

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade De Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos  
Área de Insumos Farmacêuticos

**Triagem biológica de inibidores de sirtuína 2  
(*TcSir2rp1*), candidatos a antichagásicos**

ANA CAROLINA SILVA ROCHA

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini

SÃO PAULO 2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade De Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos  
Área de Insumos Farmacêuticos

**Triagem biológica de inibidores de sirtuína 2  
(*TcSir2rp1*), candidatos a antichagásicos**

ANA CAROLINA SILVA ROCHA

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018, de 13/10/2011.

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini

SÃO PAULO 2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por q/ualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o progama desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecárias Responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira- CRB- 8/5562

R586t Rocha, Ana Carolina Silva  
Triagem biológica de inibidores de sirtuína 2  
(TcSir2rpl) candidatos a antichagásicos. / Ana  
Carolina Silva Rocha. - São Paulo, 2022.  
68 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Farmácia - Programa de Pós-Graduação  
em Fármaco e Medicamentos.  
Orientador: Trossini, Gustavo Henrique Goulart

1. Doença de Chagas. 2. Trypanosoma cruzi. I. T.  
II. Trossini, Gustavo Henrique Goulart, orientador.

Nome: ROCHA, Ana Carolina Silva

Título: Triagem biológica de inibidores de sirtuína 2 (*TcSir2rp1*), candidatos a antichagásicos.

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Comissão Julgadora

Professor Doutor Gustavo Henrique Goulart Trossini

---

Professora Doutora Thamires Quadros Froes

1° examinador

---

Professora Doutora Mariana Laureano de Souza

2° examinador

---

Professor Doutor Nilmar Silvio Moretti

3° examinador

---

São Paulo, 10 de março de 2022.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me sustentou nessa jornada. À Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF-USP) pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida.

E dedico este trabalho a minha mãe que sempre me apoiou e sempre me deu forças para continuar, ao meu irmão e meu pai que sempre estão comigo.

Ao meu orientador, professor e amigo Gustavo Henrique Goulart Trossini pela grande oportunidade!!!

Aos alunos e amigos do grupo LITEC por todas as discussões construtivas, por todos os ensinamentos e por toda a convivência no grupo: André Novaes, João Machado, Raisal Calil, Witor Ferraz, Elis Lima, Fernando Gatti, Haifa Hassanie, Renan Gomes e Evelin Fornari. E também aos amigos do Laboratório do professor Sandro Roberto Marana, Vitor Medeiros e Felipe Akihiro por toda convivência, apoio e ensinamentos.

**“Dificuldades preparam pessoas comuns para destinos extraordinários”**

Clive Staples Lewis

**“O senhor é o meu pastor; nada me faltará”**

## RESUMO

ROCHA, A. C. S.; **Triagem biológica de inibidores de sirtuína 2 (*TcSir2rp1*) candidatos a antichagásicos**. 2022. 68 f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A doença de Chagas é causada pelo *Trypanosoma cruzi*, e atualmente, acomete entre 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo. A quimioterapia disponível para seu o tratamento se baseia apenas em dois fármacos, nifurtimox e benznidazol, com mais de 50 anos de descoberto. Estes fármacos apresentam eficácia limitada, pois são pouco efetivos na fase crônica e apresentam alta toxicidade, resultando em efeitos adversos graves. Esse panorama mostra a necessidade de novas abordagens terapêuticas contra essa doença. Nesse sentido, a inibição de vias bioquímicas essenciais para o parasita se mostram como uma boa sugestão para identificação de compostos promissores candidatos a novos agentes quimioterápicos. A sirtuína 2 (Sir2) são enzimas reguladoras que participam de mecanismos epigenéticos em tripanossomatídeos, e no *T. cruzi* possuem um papel fundamental em todos os seus estágios evolutivos, devido a este fato, se apresentam como um alvo promissor na busca por novos fármacos contra a doença de Chagas. Neste sentido propomos a busca de inibidores da Sir2 proteína 1 do *T. cruzi* (*TcSir2rp1*) que é geneticamente validada como alvo farmacológico, por meio da estratégia de triagem biológica. Realizou-se a expressão da enzima recombinante por biologia molecular em um sistema de transformação utilizando cepa de *Escherichia coli* *Artic Express* (DE3). Foi feita a purificação e a confirmação da obtenção da proteína recombinante se deu por gel SDS-PAGE. Após a obtenção da enzima os parâmetros cinéticos foram determinados por experimentos de fluorimetria. A triagem foi realizada para um conjunto de 82 compostos, previamente sintetizados pelo nosso grupo de pesquisa, como inibidores da *TcSir2p1* em dose única de 100  $\mu$ M. Os ensaios foram realizados em triplicata e em experimentos independentes. Dentre os 82 compostos testados, 20 apresentaram inibições maior que 50% contra a enzima *TcSir2rp1*, na dose de 100  $\mu$ M. Dentre estes, se destacaram 3 compostos derivados de chalconas, para os quais foi determinada a potência. O composto **1** foi o que mais potente, apresentando valor de IC<sub>50</sub> de 11,65  $\mu$ M, já os compostos **3** e **5** foram menos potentes (IC<sub>50</sub>= 38,50  $\mu$ M e 19,85  $\mu$ M, respectivamente). Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que a estratégia de triagem biológica é promissora na identificação de inibidores da *TcSir2p1* candidatos a agentes anti- *T. cruzi*.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, sirtuína 2, *TcSir2rp1*, epigenética, triagem biológica.

ROCHA, A. C. S.; **Biological screening of sirtuin 2 inhibitors (TcSir2rp1) anti-chagasic candidates**. 2022. 68 p. Dissertation (Masters)- Faculdades de Ciência Farmacêutica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

### ABSTRACT

Chagas disease is caused by *Trypanosoma cruzi*, and currently affects 6 to 7 million people worldwide. The chemotherapy available for its treatment is based on only two drugs, nifurtimox and benznidazole, with more than 50 years of discovery. These drugs have limited efficacy, as they are ineffective in the chronic phase and have high toxicity, resulting in serious adverse effects. This panorama shows the need for new therapeutic approaches against this disease. In this sense, the inhibition of essential biochemical pathways for the parasite proves to be a good suggestion for the identification of promising compounds candidates for new chemotherapeutic agents. Sirtuin 2 (Sir2) are regulatory enzymes that participate in epigenetic mechanisms in trypanosomatids, and in *T. cruzi* they have a fundamental role in all their evolutionary stages, due to this fact, they present themselves as a promising target in the search for new drugs against Chagas disease. In this sense, we propose the search for inhibitors of Sir2 protein 1 of *T. cruzi* (*TcSir2rp1*) which is genetically validated as a pharmacological target, through the biological screening strategy. The expression of the recombinant enzyme was performed by molecular biology in a transformation system using strain of *Escherichia coli* *Artic Express* (DE3). Purification was performed and confirmation of obtaining the recombinant protein was performed by SDS-PAGE gel. After obtaining the enzyme, the kinetic parameters were determined by fluorimetry experiments. Screening was performed for a set of 82 compounds, previously synthesized by our research group, as *TcSir2rp1* inhibitors in a single dose of 100  $\mu$ M. Assays were performed in triplicate and in independent experiments. Among the 82 compounds tested, 20 showed inhibitions greater than 50% against the enzyme *TcSir2rp1*, at a dose of 100  $\mu$ M. Among these, 3 compounds derived from chalcones stood out, for which the potency was determined. Compound **1** was the most potent, with an  $IC_{50}$  value of 11.65  $\mu$ M, while compounds **3** and **5** were less potent ( $IC_{50}$ = 38.50  $\mu$ M and 19.88  $\mu$ M, respectively). In view of the results obtained, it can be concluded that the biological screening strategy is promising in the identification of *TcSir2rp1* inhibitors candidates for anti-*T. cruzi* agents.

**Keywords:** Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, sirtuin 2, *TcSir2rp1*, epigenetics, biological screening.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Distribuição global da doença de Chagas entre 2006-2019.....	15
<b>Figura 2:</b> Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> no hospedeiro (humano) e no Triatomíneo (vetor).....	17
<b>Figura 3:</b> Estruturas dos fármacos antichagásicos aprovados (nifurtimox e benznidazol) e representantes de novas classes químicas em desenvolvimento para a doença de Chagas.....	19
<b>Figura 4:</b> Esquema do mecanismo da deacetilação da sirtuína 2.....	22
<b>Figura 5:</b> Estrutura dos inibidores de sirtuínas relatados, sirtinol, derivados de bisnaftalimipropil cambinol e salermina.....	24
<b>Figura 6:</b> Esquema dos processos nas quais as enzimas <i>TcSir2rp1</i> e <i>TcSir2rp3</i> estão envolvidas no <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	25
<b>Figura 7:</b> Esquemática do funcionamento da triagem biológica de alta escala (HTS).....	26
<b>Figura 8:</b> Esquema da triagem biológica de compostos da biblioteca LITEC frente a enzima sirtuína 2 ( <i>TcSir2rp1</i> ).....	27
<b>Figura 9:</b> Visão geral do ensaio biológico com a <i>TcSir2rp1</i> <i>in vitro</i> .....	33
<b>Figura 10:</b> Análise das etapas de purificação por SDS-PAGE da proteína recombinante <i>TcSir2rp1</i> .....	36
<b>Figura 11:</b> Determinação do Km do substrato peptídico e do NAD <sup>+</sup> .....	37
<b>Figura 12:</b> Atividade enzimática e fluorescência detectada apenas na presença da <i>TcSir2rp1</i> .....	39
<b>Figura 13:</b> Curva de atividade enzimática em função do tempo e determinação do tempo de incubação.....	39
<b>Figura 14:</b> Efeito da alteração da concentração de <i>TcSir2rp1</i> em gráfico de curva de atividade em função do tempo.....	40
<b>Figura 15:</b> Modulação da atividade enzimática de <i>TcSir2rp1</i> diante os compostos da biblioteca LITEC testados em uma dose única de 100 µM.....	41
<b>Figura 16 :</b> Curva concentração-resposta dos compostos <b>1, 3 e 5</b> .....	45

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Representação do ensaio biológico com ou sem os componentes.....38

**Tabela 2** - Estrutura 2D e porcentagem da atividade enzimática dos **20** compostos promissores frente a enzima *TcSir2rp1*.....42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - Graus na escala Celsius

DC - Doença de Chagas

DMSO – Dimetilsulfóxido

DTN - Doença tropical negligenciada

FCF - Faculdade de Ciências Farmacêuticas

HTS – do inglês, *High-Throughput Screening* (Triagem de Alto Rendimento)

QRS- Despolarização ventricular

IC<sub>50</sub> - Concentração que promove 50% de inibição

K<sub>i</sub> - Constante de inibição

K<sub>M</sub> - Constante de Michaelis- Menten

LITEC - Laboratório de Integração entre Técnicas Experimentais e Computacionais no planejamento de Fármacos

MW - do inglês, molecular weight, (massa molecular)

NAD<sup>+</sup> - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

Ni-NTA agarose - Níquel e ácido nitrilotriacético acoplados à resina à base de agarose

pH - Potencial hidrogeniônico

SDS-PAGE - do inglês, Sodium Dodecyl Sulphate–PolyAcrylamide Gel

Electrophoresis, (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio)

Sir2 - Sirtuína-2

TcSir2rp1 – Sirtuína 2 proteína 1 do *Trypanosoma cruzi*

Tris-HCL - cloridrato de 2-amino-2-(hidroximetil) -1,3-propandiol

USP – Universidade de São Paulo

WHO - do inglês, *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

µL - Microlitros

µM - Micromolar

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 DOENÇAS NEGLIGENCIADAS.....	13
1.2 DOENÇA DE CHAGAS.....	14
1.3 CICLO DE VIDA DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .....	16
1.4 PATOGENIA DA DOENÇA DE CHAGAS.....	17
1.5 QUIMIOTERAPIADA DOENÇA DE CHAGAS.....	18
1.6 EPIGENÉTICA.....	20
1.7 SIRTUÍNA 2.....	22
1.8 TRIAGEM BIOLÓGICA AUTOMATIZADA EM LARGA ESCALA.....	25
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	28
2.1 OBJETIVO GERAIS.....	28
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	28
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
3.1. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE <i>TcSir2rp1</i> .....	29
3.2. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE <i>TcSir2rp1</i> .....	29
3.3. ESTUDO CINÉTICO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA <i>TcSIR2rp1</i> .....	30
3.4. ENSAIOS DE INIBIÇÃO DA <i>TcSir2rp1</i> .....	31
3.5. DETERMINAÇÃO DE POTENCIA (IC <sub>50</sub> ) DE INIBIDORES DE <i>TcSir2rp1</i> .....	34
3.6 BIBLIOTECA DE COMPOSTOS.....	34
<b>4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS</b> .....	34
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	35
5.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA <i>TcSir2rp1</i> .....	35
5.2 ESTUDO CINÉTICO DA ENZIMA <i>TcSir2rp1</i> .....	36
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE.....	38
5.4 PADRONIZAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA <i>TcSir2rp1</i> .....	39
5.5 TRIAGEM BIOLÓGICA: ENSAIO DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA DA <i>TcSir2rp1</i> EM DOSE ÚNICA.....	41
5.6 DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DE INIBIÇÃO DA ENZIMA <i>TcSir2rp1</i>	44
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	45
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	47
<b>ANEXOS</b> .....	57

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 DOENÇAS NEGLIGENCIADAS

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs), conceitualmente, são um grupo de doenças diversificadas, que atingem 149 países em condições tropicais e subtropicais. Afetam mais de um bilhão de pessoas em situação de pobreza, na qual estão sujeitas a falta de saneamento básico e expostas a vetores infecciosos (PAHO, 2021). Essas doenças podem interferir indiretamente na economia por inviabilizar os indivíduos infectados, corroborando com um cenário socialmente desigual (SCOTTI; SCOTTI; YARLA, 2018).

As DTNs são responsáveis por desencadear deficiências graves, morbidades e levar o infectado a morte (SCOTTI; SCOTTI; YARLA, 2018). De acordo com o *Expanded Special Project for Elimination of Neglected Tropical Diseases*, 1,5 bilhão de pessoas estão infectadas pelas DTNs e ainda, segundo estimativa, o número de mortes pode chegar a 500.000 ao ano. No entanto, individualmente, essas doenças não são prioridades, pois não se destacam pelo risco de mortalidade e sim por causarem incapacitações ou desfiguração (KLOHE et al, 2019; ENGELS; ZHOU, 2020).

A lista atual de DNTs publicada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) inclui 20 principais doenças. Sendo as infecções causadas por helmintos, transmitidas pelo solo, contabilizadas em primeiro lugar, seguidas por filariose linfática, esquistossomose, escabiose, leishmaniose, doença de Chagas e dengue (KLOHE et al, 2019; HOTEZ et al, 2020). E mesmo não sendo uma infecção, o envenenamento por picadas de cobra também é considerada como uma DTN, esta se destaca como um problema de saúde em áreas tropicais, nas quais estimam-se que mais de 100 mil pessoas morram por ano por esta causa (MSF, 2020).

O termo “negligenciadas”, foi dado às DNTs por não receberem a atenção necessária oriunda das indústrias farmacêuticas e governos, devido à falta de interesse e lucro (SCOTTI; SCOTTI; YARLA, 2018). Esta falta de interesse é retratado nos dados oriundos da introdução de fármacos na terapêutica, visto que apenas 1,3% foram aprovados para doenças negligenciadas entre janeiro de 2012 e setembro de 2018, sendo bedaquilina para tuberculose e tafenoquina para malária que não são

mais consideradas negligenciadas pela OMS. A tafenoquina, foi aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA)- agência regulatória de alimentos e fármacos dos Estados Unidos em julho de 2018 como um medicamento que promove a cura para a malária, infecção causada pelo *Plasmodium vivax*. Já a bedaquilina, tornou-se comercializada em 2012 para compor a terapia combinada para tuberculose multiresistente. Além do mais, segundo o relatório G-Finder 2019, o financiamento direcionado para as DNTs em 2018 foi quase 10% menor quando se comparava ao ano de 2009 (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2019; DNDi, 2020). Dentro ainda deste cenário temos a Leishmaniose Visceral, doença do Sono (tripanossomíase humana africana) e a doença de Chagas (tripanossomíase americana) (DC) que embora tenham sido consideradas extremamente negligenciadas, recebem menos de 5% de financiamento mundial em inovações, mesmo com o risco de mais de 500 milhões de pessoas estarem ameaçadas por estas parasitoses (FIOCRUZ, 2020). Dentre estas, a doença de Chagas nos leva a uma atenção especial, por possuir elevados números de casos no Brasil (SONAR; KABRA; SINGH, 2018; DNDi, 2020; NHR BRASIL, 2021).

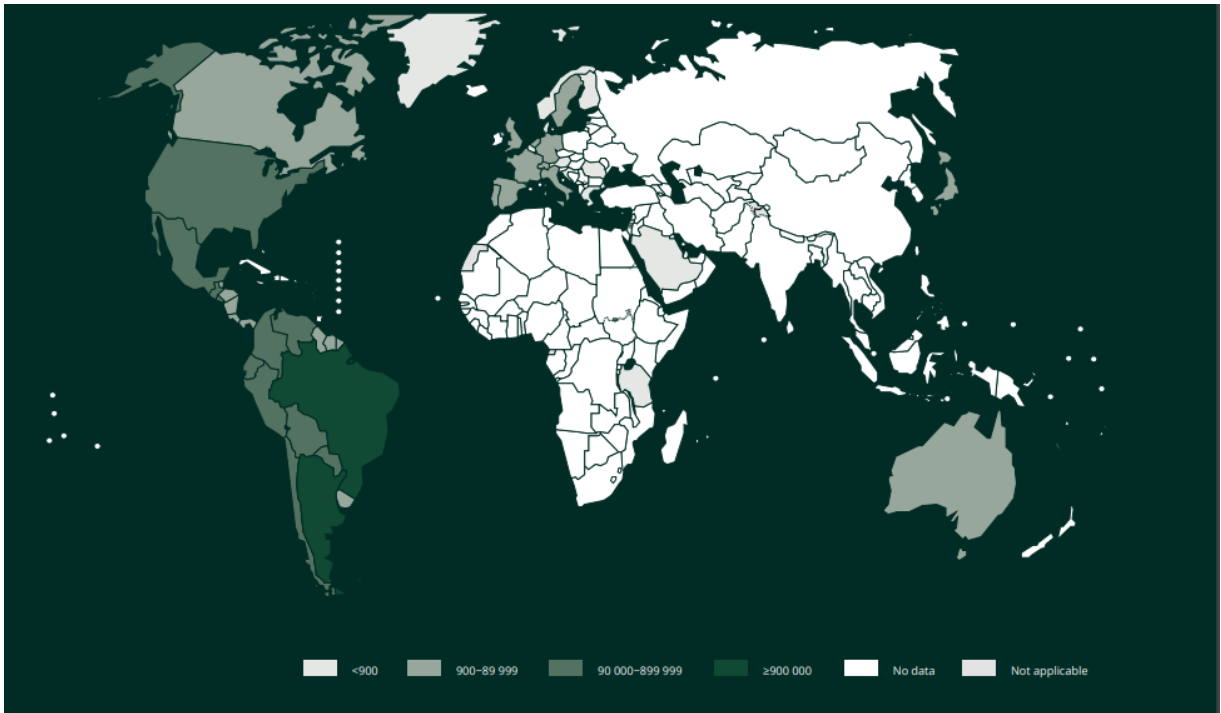
## 1.2. DOENÇA DE CHAGAS

Segundo estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS), entre 6 e 7 milhões de pessoas estão infectadas com *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas (DC) (WHO, 2021). Ao ano, estima-se que mais de 10 mil pessoas vão a óbito devido a complicações clínicas da doença e, aproximadamente, 75 milhões de pessoas correm o risco de contraí-la, principalmente nas regiões endêmicas (PAHO, 2021; WHO, 2021). No entanto, esses dados são discutíveis visto a falta de notificação pois menos de 10% dos infectados nas Américas recebem o diagnóstico e menos de 1% recebem o tratamento antiparasitário (DNDi, 2021).

