	LEU399A	Interação Hidrofóbica	3,61
	LEU399A	Interação Hidrofóbica	3,83
	LYS546B	Interação Hidrofóbica	3,83
	GLU466A	Ligação de Hidrogênio	3,60
	GLU467A	Ligação de Hidrogênio	2,34
	SER470A	Ligação de Hidrogênio	2,25
	ILE200B	Interação Hidrofóbica	3,60
	THR335B	Ligação de Hidrogênio	2,95
BZN	THR335B	Ligação de Hidrogênio	2,76
	PHE199B	$\pi$ -Stacking	5,00
	TYR111A	Interação Hidrofóbica	2,63
QUM*	ILE339A	Interação Hidrofóbica	3,52
	TYR111A	Ligação de Hidrogênio	3,20
	SER110A	Ligação Halogênica	3,63
	SER110A	Ligação Halogênica	3,12

Legenda - \*QUM: mostarda quinacrina.

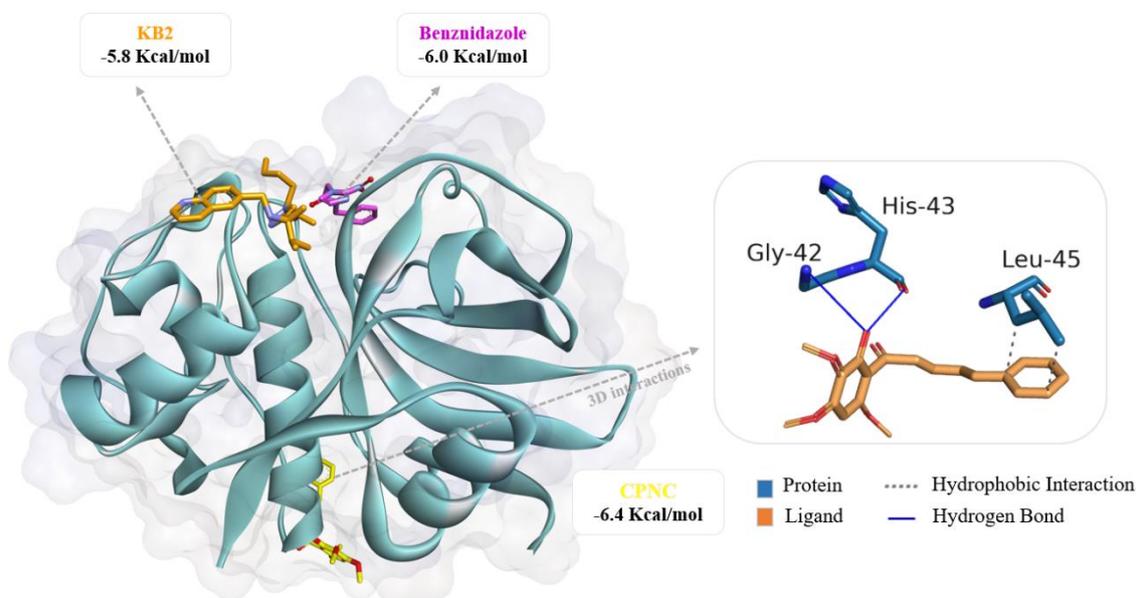
Fonte: Elaborado pela autora.

### 5.6.2 Cruzaína (TcCr)

As simulações de interações com a enzima cruzaína, apresentadas no complexo da Figura 19 mostram que a molécula de CPNC interagiu em um sítio diferente do inibidor KB2, diferente do BZN, que interagiu na mesma subunidade do inibidor KB2.

A Tabela 4 mostra que as interações estavam dentro do critério de aceitabilidade, com  $RMSD < 2,0 \text{ \AA}$ . Além disso, mostra as energias de afinidade, em que as interações da enzima com CPNC e BZN apresentaram energia de afinidade maiores que a do inibidor KB2.

Figura 19 - Complexo e mapas de interação dos ligantes com a enzima cruzaína (TcCr).



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 4 - Energia de afinidade e valores de RMSD dos complexos formados pelos ligantes e a enzima cruzaina obtidos por docking molecular.

<b>Ligantes</b>	<b>Cruzaína (TcCr)</b>	
	<b>Energia de afinidade (Kcal/mol)</b>	<b>RMSD (Å)</b>
CPNC	-6,4	1,934
BZN	-6,0	1,590
KB2*	-5,8	1,858

Legenda – \*KB2: inibidor tetrafluorofenoximetil cetona; RMSD (*Root Mean Square Deviation*).

Fonte: Elaborado pela autora.

As interações ocorridas entre os ligantes e a enzima TcCr estão listadas na Tabela 5, que mostra que CPNC realizou interações hidrofóbicas entre o anel B e o resíduo LEU45A; e ligações de hidrogênio entre a porção 2-hidroxi no anel A de CPNC e os resíduos GLY42A e HIS43A. O BZN formou interações hidrofóbicas com os resíduos de aminoácidos TRP184A e TRP188A, ligação de hidrogênio com o resíduo GLN21A e uma interação do tipo  $\pi$ -stacking com resíduo TRP184A. A molécula inibidora KB2 formou interações hidrofóbicas com o resíduo LEU67A e gerou ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos GLN19A, CYS25A e GLY66A.

Tabela 5 - Interações entre os ligantes com a enzima cruzaina.

<b>Ligantes</b>	<b>Resíduos de Aminoácido</b>	<b>Interação</b>	<b>Distância (Å)</b>
CPNC	LEU45A	Interação Hidrofóbica	3,82
	LEU45A	Interação Hidrofóbica	3,63
	GLY42A	Ligação de Hidrogênio	3,57
	HIS43A	Ligação de Hidrogênio	2,04
BZN	TRP184A	Interação Hidrofóbica	3,52
	TRP184A	Interação Hidrofóbica	3,78
	TRP184A	Interação Hidrofóbica	3,67
	TRP188A	Interação Hidrofóbica	3,99
	GLN21A	Ligação de Hidrogênio	3,54

	TRP184A	$\pi$ -Stacking	4,54
	LEU67A	Interação Hidrofóbica	3,88
	LEU67A	Interação Hidrofóbica	3,59
KB2*	GLN19A	Ligação de Hidrogênio	2,28
	CYS25A	Ligação de Hidrogênio	2,18
	GLY66A	Ligação de Hidrogênio	1,87
	GLY66A	Ligação de Hidrogênio	2,27

Legenda - \*KB2: inibidor tetrafluorofenoximetil cetona.

Fonte: Elaborado pela autora.

## 6 DISCUSSÃO

A infecção provocada por *T. cruzi* causa a doença de Chagas, uma doença negligenciada, para a qual o benznidazol e nifurtimox são os únicos fármacos para o tratamento disponíveis no mercado. Embora sejam mais eficazes na fase aguda da infecção, a eficácia diminui na fase crônica. Além disso, o perfil de segurança de ambos os fármacos está longe do ideal, apresentando eventos adversos frequentes e altas taxas de descontinuação do tratamento, principalmente em adultos (MÜLLER KRATZ et al., 2018; PÉREZ-MOLINA et al., 2021). Dessa forma, é urgente a necessidade de identificar substâncias eficazes e seguras para o tratamento.

