



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

EMANUEL PAULA MAGALHÃES

**EFEITO TRIPANOCIDA DE 2-HIDROXI-3,4,6-
TRIMETOXIFENILCHALCONAS EM CEPA Y DE *Trypanosoma cruzi*.**

FORTALEZA

2022

EMANUEL PAULA MAGALHÃES

EFEITO TRIPANOCIDA DE 2-HIDROXI-3,4,6-TRIMETOXIFENILCHALCONAS
EM CEPA Y DE *Trypanosoma cruzi*.

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

Linha de pesquisa: Biologia para a saúde.

Orientador(a): Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins

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

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

M165e Magalhães, Emanuel.
Efeito tripanocida de 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenilchalconas em cepa Y de *Trypanosoma cruzi* /
Emanuel Magalhães. – 2022.
132 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e
Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins .

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

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. chalconas. 3. halogenação. 4. simulação de docking molecular. 5. estresse oxidativo. I. Título.

CDD 615

EMANUEL PAULA MAGALHÃES

EFEITO TRIPANOCIDA DE 2-HIDROXI-3,4,6-TRIMETOXIFENILCHALCONAS
EM CEPA Y DE *Trypanosoma cruzi*.

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

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins

Universidade Federal do Ceará (UFC) – Orientadora

Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes

Universidade Federal do Ceará (UFC) – Co-orientador

Profa. Dra. Maria Jania Teixeira

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Hécio da Silva Santos

Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

“Se você luta por algo que você realmente quer, faça isso calmamente e com amor.”

Miley Cyrus.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos, por todas as conquistas, e por todos os dias me permitir fazer o que mais amo.

Aos meus pais, Maria José e Evandro, por todo o amor e carinho, por nunca medirem esforços para a realização dos nossos sonhos, pelo apoio incondicional às minhas escolhas e por me ensinarem a nunca desistir dos meus objetivos e sempre fazer tudo com muito amor.

A minha irmã, Evelyn, por estar sempre na torcida pelas minhas conquistas, por toda a ajuda e companheirismo desde os meus primeiros dias de vida. Agradeço também ao Eduardo pela torcida.

A minha sobrinha, Júlia, minha futura cientista, por me mostrar como é a vida pela visão de uma criança.

Aos meus avós, Maria, Irapuan e Rizeuda, e meus tios e padrinhos, por todo o carinho e apoio, mesmo sem entender muito bem o que eu faço todos os dias na “escola”.

A minhas primas, Ana Beatriz e Juliana, que acompanharam grande parte da minha caminhada até aqui, obrigado por todo o incentivo, pelas longas conversas e pelos bons momentos que compartilhamos.

A minha querida orientadora, Profa. Alice, pela confiança no meu trabalho há quase 6 anos, pelas conversas sobre a vida, pelos conselhos, pelo cuidado com seus alunos, por ser esse exemplo de pessoa ética, de professora e de pesquisadora. Que possamos trabalhar e conviver juntos por muitos anos.

Ao meu querido coorientador, Prof. Ramon, e ao meu querido “co-coorientador”, Prof. Tiago, grandes mestres e amigos que eu ganhei no meio acadêmico. Obrigado por confiarem no meu trabalho, pelos conselhos, pelas conversas, pelas comemorações, por sempre dizerem “vai dar certo” quando eu sequer acreditava e pela ajuda na execução de alguns experimentos; vocês são grandes exemplos de pessoas e profissionais que tenho. Que possamos trabalhar e conviver por muitos anos.

Ao Prof. Hélcio Santos, pelas moléculas de estudo, aos professores Emmanuel Marinho, Márcia Marinho e aos demais membros do Grupo de Química Teórica e Eletroquímica

(GQTE), pelas simulações de docking molecular, que essas nossas colaborações continuem rendendo grandes frutos.