A DC é encontrada principalmente em áreas endêmicas de 21 países da América Latina continental, porém os processos migratórios mudaram esse perfil epidemiológico, sendo que cada vez mais são identificados novos casos da doença ao redor do mundo. Devido a isso, a DC, atualmente, pode ser encontrada em países não endêmicos, como Japão, Estados Unidos, Europa e Austrália (Figura 1) (FONSECA- BERZAL et al., 2019; DNDi, 2020). Prova disso são as estimativas relacionadas à imigração, sendo que o Canadá e Austrália receberam 100.000 e

80.579 imigrantes de países endêmicos, relatando 1789 e 1392 casos de infectados, respectivamente. Destaca-se ainda que nos Estados Unidos, pelo menos um milhão de pessoas possuem a DC, e no Japão já foram confirmados mais de 3.500 casos (GASCON; BERN; PINAZO, 2010; SARAIVA et al., 2021).

**Figura 1:** Distribuição global da doença de Chagas entre 2006-2019.



**Fonte:** Adaptado de WHO, 2020.

A principal forma de transmissão da doença de Chagas se dá por meio das fezes infectadas do inseto *Triatoma infestans* (conhecido popularmente como “barbeiro”) (COURA; VIÑAS, 2010). Porém, esta forma foi considerada erradicada no Brasil em meados de 2006, quando este foi certificado pela Organização Pan-Americana da Saúde/ Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS) como livre da transmissão da DC pelo seu principal vetor. Vale ressaltar, que esta certificação é contestada por alguns autores, pois se refere apenas a transmissão por um triatomíneo da espécie o *T. infestans* (FERREIRA; SILVA, 2006; SOUSA et al, 2020). Entretanto outras vias de transmissão também são reportadas, por meio de transfusão sanguínea, infecção congênita, acidentes laboratoriais, transplante de órgãos, doação de órgão ou pela ingestão de alimentos contaminados pelo parasita. Sendo que a contaminação por alimentos é considerada como uma forma alarmante de transmissão em países não endêmicos e endêmicos (SILVA- JARDIM; THIEMANN;

ANIBAL, 2014; SOUTO et al, 2019; MONTANARA et al, 2019; DNDi, 2020).

### 1.3. CICLO DE VIDA DO *TRYPANOSOMA CRUZI*

Durante o ciclo de vida, o *T. cruzi* se apresenta em quatro estágios morfológicos: epimastigota, encontrados no lúmen do intestino dos triatomíneos; tripomastigota que são formas derivadas de células, que se espalham na corrente sanguínea do hospedeiro após ruptura da célula infectada; amastigotas, vistas nas células infectadas do hospedeiro; e tripomastigota metacíclico, formas infectantes eliminadas pelo inseto vetor, durante o repasto sanguíneo (SALASSA; ROMANO, 2019).

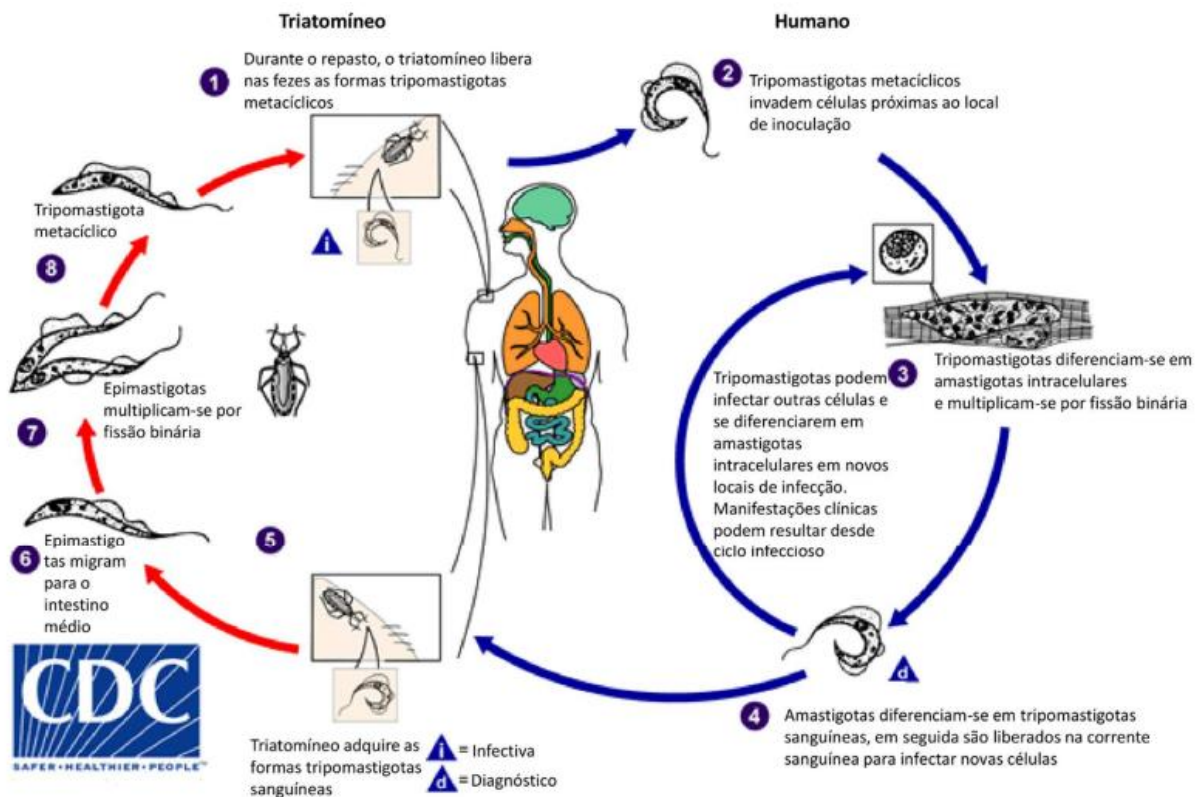
O ciclo desta tripanossomíase tem seu início quando o inseto vetor *Triatominae* (ou barbeiro), durante o repasto sanguíneo, ingerem as formas tripomastigotas derivados de células no sangue periférico do mamífero. Assim, na porção média do tubo digestório, os tripomastigotas se replicam e diferenciam-se em epimastigotas. Ao migrar para a porção final do tubo digestório, os epimastigotas se diferenciam e replicam por fissão binária em tripomastigotas metacíclicos, forma altamente infectante. O processo no qual os epimastigotas se transformam em tripomastigota metacíclico é caracterizado como metaciclogênese. Nesta etapa ocorrem variadas mudanças no parasita, incluindo o aumento de expressões de proteínas que ajudam no fator de virulência (SALASSA; ROMANO, 2019; SAAVEDRA, et al., 2020).

Já no hospedeiro mamífero, o início do ciclo se dá quando os triatomíneos ao se alimentarem, excretam junto com as suas fezes as formas tripomastigotas metacíclicos, próximo ao local ferido pela picada. Ao adentrar na corrente sanguínea, essas formas infectam macrófagos e células nucleadas se multiplicando. Por meio da amastigogênese os tripomastigotas metacíclicos se diferenciam em amastigota intracelulares. Estas formas, amastigotas, se multiplicam por divisão binária e se diferenciam novamente em tripomastigotas, as quais causam a ruptura das células e são liberadas na corrente sanguínea para infectar outras células, fechando o ciclo da parasitose (Figura 2) (BERN et al, 2011; CUCUNUBÁ et al., 2016; SALES JUNIOR, et al., 2017; SAAVEDRA, et al., 2020; DE- SIMONE et al., 2022).



**Figura 2:** Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro (humano) e no Triatomíneo (vetor).

**Fonte:** Adaptado de Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC)



#### 1.4. PATOGENIA DA DOENÇA DE CHAGAS

Clinicamente a DC apresenta duas diferentes fases, sendo elas aguda e crônica. A fase aguda, em geral, tem uma duração de até dois meses após o contágio. Neste período altas concentrações do parasita são observadas na corrente sanguínea, mas a maior parte dos infectados os sintomas são inespecíficos e leves (oligossintomático), ou ausente (assintomático). Mesmo assim, os pacientes sintomáticos apresentam febre, dor de cabeça, anorexia, vômitos, diarreia, sonolência, apatia, linfadenopatia, convulsões, dores nas articulações e na musculatura, mal-estar e hepatoesplenomegalia. Em alguns casos, observa-se ainda taquicardia sinusal, bloqueio átrio-ventricular de primeiro grau, baixa voltagem da onda QRS (despolarização ventricular que ocorre em 3 fases), dentre outras alterações cardíacas (TEIXEIRA et al, 2011; BERN, 2015).

Após a fase aguda, as respostas imunológicas controlam a multiplicação parasitária, o que reduz a presença de *T. cruzi* na corrente sanguínea, e os sintomas

desaparecem. A nova fase é denominada fase crônica assintomática ou fase crônica indeterminada, que pode durar anos ou décadas. Mesmo sem sintomas aparentes, nesta fase, o paciente ainda pode transmitir a doença (TEIXEIRA et al, 2011; BERN, 2015; PEREZ- MOLINA; MOLINA, 2018; ROSA et al, 2018; RIOS et al, 2019; GARNER, 2019; PINO-MARIN et al, 2021; DNDI, 2022).

Aproximadamente 40% dos pacientes cursam para a fase crônica sintomática da doença, a qual inclui, principalmente, alterações no sistema cardiovascular e digestivo (BONA et al, 2018; SANTOS et al, 2021). Há uma estimativa de 94,5% das manifestações da DC crônica esta relacionada às anormalidades cardíacas, sendo esta a mais comum, que podem ser arritmias, formação de trombos, movimentação dessincronizada de ventrículos e átrios, e sistema de condução anormal que podem ser fatais. Já, aproximadamente 5,5%, desenvolvem sintomas relacionadas ao sistema digestivo, como megaesôfago ou megacólon. No entanto, parte dos pacientes podem, ainda, apresentar ambas as manifestações digestivas e cardíacas simultaneamente (TEIXEIRA et al, 2011; GARNER, 2019; HOSSAIN et al, 2020). Neste sentido, a cardiomiopatia chagásica, por exemplo, é a principal causa de morte dos indivíduos que se encontram na fase crônica da DC. Esta complicação leva, aproximadamente, 7.000 pessoas à morte a cada ano, e, também, é a razão mais comum para a solicitação de transplantes cardíacos na América Latina (PEREZ- MOLINA; MOLINA, 2018; MIJARES et al., 2020; NICOLAU et al., 2021).

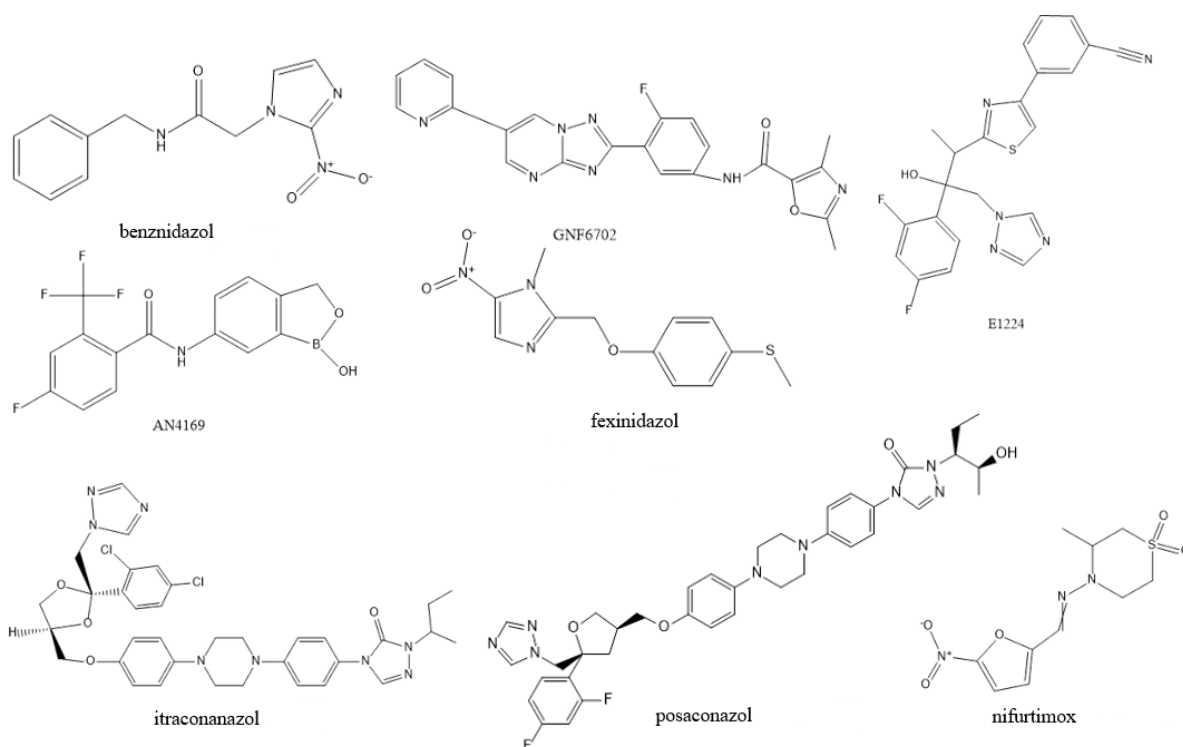
### **1.5. QUIMIOTERAPIA DA DOENÇA DE CHAGAS**

A quimioterapia para o tratamento da DC baseia-se, atualmente, em apenas dois fármacos: o benznidazol, descoberto em 1974; e o nifurtimox, descoberto em 1940 (Figura 3). A produção do benznidazol era realizada pelo laboratório Roche, mas atualmente o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) é responsável por produzir e disponibilizá-lo gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS), nas apresentações farmacêuticas de 12,5 mg e 100 mg. Já, o nifurtimox, teve a sua comercialização descontinuada no Brasil durante a década de 80 (COURA; CASTRO, 2002; BATISTA et al., 2018; CABRA et al, 2019).

Os dois fármacos têm eficácia comprovada, principalmente, na fase aguda da doença e

seus benefícios na fase crônica ainda são questionáveis. Sua administração na fase aguda é ampla, incluindo casos de neonatos, casos de reativação da doença, mulheres infectadas em idade fértil ou pacientes crônicos de até 18 anos (KRATZ, 2019; RIBEIRO et al., 2020; CASTRO; SOEIRO, 2021).

**Figura 3:** Estruturas dos fármacos antichagásicos aprovados (nifurtimox e benznidazol) e representantes de novas classes químicas em desenvolvimento para a doença de Chagas.



**Fonte:** Adaptado de KRATZ, 2019.

O tratamento da DC com benznidazol e nifurtimox é de longa duração (60 a 90 dias respectivamente), o que ressalta ainda mais seus efeitos adversos, tais como: erupções cutâneas, edema generalizado, mialgia, febre, distúrbios gastrointestinais, toxicidade medular e polineuropatia periférica, que normalmente resultam na interrupção do tratamento. Esses efeitos adversos são mais presentes em pacientes tratados com o nifurtimox, quando se compara aos tratados com benznidazol (SALES JUNIOR et al., 2017; KRATZ, 2019; MORINA-MORANT et al., 2020).

Visto isso, o benznidazol é utilizado como fármaco de primeira escolha contra a DC em muitos países, incluindo o Brasil (FRADE et al., 2022). Nos Estados Unidos, por exemplo, no ano de 2017, foi aprovado pela FDA para uso pediátrico (crianças com idades entre 2 e 12 anos) (MORINA-MORANT et al., 2020, FERREIRA; ANDRICUPOLO, 2019). Neste contexto, embora apresente pouca taxa de cura em adultos crônicos, o benznidazol tem sido indicado no tratamento da DC para a

prevenção da progressão da doença. Por outro lado, mesmo com os efeitos adversos já relatados, em agosto de 2020 o nifurtimox foi aprovado para crianças menores de 18 anos, também nos EUA (KRATZ, 2019; PAHO, 2019; MOLINA et al., 2020; FDA, 2021; WHO, 2022).

O reposicionamento terapêutico também tem sido explorado como alternativa da busca de anti- *T. cruzi* para suprir as desvantagens que os fármacos atualmente disponíveis apresentam. Um estudo investigou a administração do itraconazol por 20 anos em pacientes chagásicos crônicos. Nestes, observou-se alterações cardíacas benéficas (alterações eletrocardiográficas) e poucos efeitos adversos (APT et al., 2013). Outro fármaco reposicionado como estratégia de identificar novos anti-*T. cruzi* foi o antifúngico posaconazol que apresentou eficácia em testes *in vitro* e em modelos experimentais da doença, mas não alcançou resultados satisfatórios quando testados em humanos (RIBEIRO et al., 2020). Por outro lado, em ensaio clínico (fase 2) encontra-se o E1224 (pró- fármaco do ravuconazol), que reduziu a carga parasitária em doses altas, mas em doses menores favorecia o aumento gradual do *T. cruzi* na corrente sanguínea do chagásico. Assim como o fexinidazol, aprovado para doença do sono, atualmente encontra-se na fase 2 para DC, bem como, AN4169 e inibidores de proteassomas como o GNF6702 (TORRICO et al., 2018; KRATZ, 2019; RIBEIRO et al., 2021). Nesse sentido, estes cenários ainda nos mostram incertezas em relação à quimioterapia da DC.

## 1.6. EPIGENÉTICA

O conceito epigenético foi estabelecido pelo biólogo Conrad H. Waddington no final de 1930, quando foi definido que a interatividade entre o gene e o meio permitem o surgimento de fenótipos (WADDINGTON, 1942). Com o passar dos anos este conceito foi modificando-se e atualmente resumiu-se em: “alterações hereditárias de expressão gênica e/ou alterações de fenótipo que são promovidas por mecanismos epigenéticos que não provocam alterações na sequência genética” (CASCORBI; SCHWAB, 2016; NICOGLOU; MERLIN, 2017; HARVEY; CHEN; JAROSZ, 2018; CAVALLI; HEARD, 2019). Os mecanismos epigenéticos regulam em conjunto expressão gênica celular, podendo ativar ou suprimir a transcrição e tradução gênica, visto que regulam o nível de condensamento da cromatina (DAWSON; KOUZARIDES, 2012; CASCORBI; SCHWAB, 2016; HWANG; AROMOLARAN; ZUKIN, 2017).