Nesse sentido, substâncias de origem natural tem sido avaliadas como candidatas a agentes antichagásicos e tripanocidas, como terpenos (DE MENEZES *et al.*, 2019), flavonoides (MARINHO *et al.*, 2021) e outros compostos fenólicos, como é o caso das chalconas. As chalconas são compostos que podem ser de origem natural, semissintéticas ou sintéticas (FERREIRA et al., 2018). As chalconas sintéticas têm sido exploradas devido à flexibilidade na sua obtenção. Um grande número de rotas sintéticas foi relatado para a síntese de chalconas, sendo a mais comum a condensação de Claisen-Schmidt em meio básico (NARENDER et al., 2011).

Essas substâncias apresentam diversas atividades biológicas já estudadas, e isso se deve principalmente às possíveis substituições nos seus anéis aromáticos (SILVA et al., 2020). Adicionalmente, alterações na cadeia alifática podem ser estratégias para melhora na atividade biológica de moléculas e redução de toxicidade (KASEMETS et al., 2006; MAGALHÃES et al., 2022; WANG et al., 2008; YONG et al., 2007). Neste trabalho, foi testada a atividade tripanocida de uma chalcona produzida a partir da condensação do cinamaldeído com uma acetofenona extraída das folhas da planta *Croton anisodontus*, encontrada no semi-árido brasileiro.

A chalcona (2*E*,4*E*)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)-5-fenilpenta-2,4-dien-1-ona (CPNC) é um composto inédito, ainda não estudado na doença de Chagas. Porém, diversas chalconas foram estudadas quanto à atividade antiprotozoária, como anti-leishmania e antichagásica (APONTE et al., 2008; DE OLIVEIRA et al., 2022; GOMES et al., 2019; GRIEBLER et al., 2021a; MAGALHÃES et al., 2022). Devido a presença de determinados grupos químicos, chalconas naturais e análogos manifestam atividade contra formas parasitárias de espécies de *Leishmania* spp. (DE MELLO et al., 2018a). A

atividade antiparasitária desse grupo de moléculas em formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania amazonensis* (BOECK et al., 2006) e *Leishmania braziliensis* (DE MELLO et al., 2016) tem sido extensivamente descrita.

Assim, considerando as similaridades filogenéticas, estruturais e bioquímicas evidentes entre *Leishmania* sp. e *T. cruzi* (BARTHOLOMEU et al., 2021), o efeito inibitório de chalconas sobre as formas de vida de *T. cruzi* tem sido foco de estudo de grupos de pesquisa nos últimos anos. Alguns autores estudaram a atividade *in vitro* de chalconas sintéticas sobre alvos de *T. cruzi* (MAHAPATRA; BHARTI; ASATI, 2015), como a enzima cruzaina, mostrando o potencial dessas moléculas como inibidoras dessa enzima (BORCHHARDT et al., 2010) e possíveis agentes tripanocidas. Griebler e colaboradores (2021) avaliou a atividade de extratos de *Lonchocarpus cultratus*, onde detectou a presença de chalconas, e estes apresentaram atividade contra formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*.

Recentemente, o efeito de três chalconas produzidas a partir da acetofenona de *C. anisodontus*, foi descrito, demonstrando efeito sobre as três formas de vida de *T. cruzi* e causando morte celular caracterizada por dano à membrana plasmática, estresse oxidativo e alteração do potencial transmembrânico mitocondrial (MAGALHÃES et al., 2022). Dentre elas, a chalcona protótipo do grupo (CPNB) apresentou toxicidade nas concentrações testadas, o que limitou a realização de análises adicionais. A molécula estudada no presente trabalho possui estrutura similar à de CPNB com alongamento da cadeia alifática. Dessa forma, foi possível observar que esse alongamento foi eficaz na otimização do efeito tripanocida e na redução da citotoxicidade.

No presente estudo, foi descrita pela primeira vez o efeito tripanocida da chalcona (2*E*,4*E*)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)-5-fenilpenta-2,4-dien-1-ona, bem como as suas interações teóricas com as enzimas cruzaina e tripanotiona redutase de *T. cruzi*. Foram realizados estudos de atividades biológica e teórica para avaliar seus efeitos em células hospedeiras e nas principais formas evolutivas de *T. cruzi*. Foi utilizada a cepa Y de *T. cruzi*, uma variante isolada de um paciente acometido, que apresenta alta capacidade infectante *in vitro* e é parcialmente resistente ao BZN (FRANCO, 2018).

Inicialmente, CPNC foi avaliada quanto à sua citotoxicidade em células hospedeiras LLC-MK2. Esse ensaio é realizado com o objetivo de selecionar moléculas menos tóxicas, bem como para determinar as concentrações a serem utilizadas nos ensaios

posteriores. As células LLC-MK2 são utilizadas nesse ensaio por serem as células de escolha para o modelo de infecção *in vitro* e por serem de fácil cultivo (ADADE; SOUTO-PADRÓN, 2010).

A molécula em estudo apresentou toxicidade nas concentrações entre 62,5 e 1000  $\mu\text{M}$ , com  $\text{CC}_{50}$  de aproximadamente 355,5  $\mu\text{M}$ . Em comparação, BZN apresentou  $\text{CC}_{50}$  de 537,8  $\mu\text{M}$ . CPNB, avaliada por Magalhães e colaboradores (2022), apresentou  $\text{CC}_{50}$  de 60,4  $\mu\text{M}$ . Ou seja, o alongamento da cadeia carbônica reduziu a toxicidade da CPNC em quase 6 vezes, quando comparada a chalcona protótipo do grupo. É possível que o efeito biológico observado nas chalconas seja relacionado à presença do grupo funcional cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada, em conjugação com o grupo carbonila, que se comporta como um potencial acceptor de Michael (ZHUANG et al., 2017).

Os resultados do tratamento com a CPNC sobre formas epimastigotas mostram um efeito antiproliferativo, já que essa forma é capaz de se multiplicar sem a necessidade de infectar células hospedeiras. Os epimastigotas são a forma de vida presente apenas no inseto triatomíneo e, embora a forma tripomastigota seja a responsável pela infecção no ser humano, geralmente, compostos ativos contra a forma epimastigota frequentemente correspondem aos compostos com atividade anti-tripomastigota (CAPUTTO et al., 2012). São de cultivo mais fácil, mantidas em suspensão em meio líquido sem a necessidade de infecção de células de mamífero (ARAÚJO-JORGE; CASTRO, 2000a). Adicionalmente, expressam enzimas importantes para a sobrevivência do parasito, como cruzaina e tripanotona redutase, de forma similar ao observado para tripomastigotas (KRAUTH-SIEGEL et al., 1987; PARIONA-LLANOS et al., 2015; SAJID et al., 2011). Assim, são modelos viáveis para a triagem de substâncias com potencial tripanocida. A observação de efeito em epimastigotas indica possível efeito em tripomastigotas.

Borges-Argáez e colaboradores (2009) avaliaram o efeito da isocordoína, uma chalcona natural isolada da raiz de *Lonchocarpus xuul*, juntamente com seus análogos, sobre formas epimastigotas e observaram um efeito antiparasitário promissor em um dos análogos, com  $\text{IC}_{50}$  menor que de BZN. Um extrato hexânico de *Lonchocarpus cultratus*, contendo as chalconas derricina e lonchocarpina em sua composição, também mostrou uma atividade contra formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas (BORTOLUZZI et al., 2021).