A todos os colegas do Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica (LBFBC) e agregados (Brenna, Pedro, Lyanna, Helaynne, Felipe, Naiara, Yasmin, Tiago, John, Bárbara, Liliane, Erlânia, Manoela, Ranieri, Natália, Stephanie, Igor, Leones, Guilherme, Bruna, Ana Júlia, Izabell, Mateus, Davi, Mac, Nicole, Lana, Letícia, Arif, Marília, Mariana, Duaran, Glautemberg, Gabriela, Dânya e Gdayllon). Obrigado pelos experimentos, pelas risadas, pelo apoio mútuo. O trabalho é muito melhor na companhia de vocês. Que possamos ainda conviver durante muitos anos, aprendendo dia após dia. Especialmente a minhas queridas Brenna, Yasmin, Lyanna e Natália, que estão comigo há muitos anos nessa caminhada.

Aos meus amigos do PAZ (Brenna, Thiago, Ivna, Amanda, Thaynara, João Antônio, Carina, Marinara, Paloma, Pedro, Vinícius, Camila e Andréia) pelas conversas, pelas risadas, pelo apoio nas dificuldades e pela amizade. Que possamos continuar celebrando a vida e as nossas conquistas.

Aos meus amigos dos tempos de Colégio Diocesano Pe. Anchieta (Lívia, Thalia, Tércio, Mariana, Michel, Rosa, Anelise, Clarissa, Munyk, Dara, Emanuella, Cecília, Yuri, Talita, Sayure, Bruna e Laísa), pelos quase 10 anos de amizade, por estarmos sempre apoiando uns aos outros e comemorando as conquistas pessoais e profissionais de cada um.

A minhas amigas de infância, Nicole e Letícia, por estarmos sempre juntos nos momentos mais felizes e mais difíceis das nossas vidas.

À banca, pelas contribuições ao trabalho.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT), ao Programa de pós-graduação em Ciências farmacêuticas (PGCF) e a Universidade Federal do Ceará (UFC), por serem como uma casa para muitos de nós alunos, um local de aprendizado e crescimento.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para a concepção e execução desse trabalho, **MUITO OBRIGADO!**

RESUMO

A Doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, é uma doença negligenciada que, vem se tornando endêmica em países desenvolvidos, e cujas terapias existentes são de eficácia limitada e baixa segurança, havendo a necessidade de novas alternativas terapêuticas de menor toxicidade. Assim, as chalconas, dotadas de diversas propriedades biológicas, são potenciais candidatas na busca por novas substâncias tripanocidas. Desse modo, o presente trabalho busca avaliar o efeito tripanocida de três chalconas semissintéticas e cloradas sobre *T. cruzi*. Para isso, a citotoxicidade das moléculas em células hospedeiras (LLC-MK2) foi avaliada pelo ensaio de redução de MTT, sendo observada uma redução dos valores de CC_{50} ($60,40 \pm 11,53 \mu\text{M}$; $658,50 \pm 138,30 \mu\text{M}$ e $1100,00 \pm 259,70 \mu\text{M}$) à medida que se aumentava a halogenação das moléculas. A investigação do efeito em formas epimastigota foi feita através da determinação do percentual de parasitos viáveis, obtendo-se valores semelhantes de IC_{50} nos tempos de 24 ($81,5 \pm 19,4 \mu\text{M}$; $97,6 \pm 14,2 \mu\text{M}$ e $79,3 \pm 14,8 \mu\text{M}$), 48 ($35,1 \pm 7,6 \mu\text{M}$; $41,1 \pm 5,2 \mu\text{M}$ e $69,5 \pm 14,6 \mu\text{M}$) e 72 horas ($26,3 \pm 3,2 \mu\text{M}$; $10,9 \pm 2,4 \mu\text{M}$ e $41,5 \pm 6,8 \mu\text{M}$) para Ch-C, Ch-4Cl e Ch-DiCl, respectivamente. O efeito sob as formas tripomastigotas também mostrou que as três chalconas apresentaram valores semelhantes de LC_{50} (Ch-C: $165,20 \pm 24,97 \mu\text{M}$; Ch-4Cl: $164,80 \pm 33,00 \mu\text{M}$ e Ch-DiCl: $147,40 \pm 20,90 \mu\text{M}$). Quando avaliados os IS (CC_{50}/LC_{50}) das três moléculas, obtiveram-se valores iguais a 0,36; 3,99 e 7,46, respectivamente. Por ter mostrado melhor efeito em epimastigota e tripomastigota, o ensaio com amastigota foi realizado apenas com Ch-DiCl, a qual foi capaz de reduzir o percentual de células infectadas, bem como do número de parasitos intracelulares. Através dos ensaios de citometria de fluxo, foram avaliados o perfil de morte celular (7-AAD/AxPE), percentual de células íntegras (7-AAD), produção de ERO citoplasmáticas (DCFH₂-DA) e potencial transmembrânico mitocondrial (Rho123 - $\Delta\Psi_m$) dos grupos tratados, sendo observado um possível mecanismo necrótico de morte celular e ocorrência de estresse oxidativo, com aumento da produção de ERO e redução do $\Delta\Psi_m$. Além disso, simulações de docking molecular foram realizadas com os alvos do parasito, cruzaina e tripanotiona redutase, mostrando a possível ocorrência de interações com o sítio catalítico e outras regiões de importância destas proteínas. Em conclusão, as chalconas estudadas apresentaram efeito tripanocida, e a substituição do anel B com cloro foi capaz de manter a atividade com redução da toxicidade sobre células hospedeiras. O efeito das moléculas