Os mecanismos epigenéticos mais bem elucidados e explorados na literatura são as metilações do DNA e de resíduos de citosina, alteração na conformação das histonas, remodelação na cromatina e expressões de molécula de RNA não codificadoras (GAYON, 2016; WERNER; KELLY; ISSA, 2018). Estes mecanismos normalmente são realizados por enzimas como a DNA metiltransferases, que catalisam a metilação do DNA (POH; WEE; GAO, 2016), histonas acetiltransferases, que catalisam adições na histona, histona deacetilase e lisina demetilase, que removem estas modificações no DNA e histonas, respectivamente (ELHAMAMSY, 2016; VOSS; THOMAS, 2018). Dentre os processos de modificações epigenéticos mais observados em tripanossomatídeos, citamos acetilações e metilações de histonas. Em particular, no epigenoma do *T. cruzi*, a acetilação (mono, di, tri) e metilação ocorrem predominantemente nas lisinas e serinas da região C-terminal da histona H2B, e N- terminal das H3 E H4 (PICCHI et al., 2017).

O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo, exigindo modificações nas vias metabólicas e alterações morfológicas, para garantir sua sobrevivência nos diferentes ambientes ao qual é exposto. Assim, a identificação destas vias metabólicas que podem ser essenciais ao parasita se tornam interessantes (LEPESHEVA, VILLALTA, WATERMAN, 2011; WEISBARTH et al., 2018). A epigenética é reconhecida como reguladora da expressão gênica destes processos parasitários, e vem se destacando como uma área promissora na busca por novos alvos moleculares. Nestes organismos, a regulação epigenética causa diferenciações no perfil antigênico, e permitem que os mesmos escapem do sistema imune dos hospedeiros, ações farmacológicas e dos demais efeitos adversos, como estratégia de defesa (SULLIVAN, NAGULESWARAN, ANGEL, 2006). Portanto, enzimas reguladoras epigenéticas, que participam destes mecanismos, se tornam alvos interessantes para o desenvolvimento de fármacos anti- *T. cruzi*. Dentre elas a sirtuína 2, proteína do *T. cruzi* (TcSir2rp1) relacionada aos processos evolutivos do parasita, se destacou como um alvo promissor (GASPAR et al., 2018; MONALDI et al., 2019).

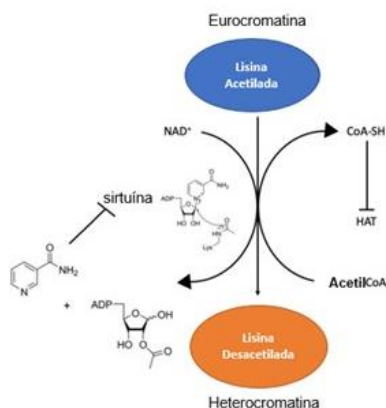
### **1.7. SIRTUÍNA 2**

Os mecanismos de acetilações são considerados os principais controladores das atividades das proteínas por meio das modificações pós-traducionais (RELIGA; WATERS, 2012). Estas modificações são realizadas por duas famílias de enzimas: as lisinas acetiltransferases (KATs) e as lisinas deacetilases (KDACs). As KATs

transferem a acetil-coenzima A para o resíduo interno de lisina das proteínas substrato. As KDACs podem ser zinco-dependentes e divididas em três classes I, II e IV; enquanto a reguladora de informação silenciosa 2 (*silent information regulator 2*) ou sirtuínas são uma família de proteína da classe III, dependentes de  $\text{NAD}^+$  (HASSEL, 2019; WANG et al., 2019). SON et al., 2021).

Para iniciar sua ação, as sirtuínas catalisam a clivagem da ligação glicosídica entre nicotinamida e ADP-ribose de  $\text{NAD}^+$ , ocorrendo a transferência do grupo acetil de lisina para ADP-ribose, resultando na lisina deacetilada, nicotinamida e o 2'- e 3'-O- acetil-ADP-ribose (Figura 4) (GASPAR et al., 2018; ZHOU et al., 2018; GOMES et al., 2021).

**Figura 4:** Esquema do mecanismo da deacetilação da sirtuína 2.



**Fonte:** Adaptado de GOMES et al., 2021.

As Sir2 estão presentes em todos os reinos da vida, desde bactérias até seres humanos e demonstram ser pró- sobrevivência em parasitas (LI et al., 2015; HU; ZHENG, 2018; MONALDI et al., 2019). A deacetilação é a função mais bem compreendida da enzima, porém algumas sirtuínas removem outros grupos como: acilas como, o succinil, glutaril, acil graxo de cadeia longa e malonil (CARAFA et al., 2016; DAI et al., 2018). A função dessa enzima está sendo bem avaliada em estudos sobre envelhecimento e estão relacionadas a várias doenças como o câncer, o Alzheimer, distúrbios neurodegenerativos e diabetes tipo II. A Sir2 tem um amplo papel em diversos processos celulares do organismo, como o silenciamento gênico, organização de microtúbulos, reparo do DNA, regulação do ciclo celular, estabilidade do genoma, autofagia e na sobrevivência e crescimento parasitário (VEIGA-SANTOS et al., 2014; RELIGA; WATERS, 2012; MORETTI et al., 2015; CARAFA et

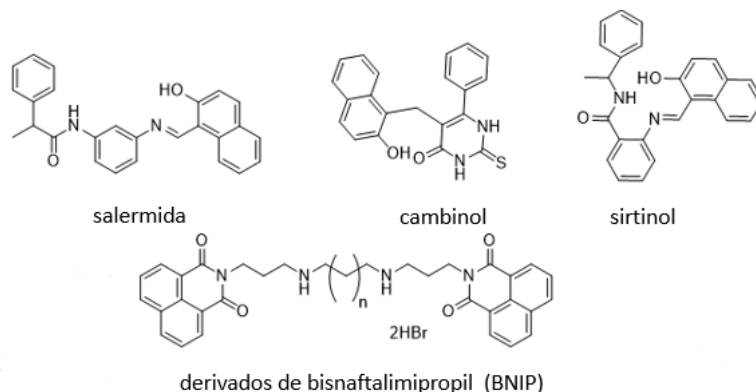
al., 2016; DAI et al., 2019; MONALDI et al., 2019).

A validação do alvo bioquímico é uma etapa essencial na descoberta de novos fármacos, que em sua maioria, são inibidores que bloqueiam a função de uma proteína-alvo. Estudos validaram a Sir2 de alguns parasitas como alvos promissores na busca de candidatos a fármacos. Essas validações foram realizadas por modelos experimentais utilizando parasitas *Knockout* e, também, por inibição desta proteína. (SMITH, 2003; GOMES et al., 2021).

Neste sentido, verificou-se, por meio de ensaios de deleções, que a Sir2 é essencial para *L. infantum*, pois em sua ausência (*LiSir2rp1*) o parasita não sobreviveu (RELIGA; WATERS, 2012; MITTAL; MUTHUSWAMI; MADHUBALA, 2017; GOMES et al., 2021). Já em *S. mansoni* (*SmSir2*) a validação ocorreu após resultados satisfatórios utilizando uma série de pirimido [4,5-d] pirimidina (MONALDI et al., 2019). Em *T. cruzi*, estudos apontaram que inibidores de sirtuína contra *TcSir2p3*, afetaram o crescimento e viabilidade de epimastigotas, além de controlar a infecção parasitária *in vivo*. (MORETTI et al., 2015).

A validação genética para a *TcSir2rp1* foi realizada por Gaspar e colaboradores, para melhor avaliar o papel da proteína no *T. cruzi* e o seu grau de infectividade. Inicialmente o gene da *TcSir2rp1* foi inserido em um vetor de superexpressão pTcINDEX, e logo após esta etapa, ocorreu o nocaute sequencial do mesmo. Neste mesmo trabalho, foi investigado a ação dos derivados de bisnaftalimipropil (BNIP) frente a *TcSir2rp1 in vitro* (Figura 5). O composto BNIP Espermidina (BNIPSpd) apresentou atividade semelhante ao benznidazol contra amastigotas, forma evolutiva clinicamente importante (GASPAR et al., 2018). Vistos os estudos realizados em Sir2 de *T. cruzi*, ambas são essenciais para a sobrevivência do parasita.

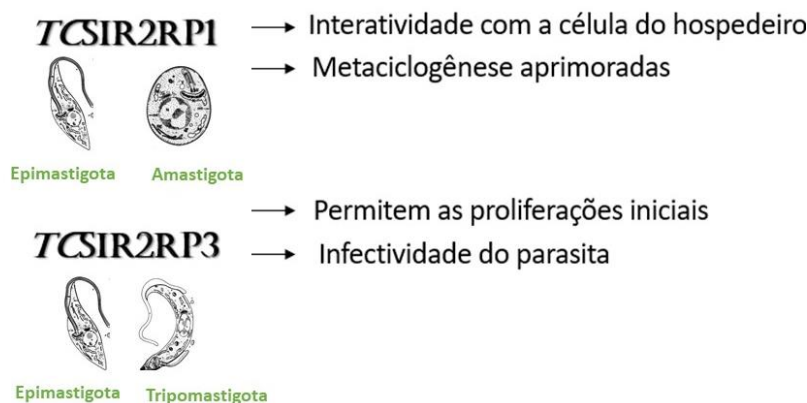
**Figura 5:** Estrutura dos inibidores de sirtuínas relacionados, sirtinol, derivados de bisnaftalimipropil cambinol e salermida.



**Fonte:** Adaptado de GOMES et al 2021.

Embora as Sir2 estejam presentes em todos os ciclos evolutivos de *T. cruzi*, a *TcSir2rp1* (localizada no citoplasma) é mais expressa em amastigotas e epimastigotas. Está envolvida em processos de diferenciação entre os estágios no ciclo de vida parasitário, e garantem também a invasão em células hospedeiras (Figura 6). Já *TcSir2rp3* (localizada na mitocôndria) são amplamente expressos em epimastigotas e tripomastigotas. E quando são superexpressas garantem o desenvolvimento, proliferação do parasita na célula hospedeira e, também, são consideradas fundamentais para a sobrevivência do parasita, reforçando a diretriz a se considera-la como um alvo promissor anti- *T. cruzi* (RITAGLIATI et al., 2015; MORETTI et al., 2015; MITTAL; MUTHUSWAMI; MADHUBALA, 2017; BASTOS et al., 2019; GOMES et al., 2021).

**Figura 6:** Esquema dos processos nas quais as enzimas *TcSir2rp1* e *TcSir2rp3* estão envolvidas no *Trypanosoma cruzi*.



**Fonte:** Elaborada pela autora.



Além disso, análises filogenéticas demonstraram que embora a *TcSir2rp1* está relacionada à SIRT2 e SIRT3 humanas. A SIRT2, apresenta apenas 29% de identidade com a enzima parasitária (*TcSir2rp1*), já em relação a SIRT3, esta apresenta 24% de identidade com a *TcSir2rp1*. Desta maneira, visto a baixa similaridade/ identidade acredita-se que este alvo seja adequado na busca de compostos inibitórios como promissores anti- *T.cruzi* (SOARES et al., 2012; HAILU et al., 2017, BASTOS et al., 2020; GOMES et al., 2021).

#### **1.8. TRIAGEM BIOLÓGICA AUTOMATIZADA EM LARGA ESCALA (HTS – HIGH THROUGHPUT SCREENING)**

Uma das metodologias que têm se destacado para obtenção de novas substâncias bioativas é a triagem biológica de alta demanda (*HTS- high throughput screening*). Caracterizada por ensaios com um grande número de compostos químicos, oriundos de fontes conhecidas, frente à alvos selecionados. Essa estratégia permite a identificação de moléculas ativas e possibilita descoberta de novos *hits*. Sua aplicação trouxe ao universo farmacêutico, avanços tecnológicos e científicos, em decorrência da capacidade de analisar centenas ou até milhões de compostos diariamente (FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2011; ALLAN; STOJDL; SWIFT, 2016; KEMPA et al., 2018; MALINOWSKA et al., 2022).

Embora seja considerado um método promissor, limitações são identificados, como o surgimento de falso-positivos nos ensaios bioquímicos de inibições (FERREIRA et al., 2010; CARAUS et al., 2015). Nesse sentido, muitos *hits* selecionados podem não ter ação por meio de inibições clássicas, e podem estar relacionados a artefatos devido a metodologia escolhida, tais como: (alta fluorescência e/ou absorvância), agregações, ou inibições promíscuas. Devido a isto, após as triagens iniciais é necessário realizar ensaios secundários para a confirmação de resultados, trazendo confiabilidade e robustez na seleção dos compostos promissores (Figura 7) (FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2011; GENICK et al., 2014; HOLENZ; STOY, 2018).

**Figura 7:** Esquemática do funcionamento da triagem biológica de alta escala (HTS).

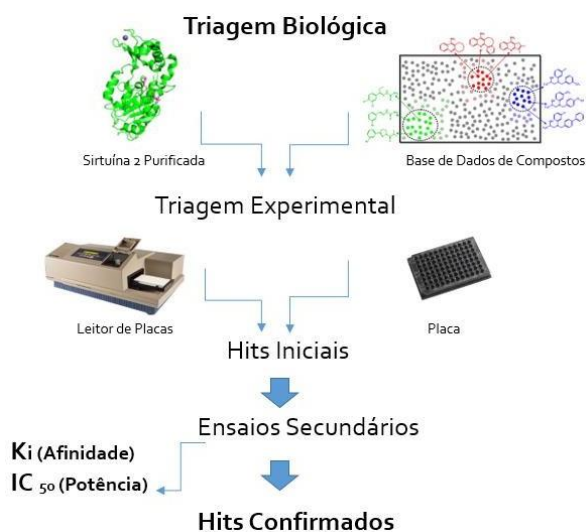


**Fonte:** Adaptado de: FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2011.

A estratégia de HTS tem utilização mais abrangente do que apenas como ferramenta para triar compostos (ENGEL et al., 2010).

Diante disto, nos baseamos nesta metodologia para desenvolver a triagem biológica da biblioteca de compostos LITEC (Laboratório de Integração entre Técnicas Experimentais e Computacionais no planejamento de Fármacos (FCF/USP). Esse estudo foi realizado por fluorimetria em um leitor de placa com o objetivo de selecionar novos *hits* inibidores da Sirtuína 2 de *T. cruzi* (*TcSir2rp1*) (Figura 8).

**Figura 8:** Esquema da triagem biológica de compostos da biblioteca LITEC frente a enzima de sirtuína2 (*TcSir2rp1*).



**Fonte:** Elaborada pela autora.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. GERAL

Triagem biológica para identificação de compostos inibidores da enzima Sirtuína 2 do *Trypanossoma cruzi* (Sir2) como candidatos a fármacos anti- *T. cruzi*.

### 2.2. ESPECÍFICOS

- Expressar e purificar TcSir2rp1;
- Padronização dos ensaios de inibição enzimática;
- Realizar ensaios em dose única de 100  $\mu$ M da coleção de compostos do Laboratório de Integração entre Técnicas Experimentais e Computacionais (LITEC) contra a TcSir2rp1;
- Determinação da potência (IC<sub>50</sub>) de compostos selecionados.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE *TcSir2rp1*

O gene que codifica a sequência da proteína *TcSir2rp1* foi clonado no plasmídeo pET24a\_*TcSir2rp1*(+) (Novagen®) com cauda de poli-histidina (6xHis) na porção C-terminal para auxiliar na purificação, utilizando a resina de níquel Ni-NTA. O plasmídeo pET24a\_*TcSir2rp1* foi transformado por choque térmico, isto é, (30 minutos no gelo, 40 segundos à 42°C e em 5 minutos novamente no gelo) em cepa de *Escherichia coli* Artic Express (DE3) que possui 2 chaperonas (Cpn60 e Cpn10) que auxiliam o enovelamento da proteína recombinante. As células transformadas foram incubadas à 37°C em meio Luria-Bertani (LB) com 30 µg/ml de canamicina, sob agitação de 150 rpm, até atingir densidade ótica de 0,6 à 600nm. Após esta etapa, a expressão foi induzida adicionando uma concentração de 0,8mM de *Isopropil β-galactopiranosídeo* (IPTG) (Termo Fisher Scientific) e as células foram incubadas à 12°C, sob agitação de 200 rpm por 16 horas. Em seguida as células foram centrifugadas sob agitação 6000 rpm, a 4°C por 30 minutos, e então separadas do sobrenadante, passando para as etapas de purificação.

#### 3.2. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE *TcSir2rp1*

A purificação iniciou-se após a ressuspensão do pellet de bactérias, obtido da expressão (item 3.1), em tampão de lise (200mM NaCl, 5% glicerol, 5 mM 2-mercaptoetanol em tampão HEPES 25mM 0,5 mM PMSF, 1 mg/ml lisozima, pH 7.5). As células foram lisadas imersas em gelo por sonificação (5 pulsos de 12s com intervalos de 50s em amplitudes de 30% em Branson Sonifier 250 (Branson Instruments, Stanford, US). O lisado solúvel foi separado por centrifugação e o sobrenadante foi adicionado em resina de níquel Ni-NTA (agarose) 1:0.1, sendo essa mistura incubada por 5 minutos. Após esse período, a resina foi lavada 5 vezes com tampão de lise contendo concentrações de 20 mM, 40 mM, 60 mM e 300mM de imidazol para remover as proteínas contaminantes. A segunda etapa da purificação consistiu-se em cromatografia de troca iônica utilizando uma coluna MonoQ 5/50 equilibrada em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7.2 (tampão A) sob um gradiente linear de 0 — 100% de tampão B (tampão A acrescido de 1M NaCl) durante 25 volumes de coluna. As frações de pico contendo a proteína purificada teve seu tampão trocado pela 25mM Tris-HCl, pH 8 com 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl e 1 mM

MgCl<sub>2</sub> usando uma coluna HiTrap Desalting (GE Healthcare). As frações contendo proteína pura foram reunidas e a proteína foi concentrada para 1 mg/mL.

A determinação da concentração da proteína purificada foi realizada por meio do método do ácido bicinconínico (BCA 4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolina). Esta metodologia se baseia na redução de Cu<sup>2+</sup> em Cu<sup>1+</sup> em meio alcalino originado das proteínas desnaturadas após serem submetidas à temperatura de 60°C por 7 minutos. A detecção do Cu<sup>1+</sup> complexado com BCA é detectado por absorvância. A reação resulta em uma coloração púrpura, sendo que uma maior concentração proteica se dá por maior intensidade de cor. A leitura da absorvância foi realizada a 562 nm. Avaliação da purificação foi feita por meio gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970; WALKER, 2002).

O processo de obtenção da proteína foi realizado com o auxílio do Dr. Vitor Medeiros Almeida e do doutorando Felipe Akihiro Otsuka do Instituto de Química-USP sob orientação do Prof. Dr. Sandro Roberto Marana.

### 3.3. ESTUDO CINÉTICO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA *TcSIR2rp1*

A atividade enzimática foi determinada por método de fluorimetria. A fluorescência medida se dá a partir da hidrólise do substrato peptídico sintético (*Abz-Gly-Pro-acetil-Lys-Ser-Gln-EDDnp* (Amino Tech)), o qual, em um primeiro momento, é deacetilado pela enzima (*TcSir2rp1*) e posteriormente clivado por tripsina (MORETTI et al. 2015).