Nos estudos de Magalhães e colaboradores (2022), CPNB apresentou efeito em formas epimastigotas com um valor de  $IC_{50}$  sendo o dobro da  $IC_{50}$  de CPNC. Ou seja, o aumento da cadeia carbônica em CPNC também propiciou um efeito maior e mais tóxico sobre as formas epimastigotas.

No efeito sobre as formas tripomastigotas, a molécula de CPNC teve uma atividade 3,42 vezes mais tripanocida do que CPNB (MAGALHÃES et al., 2022). Além disso, uma molécula do grupo 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenilchalconas substituída com grupo nitro no anel B também mostrou atividade tripanocida em formas tripomastigotas de *T. cruzi* (MATOS et al., 2022). Gomes e colaboradores (2019) sintetizaram e avaliaram a atividade de 36 chalconas e reforçaram que características moleculares são fundamentais para um eficiente potencial antitripanossoma das chalconas, como grupos alílicos, sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado e grupos hidroxilas aromáticos.

Quando comparado ao BZN, o efeito sobre as formas infectantes de *T. cruzi* foi 2,21 vezes maior. Para a chalcona em estudo, o valor necessário para diminuir 50% da população viável das formas tripomastigotas ( $LC_{50}$ ) foi de 48,33  $\mu$ M, e o de BZN foi de 161,40  $\mu$ M. Assim, o índice de seletividade de CPNC foi de 7,36 e o de BZN foi de 3,33, indicando que CPNC é 2,21 vezes mais seletiva para o parasito do que para as células hospedeiras, quando comparada ao fármaco de referência. O índice de seletividade é um parâmetro importante e interessante para determinar compostos com atividade antiparasitária específica (PEÑA et al., 2015). Em comparação à CPNB (MAGALHÃES et al., 2022), o índice de seletividade foi ainda maior. O que reforça que alongamento da cadeia alifática da chalcona aumentou a seletividade de CPNC sobre as formas tripomastigotas.

O *T. cruzi* estabelece infecção intracelular na maioria das células nucleadas do hospedeiro onde escapa de seu vacúolo parasitóforo derivado de lisossomos, logo após a entrada na célula hospedeira quando tripomastigota e se desenvolve na forma amastigota, que estabelece residência citosólica e se replica por fissão binária (APT, 2010). Para que se tenha um fármaco com ação contra *T. cruzi*, é essencial que esse composto tenha uma ação em formas amastigotas, pois é a fase de replicação do parasito no hospedeiro vertebrado, produzindo mais tripomastigotas. Amastigotas se proliferam dentro da célula hospedeira, sendo esta uma barreira para a ação dos fármacos (LENTINI; DOS SANTOS PACHECO; BURLEIGH, 2018). Dessa forma, se faz necessário que o fármaco seja capaz

de adentrar a membrana da célula para, então, alcançar os parasitos intracelulares e exercer uma ação contra estes.

A atividade anti-amastigota foi avaliada com concentrações decrescentes da CPNC, a partir daquela que não foi tóxica para as células hospedeiras. Conforme os resultados do presente estudo, CPNC diminuiu a quantidade de células infectadas e também a quantidade de amastigotas dentro das células infectadas em todas as concentrações testadas (3,9 a 31,5  $\mu\text{M}$ ). Sendo assim, foi capaz de diminuir a proliferação destes parasitos. Outros autores demonstraram o efeito de chalconas sintéticas e híbridas sobre amastigotas de leishmaniose, que são as formas intracelulares proliferativas de *Leishmania* sp. (AUCAMP; N'DA, 2022; DE MELLO et al., 2018).

O efeito visualizado na atividade anti-amastigota de CPNC pode estar associada a algumas características físico-químicas observadas nas chalconas, como baixo peso molecular e alta lipofilicidade. Essas características permitem alta permeação por membranas biológicas (THAPA et al., 2021), o que favorece a entrada de substâncias nas células infectadas e a interação com os amastigotas intracelulares. Além disso, o alongamento na cadeia alifática também aumenta a lipofilicidade da molécula.

A condensação de Claisen-Schmidt é a mais comum para a preparação de chalconas e substituições nos anéis com grupos funcionais como hidroxilas, metoxis e halogênicos aumentam a característica lipídica dessas moléculas. Essa característica em fármacos possibilita que estes permeabilizem barreiras celulares e consigam chegar ao interior da célula (THAPA et al., 2021). Pinto e colaboradores (2019) avaliou a lipofilicidade de 27 chalconas e observou que alterações nos anéis aromáticos A e/ou B designam diferentes atividades nessas moléculas. A CPNC possui insaturações, grupos metoxi e hidroxila no anel A e carbonila que podem conferir uma lipofilicidade interessante para esta chalcona, como também pode explicar como essa molécula permeia a membrana e promove uma ação anti-amastigota. Além disso, estudos sugerem que mudanças nos anéis A e B podem melhorar a seletividade contra as formas evolutivas do *T. cruzi*. González e colaboradores (2021) observaram que a interação de grupos hidroxila e isoprenil em diferentes posições dos anéis aromáticos podem aumentar a atividade tripanocida, como, por exemplo, a presença de uma hidroxila em posição adjacente a carbonila no anel A.

Um outro estudo observou que substituições halogênicas com cloro no anel B aumentaram a seletividade da chalcona estudada ao diminuir a toxicidade em células hospedeiras e manter o efeito sobre formas tripomastigotas, além de ter diminuído a quantidade de células infectadas e de amastigotas intracelulares (MAGALHÃES et al., 2022). O contrário foi observado para BZN, que possui baixa permeabilidade com consequente prejuízo na penetração da membrana plasmática para acesso aos amastigotas intracelulares, sendo estes inconvenientes associados ao tratamento com este fármaco (MORILLA; ROMERO, 2015).

Após os experimentos de citotoxicidade e atividade tripanocida, foram avaliados os possíveis mecanismos de ação envolvidos no tratamento com a chalcona, utilizando citometria de fluxo. A citometria de fluxo é interessante para avaliação de processos celulares, incluindo expressão de marcadores de superfície, citocina intracelular e sinalização proteínas ou ciclo celular (JAHAN-TIGH et al., 2012; MCKINNON, 2018; SCHMIT; KLOMP; KHAN, 2021).

Os epimastigotas foram tratados com CPNC e os resultados desse tratamento sugerem que a molécula de 7-AAD conseguiu penetrar a membrana dos parasitos e que, portanto, houve dano na membrana e esta perdeu sua integridade. Os percentuais desse processo aumentaram com o aumento da concentração do tratamento, evidenciando o dano na membrana do parasito.

Alterações características para apoptose em parasitos protozoários incluem retração do volume celular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, perda de potencial de membrana mitocondrial e translocação de fosfatidilserina para o folheto externo da membrana plasmática, enquanto a membrana plasmática não é rompida, pelo menos durante os estágios iniciais. Em contraste, a necrose normalmente inclui aumento do volume das células e organelas, com aumento da vacuolização do citoplasma, alterações na estrutura e função mitocondrial, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, por fim, perda da integridade da membrana plasmática (JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010; MENNA-BARRETO et al., 2009). Portanto, de acordo com os resultados, CPNC causou dano na membrana plasmática do parasito. Esse resultado também é observado em outras chalconas, que pertencem ao mesmo grupo que a CPNC, 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenilchalconas, como em Matos e colaboradores (2022) e as chalconas estudadas por Magalhães e colaboradores (2022).

