



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

**HELAYNNE GOMES DO NASCIMENTO**

**EFEITO TRIPANOCIDA DE 2-HIDROXI-3,4,6-TRIMETOXIACETOFENONA  
ISOLADA DE *Croton anisodontus* Mull. Arg. EM CEPA Y DE *Trypanosoma cruzi***

**FORTALEZA**

**2024**

HELAYNNE GOMES DO NASCIMENTO

EFEITO TRIPANOCIDA DE 2-HIDROXI-3,4,6-TRIMETOXIACETOFENONA  
ISOLADA DE *Croton anisodontus* Mull. Arg. 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.

Linha de pesquisa: Biologia para a saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.

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

FORTALEZA

2024

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)

---

- N195e Nascimento, Helayne Gomes do.  
EFEITO TRIPANOCIDA DE 2-HIDROXI-3,4,6-TRIMETOXIACETOFENONA ISOLADA DE  
Croton anisodontus Mull. Arg. EM CEPA Y DE Trypanosoma cruzi / Helayne Gomes do Nascimento. –  
2024.  
86 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e  
Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2024.  
Orientação: Prof. Dr. Alice Maria Costa Martins.  
Coorientação: Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes.
1. Doença de Chagas; Acetofenona; Tripanotiona Redutase. I. Título.

CDD 615

---

HELAYNNE GOMES DO NASCIMENTO

EFEITO TRIPANOCIDA DE 2-HIDROXI-3,4,6-TRIMETOXIACETOFENONA  
ISOLADA DE *Croton anisodontus* Mull. Arg. 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

---

Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins

Universidade Federal do Ceará (UFC) – Orientadora

---

Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes

Universidade Federal do Ceará (UFC) – Coorientador

---

Profa. Dra. Márcia Machado Marinho

Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA) – Examinadora

---

Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio

Universidade Federal do Ceará (UFC) – Examinador

HELAYNNE GOMES DO NASCIMENTO

*“Natural é encontrar. Natural é perder.  
Linhas paralelas se encontram no infinito.  
O infinito não acaba. O infinito é nunca. Ou sempre.”*

Caio Fernando Abreu

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por todos os dias me permitir estar aqui. Pelas bênçãos e pelos propósitos em minha vida.

Aos meus pais, Regina Cláudia e Hildebrando Chaves, por todo o amor, carinho, dedicação, apoio e incentivo durante todos esses anos. Aos meus avós, tios(as), madrinhas, padrinhos, primos(as) e familiares, por apoiarem e torcerem pelas minhas conquistas. Ao meu companheiro, Thiago Silva, durante todos esses anos, desde o início da minha caminhada acadêmica, obrigado por todo o incentivo, pelas longas conversas e pelos momentos bons e ruins que compartilhamos até aqui. Aos meus amigos do grupo das “Inês”, que dividiram das muitas angústias e aflições, mas também dos diversos momentos de alegria e felicidades.

A minha orientadora, Profa. Alice Martins, pela compreensão e auxílio durante todo esse período, por ser um exemplo de pessoa, de professora e de pesquisadora. Ao meu coorientador, Prof. Ramon, por todo auxílio, conselhos e ensinamentos, desde o período da monografia, sempre esteve presente durante todos esses anos. Ao Prof. Hélcio Santos, pelas moléculas de estudo.

Aos demais membros e colegas do Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica (LBFBC) e do Laboratório de Toxicologia (LabTox) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Muito obrigada pelo companheirismo e ajuda mútua. Em especial, ao Me. Emanuel Magalhães, sempre muito solícito, acolhedor e prestativo... Obrigada pelo apoio e incentivo!

Aos membros participantes da banca, por aceitarem gentilmente o convite em participar desse momento tão importante em minha vida. E pelas devidas e necessárias considerações e contribuições para este trabalho.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT), ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) e à Universidade Federal do Ceará (UFC), por toda infraestrutura organizacional. À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

A todos os demais colaboradores que contribuíram de maneira direta e indireta para a execução deste trabalho. Muito obrigada!

## RESUMO

A Tripanossomíase Americana, popularmente conhecida como doença de Chagas, é uma infecção parasitária causada pelo *Trypanosoma cruzi*, por vezes negligenciada, mas que tem se tornando endêmica em países desenvolvidos. Na fase crônica, apresenta terapia farmacológica de eficácia limitada e tóxica, tornando necessário estudos em busca de alternativas terapêuticas. As acetofenonas, que apresentam inúmeras propriedades biológicas, tornam-se moléculas potenciais na pesquisa por novas substâncias tripanocidas. Desse modo, o presente estudo busca avaliar o efeito tripanocida de 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona (HTMCX) *in vitro* e *in silico* sobre cepa Y de *T. cruzi*. A citotoxicidade da substância em células hospedeiras de mamíferos (LLC-MK2) foi avaliada pelo ensaio de redução de MTT, sendo observada uma redução dos valores de CC<sub>50</sub> (concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade das células), quando comparada ao grupo tratado com Benznidazol (Bz). A avaliação em formas epimastigotas foi realizada através da determinação do percentual de parasitos viáveis, a HTMCX foi capaz de inibir a proliferação celular (concentração e tempo dependentes) em todas as concentrações testadas (31,2; 62,5; 125; 250; 500; 1000 µM). Sob as formas tripomastigotas, demonstrou capacidade de matar 50% dos parasitos (LC<sub>50</sub>) nas quatro maiores concentrações testadas (125, 250, 500 e 1000 µM), sendo, a maior concentração capaz de matar cerca de 98,82% dos parasitos. Quando avaliada a relação entre citotoxicidade do composto para células hospedeiras de mamíferos e o índice de seletividade (IS: CC<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub>), a substância apresentou melhor seletividade (5,66) quando comparada com Bz (3,11). HTMCX foi capaz de reduzir o percentual de células infectadas, bem como do número de parasitos intracelulares, demonstrando, portanto, efeito antiamastigotas. Por meio dos ensaios de citometria de fluxo, foi possível inferir possíveis mecanismos semelhantes a necrose e morte celular, bem como a ocorrência de estresse oxidativo, através do aumento da produção de ERO e redução do  $\Delta\Psi_m$ . Nas simulações de docking, HTMCX interagiu com resíduos de tripanotiona redutase (TR), o que pode elucidar os efeitos biológicos apresentados. Assim, observou-se que a molécula em estudo demonstrou efeito tripanocida nos ensaios realizados, bem como significativa redução da toxicidade sobre células hospedeiras. A inibição de enzimas essenciais do parasito pode estar relacionada a um possível mecanismo de ação, evidenciados através da indução da morte celular mediada por dano de membrana e pelo estresse oxidativo.

Palavras-chave: Doença de Chagas; Acetofenona; Tripanotiona Redutase.

## ABSTRACT

American Trypanosomiasis, popularly known as Chagas disease, is a parasitic infection caused by *Trypanosoma cruzi*, sometimes neglected, but which has become endemic in developed countries. In the chronic phase, it presents pharmacological therapy with limited and toxic efficacy, making studies necessary in search of therapeutic alternatives. Acetophenones, which have numerous biological properties, become potential molecules in the search for new trypanocidal substances. Therefore, the present study seeks to evaluate the trypanocidal effect of 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyacetophenone (HTMCX) *in vitro* and *in silico* on *T. cruzi* strain Y. The cytotoxicity of the substance in mammalian host cells (LLC-MK2) was evaluated by the MTT reduction assay, with a reduction in CC<sub>50</sub> values (concentration capable of reducing cell viability by 50%) observed, when compared to the treated group with Benznidazole (Bz). The evaluation of epimastigote forms was carried out by determining the percentage of viable parasites, HTMCX was able to inhibit cell proliferation (concentration and time dependent) at all concentrations tested (31.2; 62.5; 125; 250; 500; 1000 μM). In the trypomastigote forms, it demonstrated the ability to kill 50% of the parasites (LC<sub>50</sub>) in the four highest concentrations tested (125, 250, 500 and 1000 μM), with the highest concentration capable of killing around 98.82% of the parasites. When evaluating the relationship between the compound's cytotoxicity for mammalian host cells and the selectivity index (IS: CC<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub>), the substance showed better selectivity (5.66) when compared to Bz (3.11). HTMCX was able to reduce the percentage of infected cells, as well as the number of intracellular parasites, therefore demonstrating an anti-mastigote effect. Using flow cytometry assays, it was possible to infer possible mechanisms similar to necrosis and cell death, as well as the occurrence of oxidative stress, through increased ROS production and reduced ΔΨ<sub>m</sub>. In docking simulations, HTMCX interacted with trypanothione reductase (TR) residues, which can elucidate the biological effects presented. Thus, it was observed that the molecule under study demonstrated a trypanocidal effect in the tests carried out, as well as a significant reduction in toxicity on host cells. The inhibition of essential parasite enzymes may be related to a possible mechanism of action, evidenced through the induction of cell death mediated by membrane damage and oxidative stress.

Keywords: Chagas Disease; Acetophenone; Tripanothione Reductase.



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- [T(S)<sub>2</sub>] – Tripanotiona Dissulfeto;
- [T(SH)<sub>2</sub>] – Tripanotiona Ditiol;
- BCRJ – Banco de Células do Rio de Janeiro;
- BOD – Incubadora Bioquímica de Oxigênio;
- Bz – Benznidazol;
- CC<sub>50</sub> – Concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade das células hospedeiras de mamíferos;
- CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono;
- Cr – Cruzaína;
- CT – Controle;
- DC – doença de Chagas;
- DCF – 2',7'-diclorofluoresceína oxidada;
- DCFH<sub>2</sub> – 2',7'-diclorofluoresceína;
- DCFH<sub>2</sub>-DA – 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína;
- DFT: Teoria do Funcional da Densidade
- DMEM – Meio *Eagle Modificado de Dulbecco*;
- DMSO – Dimetilsulfóxido Estéril;
- DTN ou NTD – Doenças Tropicais Negligenciadas;
- EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético;
- ERO – Espécies Reativas de Oxigênio;
- FSC – *Forward Scatter*;
- GQTE – Grupo de Química Teórica e Eletroquímica
- HTMCX – 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona;
- IC<sub>50</sub> – Concentração capaz de inibir em 50% da proliferação de epimastigotas;
- IFR – Intensidade de Fluorescência Relativa;
- IS – Índice de Seletividade;
- LACEN – Laboratório Central de Saúde Pública;
- LAFEPE – Laboratório Farmacêutico de Pernambuco;
- LC<sub>50</sub> – Concentração letal para 50% dos parasitos;
- LGA – *Lamarckian Genetic Algorithm*;
- LIT – Meio Triptose de infusão de fígado;
- LLC-MK2 – Células epiteliais do rim do macaco *Rhesus*;

MMFF94 – *Merck Molecular Force Field*;

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

NADPH – Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina;

NFX – Nifurtimox;

OMS – Organização Mundial da Saúde;

PBS – Solução Salina Tamponada com Fosfato;

PLIP – *Protein-Ligand Interaction Profiler*;

PS – Fosfatidilserina;

RCSB – *Protein Data Bank*;

RMSD – *Root Mean Square Deviation*;

SBF – Soro Bovino Fetal;

SDS – Dodecilsulfato de Sódio;

SSC – *Side Scatter*;

TR – Tripanotona redutase;

UFC – Universidade Federal do Ceará;

USP – Universidade de São Paulo;

UVA – Universidade Federal do Vale do Acaraú;

$\Delta G$  – Energia de afinidade;

$\Delta\Psi_m$  – Potencial Transmembrânico Mitocondrial;

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Percentuais de viabilidade celular de células LLC-MK2 tratadas com as substâncias em estudo .....	42
Tabela 2 - Efeito tripanocida da HTMCX sobre as formas epimastigota de <i>T. cruzi</i> .....	44
Tabela 3 - Efeito tripanocida do Bz sobre as formas epimastigota de <i>T. cruzi</i> .....	46
Tabela 4 - Percentuais de viabilidade de formas tripomastigota de <i>T. cruzi</i> .....	47
Tabela 5 - Valores estimados de CC <sub>50</sub> , IC <sub>50</sub> e LC <sub>50</sub> para a substância em estudo .....	49
Tabela 6 - Efeito substância sobre as formas amastigota de <i>T. cruzi</i> .....	49
Tabela 7 - Percentuais de eventos celulares marcados com 7-AAD/AxPE .....	51
Tabela 8 - Percentuais de formas epimastigotas danificadas .....	51
Tabela 9 - Intensidade de fluorescência relativa de formas epimastigotas tratadas com a substância e marcadas com DCFH <sub>2</sub> -DA .....	53
Tabela 10 - Valores de intensidade de fluorescência de formas epimastigotas tratadas com a substância e marcadas com Rho123 .....	55

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Médico-sanitarista brasileiro Carlos Chagas .....	15
Figura 2 - Distribuição endêmica continental da DC .....	16
Figura 3 - Sinal de Romanã em uma criança .....	17
Figura 4 - Principais formas de desenvolvimento do <i>T. cruzi</i> .....	19
Figura 5 - Ciclo do <i>T. cruzi</i> nos hospedeiros vertebrados e invertebrados .....	21
Figura 6 - Estruturas moleculares do Bz (A) e NFX (B) .....	22
Figura 7 - Mecanismos de ação dos fármacos Bz e NFX .....	23
Figura 8 - Neutralização de ERO dependentes da TR .....	24
Figura 9 - Representação estrutural da HTMCX .....	26
Figura 10 - Reação de redução do sal de MTT a Formazan .....	31
Figura 11 - Contagem dos parasitos e das células LLC-MK2 em câmara de Neubauer .	32
Figura 12 - Citômetro de fluxo .....	37
Figura 13 - Citotoxicidade do CT, DMSO (V) e HTMCX em diferentes concentrações em células hospedeiras de mamíferos LLC-MK2 .....	43
Figura 14 - Citotoxicidade do Bz em diferentes concentrações em células hospedeiras de mamíferos LLC-MK2 .....	43
Figura 15 - Efeito tripanocida da substância sobre as formas epimastigota de <i>T. cruzi</i> .....	45
Figura 16 - Efeito tripanocida do grupo tratado com Bz sobre as formas epimastigota de <i>T. cruzi</i> .....	46
Figura 17 - Efeito da HTMCX sobre as formas tripomastigota de <i>T. cruzi</i> .....	47
Figura 18 - Efeito do Bz sobre as formas tripomastigota de <i>T. cruzi</i> .....	47
Figura 19 - Efeito antiastigota da substância em estudo sob cepa Y de <i>T. cruzi</i> .....	50
Figura 20 - Células epimastigotas que apresentaram marcação com 7-AAD em avaliação por citometria de fluxo .....	52

Figura 21 - Perfil de morte celular induzido pela HTMCX sobre as formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> através por citometria de fluxo .....	52
Figura 22 - Intensidade de fluorescência relativa de formas epimastigotas tratadas com a substância e marcadas com DCFH2-DA por citometria de fluxo .....	54
Figura 23 - Intensidade de fluorescência relativa de formas epimastigotas tratadas com a substância e marcadas com Rho123 por citometria de fluxo .....	55
Figura 24 - Complexo de interação do receptor Cr com HTMCX e Bz .....	56
Figura 25 - Complexo de interação do receptor TR com HTMCX (A) e Bz (B) .....	58

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>15</b>
1.1. Histórico e epidemiologia da doença de Chagas .....	15
1.2. Sinais, sintomas e transmissão da doença de Chagas .....	17
1.3. Fisiologia e ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	19
1.4. Terapêutica da doença de Chagas .....	21
1.5. Delineamento de novos fármacos para a terapia antichagásica .....	23
1.5.1. <i>Tripanotiona reductase (TR)</i> .....	24
1.5.2. <i>Cruzaína (Cr)</i> .....	24
1.6. Produtos naturais como fonte de substâncias bioativas .....	25
1.6.1. <i>2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona (HTMCX)</i> .....	25
1.7. Justificativa .....	27
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
2.1. Objetivo Geral .....	29
2.2. Objetivos Específicos .....	29
<b>3.MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
3.1. Obtenção da substância de estudo .....	30
3.2. Avaliação da citotoxicidade em células hospedeiras de mamíferos .....	30
3.3. Avaliação do efeito sobre formas epimastigota de <i>T. cruzi</i> cepa Y .....	33
3.4. Avaliação do efeito em formas tripomastigota de <i>T. cruzi</i> cepa Y.....	34
3.5. Avaliação do efeito sobre formas amastigota de <i>T. cruzi</i> cepa Y .....	35
3.6. Ensaio de citometria de fluxo .....	36
3.6.1. <i>Análise do perfil de morte e integridade celular</i> .....	37
3.6.2. <i>Acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) citoplasmáticas</i> .....	38
3.6.3. <i>Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial (<math>\Delta\Psi_m</math>)</i> .....	39
3.7. Estudos <i>in silico</i> .....	40
3.7.1. <i>Obtenção e preparo dos ligantes</i> .....	40
3.7.2. <i>Obtenção e preparo dos alvos proteicos</i> .....	40
3.7.3. <i>Simulações de docking molecular</i> .....	41
3.7.4. <i>Análise dos modos de ligação e interações receptor-ligante</i> .....	41
3.8. Análises estatísticas .....	41
<b>4.RESULTADOS</b> .....	<b>42</b>

4.1. Análise da substância obtida .....	42
4.2. Citotoxicidade das substâncias em células LLC-MK2 .....	42
4.3. Efeito tripanocida em formas epimastigotas .....	44
4.4. Efeito tripanocida em formas tripomastigotas .....	47
4.5. Efeito sobre as formas amastigotas intracelulares .....	49
4.6. Ensaio do perfil de morte e integridade celular .....	50
4.7. Acúmulo citoplasmático de espécies reativas de oxigênio .....	53
4.8. Efeito no potencial transmembrânico mitocondrial .....	54
4.9. Estudos <i>in silico</i> de interação com a enzima cruzaina (Cr) .....	56
4.10. Estudos <i>in silico</i> de interação com a enzima tripanotona redutase (TR) .....	57
5. DISCUSSÃO .....	59
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	64
REFERÊNCIAS .....	65
APÊNDICE A .....	83
APÊNDICE B .....	84
APÊNDICE C .....	85

## 1 INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1. Histórico e epidemiologia da doença de Chagas

A doença de Chagas (DC), causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, é uma condição que pode ser assintomática, mas que pode progredir para formas cardíaca e/ou digestiva (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Foi descrita pela primeira vez no ano de 1909 no município de Lassance, pelo médico, pesquisador e cientista, Dr. Carlos Chagas (Figura 1) (CHAO; LEONE; VIGLIANO, 2020).

Figura 1: Médico-sanitarista brasileiro Carlos Chagas.



Fonte: Acervo Biografia resumida – Carlos Chagas. Acesso em 27/06/2023.

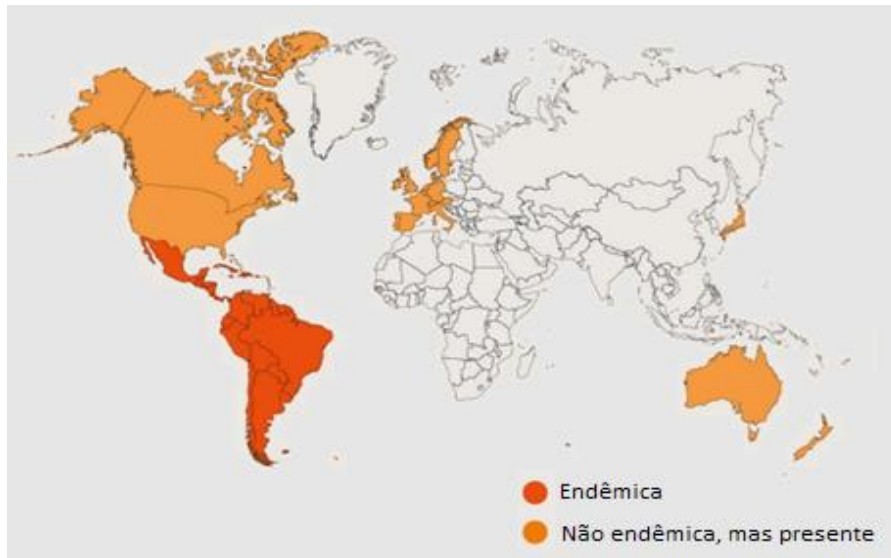
De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2023), a DC faz parte do rol de doenças tropicais negligenciadas (DTN ou NTD), que afetam as populações que vivem em condições de pobreza e vulnerabilidade social. Com relação aos determinantes biológicos, podemos citar a virulência do parasito e a suscetibilidade das pessoas afetadas, já sobre os determinantes sociais temos pobreza, alimentação, moradia e educação, entre outros (PEREIRA-SILVA *et al.*, 2022).

A DC foi originada e distribuída extensivamente no continente americano (Figura 2), onde foi popularmente denominada de Tripanossomíase Americana. Devido ao grande processo de migração das populações pelo mundo, a DC espalhou-



se mundialmente. Atualmente, é considerada um dos problemas de saúde pública mais graves na América Latina, sendo uma das endemias mais amplamente distribuída no continente (WHO, 2023).

Figura 2: Distribuição endêmica continental da DC.



Fonte: Adaptado de DNDI, 2020. (<https://dndial.org/doencas/doenca-de-chagas/>). Acesso em 27/06/2023.

Em áreas endêmicas, estima-se que existam em torno de 6 a 7 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi*. E que anualmente no mundo morrem, aproximadamente, 6 mil pessoas, em decorrência das complicações da DC na fase crônica. A transmissão aos humanos normalmente ocorre de modo vetorial, através do contato com os excrementos (urina e fezes) de triatomíneos infectados (OMS, 2023).

De acordo com o Boletim Epidemiológico de 2021, foram confirmados 146 casos de DC no território brasileiro, com uma taxa de letalidade de 2% (3/146), sendo que todos os óbitos ocorreram no estado do Pará. A região Norte apresentou a maior taxa de incidência da doença (0,74/100.000 habitantes), enquanto as regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste as menores taxas (0,00/100.000 habitantes), com destaque para a última, a qual nenhum caso foi registrado. A região Nordeste apresentou uma taxa de incidência de 0,01/100.000 habitantes. Quanto à mortalidade, entre março e agosto de 2020, foram notificados 1.746 óbitos por DC, predominantes nas regiões Nordeste e Sudeste. No entanto, é possível que haja uma significativa taxa de subnotificação em decorrência da pandemia ocasionada por SARS-CoV-2 (BRASIL, 2021; ZAIDEL *et*

*al.*, 2020).

No Ceará, o Laboratório Central de Saúde Pública do estado do Ceará (LACEN) realizou 37.188 testes para DC crônica. Ao todo, foram registradas 1.062 amostras positivas para DC, no período de 2015 a 2020, ou seja, cerca de 3% do total. Ainda nesse período, 327 óbitos foram registrados, apresentando uma mortalidade de 0,8 óbito/100.000 habitantes, com prevalência no sexo masculino. Com relação a transmissão vetorial, o estado apresenta 64 (34,81%) municípios com alto risco, 69 (37,5%) com médio risco e 51 (22,7%) com baixo risco (CEARÁ, 2021).

## 1.2. Sinais, sintomas e transmissão da doença de Chagas

A DC apresenta evolução clínica em duas fases: aguda e crônica. Durante a fase aguda, é comum a presença de sintomas como febre, fadiga, inchaço nas pálpebras, gânglios linfáticos inchados, dor muscular, dor de cabeça e inchaço no local da picada do inseto vetor. Além disso, pode ocorrer inchaço e vermelhidão em torno dos olhos, conhecido como "sinal de Romana" (Figura 3). Outros sintomas podem incluir falta de apetite, náuseas, vômitos e diarreia. Ainda nesta fase, o parasito é detectável no sangue por exames laboratoriais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Com o tempo, a maioria das pessoas infectadas entra em uma fase assintomática crônica da doença. Cerca de 1-5% de todos os casos agudos desenvolvem uma fase aguda severa, com ocorrência de manifestações como meningoencefalite e miocardite (SIMÕES *et al.*, 2018).

Figura 3: Sinal de Romanã em uma criança.