A reação enzimática ocorre em duas etapas, sendo a primeira caracterizada pela ação da *TcSir2rp1*, que deacetila o substrato peptídico sintético *Abz-Gly-Pro-acetil-Lys-Ser-Gln-EDDnp*, que possui um grupo fluorescente (*Abz*, ácido orto-aminobenzóico) e um grupo apagador (*EDDnp*, N-[2,4-dinitrofenil] etilenediamina), e a segunda etapa, consiste na adição da nicotinamida (Sigma-Aldrich) e tripsina (Sigma-Aldrich). A nicotinamida bloqueia a reação enzimática, já a tripsina, hidrolisa a ligação entre Pro-Lys do substrato peptídico sintético, o que resulta na liberação do grupo fluorescente. Dessa maneira, a detecção da fluorescência é diretamente proporcional ao aumento da atividade enzimática da *TcSir2rp1* e a sua diminuição foi consequência da ação dos inibidores na reação (MORETTI et al. 2015).

Os experimentos de determinação das constantes enzimáticas ( $K_M$ ) dos dois substratos (substrato peptídico e NAD<sup>+</sup>) foram realizadas para a padronização do ensaio de inibição. O objetivo desta etapa foi determinar as concentrações adequadas

de ambos substratos.

Toda a padronização do ensaio foi realizada mantendo a concentração da *TcSir2p1* em 1  $\mu\text{M}$ . Para a determinação do ( $K_M$ ) do substrato peptídico fixamos a concentração do  $\text{NAD}^+$  em excesso. Assim como, para identificar o  $K_M$  do  $\text{NAD}^+$  foi fixado a concentração do substrato peptídico em excesso. O volume final da reação foi de 100  $\mu\text{L}$ .

A placa foi incubada e monitorada por 1 hora a 37  $^\circ\text{C}$ , sendo que o ponto foi lido a cada 8 minutos, sendo os tempos: 5, 13, 21, 29, 37 e 45, 53, 60 minutos. A reação foi interrompida no poço referente a cada ponto de leitura pela adição do tampão da enzima (25 mM Tris-HCl pH 8,0, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ) contendo 4 mM de nicotinamida e 0,2 mg/mL de tripsina. A placa foi lida imediatamente, em um comprimento de onda de 320 nm para excitação e 420 nm para emissão no leitor de placas SpectraMax M2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) na temperatura de 30  $^\circ\text{C}$ .

O  $K_M$  foi calculado com base na equação 1, onde  $V$  é a velocidade inicial da reação.  $V_M$  é a velocidade máxima atingida na reação,  $[S]$  é a concentração do substrato e  $K_M$  é uma medida da afinidade da enzima pelo substrato.

$$V = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

### Equação 1

#### 3.4. ENSAIOS DE INIBIÇÃO DA *TcSir2rp1*

Os ensaios de inibição enzimática da *TcSir2rp1* foram realizados com base no protocolo de MORETTI e colaboradores, 2015 e adaptado em nosso grupo de pesquisa. Desta maneira, os ensaios de inibição foram realizados nas seguintes condições: em placa preta de 96 poços (Costar®/ Black) foi adicionado uma solução do composto candidato a inibidor, sendo sua concentração final de 100  $\mu\text{M}$ . Sequentemente, é adicionado o tampão da enzima (25 mM Tris- HCl pH 8.0, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ), contendo 1  $\mu\text{M}$  da *TcSir2rp1* e 50  $\mu\text{M}$   $\text{NAD}^+$  (Sigma- Aldrich). Em seguida, foi adicionado o tampão da enzima contendo 10

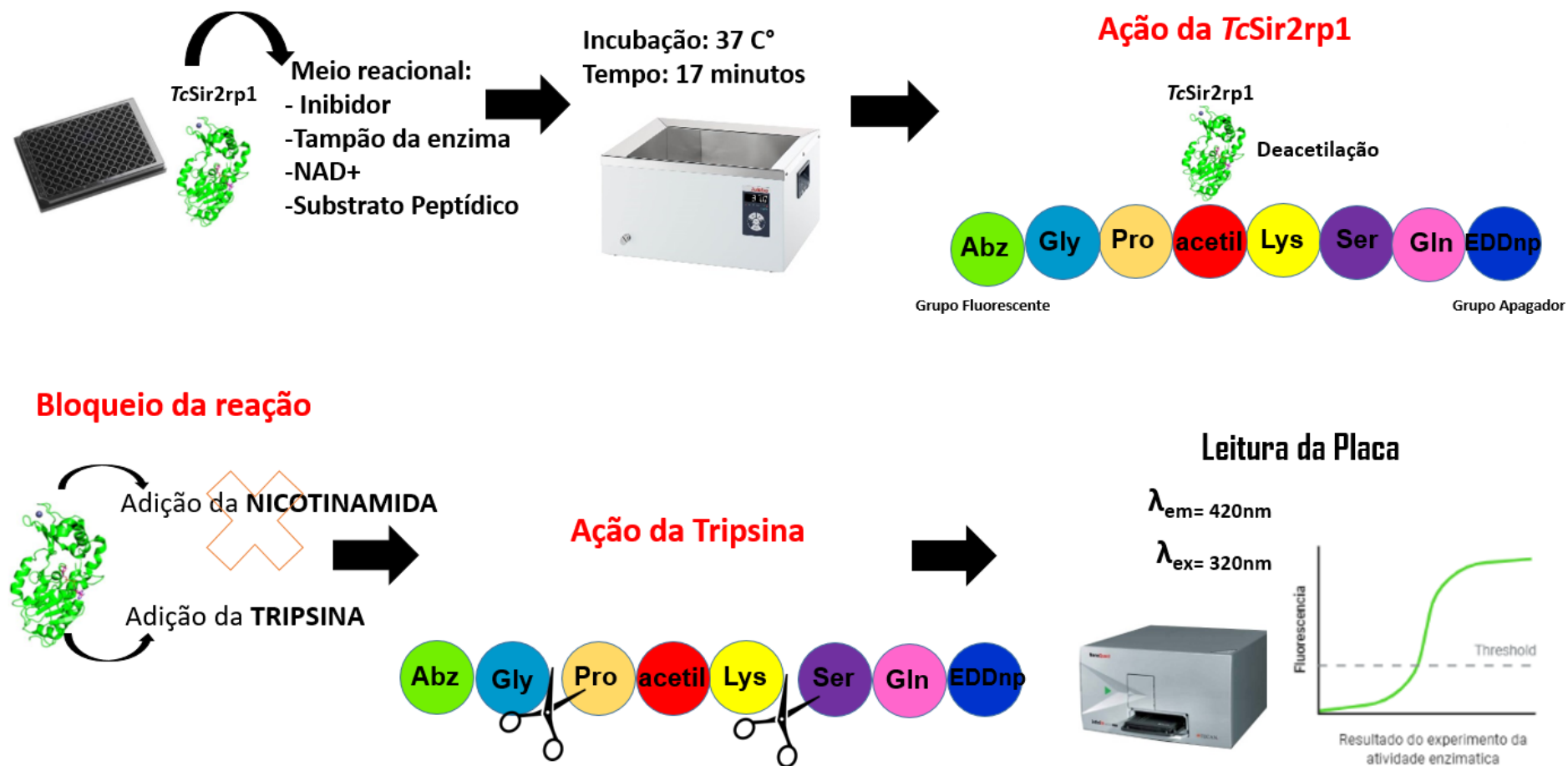
$\mu\text{M}$  do *Abz-Gly- Pro-acetyl-Lys-Ser-Gln-EDDnp*. O volume final da reação foi de 100  $\mu\text{L}$ , com uma concentração final de DMSO no ensaio de 4%.

A placa foi incubada por 17 minutos a 37 C°. Após a incubação, adicionou-se tampão contendo 4 mM de nicotinamida e 0,2 mg/mL de tripsina. A placa foi lida em um comprimento de onda de 320 nm excitação e 420 nm de emissão em leitor de placas SpectraMax M2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) a temperatura de 30 C° (Figura 9).

A atividade da enzimática *TcSir2rp1* foi verificada indiretamente pela diferença da fluorescência obtida pela clivagem do substrato e o controle. Os ensaios foram realizados em triplicata e a atividade enzimática obtida em porcentagem, bem como seus desvios padrão.

A avaliação da inibição enzimática frente aos compostos do LITEC foi realizada inicialmente em dose única de 100  $\mu\text{M}$ . Para o controle negativo em todos os ensaios foi utilizado 5  $\mu\text{L}$  de DMSO, sendo a concentração final no ensaio de 5%, em substituição ao composto.

**Figura 9:** Visão geral do ensaio biológico com a *TcSir2rp1* *in vitro*.



Fonte: Elaborada pela autora.



### 3.5. DETERMINAÇÃO DE POTENCIA (IC<sub>50</sub>) DE INIBIDORES DE *TcSir2rp1*

A determinação de potência foi realizada para três chalconas que se destacaram nos ensaios de dose única. Para isso, foram efetuados ensaios com diferentes concentrações dos compostos seguindo protocolo descrito anteriormente. O IC<sub>50</sub> foi calculado com base na equação 2, onde [I] é a concentração do inibidor e IC<sub>50</sub> corresponde a dose capaz de inibir 50% da atividade da *TcSir2rp1*:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{100}{1 + ([I]/IC_{50})}$$

**Equação 2**

### 3.6. BIBLIOTECA DE COMPOSTOS

Os 82 compostos utilizados neste estudo foram sintetizados e caracterizados no Laboratório de Integração entre Técnicas Experimentais e Computacionais da FCF-USP, sendo que todos apresentaram mais que 95% de pureza (GATTI, 2015, 2018; VITAL, 2013). Todos os compostos foram armazenados em uma solução estoque de DMSO (10 mM) a -20°C.

## 4. ANÁLISES ESTATÍSTICA

Os valores de inibição obtidos para os 82 compostos triados foram submetidos a análises no software Microsoft Excel, o que possibilitou o cálculo da porcentagem da atividade enzimática da *TcSir2p1* em dose única de 100 µM. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

Os derivados da classe das chalconas que se destacaram na dose de 100 µM, foram submetidas a determinação de potência. Sendo o valor do IC<sub>50</sub> obtidos por cálculo de regressão não linear no programa software Prism GraphPad 7.0.

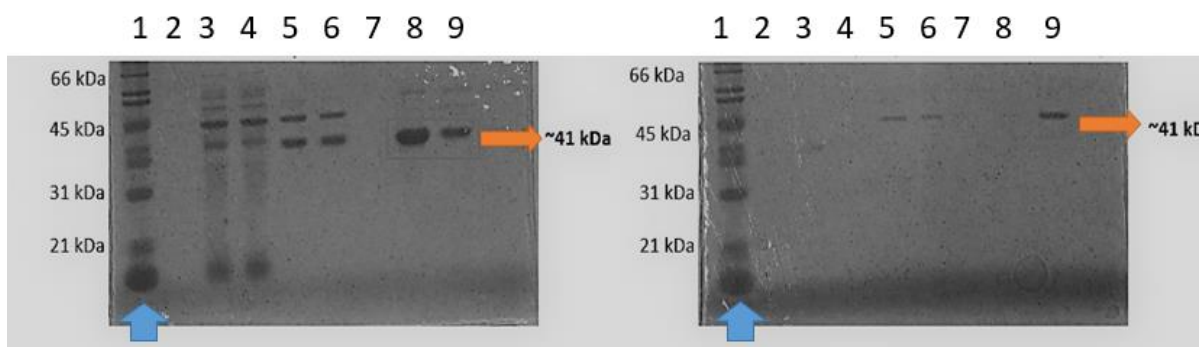
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA *TcSir2rp1*

A etapa de expressão da proteína *TcSir2rp1* foi realizada em sistema heterólogo, *E. coli* ArticExpress (DE3). Nesta cepa, continha uma cópia da T7 RNA polimerase que na presença de IPTG, foi induzido à expressão. Para garantir a seleção das culturas modificadas, utilizou-se 30 µg/ml de canamicina. Desta maneira, a T7 RNA polimerase se ligou ao sítio promotor T7 do plasmídeo pET24a\_ *TcSir2rp1*(+), o que permitiu a expressão da proteína do estudo. A presença das chaperonas Cpn10 e Cpn60, no sistema de expressão, foi essencial para a etapa de purificação e aumentando o rendimento da *TcSir2rp1* (GRÄSLUND et al., 2008). Por meio da sonificação, as células foram lisadas. O material resultante do lisado celular foi centrifugado por 30 minutos, para assegurar que os dentritos celulares e frações insolúveis fossem separados do sobrenadante (fração solúvel), na qual continha a proteína *TcSir2rp1*.

Para facilitar a purificação utilizou-se a cromatografia de afinidade, que interagiu com a cauda de poli-histidina (6xHis) na porção C-terminal do gene, nesta etapa do processo. Dessa maneira, a proteína marcada com His foi purificada por resina de alta afinidade, contendo esferas de agarose magnéticas de Ni-NTA. Assim, as esferas ligadas à proteína do estudo foram lavadas cinco vezes com tampão de lise contendo 20 mM 40 mM, 60 mM e 300 mM de imidazol, no qual permitiu a separação das proteínas contaminantes da *TcSir2rp1* (GUTIÉRREZ et al., 2018; WANG et al., 2020). Além disso, devido a utilização da cepa com chaperonas, foi necessário adicionar mais uma etapa de purificação, a cromatografia de troca iônica em coluna MonoQ® 5/50 com gradiente de 0 - 1 M de NaCl. A MonoQ® 5/50, é uma coluna aniônica, isto é, contém carga positiva o que possibilita a agregação de proteínas de cargas negativas. Foi utilizado tampão de NaCl a 1M para purificação da proteína de estudo por cromatografia de troca iônica. Assim, os íons de Cl<sup>-</sup> deslocam a *TcSir2rp1* da coluna MonoQ, em tempo diferente das impurezas que tinha menor ou maior afinidade com a coluna. O produto da purificação foi analisado em gel SDS-PAGE o qual apresentou uma banda no peso molecular de 41 kDa, semelhante ao peso teórico de aproximadamente 39 kDa (Figura 10) da *TcSir2rp1*. Esse resultado nos dá indicativa da obtenção da proteína em questão.

**Figura 10:** Análise das etapas de purificação por SDS-PAGE da proteína recombinante *TcSir2rp1*.

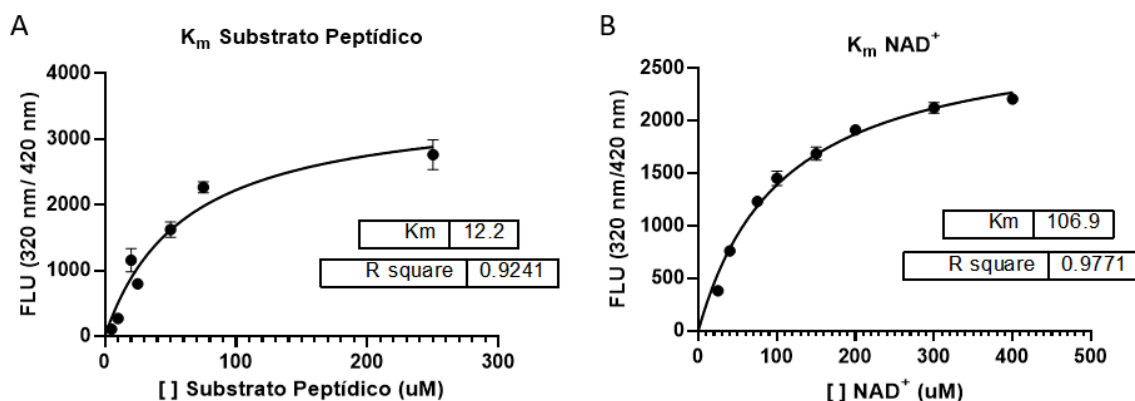


As setas laranjas indicam a proteína recombinante com o peso molecular de aproximadamente 41 kDa. As setas azuis são os padrões de peso molecular. **Figura 10 A:** Da esquerda para a direita **1)** padrão de peso molecular, **2)** nada adicionado, **3)** sobrenadante do lisado, **4)** fração que não adsorveu à resina de níquel Ni-NTA, **5)** primeira fração da eluição com tampão contendo 20 mM imidazol, **6)** segunda fração da eluição com tampão contendo 40 mM imidazol, **7)** nada adicionado, **8)** primeira fração da eluição com tampão contendo 300 mM imidazol, **9)** segunda fração da eluição com tampão contendo 300 mM imidazol. **Figura 10 B:** da esquerda para a direita **1)** padrão de peso molecular, **2 - 4)** primeiras frações eluídas da coluna MonoQ de troca iônica, **5- 9)** frações contendo os picos de absorvância.

## 5.2. ESTUDO CINÉTICO DA ENZIMA *TcSir2rp1*

Os experimentos para determinação da constante de *Michaelis-Menten* da *TcSir2rp1* e seus respectivos substratos, foram feitos em triplicata com a colaboração do Dr. Vitor M. Almeida e do Prof. Dr. Sandro R. Marana do IQ-USP. Estes foram realizados com o intuito de estabelecer condições necessárias para os ensaios de inibição. A determinação das constantes cinéticas se deu mantendo a concentração da *TcSir2rp1* em 1  $\mu\text{M}$ . Para o substrato peptídico, a concentração do  $\text{NAD}^+$  foi mantida em excesso (600  $\mu\text{M}$ ), enquanto a do substrato peptídico variou entre 5  $\mu\text{M}$  e 250  $\mu\text{M}$ , em um total de 7 concentrações. Para a constante do  $\text{NAD}^+$ , a concentração do substrato peptídico foi de 500  $\mu\text{M}$ , e a do  $\text{NAD}^+$  variou entre 25  $\mu\text{M}$  e 400  $\mu\text{M}$ , total de 8 concentrações (Figura 11).

**Figura 11:** Determinação do  $K_m$  do substrato peptídico e do  $NAD^+$ .



Curva hiperbólica da velocidade da reação pela concentração dos substratos. **A)** Gráfico referente a determinação do  $K_m$  do substrato peptídico; **B)** Gráfico referente a determinação do  $K_m$  do  $NAD^+$ . Todas as leituras foram feitas em triplicata. Os parâmetros cinéticos foram calculados utilizando o programa GraphPad Prism 7.0 por meio da regressão não linear e a escolha da opção cinética da enzima *Michaelis-Menten*.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

Conforme a disponibilização dos substratos no meio reacional, foi observado o aumento da velocidade da reação. O valor do  $K_M$  obtido para o substrato peptídico e o  $NAD^+$  foram  $K_M = 12 \pm 12 \mu M$  ( $r^2 = 0,92$ ) e  $K_M = 106,9 \pm 9,1 \mu M$  ( $r^2 = 0,97$ ), respectivamente (Figura 11 **A-B**). O modelo cinético proposto por *Michaelis e Menten* em 1913, é o mais utilizado para a representação da hipérbole visualizada (Figura 11). O  $V_M$  é a velocidade máxima, na qual a enzima se encontra saturada pela alta concentração dos substratos. Já o  $K_M$ , é conhecido como a constante de *Michaelis*, que é a concentração de substrato necessária para que a metade da velocidade máxima da reação seja atingida. Dessa maneira, quanto menor for o  $K_M$ , maior é a afinidade da enzima pelo substrato testado.