A geração de EROs depende da capacidade do fármaco de atingir o meio intracelular (BILA et al., 2021). Neste trabalho, houve um aumento da produção de EROs resultante do tratamento com a CPNC. EROs são mediadores comuns de morte celular programada em seres eucariontes. Em tripanossomas sanguíneos encontrados no homem, as EROs são produzidas durante a apoptose induzida por prostaglandina, e quando em concentrações mais altas pode induzir necrose (FIGARELLA et al., 2006). Porém, a produção de EROs no mecanismo do parasito é controversa, pois verificou-se que *T. cruzi* cresce sob condições oxidativas tanto em macrófagos quanto *in vivo*, e moléculas antioxidantes foram prejudiciais ao seu crescimento. É possível que a produção de EROs pelo hospedeiro vertebrado promova a infecção e contribua para a cardiopatia chagásica na fase crônica (PAIVA; BOZZA, 2014; PAIVA; MEDEI; BOZZA, 2018).

Durante a invasão dos tripomastigotas metacíclicos às células nucleadas do hospedeiro vertebrado, após escaparem do fagolisossomo para o citoplasma, se diferenciam em formas amastigotas. No citosol de macrófagos infectados, o estresse oxidativo, ao invés de ser prejudicial ao parasito, favorece a carga de amastigotas, que então se diferenciam em tripomastigotas (CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016).

Paiva e colaboradores (2012) mostraram que uma vez que o parasito atinge o citosol dos macrófagos, o estresse oxidativo mobiliza ferro dos estoques intracelulares do hospedeiro, que é crítico para a divisão e o crescimento do parasito. *T. cruzi* é auxotrófico para heme, um importante cofator para muitas enzimas envolvidas em processos biológicos cruciais e também fonte de ferro. Mais recentemente, o heme demonstrou estar envolvido na regulação da eIF2a quinase (TcK2). Na ausência de heme, TcK2 é ativo e promove a parada do crescimento celular levando à diferenciação de formas proliferativas amastigotas em formas infecciosas não proliferativas tripomastigotas (DA SILVA et al., 2015).

As chalconas são moléculas antioxidantes e, assim como outras moléculas antioxidantes. (BRAZÃO et al., 2017; DE MENEZES et al., 2019; MAGALHÃES et al., 2022), CPNC mostrou aumento na produção de EROs. Esses resultados podem implicar que moléculas antioxidantes possam causar um desequilíbrio no balanço redox do parasito e interferir na diferenciação do protozoário.

Bila e colaboradores (2021) avaliou uma 2-hidroxicalcona em cepas de fungos dermatófitos do gênero *Trichophyton* sp. e seus respectivos biofilmes. Essa substância teve como alvo a molécula de ergosterol na membrana celular desses fungos, além de ter promovido a geração de EROs. O ergosterol é um componente presente tanto na membrana celular de fungos quanto em protozoários, como o *T. cruzi* e este parasito pode sintetizar esteróis endogenamente. Semelhante a espécies fúngicas, o *T. cruzi* sintetiza esteróis do tipo ergostano e é sensível a uma classe de azólicos inibidores da biossíntese do ergosterol, que tem como alvo a enzima lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilase (CYP51) (DUMOULIN et al., 2022; KESSLER et al., 2013).

Os resultados da citometria de fluxo também mostram que o tratamento com a CPNC foi capaz de reduzir o potencial transmembrânico mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Esses dados, juntamente com a produção de EROs, reforçam que a chalcona em estudo provoca um estresse oxidativo e geram uma despolarização na membrana mitocondrial, semelhante ao resultado encontrado com CPNB por Magalhães e colaboradores (2022).

A mitocôndria apresenta importante função no balanço redox e no metabolismo energético de parasitos tripanossomatídeos, além do transporte de elétrons e produção de EROs, necessários durante etapas do ciclo de vida desses seres. A produção mitocondrial de EROs é regulada pelo estado redox do sistema de transporte de elétrons e/ou pela magnitude do potencial de membrana mitocondrial. Enzimas antioxidantes, como a tripanotiona redutase, trabalham como um mecanismo de defesa no desequilíbrio redox e estresse oxidativo, sendo necessárias para a sobrevivência do parasito (BOMBAÇA et al., 2019; NOGUEIRA et al., 2017).

Nesse contexto, torna-se interessante a pesquisa de moléculas capazes de inibir enzimas importantes para a sobrevivência do *T. cruzi*. Nos estudos *in silico* foi utilizado Docking Molecular para verificar a interação de duas enzimas importantes para o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*: tripanotiona redutase (TcTR) e cruzaína (TcCr). Na simulação de *docking* realizada com os ligantes selecionados, foi feito um ranqueamento de acordo com os valores de energia de afinidade de ligação obtidos. A partir destes valores, foram selecionados os melhores ligantes (menor energia) para avaliar as interações entre os resíduos da enzima do parasito e do ligante.

O *docking* com a enzima TcTR, a chalcona formou interações hidrofóbicas com os resíduos de aminoácidos PRO398A, LEU399A, PRO462A e LYS546B e gerou

ligações de hidrogênio com os resíduos GLU466A, GLU467A e SER470A. Além disso, interagiu no mesmo sítio que o inibidor, mostarda de quinacrina (QUM) e a energia de afinidade foi maior do que na interação com o inibidor. Como descrito acima, a TcTR é importante para o mecanismo de defesa do *T. cruzi* contra o estresse oxidativo, mostrando-se mais um importante alvo farmacológico na busca por novas drogas tripanocidas. TcTR possui uma região hidrofóbica que contém o aminoácido SER470 localizado no sítio Y e os aminoácidos PRO398 e LEU399 localizados no sítio Z da enzima. LEU399 é substituído por MET406 na isoforma humana, uma diferença que pode auxiliar a projetar inibidores seletivos de TcTR (DE ARAÚJO et al., 2022; DE MOLFETTA et al., 2009). Colotti e colaboradores (2020) avaliaram a interação de compostos de sulfeto com a enzima tripanotiona redutase de espécies de *Leishmania* sp. e verificou que um dos compostos inibiu a enzima com alta eficiência, ao se ligar ao sítio catalítico por meio de ligações de hidrogênio com resíduos mais envolvidos na catálise, dentre eles GLU466 e GLU467.

CPNB, molécula protótipo do grupo (MAGALHÃES *et al.*, 2022) interagiu em um sítio diferente do inibidor, o que indica que o alongamento da cadeia aberta melhorou a interação da CPNC. Isto é, a alteração na estrutura aumentou a seletividade da CPNC, que interagiu no mesmo sítio do inibidor QUM. Além disso, o alongamento da molécula aumenta a hidrofobicidade, o que leva a apresentar ligações hidrofóbicas com as enzimas.