pode estar relacionado à inibição de enzimas vitais do parasito, e induzirem morte celular mediada por dano de membrana e estresse oxidativo.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; chalconas; halogenação; simulação de docking molecular; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, is a neglected disease that has become endemic in developed countries and whose existing therapies have limited efficacy and low safety, with the need for new therapeutic alternatives with less toxicity. Thus, chalcones, endowed with diverse biological properties, are potential candidates for new trypanocidal substances. Thus, the present work evaluated the trypanocidal effect of three semi-synthetic and chlorinated chalcones on *T. cruzi*. For this, the cytotoxicity of the molecules was evaluated in host cells (LLC-MK2) was evaluated by MTT reduction assay, being observed a reduction in the CC₅₀ values ($60.4 \pm 11.5 \mu\text{M}$; $658.5 \pm 138.3 \mu\text{M}$ and $1100.0 \pm 259.7 \mu\text{M}$) as the halogenation of the molecules was increased. The investigation of the effect on epimastigote forms was carried out by determining the percentage of viable parasites, obtaining similar values of IC₅₀ at the times of 24 ($81.5 \pm 19.4 \mu\text{M}$; $97.6 \pm 14.2 \mu\text{M}$ and $79.3 \pm 14.8 \mu\text{M}$), 48 ($35.1 \pm 7.6 \mu\text{M}$; $41.1 \pm 5.2 \mu\text{M}$ and $69.5 \pm 14.6 \mu\text{M}$) and 72 hours ($26.3 \pm 3.2 \mu\text{M}$; $10.9 \pm 2.4 \mu\text{M}$ and $41.5 \pm 6.8 \mu\text{M}$) for Ch-C, Ch-4Cl and Ch-DiCl, respectively. The effect on trypomastigote forms also showed that the three chalcones presented similar values of LC₅₀ (Ch-C: $165.2 \pm 24.9 \mu\text{M}$, Ch-4Cl: 164.8 ± 33.0 and Ch-DiCl: $147.4 \pm 20.9 \mu\text{M}$). When the IS (CC₅₀/LC₅₀) of the three molecules were evaluated, we obtained values equal to 0.36; 3.99 and 7.46, respectively. Because it showed better effect in epimastigotes and trypomastigotes, the anti-amastigote effect was performed only with Ch-DiCl. Through flow cytometry assays, the cell death profile (7-AAD/AxPE), percentage of intact cells (7-AAD), cytoplasmic ROS production (DCFH2-DA) and mitochondrial transmembrane potential (Rho123 - $\Delta\Psi\text{m}$) were evaluated) of the treated groups were evaluated, and a possible necrotic mechanism of cell death and occurrence of oxidative stress were observed, with an increase in ROS production and a reduction of $\Delta\Psi\text{m}$. Furthermore, molecular docking simulations were performed with the parasite targets cruzain and trypanothione reductase, showing the possible occurrence of interactions with the catalytic site and other important regions of these proteins. In conclusion, the studied chalcones showed a trypanocidal effect, and the replacement of the B ring with chlorine was able to maintain the activity with reduced toxicity to host cells. The effect of the molecules may be related to the inhibition of vital enzymes of the parasite, and they induced cell death mediated by membrane damage and oxidative stress.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; chalcones; halogenation; molecular docking simulation; oxidative stress.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