Os resultados destes experimentos para o  $K_M$  do substrato peptídico e  $NAD^+$  foram utilizados para a determinação das suas concentrações nos ensaios de inibição enzimática. De acordo com os resultados obtidos, este parâmetro foi escolhido visando o seguinte ponto: concentrações que evitasse com que a enzima se encontrasse saturada no meio reacional. Desta maneira, foram estabelecidos:  $10 \mu M$  e  $50 \mu M$  para o substrato peptídico e  $NAD^+$ , respectivamente.

### 5.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE *TcSIR2RP1*

Para a avaliação da atividade enzimática, investigamos a influência dos componentes do ensaio na fluorescência. Assim, realizamos experimentos em diferentes condições (Tabela 1):

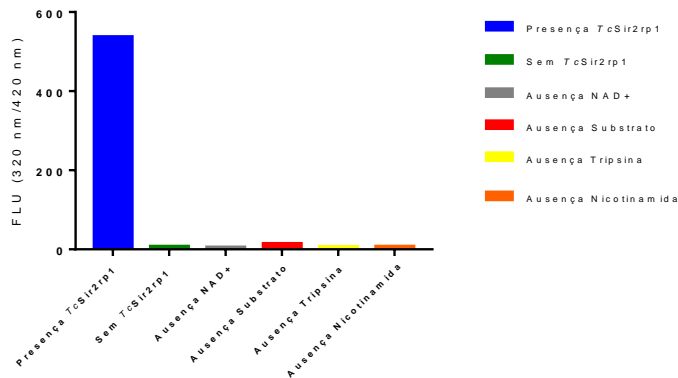
**Tabela 1-** Representação do ensaio biológico com ou sem os componentes.

Teste 1	<i>TcSir2rp1</i>	Tampão	NAD <sup>+</sup>	Substrato Peptídico	Tripsina	Nicotinamida
Teste 2	X	Tampão	NAD <sup>+</sup>	Substrato Peptídico	Tripsina	Nicotinamida
Teste 3	<i>TcSir2rp1</i>	Tampão	X	Substrato Peptídico	Tripsina	Nicotinamida
Teste 4	<i>TcSir2rp1</i>	Tampão	NAD <sup>+</sup>	X	Tripsina	Nicotinamida
Teste 5	<i>TcSir2rp1</i>	Tampão	NAD <sup>+</sup>	Substrato Peptídico	X	Nicotinamida
Teste 6	<i>TcSir2rp1</i>	Tampão	NAD <sup>+</sup>	Substrato Peptídico	Tripsina	X

Todos estes ensaios foram realizados nas mesmas condições do item 3.4. Todos estes ensaios foram feitos sem a adição de inibidores.

Cada componente que constitui o ensaio enzimático foi testado separadamente, a fim de identificar o seu comportamento sob a condição de fluorescência em 320 nm de excitação e 420 nm de emissão, e consequentemente identificar a sua influência no meio reacional. Os resultados obtidos confirmaram que a reação da enzima *TcSir2rp1* ocorre somente no Teste 1 (Tabela 1), pois foi possível visualizar uma fluorescência mais intensa quando comparadas aos outros poços. Comprovando que os outros componentes não emitem fluorescência nas condições testados, diminuimos então a incidência de falsos resultados e, consequentemente, a robustez do método. Na figura abaixo, o gráfico demonstra os resultados dos testes da tabela 1 (Figura 12).

**Figura 12:** Atividade enzimática e fluorescência detectada apenas na presença da *TcSir2rp1*.



**Fonte:** Elaborada pela autora.

Para determinação do tempo de incubação do ensaio foi avaliado a atividade enzimática da *TcSir2rp1* em função do tempo. Desta maneira, a atividade da *TcSi2rp1* foi monitorada em intervalo de 0 a 57 minutos (0, 2, 10, 17, 25 e 33, 41, 49 e 57 minutos). O gráfico da atividade enzimática em função do tempo, indica a saturação da atividade enzimática, linearidade, ou seja, deacetilação total do substrato pela *TcSir2rp1* (Figura 13 A). No gráfico 13 B, observa-se o período de reação inicial, sendo que aos 17 minutos, a velocidades da reação se manteve linear ( $r^2= 0,99$ ). Assim, determinou-se o tempo de 17 minutos para a incubação do ensaio de inibição, evitando a saturação da *TcSir2rp1* no meio reacional (Figura 13 B).

**Figura 13:** Curva de atividade enzimática em função do tempo e determinação do tempo de incubação.

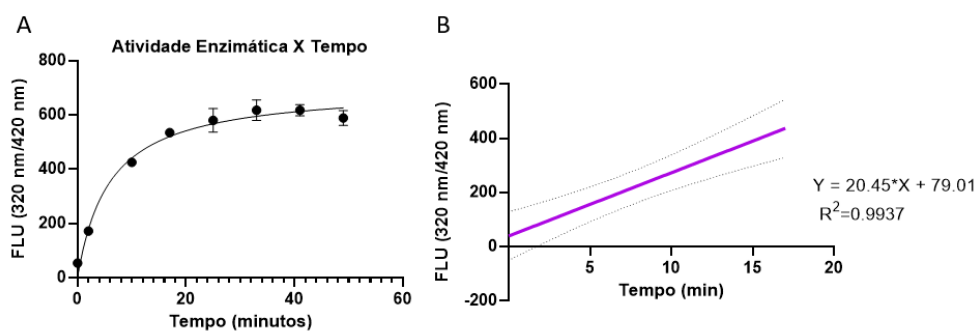


Figura **A**: Atividade enzimática de *TcSir2rp1* em função do tempo. Figura **B**: Plotagem do período inicial da reação, indicando a linearidade na velocidade.

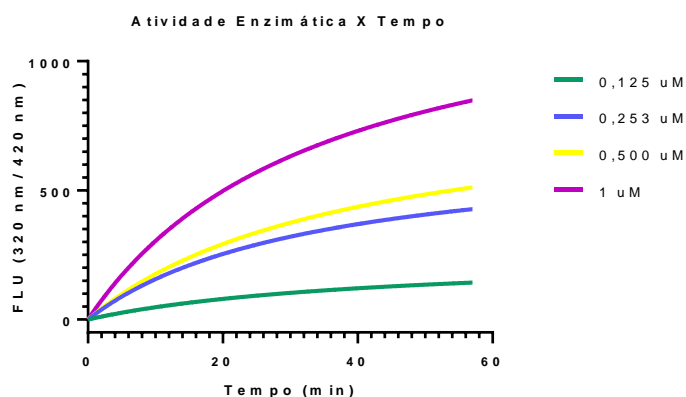
**Fonte:** Elaborada pela autora.

#### 5.4. PADRONIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA *TcSir2rp1*

A padronização da atividade enzimática é essencial para que possamos seguir com novos ensaios, desta maneira, este experimento é repetido rotineiramente após

a produção e purificação de novas amostras da enzima recombinante *TcSir2rp1*, visto a necessidade de se confirmar atividade e concentração a ser utilizada. Portanto, realizamos o mesmo experimento de atividade enzimática, sem inibidores, testando a concentração da enzima *TcSir2rp1* em 0,125  $\mu\text{M}$ , 0,253  $\mu\text{M}$ , 0,500  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$  (Figura 14). Os testes com a enzima recentemente purificada nas concentrações de 0,125  $\mu\text{M}$  e 0,253  $\mu\text{M}$  (verde e azul) mostram atividades enzimáticas menores comparados com a atividade enzimática mensurada na Figura 13-A até o tempo de 17 minutos. A enzima na concentração de 0,500  $\mu\text{M}$  (amarelo) foi a que obteve atividade semelhante comparada com a referência (Figura 13-A), portanto usamos a enzima nesta concentração para os próximos ensaios enzimáticos. A enzima na concentração de 1  $\mu\text{M}$  (roxo) apresentou um aumento de atividade enzimática incompatível de acordo com a atividade da amostra de referência, por isso não foi usada. Com os testes iniciais de atividade enzimática, melhoramos a reprodutividade dos resultados de inibição e as variáveis que não podiam ser controladas das preparações da *TcSir2rp1* em diferentes dias, como por exemplo, a fração de enzima ativa e inativa de cada preparação que podem variar dependendo do dia que foi feita. É importante ressaltar, que até o fim deste trabalho, foi utilizado a concentração de 1  $\mu\text{M}$  para *TcSir2rp1* para todos os experimentos. Esta padronização da atividade enzimática foi realizada para a continuidade dos experimentos de  $\text{IC}_{50}$ , que não entrou nos resultados desta dissertação.

**Figura 14:** Efeito da alteração da concentração de *TcSir2rp1* em gráfico de curva de atividade em função do tempo.



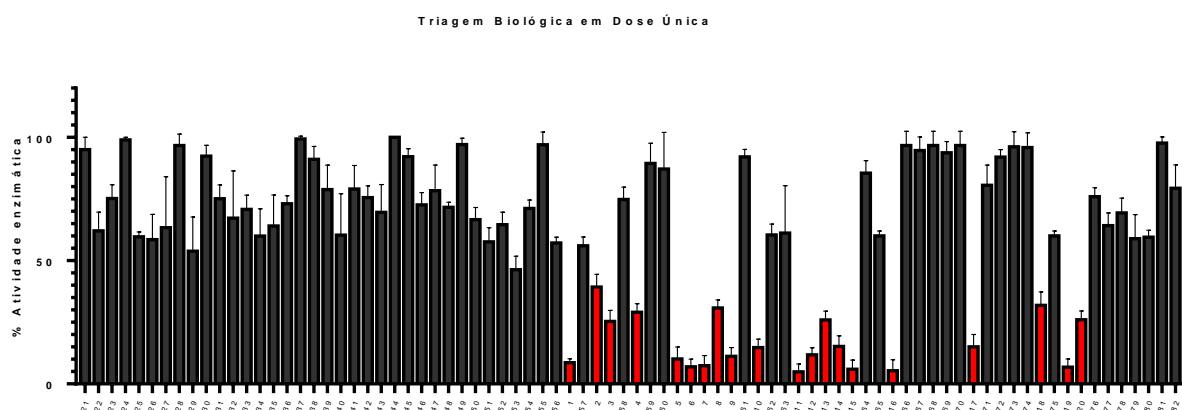
Atividade enzimática da *TcSir2rp1* em diferentes concentrações da enzima: Verde- 0,125  $\mu\text{M}$ , Azul- 0,253  $\mu\text{M}$ , Amarelo- 0,500  $\mu\text{M}$  e Roxo- 1  $\mu\text{M}$ . Os experimentos foram feitos de acordo com o item 3.4., sem a presença de inibidores. O tempo e temperatura da incubação foi de 57 minutos e 37  $^{\circ}\text{C}$ .

**Fonte:** Elaborada pela autora.

## 5.5. TRIAGEM BIOLÓGICA: ENSAIO DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA DA *TcSir2rp1* EM DOSE ÚNICA

A avaliação dos compostos que compõem a biblioteca LITEC foi realizada, inicialmente, em dose única de 100  $\mu$ M. Os experimentos foram realizados nas condições previamente estabelecida (item 3.4). A figura 15, apresenta os dados de inibição da *TcSir2rp1* pelos compostos testados. Sendo que, os que inibiram mais de 50% da enzima, em vermelho, serão submetidos à outros estudos (Figura 15).

**Figura 15:** Modulação da atividade enzimática da *TcSir2rp1* recombinante diante dos compostos da biblioteca LITEC testados em dose única de 100  $\mu$ M.



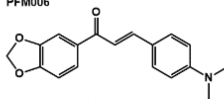
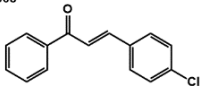
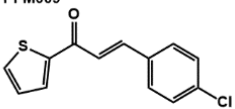
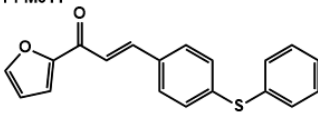
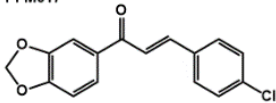
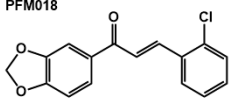
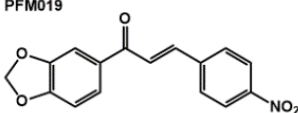
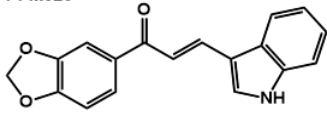
Compostos referente a barra: cinza-escuro não inibiram a atividade enzimática de *TcSir2rp1* em mais de 50%. Já os compostos mais ativos frente a enzima são apresentados pelas barras em vermelho. Todo o ensaio foi feito em triplicata para obter a (%) de atividade enzimática.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

Como pode ser observado na figura acima, 62 dos compostos testados não inibiram a atividade enzimática da *TcSir2rp1* em mais de 50%. Como os compostos estão divididos por grupos, utilizaremos essa denominação para discutir os resultados. Do grupo FG, DV e Ecar, 36 compostos foram testados, porém não apresentaram atividade acima de 50%. Dos 10 compostos do grupo G, apenas 1 se destacou, **17**, com o qual a enzima teve (15  $\pm$ 0%) de atividade, isto é, aproximadamente 85% de inibição pelo composto. Do grupo PFM, 13 compostos, 8 apresentam inibições acima de 50% (**1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8**). Do grupo FM, 10 compostos, 7 apresentaram inibição da atividade enzimática acima de 50% (**9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15**). Apresentaram, ainda, inibição da atividade enzimática considerada satisfatória, 3 compostos do grupo HI (**18, 19 e 20**). Já do do grupo CC, dos 3 compostos testados apenas o composto **16** se destacou inibindo quase que totalmente a atividade da enzima na concentração utilizada, sendo sua atividade de 99% de inibição, sendo este o mais promissor.



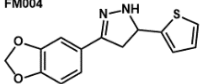
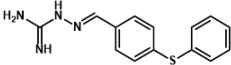
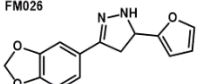
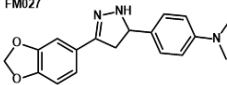
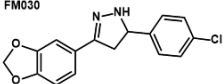
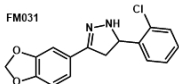
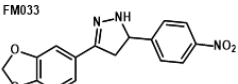
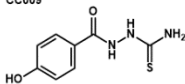
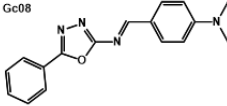
**Tabela 2-** Estrutura 2D e porcentagem da atividade enzimática dos **20** compostos promissores frente a enzima *TcSir2rp1*.

COMPOSTO	MOLÉCULA	% ATIVIDADE ENZIMÁTICA (100 $\mu$ M) <sup>a</sup> $\pm$ D.P
1	<p>PFM006</p> 	7 $\pm$ 5
2	<p>PFM008</p> 	34 $\pm$ 8
3	<p>PFM009</p> 	21 $\pm$ 2
4	<p>PFM011</p> 	25 $\pm$ 4
5	<p>PFM017</p> 	5 $\pm$ 4
6	<p>PFM018</p> 	4 $\pm$ 5
7	<p>PFM019</p> 	8 $\pm$ 4
8	<p>PFM023</p> 	35 $\pm$ 3

(continua)

(continuação)

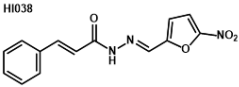
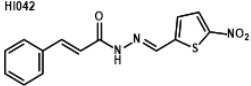
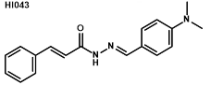
**Tabela 2** – Estrutura 2D e porcentagem da atividade enzimática dos **20** compostos promissores frente a enzima *TcSir2rp1*

COMPOSTO	MOLÉCULA	% ATIVIDADE ENZIMÁTICA (100 $\mu$ M) <sup>a</sup> $\pm$ D.P
9	FM004 	10 $\pm$ 0
10	FM017 	11 $\pm$ 4
11	FM026 	2 $\pm$ 5
12	FM027 	10 $\pm$ 3
13	FM030 	30 $\pm$ 7
14	FM031 	20 $\pm$ 4
15	FM033 	3 $\pm$ 2
16	CC008 	1 $\pm$ 0
17	Gc08 	15 $\pm$ 0

(continua)

(continuação)

**Tabela 2** – Estrutura 2D e porcentagem da atividade enzimática dos **20** compostos promissores frente a enzima *TcSir2rp1*.

COMPOSTO	MOLÉCULA	% ATIVIDADE ENZIMÁTICA (100 µM) <sup>a</sup> ±D.P
18		28 ± 3
19		4 ± 1
20		23 ± 3

<sup>a</sup> Os compostos foram testados em 3 medidas para obter a média da % da atividade enzimática.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

Os grupos que apresentaram inibições frente a *TcSir2rp1* foram o PFM (1, 57, 2, 3, 58, 4, 59, 60, 5, 6, 7, 8 e 9) identificados como chalconas, o FM (61, 10, 62, 63, 11, 12, 13, 14, 15 e 64), caracterizados como pirazolinás, o HI (67, 75, 19, 20, 76, 77, 78, 79 e 80) são da classe N- acil hidrazonas e os grupos CC (65, 16 e 66) e GC (69, 70, 17, 71, 72, 73, 74, 18, 80 e 82) são acil thiosemicarbazidas e amino oxazol, respectivamente. Estes compostos foram planejados a partir da estratégia LBDD (*Ligand- Based Drug Design*), um planejamento baseado na estrutura do ligante, para o tratamento de doenças parasitárias como a DC, leishmaniose visceral e malária. Sendo esse, um dos motivos para escolhermos todos estes compostos para a triagem biológica deste trabalho.

Podemos observar na tabela 2 acima que o grupo PFM (chalconas), apresentou o maior número de inibidores da *TcSir2rp1*, com 8 compostos. Por conta disto, foram avaliados quanto a sua potência (IC<sub>50</sub>).