Por fim, foi avaliado, também, a interação da enzima cruzaina (TcCr) com a chalcona em estudo, que interagiu em um local diferente do inibidor, tetrafluorofenoximetil, e realizou interações hidrofóbicas com o resíduo LEU45A e ligações de hidrogênio com os resíduos GLY42A e HIS43A. Trata-se de uma protease de cisteína, enzima que catalisa a hidrólise de ligações peptídicas. Esta enzima é essencial para a infecção de células hospedeiras e a replicação e metabolismo do parasito, e desempenha múltiplos papéis na patogenia da doença de Chagas (CAPUTTO et al., 2011). Estudos em modelos animais validaram que o uso desta enzima para o controle e eliminação do *T. cruzi* (MARTINEZ-MAYORGA et al., 2015). De Oliveira et al., (2022) verificaram a atividade de 17 chalconas, em que algumas inibiram a cruzaina e apresentaram atividade tripanocida. Um outro estudo mostrou que as dihidrocalconas apresentaram boa seletividade em suas atividades inibitórias contra as proteases de cisteína (BURGER et al., 2014).

Semelhante a CPNB (MAGALHÃES et al., 2022), CPNC interagiu em um sítio distinto ao inibidor KB2, com interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, porém as moléculas apresentaram interações com resíduos de aminoácidos diferentes.

Diante dos resultados discutidos, a chalcona CPNC apresentou atividade tripanocida sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas. Ademais, também apresentou anti-mastigota e, portanto, antiproliferativa. Os resultados sugerem que essa ação pode vir da interação da chalcona com as enzimas cruzaina e tripanotiona redutase, em especial a última, onde foi capaz de interagir diretamente em resíduos pertencentes ao sítio catalítico. Além disso, o possível mecanismo de ação envolve a produção de espécies reativas de oxigênio, com despolarização mitocondrial e perda da integridade da membrana plasmática.

O presente trabalho, dessa forma, demonstrou a bioatividade da chalcona em estudo sobre *T. cruzi* e sugeriu seus possíveis mecanismos de ação. Como limitação, entretanto, tem-se sua baixa seletividade, considerando os critérios definidos pela OMS, e o fato de esse ter sido um trabalho realizado unicamente *in vitro*. Apesar disso, os dados aqui obtidos poderão ser úteis no delineamento de novas pesquisas voltadas à compreensão dos mecanismos moleculares de chalconas contra *T. cruzi*, bem como fundamentar a realização de ensaios *in vivo* de DC, visando o desenvolvimento de novas moléculas antichagásicas.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

CPNC apresentou efeito tripanocida sobre as formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*. O alongamento da cadeia alifática nesta molécula, quando comparada a outra chalcona do mesmo grupo, diminuiu a toxicidade em células hospedeiras e aumentou a atividade tripanocida e a seletividade no *T. cruzi*. Além disso, aumentou a interação com enzimas importantes para o ciclo evolutivo e metabólico do parasito, implicando numa maior seletividade. Nas formas amastigotas, CPNC diminuiu a quantidade células infectadas e o número de amastigotas no interior destas células.

Ademais, CPNC provocou um dano de membrana ao parasito, que perdeu sua integridade. Houve ocorrência de estresse oxidativo, aumento na produção de EROs e diminuição do potencial transmembrânico mitocondrial. O efeito observado sobre as formas de vida do parasito pode estar relacionado a possível interação com as enzimas cruzafina e tripanotiona redutase, conforme demonstrado nos ensaios de docking molecular.

## REFERÊNCIAS

ADADE, C. M.; SOUTO-PADRÓN, T. Contributions of Ultrastructural Studies to the Cell Biology of Trypanosomatids: Targets for Anti-Parasitic Drugs. **The Open Parasitology Journal**, v. 4, n. 1, p. 178–187, 15 mar. 2010.

ADAN, A. et al. Flow cytometry: basic principles and applications. **Critical reviews in biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 163–176, 17 fev. 2017.

ALBUQUERQUE, H. M. T. et al. ChemInform Abstract: Chalcones as Versatile Synthons for the Synthesis of 5- and 6-Membered Nitrogen Heterocycles. **ChemInform**, v. 46, n. 15, p. no-no, abr. 2015.

APONTE, J. C. et al. Synthesis, Cytotoxicity, and Anti- *Trypanosoma cruzi* Activity of New Chalcones. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 19, p. 6230–6234, 9 out. 2008.

APT, W. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. **Drug Design, Development and Therapy**, p. 243, set. 2010.

ARAÚJO-JORGE, T. C. DE; CASTRO, S. L. DE. **Doença de chagas: manual para experimentação animal**. [s.l.] Editora FIOCRUZ, 2000a.

ARAÚJO-JORGE, T. C.; CASTRO, S. L. DE. Planejamento de experimentos e escolha dos modelos: hospedeiro e parasita. **Doença de chagas: manual para experimentação animal [online]**, p. 175–196, 2000b.

ARAÚJO-JORGE, T; DE CASTRO, S. L. Obtenção de células de camundongo para estudos in vitro em cultivo primário. **Doença de chagas: manual para experimentação animal [online]**, p. 2010, 2010.

AUCAMP, J.; N'DA, D. D. In vitro antileishmanial efficacy of antiplasmodial active aminoquinoline-chalcone hybrids. **Experimental Parasitology**, v. 236–237, p. 108249, maio 2022.

BARTHOLOMEU, D. C. et al. Genomics and functional genomics in *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*: statuses, challenges and perspectives. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 116, n. 1, p. 1–21, 2021.

BELTRAN-HORTELANO, I.; PEREZ-SILANES, S.; GALIANO, S. Trypanothione Reductase and Superoxide Dismutase as Current Drug Targets for *Trypanosoma cruzi*: An Overview of Compounds with Activity against Chagas Disease. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 11, 31 maio 2017.

BILA, N. M. et al. 2-Hydroxychalcone as a Potent Compound and Photosensitizer Against Dermatophyte Biofilms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 13 maio 2021.

BOECK, P. et al. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 1538–1545, mar. 2006.

- BOMBAÇA, A. C. S. et al. Mitochondrial dysfunction and ROS production are essential for anti-*Trypanosoma cruzi* activity of  $\beta$ -lapachone-derived naphthoimidazoles. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 130, p. 408–418, jan. 2019.
- BONALDO, M. C. et al. Characterization and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Experimental Parasitology**, v. 73, n. 1, p. 44–51, jul. 1991.
- BORCHHARDT, D. M. et al. Biochemical Evaluation of a Series of Synthetic Chalcone and Hydrazone Derivatives as Novel Inhibitors of Cruzain from *Trypanosoma cruzi*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 21, n. 1, p. 142–150, 2010.
- BORGES-ARGÁEZ, R. et al. Antiprotozoal and Cytotoxic Studies on Some Isocordoin Derivatives. **Planta Medica**, v. 75, n. 12, p. 1336–1338, 8 out. 2009.
- BORTOLUZZI, A. A. M. et al. Determination of chemical structure and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of extracts from the roots of *Lonchocarpus cultratus* (Vell.) A.M.G. Azevedo & H.C. Lima. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 1, p. 99–108, jan. 2021.
- 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, 25 fev. 2010.
- BRASIL. **GUIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE**. Disponível em: <[https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_saude\\_4ed.pdf](https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_4ed.pdf)>. Acesso em: 5 fev. 2023.
- BRASIL. Territorialização e vulnerabilidade para doença de Chagas crônica - Boletim Epidemiológico. . abr. 2022.
- BRAZÃO, V. et al. Melatonin: Antioxidant and modulatory properties in age-related changes during *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Pineal Research**, v. 63, n. 1, p. e12409, ago. 2017.
- BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. Em: **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1997. p. 25–31.
- BURGER, M. C. DE M. et al. Structures and Bioactivities of Dihydrochalcones from *Metrodorea stipularis*. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 11, p. 2418–2422, 26 nov. 2014.
- 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, 13 out. 2019.
- CAPUTTO, M. E. et al. Thiosemicarbazones derived from 1-indanones as new anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 22, p. 6818–6826, nov. 2011.

