



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LUCAS EDUARDO BEZERRA DE LIMA

**“CLICK CHEMISTRY”: SÍNTESE, RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE E
AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE COMPOSTOS HÍBRIDOS INÉDITOS DE DERIVADOS
DE 1,2,3-TRIAZOL CONTRA *Trypanosoma cruzi***

Recife

2020

LUCAS EDUARDO BEZERRA DE LIMA

**“CLICK CHEMISTRY”: SÍNTESE, RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE E
AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE COMPOSTOS HÍBRIDOS INÉDITOS DE DERIVADOS
DE 1,2,3-TRIAZOL CONTRA *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em ciências biológicas.

Área de concentração: Biologia Química para a Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dra. Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo

Coorientadora: Prof^a. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima

Recife

2020

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Lima, Lucas Eduardo Bezerra de

“Click chemistry”: síntese, relação estrutura-atividade e avaliação *in vitro* de compostos híbridos inéditos de derivados de 1,2,3-triazol contra *Trypanosoma cruzi* / Lucas Eduardo Bezerra de Lima - 2020.

106 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo

Coorientadora: Vera Lúcia de Menezes Lima

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas. Recife, 2020.

Inclui referências e anexo.

1. *Trypanosoma cruzi* 2. Quimioterapia 3. Triazóis
I. Figueiredo, Regina Célia Bressan Queiroz de (Orientadora) II.
Lima, Vera Lúcia de Menezes (Coorientadora) III. Título

616.9363 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-025

LUCAS EDUARDO BEZERRA DE LIMA

**“CLICK CHEMISTRY”: SÍNTESE, RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE E
AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE COMPOSTOS HÍBRIDOS INÉDITOS DE DERIVADOS
DE 1,2,3-TRIAZOL CONTRA *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em ciências biológicas.

Aprovada em: 04/03/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo (Orientador)
Instituto Aggeu Magalhães

Prof^o. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Paulo Euzébio Cabral Filho (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado a vida e forças para buscar meus objetivos. Fazer mestrado no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Pernambuco foi um sonho que se materializou.

À professora Dra. Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo, orientadora e amiga, que me acolheu desde o primeiro momento. Sou grato pelos ensinamentos, por sempre estimular meu aperfeiçoamento profissional e sempre estender a mão quando precisei, serei grato eternamente por tudo! Levarei comigo a referência de uma grande pesquisadora e ser humano.

À professora Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima por também ter me acolhido como aluno, pelo apoio técnico e científico, tenho com uma grande referência profissional.

Ao professor Ronaldo Nascimento de Oliveira por gentilmente aceitar colaborar com a nossa pesquisa, dando apoio técnico, científico e participando desse trabalho.

Ao Me. Vanderlan Nogueira Holanda que desde o início dessa caminhada ajudou-me com as experimentações e por ter passado muitos dos seus conhecimentos.

Ao professor Dr. Antonio Pereira Neves que com sua gentileza me ensinou a preparar material para microscopia eletrônica de varredura.

Ao professor Dr. Paulo Euzébio Cabral Filho pela colaboração nas análises citométricas.

A Pedro Henrique do Nascimento pela grande contribuição dada a esse trabalho.

Agradeço a minha família, especialmente a minha mãe Sônia Maria Bezerra de Lima, meu maior bem nessa vida, sem ela nada disso seria possível. Seus ensinamentos contribuíram para minha formação como pesquisador e cidadão.

A David Ferreira e Isaac Silva, que tenho como uma família, pessoas iluminadas que me ajudaram nessa trajetória.

Aos meus amigos do LBCP Tuanne, Tiago, Abigail, Welson, Rômulo, Victor, Deyzi, Ricardo, Elton e aos amigos da UFPE Larissa, Wesley e Marry.

Aos pesquisadores e funcionários do Instituto Aggeu Magalhães e da Universidade Federal de Pernambuco.

Os agradecimentos também para os órgãos financiadores desta pesquisa: FACEPE, CAPES e FIOCRUZ.

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, é uma das doenças endêmicas mais relevantes da América Latina. O tratamento atual da doença de Chagas é baseado no uso do nifurtimox (NFX) e o benznidazol (BNZ), ambos com eficácia limitada no estágio crônico da doença e severos efeitos colaterais. Essas desvantagens nos levaram a investigar novos compostos líderes mais seletivos e de baixo custo. Desta forma, os derivados de 1,2,3-triazóis demonstraram ser promissores. Neste trabalho, objetivamos investigar o potencial de quatro derivados híbridos de 1,2,3-triazol, obtidos por *click chemistry* contra *T. cruzi*. O derivado de ftalimida-1,2,3-triazol, **FT1** demonstrou significativa atividade tripanocida e baixa citotoxicidade para células do exsudato peritoneal (CEP) e células Vero, com um índice de seletividade (Ise) > 5 para as formas tripomastigota e amastigota. No entanto, os derivados **NT1**, **FT2** e **FT3** apresentam ISe ≤ 4. Para investigar os efeitos do **FT1** sobre a fisiologia mitocondrial do parasita, foi utilizada a Rhodamina 123. Nossa análise por citometria de fluxo mostrou que o tratamento das formas tripomastigotas com **FT1** induziu uma hiperpolarização da mitocôndria em concentrações mais baixas, enquanto uma diminuição dose-dependente no potencial da membrana mitocondrial foi observada em concentrações mais altas dessa molécula. A diminuição do potencial da membrana mitocondrial foi seguida por um aumento na produção de EROs nessa organela, conforme observado pela marcação com MitoSox. O tratamento do **FT1** também induziu alterações ultraestruturais, compatíveis com a perda da viabilidade do parasita e morte celular. Nossas análises de docking molecular indicaram o **FT1** como um provável inibidor da tripanotona redutase e da proteína CYP51, as quais são essenciais para a viabilidade do *T. cruzi*. Em conjunto, nossos resultados mostraram que o **FT1** foi eficaz contra as formas tripomastigota e amastigota de *T. cruzi*, com alta seletividade contra esse parasita. Nossos resultados sugerem o uso do (**FT1**), como possível agente quimioterápico contra a doença de Chagas.

Palavras chaves: *Trypanosoma cruzi*. Quimioterapia. *Click chemistry*. Molecular docking. Triazóis.

ABSTRACT

Chagas disease, caused by flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*, is one of the most relevant endemic diseases in Latin America. The current treatment of Chagas disease is based on the use of two drugs nifurtimox (NFX) and benznidazole (BNZ), both of which present limited efficacy in the chronic stage of the disease and severe side effects. These drawbacks prompted us to investigate new lead compounds more selective and with low cost. In this regard 1,2,3-triazoles derivatives has been showed to be promising. In this work we aimed to investigate the potential five hybrid 1,2,3-triazole derivatives, obtained by *click chemistry* against *T. cruzi*. The derivative of ftalimide-1,2,3 triazole **FT1** demonstrated a significant trypanocidal activity and low cytotoxicity to peritoneal exudate cells (PEC) and Vero cells, with a selectivity index (Ise) > 5, for both trypomastigote and amastigote forms. However, derivatives **NT1**, **FT2** and **FT3** show ISe ≤ 4. To investigate the effects of **FT1** on the mitochondrial physiology of the parasite, we used Rhodamine 123. Our flow cytometric analysis showed that the treatment of trypomastigote forms with **FT1** induced a hyperpolarization of mitochondrion at lower concentration, whereas a dose-dependent decrease on the mitochondrial membrane potential was observed at higher concentrations of this drug. The decrease of mitochondrial membrane potential was followed by an increase in ROS production in this organelle, as observed by MitoSox labelling. The treatment of **FT1** also induced ultrastructural changes, compatible with loss of parasite viability and cell death. Our molecular docking analyses showed **FT1** as a putative inhibitor of trypanothione reductase and CYP51, which are essential for the viability of *T. cruzi*. Taken together our results showed that **FT1** was effective against trypomastigote and amastigote forms of *T. cruzi*, with high selectivity against this parasite. Our results suggest the use of **FT1**, as a putative chemotherapeutic agent against Chagas disease.

Palavras chaves: *Trypanosoma cruzi*. Chemotherapy. *Click chemistry*. Molecular docking. Triazole.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Referencial teórico

Esquema 1 – Mecanismos de ação do benznidazol e nifurtimox	26
Esquema 2 – Síntese do ácido acetil salicílico a partir da salicilina	37

LISTA DE FIGURAS

Referencial teórico

Figura 1 – Distribuição da doença de Chagas no mundo	19
Figura 2 – Insetos da subfamília <i>Triatominae</i>	20
Figura 3 – A) Chagoma de inoculação; B) Sinal de Romaña	21
Figura 4 – Estrutura química do benznidazol e nifurtimox	25
Figura 5 – Representação das formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i> ..	28
Figura 6 – Visão esquemática das estruturas e organelas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
Figura 7 – Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> no hospedeiro vertebrado e invertebrado	32

Artigo

Figura 1 – Estrutura química dos compostos sintetizados	76
Figura 2 – Efeito dos compostos NT1 (A) e FT3 (B) sobre a inibição das formas tripomastigotas (%) em relação ao controle não tratado (0% de inibição)	79
Figura 3 – Efeito dos compostos FT1 (A) e NT1 (B) sobre a sobrevivência dos amastigotas intracelulares em macrófagos	80
Figura 4 – Gráficos representativos do efeito do composto FT1 sobre o potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) mitocondrial das formas tripomastigotas ...	83
Figura 5 – Histograma representativo da análise por citometria de fluxo para a determinação da produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio em tripomastigotas tratados com FT1	85
Figura 6 – Análise ultraestrutural das formas tripomastigotas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	87
Figura 7 – Interação detalhada entre FT1 e o sítio catalítico da tripanotiona redutase e CYP51	91

LISTA DE TABELAS

Referencial teórico

Tabela 1 – Desempenho dos métodos diagnósticos aplicados para doença de Chagas	24
--	----

Artigo

Tabela 1 – Efeito biológico dos derivados de triazol sobre células de mamífero e <i>Trypanosoma cruzi</i>	77
Tabela 2 – Molecular docking de FT1 em alvos proteicos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido acetil salicílico
BNZ	Benznidazol
CC ₅₀	Concentração citotóxica para 50% das células
CEP	Células do exsudato peritoneal
CuAAC	Cicloadição 1,3-dipolar entre um alcino terminal e uma azida orgânica catalisada por cobre
CYP51	Sterol 14 α -Demethylase Cytochrome P450 (CYP51)
CZ	Cruzipaína
DC	Doença de Chagas
DHFR-TS	Dihidrofolato timidilato redutase sintase
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNDi	Drugs for Neglected Diseases initiative
DTUs	Unidades discretas de tipagem
ed.	Edição
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EROs	Espécies reativas de oxigênio
et al.	E outros
FT1	Ftalimida-triazol 1
FT2	Ftalimida-triazol 2
FT3	Ftalimida-triazol 3
HAI	Hemaglutinação indireta
IC ₅₀	Metade da concentração inibitória máxima
IFI	Imunofluorescência indireta
ISe	Índice de seletividade
LC ₅₀	Dose necessária para reduzir em 50% a viabilidade das células
n.	Número
N. A	Não aplicáveis
NFX	Nifurtimox
NF- κ B	Fator nuclear kappa β

NT1	Naftoquinona-triazol
p.	Página
PBS	Tampão fosfato salino
PEC	Peritoneal exudate cells
ROS	Reactive oxygen species
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TR	Tripanotiona redutase
v.	Volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS	17
1.1.1 Objetivo geral	17
1.1.2 Objetivos específicos	17
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1 ASPECTOS GERAIS DA DOENÇA DE CHAGAS	18
2.1.1 Transmissão da doença de chagas	20
2.1.2 Patogênese e diagnóstico da doença de chagas	21
2.1.3 Tratamento da doença de chagas	24
2.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
2.2.1 Principais aspectos celulares do <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
2.2.2 Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
2.3 “DOCKING” MOLECULAR APLICADO A PROSPECÇÃO DE NOVOS FÁRMACOS	33
2.3.1 Alvos moleculares no <i>Trypanosoma cruzi</i>	33
2.4 A EVOLUÇÃO DA SÍNTESE ORGÂNICA ATRAVÉS DA <i>CLICK CHEMISTRY</i> PARA DESCOBERTA DE NOVOS AGENTES TERAPÊUTICOS CONTRA DOENÇAS NEGLIGENCIADAS	35
2.4.1 1,2,3-triazol	38
2.4.2 Ftalimidas	39
2.4.3 Naftoquinonas	41
REFERÊNCIAS	43
3 RESULTADOS	67
3.1 <i>CLICK CHEMISTRY</i> : SÍNTESE, RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE E AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE COMPOSTOS HÍBRIDOS INÉDITOS DE DERIVADOS DE 1,2,3-TRIAZOL CONTRA <i>Trypanosoma cruzi</i>	67
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
REFERÊNCIAS	94
ANEXO – Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	106

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma antropozoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, transmitida primariamente por insetos hematófagos da subfamília *Triatominae* (LEITE et al., 2018). Esta parasitose está presente em 21 países da América Latina, e um número crescente de pessoas infectadas tem sido observado em regiões não endêmicas em consequência dos processos de globalização (MONGE-MAILLO e LOPEZ-VELEZ, 2017; PEREZ-MOLINA e MOLINA, 2018). Esta patologia afeta principalmente regiões mais pobres das Américas. Estima-se que 6-7 milhões de pessoas estejam infectadas, com outras 70 milhões vivendo em área de risco (DNDI, 2019). Sua alta morbidade e os graves problemas a saúde, desencadeados por um quadro degenerativo crônico, com desordens cardíacas e/ou digestivas, fazem da tripanossomíase um importante problema de saúde pública (SBARAGLINI et al., 2016; MONGE-MAILLO e LOPEZ-VELEZ, 2017; LEITE et al., 2018). Apesar do grande impacto social e financeiro causado, o financiamento de pesquisas voltadas para farmacoterapia, produção de vacinas, diagnóstico e tratamento para a doença de Chagas ainda são baixos frente aos prejuízos acarretados por esta doença (CORASSA et al., 2017).

O fármaco utilizado para o tratamento da doença de Chagas no Brasil (benznidazol, LAFEPE) é um nitroheterocíclico introduzido na década de 70, que possui alta toxicidade e baixa eficácia quando a doença atinge a fase crônica (FRANCO et al., 2019). A prevalência de efeitos adversos em usuários do benznidazol é evidente e contribui fortemente para a não-adesão ou abandono dos pacientes ao tratamento, tornando imprescindível a busca por novos compostos que combinem baixa toxicidade e eficácia, tanto na fase aguda como na crônica da enfermidade (KRATZ et al., 2018; CALDAS et al., 2019).

Os recentes avanços tecnológicos têm contribuído para o desenvolvimento da Química Medicinal. O planejamento e aprimoramento de moléculas específicas de baixo custo e com menos efeitos colaterais, através da bioinformática e de novas metodologias de síntese, tornou-se uma realidade (DHEER et al., 2017; SAIKIA e BORDOLOI, 2019). Dentre as várias ferramentas utilizadas na busca por moléculas biologicamente ativas, o “*docking*” molecular tem se destacado como importante instrumento no desenvolvimento de fármacos. Essa técnica é capaz de prever possíveis alvos moleculares e os tipos de interações químicas predominantes entre

um ligante e uma proteína de estrutura tridimensional conhecida. Este método tem sido amplamente utilizado na seleção virtual de candidatos a fármacos, otimizando e barateando a busca por novos compostos (KONTOYIANNI, 2017; ESWARI. et al, 2018).

Além disso, a síntese de compostos bioativos por métodos do tipo *click chemistry*, em especial, a cicloadição 1-3-dipolar catalisada por cobre, vem ganhando protagonismo nos últimos anos. Esse método pode levar a síntese moléculas híbridas unindo grupos farmacofóricos de forma simples, com alto rendimento, baixo custo e possibilidade de produção em larga escala. Estas características são preponderantes para a produção de um fármaco voltado para o tratamento de uma doença tropical negligenciada (LAMIE et al., 2015; TABACARU et al., 2017).

Na busca por novas moléculas com propriedades antiparasitárias, o 1,2,3-triazol tem ganhado protagonismo devido seu grande potencial farmacológico. Conhecidamente utilizado como isómero de amida, éster, ácido carboxílico e outros heterocíclicos, os derivados triazólicos apresentam ação antitumoral (HUANG et al., 2019), anti-micobactéria (JIANG et al., 2019) e tripanocida (CAMPO et al., 2012; LEITE et al., 2018).

Assim como os derivados triazólicos, os compostos ftalimídicos têm chamado a atenção da comunidade científica por suas propriedades terapêuticas tais como ação anticancerígena, antibacteriana (BERK e AKGÜN, 2012), leishmanicida (SHARMA *et al.*, 2010; SI et al., 2016; ALIANÇA et al., 2017) e anti-inflamatória *in vivo* e *in vitro* (ALANAZI, et al., 2015; CASAL, et al.,2016). Tendo em vista o caráter inflamatório crônico da doença de Chagas, compostos como as ftalimidias que aliem atividade anti-inflamatória/imunomodulatória e tripanocida, apresentam-se como potenciais candidatos a fármacos contra essa doença que acomete milhões de pessoas.

Os derivados de naftoquinonas em particular os análogos do 1,4 naftoquinonas também tem recebido atenção especial devido as suas aplicações farmacêuticas promissoras. As atividades biológicas relacionadas aos derivados de naftoquinonas são diversas incluindo ação antiproliferativa (ZHANG et al, 2018), antiviral (TANDON et al., 2002; DA SILVA et al., 2002), antifúngica (TANDON et al, 2006; TANDON et al., 2009) e antitripanocida (GARAVAGLIA et al. 2018; LARA et al., 2018).

Portanto, a síntese de novas moléculas híbridas de ftalimida e 1,2,3 triazol, com o intuito de unir mais de uma atividade biológica e/ou potencializar propriedades já existentes, se mostra uma abordagem promissora. Nesta perspectiva, o presente estudo teve como objetivo investigar o potencial tripanocida e os mecanismos de ação de novos derivados híbridos de triazóis sintetizados através de *click chemistry*, visando contribuir para o desenvolvimento de fármacos de baixo custo e mais eficazes contra a doença de Chagas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial farmacológico de novos híbridos derivados de 1,2,3-triazol sintetizados por *click chemistry* como agente quimioterápico para o tratamento da doença de Chagas.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial citotóxico dos derivados ftalimida-triazol e naftoquinona-triazol em células de mamífero;
- Avaliar a atividade de derivados ftalimida-triazol e naftoquinona-triazol sobre a viabilidade de formas tripomastigotas de *T. cruzi*;
- Investigar o efeito dos derivados ftalimida-triazol e naftoquinona-triazol sobre células de mamífero infectadas por *T. cruzi*;
- Identificar possíveis alvos e mecanismos de ação dos derivados ftalimida-triazol e naftoquinona-triazol.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ASPECTOS GERAIS DA DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas (DC) é uma infecção degenerativa crônica, endêmica da América Latina, que acomete principalmente órgãos como o coração e o sistema digestivo. Seu agente etiológico, o protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, é transmitido principalmente por meio das fezes contaminadas de insetos triatomíneos infectados com o parasito (FLORES-FERRER et al., 2019; LONDERO et al, 2019).

Descrita em 1909 por Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, a doença que leva o seu nome foi observada pela primeira vez em uma criança de nome Berenice que apresentava febre, edemas e ingurgitação linfática generalizada (GARCIA, 2009). Na ocasião, Carlos Chagas identificou em amostras de sangue da menina, a presença de um protozoário flagelado, que mais tarde viria a chamar de *Trypanosoma cruzi* (MALAFAIA e RODRIGUES, 2010).

Passados mais de cem anos desde sua descoberta, a DC ainda hoje é um grande problema de saúde pública mundial, com milhões de pessoas infectadas, causando grande impacto econômico e social. Calcula-se que as perdas relacionadas à morbimortalidade pela tripanossomíase americana sejam de 7,2 bilhões de dólares, com aproximadamente 12 mil mortes anuais (CONNERS, et al, 2016; BALOUZ et al., 2017). Apesar da grande relevância, a infecção pelo *T. cruzi* ainda recebe pouco investimento, principalmente pelo fato de atingir populações pobres (LONDERO et al, 2019).

Vários fatores contribuem para a disseminação do *T. cruzi*, dentre eles, a devastação de áreas de mata, o desequilíbrio ambiental por causas externas, a iniquidade social e a falta de acesso a informação e aos serviços de saúde (DIAS, 2007). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o maior número de pessoas infectadas se concentra em quatro países, são eles: Argentina (1.505.235), Brasil (1.156.821), México (876.458) e Bolívia (607.186), enquanto as maiores prevalências estão na Bolívia (6,1%), Argentina (3,6%) e Paraguai (2,1%). Apesar do Brasil aparecer na segunda posição em números absolutos, a quantidade de casos em relação a sua grande população, deixa o país atrás dos seus vizinhos em relação à

prevalência (WHO, 2015; ANTINORI, 2017). Nas últimas décadas o perfil epidemiológico da doença de Chagas sofreu alterações devido ao processo de urbanização causado pelas mudanças nos meios de produção e a intensa migração do campo para cidade, (DIAS, 2007). Em acréscimo, devido ao grande fluxo de pessoas dos países endêmicos para outras partes do mundo, a DC tem se tornado um problema de saúde para alguns países como Estados Unidos, Canadá, Espanha, França, Suíça, Japão e Austrália (COURA e DIAS, 2009; BALOUZ et al., 2017) (Figura 1).

Figura 1 – Distribuição da doença de Chagas no mundo.

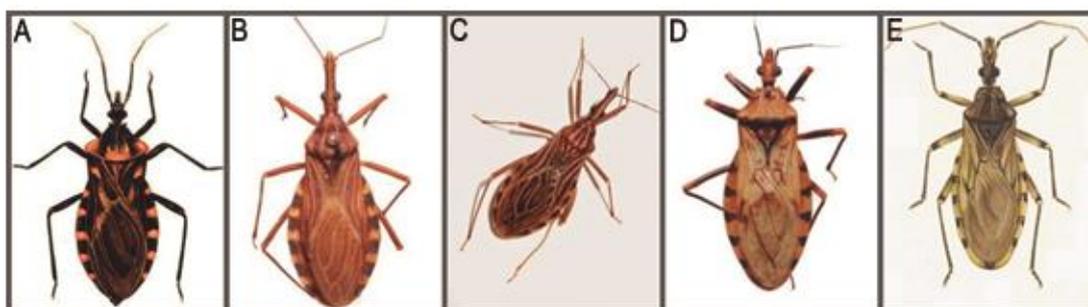


Fonte: DNDi, 2019 – Adaptado.

2.1.1 Transmissão da doença de chagas

A DC pode ser transmitida de várias maneiras, sendo a mais comum a transmissão vetorial (GUARNER, 2019). Os potenciais vetores do *T. cruzi*, insetos hematófagos pertencentes à subfamília *Triatominae* (**Figura 2**), são amplamente distribuídos nas regiões endêmicas. Até o momento, já foram catalogadas mais de 140 espécies de triatomíneos, com destaque para as espécies *Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, *T. brasiliensis*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus*, devido a sua capacidade de adaptação ao ambiente domiciliar, transmitindo o parasito para humanos e animais domésticos, no ciclo peridoméstico (STANAWAY e ROTH, 2015; ANTINORI et al., 2017; BALOUZ et al., 2017). Durante o repasto sanguíneo destes insetos, eles geralmente defecam e urinam próximo à região da picada. O *T. cruzi* presente nas fezes contaminadas, pode penetrar na pele lesionada e mucosas do hospedeiro vertebrado por meio de solução de continuidade, alcançando a corrente sanguínea e subsequentemente infectando diferentes tipos celulares (CAMARA et al., 2019). Outras formas de transmissão da doença são: ingestão de alimentos contaminados como sucos de frutas e legumes (contaminação por via oral), transfusão sanguínea, transplante de órgãos, transmissão congênita, acidentes de laboratório, manuseio de animais infectados, ingestão de carne mal cozida de animais infectados e transmissão sexual (CEVALLOS e HERNANDEZ, 2014; ALVAREZ et al., 2017).

Figura 2 – Insetos da subfamília *Triatominae*. (A) *Panstrongylus megistus*, (B) *Panstrongylus geniculatus*, (C) *Rhodnius neglectus*, (D) *Triatoma sordida* e (E) *Rhodnius prolixus*.