Fonte: CDC image courtesy of the WHO/TDR Image Library, 2023. (Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt/profissional/multimedia/image/sinal-de-roma%C3%B1a>). Acesso em 27/06/2023.

A fase crônica da DC é caracterizada pela ausência de sintomas ou pela

presença de sintomas leves e inespecíficos que podem se desenvolver décadas após a infecção inicial. Os principais órgãos afetados na fase crônica são o coração, o sistema digestivo e o sistema nervoso (SIMÕES *et al.*, 2018). Os sintomas podem variar amplamente de uma pessoa para outra, dependendo dos órgãos afetados. No sistema cardiovascular, a doença pode levar a alterações no funcionamento do coração, causando arritmias cardíacas, insuficiência cardíaca congestiva, dilatação do coração (cardiomiopatia chagásica) e trombose intracardíaca. Nesta fase, a carga parasitária apresenta-se baixa ou indetectável e a sorologia permanece positiva (FIOCRUZ, 2017).

No sistema digestivo, podem ocorrer problemas como dilatação e disfunção do esôfago e do cólon, causando dificuldade de deglutição, regurgitação, constipação ou diarreia crônica, além de danos ao fígado e ao baço. No sistema nervoso, a Doença de Chagas pode causar danos aos nervos periféricos e ao sistema nervoso central, resultando em sintomas como fraqueza muscular, dificuldades de coordenação e movimento, tremores, alterações de sensibilidade e problemas (ECHAVARRÍA *et al.*, 2021; PUNUKOLLU *et al.*, 2007; VELASCO; MORILLO, 2020; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Destaca-se que não são todas as pessoas infectadas que desenvolvem a fase crônica da doença, bem como não são todas que desenvolvem que apresentam sintomas graves. No entanto, as complicações crônicas da DC podem ser graves e afetar significativamente a qualidade de vida dos pacientes. Os danos aos órgãos decorrentes da infecção pelo parasito são secundários ao efeito direto, relacionados sobretudo à reação imune com a finalidade de controlar o parasito, através da ativação das respostas imunes inata e humoral (BERN, 2015). O diagnóstico e tratamento precoces são fundamentais para evitar a progressão da doença e suas complicações.

As principais vias de transmissão são classificadas como primárias e secundárias. A transmissão primária ocorre através da picada de triatomíneos (vetorial, a forma mais comum de transmissão), congênita e oral. Enquanto as vias de transmissão secundária incluem a transfusão sanguínea, transplante de órgãos, acidentes de laboratório, manuseio de animais infectados etc. É importante ressaltar que a transmissão secundária da DC é menos comum do que a transmissão primária, que ocorre principalmente através da picada de triatomíneos e da transmissão congênita doadores (COURA, 2015).

Como mencionado, a principal forma de transmissão da DC se dá através de

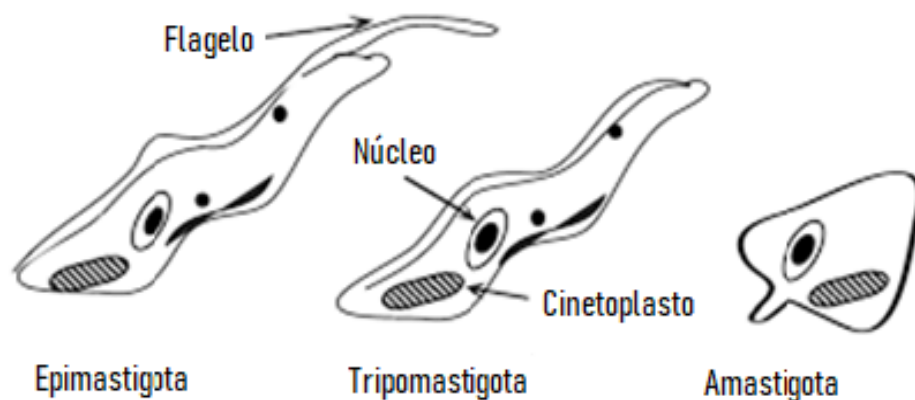
insetos conhecidos como triatomíneos ou barbeiros, que são vetores naturais do parasito. Esses insetos são encontrados principalmente em áreas rurais e carenciais da América Latina, onde a doença é endêmica. A infecção ocorre quando o vetor infectado pica uma pessoa e defeca próximo ao local da picada, permitindo que os parasitos penetrem no corpo através da pele ou das mucosas, como a conjuntiva do olho ou a mucosa bucal. A pessoa pode se infectar ao coçar a picada e introduzir o parasito pelo contato com as mucosas ou através de lesões na pele (ARGOLO *et al.*, 2008)

É importante ressaltar que a DC não é transmitida de pessoa para pessoa, exceto nos casos de transmissão congênita. Esta pode ocorrer durante qualquer fase da gestação, especialmente a partir do sexto mês até o parto, através da disseminação hematogênica, podendo ocasionar nascimentos prematuros e abortos espontâneos (SANTANA *et al.*, 2020).

### 1.3. Fisiologia e ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

No ciclo biológico do *T. cruzi* existem dois hospedeiros: o invertebrado e o vertebrado. Durante os seus estágios de desenvolvimento, evidenciam-se três principais formas de sobrevivência: epimastigota, tripomastigota e amastigota (Figura 4). As diferenças morfológicas entre essas formas são: o formato, a disposição e de onde emergem o flagelo e a membrana ondulante, além da posição do cinetoplasto em relação ao núcleo celular (FIOCRUZ, 2017).

Figura 4: Principais formas de desenvolvimento do *T. cruzi*.



Fonte: Adaptado

de [https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/3851034/mod\\_resource/content/3/Aula%20Trypanosoma%20cruzi%20para%20Enfermagem%20junto%20com%20aula%20pratica%202015.pdf](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/3851034/mod_resource/content/3/Aula%20Trypanosoma%20cruzi%20para%20Enfermagem%20junto%20com%20aula%20pratica%202015.pdf). Acesso em 08/07/2023.

A forma epimastigota apresenta cinetoplasto em forma bastão localizado

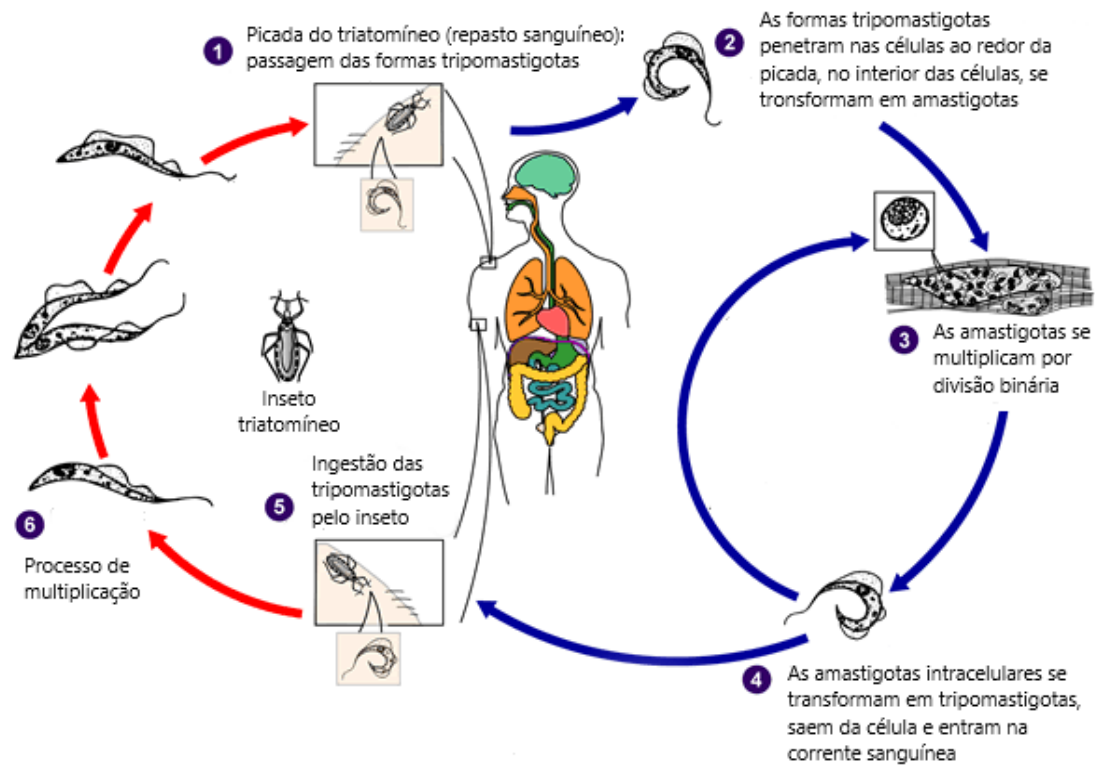
anteriormente ao núcleo. O flagelo surge a partir da bolsa flagelar com abertura lateral, aderindo a parte do corpo do parasito, tornando-se desprendido na região anterior. Pode ser encontrado no tubo digestivo do inseto vetor. A forma tripomastigota exibe formato cinetoplasto com formato arredondado localizado na região posterior ao núcleo, flagelo emergindo da bolsa flagelar invisível. Esta forma é potencialmente infectante, podendo ser encontrada no inseto vetor (no reto e na porção posterior do intestino), sangue e espaço intercelular dos hospedeiros vertebrados, culturas de células infectadas, cultivo axênico (metacicloênese *in vitro*). A forma amastigota é arredondada, possui cinetoplasto em forma de bastão na região anterior ao núcleo, flagelo invisível e curto que emerge da bolsa flagelar. Pode ser encontrada no interior de células em hospedeiros infectados, bem como em cultivo axênico (FIOCRUZ, 2017).

O ciclo de vida inicia-se quando o triatomíneo infectado realiza o repasto sanguíneo, depositando na pele do hospedeiro vertebrado seus dejetos contendo formas tripomastigotas metacíclicas. Estas penetram pelo local da picada, atingem a corrente sanguínea e são levadas para diferentes tecidos. Nas células, elas provocam mudanças na estrutura da membrana plasmática, permitindo a sua internalização. Dessa forma, a célula infectada retém o parasito em uma estrutura denominada por vacúolo parasitóforo (BERN *et al.*, 2019).

Prontamente, os lisossomos celulares se fundem ao vacúolo parasitóforo, dando origem ao fagolisossomo. A liberação das enzimas após a fusão favorecem a eliminação dos parasitos. No entanto, as formas tripomastigotas se diferenciam em amastigotas, resistentes aos mecanismos de defesa celular, e assim, multiplicam-se mitoticamente e diferenciam-se em novas formas de tripomastigotas, que provocam lise celular e passam para a corrente sanguínea, reiniciando o ciclo no hospedeiro (BERN *et al.*, 2019).

Durante o seu repasto sanguíneo no hospedeiro infectado, o triatomíneo se infecta com formas tripomastigota, que, ao chegarem no estômago do vetor, diferenciam-se em epimastigotas. No intestino médio, estas multiplicam-se, seguindo para o intestino inferior, onde diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicas, que podem ser expelidas sob superfícies durante o repasto sanguíneo barbeiro, reiniciando novamente o ciclo no hospedeiro (BERN *et al.*, 2019), como esquematizado na figura 5. Vale ressaltar que o controle efetivo do vetor e medidas de prevenção são fundamentais para interromper a transmissão da DC.

Figura 5: Ciclo do *T. cruzi* nos hospedeiros vertebrados e invertebrados.



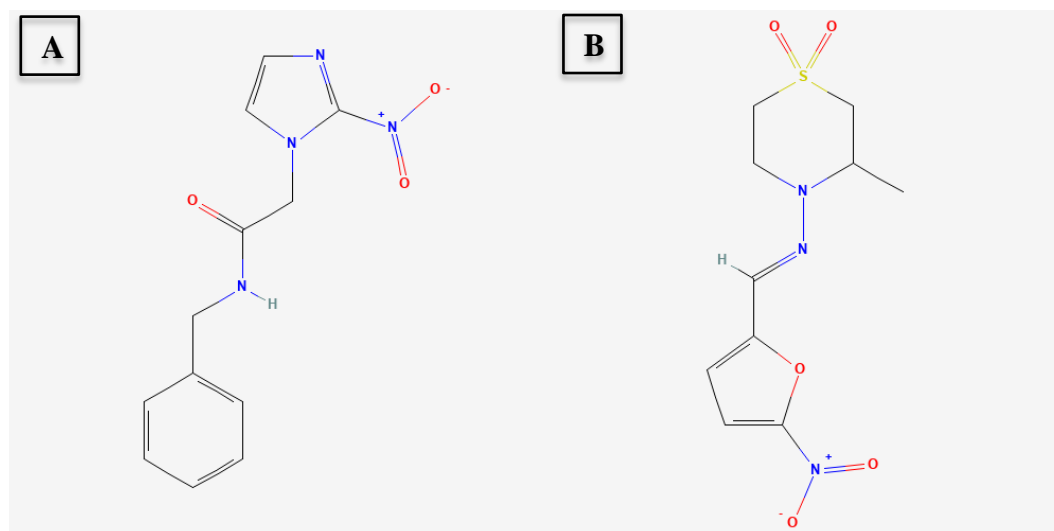
Fonte: Adaptado de Manual MSD (Disponível em : <https://www.msmanuals.com/pt/profissional/multimedia/image/ciclo-de-vida-do-trypanosoma-cruzi>).%20Acesso%20em:%202008/07/2023.

#### 1.4. Terapêutica da doença de Chagas

Atualmente, as terapias farmacológicas disponíveis e utilizadas para a DC são o benznidazol (Bz) (Figura 6-A) e o nifurtimox (NFX) (Figura 6-B). Ainda não existem vacinas direcionadas ao seu tratamento (BERMUDEZ *et al.*, 2016). Esses medicamentos têm ação antiparasitária e são capazes de reduzir a carga parasitária no organismo, controlar a replicação do *T. cruzi* e diminuir a progressão da doença.

O Bz é administrado por via oral, em forma de comprimidos, e o tratamento geralmente dura de 60 a 90 dias. O nifurtimox também é administrado por via oral, em forma de comprimidos, e o tempo de tratamento varia de acordo com o estágio da doença. O tratamento farmacológico é indicado na fase aguda, em formas congênitas, em infecções reativadas, em crianças menores de 18 anos e indivíduos com a forma crônica indeterminada (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Portanto, é fundamental realizar o diagnóstico precoce da doença e iniciar o tratamento o mais cedo possível.

Figura 6: Estruturas moleculares do Bz (A) e NFX (B).



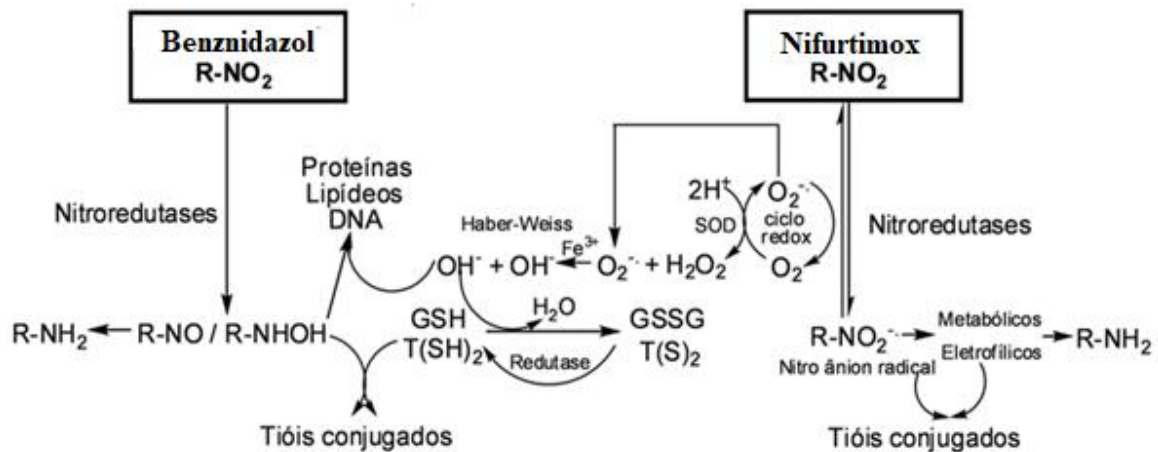
Fonte: PubChem (Disponíveis em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31593>, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6842999>). Acesso em 10/01/2024.

Esses fármacos são utilizados há mais de cinco décadas e apresentam segurança e eficácia bastante limitadas, além do mais, os mecanismos de ação ainda vem sendo discutido (JACKSON; WYSSA; CHAPPUIS, 2020). Os resultados obtidos com esse tratamento variam de acordo com: a idade e a origem dos indivíduos, a dose, e a fase da doença (CASTRO; SOEIRO, 2017). Os dois medicamentos demonstram excelentes resultados quando se tem altas taxas parasitológicas durante a fase aguda, mas a eficácia decai com o avanço da infecção (COURA; BORGES-PEREIRA, 2011).

Ademais, adultos manifestam elevados efeitos colaterais à medicação (PEREZ-MOLINA *et al.*, 2009), enquanto crianças apresentam uma maior tolerância (DIAS *et al.*, 2016). Um estudo recente revelou que os efeitos colaterais mais leves do NFX podem ser controlados com a redução na dosagem até a suspensão temporária do medicamento (CASTRO; SOEIRO, 2017). Devido aos benefícios, maior tolerância e eficácia, o tratamento com Bz é preconizado (LOSADA GALVÁN *et al.*, 2021).

O possível mecanismo de ação do Bz está associado a formação metabólitos eletrofílicos e de radicais livres a partir da redução do grupo nitro a um grupo amino pela ação das nitroredutases (MAYA *et al.*, 2007; WILKINSON *et al.*, 2008). Enquanto o mecanismo de ação do NFX está voltado a sua redução parcial em um radical nitro-aniônico, seguido pela auto-oxidação para regenerar o nitrofurano original e produzir superóxido e outras espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (Figura 7) (FERREIRA, 2019).

Figura 7: Mecanismos de ação dos fármacos Bz e NFX.



Fonte: Adaptado de Dias *et al.*, 2009.

Entretanto, ainda ocorrem inúmeras dificuldades em relação ao manejo da DC quanto a descoberta de novas terapias eficazes, conhecimento quanto sua fisiopatologia, as interações parasito-hospedeiro etc (CHAO; LEONE; VIGLIANO, 2020). Além disso, Petravicus e colaboradores (2019) apontam a existência de cepas de *T. cruzi* resistentes ao Bz.

Existe ainda o baixo interesse da indústria farmacêutica, determinante para desenvolvimento de novos fármacos, tendo em vista que a DC é uma doença que atinge, principalmente, países com populações de baixo poder aquisitivo e países subdesenvolvidos, pois trata-se de uma doença negligenciada, assim como a leishmaniose, por exemplo (DNDI, 2021; THE LANCET, 2019).

Portanto, evidencia-se a importância de novas alternativas terapêuticas. Estudos revelam que a síntese e prospecção de novas moléculas (DE MENEZES *et al.*, 2019) e a nanotecnologia (TESSAROLO *et al.*, 2018), são exemplos de estratégias que vêm sendo empregadas para a síntese de novos fármacos antichagásicos (KRATZ, 2019).

### 1.5. Delineamento de novos fármacos para a terapia antichagásica

Tendo em vista as dificuldades quanto ao manejo da doença, faz-se necessária a pesquisa de alternativas terapêuticas, considerando a elevada toxicidade e a limitada efetividade dos medicamentos usados na fase crônica da DC. Nesse contexto, estudos têm sido realizados a fim de esclarecer os processos vitais à vida dos tripanossomatídeos, visando o desenvolvimento de inibidores seletivos capazes de



interferir nesses processos e, assim, combater o parasito. Desse modo, as enzimas, tripanotiona redutase e cruzaina, destacam-se por exercerem papel fundamental na conservação do parasito no hospedeiro vertebrado (BATISTA *et al.*, 2015; PALOS *et al.*, 2017).

### 1.5.1 *Tripanotiona redutase (TR)*

Na resposta imune mediada contra *T. cruzi*, macrófagos e neutrófilos liberam espécies reativas de oxigênio (ERO). No entanto, o parasito apresenta um sistema antioxidante intracelular capaz de neutralizar essas ERO, interferindo positivamente na sua sobrevivência e proliferação no organismo (PIACENZA; TRUJILLO; RADI, 2019).

A tripanotiona redutase (TR) encontra-se no citoplasma e na mitocôndria do *T. cruzi*, e tem como papel principal combater o estresse oxidativo mediado por ERO, tanto de origem endógena quanto exógena (TETAUD *et al.*, 2001). Assim, constitui-se como um potencial alvo no desenvolvimento de alternativas terapêuticas para o desenvolvimento de moléculas com potencial tripanocida (MAGALHÃES, 2021).

Figura 8: Neutralização de ERO dependentes da TR.



TR: Tripanotiona Redutase  
 TXN: Triparedoxina  
 TXNPx: Triparedoxina peroxidase

Fonte: Adaptado de Oliveira *et al.*, 2008.

Esta enzima é dependente de NADPH (Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina) e catalisa a redução da tripanotiona dissulfeto [T(S)<sub>2</sub>] em tripanotiona ditiol [T(SH)<sub>2</sub>], manifestando uma cascata de eventos responsáveis pela neutralização de espécies reativas de oxigênio. Desse modo, a TR mantém um ambiente redutor no interior do parasito, protegendo-o contra o estresse oxidativo (Figura 8) (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

### 1.5.2 *Cruzaína (Cr)*

A cruzaína (Cr) de *T. cruzi*, ou cruzipaína, caracterizada por ser uma peptidase do tipo catepsina L-like, é a principal cisteína protease presente nas formas de vida do *T. cruzi*. É composta por um domínio do tipo  $\alpha$ -hélice e outro folha- $\beta$ -pregueada, e o seu sítio ativo encontra-se localizado na conexão entre essas duas subunidades (BARBOSA DA SILVA *et al.*, 2019; BRAK *et al.*, 2010). Ela se expressa em diferentes locais de acordo com a forma evolutiva do *T. cruzi*.

A Cr participa da adesão entre o parasito e o intestino do barbeiro e é crucial durante a metaciclogênese, processo de transformação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos. Logo, contribui diretamente com a virulência das diferentes cepas de *T. cruzi*, visto que foram observadas diferenças importantes na expressão de Cr em cepas distintas de *T. cruzi* (LOSINNO *et al.*, 2021).

No ser humano, a Cr participa do processo de invasão das células. Ademais, também exerce papel relevante na evasão à resposta imune do hospedeiro, através do impedimento da ativação do sistema complemento e do síntese de fatores de transcrição pró-inflamatórios, como o NF- $\kappa$ B, da degradação de anticorpos, e da resposta imune celular (DOYLE *et al.*, 2011; PONCE *et al.*, 2013; SCHARFSTEIN, 2018). Estudos com inibidores de cruzaína mostraram um aumento da concentração de compostos no Complexo de Golgi do *T. cruzi*, culminando com a morte do parasito. Portanto, a Cr está relacionada com a deterioração de compostos tóxicos para o parasito (MOREIRA *et al.*, 2017).

## **1.6. Produtos naturais como fonte de substâncias bioativas**

O uso de plantas com a finalidade terapêutica é uma tradição ancestral presente nas diferentes culturas e nações, e constitui-se como um recurso alternativo de grande aceitação, não somente nas comunidades rurais, mas também nos centros urbanos. As plantas são capazes de produzir uma infinidade de substâncias químicas que são biossintetizadas com vários propósitos, das quais podemos citar: protegê-las contra predadores ou atrair polinizadores. Dessa forma, a comunidade científica tem realizado inúmeros estudos a fim de comprovar a eficácia e promover o uso seguro desses recursos naturais (LI *et al.*, 2020).