7-AAD – 7-Amino-actinomicina D;

$\Delta\Psi_m$ – Potencial transmembrânico mitocondrial;

ΔG – Energia de afinidade;

ARG – Arginina;

ASN – Asparagina;

ASP – Ácido aspártico;

AxV PE – Anexina V conjugada com Ficoeritrina;

Bz – Benznidazol;

CC₅₀ – Concentração citotóxica para 50% das células LLC-MK2;

Ch-4Cl – (*E*)-3-(4-clorofenil) -1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil) prop-2-em-1-ona;

Ch-C – (*E*)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil) -3-fenilprop-2-en-1-ona;

Ch-DiCl – (*E*)-3-(2,4-diclorofenil) -1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil) prop-2-en-1-ona;

CYS – Cisteína;

DC – Doença de chagas;

DCFH₂-DA – 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína;

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*;

DMSO – Dimetilsulfóxido;

DNDI – *Drugs for neglected diseases initiative*;

ERO – Espécies reativas de oxigênio;

FSC – *Forward Scatter*;

GLN – Glutamina;

GLU – Ácido glutâmico;

GLY – Glicina;

HIS – Histidina;

IC₅₀ – Concentração capaz de inibir em 50% a proliferação de formas epimastigotas de *T. cruzi*;

IFR – Intensidade de fluorescência relativa;

ILE – Isoleucina;

IS – Índice de seletividade;

KB2 – Inibidor tetrafluorofenoximetil cetona da enzima cruzaina de *T. cruzi*;

LC₅₀ – Concentração letal para 50% das formas tripomastigotas de *T. cruzi*;

LEU – Leucina;

LIT – *Liver Infusion Tryptose*;

LYS – Lisina;

MET – Metionina;

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

OMS – Organização mundial da saúde;

PDB – *Protein data bank*;

PHE – Fenilalanina;

PRO – Prolina;

QUM – Mostarda quinacrina inibidora da enzima tripanotona redutase de *T. cruzi*;

Rho123 – Rodamina 123;

RMSD – *Root mean square deviation*;

SBF – Soro bovino fetal;

SDS – Dodecilsulfato de sódio;

SER – Serina;

SSC – *Side Scatter*;

TcCr – Cruzaina de *T. cruzi*;

TcTR – Tripanotona reductase de *T. cruzi*;

TRP – Triptofano;

TYR – Tirosina;