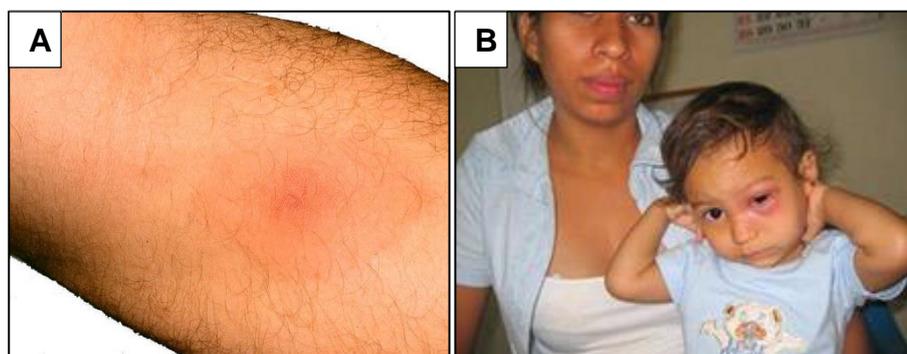
Fonte: PUPIM, 2018 – Adaptado.

2.1.2 Patogênese e diagnóstico da doença de chagas

As manifestações clínicas relacionadas à infecção pelo *T. cruzi* em humanos frequentemente iniciam-se pouco depois da invasão do parasito, na região que serve como porta de entrada, seja ela, pele ou mucosa ocular. Estas regiões podem apresentar edema e inflamação local (**Figura 3**), denominadas de Chagoma de inoculação e sinal de Romaña respectivamente (TEXEIRA, et al., 2006; ORTIZ et al., 2019). A DC apresenta duas fases clínicas distintas, a fase aguda e crônica. A primeira, ocorre alguns dias após a infecção pelo *T. cruzi*, enquanto a fase crônica se desenvolve em períodos mais tardios, levando até mesmo décadas para o surgimento dos primeiros sinais. Estudos demonstram que a resposta imune do hospedeiro e a cepa do parasito são decisivos para desenvolvimento da doença (MACEDO e PENA, 1998; ANDRADE et al., 1999).

A fase aguda da DC quase sempre é assintomática, durando de 4-8 semanas (ORTIZ et al., 2019). Caracterizada por alta parasitemia, essa fase geralmente apresenta sintomas inespecíficos, tais como: febre, cefaleia, mal-estar, hepatoesplenomegalia e linfadenopatia. Nesta fase, a destruição tecidual está associada à ação direta do parasito e uma resposta inflamatória aguda, com intensa participação de células do sistema imune inato como macrófagos, células dendríticas e natural killer, as quais atuam inicialmente no controle da parasitemia (ESPER et al., 2015).

Figura 3 – A) Chagoma de inoculação; B) Sinal de Romaña



Fonte: ROSSI, RAMOS e BESTETTI, 2003; WHO, 2019.

Quando não tratado adequadamente na fase aguda, o indivíduo chagásico pode evoluir para a fase indeterminada, a qual é caracterizada pela ausência de sintomas e sorologia positiva, podendo permanecer assim por décadas (CAMINHA et al., 2019).

A fase crônica da doença de Chagas atinge 30-40% dos indivíduos infectados e tem como principais características alterações cardíacas e digestivas ou mesmo uma associação destas formas clínicas. Apesar de ser menos comum, alterações neurológicas também podem ser observadas (CÓRDOVA et al., 2010; CAMINHA et al., 2019). As disfunções cardíacas são as mais graves e prevalentes na fase crônica da DC, afetando 20-30% dos pacientes. O dano causado pelo *T. cruzi*, inclui a dilatação do coração com eventual hipertrofia (cardiomegalia) e alterações anatomopatológicas (ESPER et al., 2015). Esta fase geralmente é caracterizada pela presença de grandes quantidades de formas amastigotas no interior dos miócitos, com infiltrado mononuclear crônico, ruptura das fibras cardíacas, aumento da fibrose, afinamento da parede ventricular, danos microvasculares e perda da homeostase do sistema condutor do coração. Como consequência, o coração lesionado perde parte da função contrátil, desenvolvendo cardiomiopatias, arritmias e insuficiência cardíaca que podem levar ao óbito (MACHADO et al., 2012; BOCCHI et al., 2017).

O acometimento dos órgãos do sistema digestivo atinge 10-20% dos pacientes. As principais características da forma digestiva são as disfunções gastrointestinais, causadas pela lesão das fibras musculares intestinais e do sistema nervoso entérico, resultando na dilatação anormal do esôfago e do cólon e ao desenvolvimento das síndromes do megaesôfago e megacólon (PINTO et al., 2019). O megaesôfago é acompanhado comumente por disfagia, seguida de odinofagia, dor epigástrica, regurgitação e ptialismo. O quadro de megacólon apresenta dilatação no segmento sigmoide, reto e, menos frequentemente, da região colônica proximal, causando uma lenta e progressiva constipação, distensão abdominal e em casos mais graves, a obstrução total do intestino devido a formação de vôlvulos e fecalomas (DE OLIVEIRA et al., 1998; DE LIMA et al., 2008; MATSUDA et al., 2009).

A DC é uma das mais importantes parasitoses da América Latina, contudo boa parte dos pacientes chagásicos possuem acesso limitado ao diagnóstico,

permanecendo por vários anos sem o conhecimento de sua condição clínica, com menos de 10% dos casos diagnosticados. Alguns fatores contribuem fortemente para falhas no diagnóstico da doença, incluindo a ampla distribuição geográfica do vetor, o lapso de tempo entre a infecção e o aparecimento dos sintomas, as limitações dos atuais métodos diagnóstico, dados de prevalência incompletos e a dificuldade no reconhecimento dos sintomas (BALOUZ et al., 2017; DNDi, 2019).

As ferramentas disponíveis para o diagnóstico da DC variam de acordo com o estágio da parasitose (**Tabela 1**). A fase aguda e a infecção vertical de recém-nascidos, tem como padrão ouro para fins diagnósticos a microscopia óptica convencional. A presença do parasito circulante possibilita, através das técnicas parasitológicas diretas como a da gota espessa, análise do sangue a fresco e estirado sanguíneo corado, identificar o *T. cruzi*. No entanto, em alguns casos a baixa parasitemia pode ocasionar a negatização do teste direto. Neste caso, permanecendo a suspeita da DC aguda, recomenda-se a realização do teste de micro-hematócrito ou teste de Strout (FREILIJ e ALTCHER, 1995; GOMES et al., 2009; BALOUZ et al., 2017). Por outro lado, o diagnóstico direto na fase crônica requer métodos de amplificação biológica como xenodiagnóstico e hemocultura, que apesar de serem específicos apresentam baixa sensibilidade de 50-74% (CASTRO et al., 2002).

Na rotina laboratorial também são utilizadas técnicas imunológicas e moleculares para detecção da tripanossomíase aguda e crônica (**Tabela 1**), com destaque para os testes sorológicos baseados na ligação antígeno-anticorpo que frequentemente são empregados na detecção da infecção chagásica crônica. No geral, estes métodos possuem uma boa acurácia, sendo os mais tradicionalmente utilizados: imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação indireta (HAI) e ensaio imunoenzimático (ELISA) (NOYA, et al., 2015; SANTOS et al., 2018).

Apesar da alta sensibilidade e especificidade as metodologias moleculares são mais complexas, necessitam de maior infraestrutura e apenas alguns centros de pesquisa/referência realizam esses tipos de testes. Desta forma, o diagnóstico preciso por estas técnicas ainda é pouco acessível para populações que moram distantes dos grandes centros urbanos (DIAS, et al., 2015).

Tabela 1 – Desempenho dos métodos diagnósticos aplicados para doença de Chagas.

	Metodologia	Casos agudo	Casos crônicos	Casos congênitos	Observações
Métodos Parasitológicos	Exame direto do sangue				Métodos baseados em microscopia óptica. Padrão Ouro no diagnóstico da doença de Chagas aguda.
	Hemocultura				Amplifica os parasitos, aumentando a sensibilidade, no entanto, requer tempo e possui o custo elevado.
	Xenodiagnóstico			N.A	Amplifica os parasitos, requer tempo, possui alto custo e produz efeitos colaterais.
Métodos sorológicos	HAI				Especificidade moderada, é necessário pessoal treinado para a execução.
	IFI				Especificidade moderada, necessita de pessoal treinado e infraestrutura laboratorial.
	ELISA				Boa especificidade e de fácil execução, comumente usado no diagnóstico da doença de Chagas crônica.
Métodos moleculares	PCR, qPCR				Alta especificidade, requer pessoal treinado e infraestrutura.
	Marcadores genotipificados	N.A	N.A	N.A	Técnica manual, específica e de alto custo, necessário pessoal treinado.
	Marcadores bioquímicos	N.A	?	?	Baixa especificidade e sensibilidade, geralmente indicativo/preditivo de cardiomiopatia.

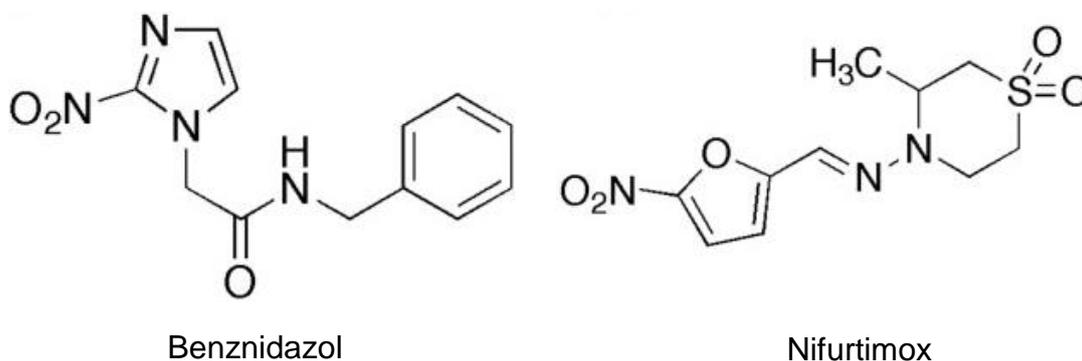
(Verde) método diagnóstico apropriado para fase doença; (amarelo) parcialmente apropriado; (vermelho) inapropriado. (N.A) Dados experimentais não aplicáveis; (?) dados insuficientes para avaliar o desempenho.

Fonte: BALOUZ, et al., 2017. – Adaptado.

2.1.3 Tratamento da doença de chagas

Classificada como doença tropical negligenciada pela Organização Mundial da Saúde, a doença de Chagas é a parasitose mais letal da América Latina, superando até mesmo a malária. Apesar do grande impacto para saúde pública, pouco tem sido feito em relação a busca por tratamentos eficazes (LIMA et al., 2010). Atualmente o tratamento da doença de Chagas é pautado em dois compostos nitroheterocíclicos (Benznidazol e Nifurtimox) (**Figura 4**). Estas drogas foram introduzidas entre as décadas de 60-70 e apresentam baixa eficácia quando a doença atinge a fase crônica (LIMA et al., 2010; LEITE et al., 2018).

Figura 4 – Estrutura química do benznidazol e nifurtimox.

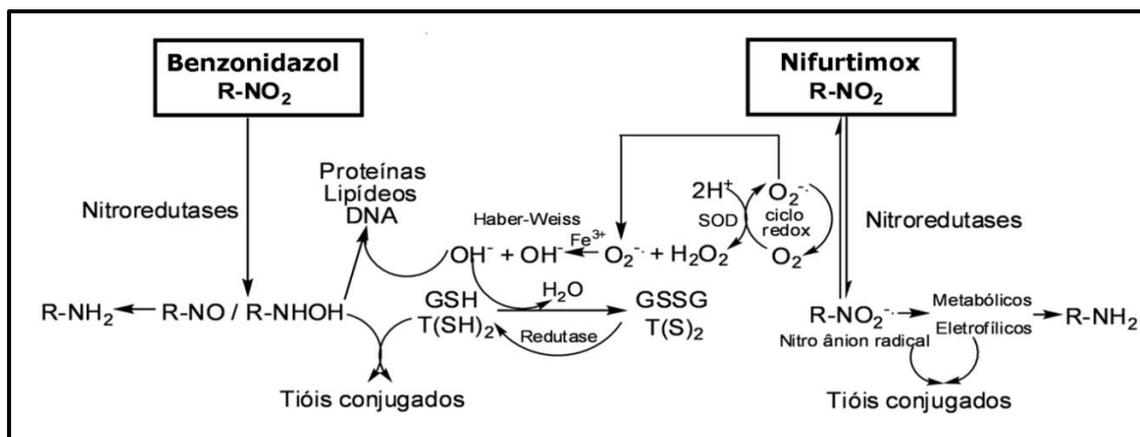


Estudos demonstram que maior parte do efeito tripanocida do Nifurtimox (NFX) e Benznidazol (BNZ) se deve à formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos. O processo de formação desses produtos é dependente da ativação de nitrorredutases do *T. cruzi* (**Esquema 1**), que atuam no grupo nitro do NFX e BNZ convertendo-o em grupo amino e gerando subprodutos, como radicais livres e metabólitos eletrofílicos (MAYA et al., 2007; DIAS e DESSOY, 2009). Tem sido proposto que a atividade do NFX é mediada principalmente por estresse oxidativo causado pelos produtos da catálise das nitrorredutases do tipo II (WILKINSON et al., 2008). O radical nitro formado a partir da catálise da nitrorredutase do tipo II no NFX sofre ciclagem na presença do oxigênio molecular (O_2), resultando na produção de ânion superóxido (O_2^-) e restituição do nitrocomposto (RNO_2) pelo processo ciclo redox (HALL et al., 2011; BRUHN et al., 2016; SALES JUNIOR et al., 2017). No entanto, outras possibilidades não podem ser excluídas. A nitrorredução em um processo com múltiplos elétrons pode levar a formação intermediária de derivados nitrosos e hidroxilamina deletérios (BOIANI et al., 2010).

Diferente do NFX, o metabolismo do BNZ pelo *T. cruzi* resulta em um radical nitro ânion altamente reativo o qual é responsável pelo efeito tripanocida. Este radical pode se ligar a macromoléculas, principalmente o DNA, causando um efeito deletério na sua estrutura (RAJÃO et al., 2014). Existem evidências que outra forma de ação do BNZ é através da ativação das nitrorredutases do tipo I em *T. cruzi*. O 2-nitroimidazol então é transformado em hidroxilamina pela nitrorredutase dependente de NADH, que por sua vez é novamente convertida, dessa vez, para dialdeído glioxial, uma molécula altamente reativa que forma ligações covalentes com DNA, RNA,

proteínas e tióis de baixo peso molecular (CALDAS et al., 2019). As ligações formadas pelo dialdeído glicol podem danificar o material genético do parasito, impedir a síntese de novas macromoléculas e inibir o sistema antioxidante do *T. cruzi* (CALDAS et al., 2019).

Esquema 1 – Mecanismos de ação do benznidazol e nifurtimox.



Fonte: Dias e Dessoy, 2009.

Os produtos do metabolismo do NFX e BNZ são reconhecidamente inespecíficos, podendo atuar tanto no *T. cruzi* quanto nos sistemas do hospedeiro. Essa baixa especificidade contribui para os efeitos tóxicos observados durante a terapia com estes dois quimioterápicos (DIAS e DESSOY, 2009).

Por apresentar um melhor perfil de segurança e maior eficácia em relação ao NFX o BNZ é o fármaco mais utilizado no tratamento da DC, sendo o único medicamento a ser empregado no Brasil. Recentemente seu uso em crianças de 2-12 anos de idade também foi aprovado pela U.S. Food and Drugs Administration (FIOCRUZ, 2013; FDA, 2017; DNDi, 2019; Paucar et al., 2019). No início da infecção chagásica, a administração do BNZ resulta na cura parasitológica de 60% dos casos (COURA e CASTRO, 2002; CANUTO et al., 2019). Entretanto, na fase crônica os resultados da terapia variam, a depender da resposta imune do hospedeiro e o tipo da cepa de *T. cruzi*. Desta forma, de maneira geral o BNZ possui baixa eficácia nesse estágio, com uma taxa de cura por volta dos 20% (COURA e CASTRO, 2002; CANUTO et al., 2019).

A intolerância ao tratamento com o BNZ, principalmente em adultos, é outro obstáculo. Frequentemente estas drogas apresentam graves efeitos colaterais, tais como: anorexia, vômito, náuseas, erupções cutâneas, febre, linfadenopatia, dores musculares e articulares, efeitos neurológicos e depressão da medula óssea. Esta última resulta em neutropenia, agranulocitose, púrpura trombocitopênica, parestesias e polineurite (CASTRO et al., 2006; VINUESA et al., 2017; CANUTO et al., 2019). Os efeitos resultantes da toxicidade sistêmica da droga, colaboram para interrupção do tratamento, reduzindo ainda mais a sua eficácia (VINUESA et al., 2017).

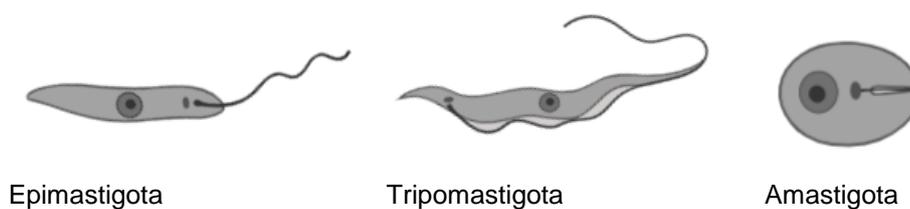
É evidente a necessidade de novos agentes com potencial terapêutico no combate a tripanossomíase. A ineficiência e as várias contraindicações dos fármacos utilizados atualmente, junto com os relatos do aparecimento de cepas resistentes, motivam a busca por compostos que possam fazer frente a DC, com baixa ou nenhuma toxicidade ao organismo humano (FILARDI e BRENER, 1987; SALES JUNIOR et al., 2017).

2.2 *Trypanossoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado heteroxênico, ou seja, possui um ciclo de vida em mais de um hospedeiro diferente: insetos triatomíneos e mamíferos (KAUFER et al., 2019). Classificado como pertencente à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae, este parasito se destaca pela sua capacidade de infectar praticamente todos os tipos celulares, fazendo dele, um dos mais versáteis tripanosomatídeos existentes (DE SOUZA e VIDAL, 2017; TOMASINI, 2018).

O protozoário apresenta três formas evolutivas diferentes (**Figura 5**), são elas: a forma multiplicativa epimastigotas encontradas no início do tubo digestivo dos insetos vetores; as formas tripomastigotas, presentes na porção final do intestino do inseto vetor (tripomastigota metacíclico) ou na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado (tripomastigota sanguíneo); e a forma amastigota, a qual prolifera ativamente no interior das células do hospedeiros (TYLER e ENGMAN, 2001; GONÇALVES et al., 2018).

Figura 5 –Representação das formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*.



Devido às características genóticas heterogêneas do *T. cruzi*, este protozoário pode ser enquadrado em sete unidades discretas de tipagem (DTUs), que vai do TcI (*T. cruzi* I) ao TcVI e mais recentemente o genótipo Tc morcego (RAMÍREZ e HERNÁNDEZ, 2018; REVOLLO et al, 2019). Os DTUs estão fortemente associados à ecologia, ao ciclo de transmissão e à gravidade das manifestações clínicas da DC (RAMÍREZ e HERNÁNDEZ, 2018).

2.2.1 Principais aspectos celulares do *Trypanosoma cruzi*

Em relação ao aspecto celular, o *T. cruzi* possui algumas peculiaridades, como a presença de microtúbulos subpeliculares, estruturas compostas por protofilamentos, que dão rigidez à célula e resistência à ruptura por meios mecânicos (SINCLAIR e ENGMAN, 2019).

Estes protozoários apresentam um único flagelo, que se insere em uma região especializada, chamada de bolsa flagelar. Essa ligação entre o flagelo e o corpo celular se dá por junções do tipo demossomos. O flagelo do *T. cruzi* como dos demais tripanosomatídeos é constituído por 9 pares de microtúbulos periféricos e um par de microtúbulo central. Seu movimento intenso confere grande motilidade as formas epimastigota e tripomastigota do *T. cruzi*. Nas formas amastigotas, o flagelo é pequeno e retido na bolsa flagelar (DE SOUZA, 2002).

Assim como na maioria dos eucariotos, a mitocôndria do *T. cruzi* é responsável pela produção energética e regula uma série de funções essenciais deste parasito. No entanto, nos tripanosomatídeos a mitocôndria é única se estendendo por todo corpo deste protozoário (**Figura 6**). Um dos aspectos que diferenciam a mitocôndria dos tripanosomatídeos dos demais eucariotos é a presença de uma rede complexa de DNA chamada de cinetoplasto, próxima ao corpo basal (Cavalcante e De Souza, 2018). O DNA do cinetoplasto é organizado em dois tipos de estruturas circulares: minicírculos com 0,5-10 kb e maxicírculos 20-40 kb. Sabe-se que os minicírculos

codificam RNAs guias que participam do processo de edição do RNA recém-formado, enquanto os maxicírculos codificam rRNAs e proteínas da cadeia respiratória (CAVALCANTE e De SOUZA, 2018; KAUFER et al., 2019).

O glicosomo é um compartimento celular exclusivo dos tripanosomatídeos como *Leishmania*, *T. brucei* e *T. cruzi*. Esta organela é semelhante aos peroxissomos, mas possui algumas diferenças marcantes como a presença de hexoquinases e fosfofrutoquinases, evidenciando a compartimentalização da via glicolítica nos tripanosomatídeos (BAUER e MORRIS, 2017; KALEL, et al., 2018; BANERJEE et al., 2019). Além disso, existem indícios que algumas vias metabólicas como fixação de dióxido de carbono, recuperação de purinas e a biossíntese *de novo* das pirimidinas também ocorrem nos glicosomos (DE SOUZA, 2002).

Os acidocalcissomos são estruturas presentes em alguns eucariotos e procariotos como tripanosomatídeos, fungos e bactérias. Estas organelas, apresentam altas concentrações de cálcio, fósforo na forma de pirofosfato (PP_i) e polifosfato (poli P) e outros cátions (DOCAMPO et al., 2010; RAMAKRISHNAN, et al., 2018). Os acidocalcissomos atuam como importante reserva energética, na osmoregulação e no equilíbrio do pH. Além disso, há evidências que a depleção de cálcio dos acidocalcissomos pode inibir a invasão do *T. cruzi* nas células hospedeiras (MORENO e DOCAMPO et al., 2009).

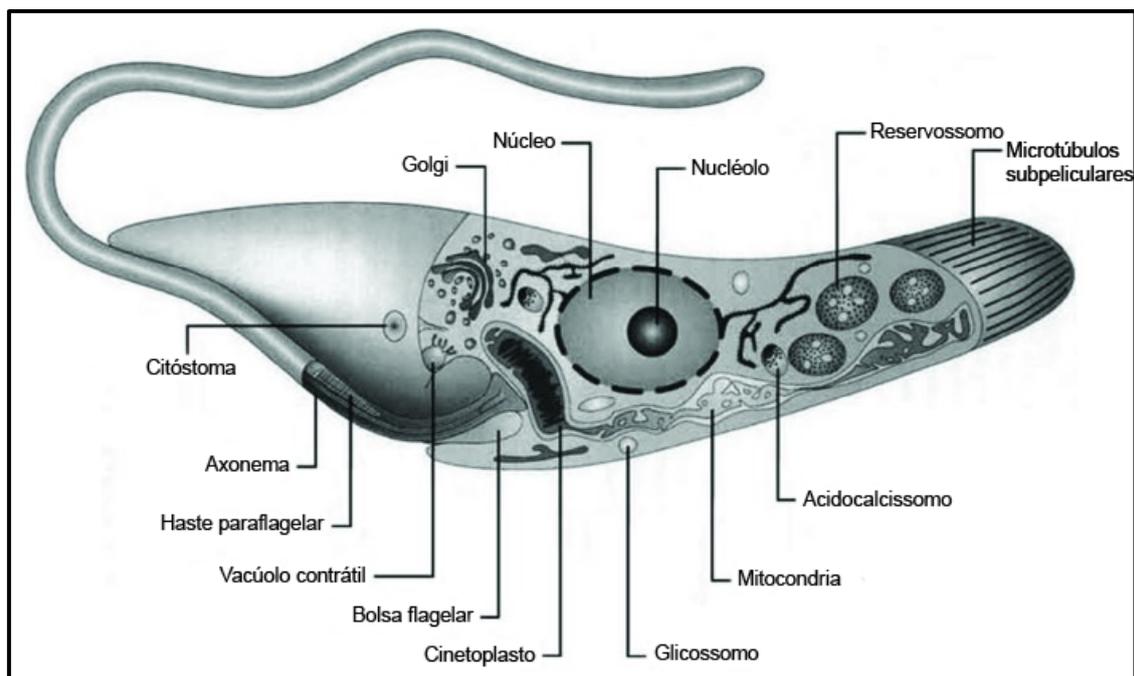
Outro compartimento celular peculiar, presente em alguns membros da família *Trypanosomatidae*, são os reservossomos. Esses reservatórios celulares, processam e armazenam macromoléculas como proteínas e lipídios após serem endocitados na região do citóstoma, nas formas epimastigotas do paraita (DE SOUZA, 2002). Sabe-se que a incubação destas formas do *T. cruzi* em meio pobre em nutrientes, causa o desaparecimento gradativo dos reservossomos, sugerindo a utilização dessas reservas durante a escassez de nutrientes (DE SOUZA, 2002; PEREIRA et al., 2011; PEREIRA et al., 2015).