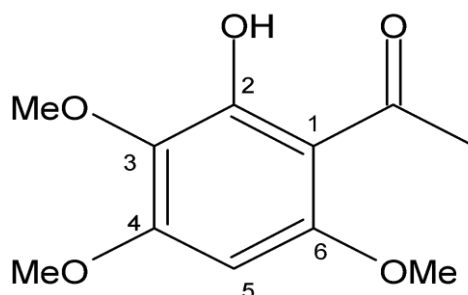
### *1.6.1 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona (HTMCX)*

A família Euphorbiaceae pertence a um dos maiores grupos de dicotiledôneas do mundo com presença expressiva em regiões tropicais como, por exemplo, os continentes americano e africano (ARAÚJO JÚNIOR *et al.*, 2017). Dentre os gêneros nativos do Brasil, destaca-se o gênero *Croton sp.* com cerca de 700 espécies, das quais podemos citar a *C. anisodontus*, a *C. nepetaefolius* e a *C. anisodontus* Müll.Arg.

As avaliações fitoquímicas para *C. anisodontus* revelam a presença de terpenóides (componente majoritário para a maioria de espécies do gênero *Croton sp.*), alcaloides, triterpenos, esteroides, chalconas e flavonoides entre outros igualmente provenientes do metabolismo secundário de plantas que assumem a função de agentes facilitadores da alteração conformacional das membranas microbianas, como também estimuladores para a ativação ou bloqueio de reações enzimáticas das mesmas (RÍOS; RECIO, 2005; FIRMO *et al.* 2011)

O composto natural em estudo foi obtido pela primeira vez a partir de *C. nepetaefolius*, popularmente chamado de marmeleiro vermelho. Não obstante, a substância química (Figura 9) também foi isolada do *C. anisodontus* Müll.Arg., espécie endêmica nativa da caatinga nordestina, que tem sido objeto de investigações em busca de compostos de interesse químico e biológico (SANTIAGO, 2018).

Figura 9: Representação estrutural da HTMCX.



Fonte: Adaptado de SANTOS, 2008.

Estudos revelam que a espécie *C. anisodontus*, por sua vez, apresenta um perfil antimicrobiano eficaz contra cepas bacteriana (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*) e fúngica (*Candida albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*) (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Embora, apesar da gama de aplicações destes compostos naturais, pouco se sabe dos mecanismos e das propriedades estruturais e vibracionais da substância HTMCX.

## 1.7. Justificativa

A DC é uma enfermidade endêmica causada pelo *T. cruzi* presente no rol de doenças negligenciadas, as quais afligem preferencialmente ou exclusivamente países em desenvolvimento (OMS, 2023). Estes apresentam pouco incentivo à pesquisa, ao desenvolvimento tecnológico e à inovação de produtos necessários para a saúde das populações. Ademais, o fármaco preconizado no Brasil, Bz, apresenta elevada toxicidade e a limitada efetividade na fase crônica da doença.

É sabido que as doenças parasitárias necessitam de atenção fundamental, tanto devido ao aumento significativo da resistência dos parasitos quanto à disponibilidade de agentes terapêuticos. Os medicamentos utilizados para o tratamento da DC apresentam eficácia limitada além de diversos efeitos colaterais (CUNHA, 2017). Nesse cenário, muitos grupos de pesquisa estudam moléculas promissoras para o desenvolvimento de novas terapias antichagásicas.

Dentre os métodos mais modernos para o desenvolvimento de terapias antichagásicas, destacam-se os alvos terapêuticos enzimáticos, dentre elas as enzimas cruzafina e tripanotiona redutase, que são de extrema importância para a sobrevivência e infectividade parasitária no organismo hospedeiro (BOMBAÇA *et al.*, 2019; FERREIRA; ANDRICOPULO, 2017; RIVERA *et al.*, 2009; SANTOS NASCIMENTO; DE AQUINO; DA SILVA-JÚNIOR, 2021). Desse modo, o desenvolvimento de substâncias inibidoras dessas enzimas constitui uma estratégia importante e promissora (MAGALHÃES, 2021).

Pesquisas resultantes de análises de compostos bioativos provenientes de recursos naturais salientam a diversidade de componentes químicos que existem em espécies vegetais referentes à vários grupos botânicos, sobretudo em países com um vasto bioma, como o Brasil, que são capazes de promover resultados satisfatórios contra quadros clínicos de diferentes causas (LOPES, 2019).

As acetofenonas possuem uma variedade de atividade farmacológica e atraentes propriedades químicas. Estudos preliminares colocam a acetofenona (C<sub>11</sub>O<sub>5</sub>H<sub>14</sub>) como fonte de atividade antimicrobiana (SANTIAGO, 2018). Assim, essa classe de moléculas torna-se promissora para o desenvolvimento de novas moléculas, em especial, com atividade antichagásicas.

Dada à necessidade de desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos eficazes e menos tóxicos, a substância em estudo apresenta-se com grande potencial, como em modelos estruturais e fonte de substâncias de interesse farmacológico. Entretanto, poucos são os estudos e os recursos voltados a esta pesquisa. Dessa maneira, tendo em vista o potencial farmacológico de substâncias de origem vegetal, aliado à necessidade de alternativas terapêuticas para o tratamento da DC, o presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito tripanocida da HTMCX *in vitro* e *in silico* em cepa Y de *T. cruzi*, visando a busca por novas alternativas terapêuticas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito tripanocida *in vitro* e *in silico* e possíveis mecanismos de ação da HTMCX sobre cepa Y de *T. cruzi*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade da molécula sobre células hospedeiras de mamíferos;
- Analisar o potencial tripanocida sobre as principais formas de sobrevivência de *T. cruzi*;
- Investigar os perfis de eventos de morte celular induzidos pela HTMCX sobre *T. cruzi*;
- Avaliar os efeitos da acetofenona sobre a produção de espécies reativas de oxigênio e sobre o potencial transmembrânico mitocondrial em *T. cruzi*.
- Identificar as possíveis interações das moléculas em estudo com as enzimas cruzaina e tripanotiona redutase de *T. cruzi*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção da substância de estudo

A substância foi cedida pelo Laboratório de Química de Produtos Naturais, da Universidade Estadual do Vale do Acaraú (UVA), coordenado pelo Prof. Dr. Hécio Silva dos Santos. O seu isolamento ocorreu sob a forma de um sólido cristalino amarelo com ponto de fusão de 108,5-110,6 °C a partir da casca do caule de *Croton anisodontus* e caracterizado como descrito por Santos e colaboradores (2008).

O fármaco de referência, Bz, foi cedido pelo Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE). As soluções estoque foram preparadas com dimetilsulfóxido estéril (DMSO) puro e as soluções de trabalho foram preparadas através de diluição com Tampão Fosfato Estéril (PBS, preparado a partir 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%.

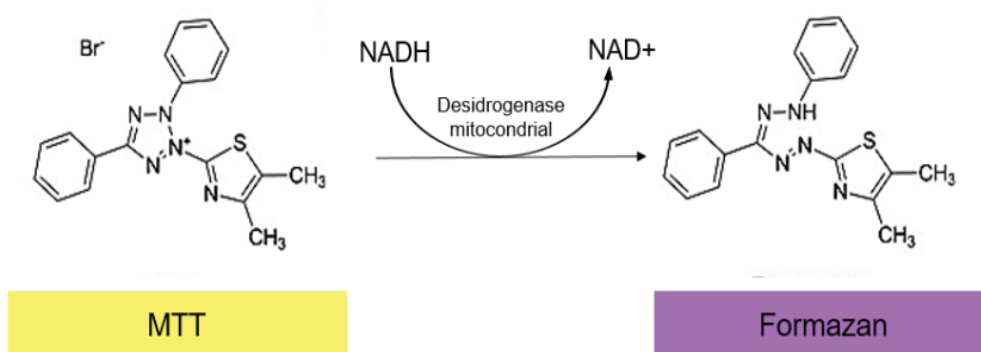
#### 3.2 Avaliação da citotoxicidade em células hospedeiras de mamíferos

Para avaliar a citotoxicidade em células hospedeiras de mamíferos, bem como a seletividade pelo *T. cruzi* em relação à estas, foi utilizada a linhagem de células LLC-MK2 (ATCC CCL-7), células epiteliais oriundas dos túbulos renais de macaco (*Macaca mulatta*). As células foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, pH 7,4), suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) e antibióticos (estreptomicina: 130 mg.mL<sup>-1</sup>; penicilina: 200 UI.mL<sup>-1</sup>), e cultivadas em garrafas plásticas estéreis (75 cm<sup>2</sup>) em estufa de CO<sub>2</sub> (37,0 ± 0,3°C, 5% de CO<sub>2</sub>) até atingirem a confluência.

Logo após, o meio foi retirado, e as células foram lavadas com PBS estéril e deslocadas com 1 mL de solução de Tripsina/EDTA (0,25%/0,04%), incubadas por 5 a 10 minutos a 37°C, e a tripsina inativada com 2 mL de meio DMEM 10% SBF. Para a manutenção da cultura, as alíquotas foram transferidas para garrafas novas com o meio de cultura. Para o congelamento, após a lavagem e deslocamento das células, foram centrifugadas (4.000 rpm por 5 minutos), o meio removido, e o *pellet* ressuspensão em solução de congelamento (95% SBF e 5% DMSO estéril). As células obtidas foram armazenadas em nitrogênio líquido.

Para avaliação da citotoxicidade das substâncias foi utilizado o ensaio de redução do MTT [Brometo de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio] (Figura 10), descrito por Mosmann (1983). Em que o sal de MTT (cor amarela) é absorvido pelas células viáveis, e é reduzido por enzimas intracelulares a um sal insolúvel (cor arroxeadada/azulada): o sal de formazan, que é solúvel na presença de surfactantes. Desse modo, a concentração de formazan é mensurada através espectrofotômetro a 570 nm, e sua quantificação sendo diretamente proporcional à quantidade de células viáveis.

Figura 10: Reação de redução do sal de MTT a Formazan.

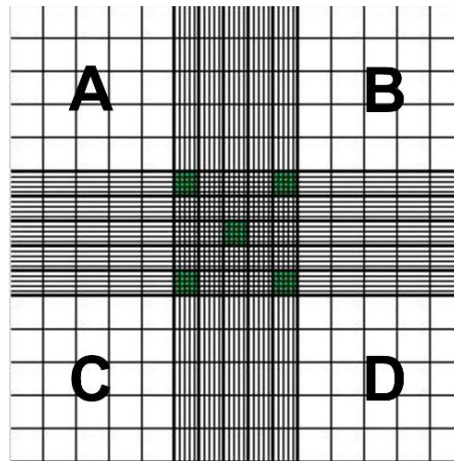


Fonte: Embrapa. Disponível em: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/191253/1/CT-427-1572-final2.pdf>>. Acesso em 10/01/2024.

As culturas em confluência foram lavadas e tripsinizadas. Logo após, foram transferidas para um tubo de fundo cônico, centrifugadas (4.000 rpm por 5 minutos), sendo o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspensão em 1 mL de meio DMEM 10% SBF, e uma alíquota foi diluída em solução de azul de trypan (0,4% m/v em PBS) nas proporções de 1:10 e 1:100, sendo esta segunda transferida para a câmara de Neubauer. A densidade celular foi calculada através da contagem das células hospedeiras LLC-MK2 nos quatro campos maiores (A, B, C e D), enquanto a contagem de parasitos (formas epimastigota e tripomastigota) foi realizada nos cinco campos verdes centrais (Figura 11).



Figura 11: Contagem dos parasitos e das células LLC-MK2 em câmara de Neubauer.



Fonte: MAGALHÃES, 2021.

A densidade celular (células.mL<sup>-1</sup>) foi calculada através da equação 1, ajustada para 10<sup>5</sup> células.mL<sup>-1</sup> e aliqotada para placas estéreis de 96 poços (200 µL/poço).

Equação 1: Cálculo da densidade celular em câmara de Neubauer.

$$Densidade\ celular = \frac{Contagem}{4} \times Fator\ de\ diluição \times 10^4$$

As placas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> *overnight* (12h) e, em seguida, os poços foram tratados com HTMCX (31,2µM; 62,5µM; 125µM; 250µM; 500µM; e 1000 µM) ou Bz (1000-31,25 µM). Como controle negativo, foram utilizados grupos não tratados, e células tratadas com DMSO 0,5% para avaliação da citotoxicidade do veículo. Os poços contendo apenas meio de cultura foram utilizados como branco.

Após 24 horas de incubação em estufa de CO<sub>2</sub>, cada poço foi lavado com 100 µL de PBS estéril, e 10 µL de solução de MTT (2,5 mg.mL<sup>-1</sup>) foram adicionados, juntamente com 90 µL de DMEM 10% SBF. As placas foram incubadas no escuro a 37°C durante 4 horas, em seguida, adicionados 90 µL de solução de dodecilsulfato de sódio (SDS) (10% m/v em HCl 0,05N). As placas foram incubadas durante 17 horas para a dissolução dos cristais de Formazan. Em seguida, foi realizada a leitura a 570 nm por espectrofotometria em leitora de microplacas.

Foi determinado o percentual de viabilidade celular (%) utilizando a equação 2. Os percentuais de viabilidade celular foram calculados para estimar (regressão não-linear/curva fit) a CC<sub>50</sub> (concentração necessária para reduzir em 50% a viabilidade das células).

Equação 2: Cálculo do percentual de viabilidade celular pelo ensaio de redução do MTT.

$$\text{Viabilidade celular} = \frac{(\text{Abs T} - \text{Abs BC})}{(\text{Abs CT} - \text{Abs BC})} \times 100\%$$

No qual:

Abs T: Absorbância do grupo teste;

Abs CT: Absorbância do grupo controle;

Abs BC: Absorbância do branco.

### 3.3 Avaliação do efeito sobre formas epimastigota de *T. cruzi* cepa Y

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

Os parasitos foram cultivados na densidade de 1x10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup>, e avaliados diariamente até atingirem a fase exponencial de crescimento (6° ao 8° dia de cultivo). Após esse período, foram subcultivados em um novo meio LIT. Para manutenção do estoque de células, as culturas foram centrifugadas (2.800 rpm por 7 minutos), ressuspendidas em 95% SBF e 5% de DMSO estéril; e estocadas em nitrogênio líquido.

Para avaliação do efeito das substâncias do presente estudo nas formas epimastigotas, alíquotas contendo os parasitos na fase exponencial foram diluídas em meio LIT completo e transferidas para câmara de Neubauer, sendo feita a determinação da densidade celular (células.mL<sup>-1</sup>) nos cinco quadrantes do campo central (Figura 11). O cálculo foi feito com base na equação 3.

Equação 3: Determinação da densidade de parasitos por contagem em Câmara de Neubauer.

$$\text{Densidade celular} = \text{Fator de diluição} \times \text{Contagem} \times 5 \times 10^4$$

Em seguida, os parasitos foram transferidos para placas estéreis de 96 poços, de modo que a concentração inicial fosse ajustada para 1x10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup> (200 µL/poço), juntamente com a substância em estudo e o Bz (1000-31,25 µM). Além disso, as células foram tratadas com DMSO 0,5% para avaliar o efeito do veículo sobre a viabilidade celular, sendo o PBS utilizado como controle negativo.

Após o tratamento, as placas foram incubadas em estufa BOD, e colhidas alíquotas dos grupos experimentais após 24, 48 e 72 horas para quantificação dos parasitos viáveis, com mobilidade e morfologia típica (LIMA *et al.*, 2016). Ao final, a viabilidade (%) dos parasitos foi determinada através da equação 4:

Equação 4: Determinação do percentual de parasitos viáveis por contagem em Câmara de Neubauer.

$$Viabilidade\ celular = \frac{T}{CT} \times 100\%$$

Em que:

T: Quantidade de parasitos viáveis no grupo experimental;

CT: Média da quantidade de parasitos viáveis do grupo controle negativo.

Sendo assim, com os valores de viabilidade (%) de formas epimastigotas, foi possível determinar a IC<sub>50</sub> (concentração capaz de inibir em 50% da proliferação de epimastigotas).

### 3.4 Avaliação do efeito em formas tripomastigota de *T. cruzi* cepa Y

As formas tripomastigota de *T. cruzi* foram obtidas a partir da infecção de células hospedeiras de mamíferos (LIMA *et al.*, 2016). As células LLC-MK2 foram cultivadas em garrafas estéreis de 25 cm<sup>2</sup> na concentração de 1x10<sup>5</sup> células.mL<sup>-1</sup> em meio DMEM 10% SBF. Após 48 horas de incubação em estufa de CO<sub>2</sub>, o meio foi substituído por DMEM 2% SBF sem antibióticos, e as células infectadas com tripomastigotas na proporção de 20 parasitos:1 célula.

Após 72 horas, ocorreu a substituição do meio das garrafas, e o sobrenadante centrifugado (2800 rpm por 7 minutos) para obtenção dos tripomastigotas; este procedimento fora realizado até o 6º dia pós-infecção. A densidade celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer, semelhante à contagem das formas epimastigotas. Os tripomastigotas foram utilizados para os ensaios de avaliação do efeito da substância de estudo e obtenção de formas amastigotas.

Para avaliação do efeito tripanocida das substâncias em estudo, 10<sup>6</sup> tripomastigotas.mL<sup>-1</sup> foram incubadas com a acetofenona e Bz (1000 - 31,25 µM) em placas de 96 poços (200 µL/poço) com meio DMEM 10% SBF. Parasitos não-tratados

foram utilizados como controle negativo, sendo considerados como 100% de viabilidade. Ademais, DMSO 0,5% foi utilizado como grupo veículo.

Após 24 horas de incubação em estufa de CO<sub>2</sub>, as alíquotas foram coletadas dos grupos experimentais, e a quantidade de parasitos foi determinada também por contagem em Câmara de Neubauer. A viabilidade (%) celular foi calculada de acordo com a equação utilizada para as formas epimastigotas, e a LC<sub>50</sub> (concentração letal para 50% dos parasitos) foi estimada por regressão não-linear. Além disso, foi calculado o índice de seletividade (IS) sobre as formas tripomastigotas em relação às células hospedeiras de mamíferos, através da seguinte equação 5:

Equação 5: Cálculo do Índice de Seletividade (IS).

$$IS = \frac{CC_{50}}{LC_{50}}$$

Em que:

IS: Índice de seletividade;

CC<sub>50</sub>: Concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade das células hospedeiras de mamíferos;

LC<sub>50</sub>: Concentração letal para 50% dos parasitos.

### 3.5 Avaliação do efeito sobre formas amastigota de *T. cruzi* cepa Y

Para avaliação do efeito da substância sobre amastigotas intracelulares, 1x10<sup>5</sup> células.mL<sup>-1</sup> de células LLC-MK2 foram cultivadas em placas de 24 poços, sobre lamínulas estéreis de 13 mm de diâmetro durante 24 horas e incubadas em estufa de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as células foram infectadas com tripomastigotas (2x10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup>) e incubadas durante 48 horas, conseguintes tratadas nas concentrações: 480µM; 240µM; 120µM e 60µM; permanecendo 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub>.

Por fim, as lamínulas foram retiradas do poço, lavadas com água destilada e fixadas com solução de Bouin (ácido pícrico, formaldeído e ácido acético). Logo após, foram lavadas com água destilada e etanol 70%; em seguida, desidratadas com metanol por 2 minutos. Posteriormente, coradas utilizando solução de corante Giemsa (5% v/v em água destilada) por 60 minutos. Finalmente, as lamínulas foram lavadas para

remoção do excesso de corante, secas e montadas em lâmina utilizando Entellan® (ARAÚJO-JORGE, T; DE CASTRO, 2010).

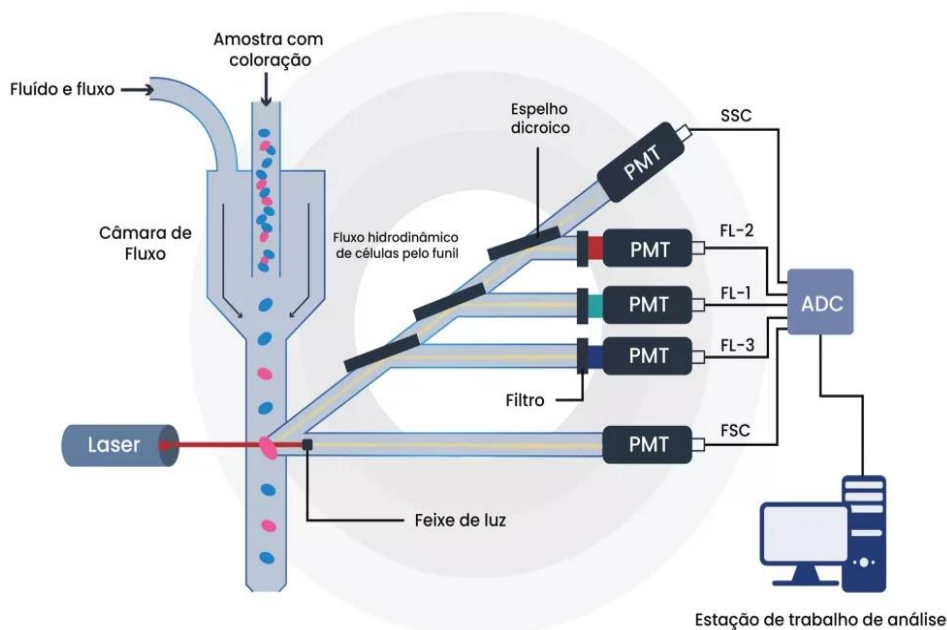
A análise do efeito sobre as formas amastigotas foi feita por contagem em microscópio óptico por meio da quantidade de células não infectadas e células infectadas, totalizando 300 células por grupo experimental. Os resultados foram apresentados como percentual de células infectadas e quantidade de amastigotas por 100 células infectadas (MONTEIRO *et al.*, 2020).

### **3.6 Ensaio de citometria de fluxo**

A citometria de fluxo é utilizada para analisar em fluxo células e partículas suspensas em uma solução isotônica, permitindo distinguir diferentes tipos de parâmetros através de marcadores fluorescentes (Figura 12). Cada partícula é analisada através de uma dispersão de luz visível e um ou mais parâmetros de fluorescência. Essa é mensurada em duas diferentes direções, a direção frontal (FSC: *Forward Scatter*), que indica o tamanho de cada célula, e a lateral (SSC: *Side Scatter*), que indica a complexidade interna e granulidade das células, característico de contato com organelas e outros componentes internos (MCKINNON, 2018).

Além de que as células podem estar marcadas com fluorocromos, o quais tornam-se excitados por feixes luminosos, possibilitando a emissão de luz em um comprimento de onda diferente, que tem a intensidade mensurada por detectores de fluorescência (FL<sub>2</sub>, FL<sub>1</sub>, FL<sub>3</sub>). Os sinais eletrônicos detectados são convertidos em informações relativas a eventos celulares patológicos e normais da amostra em análise (FLORES-GONZALEZ; CANCINO-DÍAZ; CHAVEZ-GALAN, 2020).

Figura 12: Citômetro de fluxo.



Fonte: VARSOMICS, 2022.

### 3.6.1 Análise do perfil de morte e integridade celular

Para descrever os eventos de morte celular nas formas epimastigotas sobrevivendo do tratamento com a HTMCX, foram utilizados os marcadores 7-Amino-Actinomicina D (7-AAD) e a Anexina V conjugada com Ficoeritrina (AxV PE).

O 7-AAD é proveniente da actinomicina D, que é excitado no comprimento de onda de 488 nm e emite fluorescência em 647 nm. Este conjuga-se entre as fitas de DNA, no entanto, não atravessa a membrana plasmática íntegra. Logo, as células que apresentam alta marcação com 7-AAD perderam a sua integridade de membrana, uma crucial na morte celular por necrose (CHAN; MCCULLEY; KESSEL, 2017).

A Anexina V é uma proteína que liga-se à fosfatidilserina (PS), na presença de íons cálcio, um componente abundante na membrana lipídica. A externalização de PS está relacionada ao reconhecimento por fagócitos, e consequente remoção de corpos apoptóticos do tecido (KIM *et al.*, 2020).