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 - Estruturas químicas, massa e fórmula moleculares e nomenclatura das chalconas obtidas por condensação de Claisen-Schmidt.....	44
Tabela 1 - Percentuais de viabilidade celular de células LLC-MK2 tratadas com as substâncias em estudo.....	66
Tabela 2 - Percentuais de viabilidade de formas epimastigota tratadas.	72
Tabela 3 - Percentuais de viabilidade de formas tripomastigota de T. cruzi.....	75
Tabela 4 - Valores estimados de CC ₅₀ , IC ₅₀ e LC ₅₀ para as substâncias em estudo.....	76
Tabela 5 - Efeito da Ch-DiCl sobre as formas amastigota de T. cruzi.....	78
Tabela 6 - Percentuais de eventos celulares marcados com 7-AAD/AxPE.	79
Tabela 7 - Percentuais de formas epimastigotas danificadas.	82
Tabela 8 - Intensidade de fluorescência relativa de formas epimastigotas tratadas com as chalconas e marcadas com DCFH2-DA.....	82
Tabela 9 - Valores de intensidade de fluorescência de formas epimastigotas tratadas com as chalconas e marcadas com Rho123.....	84
Tabela 10 - Energia de afinidade e valores de RMSD dos complexos formados pelos ligantes e a enzima tripanotiona redutase obtidos por docking molecular.....	86
Tabela 11 - Interações entre os ligantes com a enzima tripanotiona redutase.....	88
Tabela 12 - Energia de afinidade e valores de RMSD dos complexos formados pelos ligantes e a enzima cruzaina obtidos por docking molecular.....	89
Tabela 13 - Interações entre os ligantes com a enzima cruzaina.....	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Carlos Chagas em seu laboratório em Manguinhos (1929).....	21
Figura 2 - Moradores do município de Lassance (Minas Gerais, 1911).	21
Figura 3 - Endemicidade mundial da Doença de Chagas.....	22
Figura 4 - Sinal de Romanã.	25
Figura 5 - Alterações morfológicas no coração decorrentes da cardiopatia chagásica. .	26
Figura 6 - Envolvimento gastrointestinal em pacientes crônicos de DC.....	27
Figura 7 - Principais estágios de desenvolvimento do <i>T. cruzi</i>	28
Figura 8 - Ciclo biológico do <i>T. cruzi</i> nos hospedeiros intermediário e definitivo.....	29
Figura 9 - Estruturas moleculares do Benznidazol (A) e Nifurtimox (B).	30
Figura 10 - Estrutura tridimensional da enzima cruzaina de <i>T. cruzi</i>	32
Figura 11 - Equilíbrio oxirredutor do <i>T. cruzi</i> mediado pela enzima tripanotiona redutase.	34
Figura 12 - Estrutura básica de chalconas.	34
Figura 13 - Rota biológica de síntese de chalconas.....	35
Figura 14 - Síntese de chalconas através da reação de condensação de Claisen-Schmidt.	36
Figura 15 - Reação de Claisen-Schmidt em meio alcalino para obtenção de chalconas.	42
Figura 16 - Fotomicrografia de linhagem de células LLC-MK2 em estado de confluência.	45
Figura 17 - Reação de redução do sal de MTT à sal de formazan.	46
Figura 18 - Distribuição dos campos da Câmara de Neubauer.	47
Figura 19 - Protocolo de plaqueamento de células LLC-MK2 e tratamento com as substâncias de estudo.....	48
Figura 20 - Realização do ensaio de redução do MTT para avaliação da viabilidade celular.	49
Figura 21 - Plaqueamento e avaliação do efeito de substâncias sob formas epimastigota.	51
Figura 22 - Obtenção de formas tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	52
Figura 23 - Ensaio de avaliação da atividade tripanocida de substâncias	53
Figura 24 - Avaliação do efeito em formas amastigota de <i>T. cruzi</i>	54
Figura 25 - Funcionamento do citômetro de fluxo.	55