O núcleo do *T. cruzi* se assemelha morfologicamente ao da maioria das células eucarióticas. No entanto, diferenças funcionais e na sua organização são evidentes. Certamente a mais marcante destas diferenças é o mecanismo de regulação pós-transcricional. Neste organismo, há ausência de promotores clássicos para a RNA polimerase II. Além disso, o processamento do pré-mRNA é do tipo trans-splicing e a transcrição policistrônica (ELIAS et al., 2002; MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2010; WIPPEL, et al., 2018). Outros aspectos interessantes do núcleo de *T. cruzi* é a

ausência de uma organização nucleolar nas formas amastigotas e tripomastigota. Além do mais, durante toda a divisão celular a membrana nuclear permanece íntegra e a presença de microtúbulos intranucleares, dispersão da cromatina e o aparecimento de placas densas podem ser observados (DE SOUZA, 2009).

Estudos sobre o retículo endoplasmático (RE) e complexo de Golgi do *T. cruzi*, ainda são raros. No entanto, sabe-se que estas organelas se assemelham bastante em função quando comparadas à dos outros eucariotos, nos quais desempenham papel importante na via secretora e na síntese de proteínas (DE SOUZA, 2002; CANELA-PÉREZ et al., 2019; SANDES et al., 2019). O RE em *T. cruzi* é escasso, contínuo com o núcleo e se distribui em todo corpo celular, especialmente na periferia do parasita onde parece se associar com os microtúbulos subpeliculares, a membrana e a mitocôndria. Tanto o RE rugoso (RER) quanto o liso (REL) podem ser observados em todas as formas do parasito, mas sua abundância vai depender do estágio do ciclo celular (DE SOUZA, 2009). Estudos com drogas que causam desequilíbrio na homeostase do RE tem sido associado ao stress do retículo o qual ao se tornar persistente pode levar o parasita a morte celular (SANDES et al., 2019). O complexo de Golgi está sempre próximo a bolsa flagelar sendo formado por uma única pilha de cisternas achatadas. Drogas que afetam o complexo de Golgi, também causam alterações no RE mostrando a relação de continuidade entre estas organelas (SANDES et al., 2019).

Figura 6 – Visão esquemática das estruturas e organelas do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: CAVALCANTI e SOUZA, 2018 – Adaptado.

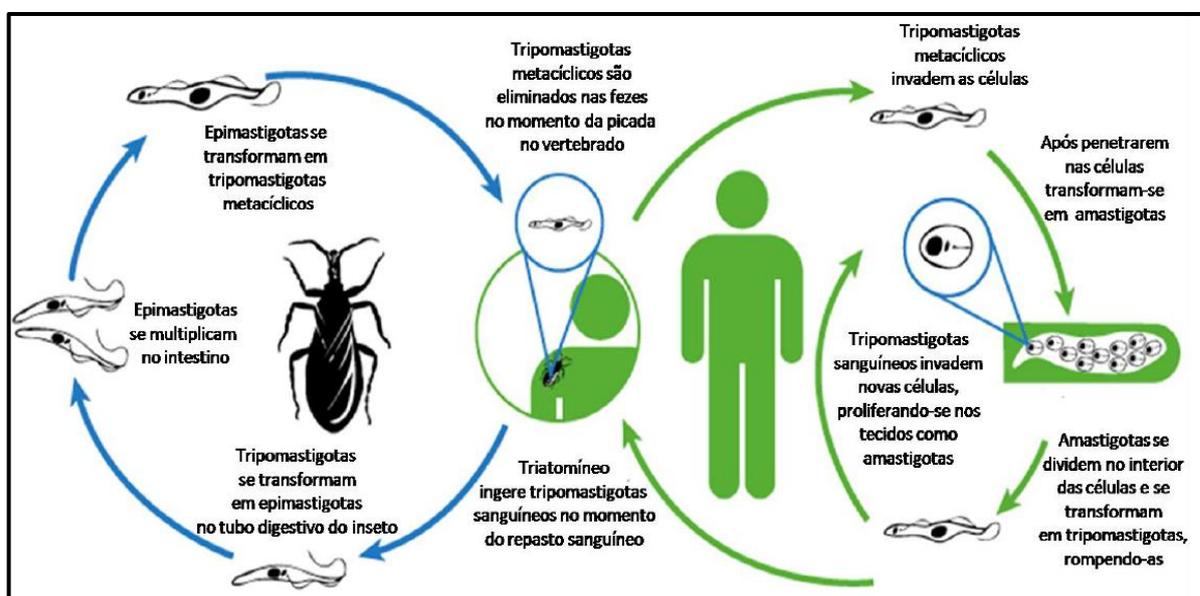
2.2.2 Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* possui um ciclo de vida complexo, alternando entre o hospedeiro vertebrado e invertebrado (**Figura 7**) (LOPES., et al., 2010). Ele pode se iniciar quando o inseto vetor, durante o repasto sanguíneo em um mamífero infectado, ingere formas tripomastigotas sanguíneas. Na porção inicial do tubo digestivo do inseto, estas formas se diferenciam em epimastigotas, as quais se dividem repetidamente por fissão binária (KOLLIEN e SCHAUB, 2000; DE SOUZA, 2002). Parte destes epimastigotas se movem para o final do tubo digestivo, onde passarão por nova diferenciação em tripomastigotas metacíclicos. Estudos revelam que mudanças do pH intestinal, presença de hemoglobina livre e o ambiente redox favorecem o início da metaciclogênese que é a transformação das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos (forma infectante não replicativa) (PAES et al., 2011; CHAGAS-LIMA et al., 2019).

O ciclo biológico no hospedeiro mamífero tem início quando os tripomastigotas metacíclicos penetram na corrente sanguínea e invadem células nucleadas como macrófagos, fibroblastos, células musculares e neuronais. No citosol das células

parasitadas os lisossomos são recrutados pelo citoesqueleto, se fundindo ao vacúolo parasitóforo em formação, acidificando seu interior. Em resposta à acidificação do vacúolo parasitóforo, as formas tripomastigotas passam a secretar proteínas líticas (TcTox e trans-sialidase) que rompem a membrana do vacúolo. Uma vez livres no citoplasma, estas formas se diferenciam em amastigotas (TYLER e ENGMAN, 2001; LIMA et al., 2010). Os amastigotas sofrem sucessivas divisões binárias até ocupar quase todo espaço intracitoplasmático da célula hospedeira. Quando isso ocorre, o *T. cruzi* mais uma vez se diferencia, para a forma tripomastigota sanguínea (DUMOULIN e BURLEIGH, 2018). A grande quantidade de tripomastigotas no interior da célula e o seu movimento constante e intenso causam a ruptura da membrana plasmática, liberando-os no meio extracelular, dando início a um novo ciclo, podendo os parasitos ser ingeridos pelo vetor ou infectar outras células (TANOWITZ et al., 2009; MACHADO et al., 2012).

Figura 7 – Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro vertebrado e invertebrado.



Fonte: MATTOS, 2017.

2.3 “DOCKING” MOLECULAR APLICADO A PROSPECÇÃO DE NOVOS FÁRMACOS

As ferramentas biotecnológicas associadas aos métodos da química medicinal e bioinformática tem assumido um papel de destaque no desenvolvimento de novas moléculas com atividade biológica (PINZI & RASTELLI, 2019). Dentre essas ferramentas, se destaca o “*Docking*” Molecular (De RUYCK et al., 2016). Esta técnica permite prever as interações de possíveis candidatos a fármacos com alvos biológicos específicos *in silico*, a fim de selecionar moléculas que se liguem com alta afinidade a estes alvos e possam funcionar como inibidores. A predição de possíveis inibidores de alvos do parasita poupa o trabalho de síntese e avaliação biológica de estruturas não promissoras, acelerando a fase inicial do desenvolvimento de um novo fármaco (SANTOS et al., 2018; SETHI et al., 2019). Sendo assim, possíveis moléculas bioativas são geralmente testadas para um determinado alvo proteico a fim de estabelecer qual, ou quais, delas apresentam melhor acomodação ao sítio ativo do alvo (SETHI et al., 2019). Os resultados obtidos nos ensaios computacionais são dados de ligação química e da energia de ligação necessária para que a molécula bioativa se ligue ao sítio ativo do alvo molecular selecionado (PRADEEPKIRAN & REDDY, 2019). Logo, a molécula que apresentar menor quantidade de energia necessária para se ligar ao sítio ativo, será aquela que, teoricamente, apresentará melhor resultado de atividade biológica para aquele alvo específico.

2.3.1 Alvos moleculares no *Trypanosoma cruzi*

O estudo dos alvos terapêuticos críticos para o metabolismo dos tripanosomatídeos tem sido um ponto chave no desenvolvimento racional de novas drogas (SINATTI et al., 2017). Este tipo de abordagem utiliza preferencialmente alvos proteicos presentes exclusivamente no agente causador da doença ou análogos à mesma função em humanos, mas estruturalmente diferentes (LIMA et al., 2016; SINATTI et al., 2017).

No *T. cruzi*, algumas enzimas têm sido alvos frequentes em testes *in silico* e *in vitro*, por regularem vias bioquímicas essenciais para a sobrevivência do parasito. Nesse contexto, a cruzipaína (CZ) juntamente com a família da Gp85/trans-sialidase (TS) estão entre os mais investigados (SAN FRANCISCO et al., 2016). A CZ é uma cisteína peptidase presente no *T. cruzi*, que atua na invasão dos tecidos, no desenvolvimento intracelular e na evasão do sistema imune no hospedeiro vertebrado (ALVAREZ et al, 2012). Estudos prévios, realizados em linhagem de células CHO tratadas com CZ purificada, foi identificado um aumento do cálcio intracitoplasmático, favorecendo a invasão das células hospedeiras pelo *T. cruzi*. Além disso, a capacidade da CZ de digerir subclasses de IgG contribui fortemente para o escape do parasita ao sistema imunológico (OSORIO et al., 2012; FERRÃO et al., 2015; SAN FRANCISCO et al., 2016). A TS também tem demonstrado ser essencial para a virulência do *T. cruzi*. Esta proteína atua na transferência do ácido siálico do hospedeiro para a superfície do parasito, “camuflando” o *T. cruzi* do sistema imune hospedeiro, favorecendo sua sobrevivência e a instalação da infecção crônica (NARDY et al, 2016; KASHIF et al, 2017).

A síntese de esteróis é um processo vital para os eucariotos, pois seus produtos são componentes importantes das membranas celulares, além de servirem como precursores de várias moléculas bioativas (RABELO et al, 2017). Portanto, a inibição da biossíntese de esteróis em tripanosomatídeos pode causar a morte desses organismos (LEPESHEVA et al, 2018). Nessa perspectiva, inibidores do esterol 14 α -desmetilase (CYP51) e farnesil difosfato sintase (FPPS) têm sido avaliados no combate a leishmanioses, doença do sono e DC (GABELLI et al, 2006; GUNATILLEKE et al., 2012; DAUCHY et al, 2016). Ensaio realizado com posaconazol, um triazol de amplo espectro utilizado para combater infecções fúngicas, com eficácia contra *T. cruzi*, demonstrou a interação deste composto com a CYP51, inibindo quase por completo a formação de produtos enzimáticos (LEPESHEVA et al., 2011). Não diferente da CYP51, uma variedade de moléculas com potencial inibitório da FPPS tem emergido (GALAKA et al, 2019). A exemplo disso, uma série de bifosfonatos contendo enxofre foram testados nas formas amastigotas do *T. cruzi*. Os compostos 37 (1-[(n-Octiltiol)etil]-1,1-ácido bisfosfônico), 38 (1-[(n-Noniltiol)etil]-1,1-ácido bisfosfônico) e 39 (1-[(n-Deciltiol)etil]-1,1-ácido bisfosfônico) foram os mais eficazes com valores da de ED₅₀ (dose efetiva para inibir 50% das amastigotas) de

15.8 μM , 12.8 μM e 22.4 μM , respectivamente. Em consonância com a redução das formas amastigotas, os compostos induziram uma forte inibição da *T. cruzi* FPPS (IC_{50} = 6,3 μM , 1.7 μM e 0.097 μM respectivamente) sugerindo que a ação inibitória desta enzima seja um dos possíveis mecanismos de morte do protozoário (RECHER et al, 2012). Outras proteínas-alvo não menos importantes, que estão diretamente envolvidas em vias metabólicas indispensáveis do *T. cruzi*, incluindo a Dihidrofolato timidilato redutase sintase (DHFR-TS), Tripanotiona redutase (TR), a triose fosfato isomerase (TPI) e a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) podem também contribuir para o desenvolvimento de fármacos mais eficazes. A DHFR-TS é responsável pela conversão do dihidrofolato (H_2F) em tetrahidrofolato (H_4F) por redução dependente de NADPH. A inibição da DHFR-TS afeta a síntese de DNA no *T. cruzi* (CHITNUMSUB et al, 2009; GIBSON et al, 2016). A TR, ajuda a manter a forma reduzida da tripanotiona, colaborando com a manutenção da homeostase do redox celular, impedindo que o parasito sofra danos por estresse oxidativo (ORTALLI et al., 2018; RUIZ-SANTAQUITERIA et al., 2018). Em *T. cruzi* a TPI é um alvo molecular validado para o desenvolvimento de drogas. Esta enzima catalisa isomerização do gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona na quinta etapa da via glicolítica (ÁLVAREZ et al., 2015). A grande dependência da via glicolítica como fonte energética para a sobrevivência do *T. cruzi* torna as enzimas dessa via um interessante alvo de estudo no desenvolvimento de fármacos com ação tripanocida (AGUILERA et al., 2016). A gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, também atua na via glicolítica, convertendo o gliceraldeído 3-fosfato em 1,3-bisfosfoglicerato usando nicotinamida adenosina dinucleotídeo e fosfato inorgânico (REIS et al, 2013; PARIONA-LLANOS et al., 2015).

2.4 A EVOLUÇÃO DA SÍNTESE ORGÂNICA ATRAVÉS DA *CLICK CHEMISTRY* PARA DESCOBERTA DE NOVOS AGENTES TERAPÊUTICOS CONTRA DOENÇAS NEGLIGENCIADAS

A química medicinal moderna compreende o desenho e síntese de novos compostos bioativos com potencial de se tornarem drogas. Neste contexto, ela envolve ciclos repetitivos de otimização visando aumentar a sua eficácia e características farmacocinéticas destas moléculas (BOSTROM et al., 2018).

Historicamente, o desenvolvimento da humanidade se confunde com o da química medicinal, na busca por agentes capazes de curar ou aliviar dores e outras condições patológicas. Assim, desde o início da civilização, os produtos de origem natural, principalmente folhas e ervas já eram utilizados para diferentes fins terapêuticos pelas civilizações antigas do oriente e ocidente. Entre estes povos se destacam os pertencentes ao antigo Egito, Grécia, Roma e China (VIEGAS JÚNIOR, BOLZANI e BARREIRO, 2006; JONES, 2011).

Com o passar do tempo a química medicinal foi progredindo e acompanhando o desenvolvimento científico, destacando-se as contribuições de vários estudiosos e químicos (CALIXTO e SIQUEIRA JÚNIOR, 2008). Em 1828, Friedrich Wöhler foi o responsável pela primeira síntese orgânica que se tem notícia na história. Antes do seu trabalho, acreditava-se que só os seres vivos eram capazes de sintetizar compostos orgânicos. No entanto, Wöhler em suas experimentações produziu ureia, uma substância orgânica presente na urina, a partir de cianato de amônia (BROCKSOM, et al., 2015). Essa importante contribuição possibilitou o desenvolvimento de novas metodologias para a produção de substâncias orgânicas, inclusive de moléculas com propriedades farmacológicas. Por volta de 1897, o pesquisador Felix Hoffman sintetizou um dos medicamentos mais populares do mundo, utilizado até os dias atuais, o ácido acetil salicílico (AAS), obtido através de mudanças estruturais do ácido salicílico, um derivado da *Salix alba* (**Esquema 2**). Este analgésico e antitérmico revolucionou a indústria farmacêutica (VANE e BOTTING, 2003; EDER e HERRLING, 2016). Pouco mais de uma década depois, Paul Erlich deu o primeiro passo em relação ao estudo dos fármacos, estabelecendo o conceito do mecanismo de ação dos medicamentos, que viria a se tornar anos mais tarde, o conceito de receptores farmacológicos. Na concepção Erlich, uma substância química não funcionaria a menos que pudesse se ligar a um sítio específico (CALIXTO e SIQUEIRA JÚNIOR, 2008).

orgânica catalisada por cobre (CuAAC) para a formação regioespecífica de 1,2,3-triazóis-1,4-dissubstituídos. Esta rota tem sido amplamente empregada, não só na química orgânica, mas também em outras áreas, provando seu grande potencial (NANDIVADA et al., 2007; BOZOROV et al., 2019). O fato dos grupos azidas e alcinos serem facilmente preparados em laboratório e estarem entre as moléculas mais inertes, inclusive em meio aquoso, favorece a reação, até mesmo quando há presença de grupos reativos nas moléculas envolvidas, formando uma molécula híbrida contendo um anel triazólico (FREITAS et al., 2011; PICKENS et al., 2018). Portanto, o número de publicações utilizando CuAAC cresce de forma exponencial, demonstrando a grande versatilidade desta metodologia. A click chemistry é amplamente aplicada na química medicinal, bioconjugação, química de materiais, química supramolecular e para obtenção de catalisadores (FREITAS et al. 2011).

2.4.1 1,2,3-triazol

Os triazóis são nitroheterocíclicos formados por dois átomos de carbono e três de nitrogênio, podendo ser obtido na forma de dois isômeros, 1,2,3-triazol e 1,2,4-triazol. As propriedades físico-químicas deste grupo fazem dele uma importante ferramenta para manipulação da lipofilicidade, polaridade e da capacidade de ligação com moléculas de hidrogênio de compostos químicos (PRAVEEN; MURTHY e PAL, 2015). (FREITAS; et al., 2011; FERREIRA et al., 2013; BONANDI et al., 2017). Suas características estruturais como: polaridade, rigidez e a capacidade de agir como doadores e aceitadores de ligações de hidrogênio, conferem a estas moléculas a capacidade de mimetizar características de diferentes grupos funcionais como amida, éster e outros nitro-heterocíclicos de cinco membros com a vantagem de se manter estável em ambientes hidrolíticos, oxidativos e redutivos. Desta forma, o 1,2,3-triazol vem sendo amplamente utilizado como bioisótero na síntese de novos análogos de drogas já estabelecidas e como plataforma para o desenvolvimento de novos compostos para fins medicinais (BONANDI et al., 2017). Geralmente hibridizados a outros grupos farmacofóricos, os derivados triazólicos apresentam diversas atividades biológicas contra microrganismos patogênicos como bactérias, fungos e protozoários (BRAND et al., 2017; DHEER, et al., 2017; SILVA et al., 2018).

O potencial bactericida e fungicida de novos compostos derivados de heterocíclicos 1,2,3-triazol, chalconas e flavonas sintetizados por *click chemistry* foi

investigado por El Sayed Aly e colaboradores (2015) em cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, enquanto a atividade antifúngica foi avaliada contra *Candida albicans* e *Aspergillus flavus*. A maioria dos compostos apresentaram atividade antibacteriana e fungicida, com destaque para o 6-(β -D-glucopiranosil)-1-(4-((3 β -colesteroliloxi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)hexano contra *E. coli*, o qual apresentou atividade superior a ampicilina. Estes autores também demonstraram o potente efeito inibitório deste composto, sobre *S. aureus* (EL SAYED ALY et al., 2015).

Marchiori e colaboradores (2017) avaliaram potencial de sete novos análogos do O-3 triazol ligado ao galactosil arilsulfonamidas sobre a invasão de fibroblastos por *T. cruzi*. Dois destes derivados foram capazes de reduzir significativamente a taxa de infecção nas células hospedeiras, bem como o número de amastigotas nas células infectadas e tratadas, em relação às células infectadas sem tratamento (MARCHIORI et al., 2017).

A ação anti-inflamatória dos derivados triazólicos tem sido reportada. A síntese de uma biblioteca de fenil-1H-1,2,3-triazol foi ensaiada em edema de orelha de rato induzido por xileno. Quatro destas novas moléculas mostraram-se superiores à droga de referência (diclofenaco) (KIM et al., 2015). Em adição, trabalhos recentes sugerem que derivados de triazóis podem agir sobre importantes reguladores da inflamação como P2X7, NF- κ B, TNF- α , cox 2, 5 lox, GSK-3 β , IL-1b, e IL-6. No contexto da doença de chagas, a atividade imunomoduladora apresentada por derivados triazólicos pode minimizar os efeitos do quadro inflamatório crônico desta doença. (SARIGOL et al., 2015; TANTRAY et al., 2016; GONZAGA et al., 2017; ZHANG et al., 2017; NAAZ et al., 2018).

2.4.2 Ftalimidas

A ftalimida é um heterocíclico, pertencente à família das imidas, constituído por -CO-N(R)-CO- e um anel imida (KUSHWHA e KAUSHIK, 2016). Esta molécula é eletricamente neutra e naturalmente hidrofóbica, possui uma leve solubilidade em água e hidróxidos alcalinos, a qual lhe confere a capacidade de penetrar as membranas celulares. Estas propriedades quimicamente interessantes, aliada aos efeitos farmacológicos já reportados, fazem dos derivados ftalimídicos uma importante plataforma para síntese e elaboração de diversos análogos (KUSHWHA e KAUSHIK, 2016; SILVA, et al., 2017).

Estudos em derivados de ftalimidas associados a outros grupos farmacofóricos demonstraram atividades biológicas, tais como: antimicrobiana (KHIDRE et al., 2011), anti-inflamatória (LIMA, et al., 2002), anticonvulsivante (KATHURIA e PATHAK, 2012), hipoglicemiante (MBARKI e ELHALLAOUI, 2012), ansiolítica, (YOSUVA e SABASTIYAN, 2012) e anti-HIV-1 (SHARMA et al., 2010). A ação ansiolítica dos derivados de ftalimidas foi uma das primeiras a ser relatada para o composto talidomida (3-ftalimidoglutarimida) sintetizado em 1954 pelo CIBA Pharmaceutical Company. Esta molécula recebeu considerável atenção devido a existência de deformidades severas em recém-nascidos de mulheres para as quais foi prescrita como antiemético (FRANKS et al., 2004). Desta forma, ela foi banida do mercado por mais de 40 anos. Apenas em 1998 voltou a ser aprovada pela FDA como potente anti-inflamatório no tratamento de eritema nodoso, uma dolorosa e severa complicação da lepra. Desde então, novas atividades têm sido atribuídas a talidomida tais como agentes imunomodulador, anti-inflamatório e antiangiogênico no tratamento de várias condições patológicas severas (LIU et al., 2017).

Além da talidomida e seus derivados, novos compostos ftalimídicos acoplados a outros grupos funcionais tem emergido como ansiolíticos promissores (KUSHWAHA e KAUSHIK, 2016). Foi visto que o composto *N*-benzoil 3-nitro-ftalimida tinha efeito ansiolítico significativo em camundongos em relação ao grupo não tratado (HASSANZADEH et al., 2012).

Trabalhos recentes têm relatado o efeito tripanocida de alguns derivados da ftalimida (MUTH et al., 2007; GOMES et al., 2016). Gomes e colaboradores (2016) avaliaram o potencial de uma série de derivados de ftalimida-tiazol frente ao *T. cruzi*. Neste estudo o composto (2-((E)-2-{{(Z)-[4-(3-nitrofenil)-3-feniltiazol-2(3H)-ilideno]hidrazono}etil)isoindolina-1,3-diona) foi um potente inibidor das formas tripomastigotas do parasito em concentrações pouco tóxicas para células de mamíferos. Além do mais, várias alterações celulares puderam ser observadas nos parasitos tratados com o composto, como encurtamento do corpo celular e aparecimento de vesículas no flagelo, alterações nos reservossomos, nas formas epimastigotas, inchaço da mitocôndria, intensa vacuolização e perda de material citoplasmático (GOMES et al., 2016).

Os mecanismos por trás da ação anti-inflamatória de análogos das ftalimidas são um dos mais estudados e mais bem estabelecidos. Ensaio realizado com novos *N*-fenil-ftalimida sulfonamidas, revelou que o 2-[4-(1,4-tiazinan-4-ilsulfonil) fenil]-1,3-

isoindolinediona reduziu a resposta inflamatória aguda induzida por LPS, em modelo murino ocorrendo o decréscimo do infiltrado neutrofílico nos pulmões dos camundongos nos níveis de TNF- α (LIMA et al., 2002).