CAPUTTO, M. E. et al. Synthesis and biological evaluation of some novel 1-indanone thiazolylylhydrazone derivatives as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 155–163, set. 2012.

CARDOSO, M. S.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 6, 18 jan. 2016.

CASTRO, J. A.; DEMECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic Side Effects of Drugs Used to Treat Chagas' Disease (American Trypanosomiasis). **Human & Experimental Toxicology**, v. 25, n. 8, p. 471–479, 2 ago. 2006.

CAZZULO, J.; STOKA, V.; TURK, V. The Major Cysteine Proteinase of *Trypanosoma cruzi*: A Valid Target for Chemotherapy of Chagas Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, n. 12, p. 1143–1156, 1 ago. 2001.

CDC. **Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease)**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/chagas/epi.html>>. Acesso em: 4 fev. 2023.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159–218, ago. 1909.

CHENG, P. et al. Chalcone hybrids and their antimalarial activity. **Archiv der Pharmazie**, v. 353, n. 4, p. 1900350, abr. 2020.

CHIARADIA, L. D. et al. Synthesis and pharmacological activity of chalcones derived from 2,4,6-trimethoxyacetophenone in RAW 264.7 cells stimulated by LPS: Quantitative structure–activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 658–667, jan. 2008.

COLOTTI, G. et al. Structure-guided approach to identify a novel class of anti-leishmaniasis diaryl sulfide compounds targeting the trypanothione metabolism. **Amino Acids**, v. 52, n. 2, p. 247–259, 29 fev. 2020.

CONSTANTINESCU, T.; LUNGU, C. N. Anticancer Activity of Natural and Synthetic Chalcones. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11306, 20 out. 2021.

COORDENADORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA E PREVENÇÃO EM SAÚDE (COVEP). **Boletim Epidemiológico - Doença de Chagas**. Fortaleza: [s.n.].

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277–282, 2 dez. 2014.

CSIZMADIA, P. **MarvinSketch and MarvinView: Molecule Applets for the World Wide Web** | **ChemAxon**. Disponível em: <<https://chemaxon.com/blog/presentation/marvinsketch-and-marvinview-molecule-applets-for-the-world-wide-web>>. Acesso em: 18 nov. 2022.

DA SILVA, A. L. et al. A Membrane-bound eIF2 Alpha Kinase Located in Endosomes Is Regulated by Heme and Controls Differentiation and ROS Levels in *Trypanosoma cruzi*. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 2, p. e1004618, 6 fev. 2015.

DA SILVA, A. W. et al. Anxiolytic-like effect of natural product 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyacetophenone isolated from *Croton anisodontus* in adult zebrafish via serotonergic neuromodulation involvement of the 5-HT system. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 394, n. 10, p. 2023–2032, 12 out. 2021.

DE ARAÚJO, J. I. F. et al. Antiproliferative activity on *Trypanosoma cruzi* (Y strain) of the triterpene 3 $\beta$ ,6 $\beta$ ,16 $\beta$ -trihidroxilup-20 (29)-ene isolated from *Combretum leprosum*. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 40, n. 22, p. 12302–12315, 12 dez. 2022.

DE FREITAS, S. P. C. et al. **CURSO DE CAPACITAÇÃO SOBRE TRIATOMÍNEOS E DOENÇA DE CHAGAS**. Fiocruz, , nov. 2019.

DE MELLO, M. V. P. et al. A comprehensive review of chalcone derivatives as antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 150, p. 920–929, abr. 2018a.

DE MELLO, M. V. P. et al. A comprehensive review of chalcone derivatives as antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 150, p. 920–929, abr. 2018b.

DE MELLO, T. F. P. et al. Ultrastructural and morphological changes in *Leishmania (Viannia) braziliensis* treated with synthetic chalcones. **Experimental Parasitology**, v. 160, p. 23–30, jan. 2016.

DE MENEZES, R. R. P. P. B. et al. Antiparasitic effect of (–)- $\alpha$ -bisabolol against *Trypanosoma cruzi* Y strain forms. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 95, n. 3, p. 114860, nov. 2019.

DE MOLFETTA, F. A. et al. Docking and molecular dynamics simulation of quinone compounds with trypanocidal activity. **Journal of Molecular Modeling**, v. 15, n. 10, p. 1175–1184, 5 out. 2009.

DE OLIVEIRA, A. S. et al. Novel trypanocidal thiophen-chalcone cruzain inhibitors: structure- and ligand-based studies. **Future Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 11, p. 795–808, jun. 2022.

DELGADO-MALDONADO, T. et al. Synthesis and biological evaluation in vitro and in silico of N-propionyl-N'-benzeneacylhydrazones derivatives as cruzain inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular Diversity**, v. 26, n. 1, p. 39–50, 20 fev. 2022.

DIAS, L. C. et al. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444–2457, 2009.

DUMOULIN, P. C. et al. Endogenous Sterol Synthesis Is Dispensable for *Trypanosoma cruzi* Epimastigote Growth but Not Stress Tolerance. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 17 jun. 2022.

- EMAMI, S. et al. Acetophenone benzoylhydrazones as antioxidant agents: Synthesis, in vitro evaluation and structure-activity relationship studies. **Food Chemistry**, v. 268, p. 292–299, dez. 2018.
- FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 3, p. 734–747, maio 2012.
- FERREIRA, M. K. A. et al. Potencial Farmacológico de Chalconas: Uma Breve Revisão. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 5, p. 1455–1473, nov. 2018.
- FIGARELLA, K. et al. Prostaglandin-induced programmed cell death in *Trypanosoma brucei* involves oxidative stress. **Cell Death & Differentiation**, v. 13, n. 10, p. 1802–1814, 3 out. 2006.
- FRANCO, C. H. **Descoberta de compostos com amplo espectro contra *Trypanosoma cruzi* por meio de triagem de alto conteúdo**. Doutorado em Ciências—São Paulo: Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), 2018.
- GAONKAR, S. L.; VIGNESH, U. N. Synthesis and pharmacological properties of chalcones: a review. **Research on Chemical Intermediates**, v. 43, n. 11, p. 6043–6077, 28 nov. 2017.
- GARCIA, M. N. et al. Evidence of Autochthonous Chagas Disease in Southeastern Texas. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 2, p. 325–330, 4 fev. 2015.
- GIAROLLA, J.; FERREIRA, E. Drug Design for Neglected Disease in Brazil. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 220–242, 12 mar. 2015.
- GOMES, K. S. et al. Structure-activity relationship study of antitrypanosomal chalcone derivatives using multivariate analysis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 29, n. 12, p. 1459–1462, jun. 2019.
- GONTIJO, M. K. C. L. et al. Characterization of adverse reactions to benznidazole in patients with Chagas disease in the Federal District, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 2020.
- GONZÁLEZ, L. A. et al. Synthesis and Evaluation of Trypanocidal Activity of Chromane-Type Compounds and Acetophenones. **Molecules**, v. 26, n. 23, p. 7067, 23 nov. 2021.
- GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, A. et al. In Vitro and In Silico Analysis of New n-Butyl and Isobutyl Quinoxaline-7-carboxylate 1,4-di-N-oxide Derivatives against *Trypanosoma cruzi* as Trypanothione Reductase Inhibitors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 21, p. 13315, 1 nov. 2022.
- GRIEBLER, A. et al. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity, cytotoxicity and, chemical characterization of extracts from seeds of *Lonchocarpus cultratus*. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 15, n. 02, p. 270–279, 7 mar. 2021a.