Para a realização deste ensaio,  $1 \times 10^6$  epimastigotas.mL<sup>-1</sup> foram cultivados em placas de 24 poços durante 24 horas na presença das substâncias em estudo (250  $\mu$ M e 500  $\mu$ M). Prontamente, os grupos experimentais foram transferidos para tubos de

hemólise, centrifugados (2800 rpm por 7 minutos), lavados com tampão de ligação (HEPES solution 10 mM; NaCl 140 mM; CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM; pH 7,4); e a marcação feita através de kit comercial (100 µL do tampão de ligação com a adição de 5 µL de 7-AAD e 5 µL de AxV PE) (*Annexin V/PE Apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences*, conforme instruções do fabricante). Após 15 minutos de incubação -no escuro-, foram adicionados 400 µL do tampão de ligação em cada tubo, e as células analisadas no citômetro (*BD FACSCalibur™*) com os detectores FL<sub>2</sub>, com fluorescência laranja, de 564-606 nm, para AxV PE; e FL<sub>3</sub>, com fluorescência vermelha, de 675-710 nm, para 7-AAD (*BD Biosciences, New Jersey, USA*), sendo as informações adquiridas pelo *CellQuest Pro™ software*.

Cada grupo foi adquirido pelo menos 10.000 eventos, e os eventos foram divididos em quatro quadrantes: células duplamente marcadas, células viáveis (baixa marcação para ambos os corantes), células em processo sugestivo de necrose (alta marcação para 7-AAD) e de apoptose (alta marcação para AxV PE). Ademais, para determinar o percentual de células que perderam a integridade de membrana, um outro ensaio foi realizado utilizando a marcação com 7-AAD, seguindo as mesmas recomendações descritas. O resultado foi descrito como percentual de eventos com marcação positiva para 7-AAD, indicando dano de membrana.

### 3.6.2 Acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) citoplasmáticas

A análise baseia-se na capacidade da 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH<sub>2</sub>-DA), sonda não-fluorescente, em penetrar a membrana plasmática das células, em seguida, clivada por esterases citoplasmáticas à 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH<sub>2</sub>), que se mantém no citoplasma celular. O DCFH<sub>2</sub> é então oxidado pelas ERO do citoplasma à 2',7'-diclorofluoresceína oxidada (DCF). No comprimento de 488 nm o DCF é excitado e emite fluorescência detectável em FL<sub>1</sub> (fluorescência verde, de 515-545 nm). Logo, a intensidade da fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de ERO presentes no citoplasma das células (RAJNEESH *et al.*, 2017).

Passadas 3 horas do tratamento das formas epimastigotas, na concentração de 1x10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup> em placas de 24 poços com as substâncias em estudo (250 e 500 µM), o DCFH<sub>2</sub>-DA (concentração final de 20 µM em DMSO) foi adicionado e as placas incubadas no escuro (ARANDA *et al.*, 2013). Após as 24 horas do tratamento, os grupos

experimentais foram transferidos para tubos de ensaio, lavados e ressuspensos em 500  $\mu\text{L}$  de PBS. Posteriormente, foi realizada a leitura mínima de 10.000 eventos no equipamento *BD FACSCalibur™*.

O acúmulo citoplasmático de ERO foi definido através da média da intensidade de fluorescência relativa (IFR) oriunda da oxidação do  $\text{DCFH}_2$  à DCF. O cálculo da média geométrica das intensidades de fluorescência dos grupos testes em relação ao controle foi realizado de acordo com a equação 6 (KESSLER *et al.*, 2013).

Equação 6: Determinação da Intensidade de Fluorescência Relativa (IFR).

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

Na qual:

mCONTROLE: Média geométrica do grupo controle;

mTESTE: Média geométrica do grupo tratado.

### 3.6.3 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial ( $\Delta\Psi\text{m}$ )

O potencial transmembrânico mitocondrial ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) foi realizado utilizando o corante catiônico Rodamina 123 (Rho123) (MERCK®, Darmstadt, Alemanha). No espaço intermembrana mitocondrial, em pH fisiológico, o corante tem bastante atração pelo potencial elétrico negativo, o qual irradia fluorescência vermelha (JOHNSON; WALSH; CHEN, 1980; O'CONNOR *et al.*, 1988).

Mudanças no  $\Delta\Psi\text{m}$  e na integridade mitocondrial relacionam-se diretamente com o declínio na produção de energia e morte celular. A redução de Rho123 na mitocôndria provoca um aumento relativo deste corante no citoplasma, o qual emite fluorescência verde. Alterações no  $\Delta\Psi\text{m}$  podem ser avaliados por meio da diminuição da fluorescência vermelha ou aumento da fluorescência verde (O'CONNOR *et al.*, 1988).

As formas epimastigotas tratadas com HTMCX (500 e 250  $\mu\text{M}$ ), após 24 horas foram transferidas para tubos de ensaio, centrifugadas (2.800 rpm por 7 minutos) e lavadas com PBS (2 vezes). Posteriormente, as células foram marcadas com Rho123, em uma concentração final de 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , e sendo incubadas durante 30 minutos no escuro. Por fim, foram realizadas duas novas lavagens, a ressuspensão em 500  $\mu\text{L}$  de



PBS e leitura por citometria de fluxo, utilizando o detector FL<sub>2</sub> (DE MENEZES *et al.*, 2019b). Os resultados foram expressos em IFR.

### 3.7 Estudos *in silico*

Para avaliação teórica das interações entre a substância do presente estudo foram realizados os ensaios de docking molecular das enzimas cruzaina (Cr) e tripanotona redutase (TR) de *T. cruzi*, em parceria com o Grupo de Química Teórica e Eletroquímica (GQTE) da Universidade Estadual do Ceará, coordenado pelo professor Dr. Emmanuel Silva Marinho.

#### 3.7.1 Obtenção e preparo dos ligantes

A plotagem da estrutura química da HTMCX foi desenhada utilizando o *software* MarvinSketch (CSIZMADIA, 1999) e o confômero de menor energia foi salvo em pH fisiológico, em seguida otimizado utilizando o *software* Avogadro (HANWELL, 2012), configurado para utilizar algoritmo *steepest descent* com ciclos de 50 interações, aplicando o campo de força MMFF94 (*Merck Molecular Force Field*) (HALGREN, 1996; ANDRADE NETO *et al.*, 2021).

#### 3.7.2 Obtenção e preparo dos alvos proteicos

As estruturas tridimensionais dos alvos proteicos foram obtidas do repositório *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>). A Cr foi descrita como “Estrutura cristalina da cruzaina em complexo com um inibidor tetrafluorofenoximetil cetona” (PDB: 3IUT) (BRAK *et al.*, 2010). Já a TR foi identificada como “Estrutura cristalina da tripanotona redutase de *Trypanosoma cruzi* em complexo com um inibidor mostarda de quinacrina” (PDB: 1GXF) (SARAVANAMUTHU *et al.*, 2004). Ambas foram determinadas pelo método de difração de raio-X, com valores de resolução de 2,70 e 1,20Å, respectivamente.

O preparo dos alvos foi realizado utilizando o *softwares* *AutoDock Tools*<sup>TM</sup> (HUEY; MORRIS; FORLI, 2012). Sendo removidas as moléculas de água e os ligantes interferentes, e adicionados hidrogênios polares e cargas Kollman e Gasteiger (YAN *et al.*, 2014).

### 3.7.3 Simulações de docking molecular

Para as simulações de docking molecular foi utilizado o *software* AutodockVina (TROTT; OLSON, 2010), *Lamarckian Genetic Algorithm* (LGA) e *Exhaustiveness* 64 (MARINHO *et al.*, 2020). Por meio destas metodologia, o *grid box* foi centralizado de acordo com Gomes e colaboradores (2023), de maneira a envolver toda a estrutura da enzima utilizando os eixos 6.612 (x), -0.436 (y) e 8.052 (z), parâmetros de *size* 116Å (x), 106Å (y) e 126Å (z) frente à Cr; eixos (44.196 x, 3.102 y, -0.054 z) e *size* (126 x, 90 y, 126 z) frente à TR. 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).

Para obtenção de dados comparativos foram realizadas simulações com o Bz. A validação estatística das simulações se deu por meio da medida do RMSD (*Root Mean Square Deviation*), utilizando como critério de aceitabilidade valores de RMSD <2,0Å (YUSUF *et al.*, 2008). Para avaliação da estabilidade do complexo ligante-proteína foi utilizada a energia de afinidade ( $\Delta G$ ) como parâmetro, sendo selecionadas aquelas simulações cujos valores de  $\Delta G$  fossem menores que -6,0 kcal.mol<sup>-1</sup> (SHITYAKOV; FÖRSTER, 2014; SILVA *et al.*, 2021).

### 3.7.4 Análise dos modos de ligação e interações receptor-ligante

Para análise dos resultados de docking molecular foram usados os *softwares* UCSF Chimera™ (PETTERSEN *et al.*, 2004), *Pymol* (DELANO, 2020) e *Discovery studio visualizer™ viewer* (BIOVIA, 2016). O servidor *Protein-Ligand Interaction Profiler* (PLIP) (ADASMES *et al.*, 2021; SALENTIN *et al.*, 2015) foi utilizado para visualizar as interações moleculares e ligações de hidrogênio.

## 3.8 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em triplicata (n=3). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), sendo a análise estatística feita utilizando *one-way* ou *two-way* ANOVA, com pós-teste de Dunnet, com p<0,05 como critério de significância. As análises foram realizadas utilizando os *softwares* Microsoft Office® Excel 2016 e GraphPad Prism® versão 5.0.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização da substância obtida

A substância foi isolada sob a forma de um sólido cristalino amarelo com ponto de fusão de 108,5-110,6 °C. O espectro de ressonância magnética (RMN<sup>1</sup>H) permitiu atribuir os sinais em 3,96 (s), 3,91 (s) e 3,83 (s) a hidrogênios metoxílicos (Apêndice A). A análise dos espectros de RMN <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C-DEPT 135° mostrou a existência de cinco carbonos quaternários: 159,22 (C-4), 158,96 (C-6), 158,60 (C-2), 130,67 (C-3) e 106,50 (C-1), e somente um carbono metínico aromático: 86,61 (C-5) (Apêndices B e C). A análise dos dados espectroscópicos e a comparação com modelos levaram a proposição da estrutura como sendo a 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona, denominada HTMCX (Figura 9).

### 4.2 Citotoxicidade das substâncias em células LLC-MK2

A avaliação da citotoxicidade da HTMCX em células hospedeiras de mamíferos foi realizada utilizando a linhagem de células LLC-MK2 submetidas ao ensaio de redução do MTT. Os valores percentuais de viabilidade celular estão expressos na tabela 1.

Tabela 1: Percentuais de viabilidade celular de células LLC-MK2 tratadas com as substâncias em estudo.

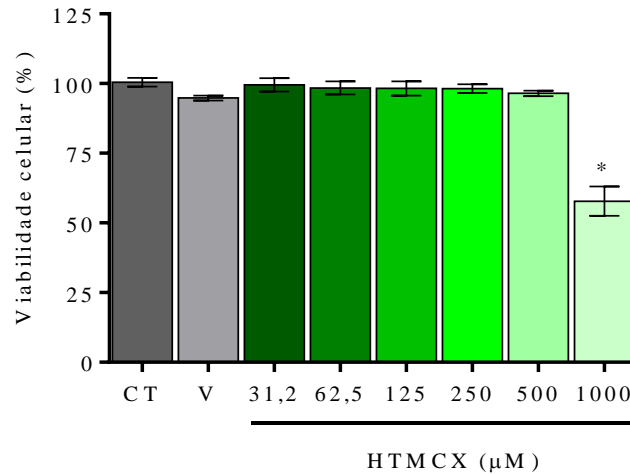
(μM)	Viabilidade celular (%)	
	HTMCX	Bz
CT	100,50 ± 1,56	100,40 ± 1,56
V (DMSO 0,5%)	94,80 ± 0,89	94,80 ± 0,89
1000	57,80 ± 5,24*	36,58 ± 1,67*
500	96,48 ± 1,00	50,66 ± 1,91*
250	98,16 ± 1,56	70,19 ± 2,20*
125	98,27 ± 2,55	74,60 ± 2,46*
62,5	98,43 ± 2,32	85,35 ± 2,37*
31,2	99,51 ± 2,39	94,94 ± 1,58*

Legenda: CT – Grupo controle (Bz); V – Veículo (DMSO 0,5%). A análise estatística foi feita por *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnet, com \*p<0,05 vs. CT. Os dados estão apresentados como média ± EPM.

Fonte: Elaborada pela Autora.

Conforme observado na tabela 1, figura 13 e 14, a substância apresentou toxicidade na concentração de 1000  $\mu\text{M}$ , com viabilidade (%) celular variando de  $57,80 \pm 5,24\%$ , e o grupo tratado com Bz de  $36,58 \pm 1,67$ .

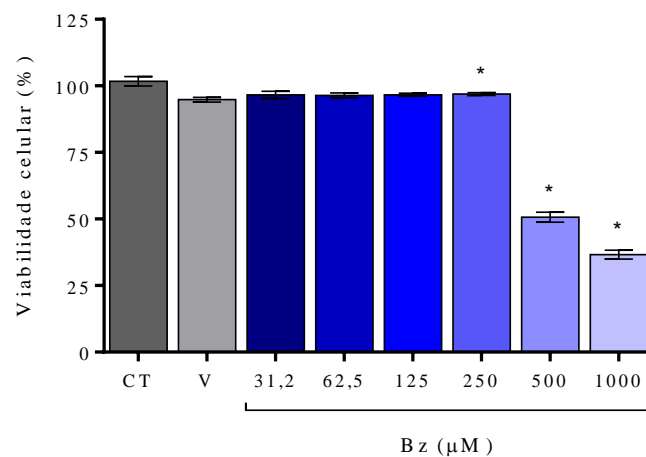
Figura 13: Citotoxicidade do CT, DMSO (V) e HTMCX em diferentes concentrações em células hospedeiras de mamíferos LLC-MK2.



Legenda: CT – Controle; V – Veículo (DMSO 0,5%). A análise estatística foi feita por *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnet, com  $*p < 0,05$  vs CT. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Elaborada pela Autora.

Figura 14: Citotoxicidade do Bz em diferentes concentrações em células hospedeiras de mamíferos LLC-MK2.



Legenda: CT – Controle; V – Veículo (DMSO 0,5%). A análise estatística foi feita por *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnet, com  $*p < 0,05$  vs CT. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Elaborada pela Autora.

A toxicidade nas células hospedeiras de mamíferos foi também mensurada através da estimativa da concentração necessária para reduzir 50% da viabilidade das células hospedeiras de mamíferos ( $CC_{50}$ ), apresentados na tabela 5. O Bz apresentou toxicidade superior a da acetofenona, quando comparados os valores de  $CC_{50}$ ,  $502,6 \pm 57,80 \mu\text{M}$  para o Bz, e  $1351,00 \pm 69,30 \mu\text{M}$  para a substância.

### 4.3 Efeito tripanocida em formas epimastigotas

Foram utilizadas as formas epimastigotas para a avaliação do efeito antiproliferativo das substâncias em estudo, e os resultados expressos através da viabilidade (%) parasitária. Conforme observado na tabela 2, a substância foi capaz de inibir de modo concentração e tempo-dependentes a proliferação celular, sendo significativa em todas as concentrações testadas para 48 e 72 horas.

Tabela 2: Efeito tripanocida da HTMCX sobre as formas epimastigota de *T. cruzi*.

(μM)	Células viáveis (%)		
	24 horas	48 horas	72 horas
CT	100,00 ± 2,48	100,00 ± 2,16	100,00 ± 0,51
V (DMSO 0,5%)	98,61 ± 4,92	94,87 ± 1,05	102,80 ± 3,16
1000	48,53 ± 6,03*	25,49 ± 3,74*	42,19 ± 5,25*
500	49,75 ± 5,38*	38,47 ± 2,49*	50,98 ± 2,67*
250	58,34 ± 2,88*	39,43 ± 3,06*	59,30 ± 2,99*
125	63,74 ± 1,50*	46,53 ± 4,35*	63,84 ± 3,27*
62,5	68,97 ± 3,92*	45,83 ± 4,56*	75,65 ± 1,63*
31,2	77,17 ± 4,52*	62,26 ± 6,59*	77,75 ± 1,80*

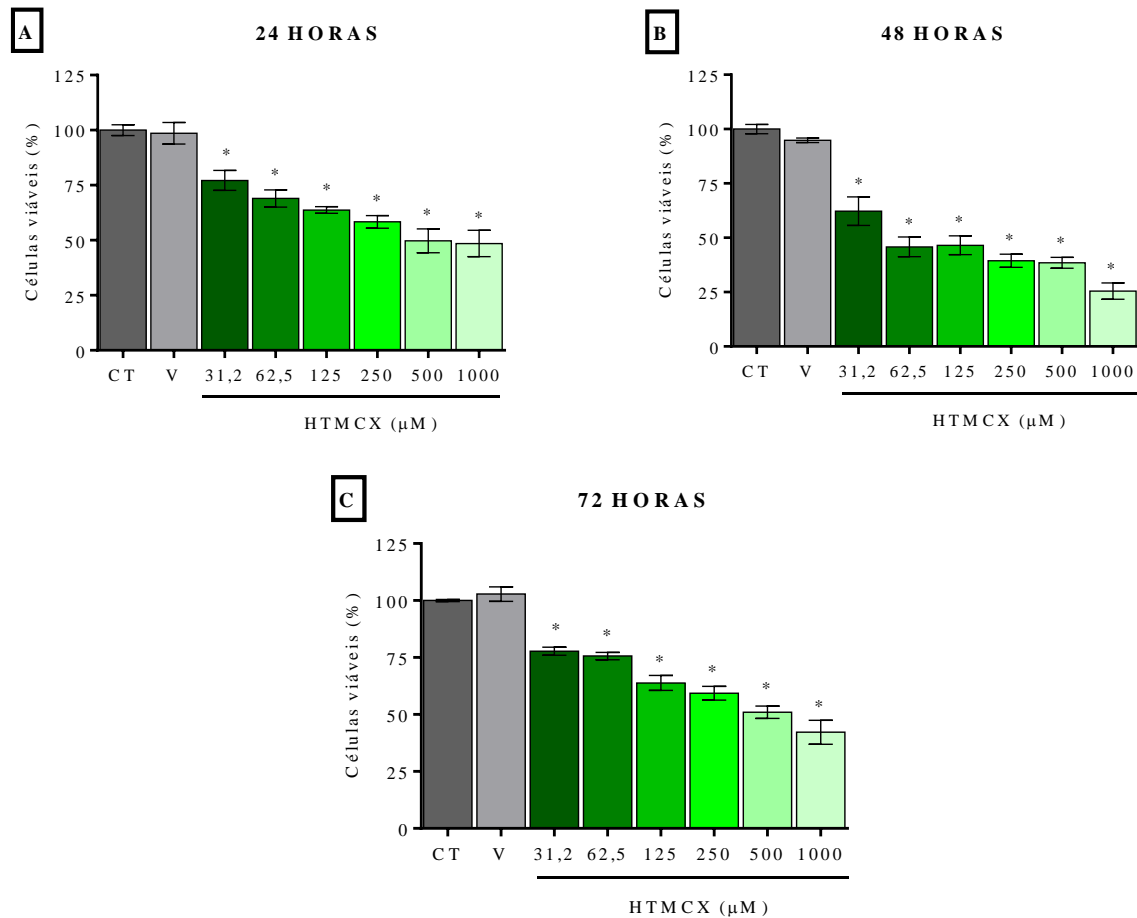
Legenda: CT – Controle; V – Veículo (DMSO 0,5%). Os dados estão apresentados como média ± EPM.

A análise foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet, com \* $p < 0,05$  vs. CT.

Fonte: Elaborada pela Autora.

No tempo de 24 horas (Figura 15-A), foram observados percentuais de viabilidade celular entre 48,53% e 77,17%, semelhante aos percentuais obtidos no tempo de 72 horas, 42,19% e 77,75% (Figura 15-C). O maior efeito foi observado no tempo de 48 horas (Figura 15-B), em que os percentuais de viabilidade celular variaram entre 25,49% e 62,26%, conforme apresentado na tabela 2. Foram estimados os seguintes valores de  $IC_{50}$ :  $IC_{50/24h} = 379,80 \pm 93,60 \mu\text{M}$ ;  $IC_{50/48h} = 47,43 \pm 22,1 \mu\text{M}$  e  $IC_{50/72h} = 341,20 \pm 75,90 \mu\text{M}$  (Tabela 5).

Figura 15: Efeito tripanocida da substância sobre as formas epimastigota de *T. cruzi*.



Legenda: CT – Controle; V – Veículo (DMSO 0,5%). A análise estatística foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet, com  $*p < 0,05$  vs. CT. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Elaborada pela Autora.

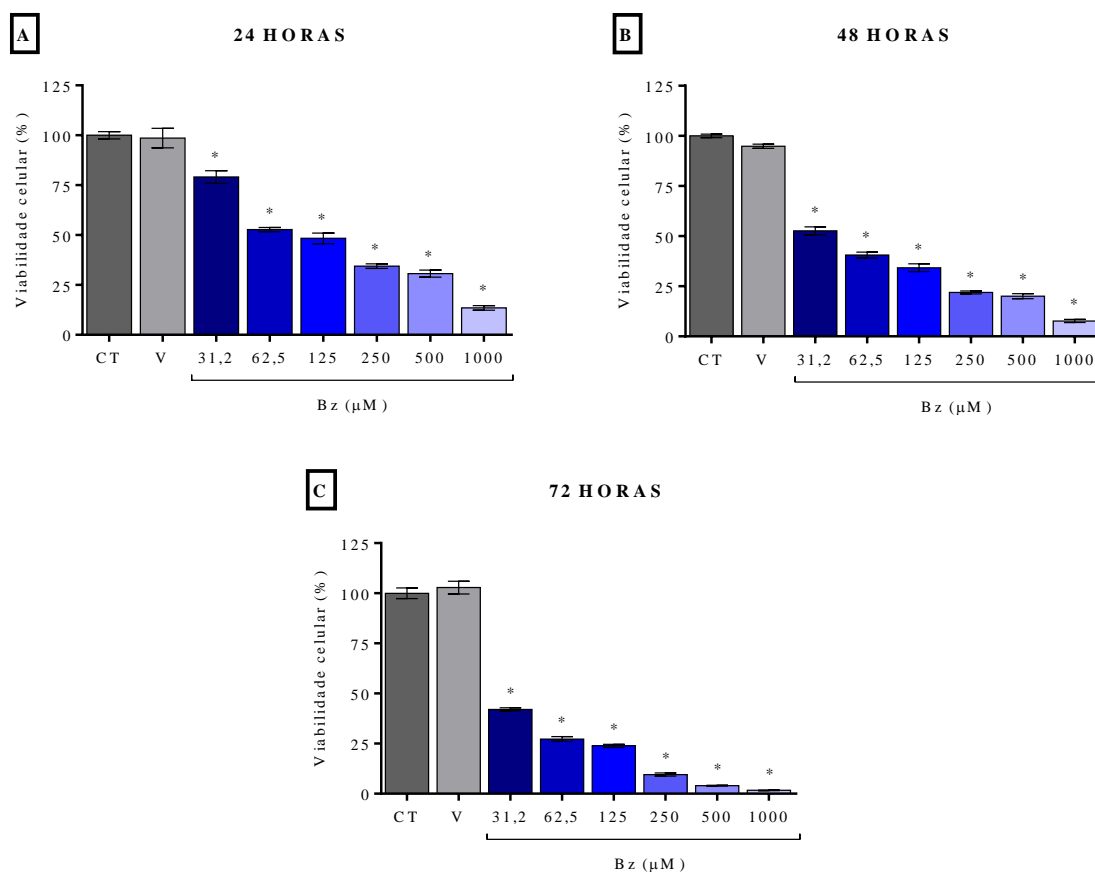
Para o Bz, no tempo de 24 horas, o percentual de epimastigotas viáveis variou de 13,5% a 79,1%. No tempo de 48 horas, 7,7% a 52,7% dos epimastigotas apresentavam-se viáveis. O tratamento de 72 horas com o Bz reduziu a viabilidade das formas epimastigotas entre 1,7% e 42,1% (Figura 16, Tabela 3). Foram estimados os seguintes valores de  $IC_{50}$ :  $IC_{50}/24h = 115,1 \pm 16,3 \mu M$ ;  $IC_{50}/48h = 37,4 \pm 5,6 \mu M$  e  $IC_{50}/72h = 22,1 \pm 2,9 \mu M$  (Tabela 5).