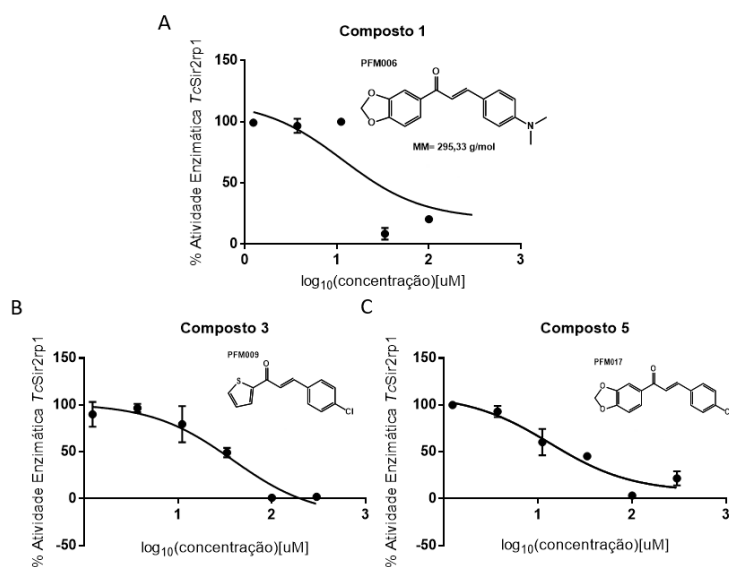
## 5.6. DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DE INIBIÇÃO DA ENZIMA *TcSir2rp1*

Devido ao fato das chalconas serem vistas como estruturas privilegiadas na

Química Medicinal, e também ao fato de estar listados como um dos maiores grupos de produtos naturais bioativos (JASIM et al., 2021), avaliar a potência desta classe de compostos frente a TcSir2rp1 é relevante. Unido a isso, o grupo de derivados de chalconas foi o que teve maior porcentagem de compostos com inibição da enzima alvo acima de 50% em dose de 100  $\mu\text{M}$ . Diante disso, selecionou-se 3 compostos desta classe química para a determinação de potência. Ressaltamos que os compostos selecionados se destacaram na triagem inicial, sendo que dois deles inibiram mais de 90% da atividade enzimática sendo o **1**- 93%, **5** 95%) e **3** 79%. Todos foram testados em diferentes concentrações contra a TcSir2rp1 em diluições seriadas (3 vezes) para a determinação da concentração que promove 50% de inibição. Para a concentração mínima utilizamos 1,23  $\mu\text{M}$  e como concentração máxima 300  $\mu\text{M}$  (Figura 16).

Embora todos os compostos sejam caracterizados como chalconas, apresentaram potências distintas, o que indica a influência dos grupos químicos substituintes na atividade biológica. O composto **1** se mostrou o mais potente contra a TcSir2rp1 com um  $\text{IC}_{50}$  de 11,65  $\mu\text{M}$  (Figura 16 A), seguida pelo composto **5** ( $\text{IC}_{50}$ = 19,88  $\mu\text{M}$  (Figura 16 C) e pelo composto **3**, que foi o menos potente, apresentando valor de  $\text{IC}_{50}$  de 38,5  $\mu\text{M}$  (Figura 16 B).

**Figura 16:** Curva concentração-resposta dos compostos **1**, **3** e **5**.



\*Todos os testes foram realizados em triplicata.

**Fonte:** Elaborado pela autora.

Além das características citadas acima, as chalconas também podem ser facilmente sintetizadas, isto é, a partir de compostos aromáticos simples, são versáteis e possuem uma vasta gama de atividades biológicas (ZHUANG et al., 2017). Dentre estas podemos citar: atividades biológicas antitumorais, antidiabéticos e antiinflamatórias (ELKHALIFA et al., 2021).

Porém, são necessários estudos mais detalhados para identificar a toxicidade do composto, bem como o mecanismo enzimático pelo qual ocorre a inibição frente a enzima.

## 6. CONCLUSÃO

Nesta dissertação estão descritos os principais resultados obtidos pelo emprego das técnicas de biologia molecular e ensaios de inibição em triagem biológica na busca de inibidores de Sir2 de *T. cruzi*.

A obtenção da enzima *TcSir2rp1* recombinante de *T. cruzi* foi realizada com sucesso. Foram estabelecidas as condições ideais para os ensaios biológicos com a enzima produzida. Isso nos permitiu realizar uma triagem biológica de uma série de compostos da biblioteca do LITEC. De um total de 82 compostos, identificados na primeira triagem, apenas 20 inibiram a *TcSir2rp1* em mais de 50%, os quais foram considerados *hits*.

Dentre os 20, determinou-se a potência de 3 compostos classificados como chalconas. Esses compostos foram escolhidos, porque além de se destacarem na triagem em dose única, existem relatos na literatura de chalconas como potentes tripanocidas. Assim, o composto **1** foi o mais potente apresentando um valor de  $IC_{50} = 11,65 \mu M$ , nesse sentido é possível afirmar que as chalconas relatadas neste trabalho podem ser identificadas como inibidoras da *TcSir2rp1* de *T. cruzi*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAN, K. J; STOJDL, D. F; SWIFT, S. L. High-throughput screening to enhance oncolytic virus immunotherapy. **Oncolytic Virother**, v. 2016, n. 1, p. 15-25, 2016.

ALBERCA, R, W. et al.; Case Report: COVID-19 and Chagas Disease in Two Coinfected Patients. **Am J Trop Med Hyg**, v.103, n. 6, p. 2353- 2356, 2020.

AN, W. F; TOLLIDAY, N.; Cell-Based Assays for High-Throughput Screening. **Molecular Biotechnology**, v. 45, n. 2, p. 180-186, 2010.

ANGHEBEN, A et al.; Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non- endemic countries. **Blood Transfusion**, v. 13, n. 4, p. 540-550, 2015.

ASHENDEN, S. K.; Screening Library Design. Methods in Enzymology. **Methods Enzymol**, v. 610, p. 73-96 ,2018.

APT, W. Treatment of Chagas' disease with itraconazole: electrocardiographic and parasitological conditions after 20 years of follow-up. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 9, p. 2164–2169, 2013.

BASTOS, T. M. et al. Chemical Constituents of *Anacardium occidentale* as Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Sirtuins. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1299, 2019.

BASTOS, T. M et al. Identification of Inhibitors to *Trypanosoma cruzi* Sirtuins Based on Compounds Developed to Human Enzymes. **Int J Mol Sci**, v.21, n. 10, p. 3659, 2020.

BATISTA, C et al., Tratamento- Desafios e oportunidades ao tratamento da doença de Chagas – perspectivas da DNDi- Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/pessoas-afetadas/tratamento-2/>> (Acessado em: 17 de março de 2022).

BONA, E. D. et al. Autoimmunity in Chronic Chagas Disease: A Road of Multiple Pathways to Cardiomyopathy?. **Front Immunol**. v. 9, n. 1842, 2018.

BORCHHARDT, D. M. et al. Biochemical evaluation of a series of synthetic chalcone and hydrazide derivatives as novel inhibitors of cruzain from *Trypanosoma cruzi*. **J. Braz. Chem. Soc**. v. 21, n. 1, p. 142-150, 2010.

BORTOLUZZI, A. A. M. et al. Determination of chemical structure and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of extracts from the roots of *Lonchocarpus cultratus* (Vell.) A.M.G. Azevedo & H.C. Lima. **Saudi J Biol Sci**, v. 28, n. 1, p. 99-108, 2021.

BERN, C et al. *Trypanosoma cruzi* and Chagas Disease in the United States. **Clin Microbiol Rev**, v. 24, n. 4, p. 655-681, 2011.

BERN, C,. Chagas Disease. **New England Journal Of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456-466, 2015.

CABRA, C. R. N. S. et al. Development method of dissolution of the tablet pharmaceutical form of Benznidazole 12.5 mg Lafepe. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 3, p. 2185-2195, 2019.

CALDAS, I. S.; SANTOS, E. G.; NOVAES. An evaluation of benznidazole as a Chagas

disease therapeutic. **Journal Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 15, p. 1797-1807, 2019.

CARAFÁ, V. et al. Sirtuin functions and modulation: from chemistry to the clinic. **Clinical Epigenetics**, v. 8, n. 61, p. 1-21, 2016.

CARAU, I. et al. Detecting and overcoming systematic bias in high-throughput screening technologies: a comprehensive review of practical issues and methodological solutions. **Briefings in Bioinformatics**, v. 16, n. 6, p. 974-986, 2015.

CASCORBI, I.; SCHWAB, M. Epigenetics in Drug Response. **Clin Pharmacol Ther**, v. 99, n. 5, p. 468-470, 2016.

CASTRO, S. L.; SOEIRO, M. N. C. **Drogas tripanossomicidas - Estudos pré-clínicos da doença de Chagas.** Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/tratamento/>> Acesso em: 24 de março de 2022.

CAVALLI, G.; HEARD, E. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. **Nature**, v. 571, n. 7766, p. 489-499, 2019.

CDC- Parasites- American Trypanosomiasis (also know A Chagas Disease) Center for Disease Control and Prevention 2017. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>> Acesso em 23 de março de 2022.

COPELAND, R. A. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*; John Wiley & Sons, 2004.

CORTES-SERRA, N. et al. State-of-the-art in host-derived biomarkers of Chagas disease prognosis and early evaluation of anti-*Trypanosoma cruzi* treatment response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. **Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 7, 165758, 2020.

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

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. 7301, p S6–S7, 2010.

CUCUNUBÁ, Z. M. Increased mortality attributed to Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. **Parasites & Vectors**, v.9, n. 1, p. 42, 2016.

DAI, H. et al. Sirtuin activators and inhibitors: Promises, achievements, and challenges. **Pharmacol Ther**, v. 188, p. 140–154, 2018.

D' ARGENIO, V.; Opinion The High-Throughput Analyses Era: Are We Ready for the Data Struggle?. **High Throughput**, v. 7, n. 1, p. 8, 2018.

DAWSON, M. A; KOUZARIDES, T.; Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. **Cell**, v. 150, n. 1, p. 12-27, 2012.

DE- SIMONE S. G. Metabolic Alteration of *Trypanosoma cruzi* during Differentiation of Epimastigote to Trypomastigote Forms. **Pathogens**, v. 11, n. 2, p. 268, 2022.

DNDI. **Drugs for Neglected Diseases initiative.** Disponível em: <<https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/>> Acesso em: 20 de abril. 2020.

DNDI. **DNDi welcomes the findings of the 2019 G-FINDER report.** Disponível em: <<https://dndi.org/statements/2020/g-finder-report-2019/>> Acesso em: 21 de março de 2022.

DNDI. O que é a doença de Chagas. Disponível em : <<https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/>> Acesso em 22 de março de 2022.

ECHEVERRIA, L. E; MORILLO, C. A.; American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 119–134, 2019.

ELHAMAMSY, A. R.; DNA methylation dynamics in plants and mammals: overview of regulation and dysregulation. *Cell Biochemistry and Function*. **Cell Biochemistry and Function**, v. 34, n. 5, p. 289–298, 2016.

ELKHALIFA, D et al.; A comprehensive review on the antiviral activities of chalcones 2021. **J Drug Target**, v. 29, n. 4, p. 403-419, 2020.

ENGEL, J. C. et al. Image-Based High-Throughput Drug Screening Targeting the Intracellular Stage of *Trypanosoma cruzi*, the Agent of Chagas Disease. **Agents Chemother**, v. 54, n. 8, p. 3326–3334, 2010.

ENGELS, D; ZHOU, X. N. Neglected tropical diseases: an effective global response to local poverty-related disease priorities. **Infect Dis Poverty**, v. 28, n. 1, 2020.

ENTZEROTH, M; FLOTOW, H; CONDRON, P. Overview of High-Throughput Screening. **Current Protocols in Pharmacology**, v. 44, n. 1, p. 9.4.1-9.4.27, 2009.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Drug Trials Snapshots: LAMPIT. Disponível em: <<https://www.fda.gov/drugs/development-approval-process-drugs/drug-trials-snapshots-lampit>>. Acesso em: 23 de março. 2021.

FERREIRA, I.L. M; SILVA, T. P. T. Transmission elimination of Chagas' disease by *Triatoma infestans* in Brazil: an historical fact. **Rev. Soc. Bras. Trop**, v. 39, n. 5, p. 507-509, 2006.

FERREIRA, G. M. et al. *Trypanosoma cruzi* Sirtuin-2 construction by Modeling threading and Molecular Dynamics. **ACS Chemical Biology**. [s.l: s.n.]. p. 2651991.

FERREIRA, R. S; GLAUCIUS, O; ANDRICOPULO, A. D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. **Quím. Nova**, v. 34, n. 10, p. 1770-1778, 2011.

FERREIRA, R. S. et al. Historical Perspective and Human Consequences of Africanized Bee Stings in the Americas. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part B**, v. 15, n. 2, p. 97-108, 2012.

FERREIRA, R. S. et al. Complementarity Between a Docking and a High-Throughput Screen in Discovering New Cruzain Inhibitors. **J. Med. Chem**, v. 53, n. 13, p. 4891–4905, 2010.

FERREIRA, L. L. G; DE OLIVEIRA, M. T; ANDRICOPULO, A. D.; Advances and Progress in Chagas Disease Drug Discovery. **Curr Top Med Chem**, v. 16, n. 20, p. 2290-2302, 2016.

FERREIRA, L. L. G; ANDRICOPULO, A. D.; Drugs and Vaccines in the 21st Century for Neglected Diseases. **Lancet Infect Dis**, v. 19, n. 2, p. 125-127, 2019.

FIOCRUZ. **Agência Fiocruz de Notícias**. Disponível

Em:<<https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>> Acesso em: 20 de abril. 2020.

FONSECA- BERZAL, C. et al. Antichagasic, Leishmanicidal, and Trichomonacidal



Activity of 2-Benzyl-5-nitroindazole-Derived Amines. **Chem Med Chem**, v. 13, n. 12, p. 1246-1259, 2018.

FRADE, V.P. et al. Population pharmacokinetic modeling of benznidazole in Brazilian patients with chronic Chagas disease. **Rev Inst Med Trop**, v. 64, e4, 2022.

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

GASPAR, L. et al. Inhibitors of Trypanosoma cruzi Sir2 related protein 1 as potential drugs against Chagas disease. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 12, n. 1, p. e0006180, 2018.

GATTI, F. M.; **Síntese e avaliação biológica de sulfonil- hidrazonas análogos do nitrofural como candidatos a antichagásicos**. Dissertação (Mestrado em Ciência: Fármacos e Medicamentos) - Faculdades de Ciência Farmacêutica, Universidade de São Paulo, p. 43. 2015.

GATTI, F. M.; **Compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$ - insaturados e hidrazonas sintéticas como antiparasitários**. Tese (Doutorado em Ciência Toxicologia e Análises Toxicológicas) - Faculdades de Ciência Farmacêutica, Universidade de São Paulo, p. 67. 2019.

GAYON, J.; From Mendel to epigenetics: History of genetics De Mendel à l'épigénétique : histoire de la génétique. **Comptes Rendus Biologies**, v. 339, n. 7-8, p. 225-230, 2016.

GENICK, C. C. et al. Applications of Biophysics in High-Throughput Screening Hit Validation. **J Biomol Screen**, v. 19, n. 5, p. 707-714, 2014.

GOMES R. A. et al.; Paraitic sirtuin 2 as an opportunity in drug discovery. **Future Medicinal Chemistry**. V. 13, n. 16, p. 1397-1409, 2021.

GRÄSLUND, S., et al. Protein production and purification. **Nature methods**, v. 5, n. 2, p. 135, 2008.

GUARNER, J. Chagas disease as example of a reemerging parasite. Seminars in Diagnostic Pathology. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 36, n. 3, p. 164-169, 2019.

GUTIÉRREZ, J. G. et al. Expression and Ni-NTA-Agarose Purification of Recombinant Hepatitis C Virus E2Ectodomain Produced in a Baculovirus Expression System. **Bio Protocol**, v. 8, n. 19, e3030, 2018.

HAILU, G. S. et al. Lysine Deacetylase Inhibitors in Parasites: Past, Present, and Future Perspectives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 12, p. 4780-4804, 2017.

HARVEY, Z. H; CHEN, Y; JAROSZ, D. F.; Protein-based inheritance: Epigenetics beyond 1 the chromosome. **Mol Cell**, v. 69, n. 2, p. 195-202, 2018.

HASSEL, K. N.; Histone Deacetylases and Their Inhibitors in Cancer Epigenetics. **Diseases**, v. 7, n. 4, p. 57, 2019.

HONG, J. H; LIN, H.; Sirtuin Modulators in Cellular and Animal Models of Human

- Diseases. Front Pharmacol**, v. 12, n. 735044, 2021.
- HOLENZ, J; STOY, P. Advances in Lead Generation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 29, n. 4, p. 517-524, 2018.
- HOSSAIN, E. et al. Mapping of host-parasite-microbiome interactions reveals metabolic determinants of tropism and tolerance in Chagas disease. **Sci Adv**, v. 6, n. 30:eaaz2015, 2020.
- HOTEZ, P. J. et al, 2020. World neglected tropical diseases day. **Plos Negl Trop Dis**, v. 14(1):e 0007999, 2020.
- HU, X; ZHENG, W.; Chapter One - Chemical Probes in Sirtuin Research. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 154, n. 1, p. 1-24, 2018.
- HWANG, J. Y; AROMOLARAN, K. A; ZUKIN, R. S. The emerging field of epigenetics in neurodegeneration and neuroprotection. **Nat Rev Neurosci**, v. 18, n. 6, p. 347-361, 2017.
- JASIM, H. A. et al. Chalcones: Synthetic Chemistry Follows Where Nature Leads. **Biomolecules**, v. 11, n. 8, p. 1203, 2021.
- KAUR, S; SHIVANGE, A. V; ROY, N. Structural analysis of trypanosomal sirtuin: an insight for selective drug design. **Molecular Diversity**, v. 14, n. 1, p. 169-178, 2009.
- KOURBELI, V. et al., An Overview on Target-Based Drug Design against Kinetoplastid Protozoan Infections: Human African Trypanosomiasis, Chagas Disease and Leishmaniases. **Molecules**. v. 26, n. 15, p. 4629, 2021.
- KELLY et al. Inhibitors of human histone deacetylase with potent activity against the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Bioorg. Med. Chem.** v. 22, n. 5, p. 1886–1890, 2012.
- KEMPA, E. et al. High Throughput Screening of Complex Biological Samples with Mass Spectrometry – From Bulk Measurements to Single Cell Analysis. **The Analyst**, v. 144, n. 3, p. 872-891, 2018.
- KLOHE, K. et al. The 2017 Oslo conference report on neglected tropical diseases and emerging/re-emerging infectious diseases – focus on populations underserved. **Infect Dis Poverty**, v. 8, n. 1, p. 40, 2019.
- KRATZ, J. M. et al. Drug discovery for chagas disease: A viewpoint. **Acta Tropica**, v. 198, n. 105107, 2019.
- LAEMMLI, J. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p- 680-685, 1970.
- LEPESHEVA, G. I; VILLALTA, F; WATERMAN, M. R. Targeting *Trypanosoma cruzi* Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase (CYP51). **Adv Parasitol**, v. 78, p. 65-87, 2011.
- LI, Y. et al. A mini-review on Sirtuin activity assays. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 467, n. 3, p. 459-466, 2015.
- MACKEY, T. K. et al. Emerging and Reemerging Neglected Tropical Diseases: a Review of Key Characteristics, Risk Factors, and the Policy and Innovation Environment. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 949- 979, 2014.

MALINOWSKA, J. M. et al. Integrating *in vitro* metabolomics with a 96-well high-throughput screening platform. **Metabolomics**, v. 18, n. 1, 2022.

MATOS, M. G. C. et al. Quantum mechanical, molecular docking, molecular dynamics, ADMET and antiproliferative activity on *Trypanosoma cruzi* (Y strain) of chalcone ( *E*)-1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl)-3-(3-nitrophenyl)prop-2-en-1-one derived from a natural product. **Phys Chem Chem Phys**, v. 24, n. 8, p. 5052-5069, 2022.

MEDSCAPE. Doença de Chagas aumenta risco de AVC. Disponível em: <<https://portugues.medscape.com/verartigo/6504695>>. Acesso em: 24 de abril. 2020.