Figura 26 - Avaliação do perfil de morte celular com os fluorocromos 7-AAD e AxV PE.	56
Figura 27 - Procedimento de marcação com 7-AAD/AxV PE para avaliação do perfil de morte celular.	57
Figura 28 - Processo de formação do DCF a partir da sonda DCFH ₂ -DA para determinação do acúmulo citoplasmático de ERO.	58
Figura 29 - Procedimento de marcação com DCFH ₂ -DA para avaliação do acúmulo citoplasmático de ERO.	59
Figura 30 - Princípio da avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial com a sonda fluorescente Rho123.	60
Figura 31 - Protocolo de marcação com Rho123 para avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial.	61
Figura 32 - Citotoxicidade das chalconas Ch-C (A), Ch-4Cl (B) e Ch-DiCl (C) e Bz (D) em células hospedeiras LLC-MK2 (24 horas).	67
Figura 33 - Efeito antiproliferativo da Ch-C sobre as formas epimastigota de <i>T. cruzi</i> . 68	
Figura 34 - Efeito da Ch-4Cl sobre as formas epimastigota de <i>T. cruzi</i>	69
Figura 35 - Efeito da Ch-DiCl sobre as formas epimastigota de <i>T. cruzi</i>	70
Figura 36 - Efeito do Bz em formas epimastigota de <i>T. cruzi</i>	71
Figura 37 - Efeito das chalconas Ch-C (A), Ch-4Cl (B), Ch-DiCl (C) e Bz (D) sobre as formas tripomastigota de <i>T. cruzi</i> (24 horas).	74
Figura 38 - Efeito antiamastigota da Ch-DiCl em cepa Y de <i>T. cruzi</i> (24 horas).	77
Figura 39 - Perfil de morte celular induzido pelas chalconas em estudo sobre as formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> , avaliado por citometria de fluxo.	80
Figura 40 - Células epimastigotas que apresentaram marcação com 7-AAD em avaliação por citometria de fluxo.	81
Figura 41 - Intensidade de fluorescência relativa de formas epimastigotas tratadas com as chalconas e marcadas com DCFH ₂ -DA por citometria de fluxo.	83
Figura 42 - Intensidade de fluorescência relativa de formas epimastigotas tratadas com as chalconas e marcadas com Rho123 por citometria de fluxo.	85
Figura 43 - Complexo e mapas de interação dos ligantes com a enzima tripanotona redutase.	87
Figura 44 - Complexo e mapas de interação dos ligantes com a enzima cruzaina.	90

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO	21
1.1. Histórico e epidemiologia da Doença de Chagas	21
1.2. Transmissão, sinais e sintomas	23
1.3. Ciclo de vida e fisiologia do <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
1.4. Tratamento farmacológico da Doença de Chagas	30
1.4.1. Novas abordagens para o desenvolvimento de fármacos antichagásicos	31
1.4.1.1. <i>Cruzaína</i>	32
1.4.1.2. <i>Tripanotiona redutase</i>	33
1.5. Chalconas como fontes de novas moléculas bioativas	34
1.6. Justificativa	37
2. OBJETIVOS	40
2.1. Objetivo Geral	40
2.2. Objetivos Específicos	40
3. MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1. Obtenção e caracterização das substâncias de estudo	42
3.2. Avaliação da citotoxicidade em células hospedeiras	45
3.3. Avaliação da atividade sobre formas epimastigota de <i>T. cruzi</i> cepa Y	49
3.4. Avaliação do efeito tripanocida em formas tripomastigota de <i>T. cruzi</i> cepa Y	51
3.5. Avaliação do efeito sobre formas amastigota de <i>T. cruzi</i> cepa Y	53
3.6. Ensaios de citometria de fluxo	55
3.6.1. Avaliação do perfil de morte e integridade celular	56
3.6.2. Acúmulo de espécies reativas de oxigênio citoplasmáticas (ERO)	57
3.6.3. Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	59
3.7. Estudos <i>in silico</i>	61
3.7.1. Obtenção e preparo dos ligantes	61
3.7.2. Obtenção e preparo dos alvos proteicos	62

3.7.3. Simulações de Docking molecular	62
3.8. Análise estatística.....	63
4. RESULTADOS	65
4.1. Citotoxicidade das substâncias em células LLC-MK2.....	65
4.3. Efeito tripanocida em formas tripomastigota	73
4.4. Efeito antiamastigota.....	77
4.5. Avaliação do perfil de morte e integridade celular	78
4.6. Acúmulo citoplasmático de espécies reativas de oxigênio.....	82
4.7. Efeito no potencial transmembrânico mitocondrial.....	84
4.8. Estudos <i>in silico</i> de interação com a enzima tripanotona redutase	86
4.9. Estudos <i>in silico</i> de interação com a enzima cruzaina	88
5. DISCUSSÃO	93
6. CONCLUSÃO	101
7. RESUMO GRÁFICO	102
8. REFERÊNCIAS	104
APÊNDICE A – DADOS DE CARACTERIZAÇÃO DE Ch-C: (<i>E</i>)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil) -3-fenilprop-2-en-1-ona.....	124
APÊNDICE B – DADOS DE CARACTERIZAÇÃO DE Ch-4Cl: (<i>E</i>)-3-(4-clorofenil) -1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil) prop-2-em-1-ona	127
APÊNDICE C – DADOS DE CARACTERIZAÇÃO DE Ch-DiCl: (<i>E</i>)-3-(2,4-diclorofenil) -1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil) prop-2-en-1-ona	130