Tabela 3: Efeito tripanocida do Bz sobre as formas epimastigota de *T. cruzi*.

Células viáveis (%)			
( $\mu\text{M}$ )	24 horas	48 horas	72 horas
CT	100,0 $\pm$ 1,8	100,0 $\pm$ 0,9	100,0 $\pm$ 2,7
V (DMSO 0,5%)	98,6 $\pm$ 4,9	94,9 $\pm$ 1,1	102,8 $\pm$ 3,2
1000	13,5 $\pm$ 1,1*	7,7 $\pm$ 0,8*	1,7 $\pm$ 0,2*
500	30,7 $\pm$ 1,8*	20,1 $\pm$ 1,3*	4,0 $\pm$ 0,2*
250	34,4 $\pm$ 1,8*	21,9 $\pm$ 0,7*	9,6 $\pm$ 0,8*
125	48,4 $\pm$ 2,7*	34,3 $\pm$ 2,0*	24 $\pm$ 0,8*
62,5	52,8 $\pm$ 1,0*	40,6 $\pm$ 1,5*	27,3 $\pm$ 1,2*
31,2	79,1 $\pm$ 3,2*	52,7 $\pm$ 2,0*	42,1 $\pm$ 0,8*

Legenda: A análise foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet, com  $*p < 0,05$  vs CT. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Elaborada pela Autora.

Figura 16: Efeito tripanocida do grupo tratado com Bz sobre as formas epimastigota de *T. cruzi*.

Legenda: CT – Controle; V – Veículo (DMSO 0,5%). A análise estatística foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet, com  $*p < 0,05$  vs. CT. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Elaborada pela Autora.

#### 4.4 Efeito tripanocida em formas tripomastigotas

A HTMCX foi testada contra formas tripomastigotas, e os resultados expressos na tabela 4 e figura 17. A substância apresentou efeito nas quatro maiores concentrações testadas (125, 250, 500 e 1000  $\mu\text{M}$ ), com percentuais de parasitos viáveis variando de 0,69% a 67,65%. Sendo capaz de, na maior concentração, matar, aproximadamente, 98,82% dos parasitos. O Bz apresentou efeito significativo sobre as formas tripomastigotas em todas as concentrações testadas, com percentuais de células viáveis variando entre 97,23% e 100,00% (Figura 18).

Tabela 4: Percentuais de viabilidade de formas tripomastigota de *T. cruzi*.

( $\mu\text{M}$ )	Células viáveis (%)
<b>CT</b>	100,00 $\pm$ 2,77
<b>V (DMSO 0,5%)</b>	98,61 $\pm$ 2,10
<b>1000</b>	0,69 $\pm$ 0,49*
<b>500</b>	22,15 $\pm$ 1,94*
<b>250</b>	58,02 $\pm$ 4,25*
<b>125</b>	67,65 $\pm$ 5,98*
<b>62,5</b>	87,35 $\pm$ 4,59
<b>31,2</b>	98,84 $\pm$ 5,49

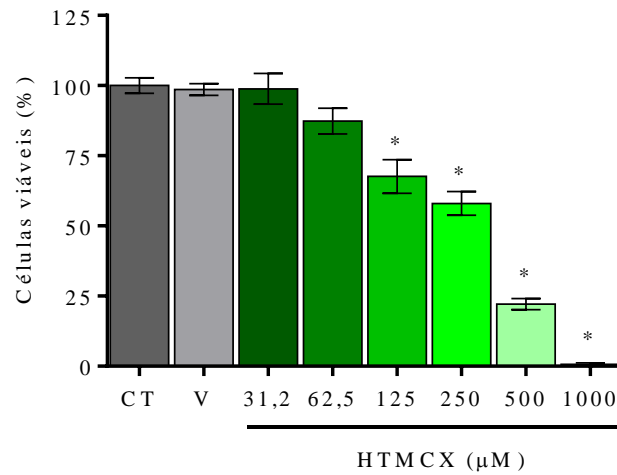
Legenda: A análise estatística foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet, com  $*p < 0,05$  vs CT. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Elaborada pela Autora.

O efeito sobre as formas tripomastigotas pode ser avaliado também através da estimativa dos valores de  $\text{LC}_{50}$ , sendo  $238,30 \pm 29,90 \mu\text{M}$  e  $161,4 \pm 31,8 \mu\text{M}$  para a substância e Bz, respectivamente. Com a avaliação do efeito sobre as formas tripomastigotas, bem como a citotoxicidade sobre células hospedeiras de mamíferos, a seletividade desta molécula foi comparada através do cálculo do IS. Os valores de IS obtidos foram de 5,66 para a substância e 3,11 para Bz. A tabela 5 apresenta de maneira resumida os valores de  $\text{CC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{LC}_{50}$  e IS obtidos no presente estudo.



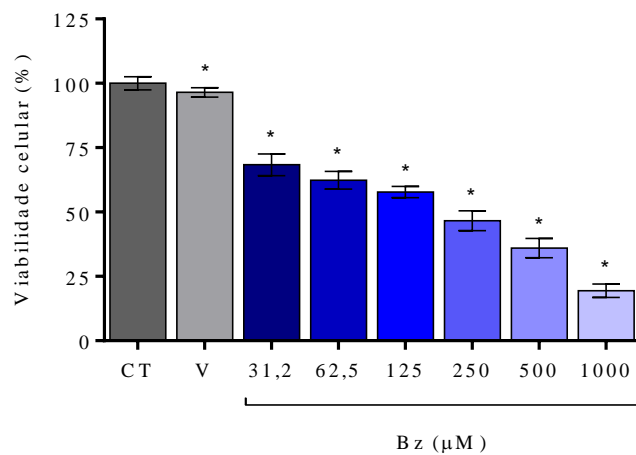
Figura 17: Efeito da HTMCX sobre as formas tripomastigota de *T. cruzi*.



Legenda: CT – Controle; V – Veículo (DMSO 0,5%). A análise estatística foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet, \* $p < 0,05$  vs CT. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Elaborada pela Autora.

Figura 18: Efeito do Bz sobre as formas tripomastigota de *T. cruzi*.



Legenda: CT – Controle; V – Veículo (DMSO 0,5%). A análise estatística foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet, \* $p < 0,05$  vs CT. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Elaborada pela Autora.

Tabela 5: Valores estimados de CC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> e LC<sub>50</sub> para a substância em estudo.

	Tempo de incubação		
	24 horas	48 horas	72 horas
<b>HTMCX</b>			
LLC-MK2 (CC <sub>50</sub> )	1351,00 ± 69,30	-	-
Epimastigota (IC <sub>50</sub> )	379,80 ± 93,60	47,43 ± 22,1	341,20 ± 75,90
Tripomastigota (LC <sub>50</sub> )	238,30 ± 29,90	-	-
Índice de Seletividade (IS)	5,66	-	-
<b>Bz</b>			
LLC-MK2 (CC <sub>50</sub> )	502,6 ± 57,8	-	-
Epimastigota (IC <sub>50</sub> )	115,1 ± 16,3	37,4 ± 5,6	22,1 ± 2,9
Tripomastigota (LC <sub>50</sub> )	161,4 ± 31,8	-	-
Índice de Seletividade (IS)	3,11	-	-

Legenda: CC<sub>50</sub> – Estimativa de concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade de células LLC-MK2 hospedeiras; IC<sub>50</sub> – Concentração estimada capaz de inibir 50% da proliferação de formas epimastigotas; LC<sub>50</sub> – Estimativa de concentração tripanocida para 50% das formas tripomastigotas.

Fonte: Elaborada pela Autora.

#### 4.5 Efeito sobre a formas amastigotas intracelulares

A substância em estudo reduziu o percentual de células infectadas, com percentuais de 84,17% e 81,83% nas duas concentrações mais altas, comparados aos 92,83% de células infectadas no grupo controle (Tabela 6).

Tabela 6: Efeito da substância sobre as formas amastigota de *T. cruzi*.

(24 horas)		
Concentração (µM)	Células infectadas (%)	Nº amastigotas/100 células
<b>CT</b>	92,83 ± 0,91	1270,00 ± 15,54
<b>480 (2 IC)</b>	81,33 ± 1,65*	625,50 ± 6,96*
<b>240 (IC)</b>	84,17 ± 1,14*	722,80 ± 9,67*
<b>120 (0,5 IC)</b>	89,50 ± 0,56	740,30 ± 5,30*
<b>60 (0,25IC)</b>	89,33 ± 0,67	860,00 ± 18,61*

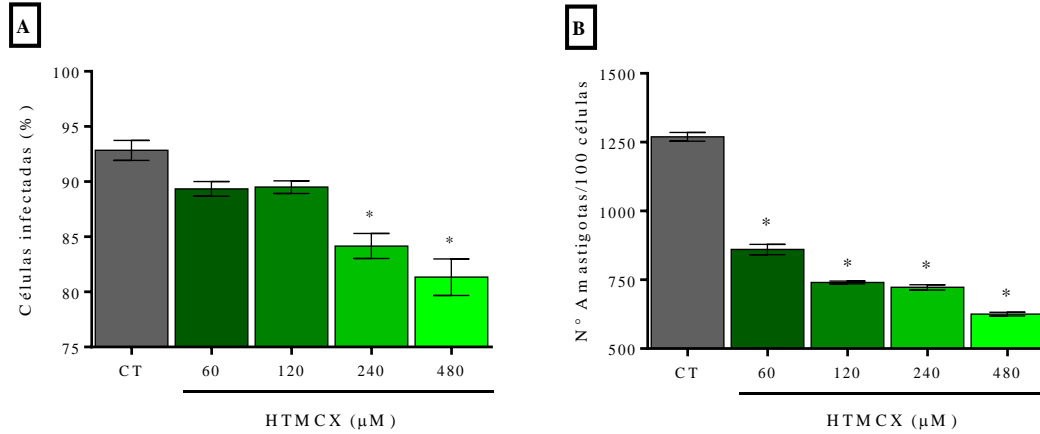
Legenda: A análise estatística foi feita por *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnet, com \*p<0,05 vs CT. Os dados estão apresentados como média ± EPM.

Fonte: Elaborada pela Autora.

Além disso, conforme mostrado na tabela 7 e figura 19 (A e B), em todas as concentrações testadas, a substância foi capaz de reduzir a quantidade de parasitos intracelulares, com quantidades médias de amastigotas iguais a 625,50/100 células a

860,00/100 células, comparado ao número médio de 1270,00/100 células de amastigotas intracelulares do grupo controle.

Figura 19: Efeito anti-amastigota da substância em estudo sob cepa Y de *T. cruzi*.



Legenda: CT – Controle. Estão representados os percentuais de células infectadas (A) e o número de amastigotas em 100 células (B). A análise estatística foi feita por *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett, com  $*p < 0,05$  vs. CT. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Elaborada pela Autora.

#### 4.6 Ensaio do perfil de morte e integridade celular

A avaliação do perfil de morte celular da substância sobre as formas epimastigotas, foi realizada através de ensaios de citometria de fluxo. O tratamento com a acetofenona nas concentrações aumentou a marcação com 7-AAD (7-AAD+/AxPE-), dupla marcação com 7-AAD e Anexina V (7-AAD+/AxPE+) e Anexina V (7-AAD-/AxPE+), em relação ao grupo controle. O comportamento das populações mediante o tratamento com as substâncias em estudo pode ser observado na tabela 7 e figura 20.

Tabela 7: Percentuais de eventos celulares marcados com 7-AAD/AxPE.

Marcação	Eventos (%)		
	Controle	HTMCX	
		250	500
<b>7AAD-/AxPE-</b>	95,3 ± 0,22	77,63 ± 1,28*	57,26 ± 1,63*
<b>7AAD+/AxPE-</b>	3,14 ± 0,26	10,84 ± 0,72*	17,04 ± 0,43*
<b>7AAD-/AxPE+</b>	0,95 ± 0,03	8,49 ± 0,55*	17,31 ± 1,09*
<b>7AAD+/AxPE+</b>	0,56 ± 0,05	3,04 ± 0,20	8,39 ± 0,94*

Legenda: 7-AAD – 7-Aminoactinomicina D; AxPE – Anexina V conjugada com ficoeritrina. A análise estatística foi realizada por two-way ANOVA com pós-teste de Dunnet, com \* $p < 0,05$  vs CT. Os dados estão apresentados como média ± EPM.

Fonte: Elaborada pela Autora.

Além do ensaio de avaliação do perfil de morte celular, a avaliação da marcação apenas com 7-AAD foi realizada para que se fossem quantificadas as células danificadas, tendo em vista que esta expressou-se melhor, e os valores percentuais expressos na tabela 8. Nas concentrações de 250 e 500  $\mu\text{M}$  da HTMCX, o percentual de epimastigotas que apresentaram marcação com 7-AAD foram iguais a 34,35% e 19,33%, respectivamente (Figura 21).

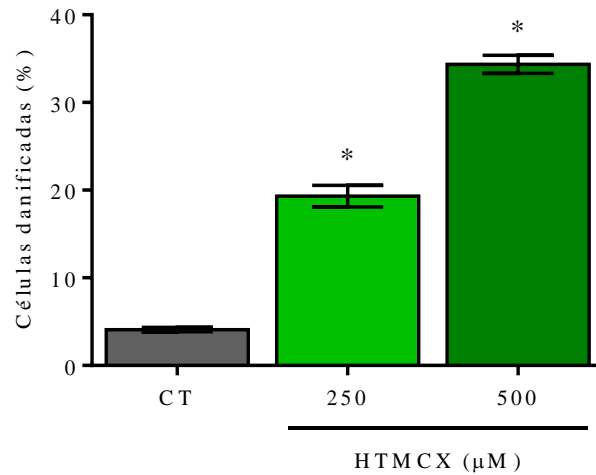
Tabela 8: Percentuais de formas epimastigotas danificadas.

Células danificadas (%)	
<b>Controle</b>	4,10 ± 0,26
<b>HTMCX – 500 <math>\mu\text{M}</math></b>	19,33 ± 1,23*
<b>HTMCX – 250 <math>\mu\text{M}</math></b>	34,35 ± 1,03*

Legenda: A análise estatística foi feita por *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnet, com \* $p < 0,05$  vs CT. Os dados estão apresentados como média ± EPM.

Fonte: Elaborada pela Autora.

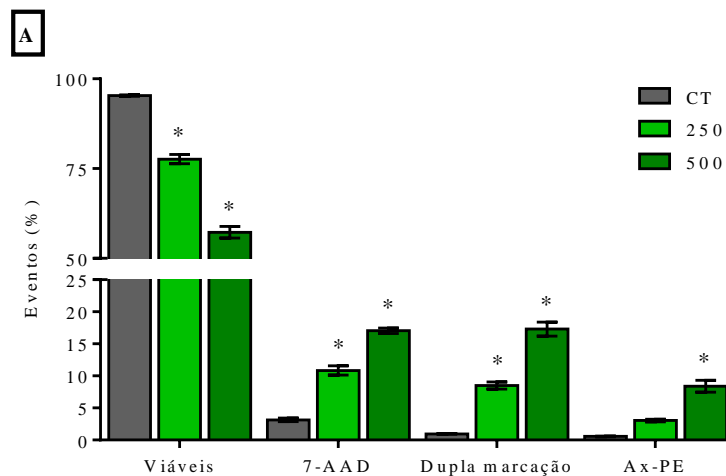
Figura 20: Células epimastigotas que apresentaram marcação com 7-AAD em avaliação por citometria de fluxo.

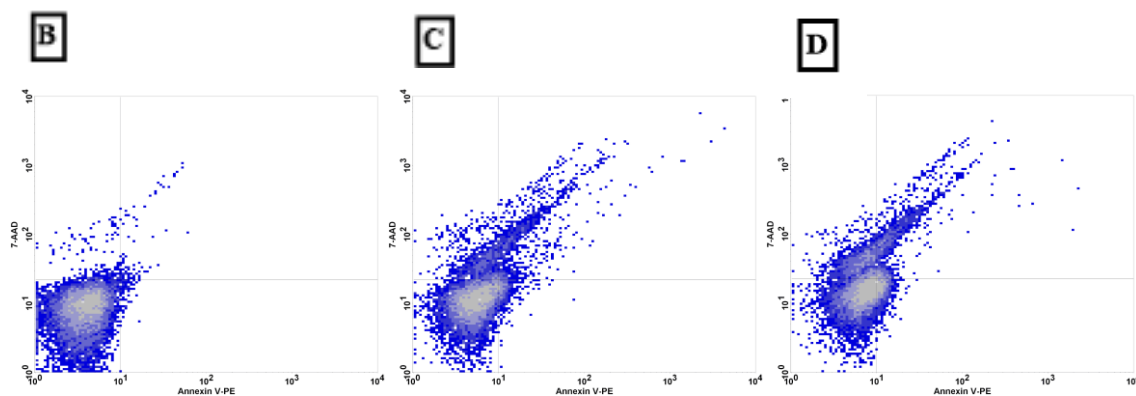


Legenda: CT – Controle; HTMCX – Substância em estudo. Estão representados os percentuais de células danificadas tratadas com acetofenona 250μM e 500μM. A análise estatística foi feita por *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnet, com \* $p < 0,05$  vs. CT. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Elaborada pela Autora.

Figura 21: Perfil de morte celular induzido pela HTMCX sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi* através por citometria de fluxo.





Legenda: Na figura A tem-se os resultados apresentados como média  $\pm$  EPM. A análise estatística foi feita por *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnet, com  $*p < 0,05$  vs. CT. Nos gráficos de dot plot (B, C, D), têm-se o comportamento das populações mediante tratamento com a substância, em que o tratamento com a substância provocou o deslocamento da população de células para o quadrante superior esquerdo (7-AAD+/AxPE-), com menor deslocamento para o quadrante superior direito (7-AAD+/AxPE+).

Fonte: Elaborada pela Autora.

#### 4.7 Acúmulo citoplasmático de espécies reativas de oxigênio

A avaliação do acúmulo de espécies reativas de oxigênio no citoplasma foi realizada utilizando a sonda fluorescente DCFH<sub>2</sub>-DA. Como demonstrado na tabela 9, o tratamento com a substância provocou um aumento na fluorescência 74%, enquanto na concentração mais alta, este aumento foi de 170%, em relação ao grupo controle. Nas concentrações de 250  $\mu$ M e 500  $\mu$ M, houve um aumento da intensidade de fluorescência relativa (Figura 22-A), observado através do deslocamento do pico do histograma (Figura 22-B).

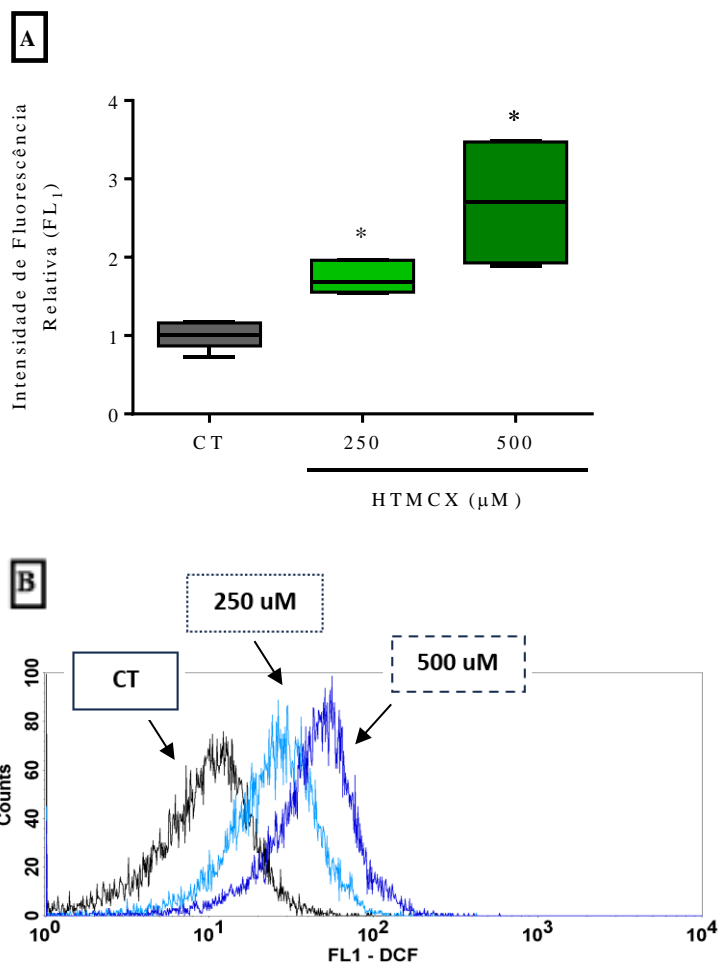
Tabela 9: Intensidade de fluorescência relativa de formas epimastigotas tratadas com a substância e marcadas com DCFH<sub>2</sub>-DA.

Intensidade de Fluorescência Relativa (FL <sub>1</sub> )	
Controle	1,00 $\pm$ 0,05
HTMCX – 250 $\mu$ M	1,74 $\pm$ 0,06*
HTMCX – 500 $\mu$ M	2,70 $\pm$ 0,25*

Legenda: A análise estatística foi feita por *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnet, com  $*p < 0,05$  vs. CT. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM.

Fonte: Elaborada pela Autora.

Figura 22: Intensidade de fluorescência relativa de formas epimastigotas tratadas com a substância e marcadas com DCFH<sub>2</sub>-DA por citometria de fluxo.



Legenda: CT – Controle; Azul – 250μM; Roxa – 500μM. Os dados estão apresentados como média ± EPM. A análise estatística foi feita por *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnet. \* $p < 0,05$  vs. CT. Estão representados os resultados de intensidade de fluorescência relativa das células tratadas com HTMCX e marcadas com DCFH<sub>2</sub>-DA (A) e o seu histograma (B).

Fonte: Elaborada pela Autora.

#### 4.8 Efeito no potencial transmembrânico mitocondrial

Foram realizados ensaios de citometria de fluxo com Rho123 para avaliar o potencial transmembrânico mitocondrial das formas epimastigotas tratadas. Os resultados foram expressos na tabela 10, o tratamento com a substância, nas concentrações, foi capaz de reduzir o potencial mitocondrial em cerca de 40% das formas epimastigotas, em relação ao controle. Esse efeito pode ser observado na figura 23-A, e com o deslocamento do pico do histograma para o lado esquerdo (Figura 23-B).

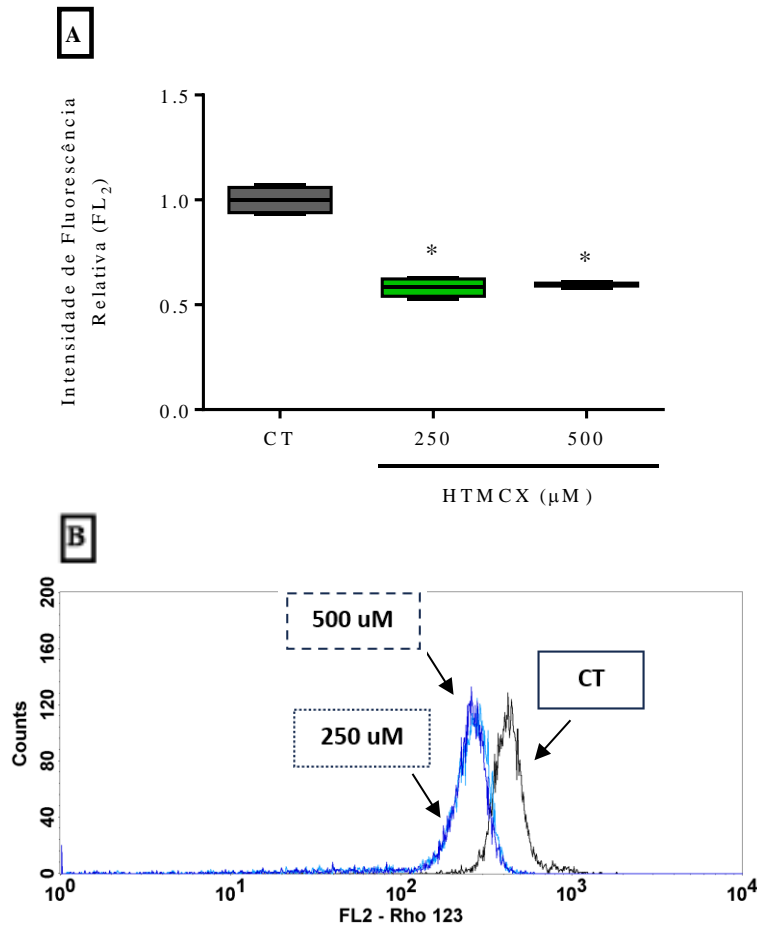
Tabela 10: Valores de intensidade de fluorescência de formas epimastigotas tratadas com a substância e marcadas com Rho123.