2.4.3 Naftoquinonas

Pertencentes a classe dos naftalenos orgânicos, as naftoquinonas são moléculas de ampla distribuição natural, estando presentes em plantas, fungos e alguns animais, onde participam de processos vitais (FOWLER et al., 2018; ZHANG et al., 2018). As naftoquinonas podem também ser facilmente sintetizadas, favorecendo a obtenção de vários análogos com potencial farmacológico, inclusive no combate as doenças negligenciadas (NAUJORKS et al. 2012).

Os derivados de naftoquinonas tem exibido uma série de efeitos biológicos, principalmente no que diz respeito ao combate aos microrganismos, sendo reportado sua ação antifúngica, bactericida e tripanocida (FOWLER et al., 2018; ZHANG et al., 2018).

O efeito das quinonas tem sido atribuído a pelo menos um de dois possíveis mecanismos: oxidação de grupos sulfidril nucleofílicos de proteínas e aminoácidos ou através de estresse oxidativo produzindo EROs durante o ciclo redox (FOWLER et al., 2018). Tendo em vista que tripanosomatídeos possuem mecanismos anti-oxidantes rudimentares, estes organismos podem ser particularmente sensíveis ao estresse oxidativo induzido por moléculas como as naftoquinonas (FOWLER et al., 2018).

A avaliação do efeito biológico de uma série de novos derivados de naftoquinonas mostrou que estes compostos foram eficazes contra formas amastigotas de *T. cruzi*, em concentrações na faixa de micromolar. Além disso, os ensaios de citotoxicidade em fibroblastos revelaram altos índices de seletividade das naftoquinonas contra o parasita, superando os resultados obtidos com BNZ (NAUJORKS et al., 2015).

Menna-Barreto et al. (2009) investigaram o modo de ação de três derivados da β -lapachona, uma quinona de origem natural contra o *T. cruzi*. Estes compostos foram eficazes contra formas epimastigotas e tripomastigotas do parasito. A análise ultraestrutural de células tratadas revelou a presença de autofagossomos, característico de autofagia e *blebs* na membrana, característica observada em células

apoptóticas. A mitocôndria, os reservossomos e o núcleo foram apontados como os principais alvos de ação da droga.

Um estudo com outros derivados de naftoquinona demonstrou um aumento no percentual de necrose nos tripomastigotas tratados com 4,5-dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(fenil)-piran[b-4,3]naft[1,2-d]imidazol) e 4,5-dihidro-6,6-dimetil-6H-2-(3k-indolil)-piran[b4,3]naft[1,2-d]-imidazol e aumento da exposição da fosfotidilserina nos parasitos tratados com o primeiro composto, sugerindo a atuação concomitante de vias de morte celular diferentes (MENNA-BARRETO et al., 2009a).

O potencial antiparasitário das naftoquinonas também vem sendo reportado em *Leishmania* (SOUZA-SILVA et al., 2014; MENDONÇA et al., 2017). Os derivado [2-(2,3,4-tri-O-acetil-6-desoxi- β -L-galactopiranosiloxi)-1,4-naftoquinona] mostrou ação inibitória para as espécies de *L. infantum* e *L. amazonensis*. Além disso, o composto se mostrou mais seletivo para ambas as espécies do parasito do que para os macrófagos murinos, com o índice de seletividade (IS) superior ao da anfotericina B (MENDONÇA et al., 2017).

Assim, devido a falta de medicamentos mais baratos, eficazes contra o *T. cruzi* e com menos efeitos colaterais para células do hospedeiros, nosso trabalho se propôs a investigar o efeito de derivados híbridos de 1,2,3-triazol contendo grupamentos naftoquinonas e ftalimidas em sua estrutura química e elucidar seus possíveis alvos de ação, por abordagens de biologia celular e *docking* molecular.

REFERÊNCIAS

AGUILERA, E. et al. Potent and Selective Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Triosephosphate Isomerase with Concomitant Inhibition of Cruzipain: Inhibition of Parasite Growth through Multitarget Activity. **ChemMedChem**, v. 11, n. 12, p. 1328-1338, 2016.

ALANAZI, A. M. et al. Structure-based design of phthalimide derivatives as potential cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: Anti-inflammatory and analgesic activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 92, p.115-123, 2015.

ALIANÇA, A. et al. In vitro evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazole derivatives. **Eur J Pharm Sci**, v. 105, p. 1-10, 2017.

ALVAREZ, G. et al. Development of bis-thiazoles as inhibitors of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. Identification of new non-mutagenic agents that are active in vivo. **Eur J Med Chem**, v. 100, p. 246-256, 2015.

ALVAREZ, M. G. et al. Prevention of congenital Chagas disease by Benznidazole treatment in reproductive-age women. An observational study. **Acta Trop**, v. 174, p. 149-152, 2017.

ALVAREZ, V. E.; NIEMIROWICZ, G. T.; CAZZULO, J. J. The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. **Biochim Biophys Acta**, v. 1824, n. 1, p. 195-206, 2012.

ANDRADE, L. O. et al. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. **Mol Biochem Parasitol**, v. 100, n. 2, p. 163-172, 1999.

ANDREI, C. C.; FERREIRA, D. T.; FACCIONE, M.; FARIA, T. J. Da Química Medicinal à Química Combinatória. 2ª ed. Barueri: Manole, 2011.

ANTINORI, S. et al. Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. **Eur J Intern Med**, v. 43, p. 6-15, Sep 2017.

ARNOTT, J. A.; PLANEY, S. L. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. **Expert Opin Drug Discov**, v. 7, n. 10, p. 863-875, 2012.

ASHWINI, N. et al. Synthesis of 1,2-benzisoxazole tethered 1,2,3-triazoles that exhibit anticancer activity in acute myeloid leukemia cell lines by inhibiting histone deacetylases, and inducing p21 and tubulin acetylation. **Bioorg Med Chem**, v. 23, n. 18, p. 6157-6165, 2015.

BALOUZ, V.; AGUERO, F.; BUSCAGLIA, C. A. Chagas Disease Diagnostic Applications: Present Knowledge and Future Steps. **Adv Parasitol**, v. 97, p. 1-45, 2017.

BAUER, S.; MORRIS, M. T. Glycosome biogenesis in trypanosomes and the de novo dilemma. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 4, p. e0005333, 2017.

BELLO CORASSA, R. et al. Evolution of Chagas' disease in Brazil. Epidemiological perspective and challenges for the future: a critical review. **Perspect Public Health**, v. 137, n. 5, p. 289-295, 2017.

BERK, B; AKGÜN, H. Synthesis and Antimycobacterial Activity of Some Phthalimide Derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.20, n. 13, p. 4149–4154, 2012.

BERNSTEIN, R. Darwin's illness: Chagas' disease resurgens. *J R Soc Med*.

BOIANI, M. et al. Mode of action of nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: is oxidative stress involved? **Biochem Pharmacol**, v. 79, n. 12, p. 1736-1745, 2010.

BONANDI, E. et al. The 1,2,3-triazole ring as a bioisostere in medicinal chemistry. **Drug Discov Today**, v. 22, n. 10, p. 1572-1581, 2017.

BOZOROV, K.; ZHAO, J.; AISA, H. A. 1,2,3-Triazole-containing hybrids as leads in medicinal chemistry: A recent overview. **Bioorg Med Chem**, v. 27, n. 16, p. 3511-3531 2019.

BRAND, S. et al. Discovery and Optimization of 5-Amino-1,2,3-triazole-4-carboxamide Series against *Trypanosoma cruzi*. **J Med Chem**, v. 60, n. 17, p. 7284-7299, 2017.

BROCKSOM, T. J.; DESIDERÁ, A. L.; ALVES L. C.; DE OLIVEIRA, K. T. “The New Directions of Organic Synthesis”, **Current Organic Synthesis**, v. 12, p. 496-522, 2015.

BRUHN, D. F. et al. Pentacyclic nitrofurans that rapidly kill nifurtimox-resistant trypanosomes. **J Antimicrob Chemother**, v. 71, n. 4, p. 956-963, 2016.

CALDAS, I. S.; SANTOS, E. G.; NOVAES, R. D. An evaluation of benznidazole as a Chagas disease therapeutic. **Expert Opin Pharmacother**, v. 20, n. 15, p. 1797-1807, 2019.

CAMARA, M. L. M. et al. *Trypanosoma cruzi* surface mucins are involved in the attachment to the *Triatoma infestans* rectal ampoule. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 13, n. 5, p. 1-23, 2019.

CAMINHA, M. A. et al. *Trypanosoma cruzi* immunoproteome: Calpain-like CAP5.5 differentially detected throughout distinct stages of human Chagas disease cardiomyopathy. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 194, p. 179-190, 2018.

CAMPO, V. L. et al. Design, synthesis and the effect of 1,2,3-triazole sialylmimetic neoglycoconjugates on *Trypanosoma cruzi* and its cell surface trans-sialidase. **Bioorg Med Chem**, v. 20, n. 1, p. 145-156, 2012.

CANELA-PEREZ, I. et al. Nuclear localization signals in trypanosomal proteins. **Mol Biochem Parasitol**, v. 229, p. 15-23, 2019.

CANUTO, J. A. et al. Antichagasic effect of Violacein from *Chromobacterium violaceum*. **J Appl Microbiol**, v. 5, p.1373-1380, 2019.

CASAL, J. J.; BOLLINI, M.; LOMBARDO, M. E.; BRUNO, A. M.; Thalidomide analogues: tumor necrosis factor-alpha inhibitors and their evaluation as anti-inflammatory agents. **Eur J Intern Med**. v. 83, n. 1, p. 114-119, 2016.

CASAL, J. J.; BOLLINI, M.; LOMBARDO, M. E.; BRUNO, A. M.; Thalidomide analogues: tumor necrosis factor-alpha inhibitors and their evaluation as anti-inflammatory agents. **Eur J Intern Med.** v. 83, n. 1, p. 114-119, 2016.

CASTRO, A. M. et al. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Res**, v. 88, n. 10, p. 894-900, 2002.

CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Hum Exp Toxicol**, v. 25, n. 8, p. 471-479, 2006.

CAVALCANTI, D. P.; DE SOUZA, W. The Kinetoplast of Trypanosomatids: From Early Studies of Electron Microscopy to Recent Advances in Atomic Force Microscopy. **Scanning**, v. 2018, p. 1-11, 2018.

CEVALLOS, A. M.; HERNANDEZ, R. Chagas' disease: pregnancy and congenital transmission. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 1-11, 2014.

CHAGAS-LIMA, A. C. et al. Bioactive lipids regulate *Trypanosoma cruzi* development. **Parasitol Res**, v. 9, p. 2609-2619, 2019.

CHITNUMSUB, P. et al. Crystallization and preliminary crystallographic studies of dihydrofolate reductase-thymidylate synthase from *Trypanosoma cruzi*, the Chagas disease pathogen. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun**, v. 65, n. 11, p. 1175-1178, 2009.

CONNERS, E. E. et al. A global systematic review of Chagas disease prevalence among migrants. **Acta Trop**, v. 156, p. 68-78, 2016.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.

COURA, J. R; DIAS, J. C. P. Epidemiology, Control and Surveillance of Chagas Disease - 100 years after its Discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 104, p. 31-40, 2009.

DAUCHY, F. et al. *Trypanosoma brucei* CYP51: essentiality and targeting therapy in na experimental model. **Plos Neglected Tropical Disease**. v. 10, p. 1-21, 2016.

DE LIMA, M. A. et al. Interstitial cells of Cajal in chagasic megaesophagus. **Ann Diagn Pathol**, v. 12, n. 4, p. 271-274, 2008.

DE OLIVEIRA, R. B. et al. Gastrointestinal manifestations of Chagas' disease. **Am J Gastroenterol**, v. 93, n. 6, p. 884-889, 1998.

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr Pharm Des**, v. 8, n. 4, p. 269-285, 2002.

DE SOUZA. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v.104, p. 89-100, 2009.

DE, V. C. S. V. et al. In silico identification of inhibitors of ribose 5-phosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* using ligand and structure based approaches. **J Mol Graph Model**, v. 77, p. 168-180, 2017.

DHEER, D.; SINGH, V.; SHANKAR, R. Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: Current developments. **Bioorg Chem**, v. 71, p. 30-54, 2017.

DIAS, et al. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v. 25, p. 7-86, 2015.

DIAS, L. C.; Dessoy M. A. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química nova**, v. 32, n. 9, p. 2444-2457. 2009.

DOCAMPO, R.; ULRICH, P.; MORENO, S. N. Evolution of acidocalcisomes and their role in polyphosphate storage and osmoregulation in eukaryotic microbes. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 365, n. 1541, p. 775-784, 2010.

Drugs for neglected diseases initiative (DNDi), **Doença de Chagas**. Disponível em <<https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/>>. Acesso em 21 de Ago. 2019.
Drugs for neglected diseases initiative. **About for Chagas disease**, 2019. Disponível em <<https://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/>> Acesso em: 10 de Mai. de 2019.

DUMOULIN, P. C.; BURLEIGH, B. A. Stress-Induced Proliferation and Cell Cycle Plasticity of Intracellular *Trypanosoma cruzi* Amastigotes. **MBio**, v. 9, n. 4, p. 1-15 2018.

EDER, J.; HERRLING, P. L. Trends in Modern Drug Discovery. **Handb Exp Pharmacol**, v. 232, p. 3-22, 2016.

EL SAYED ALY, M. R.; SAAD, H. A.; MOHAMED, M. A. Click reaction based synthesis, antimicrobial, and cytotoxic activities of new 1,2,3-triazoles. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 25, n. 14, p. 2824-2830, 2015.

ELIAS, M. C. et al. Chromosome localization changes in the *Trypanosoma cruzi* nucleus. **Eukaryot Cell**, v. 1, n. 6, p. 944-953, 2002.

ESPER, L. et al. Molecular mechanisms of myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi*. **Curr Opin Infect Dis**, v. 28, n. 3, p. 246-252, 2015.

ESWARI, J. S.; DHAGAT, S. KASER, S.; TIWARI, A. Homology modeling and molecular docking studies of bacillomycin and iturin synthetases with novel ligands for the production of therapeutic lipopeptides. **Current Drug Discov Techno**, v. 15, n. 2, p. 132-141, 2018.

Farmacologia UEFS. **Absorção**. Disponível em <<https://farmacologiauefs.wordpress.com/farmacocinetica/absorcao/>>. Acesso em 06 de Set. de 2019.

FEINSTEIN, W.; BRYLINSKI, M. Structure-Based Drug Discovery Accelerated by Many-Core Devices. **Curr Drug Targets**, v. 17, n. 14, p. 1595-1609, 2016.

FERRAO, P. M. et al. Cruzipain Activates Latent TGF-beta from Host Cells during *T. cruzi* Invasion. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0124832, 2015.

FERREIRA, V. F. et al. Novel 1H-1,2,3-, 2H-1,2,3-, 1H-1,2,4- and 4H-1,2,4-triazole derivatives: a patent review (2008 - 2011). **Expert Opin Ther Pat**, v. 23, n. 3, p. 319-331, 2013.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 81, n. 5, p. 755-759, 1987.

FILIGHEDDU, M. T.; GORGOLAS, M.; RAMOS, J. M. Orally-transmitted Chagas disease. **Med Clin (Barc)**, v. 148, n. 3, p. 125-131, 2017.

FLORES-FERRER, A. et al. *Trypanosoma cruzi* transmission dynamics in a synanthropic and domesticated host community. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 13, n. 12, p. 1-24, 2019.

FOWLER, P. et al. A review of the genotoxic potential of 1,4-naphthoquinone. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen**, v. 834, p. 6-17, 2018.

FRANCO, C. H. et al. Drug Discovery for Chagas Disease: Impact of Different Host Cell Lines on Assay Performance and Hit Compound Selection. **Trop Med Infect Dis**, v. 4, n. 2, p. 1-17, 2019.

FRANKS, M. E.; MACPHERSON, G. R.; FIGG, W. D. Thalidomide. **Lancet**, v. 363, n. 9423, p. 1802-1811, 2004.

FREILIJ, H.; ALTICHEH, J. Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. **Clin Infect Dis**, v. 21, n. 3, p. 551-555, 1995.

FREITAS, L. B. O. A reação de “click” na síntese de 1,2,3-triazóis: Aspectos químicos e aplicações. **Quim Nova**, v. 34, n. 10, p. 1791-1804, 2011.

Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Doença de Chagas. Rio de Janeiro, Brasil, 2013. Disponível em <<https://agencia.fiocruz.br/print/499>>. Acesso em 21 de Ago. de 2019.
GABELLI, S. B. et al. Structure and mechanism of the farnesyl diphosphate synthase from *Trypanosoma cruzi*: implications for drug design. **Proteins**, v. 62, n. 1, p. 80-88, 2006.

GALAKA, T. et al. Synthesis and biological evaluation of 1-alkylaminomethyl-1,1-bisphosphonic acids against *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii*. **Bioorg Med Chem**, v. 27, n. 16, p. 3663-3673, 2019.

GARAVAGLIA, P. A. et al. *Trypanosoma cruzi*: death phenotypes induced by ortho-naphthoquinone substrates of the aldo-keto reductase (TcAKR). Role of this enzyme in the mechanism of action of beta-lapachone. **Parasitology**, v. 145, n. 9, p. 1251-1259, 2018.

GIBSON, M. W. et al. *Trypanosoma brucei* DHFR-TS Revisited: Characterisation of a Bifunctional and Highly Unstable Recombinant Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 5, p. e0004714, 2016.

GOMES, Y. M.; LORENA, V. M.; LUQUETTI, A. O. D **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 115-121, 2009.

GOMES, P. A. et al. Phthalimido-thiazoles as building blocks and their effects on the growth and morphology of *Trypanosoma cruzi*. **Eur J Med Chem**. v. 111, p. 46-57, 2016.

GONZAGA, D. T. G. et al. 1-Aryl-1H- and 2-aryl-2H-1,2,3-triazole derivatives blockade P2X7 receptor in vitro and inflammatory response in vivo. **Eur J Med Chem**, v. 139, p. 698-717, 2017.

GUARNER, J. Chagas disease as example of a reemerging parasite. **Semin Diagn Pathol**, v. 36, n. 3, p. 164-169, 2019.

GUNATILLEKE, S. S. et al. Diverse inhibitor chemotypes targeting *Trypanosoma cruzi* CYP51. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 7, p. e1736, 2012.

HALL, B. S.; BOT, C.; WILKINSON, S. R. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. **J Biol Chem**, v. 286, n. 15, p. 13088-13095, 2011.

HASSANZADEH, F. et al. Synthesis and evaluation of the anxiolytic activity of some phthalimide derivatives in mice model of anxiety. **Iran J Pharm Res**, v. 11, n. 1, p. 109-115, 2012.

HUANG, R. Synthesis and discovery of asiatic acid based 1,2,3-triazoles derivatives as antitumor agents blocking NF- κ B activation and cell migration. **Med Chem Comm**, v. 10, p. 1-14. 2019.

JIANG, Y.; QIAN, A.; LI, Y. 1H-1,2,3-Triazole tethered isatin-moxifloxacin: Design, synthesis and in vitro anti-mycobacterial evaluation. **Arch Pharm (Weinheim)**, p. e1900040, 2019.

JOHNSON, T. W.; GALLEGGO, R. A.; EDWARDS, M. P. Lipophilic Efficiency as an Important Metric in Drug Design. **J Med Chem**, v. 61, n. 15, p. 6401-6420, 2018.

JONES, A. W. Early drug discovery and the rise of pharmaceutical chemistry. **Drug Test Anal**, v. 3, n. 6, p. 337-344, 2011.

KALEL, V. C. et al. Come, sweet death: targeting glycosomal protein import for antitrypanosomal drug development. **Curr Opin Microbiol**, v. 46, p. 116-122, 2018.

KAUFER, A.; STARK, D.; ELLIS, J. Evolutionary Insight into the Trypanosomatidae Using Alignment-Free Phylogenomics of the Kinetoplast. **Pathogens**, v. 8, n. 3, 2019.

KATHURIA, V.; PATHAK, D. P. Synthesis and anticonvulsant activity of some N-substituted-phthalimide analogs. **The Pharmainnovation**. v. 1, n.10, p.55-59, 2012.

KESSLER, R. L. et al. Recently differentiated epimastigotes from *Trypanosoma cruzi* are infective to the mammalian host. **Mol Microbiol**, v. 104, n. 5, p. 712-736, 2017.

KHIDRE, R. E.; ABU-HASHEM, A. A.; EL-SHAZLY, M. Synthesis and anti-microbial activity of some 1- substituted amino-4,6-dimethyl-2-oxo-pyridine-3-carbonitrile derivatives. **Eur J Med Chem**, v. 46, n. 10, p. 5057-5064, 2011.

KIM, T. W. et al. Synthesis and biological evaluation of phenyl-1H-1,2,3-triazole derivatives as anti-inflammatory agents. **Bioorg Chem**, v. 59, p. 1-11, 2015.

KOLB, H. C.; FINN, M. G.; SHARPLESS, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 40, n. 11, p. 2004-2021, 2001.

KOLLIEN, A. H.; SCHAUB, G. A. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. **Parasitol Today**, v. 16, n. 9, p. 381-387, 2000.

KONTOYIANNI, M. Docking and virtual screening in drug Discovery. **Methods in Molecular Biology**. p. 255-266, 2017.

KRATZ, J. M. et al. Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. **Expert Rev Clin Pharmacol**, v. 11, n. 10, p. 943-957, 2018.

KUSHWAHA, N. KAUSHIK, D. Recent Advances and Future Prospects of Phthalimide Derivatives. **J of Applied Pharm Sci**. v. 6, n. 3, p. 159-171, 2016.

LAMIE, P. F. et al. Design, Synthesis and Evaluation of Novel Phthalimide Derivatives as in Vitro Anti-Microbial, Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Agents. **Molecules**, v. 20, n. 9, p. 16620-16642, 2015.

LARA, L. S. et al. Efficacy of 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl-[1,4]-naphthoquinone derivatives against different *Trypanosoma cruzi* discrete type units: Identification of a promising hit compound. **Eur J Med Chem**, v. 144, p. 572-581, 2018.

LEDNICE, D. Drugs based on five-membered heterocycles. In: LEDNICE, D. Strategies for organic drug synthesis and design. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009. p. 239-318.

LEITE, D. I. et al. New 1,2,3-triazole-based analogues of benznidazole for use against *Trypanosoma cruzi* infection: In vitro and in vivo evaluations. **Chem Biol Drug Des**, v. 92, n. 3, p. 1670-1682, 2018.

LEPESHEVA, G. I.; FRIGGERI, L.; WATERMAN, M. R. CYP51 as drug targets for fungi and protozoan parasites: past, present and future. **Parasitology**, v. 145, n. 14, p. 1820-1836, 2018.

LEPESHEVA, G. I.; VILLALTA, F.; WATERMAN, M. R. Targeting *Trypanosoma cruzi* sterol 14 α -demethylase (CYP51). **Adv Parasitol**, v. 75, p. 65-87, 2011.

LIMA, C. R. et al. In silico structural characterization of protein targets for drug development against *Trypanosoma cruzi*. **J Mol Model**, v. 22, n. 10, p. 1-14, 2016.

LIMA, F. M. et al. The challenge of Chagas' disease: has the human pathogen, *Trypanosoma cruzi*, learned how to modulate signaling events to subvert host cells? **N Biotechnol**, v. 27, n. 6, p. 837-843, 2010.

LIMA, L. M. et al. Synthesis and anti-inflammatory activity of phthalimide derivatives, designed as new thalidomide analogues. **Bioorg Med Chem**, v. 10, n. 9, p. 3067-3073, 2002.

LIU, T., et al. Thalidomide and its analogues: A review of the potential for immunomodulation of fibrosis diseases and ophthalmopathy. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v.14, n. 6, p. 5251–5257, 2017.

LONDERO, V. S. et al. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of costic acid isolated from *Nectandra barbellata* (Lauraceae) is associated with alterations in plasma membrane electric and mitochondrial membrane potentials. **Bioorg Chem**, v. 95, p. 1-7, J 18 2019.

LOPES, A. L. et al. Intracellular signaling pathways involved in cell differentiation in trypanosomatids. *The open parasitology journal*, v.4, p. 102-110, 2010.

MACEDO, A. M.; PENA, S. D. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. **Parasitol Today**, v. 14, n. 3, p. 119-24, 1998.

MACHADO, F. S. et al. Chagas heart disease: report on recent developments. **Cardiol Rev**, v. 20, n. 2, p. 53-65, 2012.