MIJARES, A. et al. Increases in [IP3]i aggravates diastolic [Ca2+] and contractile dysfunction in Chagas' human cardiomyocytes. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 14, n. 4, p. 1-23, 2020.

MITTAL, N; MUTHUSWAMI, R; MADHUBALA.; The mitochondrial SIR2 related protein 2 (SIR2RP2) impacts *Leishmania donovani* growth and infectivity. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 11, n. 5, p. 1-25, 2017.

MOLINA- MORANT, D. et al. Efficacy and safety assessment of different dosage of benznidazol for the treatment of Chagas disease in chronic phase in adults (MULTIBENZ study): study protocol for a multicenter randomized Phase II non-inferiority clinical trial. **Trials**, v. 21, n. 1, p. 328, 2020.

MONALDI, D. et al. Structure–Reactivity Relationships on Substrates and Inhibitors of the Lysine Deacylase Sirtuin 2 from *Schistosoma mansoni* (SmSirt2). **J. Med. Chem.**, v. 62, n. 19, p. 8733–8759, 2019.

MONTANARO, V. V. A. et al. Epidemiology of concurrent Chagas disease and ischemic stroke in a population attending a multicenter quaternary rehabilitation network in Brazil. **Neurological Sciences**, v.40, n. 12, p. 2595-2601, 2019.

MORETTI, N. S. et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* Sirtuins as Possible Drug Targets for Chagas Disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4669-4679, 2015.

MSF. MEDICINA SEM FRONTEIRA. **MSF saúda decisão da OMS de incluir a picada de cobra na lista de doenças tropicais negligenciadas**. Disponível em: <[msf.org.br/noticias/msf-sauda-decisao-da-oms-de-incluir-picada-de-cobra-na-lista-de-doencas-tropicais](https://msf.org.br/noticias/msf-sauda-decisao-da-oms-de-incluir-picada-de-cobra-na-lista-de-doencas-tropicais)> Acesso em: 11 de novembro de 2021.

NHR BRASIL. Doenças Tropicais Negligenciadas. Disponível em: <[www.nhrbrasil.org.br/nhr-brasil/nossas-causas/doencas-tropicais-negligenciadas.html](http://www.nhrbrasil.org.br/nhr-brasil/nossas-causas/doencas-tropicais-negligenciadas.html)> Acesso em: 11 de novembro de 2021.

NI-TREBI, N. I. Emerging and Neglected Infectious Diseases: Insights, Advances, and Challenges. **Biomed Research Internacional**, v. 2017, n. 2017, p. 1-15, 2017.

NICOGLU, A; MERLIN, F.; Epigenetics: A way to bridge the gap between biological fields. **Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences**, v. 66, n. p. 79-82, 2017.

PAHO. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Doenças transmissíveis e**

**análise de situação de saúde.** Disponível em:

<[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_joomlabook&view=topic&id=57](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_joomlabook&view=topic&id=57) >. Acesso em: 10 de novembro 2021.

PAHO. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the diagnosis and treatment of chagas disease.** Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/abc/a/pMFYVgNkwkgDMPbyrhZmZKR/?format=pdf&lang=pt> > Acesso em: 24 de março de 2022.

PAIVA DE CARVALHO, H. et al. Combining an innovative non-invasive sampling method and high-throughput sequencing to characterize fungal communities on a canvas painting. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 145, 104816, 2019.

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

PICCHI, G. F. A. et al. Post-translational Modifications of *Trypanosoma cruzi* Canonical and Variant Histones. **J. Proteome Res.**, v. 16, n. 3, p. 1167–117, 2017.

PINO-MARIN, A. et al. Chagas Cardiomyopathy: From Romaña Sign to Heart Failure and Sudden Cardiac Death. **Pathogens.**, v. 10, n. 5, p. 505, 2021.

POH, W. J; WEE, C. P. P; GAO, Z.; DNA Methyltransferase Activity Assays: Advances and Challenges. **Theranostics**, v. 6, n. 3, p. 369–391, 2016.

RELIGA, A. A; WATERS, A. P.; Sirtuins of parasitic protozoa: In search of function(s). **Mol Biochem Parasitol**, v. 185, n. 2-2, p. 71–88, 2012.

RIBEIRO, V. et al. Current trends in the pharmacological management of Chagas disease. **Int J Parasitol rugs Drug Resist.** v. 12, n. 7, p. 17, 2020.

RIOS, L. E. et al. Immunity and vaccine development efforts against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Trop.** v. 200, n. 105168, 2019.

RITAGLIATI, C. et al. Overexpression of Cytoplasmic TcSIR2RP1 and Mitochondrial TcSIR2RP3 Impacts on *Trypanosoma cruzi* Growth and Cell Invasion. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 9, n. 4, p. e0003725, 2015.

ROSA, E. D. L. et al. Early Detection of Chronic Asymptomatic Chagas Infection. **Med Sci Monit**, v. 24, p. 4567- 4571, 2018.

SAAVEDRA, L. C. et al. Transcriptomic changes across the life cycle of *Trypanosoma cruzi* II. **Perrj**, v. 8, n. e8947, 2020.

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

SANTOS, E. S. et al. Immunomodulation for the Treatment of Chronic Chagas Disease

Cardiomyopathy: A New Approach to an Old Enemy. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 11, n. 765879, 2021.

SALASSA, B. N; ROMANA, P.; Autophagy: a necessary process during the Trypanosoma cruzi life-cycle. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 460-469, 2019.

SARAIVA, R. M.; Chagas heart disease: An overview of diagnosis, manifestations, treatment, and care. **World J Cardiol**, v. 13, n. 12, p. 654-675, 2021.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102. supl. 1, p. 75-86, 2007.

SCHMUNIS, G. A; YADON, Z. E.; Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 14-21, 2010.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T; YARLA, N. S. Recent Advancement against Neglected Diseases. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 18, p. 1520-1521, 2018.

SHINN, P. et al. High-Throughput Screening for Drug Combinations. **Bioinformatics and Drug Discovery**, p. 11-35, 2019.

SILVA-JARDIM, I.; THIEMANN, O. H.; ANIBAL, F. F. Leishmaniasis and Chagas disease chemotherapy: a critical review. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 25, n. 10, p. 1810-1823, 2014.

SMITH, C. Drug target validation: Hitting the target. **Nature**, v. 422, n. 6929 p. 342-345, 2013.

SOARES, M. B. P. et al. Anti-Trypanosoma cruzi activity of nicotinamid. **Acta Tropica**, v. 122, n. 2, p. 224–229, 2012.

SON, S. M. et al. Autophagy regulation by acetylation—implications for neurodegenerative diseases. **Experimental e Molecular Medicine**, v. 53, p. 30-41, 2021.

SONAR, K.; KABRA, R.; SINGH, S.; TryTransDB: A web-based resource for transport proteins in Trypanosomatidae. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 4368, 2018.

SOUTO, E. B. et al. Therapeutic Interventions for Countering Leishmaniasis and Chagas's Disease: From Traditional Sources to Nanotechnological Systems. **Pathogens**, v. 8, n. 3, p. 119, 2019.

SOUZA et al. Triatomine bugs (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in the Domiciles of the Guaribas Valley Territory, in Northeastern Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 53:(e20200177), 2020.

SULLIVAN JR, W. J; NAGULESWARAN, A; ANGEL.; Histones and histone modifications in protozoan parasites. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 12, p. 1850-1861, 2006.

TEIXEIRA, A. R. L. et al. Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 3, p. 598-630, 2011.

TORRICO, F et al. Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with

benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. **Clinical Trial**, v. 18, n. 4, p. 419-430, 2018.

VERGNES, B; GAZANION, E; GRENTZINGER, T.; Functional divergence of SIR2 orthologs between trypanosomatid parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 207, n. 2, p. 96–101, 2016.

VITAL, D. G; **Planejamento, síntese e avaliação biológica de análogos bioestéricos da nitrofurazona: variações de anéis (pirrol e 4-dimetilaminobenzil) e cadeias laterais (semicarbazona, tiossemicarbazona e aminoguanidina)**. Dissertação (Mestrado em Ciência: Fármacos e Medicamentos) - Faculdades de Ciência Farmacêutica, Universidade de São Paulo, p. 64. 2013.

VOSS, A. K; THOMAS, T.; Histone Lysine and Genomic Targets of Histone Acetyltransferases in Mammals. **Bioessays**, v. 40, n. 10, p. 1-16, 2018.

ZAIDEL, E. J. COVID-19: Implications for People with Chagas Disease. **Glob Heart**, v.15, n. 1, p. 69, 2020.

ZHOU, Z. et al. Recent advances in inhibitors of sirtuin1/2: an update and perspective. **Future Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 8, p. 907-934, 2018.

ZHUANG, C. et al Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. **Chem Review**, v. 117, n. 12, p. 7762- 7810, 2017.

WADDINGTON, C.H.; The Epigenotype. 1942. **Int J Epidemiol**, v. 41, n. 1, p. 10-13, 2012.

WALKER, J.M.; The proteins protocols handbook. The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation. Totowa- New Jersey. Humana Press, 2002.

WANDERLEY, D. M. V; CORREA, F. M. A.; Epidemiology of Chagas heart disease. **Sao Paulo Med. J**, v. 113, n. 2, p. 742-749, 1995.

WANG, Y. et al. SIRT2: Controversy and multiple roles in disease and physiology. **Ageing Res Rev**, v. 55, n. 100961, p. 1-15, 2019.

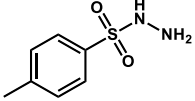
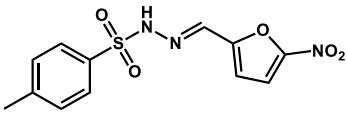
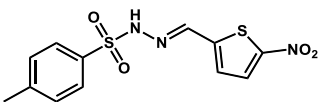
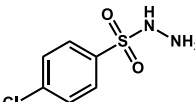
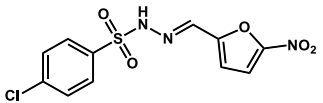
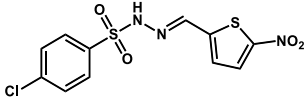
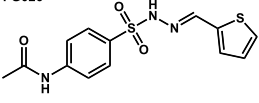
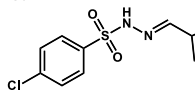
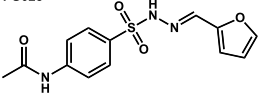
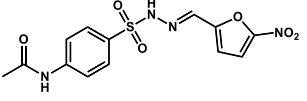
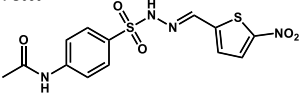
WANG, W. High-efficiency Ni<sup>2+</sup> -NTA/PAA magnetic beads with specific separation on His-tagged protein. **IET Nanobiotechnol**, v. 14, n. 1, p. 67-72, 2020.

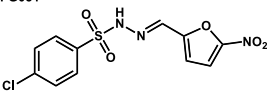
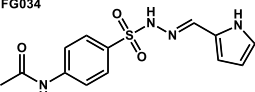
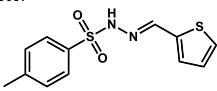
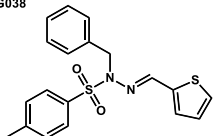
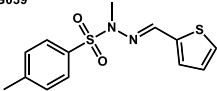
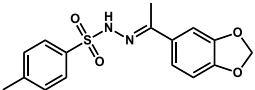
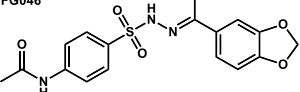
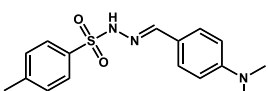
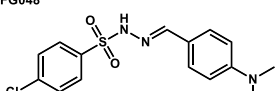
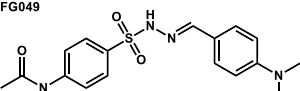
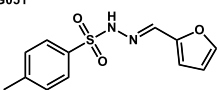
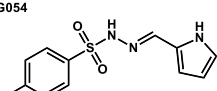
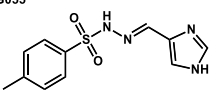
WEISBARTH, R.T. et al. The *Trypanosoma cruzi* RNA-binding protein RBP42 is expressed in the cytoplasm throughout the life cycle of the parasite. **Parasitol Res**, v. 117, n. 4, p. 1095-1104, 2018.

WERNER, R. J; KELLY, A. D; ISSA, J. P. J.; Epigenetics and Precision Oncology. **Cancer J**, v. 23, n. 5, p. 262-269, 2017.

WHO. WORD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas diseases (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/q-a-detail/chagas-disease>>. Acesso em: 25 de março 2022.

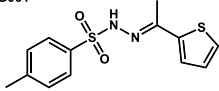
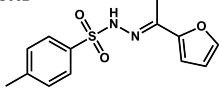
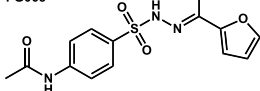
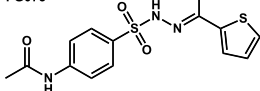
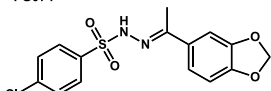
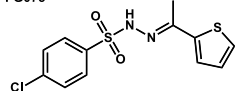
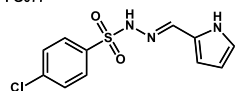
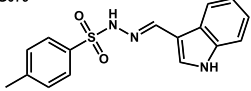
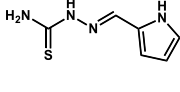
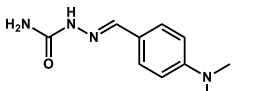
## ANEXOS 1- COMPOSTOS ESTUDADOS

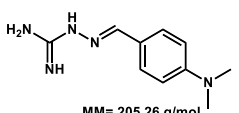
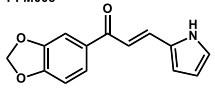
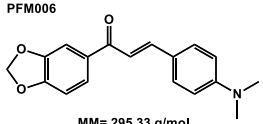
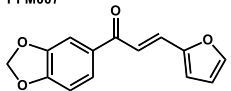
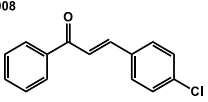
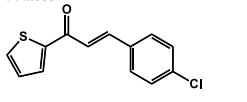
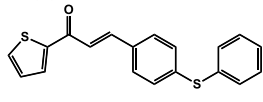
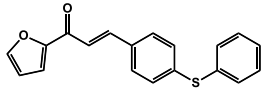
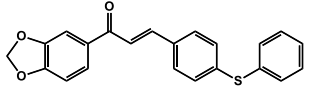
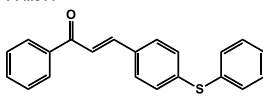
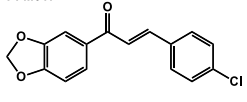
NÚMERO	MOLECULA	DOSE ÚNICA±SD
1	FG009  MM= 186,23 g/mol	>100
2	FG011  MM= 309,30 g/mol	61.29 ± 3.35
3	FG012  MM= 325,36 g/mol	81.10 ± 2.86
4	FG020  MM= 206,65 g/mol	>100
5	FG023  MM= 329,72 g/mol	57.44 ± 1.29
6	FG024  MM= 345,78 g/mol	55.05 ± 1.74
7	FG026  MM= 323,39 g/mol	70.88 ± 1.19
8	FG027  MM= 284,72 g/mol	98.75 ± 1.7
9	FG028  MM= 307,33 g/mol	69.09 ± 1.09
10	FG029  MM= 352,32 g/mol	97.43 ± 2.51
11	FG030  MM= 368,39 g/mol	74.16 ± 1.58

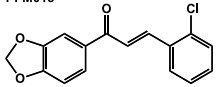
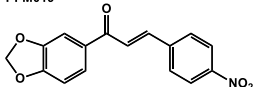
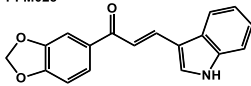
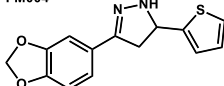
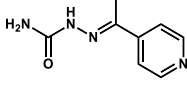
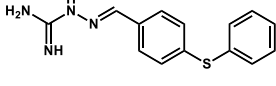
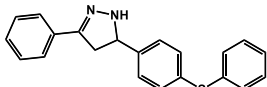
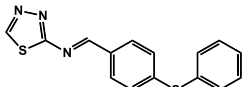
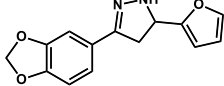
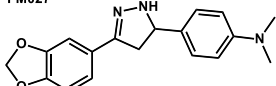
NÚMERO	MOLECULA	DOSE ÚNICA ± SD
12	FG031  MM= 329,72 g/mol	78.50 ± 2.94
13	FG034  MM= 306,34 g/mol	76.86 ± 0.10
14	FG037  MM= 280,37 g/mol	61.18 ± 1.75
15	FG038  MM= 370,49 g/mol	66.37 ± 4.93
16	FG039  MM= 294,39 g/mol	74.13 ± 4.88
17	FG042  MM= 332,37 g/mol	98.01 ± 1.10
18	FG046  MM= 375,40 g/mol	92.83 ± 3.35
19	FG047  MM= 317,41 g/mol	75.60 ± 2.66
20	FG048  MM= 337,82 g/mol	79.79 ± 1.23
21	FG049  MM= 360,43 g/mol	71.75 ± 2.99
22	FG051  MM= 264,30 g/mol	78.02 ± 2.49
23	FG054  MM= 263,32 g/mol	76.85 ± 1.20
24	FG055  MM= 264,30 g/mol	>100

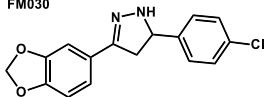
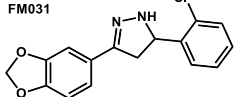
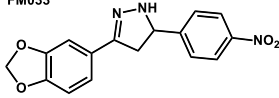
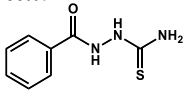
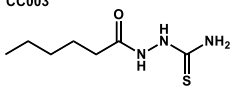
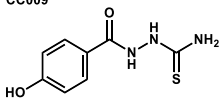
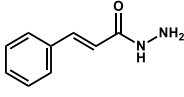
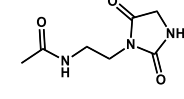
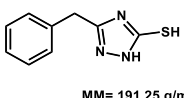


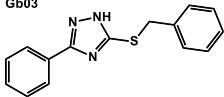
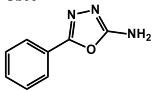
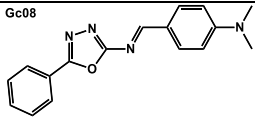
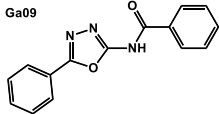
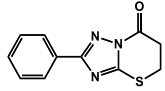
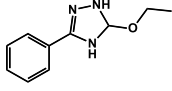
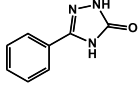
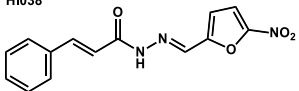
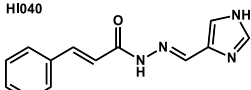
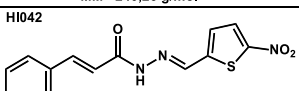
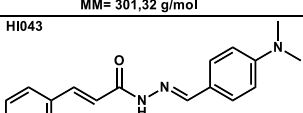
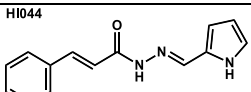