Intensidade de Fluorescência Relativa (FL <sub>2</sub> )	
<b>Controle</b>	1,00 ± 0,02
<b>HTMCX – 250 µM</b>	0,58 ± 0,01*
<b>HTMCX – 500 µM</b>	0,60 ± 0,01*

Legenda: A análise estatística foi feita por *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnet, com \* $p < 0,05$  vs. CT. Os dados estão apresentados como média ± EPM.

Fonte: Elaborada pela Autora.

Figura 23: Intensidade de fluorescência relativa de formas epimastigotas tratadas com a substância e marcadas com Rho123 por citometria de fluxo.



Legenda: CT – Controle; Azul – 250µM; Roxa – 500µM. Estão representados os resultados de intensidade de fluorescência relativa das células tratadas com HTMCX e marcadas com Rho123 (A), bem como seu histograma (B). A análise estatística foi feita por *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnet, com \* $p < 0,05$  vs. CT. Os dados estão apresentados como média ± EPM.

Fonte: Elaborada pela Autora.



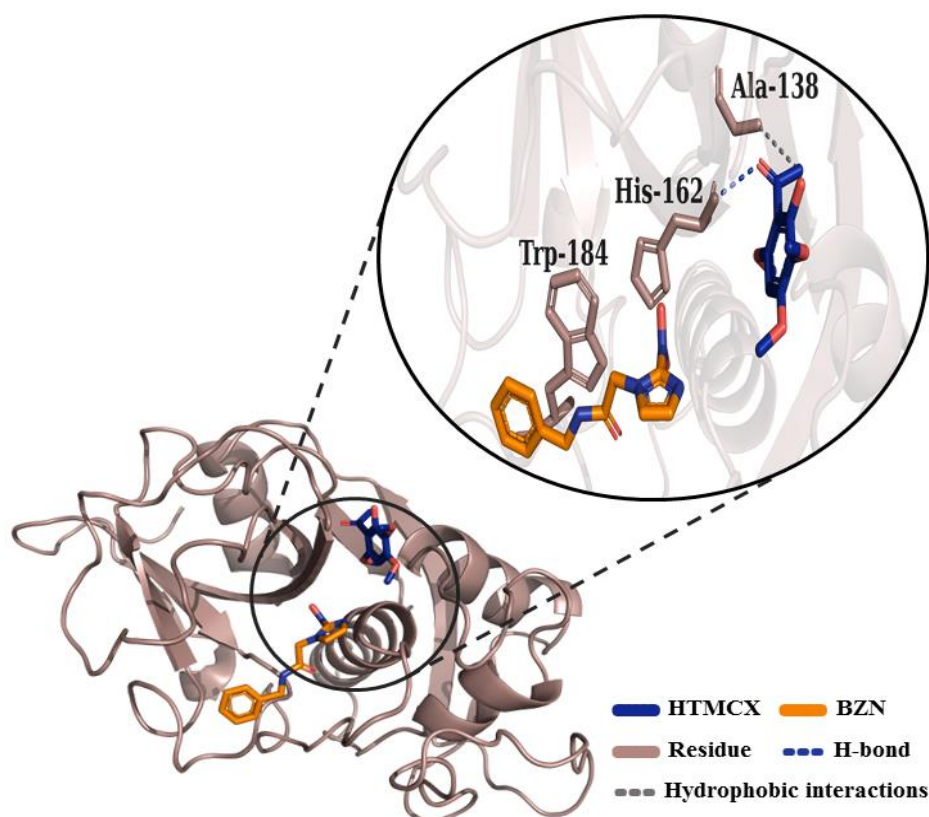
#### 4.9 Estudos *in silico* de interação com a enzima cruzaína (Cr)

Para o estudo da atividade antichagásica do HTMCX, foram realizadas simulações de docking molecular frente ao receptor Cr. Foi possível observar que o ligante apresentou RMSD de 1.354Å, valor menor que 2.0Å, dentro do parâmetro de idealidade (YUSUF *et al.*, 2008), e energia de afinidade de -4.7 kcal/mol. O controle Bz apresentou RMSD de 1.838 Å e energia de afinidade -6.1 kcal/mol.

Em relação às interações envolvidas na formação do complexo ligante-receptor (Figura 24), observamos que o HTMCX apresentou uma interação hidrofóbica com a cadeia lateral apolar do resíduo Ala-138A (3.82Å) e uma *H-bond* de intensidade forte (IMBERTY *et al.*, 1991) com o resíduo de cadeia lateral básica His-162A (2.37 Å).

O complexo Bz-Cr (Figura 24) apresentou quatro interações com o resíduo aromático Trp-184A, sendo três hidrofóbicas (3.53, 3.65 e 3.66Å) e uma *H-bond* de intensidade moderada (3.12Å).

Figura 24: Complexo de interação do receptor Cr com HTMCX e Bz.



Legenda: Complexo e mapas de interação da enzima Cr com os ligantes HTMCX e Bz.

Fonte: Grupo de Química Teórica e Eletroquímica (GQTE) - UECE.

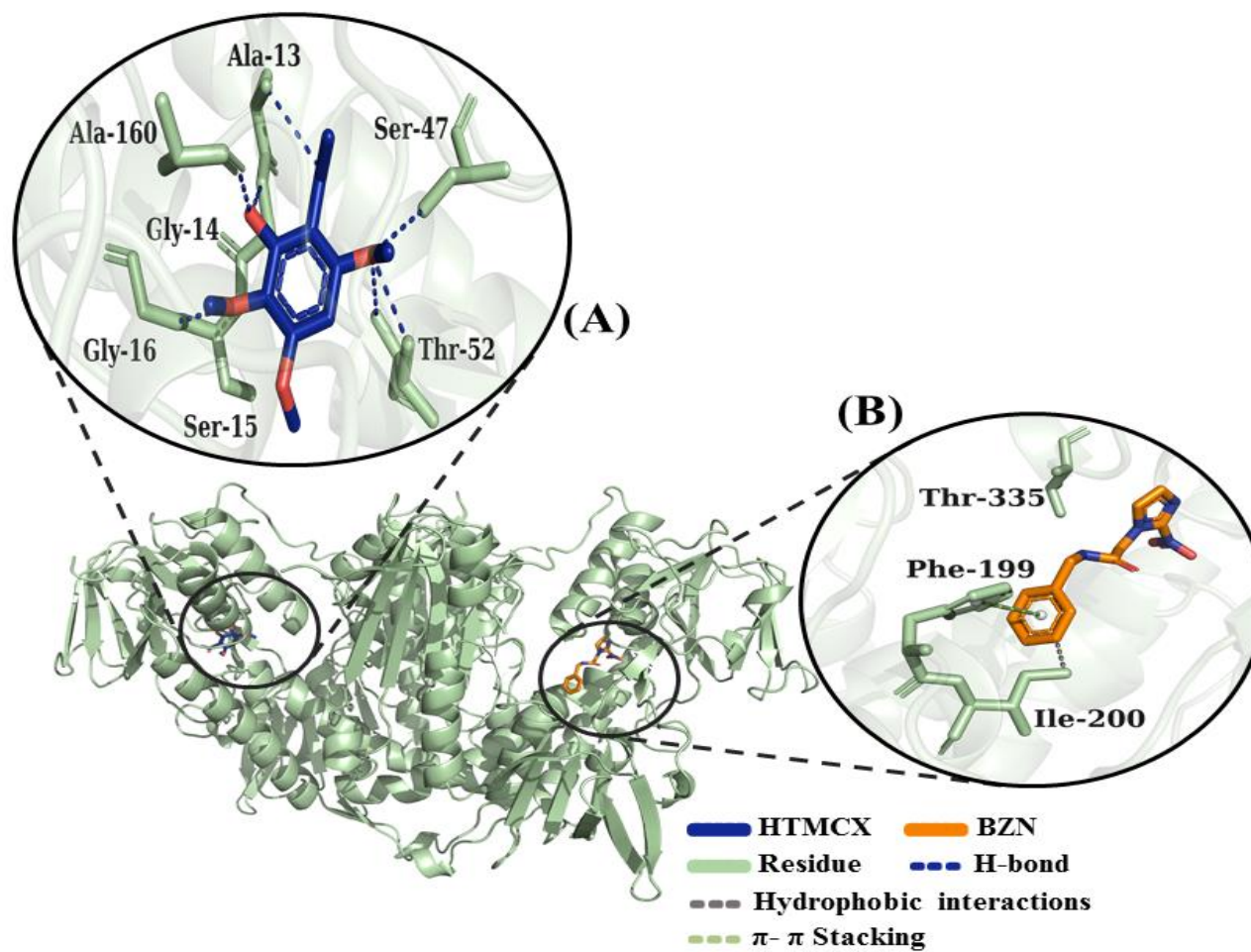
#### 4.10 Estudos *in silico* de interação com a enzima tripanotona redutase (TR)

Frente à TR, a substância apresentou valor RMSD e energia de afinidade de 0.643Å e -6.2 kcal/mol. Foi possível observar valor de RMSD menor que 2.0Å, dentro do parâmetro de idealidade (YUSUF *et al.*, 2008). O complexo apresentou energia de afinidade de -6.2 kcal/mol, valor menor que -6.0 kcal/mol (SHITYAKOV; FÖRSTER, 2014) confirmando a estabilidade do complexo ligante-receptor formado. O controle Bz apresentou RMSD de 1.526Å e energia de afinidade de -7.4 kcal/mol, similar ao estudo de Gomes e colaboradores (2023).

Em relação às interações envolvidas na formação do complexo, observamos que o HTMCX (Figura 25-A) apresentou sete *H-bonds* de intensidade forte, sendo quatro com os resíduos de cadeia lateral apolar Ala-13A (2.85Å), Gly-14A (2.22Å), Gly-16A (2.49Å), Ala-160A (1.78Å) e três com os resíduos de cadeia lateral polar não carregada Ser-47A (2.64Å) e Thr-52A (2.06 e 2.86Å), evidenciamos também que o ligante apresentou uma *H-bond* de intensidade moderada com o resíduo de cadeia lateral polar não carregada Ser-15A (3.54Å).

O complexo Bz-TR (Figura 25-B), apresentou uma interação hidrofóbica com o resíduo de cadeia lateral apolar Ile-200B (3.60Å), duas *H-bonds* de intensidade forte com o resíduo de cadeia lateral polar não carregada Thr-335B (2.76 e 2.95Å) e uma interação  $\pi$ - $\pi$  Stacking com o resíduo aromático Phe-199B (5.00Å).

Figura 25: Complexo de interação do receptor TR com HTMCX (A) e Bz (B).



Legenda: Complexo e mapas de interação da enzima TR com os ligantes HTMCX (A) e Bz (B).

Fonte: Fonte: Grupo de Química Teórica e Eletroquímica (GQTE) – UECE.

## 5 DISCUSSÃO

Apesar de ser uma enfermidade identificada há décadas, a DC ainda aflige a população de forma devastadora, principalmente nos países emergentes, onde as Políticas de Saúde Pública são precárias e desiguais. O único fármaco disponível no mercado brasileiro é o Bz. Sua eficácia para cura parasitológica tem sido relatada na fase aguda da doença, porém o mesmo não ocorre na fase crônica (CONCEIÇÃO *et al.*, 2018).

As diferenças de eficácia deste fármaco na fase aguda e crônica não estão totalmente esclarecidas, mas podem estar relacionadas às suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Ademais, manifesta diversos efeitos adversos decorrentes das altas doses, como por exemplo, vômitos, dermatite e, em casos mais graves, depressão da medula óssea e polineuropatia periférica (FERREIRA *et al.*, 2019), o que pode dificultar a continuidade da terapia. Nesse contexto, a prospecção de novas moléculas para o tratamento, controle e enfrentamento dessa doença é de extrema importância.

Desde muito tempo, é sabido a diversidade medicinal das plantas. Os avanços científicos têm mostrado que as acetofenonas apresentam variadas atividades biológicas em uma variedade de organismos, das quais podemos citar: anti-hepatite B (YAMASAKI *et al.*, 2021), antibacteriana (DU *et al.*, 2022), antimicrobiana (VIEIRA; SOUSA E SILVA; VINHA, 2023), antifotoenvelhecimento (NAIKOO *et al.*, 2023), antidiabéticas (TASLIMI *et al.*, 2020), entre outros.

Os derivados de acetofenonas também são precursores importantíssimos na síntese de medicamentos, entre os quais podemos citar o agente hipnótico-sedativo hemitartarato de zolpidem, o agente regulador de crescimento cloridrato de cinacalcete e o agente antifúngico tópico nitrato de oxiconazol, são exemplos de medicamentos sintetizados a partir de derivados de acetofenona (ZUBKOV; KOUZNETSOV, 2020). No entanto, poucos são os estudos voltados à busca de novos fármacos antichagásicos a partir destes precursores.

Para tanto, a 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona (HTMCX), caracterizada por ser uma acetofenona, apresentou atividade antioxidante, antiacetilcolinesterase (HOLANDA, 2019), antifúngica (AGUIAR, 2015) e antiinflamatória

(CAVALCANTI, 2023). Além disso, os derivados desta substância também têm sido relatados com bastante promissores, tais como atividade anti-SARS-CoV-2 (ALMEIDA NETO, 2021), e também antifúngica (LOPES, 2019). Embora, poucos sejam os estudos desta molécula como alternativa para terapia antichagásica, esta demonstra ser bastante promissora.

No presente estudo, foi descrito pela primeira vez o efeito tripanocida da acetofenona HTMCX, bem como seu possível mecanismo de ação. Essa molécula foi sintetizada e caracterizada previamente, e a realização do estudo de atividade *in vitro* e *in silico* teve como finalidade avaliar os efeitos nas principais formas de sobrevivência do *T. cruzi*.

As células hospedeiras de mamíferos (LLC-MK2) possuem alta suscetibilidade à infecção e facilidade de cultivo e, geralmente, são utilizadas para investigar substâncias de baixa toxicidade, além de nortear sobre quais concentrações podem ser utilizadas para outras avaliações (MAGALHÃES, 2021). Dessa maneira, através do ensaio de citotoxicidade foi possível observar que a substância apresentou toxicidade apenas na maior concentração testada. E que as demais concentrações foram menos tóxicas, até mesmo, que o fármaco de referência (Bz). Esse efeito pode estar relacionado com a sua capacidade de interagir com resíduos de aminoácidos nucleofílicos presentes nas biomoléculas (OTERO *et al.*, 2014).

A molécula em estudo apresentou efeito em formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, inibindo de modo concentração e tempo-dependentes a proliferação celular, além de, na maior concentração, ser capaz de matar quase totalmente os parasitos. Resultados semelhantes foram observados em um estudo com *in vitro* e *in silico* com trimetoxifenilchalconas (MAGALHÃES, 2021) e p-aminochalconas sintéticas sobre cepa Y de *T. cruzi* (GOMES, 2023).

As acetofenonas são precursoras do anel aromático A das chalconas (ROSA, 2018). A biossíntese das chalconas começa com a condensação do composto, derivado da fenilalanina (acetofenona), com três moléculas de malonil-CoA catalisada pela enzima chalcona sintase, formando o intermediário, resultando na formação da chalcona hidroxilada 6 que pode ainda ser substrato da enzima chalcona isomerase (DUARTE, 2018). Estas apresentam inúmeras atividades descritas a saber: antifúngica (LOPES,

2019; OSMANIYE *et al.*, 2018), antimalárica (DEVI *et al.*, 2018; REETA *et al.*, 2019) e antibacteriana (AL-SAHAB *et al.*, 2020; UŠJAK *et al.*, 2019).

A HTMCX foi capaz de aumentar a seletividade em comparação ao grupo controle, cujo IS foi de 5,66 e 3,11, respectivamente. Esse efeito ocorreu devido à uma redução da toxicidade em células hospedeiras de mamíferos, sem comprometer a funcionalidade no parasito. Embora os valores encontrados sejam inferiores ao preconizado pela OMS (IS>50), este achado corrobora com os avanços dos conhecimentos científicos de forma a permitir o desenvolvimento de moléculas menos tóxicas com efeito antiparasitário.

As acetofenonas com valor LC<sub>50</sub> de 815 mg/kg, são classificadas como não cancerígenas para o ser humano, e por isso são utilizadas na indústria farmacêutica para diversos fins. A partir disso, alguns agentes farmacológicos foram desenvolvidos a partir de acetofenonas e propostos para uso prático no tratamento de diferentes doenças, são exemplo, o antidepressivo bupropiona, o anorexígeno anfepramona (dietilpropiona), e o agente neuropsiquiátrico pirovalerona (ZUBKOV; KOUZNETSOV, 2020).

A substância foi utilizada também para a avaliação do efeito anti-amastigota, e não só reduziu a quantidade de amastigotas dentro das células infectadas nas duas concentrações mais altas, mas também reduziu o percentual de células infectadas nas em todas as concentrações testadas. Demonstrando, então, um possível impedimento na proliferação intracelular das amastigotas.

Semelhante aos resultados encontrados no presente estudo, uma pesquisa desenvolvida por Soares e colaboradores (2012) demonstrou que o tratamento de células de mamíferos (LLC-MK2) com acetofenona  $\alpha$ -aminocetona 1,4-diamino-2-butanona levou à alteração do balanço redox celular, à ativação de resposta antioxidante e ao desencadeamento de morte celular via apoptose e parada de ciclo celular. Em formas tripomastigotas de *T. cruzi* o tratamento com a substância acarretou na redução da motilidade e viabilidade destes parasitas. Além do mais, demonstrou-se eficiente em limitar a invasão de tripomastigotas às células hospedeiras (LLC-MK2) e redução da proliferação de amastigotas intracelulares.

Bortoluzzi e colaboradores (2021) descreveu um efeito semelhante de uma fração rica em chalconas de *L. culturatus* contra formas amastigotas de *T. cruzi*. A redução na viabilidade de amastigotas e na infectividade provocada pela HTMCX pode

estar relacionada com a interferência em processos celulares de importância para a sobrevivência parasitária (MAGALHÃES, 2021).

Dessa forma, a atividade tripanocida da substância pode ser avaliada através dos resultados satisfatórios oriundos dos ensaios realizados sobre as formas de vida do parasito. Sobretudo, se tratando dos ensaios sobre tripomastigota, forma não replicativa, além de apresentar-se moderadamente tóxico para as células LLC-MK2.

As avaliações análogas a apoptose e necrose, bem como de morte dos parasitos, foram realizadas através de citometria de fluxo após marcação com 7-AAD e Anexina V. As concentrações analisadas promoveram marcação única que evidenciaram uma lesão de membrana semelhante à que acontece na necrose, o que compromete a recuperação dos parasitos, podendo ocasionar a perda de integridade de membrana e ao dano de organelas (MENNA-BARRETO, 2019).

Além disso, foi possível evidenciar o estresse oxidativo pela produção de ERO e diminuição do potencial mitocondrial. Desse modo, o efeito tripanocida dessas moléculas aparentemente não parece ser mediado por reações nucleofílicas, mas sim através da interferência em vias metabólicas do parasito. Lopes e colaboradores (2019) evidenciaram que estruturas semelhantes a chalconas, derivados do ácido p-cumárico, também provocaram dano de membrana e processo sugestivo de necrose em *T. cruzi*. Apesar da escassez de estudos nesta vertente, alguns resultados demonstram que este mecanismo pode estar associado ao efeito destas moléculas em células cancerígenas (DOS SANTOS *et al.*, 2019).

A evidência de estresse oxidativo a partir dos ensaios de citometria de fluxo nos direciona para a existência de vias alternativas de metabolização da substância. Por isso, foram realizadas simulações de docking molecular para analisar as interações entre HTMCX-tripanotiona redutase (TR) e, também, HTMCX-cruzaína (Cr) de *T. cruzi*. Estas enzimas são consideradas alvos promissores para o desenvolvimento de novos medicamentos tripanocidas, uma vez que está envolvida na sobrevivência do hospedeiro e em vias metabólicas essenciais ao longo do seu ciclo de vida (KHAN, 2007; MCGRATH *et al.*, 1995).

Embora não tão expressiva, quando comparada as interações HTMCX-TR, os resultados da interação HTMCX-Cr apresentaram-se dentro do parâmetro de idealidade ( $<2.0\text{\AA}$ ), interagindo com os resíduos Ala-138A, Trp-184, His-162. Apenas esta última

sendo de intensidade forte. A substância apresentou afinidade com TR considerável, interagindo com os resíduos Ala-13, Ala-160, Ser-47, Gly-14, Gly-16, Ser-15 e Thr-52. Todas essas interações foram fortes e sugerem uma conformação ligante-proteína estável.

A porção hidrofóbica da enzima, formada por Phe-396, Pro-398, Leu-399, Cys-469, Ser-470, Met-471 e Arg-472, atribui elevada seletividade para a enzima parasitária, quando comparada à isoforma humana, com uma melhor interação com o substrato [T(S)<sub>2</sub>] (DA PAIXÃO; PITA, 2019; MAGALHÃES, 2021). Embora a interação não esteja totalmente localizada no sítio catalítico, foi demonstrado que o substrato [T(S)<sub>2</sub>] liga-se ao resíduo Ser-15 através da ligação de hidrogênio durante o mecanismo enzimático (BOND *et al.*, 1999), o que indica que a substância pode potencialmente interferir na estabilização do substrato natural para TR.

Nesse contexto, derivados de *Diaspyros crassiflora* demonstraram, através do docking, interações inibitórias com TR de *T. cruzi*, designando atividade promissora para a terapia antichagásica (ULIASSI *et al.*, 2017). O derivado da plumbagina, 5-hidróxi-2-metil-1,4-naftoquinona, também apresentou inibição de TR no gênero *Leishmania sp.*, este achado está associado com inchaço mitocondrial, aumento da produção de ERO e morte celular (AWASTHI *et al.*, 2016).

O comprometimento da TR relaciona-se aos resultados de citometria de fluxo, especialmente, no que diz respeito à análise do estresse oxidativo. Como a TR é a principal enzima responsável pela eliminação de ERO no *T. cruzi*, uma inibição potencial pode levar a um efeito tripanocida eficiente. Além disso, a TR não está presente em hospedeiros mamíferos, o que pode ser explorado como um mecanismo específico para drogas tripanocidas.

Todavia, poucos são os estudos relacionando as acetofenonas com a inibição de sistemas redox do *T. cruzi*. Dessa maneira, os achados do presente estudo, sobretudo, na morte celular e na função mitocondrial e do parasito reforçam a importância do delineamento molecular destas substância utilizando alvos proteicos do parasito para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas para doenças negligenciadas, em especial, para a doença de Chagas.

Holanda (2019), em um ensaio com *zebrafish* e tratamento com a HTMCX, demonstrou a capacidade desta em inibir a satisfatoriamente colinesterase, no entanto,



esta não apresentou atividade antioxidante tão eficaz em comparação com outros resultados obtidos na literatura para outras substâncias da mesma classe. Entretanto, é necessária a realização de mais testes, utilizando outros métodos de avaliação antioxidante, para comprovar a ação antioxidante positiva ou negativa da acetofenona HTMCX.

Dentre alguns fatores que possam limitar a sua aplicabilidade estão as características já descritas para hidroxiaacetofenonas: baixa biodisponibilidade e solubilidade reduzida (ADKI; KULKARNI, 2020). Sendo assim, o desenvolvimento e a utilização de sistemas alternativos de produção de medicamentos poderá ser empregado a fim de melhorar a eficácia e disponibilidade da substância.