GRIEBLER, A. et al. Anti-Trypanosoma cruzi activity, cytotoxicity and, chemical characterization of extracts from seeds of Lonchocarpus cultratus. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 15, n. 02, p. 270–279, 7 mar. 2021b.

HARTH, G. et al. Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of Trypanosoma cruzi. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 58, n. 1, p. 17–24, mar. 1993.

H.W. RIVAROLA; P.A. PAGLINI-OLIVA. Trypanosoma cruzi Trypanothione Reductase Inhibitors: Phenothiazines and Related Compounds Modify Experimental Chagas' Disease Evolution. **Current Drug Target -Cardiovascular & Hematological Disorders**, v. 2, n. 1, p. 43–52, 1 jun. 2002.

IMBERTY, A. et al. Molecular modelling of protein-carbohydrate interactions. Docking of monosaccharides in the binding site of concanavalin A. **Glycobiology**, v. 1, n. 6, p. 631–642, 1 dez. 1991.

JAHAN-TIGH, R. R. et al. Flow Cytometry. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 10, p. 1–6, out. 2012.

JIMÉNEZ-RUIZ, A. et al. Apoptotic markers in protozoan parasites. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 104, 2010.

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, mar. 1989.

JURBERG, J. et al. **ATLAS ICONOGRÁFICO DOS TRIATOMÍNEOS DO BRASIL (VETORES DA DOENÇA DE CHAGAS)**. Rio de Janeiro Laboratório Nacional e Internacional de referência em Taxonomia de Triatomíneos - Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz, , 2014.

KADELA-TOMANEK, M. et al. Lipophilicity, Pharmacokinetic Properties, and Molecular Docking Study on SARS-CoV-2 Target for Betulin Triazole Derivatives with Attached 1,4-Quinone. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 6, 2021.

KASEMETS, K. et al. Study of the toxic effect of short- and medium-chain monocarboxylic acids on the growth of Saccharomyces cerevisiae using the CO<sub>2</sub>-auxo-accelerostat fermentation system. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, n. 3, p. 206–215, out. 2006.

KESSLER, R. L. et al. Trypanosoma cruzi Response to Sterol Biosynthesis Inhibitors: Morphophysiological Alterations Leading to Cell Death. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e55497, 31 jan. 2013.

KRAUTH-SIEGEL, R. L. et al. Trypanothione reductase from Trypanosoma cruzi. Purification and characterization of the crystalline enzyme. **European Journal of Biochemistry**, v. 164, n. 1, p. 123–128, abr. 1987.

- KROPF, S. P.; SÁ, M. R. The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 16, n. suppl 1, p. 13–34, jul. 2009.
- KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. **Cold Spring Harbor protocols**, v. 2018, n. 6, p. 469–471, 1 jun. 2018.
- LENTINI, G.; DOS SANTOS PACHECO, N.; BURLEIGH, B. A. Targeting host mitochondria: A role for the *Trypanosoma cruzi* amastigote flagellum. **Cellular Microbiology**, v. 20, n. 2, p. e12807, fev. 2018.
- LIMA, D. B. et al. Antiparasitic effect of *Dinoponera quadriceps* giant ant venom. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 120, p. 128–132, 15 set. 2016.
- 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, p. 109920, jul. 2022.
- MAHAPATRA, D. K.; BHARTI, S. K.; ASATI, V. Chalcone scaffolds as anti-infective agents: Structural and molecular target perspectives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 496–524, ago. 2015.
- MANOHAR, S. M.; SHAH, P.; NAIR, A. Flow cytometry: principles, applications and recent advances. <https://doi.org/10.4155/bio-2020-0267>, v. 13, n. 3, p. 185–202, 5 fev. 2021.
- MARINHO, E. M. et al. Virtual screening based on molecular docking of possible inhibitors of Covid-19 main protease. **Microbial pathogenesis**, v. 148, 1 nov. 2020.
- MARINHO, M. M. et al. Quantum computational investigations and molecular docking studies on amentoflavone. **Heliyon**, v. 7, n. 1, 1 jan. 2021.
- MARTÍN-ESCOLANO, R. et al. Synthesis and Biological in vitro and in vivo Evaluation of 2-(5-Nitroindazol-1-yl)ethylamines and Related Compounds as Potential Therapeutic Alternatives for Chagas Disease. **ChemMedChem**, v. 13, n. 19, p. 2104–2118, 8 out. 2018.
- MARTINEZ-MAYORGA, K. et al. Cruzain inhibitors: efforts made, current leads and a structural outlook of new hits. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 7, p. 890–898, jul. 2015.
- MARTINS-MELO, F. R. et al. Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v. 130, p. 167–174, fev. 2014.
- MARTINS-MELO, F. R. et al. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000-2011. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 2, p. 103–110, 1 fev. 2016.
- MASTACHI-LOZA, S. et al. Chalcones, a Privileged Scaffold: Highly Versatile Molecules in [4+2] Cycloadditions. **Chemistry – An Asian Journal**, v. 17, n. 20, 17 out. 2022.
- MATOS, M. G. C. M. 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 a natural product. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 24, n. 8, p. 5052–5069, 2022.

MATTHEE, C. et al. Exploration of chalcones and related heterocycle compounds as ligands of adenosine receptors: therapeutics development. **Molecular Diversity**, v. 26, n. 3, p. 1779–1821, 27 jun. 2022.

MCKINNON, K. M. Flow Cytometry: An Overview. **Current Protocols in Immunology**, v. 120, n. 1, 21 jan. 2018.

MEIRELLES, M. N. L. et al. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 52, n. 2, p. 175–184, jun. 1992.

MENEZES, R. R. P. P. B. et al. **Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothropoides lutzi* venom**. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22428250/>>. Acesso em: 18 nov. 2022.

MENNA-BARRETO, R. F. S. et al. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: An ultrastructural study. **Micron**, v. 40, n. 2, p. 157–168, fev. 2009.

MILLS, R. M. Chagas Disease: Epidemiology and Barriers to Treatment. **The American journal of medicine**, v. 133, n. 11, p. 1262–1265, 1 nov. 2020.