MALAFAIA, G.; RODRIGUES, A. S. L. Centenário do descobrimento da doença de Chagas: desafios e perspectivas. *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 43, n. 5, p. 483-485, 2010.

MANEGATTI, R.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. A importância da síntese de fármacos. **Sociedade Brasileira de Química**: cadernos temáticos de química nova na escola, 2001.

MARCHIORI, M. F. et al. Binding of triazole-linked galactosyl arylsulfonamides to galectin-3 affects *Trypanosoma cruzi* cell invasion. **Bioorg Med Chem**, v. 25, n. 21, p. 6049-6059, 2017.

MARTINEZ-CALVILLO, S. et al. Gene expression in trypanosomatid parasites. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 1-15, 2010.

MATSUDA, N. M.; MILLER, S. M.; EVORA, P. R. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 64, n. 12, p. 1219-1224, 2009.

MATTOS, E. C. Associação de métodos para a detecção de *Trypanosoma cruzi* em alimentos. Tese (Doutorado Ciências) – Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. São Paulo, p. 1-121. 2017.

MAYA, J. D. et al. 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**, v. 146, n. 4, p. 601-620, 2007.

MENDONÇA, D. V. C. et al. Antileishmanial activity of a naphthoquinone derivate against promastigote and amastigote stages of *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and its mechanism of action against *L. amazonensis* species. **Parasitol Res**, v. 117, n. 2, p. 391-403, 2018.

MENNA-BARRETO, R. F. et al. The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. **Free Radic Biol Med**, v. 47, n. 5, p. 644-53, 2009.

MENNA-BARRETO, R. F. et al. Naphthoimidazoles promote different death phenotypes in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 136, n. 5, p. 499-510, 2009a.

MONGE-MAILLO, B.; LOPEZ-VELEZ, R. Challenges in the management of Chagas disease in Latin-American migrants in Europe. **Clin Microbiol Infect**, v. 23, n. 5, p. 290-295, 2017.

MORENO, S. N.; DOCAMPO, R. The role of acidocalcisomes in parasitic protists. **J Eukaryot Microbiol**, v. 56, n. 3, p. 208-213, 2009.

MORRIS, G. M.; LIM-WILBY, M. Molecular docking. **Methods Mol Biol**, v. 443, p. 365-382, 2008.

NAAZ, F. et al. 1,2,3-triazole tethered Indole-3-glyoxamide derivatives as multiple inhibitors of 5-LOX, COX-2 & tubulin: Their anti-proliferative & anti-inflammatory activity. **Bioorg Chem**, v. 81, p. 1-20, 2018.

NARDY, A. F. et al. Role of *Trypanosoma cruzi* Trans-sialidase on the Escape from Host Immune Surveillance. **Front Microbiol**, v. 7, p. 1-9, 2016.

NAUJORKS, A. A. et al. Novel naphthoquinone derivatives and evaluation of their trypanocidal and leishmanicidal activities. **Org Biomol Chem**, v. 13, n. 2, p. 428-437, 2015.

NOYA, B. A. et al. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 377-386, 2015.

ODLO, K. et al. 1,5-Disubstituted 1,2,3-triazoles as cis-restricted analogues of combretastatin A-4: Synthesis, molecular modeling and evaluation as cytotoxic agents and inhibitors of tubulin. **Bioorg Med Chem**, v. 16, n. 9, p. 4829-4838, 2008.

ORTALLI, M. et al. Identification of chalcone-based antileishmanial agents targeting trypanothione reductase. **Eur J Med Chem**, v. 152, p. 527-541, 2018.

ORTIZ, J. V. et al. Cardiac Evaluation in the Acute Phase of Chagas' Disease with Post-Treatment Evolution in Patients Attended in the State of Amazonas, Brazil. **Arq Bras Cardiol**, v. 112, n. 3, p. 240-246, 2019.

OSORIO, L. et al. Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who? **Microbes Infect**, v. 14, n. 15, p. 1390-1402, 2012.

PAES, M. C. et al. The Role of Heme and Reactive Oxygen Species in Proliferation and Survival of *Trypanosoma cruzi*. **J Parasitol Res**, v. 2011, p. 1-8, 2011.

PARIONA-LLANOS, R. et al. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-telomere association correlates with redox status in *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0120896, 2015.

PAUCAR, R. et al. Rational modification of Mannich base-type derivatives as novel antichagasic compounds: Synthesis, in vitro and in vivo evaluation. **Bioorg Med Chem**, v. 27, n. 17, p. 3902-3917, 2019.

PEREIRA, M. G. et al. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes are able to store and mobilize high amounts of cholesterol in reservosome lipid inclusions. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22359, 2011.

PEREIRA, M. G. et al. *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes Are Able to Manage Internal Cholesterol Levels under Nutritional Lipid Stress Conditions. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0128949, 2015.

PEREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82-94, 2018.

PICKENS, C. J. et al. Practical Considerations, Challenges, and Limitations of Bioconjugation via Azide-Alkyne Cycloaddition. **Bioconjug Chem**, v. 29, n. 3, p. 686-701, 2018.

PINTO, J. J. et al. Characterization of digestive disorders of patients with chronic Chagas disease in Cochabamba, Bolivia. **Heliyon**, v. 5, n. 2, p. e01206, 2019.

POKORSKI, J. K.; SMITH, L. E. "Click" Chemistry for Medicine and Biology. **Mol Pharm**, v. 15, n. 8, p. 2891, 2018.

PRAVEEN, K. S. S.; MURTHY, N. Y. S.; PAL, S. Syntheses and Biological Activities of 1,4 Disubstituted-1,2,3-triazoles. **J of Chem and Pharm Res**. v. 7, n. 5, p 506-522. 2015.

RABELO, V. W. et al. Targeting CYP51 for drug design by the contributions of molecular modeling. **Fundam Clin Pharm**, v. 31, n. 1, p. 37-53, 2017.

RAJÃO, M. A., et al. Unveiling Benznidazole's Mechanism of Action Through Overexpression of DNA Repair Proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Environ and Mol Mut**, v. 55, p. 309-321, 2014.

RAMAKRISHNAN, S.; ASADY, B.; DOCAMPO, R. Acidocalcisome-Mitochondrion Membrane Contact Sites in *Trypanosoma brucei*. **Pathogens**, v. 7, n. 2, p. 1-11 2018.

RAMIREZ, J. D.; HERNANDEZ, C. *Trypanosoma cruzi* I: Towards the need of genetic subdivision?, Part II. **Acta Trop**, v. 184, p. 53-58, 2018.

RECHER, M. et al. Design, synthesis and biological evaluation of sulfur-containing 1,1-bisphosphonic acids as antiparasitic agents. **Eur J Med Chem**, v. 60, p. 431-440, 2013.

REIS, M. et al. The catalytic mechanism of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* elucidated via the QM/MM approach. **Phys Chem Chem Phys**, v. 15, n. 11, p. 3772-3785, 2013.

ROSSI, M. A.; RAMOS, S. G.; BESTETTI, R. B. Chagas' heart disease clinical-pathological correlation. **Frontiers in Bioscience**. v. 8, p. 94-109, 2003.

RUIZ-SANTAQUITERIA, M. et al. Trypanothione reductase inhibition and anti-leishmanial activity of all-hydrocarbon stapled alpha-helical peptides with improved proteolytic stability. **Eur J Med Chem**, v. 149, p. 238-247, 2018.

SAIKIA, S.; BORDOLOI, M. Molecular Docking: Challenges, Advances and its Use in Drug Discovery Perspective. **Curr Drug Targets**, v. 20, n. 5, p. 501-521, 2019.

SALES JUNIOR, P. A. et al. Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. **Am J Trop Med Hyg**, v. 97, n. 5, p. 1289-1303, 2017.

SAN FRANCISCO, J. et al. Decreased cruzipain and gp85/trans-sialidase family protein expression contributes to loss of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote virulence. **Microbes Infect**, v. 19, n. 1, p. 55-61, 2017.

SANDES, J. M. et al. The effects of endoplasmic reticulum stressors, tunicamycin and dithiothreitol on *Trypanosoma cruzi*. **Exp Cell Res**, v. 383, n. 2, p. 1-12, 2019.

SANGI, D. P. Estratégias de Síntese da Descoberta de Fármacos: O Emprego da Síntese Orientada Pela Diversidade Estrutural. **Química Nova**, v. 39, n. 8, p. 995-1006, 2016.

SANTOS, F. R. D. et al. Systematic neonatal screening for congenital Chagas disease in Northeast Brazil: prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in the Southern region of Sergipe. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 51, n. 3, p. 310-317, 2018.

SARIGOL, D. et al. Novel thiazolo[3,2-b]-1,2,4-triazoles derived from naproxen with analgesic/anti-inflammatory properties: Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies. **Bioorg Med Chem**, v. 23, n. 10, p. 2518-2528, 2015.

SBARAGLINI, M. L. et al. Novel cruzipain inhibitors for the chemotherapy of chronic Chagas disease. **Int J Antimicrob Agents**, v. 48, n. 1, p. 91-95, 2016.

SHARMA, U. et al. Recent advances in the chemistry of phthalimide analogues and their therapeutic potential. **Mini Rev Med Chem**, v. 10, n. 8, p. 678-704, 2010.

SI, W. et al. Design, synthesis and bioactivity of novel phthalimide derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 26, n. 9, p. 2380-2, 2016.

SILVA, A. J. et al. Synthesis and preliminary pharmacological evaluation of new (+/-) 1,4-naphthoquinones structurally related to lapachol. **Bioorg Med Chem**, v. 10, n. 8, p. 2731-2738, 2002.

SILVA, G. F. et al. Anti-hypersensitivity effects of the phthalimide derivative N-(4methylphenyl)-4-methylphthalimide in different pain models in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v 96, p. 503-512, 2017.

SILVA, S. T. M. et al. In vitro antileishmanial activity of ravuconazole, a triazole antifungal drug, as a potential treatment for leishmaniasis. **J Antimicrob Chemother**, v. 73, n. 9, p. 2360-2373, 2018.

SINCLAIR, A. N.; DE GRAFFENRIED, C. L. More than Microtubules: The Structure and Function of the Subpellicular Array in Trypanosomatids. **Trends Parasitol**, v. 35, n. 10, p. 760-777, 2019.

SOUZA-SILVA, F. et al. Evidences for leishmanicidal activity of the naphthoquinone derivative epoxy-alpha-lapachone. **Exp Parasitol**, v. 147, p. 81-84, 2014.

STANAWAY, J. D.; ROTH, G. The burden of Chagas disease: estimates and challenges. **Glob Heart**, v. 10, n. 3, p. 139-144, 2015.

TABACARU, A. Recent advances in click chemistry reactions mediated by transition. **Inorg Chim Acta**. v. 455, p. 329-349, 2017.

TANDON, V. K. et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel nitrogen and sulfur containing hetero-1,4-naphthoquinones as potent antifungal and antibacterial agents. **Eur J Med Chem**, v. 44, n. 8, p. 3130-3137, 2009.

TANDON, V. K. et al. Synthesis and pharmacological studies of some 2-t-amino and 2,3-di-t-amino substituted 1,4-naphthoquinones and related compounds. **Boll Chim Farm**, v. 141, n. 4, p. 304-310, 2002.

TANDON, V. K. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of 1,2,3-trisubstituted-1,4-dihydrobenzo[g]quinoxaline-5,10-diones and related compounds as

antifungal and antibacterial agents. **Bioorg Med Chem**, v. 14, n. 17, p. 6120-6126, 2006.

TANOWITZ, H. B. et al. Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). **Prog Cardiovasc Dis**, v. 51, n. 6, p. 524-539, 2009.

TANTRAY, M. A. et al. Synthesis of Novel Oxazolo[4,5-b]pyridine-2-one based 1,2,3-triazoles as Glycogen Synthase Kinase-3beta Inhibitors with Anti-inflammatory Potential. **Chem Biol Drug Des**, v. 87, n. 6, p. 918-926, 2016.

TOMASINI, N. Introgression of the Kinetoplast DNA: An Unusual Evolutionary Journey in *Trypanosoma cruzi*. **Curr Genomics**, v. 19, n. 2, p. 133-139, 2018.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **Int J Parasitol**, v. 31, n. 5-6, p. 472-481, 2001.

United States Food and Drugs Administration. **FDA approves first U.S treatment for Chagas disease**. 2019. Disponível em <<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-us-treatment-chagas-disease>> acesso em 21 de Ago. 2019.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. The mechanism of action of aspirin. **Thromb Res**, v. 110, n. 5-6, p. 255-258, 2003.

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; Barreiro, e. os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**. v. 29, no. 2, p. 326-337, 2006.

VINUESA, T. et al. Benznidazole Nanoformulates: A Chance to Improve Therapeutics for Chagas Disease. **Am J Trop Med Hyg**, v. 97, n. 5, p. 1469-1476, 2017.

WHO. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Wkly Epidemiol Rec**, p. 33–43, 2015.

WILKINSON, S. R. et al. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 105, n. 13, p. 5022-5027, 2008.

WIPPEL, H. H. et al. The Nuclear RNA-binding Protein RBSR1 Interactome in *Trypanosoma cruzi*. **J Eukaryot Microbiol**, v. 66, n. 2, p. 244-253, 2019.

ZHANG, Q. et al. Cytotoxicity of Synthesized 1,4-Naphthoquinone Oxime Derivatives on Selected Human Cancer Cell Lines. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 66, n. 6, p. 612-619, 2018.

3 RESULTADOS

ARTIGO A SER SUBMETIDO NA REVISTA EUROPEAN JOURNAL OF
MEDICINAL CHEMISTRY

3.1 “CLICK CHEMISTRY”: SÍNTESE, RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE E
AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE COMPOSTOS HÍBRIDOS INÉDITOS DE DERIVADOS
DE 1,2,3-TRIAZOL CONTRA *Trypanosoma cruzi*

Lucas Eduardo Bezerra de Lima^a, Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo^{a,*}

^aDepartamento de Microbiologia, Instituto Aggeu Magalhães, Avenida Profº Moraes
Rego s/nº- Campus da UFPE, Recife-PE, 50670420, Brasil.

*Autor correspondente:

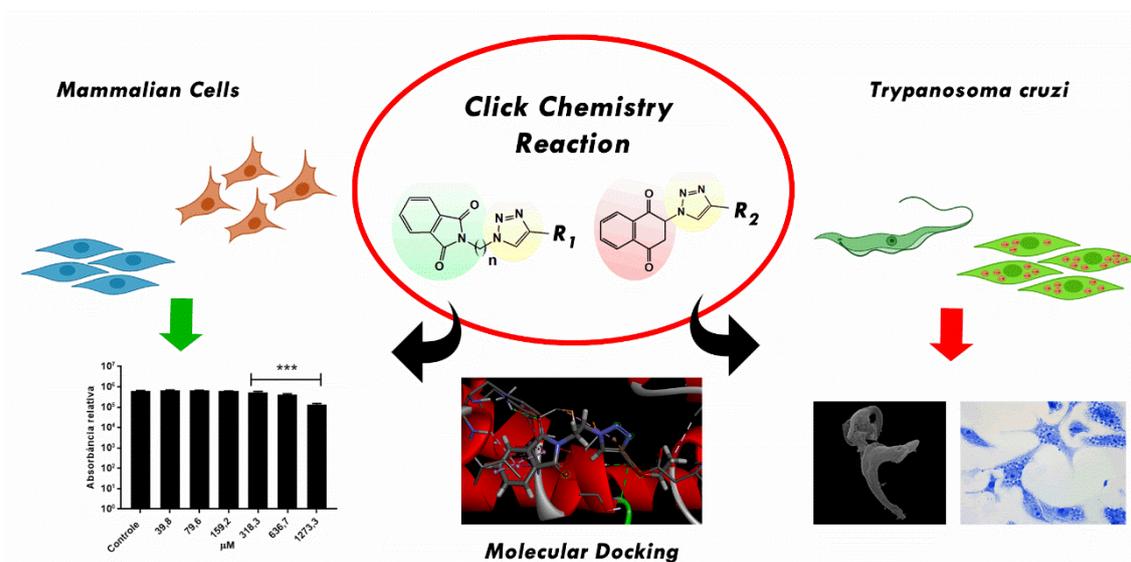
Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo*

Departamento de Microbiologia, Instituto Aggeu Magalhães, Avenida Moraes

Email: bressan@cpqam.com.br

Tel: +558121012556

Graphic abstract



ABSTRACT

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, is the major cause of death by cardiomyopathy and heart failure in Latin American countries. Since the 1970s, benznidazol (BNZ) and nifurtimox (NFX) have been the only chemotherapeutic agent used in the treatment of disease. These nitroheterocyclic compounds are highly toxic and ineffective in the chronic phase of Chagas disease. Recent studies with triazole derivatives have demonstrated the trypanocidal potential of these compounds. In this work we investigated the effects of four novel 1,2,3-triazole hybrids derivatives containing phthalimide (**FT1**, **FT2**, **FT3**) or naphthoquinones (**NT1**) on mammalian cells and on different developmental stages of *T. cruzi*. The compounds were synthesized through the click chemistry reactions, of these, the compound **NT1** and **FT1** were the most cytotoxic to intracellular form of the parasite with an $IC_{50} = 31.1$ and $189.2 \mu M$ respectively. **NT1** was also the most toxic against Vero and CEP cells with CC_{50} of 96.1 and $124.8 \mu M$. When compared with CEP, the phthalimide-1,2,3-triazole derivative **FT1** proved to be the most selective against trypomastigote and amastigote forms of the parasite selectivity index (ISe) > 5 , being superior to benznidazole (ISe < 3). To elucidate the potential mechanism of action of **FT1**, we evaluated the effect of this compound on the mitochondrial physiology of the trypomastigote forms using the fluorescent probe rhodamine 123. Our results showed a reduction in the mitochondrial membrane potential of parasites incubated with the two highest concentrations of **FT1**. In addition, the cytometric analysis of treated-parasites incubated with Mitosox showed an increase in the mitochondrial reactive oxygen species (ROS), demonstrating the loss of mitochondrial homeostasis. The ultrastructural study of trypomastigotes treated with **FT1** showed morphological alterations consistent with the loss of cell viability. Molecular docking of **FT1** on target enzymes of *T. cruzi* showed that this compound strongly interacted with the parasite triponathione reductase (total energy = -122.72 kcal / mol) and CYP51 (total energy = -109.12 kcal / mol), enzymes that play a role redox balance and ergosterol production, respectively. Taken together our results showed that the phthalimide-1,2,3-triazole derivative **FT1** can be considered a promising prototype for the development of new drugs to combat Chagas disease.

Palavras chaves: *Trypanosoma cruzi*. Benznidazole. Click chemistry. Trypanocidal activity. Triazole.

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC), causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é uma doença negligenciada, comum em países em desenvolvimento, nos quais constitui um sério agravo a Saúde Pública [1]. Nas últimas décadas, os fenômenos de migração e globalização tem mudado substancialmente o perfil epidemiológico da DC, com número crescente de indivíduos infectados em países tidos como não endêmicos, na América do Norte e na Europa [2,3]. Os compostos, benznidazol (BNZ) e nifurtimox (NFX) são os únicos fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas. Estas drogas causam severos efeitos colaterais, alto custo, baixa biodisponibilidade oral e sua eficácia na fase crônica da doença é controversa, com baixos índices de cura parasitológica. Soma-se a estes fatores o aparecimento de cepas do parasita resistentes ao tratamento [4]. Desta forma, é urgente a procura por quimioterápicos mais seletivos para o parasito, com menos efeitos colaterais e que sejam acessíveis às populações acometidas pela doença de Chagas.

Compostos contendo grupamento 1,2,3-triazol e seus derivados exibem atividades biológicas interessantes tais como: antibacteriana [5,6], anti-inflamatória [7], antiviral [8], antifúngica [9] e tripanocida [3,10]. Essas atividades podem ser atribuídas a característica aromática azólica de seu anel heterocíclico que se liga com alta afinidade a uma variedade de enzimas e receptores, via interações não covalentes diversas, aumentando, desta forma, as possibilidades de interações e rearranjos químicos [11].

Compostos contendo o grupamento ftalimidas possuem características hidrofóbicas, o que favorece a passagem através das membranas lipídicas e sua interação com os alvos moleculares responsáveis pelo efeito farmacológico no interior das células. Os derivados de ftalimidas tem se mostrado eficazes como agentes antimicrobiano [12], anti-inflamatório [13], anticonvulsivante [14], anti-HIV-1[15] e tripanocida [16].

Assim como os derivados do 1,2,3-triazol e ftalimida, as naftoquinonas vem ganhando visibilidade no campo da química medicinal. Seus derivados podem ser encontrados na natureza, principalmente em algumas espécies de plantas, podendo também ser obtidos através de síntese [17]. Estudos relatam uma série de atividades biológicas atribuídas aos derivados de naftoquinonas, com destaque para ação sobre

microrganismos patogênicos, tais como: fungos [18], bactérias [19] e protozoários [20,21]. A ação tripanocida desses derivados vem sendo frequentemente relatada, como causada pelo estresse oxidativo induzido por estas moléculas [22].

Na busca por rotas mais eficientes e de baixo custo para a síntese de derivados de triazol, reações de *click chemistry* têm se mostrado promissoras. Entre elas, a reação de cicloadição 1,3 dipolar, envolvendo alcinos e azida, catalisada por cobre (CuAAC, *Copper catalyzed azide alkyne cycloaddition*) ganha destaque devido a sua simplicidade, alta seletividade, ausência de subprodutos e baixo custo associado [23]. Na Química Medicinal a síntese do 1,2,3-triazol também tem sido utilizada para ligar dois ou mais grupos farmacofóricos como ftalimidas e naftoquinonas, o que pode potencializar as atividades já existentes, aumentar biodisponibilidade e melhorar a estabilidade das moléculas [3]. Esta estratégia, conhecida como hibridização molecular, tem sido amplamente utilizada na identificação de novas moléculas com atividade tripanocida.

No presente trabalho nós investigamos o potencial tripanocida, a relação estrutura-atividade, e a citotoxicidade em células de mamífero de 4 derivados contendo núcleo 1,2,3-triazol, obtidos através da reação de *click chemistry*. O potencial dos compostos contra alvos moleculares enzimáticos já validados em *T. cruzi* também foram avaliados através de docking molecular.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos compostos – Uma série de quatro derivados de ftalimida-triazol (FT1-FT3) e naftoquinona-triazol (NT1) foram sintetizados e caracterizados conforme descrito previamente [24]. Os compostos sintetizados foram gentilmente cedidos pelo Dr. Ronaldo Nascimento de Oliveira do Departamento de Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Os compostos foram obtidos pela reação de *click chemistry* (cicloadição 1,3 dipolar catalisada por cobre) para a síntese de compostos derivados de 1,2,3-triazol-ftalimida ou naftoquinona **FT1** (ethyl 1-[2-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)ethyl]-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate), **FT2** (ethyl 1-[3-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)propyl]-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate) e **FT3** (2-[[4-(2-hydroxypropan-2-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl]methyl]-1H-isoindole-1,3(2H)-dione) e um derivado de triazol-naftoquinona **NT1** (ethyl 1-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-

yl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate) com rendimentos de 92,%, 81,4%, 68,4% e 72,4% respectivamente. Os compostos foram inicialmente diluídos na concentração de 50 mg/mL em dimetilsulfóxido DMSO puro. Essa solução foi então dissolvida em meio de cultivo RPMI a 1 mg/mL e uma concentração de DMSO 2% (solução estoque). A solução estoque foi guardada à -20 °C protegida da luz e posteriormente diluída em diferentes concentrações, em meio de cultivo, até sua utilização nos ensaios. A concentração de DMSO na solução de trabalho não foi superior 1%.

2.2 Cultivo de células de mamífero – As células VERO e as células do exsudato peritoneal (CEP) foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm² contendo meio de cultivo RPMI 1640 (Sigma - Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) suplementado a 10% de soro fetal bovino (SFB), 10 U/mL de penicilina e 10 mg/mL de streptomina (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) à 37 °C e 5% de CO₂.

2.3 Parasitas – As formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram obtidas de camundongos albinos Swiss infectados, através de punção cardíaca no sétimo dia após a infecção. Os parasitos foram mantidos em cultura de célula Vero em meio de cultivo RPMI suplementado com 10% de SFB à 37 °C e 5% de CO₂ e utilizados nos ensaios de atividade dos compostos sobre *T. cruzi*. As formas amastigotas intracelulares foram obtidas através da infecção das CEPs com as formas tripomastigotas obtidas do sobrenadante da cultura de células Vero, mantidas em RPMI.