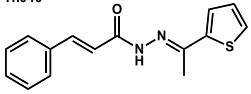
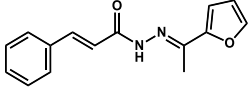
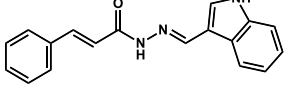
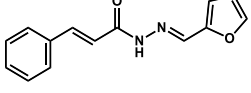
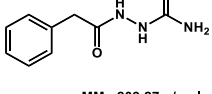
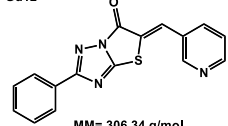
NÚMERO	MOLÉCULA	DOSE ÚNICA ± SD
25	FG061  MM= 294,39 g/mol	88.80 ± 0.86
26	FG062  MM= 278,33 g/mol	69.07 ± 1.11
27	FG068  MM= 321,35 g/mol	75.15 ± 2.04
28	FG073  MM= 337,42 g/mol	73.93 ± 1.40
29	FG074  MM= 352,79 g/mol	96.26 ± 1.61
30	FG075  MM= 314,81 g/mol	68.94 ± 0.02
31	FG077  MM= 283,73 g/mol	61.81 ± 0.90
32	FG079  MM= 313,37 g/mol	63.79 ± 0.09
33	DV007  MM= 168,22 g/mol	49.88 ± 2.05
34	DV013  MM= 206,24 g/mol	68.58 ± 5.09

NÚMERO	MOLÉCULAS	DOSE ÚNICA ± SD
35	DV014b  MM= 205,26 g/mol	>100
36	PFM005  MM= 241,24 g/mol	54.57 ± 1.08
37	PFM006  MM= 295,33 g/mol	6.85 ± 4.52
38	PFM007  MM= 242,23 g/mol	53.11 ± 0.97
39	PFM008  MM= 242,70 g/mol	33.77 ± 8.38
40	PFM009  MM= 248,73 g/mol	21.12 ± 2.42
41	PFM010  MM= 322,44 g/mol	74.32 ± 2.33
42	PFM011  MM= 306,38 g/mol	25.22 ± 4.08
43	PFM012  MM= 360,43 g/mol	93.20 ± 2.94
44	PFM014  MM= 316,42 g/mol	95.40 ± 3.21
45	PFM017  MM= 286,71 g/mol	5.37 ± 4.60

NÚMERO	MOLÉCULAS	DOSE ÚNICA ± SD
46	<p>PFM018</p>  <p>MM= 286,71 g/mol</p>	3.89 ± 5.50
47	<p>PFM019</p>  <p>MM= 297,26 g/mol</p>	8.27 ± 3.91
48	<p>PFM023</p>  <p>MM= 291,30 g/mol</p>	34.35 ± 2.92
49	<p>FM004</p>  <p>MM= 272,32 g/mol</p>	10.56 ± 0.10
50	<p>FM010</p>  <p>MM= 178,19 g/mol</p>	92.34 ± 6.03
51	<p>FM017</p>  <p>MM= 270,35 g/mol</p>	11.26 ± 3.69
52	<p>FM020</p>  <p>MM= 330,45 g/mol</p>	56.27 ± 4.37
53	<p>FM025</p>  <p>MM= 297,40 g/mol</p>	83.41 ± 2.55
54	<p>FM026</p>  <p>MM= 256,26 g/mol</p>	1.67 ± 5.28
55	<p>FM027</p>  <p>MM= 309,36 g/mol</p>	9.45 ± 2.97

NÚMERO	MOLÉCULA	DOSE ÚNICA ± SD
56	<p>FM030</p>  <p>MM= 300,74 g/mol</p>	29.98 ± 7.70
57	<p>FM031</p>  <p>MM= 300,74 g/mol</p>	19.59 ± 4.48
58	<p>FM033</p>  <p>MM= 311,29 g/mol</p>	2.78 ± 2.22
59	<p>CC001</p>  <p>MM= 195,24 g/mol</p>	86.56 ± 0.95
60	<p>CC003</p>  <p>MM= 189,28 g/mol</p>	62.03 ± 0.30
61	<p>CC009</p>  <p>MM= 211,24 g/mol</p>	1.09 ± 0.64
62	<p>HI036</p>  <p>MM= 162,19 g/mol</p>	>100
63	<p>ECar61</p>  <p>MM= 185,18 g/mol</p>	>100
64	<p>Ga04</p>  <p>MM= 191,25 g/mol</p>	>100

NÚMERO	MOLÉCULAS	DOSE ÚNICA ±SD
65	<p>Gb03</p>  <p>MM= 267,35 g/mol</p>	94.32 ± 7.93
66	<p>Gb06</p>  <p>MM= 161,16 g/mol</p>	>100
67	<p>Gc08</p>  <p>MM= 292,34 g/mol</p>	15.12 ± 0.17
68	<p>Ga09</p>  <p>MM= 265,27 g/mol</p>	72.65 ± 7.37
69	<p>Ga13</p>  <p>MM= 231,27 g/mol</p>	92.13 ± 2.15
70	<p>Ga16.1</p>  <p>MM= 191,23 g/mol</p>	99.43 ± 0.54
71	<p>Ga16.2</p>  <p>MM= 161,16 g/mol</p>	98.63 ± 1.34
72	<p>HI038</p>  <p>MM= 285,25 g/mol</p>	27,57±3,20
73	<p>HI040</p>  <p>MM= 240,26 g/mol</p>	58,01±1,30
74	<p>HI042</p>  <p>MM= 301,32 g/mol</p>	3,45± 1,01
75	<p>HI043</p>  <p>MM= 293,36 g/mol</p>	22,98± 2,73
76	<p>HI044</p>  <p>MM= 239,27 g/mol</p>	72,82± 1,43

NÚMERO	MOLECULAS	DOSE ÚNICA ±SD
77	<p>H1046</p>  <p>MM= 270,35 g/mol</p>	62,73± 4,02
78	<p>H1048</p>  <p>MM= 254,28 g/mol</p>	62,97 ± 1,18
79	<p>H1050</p>  <p>MM= 289,33 g/mol</p>	51,74± 5,33
80	<p>H1051</p>  <p>MM= 240,26 g/mol</p>	56,53 ± 0,37
81	<p>Ga02</p>  <p>MM= 209,27 g/mol</p>	>100
82	<p>Gd12</p>  <p>MM= 306,34 g/mol</p>	78,98 ± 2,98

## ANEXOS- ARTIGO PUBLICADO

Review

Future  
**Medicinal  
 Chemistry**

For reprint orders, please contact: [reprints@future-science.com](mailto:reprints@future-science.com)

## Parasitic sirtuin 2 as an opportunity in drug discovery

Renan Augusto Gomes<sup>\*.1</sup> , Evelin Fornari<sup>1</sup> , Ana Carolina Silva Rocha<sup>1</sup> , Gustavo Luis Tripodi<sup>1</sup> , Flavio da Silva Emery<sup>2</sup>  & Gustavo Henrique Goulart Trossini<sup>\*\*1</sup> 

<sup>1</sup>Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, São Paulo, SP, 05508-000, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. do Café, s/n, Ribeirão Preto, SP, 14040-903, Brasil

\*Author for correspondence: [renan2.gomes@usp.br](mailto:renan2.gomes@usp.br)

\*\*Author for correspondence: [trossini@usp.br](mailto:trossini@usp.br)

Infections caused by protozoans remain a public health issue, especially in tropical countries. Serious adverse events, lack of efficacy at the different stages of the infection and routes of administration that have a negative impact on treatment adherence are some of the problems with currently available therapy against these diseases. Here we describe an epigenetic target, sirtuin 2 and its related proteins, that is promising given the results in phenotypic assays and *in vivo* models against Sir2 of *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, *Schistosoma mansoni*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* parasites. The results we present highlight how this target can be extensively explored and how its inhibitors might be employed in the clinic.

First draft submitted: 30 March 2021; Accepted for publication: 26 May 2021; Published online: 30 June 2021

**Keywords:** drug design • epigenetics • HDAC • sirtuin 2 • tropical diseases

Overall, parasitic infections are broadly present in poor tropical countries and threaten billions of people worldwide. Despite being a global health issue, their complex physiopathology and emerging resistance to antimicrobial agents make this group of diseases unattractive to pharmaceutical companies. Given this scenario, they are also known as neglected tropical diseases [1,2].

These illnesses are caused by parasites of different levels of complexity, such as viruses, bacteria, helminths and protozoa, none of which can be treated by an effective treatment. High toxicity, upsurging resistance, efficacy in only one stage of the infection and inconvenient routes of administration are just some of the flaws existing in the available therapeutics [3]. Particular information regarding each drug is summarized in the Table 1.

During the search for new parasitic targets, the class of histone deacetylases (HDACs) has become prominent.



## **ANEXOS- ESTUDO EM COLABORAÇÃO: ANÁLISE DE FLUORESCÊNCIA DE COMPOSTOS ORGÂNICOS**

Em colaboração com o Prof. Dr. Claudio Pereira Martin Pereira de Pereira do laboratório de Lipidomica e Bio-orgânica da Universidade Federal de Pelotas foi realizado análises de fluorimetria de compostos orgânicos voltados à Química Forense.

### **REPORT**

Ultraviolet and Fluorescence assay of curcumins and chalcones

Professor: Dr. Gustavo Henrique Goullart Trossini – Laboratório de Integração entre Técnicas Experimentais e Computacionais (LITEC)

e-mail: trossini@usp.br

Msc: Ana Carolina Silva Rocha (LITEC) e-mail: carolina.srocha@usp.br

PhD: Fernando de Moura Gatti (LITEC) e-mail: mouragatti@alumni.usp.br

---

Ensaio de Fluorescência

Equipamento: Infinite M200 PRO TECAN Software: Tecan IControl 1.9.17.0

Solvente: Dimetilsulfóxido (DMSO) and metanol (MeOH)

---

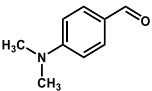
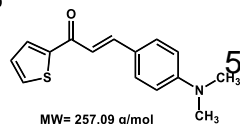
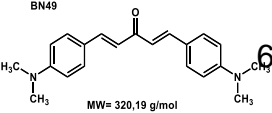
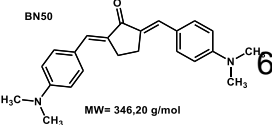
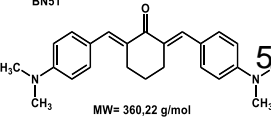
### ***Material and Instrumentação***

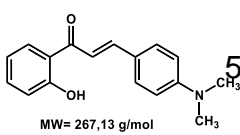
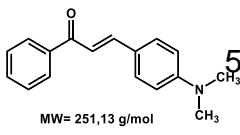
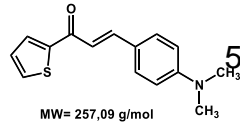
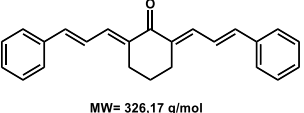
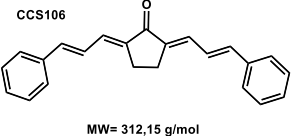
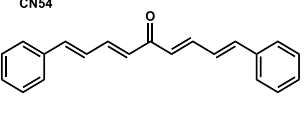
As medidas dos perfis espectrais de absorção e emissão de tiofeno-chalconas e cinamaldeído- curcuminas foram realizadas em espectrofluorômetro TECAN® Infinite 200PRO. Os experimentos foram realizados empregando amostras dos compostos em  $10^{-3}M$ ,  $10^{-4}M$ ,  $10^{-5}M$ ,  $10^{-6}M$  and  $10^{-7}M$

concentrações em solução com dimetilsulfóxido (DMSO) ou / e MeOH. Todas as medições foram realizadas em temperatura fixa de 25° C.

Os espectros de UV foram realizados em microplacas transparentes de 96 poços, o perfil de absorção foi monitorado de 230 nm a 600 nm de largura de banda com tamanho de etapa de 2 nm. Cada medição de absorbância foi realizada como uma média de 10 flashes em um determinado comprimento de onda. Após a determinação do comprimento de onda de absorção, realizou-se o espectro de emissão de fluorescência com comprimento de onda de excitação fixo ( $\lambda_{exc}$ ). Para a medição do espectro de fluorescência, as amostras foram excitadas a 430 nm, enquanto a largura de banda de emissão de varredura ( $\lambda_{em}$ ) foi de 300 nm a 800 nm com tamanho de etapa de 2 nm, usando microplaca preta de fundo plano de 96 poços. DMSO e / ou MeOH foram empregados como solvente e branco devido à solubilidade dos compostos estudados.

### Resultados

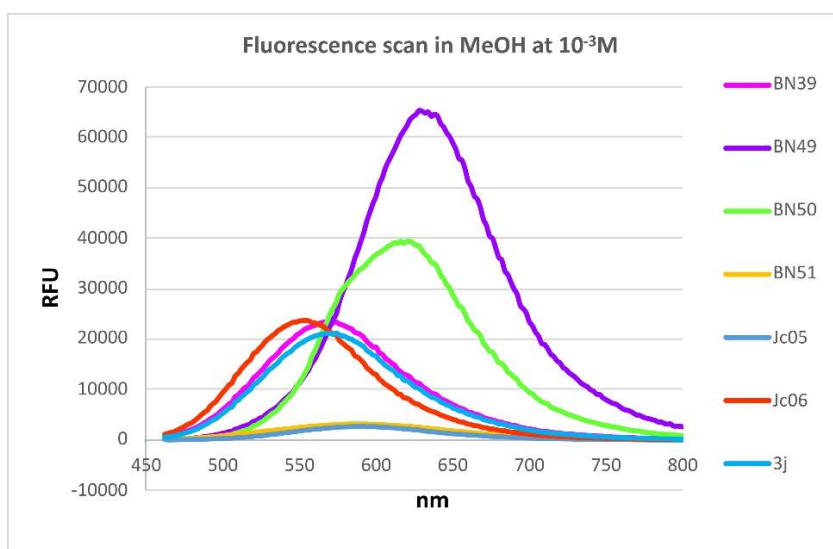
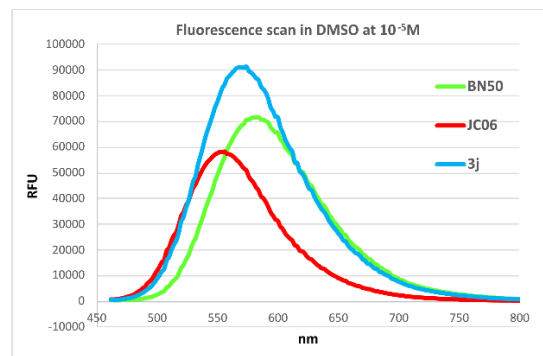
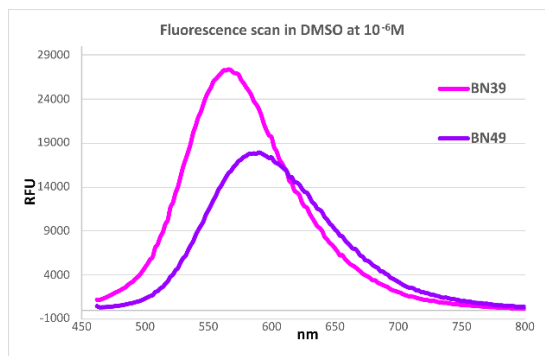
code	compound	$\lambda_{em}$ máx (Me thanol)	Fluorescence units (RFU <sub>max</sub> )	$\lambda_{em}$ máx (DMSO)	Fluorescence units (RFU <sub>max</sub> )
<b>4-DMAB</b>	4-DMAB  MW= 149,08 g/mol	-	-	-	-
<b>BN39</b>	BN39  MW= 257,09 g/mol	574 nm	23409 (10 <sup>-3</sup> M)	566 nm	27397 (10 <sup>-6</sup> M)
<b>BN49</b>	BN49  MW= 320,19 g/mol	628 nm	65297 (10 <sup>-3</sup> M)	584 nm	17795 (10 <sup>-6</sup> M)
<b>BN50</b>	BN50  MW= 346,20 g/mol	622 nm	39278 (10 <sup>-3</sup> M)	584 nm	71679 (10 <sup>-5</sup> M)
<b>BN51</b>	BN51  MW= 360,22 g/mol	584 nm	3272 (10 <sup>-3</sup> M)	592 nm	7757 (10 <sup>-3</sup> M)

code	compound	$\lambda_{em}$ máx(Me thanol)	Fluorescence units (RFU <sub>max</sub> )	$\lambda_{em}$ máx (DMSO)	Fluorescence units (RFU <sub>max</sub> )
JC05	<p>JC05</p>  <p>MW= 267,13 g/mol</p>	592 nm	2776 ( $10^{-3}M$ )	564 nm	22007 ( $10^{-5}M$ )
JC06	<p>JC06</p>  <p>MW= 251,13 g/mol</p>	554 nm	23751 ( $10^{-3}M$ )	556 nm	58429 ( $10^{-5}M$ )
3j	<p>3j</p>  <p>MW= 257,09 g/mol</p>	574 nm	21266 ( $10^{-3}M$ )	574 nm	91565 ( $10^{-5}M$ )
CC5105	<p>CCS105</p>  <p>MW= 326,17 g/mol</p>	-	-	-	-
CC5106	<p>CCS106</p>  <p>MW= 312,15 g/mol</p>	-	-	-	-
CN54	<p>CN54</p>  <p>MW= 286,14 g/mol</p>	-	-	-	-

### Discussão

Os compostos mais fluorescentes foram **BN39** e **BN49** que emitem em concentração de solução  $10^{-6}M$ . Estes compostos apresentam fluorescência em solução altamente concentrada em DMSO ( $10^{-5}M$  a  $10^{-3}M$ ). O comprimento de onda máximo de emissão para eles foram 566 nm (**BN39**) e 584 nm (**BN49**) próximo à parte de baixa energia da luz visível do espectro (700nm), tornando-os compostos fluorescentes muito seletivos.

Outros três compostos (**BN50**, **JC06** e **3j**) também apresentaram fluorescência significativa em baixas concentrações ( $10^{-5}M$ ) no DMSO e comprimento de onda de emissão no espectro visível da luz (584, 556 e 574 nm, respectivamente) apresentando as mesmas boas características do **BN39** e **BN49**. Os compostos **BN51** e **JC05** foram fluorescentes, mas com baixa intensidade em concentrações mais elevadas do que outros compostos não sendo interessantes para este estudo. As curcuminas derivadas de cinamaldeído (**CC5105**, **CC5106** e **CN54**) surpreendentemente não eram fluorescentes, apesar do extenso sistema de ressonância.



Em relação ao ensaio de fluorescência em metanol (MeOH), os mesmos compostos apresentaram algumas diferenças entre a solução de DMSO. Em MeOH a concentração ótima para todos os compostos foi de  $10^{-3}M$  e a fluorescência mais intensa foi observada para **BN49** divergindo de DMSO onde **BN39** foi o mais fluorescente. O composto **BN50** possui as mesmas características em ambos os solventes, porém em MeOH foi necessária alta concentração para emitir. Os compostos **Jc05**, **Jc06**, **3j** e **BN39** apresentaram perfil de emissão semelhante em MeOH.