Por fim, pode-se inferir que a HTMCX apresentou potencial atividade tripanocida, através de mecanismos de ação ainda não esclarecidos, mas que nos levam a pressupor que seja através de vias metabólicas, por meio do estresse oxidativo e dano de membrana observados. Estes acontecimentos podem estar ligados a importantes enzimas (Cr e TR) que são fundamentais para a manutenção da sobrevivência do parasito e da infectividade. Os resultados promissores expressam a necessidade da continuidade de estudos desta molécula, com a finalidade do desenvolvimento de novas opções terapêuticas para o tratamento da DC.

## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Portanto, os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade, revelam que a HTMCX apresenta considerável efeito tripanocida. Além disso, devido a sua maior seletividade contra os amastigotas, através da redução do percentual de células infectadas e do número dessas formas intracelulares, indicam uma eventual potencialidade da substância para aplicação em modelos crônicos de DC.

A substância também foi capaz de provocar um considerável dano de membrana ao parasito com ocorrência de estresse oxidativo, evidenciados através do da produção de ERO e diminuição do potencial transmembrânico mitocondrial, bem como a interferência na atividade da TR. De modo geral, o presente estudo ressalta a importância da acetofenona como potencial molécula farmacológica no contexto da terapia antichagásica, tendo em vista os seus resultados promissores. Além de reforçar a continuidade da realização de novos desenhos experimentais tripanocidas.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, F. L. L. De. **Avaliação da atividade de acetofenonas isoladas de *Croton spp.* frente a fungos dermatofíticos e *Candida albicans***. Dissertação (Mestrado Acadêmico ou Profissional em 2015) - Universidade Estadual do Ceará, 2015.

ADASME, M. F., LINNEMANN, K. L., BOLZ, S. N., KAISER, F., SALENTIN, S., HAUPT, V. J., & SCHROEDER, M. PLIP 2021: expanding the scope of the protein-ligand interaction profiler to DNA and RNA. **Nucleic acids research**, **49**(W1), W530–W534. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab294>.

ADKI K.M., KULKARNI Y.A. Chemistry, pharmacokinetics, pharmacology and recent novel drug delivery systems of paeonol. **Life Sci.** 2020 Jun 1;250:117544. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117544. Epub 2020 Mar 13. PMID: 32179072.

ALMEIDA NETO, F. W. Q. **Theoretical, structural and *in silico* analysis of aminochalcones derivatives with potential antioxidant and anti-SARS-CoV-2**. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2021.

AL-SAHEB R., MAKHARZA S., AL-BATTAH F., ABU-EL-HALAWA R., KAIMARI T., ABU ABED O.S. Synthesis of new pyrazolone and pyrazole-based adamantyl chalcones and antimicrobial activity. **Biosci Rep.** 2020 Sep 30;40(9):BSR20201950. doi: 10.1042/BSR20201950. PMID: 32914839; PMCID: PMC7517278.

Altervista. **Cultura de células**. Disponível em: <[https://cellculture.altervista.org/cell-viability-assay-mtt/?lang=pt&doing\\_wp\\_cron=1698612296.804769763946533203125](https://cellculture.altervista.org/cell-viability-assay-mtt/?lang=pt&doing_wp_cron=1698612296.804769763946533203125)>.

ANDRADE NETO, J. B., PESSOA DE FARIAS CABRAL, V., BRITO NOGUEIRA, L. F., ROCHA DA SILVA, C., GURGEL DO AMARAL VALENTE SÁ, L., RAMOS DA SILVA, A., BARBOSA DA SILVA, W. M., SILVA, J., MARINHO, E. S., CAVALCANTI, B. C., ODORICO DE MORAES, M., & NOBRE JÚNIOR, H. V. Anti-MRSA activity of curcumin in planktonic cells and biofilms and determination of possible action mechanisms. **Microbial pathogenesis**, 155, 104892. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104892>.

ARANDA A., SEQUEDO L., TOLOSA L., QUINTAS G., BURELLO E., CASTELL J.V., GOMBAU L. Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: A quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells, **Toxicology in Vitro**, Volume 27, Issue 2, 2013, Pages 954-963, ISSN 0887-2333, <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.01.016>.

ARAÚJO JÚNIOR, C. A.; MENDES, J. B.; CABACINHA, C. D.; ASSIS, A. L. de; MATOS, L. M. A.; LEITE, H. G. Meta-heuristic clonal selection algorithm for optimization of forest planning. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 41, n. 6, p. 1-10, 2017.

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.

ARGOLO, A. M. *et al.* Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil. Fundação Oswaldo Cruz. Programa Integrado de Doença de Chagas (PIDC). **Instituto Oswaldo Cruz**. Ação comemorativa do centenário de descoberta da doença de Chagas. Rio de Janeiro, 2008.

AWASTHI, B. P. *et al.* Plumbagin, a plant-derived naphthoquinone metabolite induces mitochondria mediated apoptosis-like cell death in *Leishmania donovani*: an ultrastructural and physiological study. **Apoptosis**, v. 21, n. 8, p. 941–953, 2016.

BARBOSA DA SILVA E., DALL E., BRIZA P., BRANDSTETTER H., FERREIRA R.S. Cruzain structures: apocruzain and cruzain bound to S-methyl thiomethanesulfonate and implications for drug design. **Acta Crystallogr F Struct Biol Commun**. 2019 Jun 1;75(Pt 6):419-427. doi: 10.1107/S2053230X19006320. Epub 2019 May 13. PMID: 31204688; PMCID: PMC6572096.

BATISTA C.M., KESSLER R.L., EGER I., SOARES M.J. *Trypanosoma cruzi* Intracellular Amastigotes Isolated by Nitrogen Decompression Are Capable of Endocytosis and Cargo Storage in Reservosomes. **PLoS ONE** 10(6): e0130165. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130165>.

BERMUDEZ J., DAVIES C., SIMONAZZI A., REAL J.P., PALMA S. Current drug

therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Trop.** 2016 Apr;156:1-16. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.12.017. Epub 2015 Dec 30. PMID: 26747009.

Bern C. Chagas' Disease. **N Engl J Med.** 2015 Jul 30;373(5):456-66. doi: 10.1056/NEJMra1410150. PMID: 26222561.

BERN C., MESSENGER L.A., WHITMAN J.D., MAGUIRE J.H. Chagas Disease in the United States: a Public Health Approach. **Clin Microbiol Rev.** 2019 Nov 27;33(1):e00023-19. doi: 10.1128/CMR.00023-19. PMID: 31776135; PMCID: PMC6927308.

BIOVIA Dassault Systèmes, “Discovery Studio Visualizer Version 16.1.0.” **Accelrys Software Inc.**, San Diego, 2016.

BOMBAÇA A.C.S., VIANA P.G., SANTOS A.C.C., SILVA T.L., RODRIGUES A.B.M., GUIMARÃES A.C.R., GOULART M.O.F., DA SILVA JÚNIOR E.N., MENNA-BARRETO R.F.S. Mitochondrial dysfunction and ROS production are essential for anti-*Trypanosoma cruzi* activity of  $\beta$ -lapachone-derived naphthoimidazoles. **Free Radic Biol Med.** 2019 Jan;130:408-418. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.11.012. Epub 2018 Nov 14. PMID: 30445126.

BOND, C.S., ZHANG, Y., BERRIMAN, M., CUNNINGHAM, M.L., FAIRLAMB, A.H., HUNTER, W.N. Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors. **Structure** 7, 81–89. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80011-2](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80011-2).

BORTOLUZZI A.A.M., STAFFEN I.V., BANHUK F.W., GRIEBLER A., MATOS P.K., AYALA T.S., ALVES DA SILVA E.A., SARRAGIOTTO M.H., SCHUQUEL I.T.A., MARINHO JORGE T.C., MENOLLI R.A. 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**, Volume 28, Issue 1, 2021, Pages 99-108, ISSN 1319-562X, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.036>.

BRAK K., KERR I.D., BARRETT K.T., FUCHI N., DEBNATH M., ANG K., ENGEL

J.C., MCKERROW J.H., DOYLE P.S., BRINEN L.S., ELLMAN J.A. Nonpeptidic tetrafluorophenoxymethyl ketone cruzain inhibitors as promising new leads for Chagas disease chemotherapy. **J Med Chem.** 2010 Feb 25;53(4):1763-73. doi: 10.1021/jm901633v. PMID: 20088534; PMCID: PMC2838180.

BRASIL. Doença de Chagas. **Boletim Epidemiológico**, v. 2, 2021.

CARTUCHE L., SIFAOU I., LÓPEZ-ARENCIBIA A., BETHENCOURT-ESTRELLA C.J., SAN NICOLÁS-HERNÁNDEZ D., LORENZO-MORALES J., PIÑERO J.E., DÍAZ-MARRERO A.R., FERNÁNDEZ J.J. Antikinetoplastid Activity of Indolocarbazoles from *Streptomyces sanyensis*. **Biomolecules.** 2020 Apr 24;10(4):657. doi: 10.3390/biom10040657. PMID: 32344693; PMCID: PMC7226613.

CASTRO, S.L. De; SOEIRO, M.N.C. Drogas tripanossomicidas. Estudos pré-clínicos da doença de Chagas. Laboratório de Biologia Celular, **Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ**, 2017.

CAVALCANTI, M.M. **As 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenilchalconas protegem as células tubulares renais contra os danos oxidativos e inflamatórios causados pela cetamina – possível envolvimento das vias JNK/46a e MAPK/CJA.** Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Tese. Fortaleza, 2023.

CHAN, L. L.-Y. MCCULLEY, K. J.; KESSEL, S. L. Assessment of Cell Viability with Single-, Dual-, and Multi-Staining Methods Using Image Cytometry. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1601, p. 27–41, 2017.

CHAO, C., LEONE, J.L., VIGLIANO, C.A. Chagas disease: Historic perspective. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, v. 1866, n. 5, p. 165689, 2020.

CONCEIÇÃO G.C.L., SARTO M.P.M., SILVA H.F.L., ABREU A.P.De., CONTER C.C., TOLEDO M.J.De O. Um panorama sobre a eficácia de novas abordagens no tratamento da doença de Chagas. **Braz. J. Surg. Clin. Res.** Vol.22,n.2,pp.72-78 (Mar – Mai 2018).

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. 277–82, maio/2015.

CSIZMADIA, P. **MarvinSketch and MarvinView: Molecule Applets for the World ide Web**. 2019.

CUNHA, E. L. A. **Avaliação do tratamento com benznidazol, itraconazol e sua associação na fase aguda da doença de Chagas experimental no modelo cão**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2017.

CUNHA-FILHO M.S.S. Da., SÁ-BARRETO L.C.L.De., LEONARDI D., LAMAS M.C., SALOMÓN C.J. Recentes avanços no tratamento da doença de Chagas. **Brasília Med**, 2012;49(4):279-283.

DA PAIXÃO, V. G.; PITA, S. S. DA R. In silico identification and evaluation of new *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase (TcTR) inhibitors obtained from natural products database of the Bahia semi-arid region (NatProDB). **Computational Biology and Chemistry**, v. 79, n. January, p. 36–47, 2019.

DELANO, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.3. **Schrödinger LLC**. 2020.

DE MENEZES R.R.P.P.B., SAMPAIO T.L., LIMA D.B., SOUSA P.L., DE AZEVEDO I.E.P, MAGALHÃES E.P., TESSAROLO L.D., MARINHO M.M., DOS SANTOS R.P., MARTINS A.M.C. Antiparasitic effect of (-)- $\alpha$ -bisabolol against *Trypanosoma cruzi* Y strain forms. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 2019 Nov;95(3):114860. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2019.06.012. Epub 2019 Jun 28. PMID: 31353066.

DEVI K., RAJENDRAN V.; AYUSHEE; RANGARAJAN T.M., SINGH R.P., GHOSH P.C., SINGH M. Synthesis and Evaluation of Antiplasmodial Activity of 2,2,2-Trifluoroethoxychalcones and 2-Fluoroethoxy Chalcones against *Plasmodium falciparum* in Culture. **Molecules**. 2018 May 14;23(5):1174. doi: 10.3390/molecules23051174. PMID: 29757989; PMCID: PMC6099641.

DIAS, João Carlos Pinto *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília**, v. 25, n. esp, p. 7-86, jun. 2016. Epub 30-Jun-2016. <http://dx.doi.org/10.5123/s1679-49742016000500002>.

DNDI. **Drugs for Neglected Diseases initiative**. Disponível em: <[https://dndi.org/diseases/chagas/facts/?gclid=Cj0KCQjw8eOLBhC1ARIsAOzx5cHnGf8ACy2v40oGaaWo6XAJLEb-K25zSElnDIzV2Pg\\_9MdiA7AbzUaAnC7EALw\\_wcB](https://dndi.org/diseases/chagas/facts/?gclid=Cj0KCQjw8eOLBhC1ARIsAOzx5cHnGf8ACy2v40oGaaWo6XAJLEb-K25zSElnDIzV2Pg_9MdiA7AbzUaAnC7EALw_wcB)>.

DOS SANTOS M.B., BERTHOLIN ANSELMO D., DE OLIVEIRA J.G., JARDIM-PERASSI B.V., ALVES MONTEIRO D., SILVA G., GOMES E., LUCIA FACHIN A., MARINS M., DE CAMPOS ZUCCARI D.A.P., OCTAVIO REGASINI L. Antiproliferative activity and p53 upregulation effects of chalcones on human breast cancer cells. **J Enzyme Inhib Med Chem**. 2019 Dec;34(1):1093-1099. doi: 10.1080/14756366.2019.1615485. PMID: 31117836; PMCID: PMC6534249.

DOYLE P.S., ZHOU Y.M., HSIEH I., GREENBAUM D.C., MCKERROW J.H., ENGEL J.C. The *Trypanosoma cruzi* protease cruzain mediates immune evasion. **PLoS Pathog**. 2011 Sep;7(9):e1002139. doi: 10.1371/journal.ppat.1002139. Epub 2011 Sep 1. PMID: 21909255; PMCID: PMC3164631.

DUARTE, G. D. **Preparação e avaliação de atividade antimicrobiana de chalconas heterocíclicas**. Universidade Federal da Paraíba. Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Centro de Biotecnologia. João Pessoa, 2018.

DU, K., ZHANG, Z., JING, D., WANG, Y., LI, X., MENG, D. Diterpene glycosides, acetophenone glycosides and tannins from polar extracts of the root of *Euphorbia fischeriana* with cytotoxicity and antibacterial activities. **Phytochemistry** **203**, 113382. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113382>.

ECHAVARRÍA N.G., ECHEVERRÍA L.E., STEWART M., GALLEGOS C., SALDARRIAGA C. Chagas Disease: Chronic Chagas Cardiomyopathy. **Curr Probl Cardiol**. 2021 Mar;46(3):100507. doi: 10.1016/j.cpcardiol.2019.100507. Epub 2019 Dec 1. PMID: 31983471.

FERREIRA, E. I. Drug Design and Development for Neglected Diseases. **Current**

**Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 23, p. 4298–4300, 2019.

FERREIRA, L. G.; ANDRICOPULO, A. D. Targeting cysteine proteases in trypanosomatid disease drug discovery. **Pharmacology & therapeutics**, v. 180, p. 49–61, dez. 2017.

FIOCRUZ. **Portal da Doença de Chagas**. Disponível em:

<<https://portal.fiocruz.br/doenca/doenca-de-chagas>>.

FIRMO, W. Da C.A.; MENEZES, V. De J.M. de; PASSOS, C.E. De C.; DIAS, C. N., ALVES, L.P.L., DIAS, I.C.L.; SANTOS NETO, M., OLEA, R.S.G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, São Luís, 2012. Disponível em:

<https://periodicoseletronicos.ufma.br/index.php/cadernosdepesquisa/article/view/746>.

FLORES-GONZALEZ, J.; CANCINO-DÍAZ, J. C.; CHAVEZ-GALAN, L. Flow Cytometry: From Experimental Design to Its Application in the Diagnosis and Monitoring of Respiratory Diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 22, 22 nov. 2020.

GOMES, N.D.B.G. **Efeito tripanocida *in silico* e *in vitro* de p-aminochalconas sintéticas**. Universidade Federal do Ceará Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Dissertação. Fortaleza, 2023.

HALGREN, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. **J. Comput. Chem.**, vol. 17, no. 5–6, pp. 490–519, 1996.

HANWELL, M.D., CURTIS, D.E., LONIE, D.C. *et al.* Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **J Cheminform** **4**, 17 (2012). <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>.

HOLANDA, C.L.A. **Atividades antioxidante, antiacetilcolinesterase da chalcona 2- hidroxí-3,4,6-trimetoxiacetofenona e sua avaliação da segurança não clínica frente ao zebrafish (danio rerio) adulto**. Universidade Estadual do Ceará. Centro de



Ciências e Tecnologia. Curso de Graduação em Química. Licenciatura. Fortaleza, 2019.

HUEY, G. R, MORRIS, M., & FORLI, S. Using autodock 4 and autodock vina with autodocktools: a tutorial. **The Scripps Research Institute Molecular Graphics Laboratory**, p. 92037, 2012.

IMBERTY, A., HARDMAN, K. D., CARVER, J. P., & PÉREZ, S. Molecular modelling of protein-carbohydrate interactions. Docking of monosaccharides in the binding site of concanavalin A. **Glycobiology**, 1(6), 631–642.  
<https://doi.org/10.1093/glycob/1.6.631>.

JACKSON Y., WYSSA B., CHAPPUIS F. Tolerance to nifurtimox and benznidazole in adult patients with chronic Chagas' disease. **J Antimicrob Chemother.** 2020 Mar 1;75(3):690-696. doi: 10.1093/jac/dkz473. PMID: 31754690; PMCID: PMC7021088.

JOHNSON, L. V; WALSH, M.L.; CHEN, L.B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 2, p. 990–4, fev. 1980.

KESSLER R.L., SOARES M.J., PROBST C.M., KRIEGER M.A. *Trypanosoma cruzi* Response to Sterol Biosynthesis Inhibitors: Morphophysiological Alterations Leading to Cell Death. 2013. **PLoS ONE** 8(1): e55497.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055497>.

KHAN M. O. Trypanothione reductase: a viable chemotherapeutic target for antitrypanosomal and antileishmanial drug design. **Drug target insights**, 2, 129–146.

KIM, H., KIM H.Y., LEE E.Y., CHOI B.K., JANG H., CHOI Y. A Quenched Annexin V-Fluorophore for the Real-Time Fluorescence Imaging of Apoptotic Processes *In Vitro* and *In Vivo*. **Advanced science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)**, v. 7, n. 24, p. 2002988, dez. 2020.

LI Y., KONG D., FU Y., SUSSMAN M. R., & WU H. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant physiology and biochemistry : PPB**, 148, 80–89.

<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006>

LIMA D.B., MELLO C.P., BANDEIRA I.C.J., PESSOA BEZERRA DE MENEZES R.R.P, SAMPAIO T.L., FALCÃO C.B., MORLIGHEM J.R.L., RÁDIS-BAPTISTA G., MARTINS A.M.C. The dinoponeratoxin peptides from the giant ant *Dinoponera quadriceps* display in vitro antitrypanosomal activity. **Biol Chem**. 2018 Jan 26;399(2):187-196. doi: 10.1515/hsz-2017-0198. PMID: 28976889.

LOPES, L. M. A. **Avaliação antifúngica de chalconas obtidas a partir de 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona isolada de *Croton anisodontus* Mull. Arg. (Euphorbiaceae)**. 2019. Dissertação (Mestrado Acadêmico ou Profissional em 2019) . Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza , 2019.

LOPES S.P., CASTILLO Y.P., MONTEIRO M.L., MENEZES R.R.P.P.B., ALMEIDA R.N., MARTINS A.M.C., SOUSA D.P. Trypanocidal Mechanism of Action and in silico Studies of p-Coumaric Acid Derivatives. **Int J Mol Sci**. 2019 Nov 25;20(23):5916. doi: 10.3390/ijms20235916. PMID: 31775321; PMCID: PMC6928761.

LOSADA GALVÁN I., ALONSO-PADILLA J., CORTÉS-SERRA N., ALONSO-VEGA C., GASCÓN J., PINAZO M.J. Benznidazole for the treatment of Chagas disease. **Expert Rev Anti Infect Ther**. 2021 May;19(5):547-556. doi: 10.1080/14787210.2021.1834849. Epub 2020 Oct 21. PMID: 33043726.

LOSINNO A.D., MARTÍNEZ S.J., LABRIOLA C.A., CARRILLO C., ROMANO P.S. Induction of autophagy increases the proteolytic activity of reservosomes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Autophagy**. 2021 Feb;17(2):439-456. doi: 10.1080/15548627.2020.1720428. Epub 2020 Feb 4. PMID: 31983275; PMCID: PMC8007142.

MAGALHÃES, E. P. **Efeito tripanocida de 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenilchalconas em cepa Y de *Trypanosoma cruzi***. Universidade Federal do Ceará Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Dissertação. Fortaleza, 2021.

Manual MSD. **Doença de Chagas (Tripanossomíase americana)**. Disponível em:

<<https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/doen%C3%A7as-infecciosas/protozo%C3%A1rios-extraintestinais/doen%C3%A7a-de-chagas>>.

MARINHO, E. M., BATISTA DE ANDRADE NETO, J., SILVA, J., ROCHA DA SILVA, C., CAVALCANTI, B. C., MARINHO, E. S., & NOBRE JÚNIOR, H. V. Virtual screening based on molecular docking of possible inhibitors of Covid-19 main protease. **Microbial pathogenesis**, 148, 104365. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104365>.

MAYA J.D., CASSELS B.K., ITURRIAGA-VÁSQUEZ P., FERREIRA J., FAÚNDEZ M., GALANTI N., FERREIRA A., MORELLO A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**. 2007 Apr;146(4):601-20. doi: 10.1016/j.cbpa.2006.03.004. Epub 2006 Mar 12. PMID: 16626984.

MCGRATH, M. E., EAKIN, A. E., ENGEL, J. C., MCKERROW, J. H., CRAIK, C. S., & FLETTERICK, R. J. The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease. **Journal of molecular biology**, 247(2), 251–259. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.0137>.

MCKINNON, K. M. Flow Cytometry: An Overview. **Current Protocols in Immunology**, v. 120, n. 1, p. 5.1.1-5.1.11, 1 jan. 2018.

MENNA-BARRETO, R. F. S. Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over)kill. **Cell Death and Disease**, v. 10, n. 2, 2019.

Ministério da Saúde. **Doença de Chagas**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/doenca-de-chagas>>.

MONTEIRO M.L., LIMA D.B., MENEZES R.R.P.P.B., SAMPAIO T.L., SILVA B.P., SERRA NUNES J.V., CAVALCANTI M.M., MORLIGHEM J.E., MARTINS A.M.C. Antichagasic effect of hemocyanin derived from antimicrobial peptides of penaeus monodon shrimp. **Exp Parasitol**. 2020 Aug;215:107930. doi: 10.1016/j.exppara.2020.107930. Epub 2020 May 25. PMID: 32464221.

MOREIRA C.M.D.N., BATISTA C.M., FERNANDES J.C., KESSLER R.L., SOARES M.J., FRAGOSO S.P. Knockout of the gamma subunit of the AP-1 adaptor complex in the human parasite *Trypanosoma cruzi* impairs infectivity and differentiation and prevents the maturation and targeting of the major protease cruzipain. **PLoS One**. 2017 Jul 31;12(7):e0179615. doi: 10.1371/journal.pone.0179615. PMID: 28759609; PMCID: PMC5536268.

NAIKOO S.H., RASHID H., GUPTA R., SHARMA R.R., KUMAR S., AHMAD R., GUDUP S., SINGH P.P., ABDULLAH S.T. A Novel Molecule 3-(1'-Methyltetrahydropyridinyl)-2,4,6-Trihydroxy Acetophenone Alleviates Ultraviolet-B-Induced Photoaging in Human Dermal Fibroblasts and BALB/c Mice. **Photochem Photobiol**. 2023 Sep-Oct;99(5):1343-1351. doi: 10.1111/php.13784. Epub 2023 Feb 7. PMID: 36691736.