2.4 Ensaio de citotoxicidade – Para o ensaio de citotoxicidade, células Vero mantidas em cultura foram tratadas com tripsina, centrifugadas, ressuspendidas em RPMI e semeadas na concentração de 1 x 10⁴ células/mL em microplacas de 96 poços e incubadas por 24h. Às CEPs de camundongos (CEUA 146/2019) foram coletadas, semeadas na concentração 1 x 10⁶ células/mL e incubadas por 24h. Posteriormente as células Vero e CEPs foram tratadas com diluições seriadas dos compostos testes **FT1** (39,8-1273,3 µM), **FT2** (38,1- 1218,4 µM) **FT3** (43,7-1397,2 µM) e **NT1** (42,1-1345,6 µM) e incubadas por 24h, após esse período a viabilidade celular foi avaliada utilizando o kit de viabilidade celular CellTiter-Glo® Luminescent cell viability assay, conforme as instruções do fabricante. A luminescência foi quantificada pelo GloMax® Luminometer (Promega Corporation, USA). Células cultivadas na ausência dos

compostos foram utilizadas como controle negativo. A concentração dos compostos capaz de inibir em 50% a viabilidade das células (CC₅₀) foi estimada através de regressão linear utilizando o programa IBM SPSS Statics 25. Todos os testes foram realizados em triplicata em três experimentos independentes.

2.5 Atividade tripanocida – Os tripomastigotas obtidos do sobrenadante de cultura de células Vero infectadas foram incubados em microplacas de 96 poços (1 x 10⁶ células/mL) e cultivados à 37°C, na presença e ausência (controle) de diferentes concentrações dos compostos **FT1** (19,9 - 636,4 µM), **FT2** (19 - 609,2 µM) **FT3** (10,9 - 698,6µM) e **NT1** (21,1 - 672,8 µM), diluídos em RPMI. Após 24h de incubação dos parasitos com e sem o tratamento, foi determinada a viabilidade dos parasitos por contagem em câmara de Neubauer utilizando o microscópio óptico convencional. Cada experimento foi realizado em triplicata, em 3 experimentos independentes. Para os ensaios com as formas amastigotas, as CEPs foram infectados com as formas tripomastigotas obtidas do sobrenadante de cultura de células Vero infectadas, em uma proporção de 1:10 parasitos/célula por 3h em meio de cultivo RPMI à 37°C. Após esse período as culturas foram lavadas com RPMI fresco, para retirada dos parasitos não interiorizados e cultivadas por um tempo adicional de 24h. Em seguida, as células infectadas e não infectadas, foram tratadas ou não com os compostos **FT1** (23,3-372,3 µM), **FT2** (49,3-788 µM) **FT3** (90,4-1446,4 µM) e **NT1** (3,8-60,2 µM) por 24h a 37°C em RPMI suplementado com 10% de soro bovino e então fixadas e coradas usando o *kit* comercial Panótico Rápido LB (Laborclin Produtos Para Laboratórios Ltda). A concentração capaz de causar a lise de 50% das formas tripomastigotas ou inibir a sobrevivência de amastigotas (LC₅₀ e IC₅₀ respectivamente) foi estimada por análise de regressão linear utilizando o programa IBM SPSS Statics 25, e então calculado os índices de seletividade (CC₅₀/LC₅₀ ou IC₅₀) e de sobrevivência das formas amastigotas (taxa de infecção % x amastigota por célula).

2.6 Efeito dos compostos sobre a fisiologia mitocondrial do *Trypanosoma cruzi*

– O efeito do tratamento com o composto mais promissor (**FT1**) no potencial de membrana e na produção de EROs na mitocôndria do parasito foi investigado utilizando os fluorocromos Rodamina 123 (Sigma - Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) e MitoSox (Invitrogen), respectivamente. Os parasitos foram tratados com **FT1** nas concentrações de ½ LC₅₀, LC₅₀ e 2 LC₅₀ por 24h. Tripomastigotas não tratados foram

utilizados como controle. Após a incubação com **FT1** os parasitos foram lavados em solução tamponada salina de fosfato (PBS – *phosphate buffer saline*) e incubados em PBS contendo 10 µg/mL de rodamina 123, por 20 minutos no escuro. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes com PBS e analisadas por citômetro de fluxo Accuri C6 (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA). Para determinar a produção de EROs na mitocôndria, as células foram lavadas com PBS, em seguida incubadas em uma solução de PBS contendo 5 µM do Mitosox, por 10 min no escuro. Após a incubação, os tripomastigotas foram lavados três vezes em PBS e analisados, conforme o citado acima. 20.000 eventos foram adquiridos para cada condição experimental.

2.7 Ensaio ultraestrutural – Para análise ultraestrutural, formas tripomastigotas de *T. cruzi* (controle e tratados com FT1 nas concentrações referentes a LC₅₀ e 2 LC₅₀) foram fixados por 2h a 25°C em solução contendo 2,5% glutaraldeído/4% paraformaldeído em 0,1 M tampão fosfato (PBS), pH 7,2. Em seguida, as células foram lavadas em PBS e pós-fixadas por 1h com 1% de tetróxido de ósmio/0,8% ferricianeto de potássio/5 mM CaCl₂ em 0,1 M de tampão cacodilato pH 7,2. Em seguida as células foram lavadas no mesmo tampão, aderidas com poli-L-lisina em lamínulas, desidratadas gradativamente em solução de etanol e submetidas ao ponto crítico no aparelho HCP-2 Critical Point Dryer (Hitachi, Tokyo, Japan) e metalizadas com uma camada de ouro de aproximadamente 20 nm. As imagens foram feitas com o microscópio eletrônico de varredura JEOL T-200.

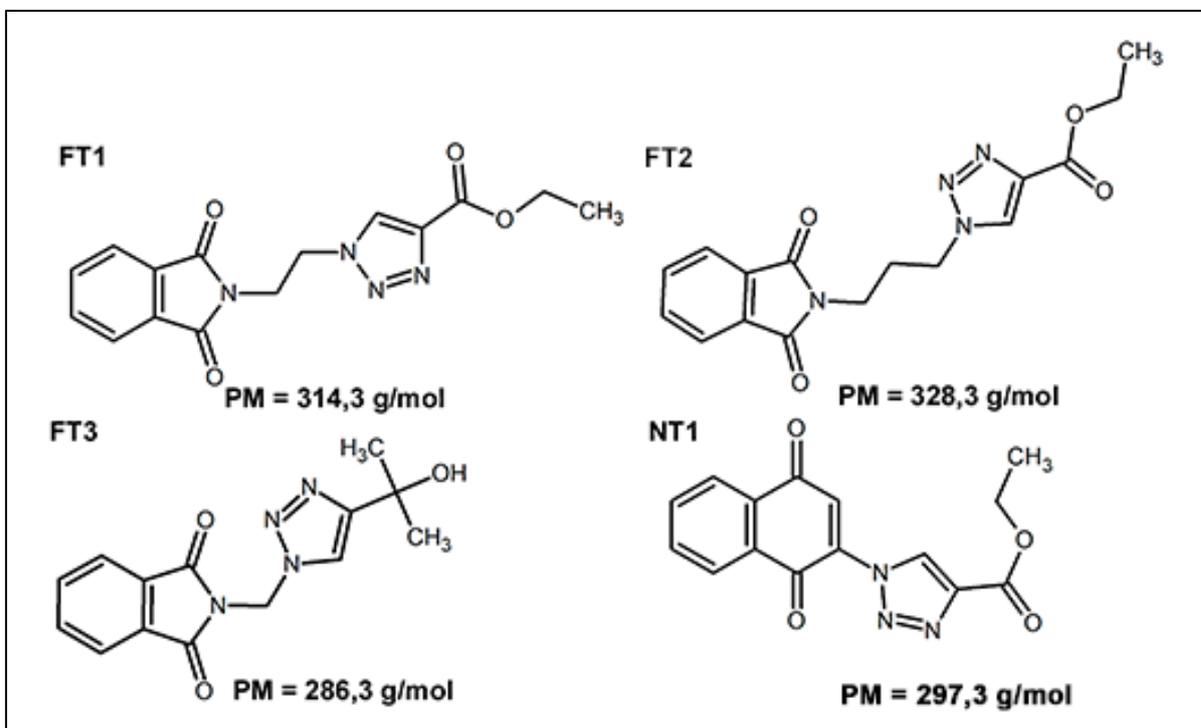
2.8 Docking molecular – As estruturas cristalográficas das proteínas Cruzipaína, Dihidrofolato Redutase - Timidilato Sintase, Tripanotiona Redutase e P450 Lanosterol 14α-desmetilase utilizadas nas análises foram obtidas através do Protein Data Bank. As estruturas dos ligantes foram preparadas no software ChemSketch®. O docking foi realizado utilizando o programa iGEMDOCK 2.1 Para esta análise o composto **FT1** foi ancorado nos locais catalíticos de referência para cada uma das proteínas. O Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA) foi utilizado para estabelecer as conformações de ligantes e macromoléculas. Após o ajuste dos ligantes e proteínas-alvo preparados e o local de ligação estabelecido, o docking foi realizado ajustando os seguintes parâmetros: 100 poses formadas; populações de 300 indivíduos e 60 gerações em duplicata.

2.9 Análises estatísticas – As análises estatísticas foram realizadas usando o ANOVA e o teste de Bonferroni. Os dados foram analisados no Graphpad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho foram sintetizados novos derivados a partir da hibridização dos grupos farmacofóricos ftalimida-triazol e naftoquinona-triazol, através da *click chemistry*. Esta metodologia foi escolhida para a síntese de híbridos derivados do triazol devido ao seu baixo custo, regiosseletividade, alto rendimento e rapidez. Os produtos derivados desta reação são atóxicos e podem ser purificados sem a necessidade de métodos cromatográficos. Neste sentido é possível unir diversas estruturas sem a necessidade de etapas de proteção [25]. Tendo em vista que a doença de Chagas é uma doença altamente negligenciada, cujo desenvolvimento de novas drogas não é viável economicamente, o baixo custo e o alto rendimento da *click chemistry* figuram como vantagens importantes no contexto do desenvolvimento de moléculas biologicamente ativas contra a doença de Chagas [26,27]. A estrutura química dos compostos sintetizados bem como os seus grupamentos funcionais estão demonstrados na **Figura 1**.

Figura 1 – Estrutura química dos compostos sintetizados. **FT1** – ethyl 1-[2-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)ethyl]-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate; **FT2** – ethyl 1-[3-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)propyl]-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate; **FT3** – 2-[[4-(2-hydroxypropan-2-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl]methyl]-1H-isoindole-1,3(2H)-dione; **NT1** – ethyl 1-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylate.



No desenvolvimento de fármacos, o potencial citotóxico dos candidatos deve ser levado em consideração [28]. Neste sentido, no presente estudo, em uma análise preliminar, investigamos o efeito de quatro derivados de triazol (**FT1**, **FT2**, **FT3** e **NT1**) sobre células Vero e sobre células do exsudato peritoneal (CEP). A escolha pelas células Vero e pelas CEPs se devem ao fato destes dois tipos celulares serem os mais utilizados para os ensaios de infecção com o *T. cruzi* [29]. Além do mais, células do exsudato peritoneal possuem atividades imunomoduladoras e são modelos de infecção com *T. cruzi* e desta forma se aproximam mais das condições encontradas nos modelos *in vivo* [30,31].

Nossos resultados mostraram que os perfis de citotoxicidade para os dois tipos celulares frente aos híbridos de 1,2,3-triazol foi similar (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Efeito biológico dos derivados de triazol sobre células de mamífero e *Trypanosoma cruzi*.

Composto	μM						
	CC ₅₀		LC ₅₀	IC ₅₀	ISe		
	Vero	CEP	Tripo	Ama	Vero/Tripo	CEP/Tripo	CEP/Ama
FT1	889,6 ± 70	1226,6 ± 22,8	178,1 ± 25	189,2 ± 22	5	6,9	6,7
FT2	1176,3 ± 239,5	1576,4 ± 141,7	924,7 ± 398,7	708 ± 36,4	1,3	1,7	2,2
FT3	>1397,2	>1397,2	>698,6	712 ± 149	n.d	n.d	>2
NT1	96,1 ± 33,3	124,8 ± 41,3	Nd	31,1 ± 5,3	n.d	n.d	4

CC₅₀ – concentração inibitória para 50% das células; LC₅₀ – concentração letal para 50% dos parasitos; IC₅₀ – metade da concentração inibitória máxima; ISe – Índice de seletividade; n.d – não determinado por regressão linear. Resultados de CC₅₀ e LC₅₀ foram expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes em triplicata. A IC₅₀ foi expressa como média ± desvio padrão de dois experimentos independentes em triplicata.

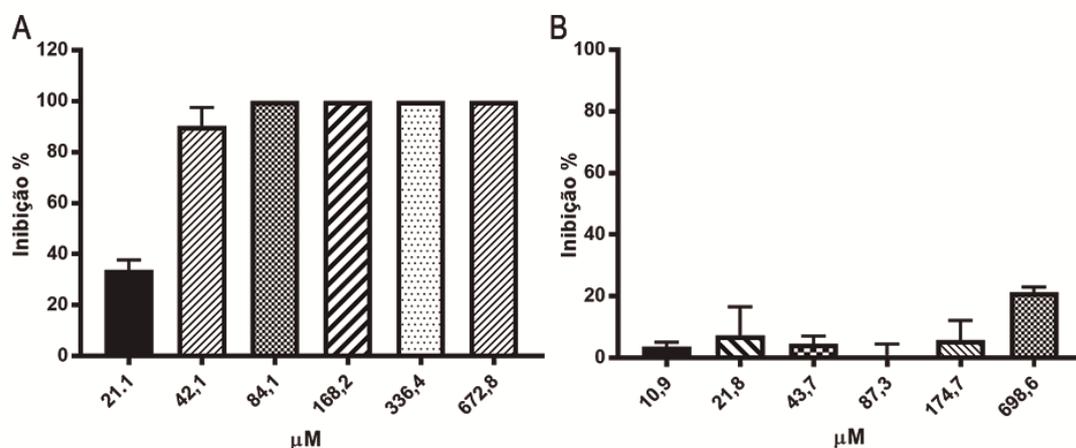
O composto **FT3** foi o menos tóxico para às células Vero com valor de CC₅₀ >1397,2 μM , seguido pelos compostos **FT2** e **FT1**, os quais apresentaram valores de 1176,3 e 889,6 μM para células Vero e 1576,4 e 1226,6 μM para as CEPs, respectivamente. Já o composto **NT1** foi considerado o mais tóxico para ambos tipos celulares, sendo os valores de CC₅₀ para célula Vero e macrófagos de 96,1 e 124,8 μM , respectivamente. Com exceção do **NT1** os compostos testados apresentaram baixa toxicidade, característica que tem sido reportada em vários trabalhos com moléculas híbridas contendo o grupamento triazol ou ftalimida [32,33]. Estudo recente realizado por Assis et al. [34] demonstrou que nenhum dos oitos compostos avaliados de uma série de derivados de ftalimidazóis com atividade anti-inflamatória, apresentou letalidade contra o modelo de toxicidade de *Artemia salina* para concentrações inferiores a 1000 ppm.

A análise detalhada da relação estrutura e atividade dos nossos compostos demonstrou que os compostos (**FT1-FT3**), os quais apresentam grupos ftalimidazóis e 1,2,3-triazol ligados por cadeias alifáticas de tamanho variável, apresentaram atividade citotóxica semelhante contra células Vero e CEPs. A introdução de uma função álcool ao núcleo triazólico em **FT3**, bem como o tamanho da cadeia alifática

diminuiu a citotoxicidade deste composto contra ambas as células em comparação ao **FT1**. A maior citotoxicidade apresentada pelo composto **NT1** pode ser atribuída a substituição do grupamento ftalimida pelo grupamento naftoquinona ligado diretamente ao anel triazólico. As naftoquinonas são compostos presentes em diferentes famílias de plantas, participando de uma série de eventos oxidativos [35]. As suas propriedades estruturais e atividades biológicas, fazem destas moléculas estruturas versáteis na construção de moléculas híbridas como o **NT1** [36]. Entretanto, tem sido reportado na literatura que o grupamento naftoquinona apresentou toxicidade para células de hepatócito, corroborando com nossos achados [35].

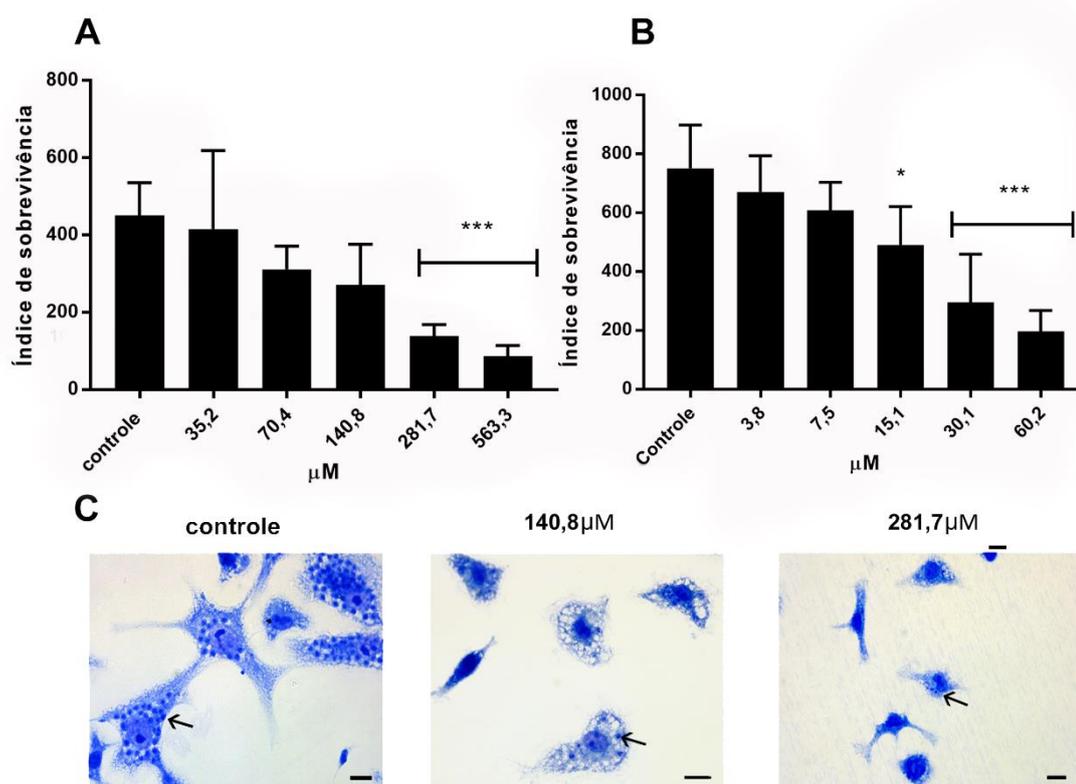
O potencial antiparasitário dos derivados de triazol foi avaliado sobre a forma tripomastigota de *T. cruzi* (**Tabela 1**) a qual representa a principal forma infectiva no hospedeiro vertebrado [37,38]. Devido à toxicidade apresentada para o composto **NT1** contra formas tripomastigotas, com 100% de lise para concentrações maiores que 42 μM (**Figura 2A**), pela análise de regressão não conseguimos determinar a LC_{50} para estas formas, bem como o seu índice de seletividade. O composto **FT3** não conseguiu atingir o valor da LC_{50} em nenhuma das concentrações e, portanto, este valor foi estimado como sendo maior do que 698,6 μM (**Tabela 1**; **Figura 2B**). Nesta concentração, a porcentagem de inibição não ultrapassou 25%. O composto **FT1** foi capaz de causar a lise de 100% dos tripomastigotas na concentração de 636,4 μM , apresentando um valor de LC_{50} de aproximadamente 178 μM , sendo 5 e 7 vezes mais tóxico para o parasito do que para células Vero e CEP, respectivamente, enquanto que o BNZ mostrou-se 2 vezes mais tóxicos para os tripomastigotas em comparação às CEPs [31]. Por outro lado, o **FT2** causou a morte de pouco mais de 20% dos tripomastigotas na maior concentração testada (609,2 μM). A toxicidade desse composto para o *T. cruzi* foi comparável com a da célula de mamífero, refletindo em baixos índices de seletividade de 1,3 e 1,7 em comparação com as células Vero e CEP (**Tabela 1**).

Figura 2 - Efeito dos compostos **NT1** (A) e **FT3** (B) sobre a inibição das formas tripomastigotas (%) em relação ao controle não tratado (0% de inibição).



O efeito dos compostos dos derivados de 1,2,3-triazol também foram analisados sobre a forma intracelular amastigota em CEPs infectadas com *T. cruzi*. Os compostos **NT1** e **FT1** reduziram significativamente a sobrevivência das formas amastigotas nos CEPs (**Figura 3A** e **3B**) de maneira dose-dependente. Esta redução pode ser claramente observada nas culturas tratadas com **FT1** e coradas com panótico (**Figura 3C**). Células controles, apresentam um grande número de células infectadas, bem como de amastigotas intracelulares (**Figura 3C**). Em algumas células o número de amastigotas é superior a 20. A incubação com concentrações crescentes de **FT1**, levaram a uma redução significativa do número de células infectadas como também de amastigotas intracelulares. Nossos dados demonstraram que para esta forma os compostos **FT1** e **NT1** foram os mais seletivos com ISe = 6,7 e 4, respectivamente, com o **FT2** e **FT3** superando o índice de seletividade relatado na literatura para o BNZ (ISe = 1,2) [31]. A atividade antiparasitária de **FT2** e **FT3** contra as formas amastigotas, apesar de inferior aos outros dois compostos, apresentou ISe superior ao da droga de referência [31].

Figura 3 – Efeito dos compostos **FT1** (A) e **NT1** (B) sobre a sobrevivência dos amastigotas intracelulares em macrófagos. As colunas abaixo representam a média de sobrevivências das formas amastigotas. Valores estatisticamente significantes * ($p < 0,05$) *** ($p \leq 0,001$) por One-way ANOVA test seguido pelo Bonferroni post test. (C) Aspecto das culturas controles e tratadas com **FT1** coradas com panótico evidenciando o efeito dose-dependente na inibição do número de amastigotas e de células infectadas com *Trypanosoma cruzi*. Barra (10 μ m).



Ensaio com células tumorais revelam que derivados naftoquinona atuam produzindo espécies reativas de oxigênio (EROS) as quais levam a morte celular por estresse oxidativo. Por outro lado, células normais são mais resistentes a ação destas moléculas, por possuírem mecanismos capazes de minimizar o efeito causado pelas EROS [35]. Ao contrário das células de mamífero, o *T. cruzi* possui capacidade limitada em metabolizar ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e outras espécies reativas de oxigênio, devido à ausência da enzima catalase e glutathione peroxidase as quais são responsáveis pela metabolização do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) [39,40]. Esta maior suscetibilidade do parasita às EROs e outras espécies reativas pode explicar em parte

a maior toxicidade de **NT1** sobre as formas tripomastigotas, observadas em nosso estudo. Relatos na literatura já vem demonstrando o efeito do grupo triazol-naftoquinona como indutores da morte do *T. cruzi*. Diogo et al. [41], investigaram a ação de uma série de 26 compostos derivados de naftoquinona contendo um núcleo triazol frente ao *T. cruzi*. Segundo estes mesmos autores dois fatores contribuíram para o efeito deletério dos derivados naftoquinona-triazol 1) a união de grupos orto- e para-quinoidais aos derivados podem gerar altas concentrações de espécies reativas de oxigênio, e 2) quinonas mais eletrofílicas, ou seja, com potencial de redução relativos maiores, apresentam uma maior atividade tripanocida [41].