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. Histórico e epidemiologia da Doença de Chagas

A Doença de Chagas (DC), também conhecida como tripanossomíase americana, é uma parasitose causada pelo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, a qual foi diagnosticada e descrita pela primeira vez pelo cientista Dr. Carlos Chagas, no município de Lassance, no ano de 1909 (figuras 1 e 2) (CHAO; LEONE; VIGLIANO, 2020).

Figura 1 - Carlos Chagas em seu laboratório em Manguinhos (1929).



Fonte – Acervo arquivístico FIOCRUZ (<http://www.coc.fiocruz.br/index.php/pt/carlos-chagas.html#menu-galerias>). Acesso em 02/11/2021.

Figura 2 - Moradores do município de Lassance (Minas Gerais, 1911).



Fonte – Acervo arquivístico FIOCRUZ (<http://www.coc.fiocruz.br/index.php/pt/carlos-chagas.html#menu-galerias>). Acesso em 02/11/2021.

Conforme o Boletim Epidemiológico do ano de 2020 do Ministério da Saúde, 146 novos casos de DC foram confirmados em todo o território brasileiro. Além disso, houve uma redução em quase 50% no número de casos suspeitos notificados e de quase 60% no número de casos confirmados de DC, juntamente com uma redução de quase 40% nas requisições de exames diagnósticos de DC, todos em relação ao ano de 2019. Quanto à mortalidade, no período compreendido entre março e agosto de 2020, foram notificados 1.746 óbitos por DC, sendo predominantes nas regiões Sudeste e Nordeste, contudo, pode haver uma expressiva subnotificação em decorrência da pandemia de COVID-19 (BRASIL, 2021; ZAIDEL et al., 2020).

No estado do Ceará, de acordo com o último Boletim Epidemiológico de Doenças negligenciadas, o estado teve, de 2015 a 2020, 1.062 amostras positivas para DC, cerca de 3% do total. Ainda nesse período, foram registrados 327 óbitos, com uma mortalidade de 0,8 óbito/100.000 habitantes. Quanto ao risco de transmissão vetorial, o estado apresenta 64 (34,81%) municípios com alto risco, 69 (37,5%) com médio risco e 51 (22,7%) com baixo risco de transmissão (CEARÁ, 2021).

Conforme estudo de LEE e colaboradores (2013), os indivíduos infectados geram um custo anual aproximado de US\$ 4.660 por pessoa aos sistemas de saúde, um total de US\$ 7,19 bilhões em gastos se considerados todos os países, e US\$ 188,80 bilhões durante toda a vida de cada paciente. Mais de 10% desses custos são nos EUA e Canadá, onde a DC não é endêmica, os quais provêm da perda de produtividade e da mortalidade precoce induzida por doenças cardiovasculares.

1.2. Transmissão, sinais e sintomas

A infecção pelo *T. cruzi* se dá por meio de dois mecanismos, sendo classificados como mecanismos primários e secundários. Os mecanismos primários, que ocorrem em maior frequência, representam as vias de transmissão vetorial, oral e congênita. Em contrapartida, os mecanismos secundários de transmissão ocorrem por meio de acidentes de laboratório, manuseio de animais infectados, ingestão de alimentos infectados de origem animal e vegetal e transplante de hemoderivados e órgãos de doadores (COURA, 2015).

Cerca de 80% de todos os casos de DC são tipicamente transmitidos por via vetorial, quando o triatomíneo elimina fezes e urina contendo formas infectantes do parasito durante o repasto sanguíneo (FIDALGO et al., 2018). A transmissão oral está

bastante envolvida com a transmissão vetorial, consumo de bebidas preparadas com frutas ou vegetais contaminados com fezes do triatomíneo ou secreções/carnes de mamíferos infectados, como açaí e cana-de-açúcar (FILIGHEDDU; GÓRGOLAS; RAMOS, 2017). Essa segunda forma de transmissão está relacionada a uma mortalidade superior àquela registrada para a forma vetorial de transmissão por conta da maior carga parasitária ingerida (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018b).