MITTAL, A.; VASHISTHA, V. K.; DAS, D. K. Recent advances in the antioxidant activity and mechanisms of chalcone derivatives: a computational review. **Free Radical Research**, v. 56, n. 5–6, p. 378–397, 3 jun. 2022.

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

MORILLA, M. J.; ROMERO, E. L. Nanomedicines against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. **Nanomedicine**, v. 10, n. 3, p. 465–481, fev. 2015.

MORILLO, C. A. et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 14, p. 1295–1306, out. 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, 16 dez. 1983.

MÜLLER KRATZ, J. et al. Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 10, p. 943–957, 3 out. 2018.

NARENDER, T. et al. A new chemical access for 3'-acetyl-4'-hydroxychalcones using borontrifluoride–etherate via a regioselective Claisen-Schmidt condensation and its application in the synthesis of chalcone hybrids. **Tetrahedron Letters**, v. 52, n. 44, p. 5794–5798, nov. 2011.

- NOGUEIRA, N. P. et al. Heme modulates *Trypanosoma cruzi* bioenergetics inducing mitochondrial ROS production. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 108, p. 183–191, jul. 2017.
- OKOLO, E. N. et al. New chalcone derivatives as potential antimicrobial and antioxidant agent. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 21781, 5 nov. 2021.
- OLIVEIRA, M. T. A. et al. Identification and Modulatory Activity Assessment of 2-Hydroxy-3,4,6-trimethoxyacetophenone Isolated from *Croton anisodontus* Mull. Arg.(Euphorbiaceae). **Natural Product Communications**, v. 9, n. 5, p. 1934578X1400900, 1 maio 2014.
- PAIVA, C. N. et al. Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 7, p. 2531–2542, 2 jul. 2012.
- PAIVA, C. N.; BOZZA, M. T. Are Reactive Oxygen Species Always Detrimental to Pathogens? **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 6, p. 1000–1037, 20 fev. 2014.
- PAIVA, C. N.; MEDEI, E.; BOZZA, M. T. ROS and *Trypanosoma cruzi*: Fuel to infection, poison to the heart. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 4, p. e1006928, 19 abr. 2018.
- PARIONA-LLANOS, R. et al. Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase-Telomere Association Correlates with Redox Status in *Trypanosoma cruzi*. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0120896, 16 mar. 2015.
- PEÑA, I. et al. New Compound Sets Identified from High Throughput Phenotypic Screening Against Three Kinetoplastid Parasites: An Open Resource. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 8771, 5 ago. 2015.
- PÉREZ-MOLINA, J. A. et al. Trypanocidal treatment of Chagas disease. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica (English ed.)**, v. 39, n. 9, p. 458–470, nov. 2021.
- PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82–94, jan. 2018.
- PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, out. 2004.
- PINTO, P. et al. Chalcone derivatives targeting mitosis: synthesis, evaluation of antitumor activity and lipophilicity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 184, p. 111752, dez. 2019.
- RAJÃO, M. A. et al. Unveiling Benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 55, n. 4, p. 309–321, maio 2014.
- RAMMOHAN, A. et al. Chalcone synthesis, properties and medicinal applications: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 2, p. 433–458, 6 mar. 2020.
- RANI, A. et al. Recent developments in biological aspects of chalcones: the odyssey continues. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 14, n. 3, p. 249–288, 4 mar. 2019.

- RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, abr. 2010.
- SAJID, M. et al. Cruzain. Em: [s.l: s.n.]. p. 100–115.
- SANTIAGO, R. N. S. et al. Crystal structure, vibrational spectra and quantum chemical parameters of 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyacetophenone isolated from the Croton anisodontus Müll. Arg. (Euphorbiaceae). **Journal of Molecular Structure**, v. 1171, p. 815–826, nov. 2018.
- SANTIAGO, R. N. S. et al. Low-temperature and high-pressure Raman spectroscopy of 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyacetophenone isolated from the Croton anisodontus Müll.Arg. **Vibrational Spectroscopy**, v. 110, p. 103143, set. 2020.
- SARAVANAMUTHU, A. et al. Two interacting binding sites for quinacrine derivatives in the active site of trypanothione reductase: a template for drug design. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 28, p. 29493–500, 9 jul. 2004.
- SCHMIT, T.; KLOMP, M.; KHAN, M. N. An Overview of Flow Cytometry: Its Principles and Applications in Allergic Disease Research. Em: [s.l: s.n.]. p. 169–182.
- SHERLOCK, I. A. Vetores. Em: **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 21–40.
- 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, n. 1, p. 23–36, 2014.
- SILVA, P. T. ; et al. Cytotoxic and Antifungal Activity of Chalcones Synthesized from Natural Acetophenone Isolated from Croton anisodontus. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 3, p. 712–723, 28 maio 2020.
- SINHA, S. et al. Antimalarial and immunomodulatory potential of chalcone derivatives in experimental model of malaria. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 22, n. 1, p. 330, 12 dez. 2022.
- SOEIRO, M. DE N. C.; CASTRO, S. L. DE. Screening of Potential anti-Trypanosoma cruzi Candidates: In Vitro and In Vivo Studies. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 5, p. 21–30, 9 mar. 2011.
- SOUZA, W. Basic Cell Biology of Trypanosoma cruzi. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 4, p. 269–285, 1 fev. 2002.
- THAPA, P. et al. Chalcone and its analogs: Therapeutic and diagnostic applications in Alzheimer’s disease. **Bioorganic Chemistry**, v. 108, p. 104681, mar. 2021.
- TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. NA-NA, 2010.
- VISUALIZER D.S. Accelrys Software Inc. v. 4, n. 0.100. 13345, 2005.

WANG, A. et al. Antioxidant acetophenone glycosides from the roots of *Euphorbia ebracteolata* Hayata. **Natural Product Research**, v. 32, n. 18, p. 2187–2192, 17 set. 2018.

WANG, L. et al. Synthesis and Antimicrobial Activity of 3-Alkoxyjatrorrhizine Derivatives. **Planta Medica**, v. 74, n. 3, p. 290–292, fev. 2008.

WHO. **Global distribution of cases of Chagas Disease, based on official estimates, 2018.**

WHO. **Chagas disease (also known as American trypanosomiasis).** Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em: 4 fev. 2023.

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

WINTER, C. **CATALISADORES HETEROGÊNEOS PARA PRODUÇÃO DE CHALCONAS: REAÇÃO DE CONDENSAÇÃO DE CLAISEN-SCHMIDT** . Dissertação de Mestrado—Goiânia: Universidade Federal de Goiás, mar. 2016.

WLOODKOWIC, D.; SKOMMER, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. Cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances - PubMed. p. 255–262, out. 2012.

WON, S.-J. et al. Synthetic chalcones as potential anti-inflammatory and cancer chemopreventive agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 1, p. 103–112, jan. 2005.

YONG, Y. et al. Synthesis and Antimicrobial Activity of 8-Alkylberberine Derivatives with a Long Aliphatic Chain. **Planta Medica**, v. 73, n. 6, p. 602–604, jun. 2007.

ZHOU, B. **Diverse Molecular Targets for Chalcones with Varied Bioactivities. Medicinal Chemistry**, 2015.

ZHUANG, C. et al. Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 12, p. 7762–7810, 28 jun. 2017.