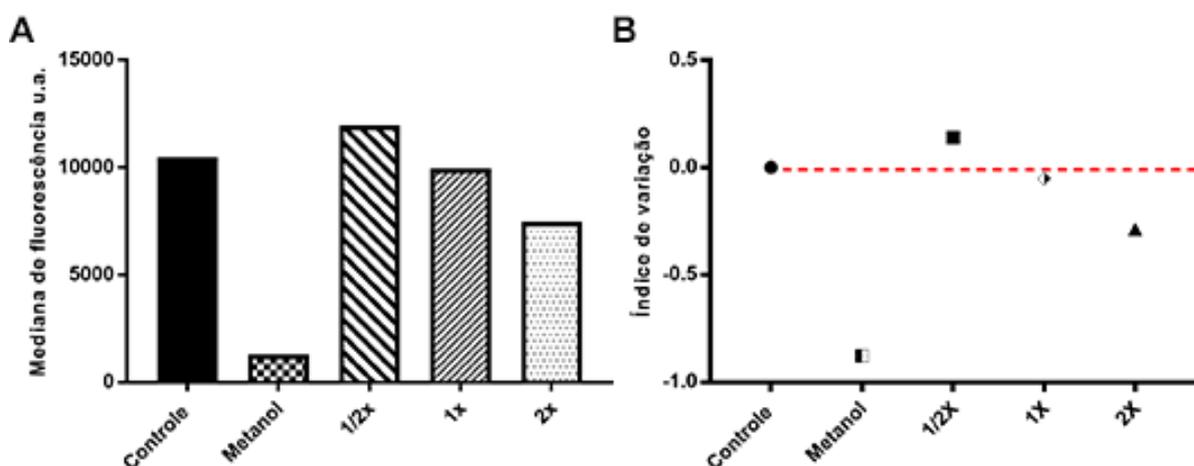
O maior efeito do **FT1** comparado ao **FT2** provavelmente se deve à ausência de um átomo de carbono presente no grupo espaçador (cadeia alifática). Conhecidamente as interações hidrofóbicas são fundamentais na dobragem e manutenção da estrutura das proteínas assim como na ligação a ligantes, tais como drogas e outras moléculas [24]. A interação do ligante com o alvo proteico em parte é influenciada pelas interações lipofílicas e a natureza química da proteína [42]. A literatura já relata que a ramificação de cadeias em compostos podem ser determinantes para que a molécula se ligue mais ou menos bem a um alvo molecular, com funções específicas [24]. Portanto a modificação na cadeia alifática da **FT1**, pode ter sido determinante para a ligação do composto com o sítio ativo a um alvo específico no protozoário, induzindo a sua morte. São muitos os relatos que comprovam a ação dos híbridos contendo triazol como agentes químicos eficientes contra protozoários e outros microrganismos [43]. Faria et al. [44] investigaram análogos do 1,2,3-triazol e demonstraram sua capacidade em promover a morte do *T. cruzi* em concentrações não tóxicas para células de mamífero. Em um estudo de otimização molecular utilizando os derivados 5-amino-1,2,3-triazol-4-carboxamidas contra *T. cruzi*, foi constatado que a substituição do anel triazólico por um imidazol reduziu significativamente a atividade dos derivados, demonstrando a importância do grupo triazólico para atividade biológica [45]. Andrade e colaboradores [46], investigando o efeito de derivados do BNZ, demonstraram que a inserção do grupamento 1,4-triazol com *p*-nitrophenil no lugar do núcleo imidazol do BNZ, aumentou o efeito tóxico para os tripomastigotas. Por outro lado, estas mesmas modificações reduziram os efeitos tóxicos para células do baço de camundongos [46].

Uma vez que o composto **FT1** foi o mais seletivo contra as formas tripomastigotas e amastigotas, este foi escolhido para investigar o seu mecanismo de ação.

Os tripanosomatídeos possuem características que tornam esses organismos singulares. Uma destas, é a presença de uma única mitocôndria, em oposição às numerosas mitocôndrias em células de eucariotos superiores [47]. Portanto, os aspectos fisiológicos como a síntese de ATP, oxidação de nutrientes, a homeostasia regulada por cálcio e controle da apoptose, estão intimamente ligados ao bom funcionamento da mitocôndria [48]. Desta forma, substâncias que agem sobre esta única organela têm se mostrado uma abordagem promissora na busca por novos quimioterápicos para doença de Chagas. Utilizando o marcador fluorescente Rodamina 123, avaliamos o efeito do composto **FT1** sobre o potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (**Figura 4A**). A Rodamina 123 é um fluorocromo catiônico atraído pelo potencial de mitocôndrias metabolicamente ativas, sem demonstrar citotoxicidade [49]. Como era de se esperar, o controle sem tratamento apresentou intensa fluorescência. Curiosamente no tratamento com $1/2 \times LC_{50}$ houve um ligeiro aumento na polarização, enquanto os tratados com LC_{50} e $2x LC_{50}$ tiveram a fluorescência reduzida em 6% e 29% respectivamente. Já é bem conhecido na literatura, que a despolarização da membrana da mitocôndria está ligada a mudanças nos canais de cálcio e a geração excessiva de EROs, eventos que podem levar a morte celular por apoptose ou necrose [50]. A redução na intensidade de fluorescência nas maiores concentrações do composto **FT1** sugere aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, inibição da cadeia transportadora de elétrons ou redução/oxidação no transporte do substrato mitocondrial, eventos que podem diminuir a eficiência na síntese de ATP resultando na morte do parasito [51,52]. Estudo prévio por Faria et al. [44] demonstraram o efeito deletério de compostos derivados de triazol sobre formas epimastigotas do *T. cruzi*. Macedo-Silva et al. [53] investigando o efeito dos azóis Itraconazol e Posoconazol sobre *Leishmania amazonensis* também demonstraram que estes compostos foram capazes de causar decréscimo significativo no $\Delta\Psi_m$. Estas alterações vieram acompanhadas de mudanças drásticas na ultraestrutura desta organela tais como inchaço, aparecimento de figuras mielínicas e alterações no cinetoplasto, região especializada da mitocôndria de tripanosomatídeos, onde se concentra o DNA mitocondrial. Estas alterações foram similares às encontradas em

parasitas tratados com inibidores de ergosterol. A diminuição do potencial de membrana mitocondrial, também pode ser observado, pelos valores negativos do índice de variação na maior concentração testada (**Figura 4B**). Em células eucariotas superiores, os fenômenos de hiperpolarização seguida de depleção de ATP, tem sido relacionado um evento inicial, reversível e transitório na ativação e apoptose de células T [54]. O aumento inicial no potencial de membrana pode ser devido a uma resposta imediata ao estresse oxidativo em baixas concentrações de **FT1**, na tentativa de reverter os efeitos deletérios deste composto sobre a fisiologia mitocondrial. Tanto a hiperpolarização quanto a despolarização do potencial de membrana mitocondrial podem levar a geração de EROs nesta organela e conseqüentemente à morte do parasita.

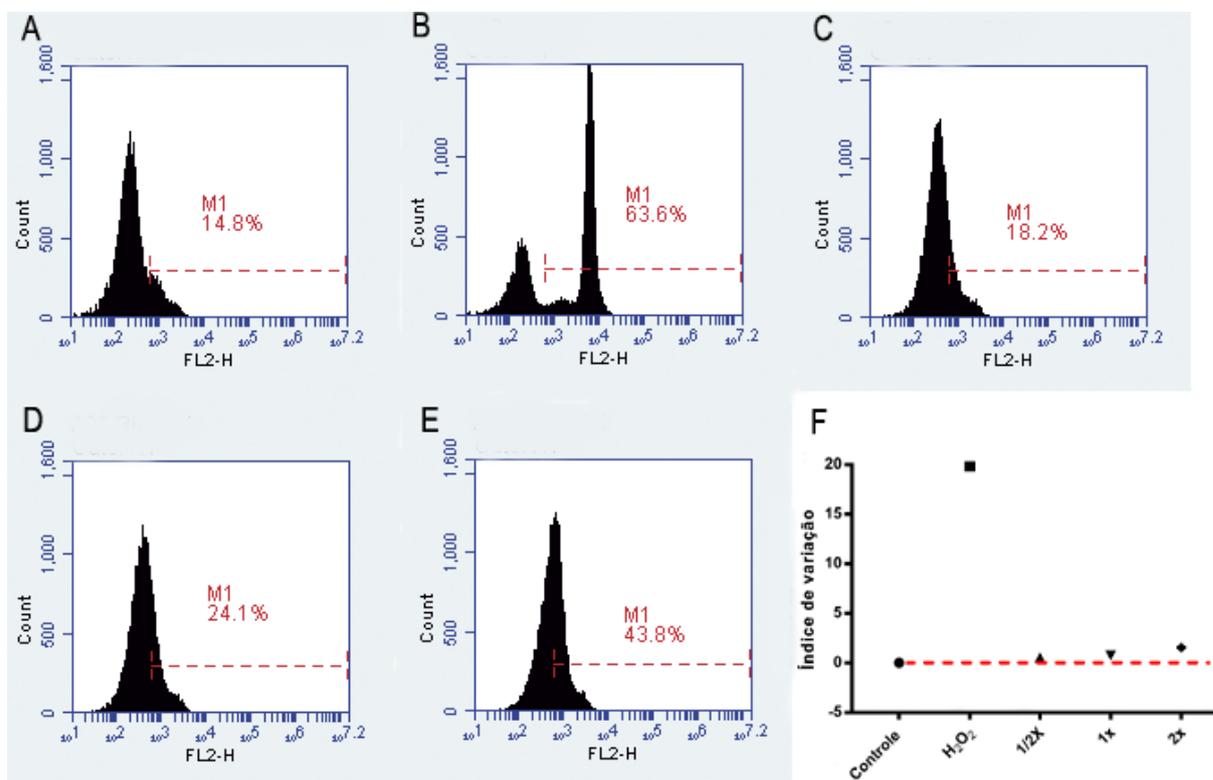
Figura 4 – Gráficos representativos do efeito do composto **FT1** sobre o potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) mitocondrial das formas tripomastigotas. A) representação gráfica da mediana de fluorescência para Rodamina 123. (B) representação gráfica do índice de variação.



Para investigarmos se os efeitos deletérios do **FT1** eram devido a uma maior produção destas espécies reativas na mitocôndria do parasita, células controles e tratadas foram incubadas com MitoSox (**Figura 5**). Este fluorocromo possui grupos lipofílicos, carregados positivamente, sensíveis a ânions superóxido que se concentram na matriz mitocondrial. Fisiologicamente a mitocôndria produz espécies reativas de oxigênio em baixos níveis, em decorrência da produção de ATP através da cadeia transportadora de elétrons [55]. A avaliação das células controle por

citometria de fluxo, mostrou que 14% das células, apresentavam marcação positiva para este marcador. Por outro lado, o tratamento com o composto levou a um aumento gradativo na porcentagem de células positivas e na intensidade de fluorescência para este marcador, indicando que o composto **FT1** leva a um aumento na produção de EROs, comprometendo a viabilidade celular. O aumento gradativo do índice de variação da intensidade de fluorescência observado nas células submetidas ao tratamento demonstrou efeito dose dependente na produção de EROs na mitocôndria. Os valores do índice de variação obtidos para os tratamentos com $\frac{1}{2}x$, 1x e 2x LC_{50} foram +0,5; +0,8 e +1,5, respectivamente. Estudos revelam que o aumento da produção de EROs na mitocôndria, pode ser induzido através de alterações que diminuem a eficiência da produção de ATP por estas organelas. Com isso, há o acúmulo desses radicais no interior da organela [56]. O excesso de EROs pode causar danos ao DNA [57,58], lipídios [59] e proteínas [60] e finalmente a morte da célula [56]. Portanto, nossos achados sugerem a ação da **FT1** como indutor da despolarização da membrana mitocondrial do *T. cruzi* e geração de EROs, contribuindo para o colapso da célula. Estudos recentes, revelam que mecanismos semelhantes foram observados em *L. amozenensis* tratadas com (1-decil-3-metil-4-((oxiran-2-ilmethoxi)metil)-1H-1,2,3-triazol-3-ium iodeto), sendo a atividade antiparasitária relacionada com disfunção da mitocôndria, causada pelo aumento total e mitocondrial de EROs e despolarização da membrana mitocondrial do parasito [61].

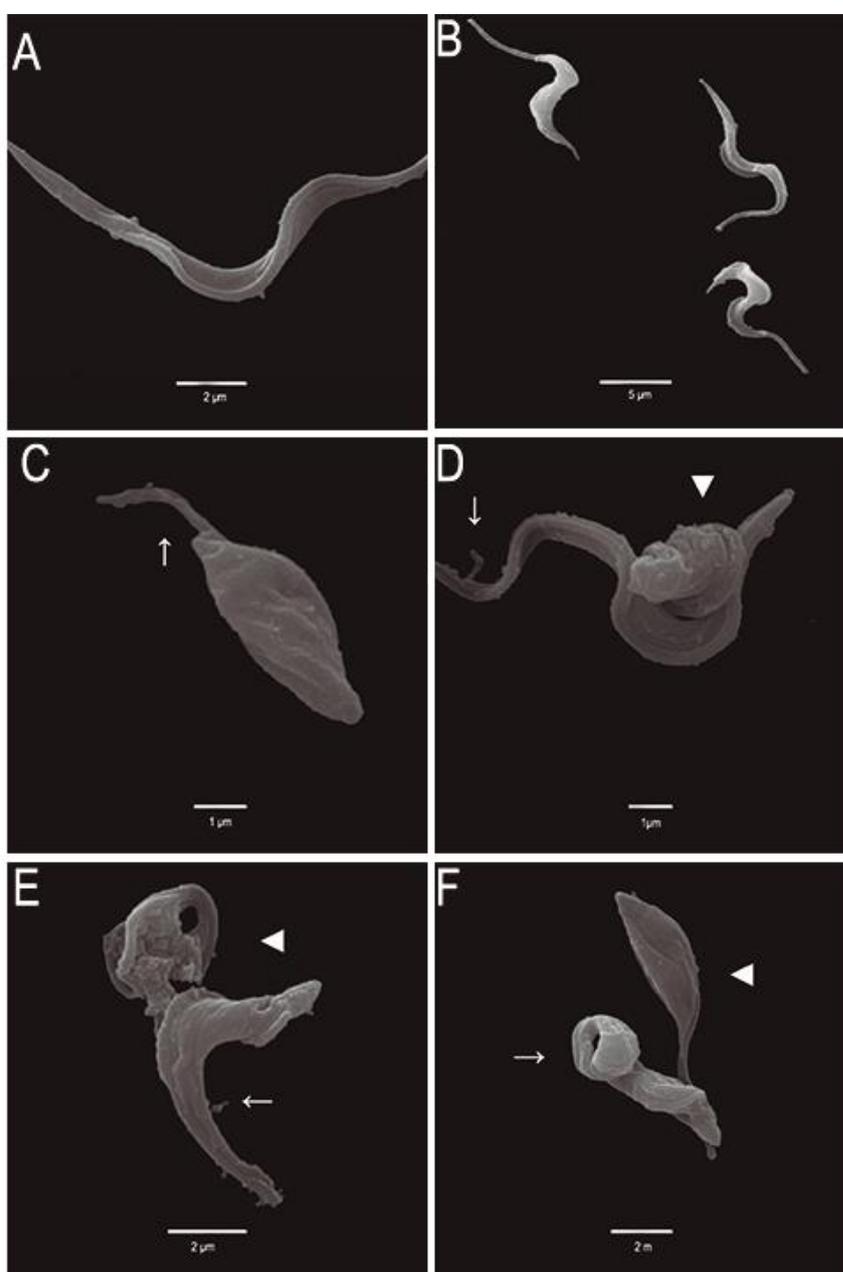
Figura 5 – Histograma representativo da análise por citometria de fluxo para a determinação da produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio em tripomastigotas tratados com **FT1**. (A) controle negativo; (B) controle positivo (tratado com H_2O_2), (C-E) células tratadas com $\frac{1}{2}$ LC_{50} , LC_{50} e $2x$ LC_{50} , respectivamente. (F) gráfico representativo do índice de variação em células tratadas com **FT1** em relação ao controle.



O estudo ultraestrutural através do microscópio eletrônico de varredura, é uma ferramenta bastante utilizada para a investigação do efeito de drogas em microrganismos, fornecendo informações preciosas para o entendimento dos mecanismos de ação de determinado composto [62]. Nesse sentido, avaliamos o efeito do **FT1** em tripomastigotas sobre a morfologia do parasita e integridade da membrana plasmática através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (**Figura 6**). Quando comparadas com as células sem tratamento (**Figura 6A-B**), as células tratadas (**Figura 6C-F**) exibiram várias alterações de membrana de maneira dose-dependente. Estas alterações têm sido relacionadas a um comprometimento de vias metabólicas relevantes para o parasita, como a síntese de ergosterol e poliaminas [63] (SUETH-SANTIAGO et al., 2016). Uma das principais alterações observadas em células tratadas com $1x$ e $2x$ a LC_{50} , foi o encurtamento e torção do corpo celular. O tratamento com **FT1** nas diferentes concentrações também revelou encurtamento do

flagelo do parasito. Segundo Vannier-Santos e De Castro [62], este fenômeno sugere a perda da permeabilidade da membrana plasmática bem como desorganização do citoesqueleto. Além do mais, houve visível aumento na produção de vesículas extracelulares nos parasitas tratados. Souza-Neta et al. [64] relataram alterações semelhantes em *T. cruzi* tratados com ácido arjunólico. Segundo estes autores, o ácido arjunólico interfere na função dos microtúbulos, levando ao encurtamento do flagelo. Corroborando com nossos dados, derivados contendo em sua estrutura química o anel ftalimídico têm demonstrado efeito deletério para o *T. cruzi*, como redução do corpo celular, perda da integridade da membrana celular, vacuolização do citoplasma e aumento da mitocôndria [32]. Fármacos triazólicos como fluconazol e posaconazol, utilizados como antifúngicos, também exibem atividade contra tripanosomatídeos, estas drogas são capazes de inibir a 14 α -desmetilase (CYP51), bloqueando a síntese de ergosterol e consequentemente causando danos irreversíveis a membrana celular [65].

Figura 6 – Análise ultraestrutural das formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*. (A-B) controle dos tripomastigotas mostrando a forma fusiforme e o comprimento dos flagelos normais. (C-D) Tripomastigotas tratados com LC₅₀ de FT1. (C) Detalhe do encurtamento do flagelo (seta), e aumento no volume celular; (D) Detalhe de uma forma tripomastigota tratada com FT1. Note o aparecimento de projeções da membrana do flagelo (seta) e a torção do corpo celular (cabeça de seta). (E-F) Tripomastigotas tratados 2x LC₅₀. (E) Detalhe de formas tripomastigotas drasticamente afetadas pela droga com enrugamento da membrana e encurtamento do corpo celular (cabeça de seta). Note a presença de pequenas vesículas brotando da superfície celular (seta) (F) Detalhe mostrando intensa torção do corpo celular (seta) e aumento do volume celular (cabeça de seta).



Alterações ultraestruturais semelhantes às observadas neste estudo, tem sido relatada para outros compostos triazólicos, os quais mostraram inibir enzimas de *T. cruzi* [65,66]. Derivados triazólicos também tem sido implicados na morte celular dos parasitos através de sua ação direcionada para mitocôndria do parasita, como observado em nosso estudo [52]. Desta forma, partimos para investigar se o composto derivado de ftalimida-triazol, o **FT1** poderia ser um potencial inibidor das enzimas cruzipaina (CZ), dihidrofolato redutase - timidilato sintase (DHFR-TS), citocromo P450 lanosterol 14 α -desmetilase (CYP51) e tripanotiona redutase (TR), as quais participam do metabolismo do *T. cruzi*, constituindo alvos seletivos, uma vez que não possuem análogos em células de mamífero [67,68,69].

A abordagem de docking utilizada neste estudo teve como objetivo identificar a ligação ao sítio ativo capaz de modular a atividade enzimática. A pontuação preditiva funcional do iGemDOCK consiste na soma total das ligações do tipo Wan der Walls, ligações de hidrogênio e energia eletrostática (**Tabela 2**). Com base nos dados de interação do teste de docking pode-se observar que o **FT1** interage com o sítio ativo da DHFR-TS com energia total de -105,34 kcal/mol, cujas contribuições, em maior parte, vêm das interações de Van der Waals, com energia de ligação de -77,71 kcal/mol em comparação com as ligações de hidrogênio, que resultam em energia total de ligação de -27,63 kcal/mol. Em geral, foi observado que o composto **FT1** apresenta vários perfis de interações químicas em suas respectivas ligações com o sítio ativo da DHFR-TS [70].

A CZ é uma proteína expressa em todo o ciclo de vida do *T. cruzi* desempenhando papel chave nos processos de diferenciação e sobrevivência do parasito [71]. Nossos resultados do docking para esta enzima mostrou que os complexos proteína-droga formados se dão principalmente por meio de interações hidrofóbicas, com energia de ligação total de -93.54 kcal/mol. As ligações de hidrogênio apresentam valores de ligação de -50.96 kcal/mol enquanto as interações do tipo Van der Walls apresentaram valores de ligação de -42.58 kcal/mol. O resíduo HIS162 que compõe a tríade catalítica da enzima apresentou valores de -12.5 kcal/mol para a **FT1**. É válido salientar a importância das ligações covalentes formadas entre o anel ftalimídico da **FT1** e os resíduos dos aminoácidos LEU67 e GLU208, cuja

presença na periferia da tríade catalítica é responsável por diferenciar a CZ de outras cisteíno proteases no parasita [72].

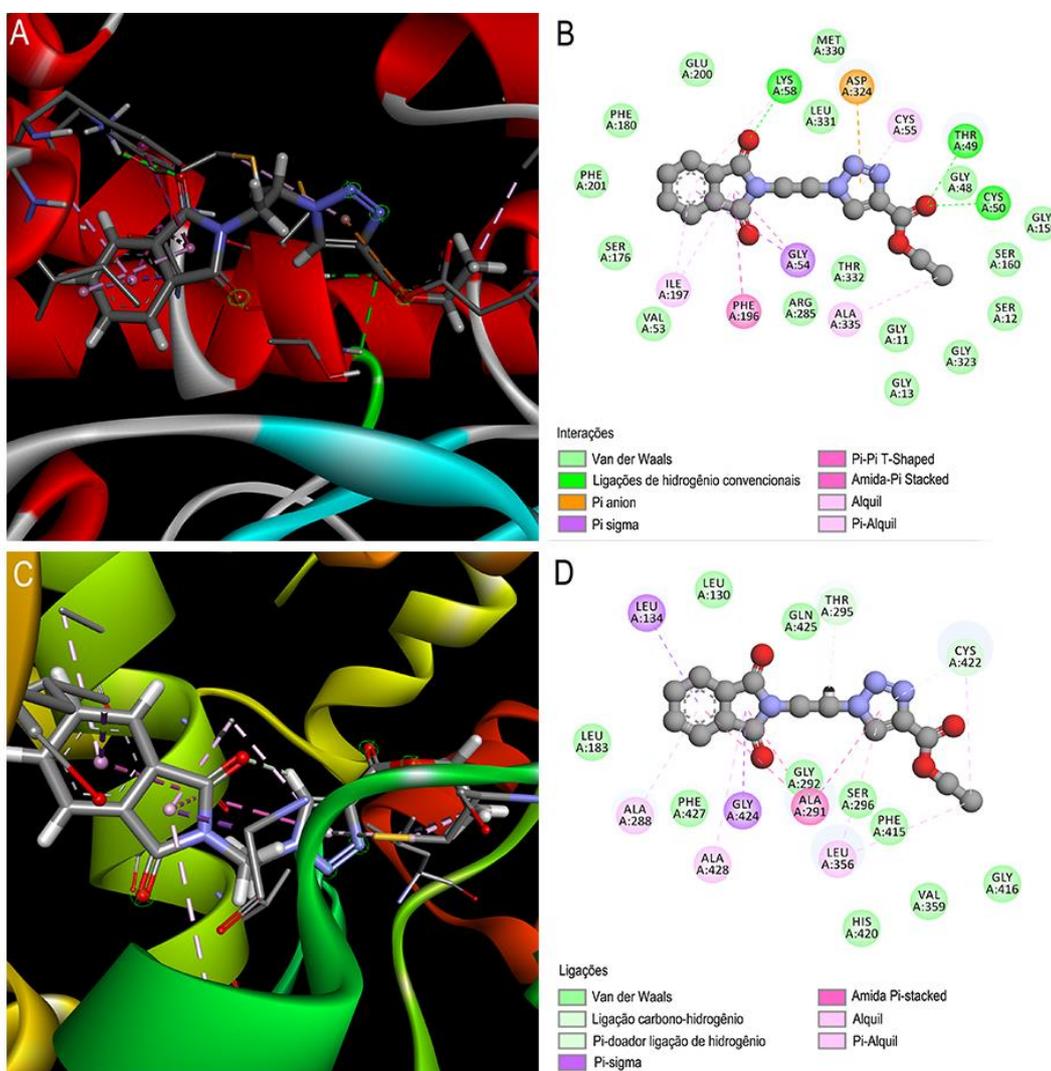
A utilização de compostos azólicos para inibição da enzima CYP51 é conhecida e amplamente utilizada em patógenos eucariotos [73,74]. As alterações ultraestruturais observadas nas células após o tratamento com o **FT1** nos fizeram investigar o potencial de interação entre o **FT1** e a CYP51, um dos principais alvos relacionados a biossíntese de ergosterol e essencial para síntese de lipídios de membrana [75]. Na **Figura 7**, podemos observar o composto **FT1** em interação com o grupo HEME da citocromo P450 Lanosterol 14 α -desmetilase. Com energia total de ligação de -109.12 Kcal/mol. Dentre os resíduos de aminoácidos do sítio ativo (**Figura 7**) com maiores chances de interação com a molécula **FT1**, ALA291 apresentou energia de ligação de -18.7 kcal/mol, interagindo com os dois grupos farmacofóricos do composto, através das ligações covalentes existentes entre as amidas terminais. Tais interações podem inibir a demetilação interrompendo a interação entre o grupo HEME e o TPF490, necessária para a síntese de ergosterol. A existência do grupo triazol em moléculas orgânicas tem sido associada ao efeito leishmanicida, através da inibição da biossíntese de esteróis, em espécies como *Leishmania donovani*, *L. braziliensis*, *L. mexicana* [73,76] e *T. brucei* [75].