O'CONNOR J.E., VARGAS J.L., KIMLER B.F., HERNANDEZ-YAGO J., GRISOLIA S. Use of rhodamine 123 to investigate alterations in mitochondrial activity in isolated mouse liver mitochondria. **Biochem Biophys Res Commun**. 1988 Feb 29;151(1):568-73. doi: 10.1016/0006-291x(88)90632-8. PMID: 3348796.

OLIVEIRA M.T., TEIXEIRA A.M., COUTINHO H.D., MENEZES I.R., SENA D.M. Jr, SANTOS H.S., De MESQUITA B.M., ALBUQUERQUE M.R., BANDEIRA P.N., BRAZ-FILHO R. Identification and modulatory activity assessment of 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyacetophenone isolated from *Croton anisodontus* müll. Arg.(euphorbiaceae). **Nat Prod Commun**. 2014 May;9(5):665-8. PMID: 25026716.

OLIVEIRA R.B.De., ZANI C.L., FERREIRA R.S., LEITE R.S., ALVES T.M.A., SILVA T.H.A.Da., & ROMANHA A.J. Síntese, avaliação biológica e modelagem molecular de arilfuranos como inibidores da enzima tripanotona redutase. **Química Nova**, 31(2), 261–267. 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000200013>

OMS. Organização Mundial da Saúde. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1)>. Acesso em: 27 out. 2023.

OSMANIYE D., KAYA ÇAVUŞOĞLU B., SAĞLIK B.N., LEVENT S., ACAR ÇEVİK U., ATLI Ö., ÖZKAY Y., KAPLANCIKLI Z.A. Synthesis and Anticandidal

Activity of New Imidazole-Chalcones. **Molecules**. 2018 Apr 4;23(4):831. doi: 10.3390/molecules23040831. PMID: 29617329; PMCID: PMC6017838.

OTERO E., VERGARA S., ROBLEDO S.M., CARDONA W., CARDA M., VÉLEZ I.D., ROJAS C., OTÁLVARO F. Synthesis, leishmanicidal and cytotoxic activity of triclosan-chalcone, triclosan-chromone and triclosan-coumarin hybrids. **Molecules**. 2014 Aug 28;19(9):13251-66. doi: 10.3390/molecules190913251. PMID: 25170948; PMCID: PMC6271011.

PALOS I., LARA-RAMIREZ E.E., LOPEZ-CEDILLO J.C., GARCIA-PEREZ C., KASHIF M., BOCANEGRA-GARCIA V., NOGUEDA-TORRES B., RIVERA G. Repositioning FDA Drugs as Potential Cruzain Inhibitors from *Trypanosoma cruzi*: Virtual Screening, *In Vitro* and *In Vivo* Studies. **Molecules**. 2017 Jun 18;22(6):1015. doi: 10.3390/molecules22061015. PMID: 28629155; PMCID: PMC6152615.

PEREIRA-SILVA F.S., MELLO M.L.B.C. De . & ARAÚJO-JORGE T.C. De. Doença de Chagas: enfrentando a invisibilidade pela análise de histórias de vida de portadores crônicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, 27(5), 1939–1949. 2022. <https://doi.org/10.1590/1413-81232022275.08492021>

PÉREZ-MOLINA J.A., PÉREZ-AYALA A., MORENO S., FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ M.C., ZAMORA J., LÓPEZ-VELEZ R. Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. **J Antimicrob Chemother**. 2009 Dec;64(6):1139-47. doi: 10.1093/jac/dkp357. Epub 2009 Oct 9. PMID: 19819909.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet (London, England)**, v. 391, n. 10115, p. 82–94, 2018a.

PETRAVICIUS P.O., COSTA-MARTINS A.G., SILVA M.N., REIS-CUNHA J.L., BARTHOLOMEU D.C., TEIXEIRA M.M.G., ZINGALES B. Mapping benznidazole resistance in trypanosomatids and exploring evolutionary histories of nitroreductases and ABCG transporter protein sequences. **Acta Trop**. 2019 Dec;200:105161. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.105161. Epub 2019 Sep 5. PMID: 31494121.

PETTERSEN, E. F., GODDARD, T. D., HUANG, C. C., COUCH, G. S.,

GREENBLATT, D. M., MENG, E. C., & FERRIN, T. E. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of computational chemistry**, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.

PIACENZA, L.; TRUJILLO, M.; RADI, R. Reactive species and pathogen antioxidant networks during phagocytosis. **The Journal of experimental medicine**, v. 216, n. 3, p. 501–516, 2019.

PONCE N.E., CARRERA-SILVA E.A., PELLEGRINI A.V., CAZORLA S.I., MALCHIODI E.L., LIMA A.P., GEA S., AOKI M.P. *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, modulates interleukin-6-induced STAT3 phosphorylation via gp130 cleavage in different host cells. **Biochim Biophys Acta**. 2013 Mar;1832(3):485-94. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.12.003. Epub 2012 Dec 16. PMID: 23253440.

PUNUKOLLU G., GOWDA R.M., KHAN I.A., NAVARRO V.S., VASAVADA B.C. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. **Int J Cardiol**. 2007 Feb 14;115(3):279-83. doi: 10.1016/j.ijcard.2006.03.004. PMID: 16769134.

RAJNEESH, PATHAK J., CHATTERJEE A., SINGH S.P., SINHA R.P. Detection of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cyanobacteria Using the Oxidant-sensing Probe 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (DCFH-DA). **Bio Protoc**. 2017, Sep 5;7(17):e2545. doi: 10.21769/BioProtoc.2545. PMID: 34541194; PMCID: PMC8413551.

REETA, VINOTH R., RANGARAJAN T.M., AYUSHEE, SINGH R.P., SINGH M. Synthesis of novel chalcones through palladium-catalyzed CO cross-coupling reaction of bromo-chalcones with ethyl acetohydroxamate and their antiplasmodial evaluation against *Plasmodium falcipuram in vitro*. **Bioorg Chem**. 2019 May;86:631-640. doi: 10.1016/j.bioorg.2019.02.016. Epub 2019 Feb 8. PMID: 30818235.

RIOS, J.L; RECIO, M.C. Plantas Mediciniais e Atividade Antimicrobiana. **Revista de Etnofarmacologia** , vol. 100, nº 1–2 , agosto de 2005, p. 80–84. DOI.org (Crossref) , <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.025>.

RIVERA G., BOCANEGRA-GARCÍA V., ORDAZ-PICHARDO C., NOGUEDA-

TORRES B., MONGE A. New therapeutic targets for drug design against *Trypanosoma cruzi*, advances and perspectives. **Curr Med Chem.** 2009;16(25):3286-93. doi: 10.2174/092986709788803303. Epub 2009 Sep 1. PMID: 19548870.

SALENTIN, S., SCHREIBER, S., HAUPT, V. J., ADASME, M. F., & SCHROEDER, M. PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler, **Nucleic Acids Res.**, vol. 43, no. W1, pp. W443–W447, jul. 2015.

SANTANA K.H., OLIVEIRA L.G.R., BARROS DE CASTRO D., PEREIRA M. Epidemiology of Chagas disease in pregnant women and congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in the Americas: systematic review and meta-analysis. **Trop Med Int Health.** 2020 Jul;25(7):752-763. doi: 10.1111/tmi.13398. Epub 2020 May 26. PMID: 32279399.

SANTIAGO, R. N. S. **Propriedades estruturais e vibracionais da acetofenona C11O5H14 e da chalcona C15H13NO por espectroscopia Raman e infravermelho e cálculos de primeiros princípios.** Tese (Doutorado em Física) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

SANTOS NASCIMENTO, I. J. DOS; DE AQUINO, T. M.; DA SILVA-JÚNIOR, E. F. Cruzain and Rhodesain Inhibitors: Last Decade of Advances in Seeking for New Compounds Against American and African Trypanosomiasis. **Current topics in medicinal chemistry**, 31 mar. 2021.

SANTOS H.S., MESQUITA F.M.R., LEMOS T.L.G., MONTE F.J.Q., & BRAZ-FILHO R. Diterpenos casbanos e acetofenonas de *Croton nepetaefolius* (Euphorbiaceae). **Química Nova**, 31(3), 601–604, 2008.  
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000300026>.

SANTOS R.L., GUIMARAES G.P., NOBRE M.S.C., PORTELA A.S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Rev bras plantas med.** 2011;13(4):486–91. Available from: <https://doi.org/10.1590/S1516-05722011000400014>.

SARAVANAMUTHU, A., VICKERS, T. J., BOND, C. S., PETERSON, M. R., HUNTER, W. N., & FAIRLAMB, A. H. Two interacting binding sites for quinacrine

derivatives in the active site of trypanothione reductase: a template for drug design. **The Journal of biological chemistry**, 279(28), 29493–29500.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M403187200>.

SCHARFSTEIN, J. Subverting bradykinin-evoked inflammation by co-opting the contact system: lessons from survival strategies of *Trypanosoma cruzi*. **Current opinion in hematology**, v. 25, n. 5, p. 347–357, 2018.

SILVA, J., DA ROCHA M. N., MARINHO, E. M., MARINHO, M. M., MARINHO, E. S., & DOS SANTOS H. S. Evaluation of the ADME, toxicological analysis and molecular docking studies of the anacardic acid derivatives with potential antibacterial effects against *Staphylococcus aureus*. **J. Anal. Pharm. Res.**, vol. 10, no. 5, pp. 177–194, 2021.

SIMÕES M.V., ROMANO M.M.D., SCHMIDT A., MARTINS K.S.M., MARIN- NETO J.A. Chagas Disease Cardiomyopathy. **Int J Cardiovasc Sci**. 2018, Mar;31(2):173–89. Available from: <https://doi.org/10.5935/2359-4802.20180011>.

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**, 7, 23–36.  
<https://doi.org/10.2147/AABC.S63749>.

SOARES C. O., COLLI W., BECHARA E.J.H., ALVES M. J. M. 1,4 Diamino-2-butanone, a putrescine analogue, promotes redox imbalance in *Trypanosoma cruzi* and mammalian cells, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Volume 528, Issue 2, 2012, Pages 103-110, ISSN 0003-9861, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.09.005>.  
 TASLIMI P., SUJAYEV A., KARAMAN M., MAHARRAMOVA G., SADEGHIAN N., OSMANOVA S., SARDAROVA S., MAJDI N., OZEL HU., GULCIN İ. N-Substituted pyrimidinethione and acetophenone derivatives as a new therapeutic approach in diabetes. **Arch Pharm** (Weinheim). 2020 Sep;353(9):e2000075. doi: 10.1002/ardp.202000075. Epub 2020 Jun 14. PMID: 32537841.

TESSAROLO L.D., MENEZES R.R.P.P.B. De., MELLO C.P., LIMA D.B., MAGALHÃES E.P., BEZERRA E.M., SALES F.A.M., BARROSO NETO I.L., OLIVEIRA M.F., DOS SANTOS R.P., ALBUQUERQUE E.L., FREIRE V.N., MARTINS A.M.C. Nanoencapsulation of benzimidazole in calcium carbonate increases



its selectivity to *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**. 2018 Aug;145(9):1191-1198. doi: 10.1017/S0031182018000197. Epub 2018, Apr 12. PMID: 29642963.

TETAUD E., GIROUD C., PRESCOTT A.R., PARKIN D.W., BALTZ D., BITEAU N., BALTZ T., FAIRLAMB A.H. Molecular characterisation of mitochondrial and cytosolic trypanothione-dependent tryparedoxin peroxidases in *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem Parasitol**. 2001 Sep 3;116(2):171-83. doi: 10.1016/s0166-6851(01)00320-6. PMID: 11522350.

THE LANCET. Chagas disease: still a neglected emergency. **Lancet (London, England)**, v. 394, n. 10209, p. 1592, 2019.

TROTT O., OLSON A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **J Comput Chem**. 2010, Jan 30;31(2):455-61. doi: 10.1002/jcc.21334. PMID: 19499576; PMCID: PMC3041641.

UŠJAK D., IVKOVIĆ B., BOŽIĆ D.D., BOŠKOVIĆ L., MILENKOVIĆ M. Antimicrobial activity of novel chalcones and modulation of virulence factors in hospital strains of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Microb Pathog**. 2019 Jun;131:186-196. doi: 10.1016/j.micpath.2019.04.015. Epub, 2019 Apr 10. PMID: 30980878.

ULIASSI, E. *et al.* Crassiflorone derivatives that inhibit *Trypanosoma brucei* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (TbGAPDH) and *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase (TcTR) and display trypanocidal activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 141, p. 138–148, 2017.

VARSONICS. **Medicina de precisão do Hospital Israelita Albert Einstein**.

Disponível em: <<https://blog.varsomics.com/citometria-de-fluxo/>>

VELASCO, A., MORILLO, C.A. Chagas heart disease: A contemporary review. **Journal of Nuclear Cardiology**, v. 27, n. 2, p. 445–451, 18 abr. 2020.

VIEIRA, J. M., SOUSA E SILVA, C. A. L. A., VINHA, A. C. M. F. Acacia dealbata: de espécie invasiva a espécie promissora para a saúde pública. **A pesquisa em saúde:**

**desafios atuais e perspectivas futuras 2.** Cap. 19. p. 202. 2023.

WILKINSON S.R., TAYLOR M.C., HORN D., KELLY J.M., CHEESEMAN I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. **Proc Natl Acad Sci, U.S.A.** 2008 Apr 1;105(13):5022-7. doi: 10.1073/pnas.0711014105. Epub 2008 Mar 26. PMID: 18367671; PMCID: PMC2278226.

YAMASAKI M., MATSUDA N., MATOBA K., KONDO S., KANEGAE Y., SAITO I., NOMOTO A. Acetophenone 4-nitrophenylhydrazone inhibits Hepatitis B virus replication by modulating capsid assembly, **Virus Research**, Volume 306, 2021, 198565, ISSN 0168-1702, <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198565>.

YAN, J., ZHANG, G., PAN, J., & WANG, Y.  $\alpha$ -Glucosidase inhibition by luteolin: kinetics, interaction and molecular docking. **International journal of biological macromolecules**, 64, 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.12.007>.

YUSUF, D., DAVIS, A. M., KLEYWEGT, G. J., & SCHMITT, S. An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. **Journal of chemical information and modeling**, 48(7), 1411–1422. <https://doi.org/10.1021/ci800084x>.

ZAIDEL E.J., FORSYTH C.J., NOVICK G., MARCUS R., RIBEIRO A.L.P., PINAZO M.J., MORILLO C.A., ECHEVERRÍA L.E., SHIKANAI-YASUDA M.A., BUEKENS P., PEREL P., MEYMANDI S.K., RALSTON K., PINTO F., SOSA-ESTANI S. COVID-19: Implications for People with Chagas Disease. **Glob Heart**. 2020 Oct 13;15(1):69. doi: 10.5334/gh.891. PMID: 33150134; PMCID: PMC7566506.

ZHEOAT A.M., ALENEZI S., ELMAHALLAWY E.K., UNGOGO M.A., ALGHAMDI A.H., WATSON D.G., IGOLI J.O., GRAY A.I., De KONING H.P., FERRO V.A. Antitrypanosomal and Antileishmanial Activity of Chalcones and Flavanones from *Polygonum salicifolium*. **Pathogens**. 2021 Feb 5;10(2):175. doi: 10.3390/pathogens10020175. PMID: 33562567; PMCID: PMC7915666.

ZUBKOV, F. I., & KOUZNETSOV, V. V. Traveling across Life Sciences with

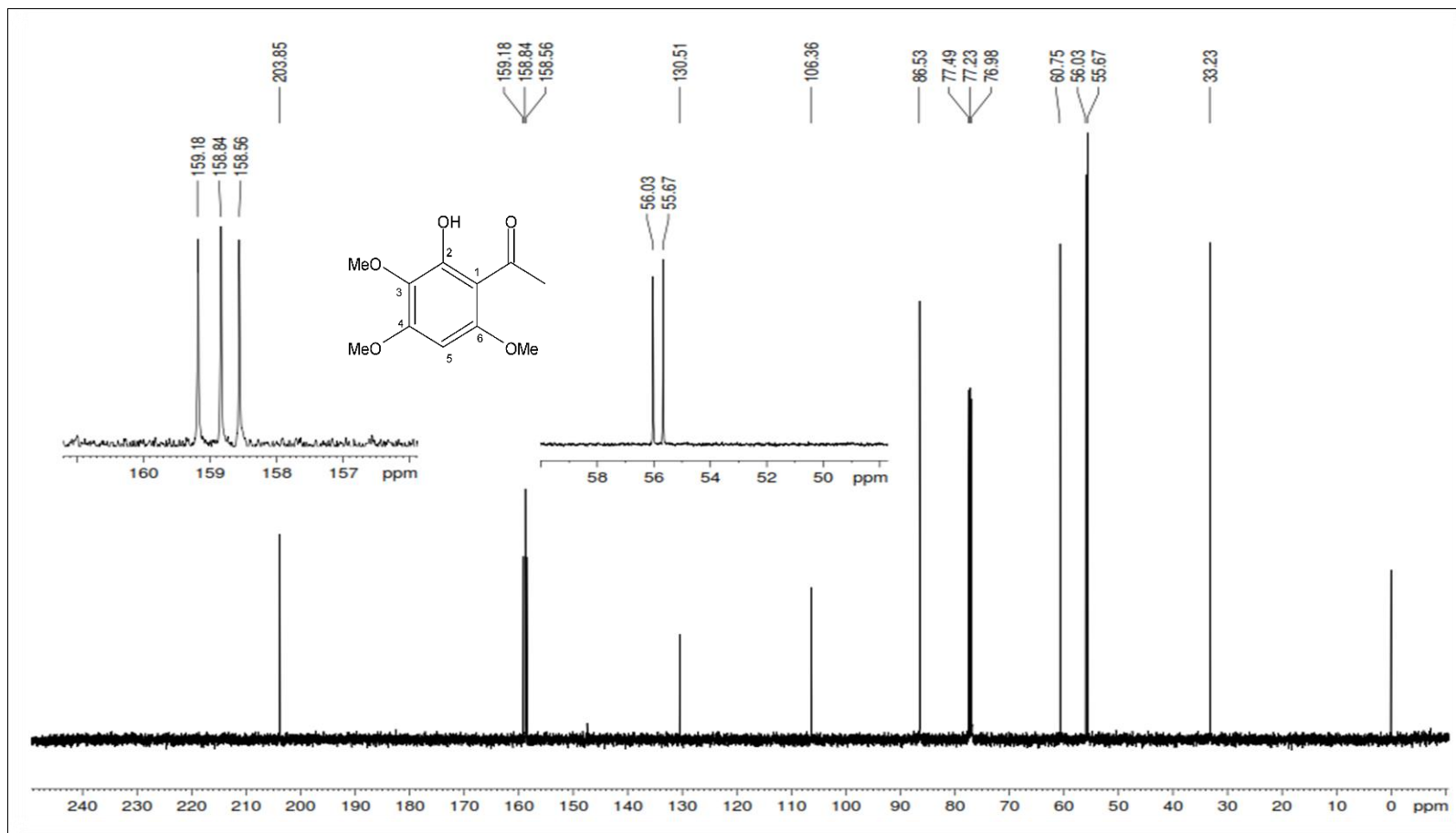
Acetophenone-A Simple Ketone That Has Special Multipurpose Missions. **Molecules** (Basel, Switzerland), 28(1), 370. <https://doi.org/10.3390/molecules28010370>.

APÊNDICE A - Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da HTMCX em  $\text{CDCl}_3$ .

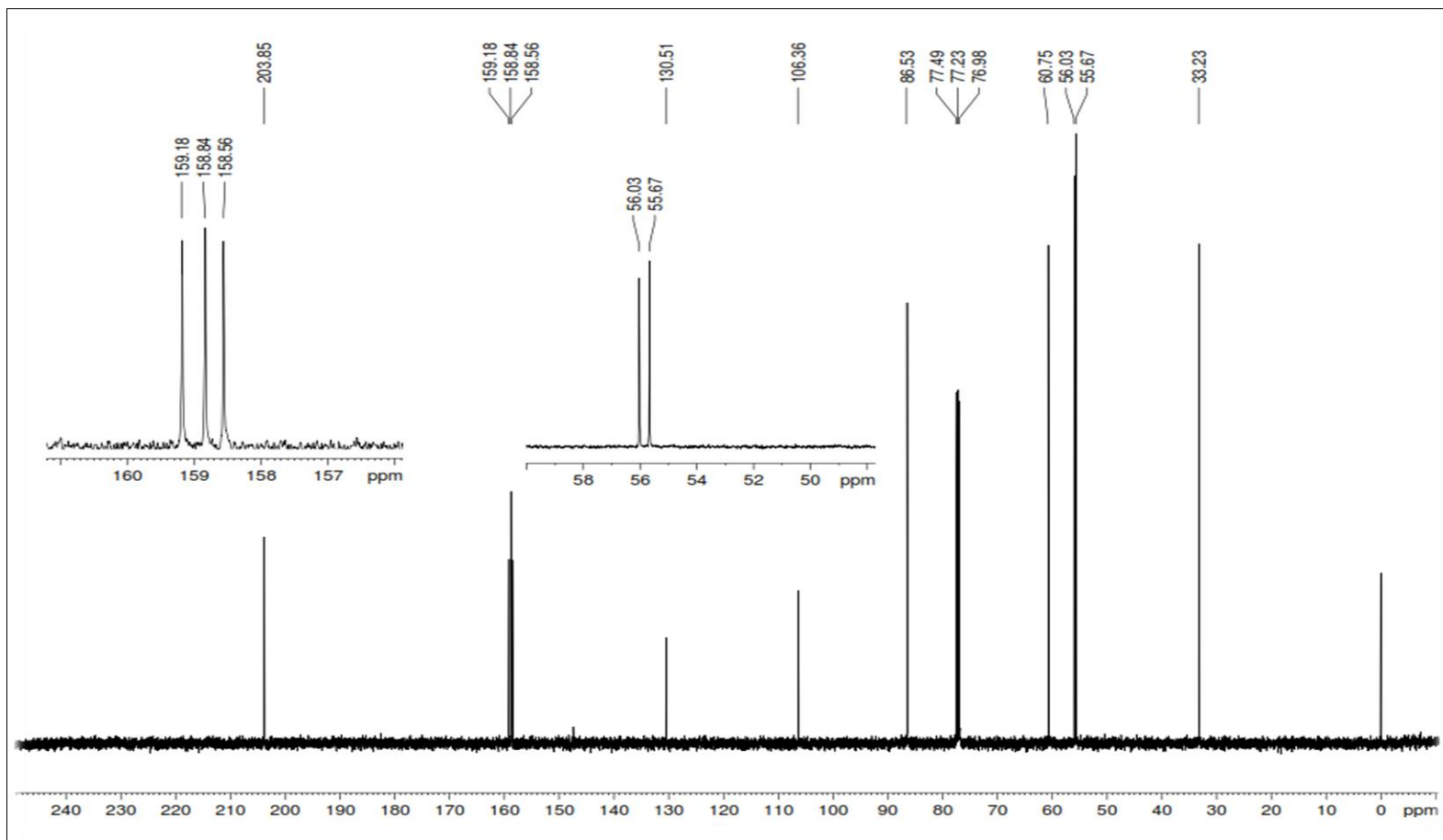
C	dC (ppm)	dH (ppm)
1	106,36	-
2	158,56	-
3	130,51	-
4	159,18	-
5	86,53	5,88 (s)
6	158,84	-
7	203,85	-
8	33,23	2,52 (s)
OH	-	13,74 (s)
MeO	60,75	3,85 (s)
MeO	56,03	3,81 (s)
MeO	55,67	3,72 (s)

Legenda: Os deslocamentos químicos em  $\delta\text{C}$  e  $\delta\text{H}$  estão em ppm.

Fonte: Laboratório de Química de Produtos Naturais - UVA.

APÊNDICE B - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) da HTMCX.

Fonte: Laboratório de Química de Produtos Naturais - UVA.

APÊNDICE C - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) da HTMCX.

Fonte: Laboratório de Química de Produtos Naturais - UVA.