Tendo em vista que o composto **FT1** diminuiu o potencial de membrana mitocondrial, nós partimos para investigar o potencial de interação entre o **FT1** e a enzima TR, um dos principais alvos relacionados à redução da tripanotiona dissulfeto em tripanotiona. Esta etapa é essencial para manutenção de um ambiente redutor nesses parasitos e de extrema importância para sua sobrevivência [77]. O **FT1** interagiu com o sítio ativo da TR com energia total de -122,72 kcal/mol, cujas contribuições em maior parte, vêm das interações de pontes de hidrogênio e ligações covalentes, com energia de ligação de - 96.15 kcal/mol em comparação com as interações de Wan der Walls, que resultam em -27,63 kcal/mol da energia total. O grupo 1,2,3-triazol do composto interage com resíduos do sítio γ -Glu9 da TR: CYS55, ASP324 e THR332, bem como estabelece ligações de hidrogênio e covalentes com o anel ftalimídico (LYS58, PHE196 e GLY54) (**Figura 7**). Estes sítios apresentam resíduos doadores e aceitadores de prótons, além dos resíduos catalíticos THR49 e CYS50 os quais podem se ligar, através de pontes de hidrogênio ao resíduo γ -Glu-II do substrato tripanotiona dissulfeto (T[S]2), [78,79].

Tabela 2 – Molecular docking de FT1 em alvos proteicos de *Trypanosoma cruzi*. DHFR-TS - Dihidrofolato redutase - timidilato sintase, CYP51 - P450 Lanosterol 14 α -desmetilase, TR - tripanotiona redutase; CZ - cruzipaína.

	kcal/mol		
	Energia total	Ligações de hidrogênio	Ligações de van der Waals
DHFR-TS	-105,34	-27,63	-77,71
CZ	-93,54	-50,96	-42,58
TR	-122,72	-96,15	-26,57
CYP51	-109,12	-56,94	-56,94

Figura 7 – Interação detalhada entre **FT1** e o sítio catalítico da tripanotona redutase e citocromo P450 Lanosterol 14 α -desmetilase. (A-B) Docking molecular, interações entre **FT1** e tripanotona redutase; (A) representação em 3D; (B) Representação em 2D. (C-D) Docking molecular, interações entre **FT1** e CYP51; (C) representação em 3D; (D) Representação em 2D.



4 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou a atividade tripanocida de novos derivados triazólicos sintetizados por *click chemistry*. Os ensaios de citotoxicidade em células de mamíferos e atividade tripanocida mostraram o **FT1** como o mais seletivo dentre os compostos avaliados. Esta molécula induziu a despolarização da membrana mitocondrial e a produção de EROs pela organela, além do mais, os ensaios ultraestruturais revelaram alterações de membrana, sugestivas de perda do conteúdo da membrana plasmática e alterações funcionais do citoesqueleto. Corroborando com

estes resultados, a análise do docking molecular demonstrou menor energia total de ligação para as enzimas CYP51 e TR, sugerindo maior probabilidade de o **FT1** ser um inibidor destas enzimas. Estas enzimas possuem papel chave na manutenção da integridade da membrana plasmática e do ambiente redox respectivamente. Portanto, nossos resultados demonstram os derivados triazólicos como potenciais agentes para a quimioterapia da doença de Chagas, podendo exibir múltiplos alvos.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A doença de Chagas ainda é um grande problema de saúde pública no mundo. Na busca por novos agentes quimioterápicos para seu tratamento, utilizamos neste trabalho o método de cicloadição 1,3-dipolar catalisado por cobre (*click chemistry*), para obter moléculas híbridas de 1,2,3-triazol (**FT1**, **FT2**, **FT3** e **NT1**). Os novos compostos foram sintetizados com 92,2%(**FT1**), 81,4%(**FT2**), 68,4%(**FT3**) e 72,4%(**NT1**) de rendimento, demonstrando bom aproveitamento dos reagentes de partida. O estudo demonstrou o potencial tripanocida do **FT1** sobre as formas tripomastigotas e amastigotas do *T. cruzi*, com baixa toxicidade para células de mamíferos e alta seletividade para o parasita. O efeito do composto no parasito foi marcado por alterações no potencial de membrana o que pode ter levado ao aumento da produção de EROs na mitocôndria, conforme observamos neste trabalho. Além disso, houve alterações da membrana plasmática, sugerindo a perda da permeabilidade dela. Os resultados do docking molecular corroboraram com os achados da avaliação da fisiologia da mitocôndria e das alterações topológicas no *T. cruzi*, com o composto **FT1** demonstrando menor energia de ligação para as enzimas TR e CYP51, o que sugere estas enzimas como principais alvos proteicos do **FT1**. As enzimas TR e CYP51 são de grande importância para a manutenção do ambiente redox no parasito e na síntese de esteróis respectivamente, portanto, alterações nessas vias podem comprometer a viabilidade do *T. cruzi*.

Nossos resultados sugerem que a utilização de híbridos derivados de ftalimida-triazol é uma abordagem interessante para a prospecção de novos fármacos para o tratamento da doença de chagas, nesta perspectiva, são necessários mais estudos relacionados ao tema.

REFERÊNCIAS

- [1] PEREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. *Lancet*. 391 (2018) 82-94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4).
- [2] MONGE-MAILLO, B.; LOPEZ-VELEZ, R. Challenges in the management of Chagas disease in Latin-American migrants in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 23 (2017) 290-295. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.04.013>.
- [3] LEITE, D. I. et al. New 1,2,3-triazole-based analogues of benznidazole for use against *Trypanosoma cruzi* infection: In vitro and in vivo evaluations. *Chem Biol Drug Des*. 92 (2018) 1670-1682. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13333>.
- [4] PAPADOPOULOU, M. V. et al. Discovery of potent nitrotriazole-based antitrypanosomal agents: In vitro and in vivo evaluation. *Bioorg Med Chem*. 23 (2015) 6467-6476. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.08.014>.
- [5] LAL, K. et al. Oxazolone-1,2,3-Triazole Hybrids: Design, Synthesis and Antimicrobial Evaluation. *Curr Top Med Chem*. 18 (2018) 1506-1513. <https://doi.org/10.2174/1568026618666180913110456>.
- [6] LÓPEZ-ROJAS, P. et al. Synthesis and Antimicrobial Activity of 4-Substituted 1,2,3-Triazole-Coumarin Derivatives. *Molecules*. 23 (2018) 1-18. <https://doi.org/10.3390/molecules23010199>.
- [7] KIM, T. W. et al. Synthesis and biological evaluation of phenyl-1H-1,2,3-triazole derivatives as anti-inflammatory agents. *Bioorg Chem*. 59 (2015) 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2015.01.003>.

[8] SCHLOER, S. et al. The clinically licensed antifungal drug itraconazole inhibits influenza virus in vitro and in vivo. *Emerg Microbes Infect.* 8 (2019) 80-93.

<https://doi.org/10.1080/22221751.2018.1559709>.

[9] ANTYPENKO, L. et al. Synthesis and mode of action studies of novel {2-(3-R-1H-1,2,4-triazol-5-yl)phenyl}amines to combat pathogenic fungi. *Arch Pharm (Weinheim)*.

352 (2019) e190009. <https://doi.org/10.1002/ardp.201900092>.

[10] CAMPO, V. L. et al. Design, synthesis and the effect of 1,2,3-triazole sialylmimetic neoglycoconjugates on *Trypanosoma cruzi* and its cell surface trans-sialidase. *Bioorg Med Chem.* 20 (2012) 145-56. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.11.022>.

[11] FREITAS, L. B. O. A reação de “click” na síntese de 1,2,3-triazóis: Aspectos químicos e aplicações. *Quim Nova*, v. 34, n. 10, p. 1791-1804, 2011.

Med Chem. 22. (2015) 2225-35.

<https://doi.org/10.2174/0929867322666150521091652>.

[12] KHIDRE, R. E.; ABU-HASHEM, A. A.; EL-SHAZLY, M. Synthesis and antimicrobial activity of some 1- substituted amino-4,6-dimethyl-2-oxo-pyridine-3-carbonitrile derivatives. *Eur J Med Chem*, v. 46, n. 10, p. 5057-5064, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.08.018>.

[13] LIMA, L. M. et al. Synthesis and anti-inflammatory activity of phthalimide derivatives, designed as new thalidomide analogues. *Bioorg Med Chem*, v. 10, n. 9, p. 3067-3073, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0968-0896\(02\)00152-9](https://doi.org/10.1016/s0968-0896(02)00152-9).

[14] KATHURIA, V.; PATHAK, D. P. Synthesis and anticonvulsant activity of some N-substituted-phthalimide analogs. *The Pharmainnovation*. 1 (2012) 55-59.

[15] SHARMA, U. et al. Recent advances in the chemistry of phthalimide analogues and their therapeutic potential. *Mini Rev Med Chem*, v. 10, n. 8, p. 678-704, 2010. [https://doi.org/ 10.2174/138955710791572442](https://doi.org/10.2174/138955710791572442).

[16] GOMES, P. A. et al. Phthalimido-thiazoles as building blocks and their effects on the growth and morphology of *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Med Chem*. 111 (2016) 46-57. [https://doi.org/ 10.1016/j.ejmech.2016.01.010](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.01.010).

[17] CARDOSO, S. H. et al. Synthesis of newly functionalized 1,4-naphthoquinone derivatives and their effects on wound healing in alloxan-induced diabetic mice. *Chem Biol Interact*. 291 (2018) 55-64. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.06.007>.

[18] FUTURO, D. O. et al. The Antifungal Activity of Naphthoquinones: An Integrative Review. *An Acad Bras Cienc*. 90 (2018) 1187-1214. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170815>.

[19] NOVAIS, J. S. et al. Antibacterial naphthoquinone derivatives targeting resistant strain Gram-negative bacteria in biofilms. *Microb Pathog*. 118 (2018) 105-114. [https://doi.org/ 10.1016/j.micpath.2018.03.024](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.024).

[20] NAUJORKS, A. A. et al. Novel naphthoquinone derivatives and evaluation of their trypanocidal and leishmanicidal activities. *Org Biomol Chem*. 13 (2015) 428-437. [https://doi.org/ 10.1039/c4ob01869a](https://doi.org/10.1039/c4ob01869a).

[21] MENDONÇA, D. V. C. et al. Antileishmanial activity of a naphthoquinone derivate against promastigote and amastigote stages of *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and its mechanism of action against *L. amazonensis* species. Parasitol Res. 117 (2018) 391-403. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5713-6>.

[22] FOWLER, P. et al. A review of the genotoxic potential of 1,4-naphthoquinone. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 834 (2018) 6-17. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.07.004>.

[23] POKORSKI, J. K.; SMITH, L. E. "Click" Chemistry for Medicine and Biology. Mol Pharm. 15 (2018) 2891. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00743>.

[24] ASSIS, S. P. et al. Synthesis and anti-inflammatory activity of new alkyl-substituted phthalimide 1H-1,2,3-triazole derivatives. ScientWorldJournal. 2012 (2012) 1-7. <https://doi.org/10.1100/2012/925925>.

[25] HEIN, C. D.; LIU, X. M.; WANG, D. Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences. Pharm Res. 25 (2008) 2216-2230. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9616-1>.

[26] LAMIE, P. F. et al. Design, Synthesis and Evaluation of Novel Phthalimide Derivatives as in Vitro Anti-Microbial, Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Agents. Molecules. 20 (2015) 16620-16642. <https://doi.org/10.3390/molecules200916620>.

[27] TABACARU, A. Recent advances in click chemistry reactions mediated by transition. Inorg Chim Acta. 455 (2017) 329-349. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2016.07.029>.

[28] PERRYMAN, A. L. et al. Naive Bayesian Models for Vero Cell Cytotoxicity. *Pharm Res.* 35 (2018) 1-10. [https://doi.org/ 10.1007/s11095-018-2439-9](https://doi.org/10.1007/s11095-018-2439-9).

[29] LIN, Z.; WILL, Y. Evaluation of drugs with specific organ toxicities in organ-specific cell lines. *Toxicol Sci.* 126 (2012) 114-127.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr339>.

[30] FRANKO, J.; MCCALL, J. L.; BARNETT, J. B. Evaluating Macrophages in Immunotoxicity Testing. *Methods Mol Biol.* 1803 (2018) 255-296.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8549-4_17.

[31] SOUZA, L. I. O. et al. The chemical composition and trypanocidal activity of volatile oils from Brazilian Caatinga plants. *Biomed Pharmacother.* 96 (2017) 1055-1064. [https://doi.org/ 10.1016/j.biopha.2017.11.121](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.121).

[32] ALIANÇA, A. et al. In vitro evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazole derivatives. *Eur J Pharm Sci.* 105 (2017) 1-10.
<https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

[33] SINGH, S. et al. Synthesis and Bioactivity of Phthalimide Analogs as Potential Drugs to Treat Schistosomiasis, a Neglected Disease of Poverty. *Pharmaceuticals (Basel).* 13 (2020) 1-20. doi: <https://doi.org/10.3390/ph13020025>.

[34] ASSIS, S. P. O. et al. Design and Synthesis of Triazole-Phthalimide Hybrids with Anti-inflammatory Activity. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 67 (2019) 96-105.
<https://doi.org/10.1248/cpb.c18-00607>.

[35] COULIDIATI, T. H. et al. Distinct effects of novel naphthoquinone-based triazoles in human leukaemic cell lines. *J Pharm Pharmacol.* 67 (2015) 1682-1695. <https://doi.org/10.1111/jphp.12474>.

[36] DE CASTRO, S. L. et al. Experimental Chemotherapy for Chagas Disease: A Morphological, Biochemical, and Proteomic Overview of Potential *Trypanosoma cruzi* Targets of Amidines Derivatives and Naphthoquinones. *Mol Biol Int.* 2011(2011) 1-14. <https://doi.org/10.4061/2011/306928>.

[37] ROMANHA, A. J. et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 105 (2010) 233-238. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000200022>.

[38] DE SOUZA, T. B. et al. Synthesis, activity, and molecular modeling studies of 1,2,3-triazole derivatives from natural phenylpropanoids as new trypanocidal agents. *Chem Biol Drug Des.* 95 (2020) 124-129. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13628>.

[39] MACHADO-SILVA, A. et al. How *Trypanosoma cruzi* deals with oxidative stress: Antioxidant defence and DNA repair pathways. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 767 (2016) 8-22. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.12.003>.

[40] BELTRAN-HORTELANO, I.; PEREZ-SILANES, S.; GALIANO, S. Trypanothione Reductase and Superoxide Dismutase as Current Drug Targets for *Trypanosoma cruzi*: An Overview of Compounds with Activity against Chagas Disease. *Curr Med Chem.* 24 (2017) 1066-1138. <https://doi.org/10.1248/cpb.c18-00607>.

[41] DIOGO, E. B. et al. Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of naphthoquinone-containing triazoles: electrochemical studies on the effects of the

quinoidal moiety. *Bioorg Med Chem.* 21 (2013) 6337-6348.

<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.08.055>.

[42] SILVERMAN, R. B. 2004. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action. Receptors.* 2004. 3. 121-172. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-22222-7>.

[43] REIGADA, C. et al. Repurposing of terconazole as an anti *Trypanosoma cruzi* agent. *Heliyon.* 5 (2019) e01947. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01947>.

[44] FARIA, R. X. et al. Searching for new drugs for Chagas diseases: triazole analogs display high in vitro activity against *Trypanosoma cruzi* and low toxicity toward mammalian cells. *J Bioenerg Biomembr.* 50 (2018) 81-91. <https://doi.org/10.1007/s10863-018-9746-z>.

[45] BRAND, S. et al. Discovery and Optimization of 5-Amino-1,2,3-triazole-4-carboxamide Series against *Trypanosoma cruzi*. *J Med Chem.* 60 (2017) 7284-7299. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00463>.

[46] ANDRADE, P. et al. 1,2,3-Triazole-based analogue of benznidazole displays remarkable activity against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg Med Chem.* 23 (2015) 6815-6826. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.10.008>.

[47] CAVALCANTI, D. P.; DE SOUZA, W. The Kinetoplast of Trypanosomatids: From Early Studies of Electron Microscopy to Recent Advances in Atomic Force Microscopy. *Scanning.* 2018 (2018) 1-10. <https://doi.org/10.1155/2018/9603051>.

- [48] NOGUEIRA, N. P. et al. Heme modulates *Trypanosoma cruzi* bioenergetics inducing mitochondrial ROS production. *Free Radic Biol Med.* 108 (2017) 183-191. <https://doi.org/doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.027>.
- [49] RAHN, C. A.; BOMBICK, D. W.; DOOLITTLE, D. J. *Fund and Appl Toxic.* 16 (1991) 435-448.
- [50] GIORGIO, V. et al. Calcium and regulation of the mitochondrial permeability transition. *Cell Calcium.* 70 (2018) 56-63. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.05.004>.
- [51] MENNA-BARRETO, R. F. et al. The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. *Free Radic Biol Med.* 47 (2009) 644-653. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.06.004>.
- [52] NUNNARI, J.; SUOMALAINEN, A. Mitochondria: In Sickness and in Health. *Cell.* 148 (2012) 1145-1159. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.035>.
- [53] MACEDO-SILVA, S. T. In vitro activity of the antifungal azoles itraconazole and posaconazole against *Leishmania amazonensis*. 8 (2013) e83247. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083247>.
- [54] PERL, A. et al. Mitochondrial hyperpolarization: a checkpoint of T-cell life, death and autoimmunity. *Trends Immunol.* 25 (2004) 360-367. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.05.001>.
- [55] DELIERNEUX, C. et al. Mitochondrial Calcium Regulation of Redox Signaling in Cancer. *Cells.* 9 (2020) 1-24. <https://doi.org/10.3390/cells9020432>.

- [56] TOWARNICKI, S. G.; KOK, L. M.; BALLARD, J. W. O. Yin and Yang of mitochondrial ROS in *Drosophila*. *J Insect Physiol.* 122 (2020) 1-10 104022. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2020.104022>.
- [57] BIANCINI, G. B. et al. DNA damage in Fabry patients: An investigation of oxidative damage and repair. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 784-785 (2015) 31-36. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.04.012>.
- [58] SCOTT, T. L. et al. Repair of oxidative DNA damage and cancer: recent progress in DNA base excision repair. *Antioxid Redox Signal.* 20 (2014) 708-726. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5529>.
- [59] JAESCHKE, H.; RAMACHANDRAN, A. Oxidant Stress and Lipid Peroxidation in Acetaminophen Hepatotoxicity. *React Oxyg Species (Apex).* 5 (2018) 145-158.
- [60] FEDOROVA, M. et al. OP2-1 - Protein and lipid carbonylation in cellular model of nitrosative stress: mass spectrometry, biochemistry and microscopy study. *Free Radic Biol Med.* 75 (2014) S15. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.589>.
- [61] MEINEL, R. S. et al. Novel functionalized 1,2,3-triazole derivatives exhibit antileishmanial activity, increase in total and mitochondrial-ROS and depolarization of mitochondrial membrane potential of *Leishmania amazonensis*. *Chem Biol Interact.* 315 (2020) 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108850>.
- [62] VANNIER-SANTOS, M. A.; DE CASTRO, S. L. Electron microscopy in antiparasitic chemotherapy: a (close) view to a kill. *Curr Drug Targets.* 10 (2009) 246-260. <https://doi.org/10.2174/138945009787581168>.

[63] SUETH-SANTIAGO, V. et al. The Effectiveness of Natural Diarylheptanoids against *Trypanosoma cruzi*: Cytotoxicity, Ultrastructural Alterations and Molecular Modeling Studies. PLoS One. 11 (2016) e0162926.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162926>.

[64] SOUZA-NETA, L. C. et al. Modes of action of arjunolic acid and derivatives on *Trypanosoma cruzi* cells. Curr Top Med Chem. 14 (2014) 1022-1032. <https://doi.org/10.2174/1568026614666140324122800>.

[65] CHEN, C. K. et al. Structural Characterization of CYP51 from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* Bound to the Antifungal Drugs Posaconazole and Fluconazole. Plos Neglected Tropical Diseases. 4 (2010) e651.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000651>.

[66] VEIGA-SANTOS, P. Effects of amiodarone and posaconazole on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. Int J Antimicrob Agents. 40 (2012) 61-71.

<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.03.009>.

[67] BRANQUINHA, M. H. et al. Cruzipain: An Update on its Potential as Chemotherapy Target against the Human Pathogen *Trypanosoma cruzi*. Curr Med Chem. 22 (2018) 11. <https://doi.org/10.2174/0929867322666150521091652>.

[68] RABELO, V. W. et al. Targeting CYP51 for drug design by the contributions of molecular modeling. Fundam Clin Pharm. 31 (2017) 37-53.

<https://doi.org/10.1111/fcp.12230>.

[69] ANDERSON, K. S. Understanding the molecular mechanism of substrate channeling and domain communication in protozoal bifunctional TS-DHFR. Protein Eng Des Sel. 30 (2017) 253-261. <https://doi.org/10.1093/protein/gzx004>.

- [70] SCHORMANN, Norbert et al. Synthesis and characterization of potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* dihydrofolate reductase. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 18 (2010) 4056-4066. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.04.020>.
- [71] HERRERA-MAYORGA et al. Structure-based virtual screening and in vitro evaluation of new *Trypanosoma cruzi* cruzain inhibitors. *Inter J of Mol Scien*. 20 (2019) 1-3. <https://doi.org/doi.org/10.3390/ijms20071742>.
- [72] SILVA. E. B. et al. Cruzain structures: apocruzain and cruzain bound to S-methyl thiomethanesulfonate and implications for drug design. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*. 75 (2019) 419-427. <https://doi.org/10.1107/S2053230X19006320>.
- [73] EMAMI, S.; TAVANGAR, P.; KEIGHOBADI, M. An overview of azoles targeting sterol 14 α -demethylase for antileishmanial therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 135 (2017) 241-259. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.044>.
- [74] WALL, R. J. et al. The Qi site of cytochrome b is a promiscuous drug target in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani*. *ACS Infectious Diseases*. 6 (2020) 515-528. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00426>.
- [75] VARGAS, J. A. R. et al. In vitro evaluation of arylsubstituted imidazoles derivatives as antiprotozoal agents and docking studies on sterol 14 α -demethylase (CYP51) from *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum*, and *Trypanosoma brucei*. *Parasitology research*. 118 (2019) 1533-1548. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06206-z>.

[76] VIJAYAKUMAR, S; DAS, P. Structural, molecular motions, and free-energy landscape of *Leishmania* sterol-14 α -demethylase wild type and drug resistant mutant: a comparative molecular dynamics study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 37 (2019) 1477-1493. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1461135>.

[77] GASPARO, R. et al. Targeting a Large Active Site: Structure-Based Design of Nanomolar Inhibitors of *Trypanosoma brucei* Trypanothione Reductase. *Chemistry—A European Journal*. 25 (2019) 11416-11421. <https://doi.org/10.1002/chem.201901664>.

[78] BOMBAÇA, A. C. S. et al. Mitochondrial dysfunction and ROS production are essential for anti-*Trypanosoma cruzi* activity of β -lapachone-derived naphthoimidazoles. *Free Radical Biology and Medicine*. 130 (2019) 408-418. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.04.012>.

[79] DA PAIXÃO, V. G.; PITA, S. S. 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*. 79 (2019) 36-47. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2019.01.009>.

ANEXO – Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado “**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE NOVOS HETEROCÍCLICOS NITROGENADOS NO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS CONTRA A LEISHMANIOSE E DOENÇA DE CHAGAS**” protocolado sob nº 146/2019 pela pesquisadora Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/IAM). Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 30 de dezembro de 2023 com a finalidade de pesquisa científica. É responsabilidade da coordenadora do projeto notificar à CEUA de quaisquer alterações em relação ao projeto. A coordenadora concorda que nenhuma dessas mudanças serão implementadas antes de serem aprovadas pela CEUA/IAM.

Quantitativo de Animais Aprovados								
Animal	Espécie e linhagem	Quant. (total)	Sexo			Idade	Peso	Origem
			♂	♀	Ambos			
Camundongo	BALB/c	744	708	36		30 dias de idade	± 20g	Biotério IAM
Camundongo	Swiss	184	184			30 dias de idade	± 20g	Biotério IAM
Total		928						

Recife (PE, Brasil), 29 de Abril de 2020

Virginia M. Barros de Lorena

Virginia Maria Barros de Lorena
Coordenadora CEUA/IAM
Mat. SIAPE 1.984.445