A transmissão congênita pode ocorrer durante qualquer fase da gestação, sobretudo entre as 22^o e 26^o semanas, e no momento do parto. Essa transmissão ocorre por disseminação hematogênica, podendo levar à ocorrência de aborto e nascimentos prematuros (CEVALLOS; HERNÁNDEZ, 2014; SANTANA et al., 2020).

A forma de transmissão por meio de transplante de órgãos ou hemoderivados é responsável por 5 a 20% de todos os casos de DC, sendo essa a forma de transmissão mais relacionada à introdução e expansão da doença em países não endêmicos (COURA; VIÑAS, 2010). Com a expansão do controle vetorial e a maior rigidez dos critérios de rastreamento e seleção de doadores, os acidentes laboratoriais e de manejo de animais infectados, apesar de acontecerem com menor frequência, tem chamado bastante atenção no comportamento epidemiológico (CASTRO-ARROYAVE; MONROY; IRURITA, 2020; RADISIC; REPETTO, 2020).

A evolução clínica da DC compreende duas fases: aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada pela alta parasitemia e ocorre em 4 a 8 semanas após a infecção, com redução após 90 dias. Os sintomas incluem febre, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. Existe ainda inflamação e formação de edema no local de inoculação dos parasitos (Chagoma de inoculação). O sinal de Romanã (Figura 4), é um exemplo claro deste processo inflamatório, o qual consiste em um edema bpalpebral e unilateral quando o parasito é inoculado na conjuntiva ocular. De todos os casos agudos, 1-5% destes pacientes desenvolvem uma fase aguda severa, com ocorrência de manifestações como miocardite e meningoencefalite (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018a).

Figura 4 - Sinal de Romanã.



Fonte - https://www.google.com/search?q=sinal+de+roman%C3%A3&sxsrf=AOaemvIGSSMNps-kOIMydQFs6oMAUteunQ:1635869674548&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=2ahUKEwik0uW2ifr zAhUsq5UCHdStCeEQ_AUoAXoECAEQAw&biw=1366&bih=635&dpr=1#imgsrc=ltXXXfccFHuj7M.

Acessado em 02/11/2021.

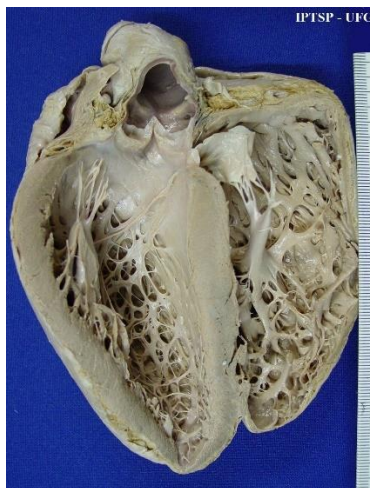
Comumente, a fase aguda se resolve espontaneamente. Contudo, alguns pacientes podem evoluir para a forma indeterminada, ou intermediária da DC, em que aproximadamente 70% destes permanecem assintomáticos e com função dos órgãos conservada; 20% permanecem assintomáticos, porém com disfunção orgânica, e 10% desenvolvem a forma sintomática com disfunção de órgãos. Os pacientes com a forma indeterminada da doença, apesar de permanecerem soropositivos para anticorpos anti-*T. cruzi*, tem bom prognóstico, visto que não ocorrem alterações cardíacas ou intestinais significativas (GUARNER, 2019).

Caso o paciente não seja diagnosticado ou tratado precocemente, 30-40% desses podem desenvolver as formas crônicas sintomáticas da DC, que podem se manifestar após 10-30 anos da infecção. As manifestações crônicas da DC são representadas pelas formas cardíaca e gastrointestinal da doença, que cursam com carga parasitária baixa ou indetectável e sorologia positiva (ECHAVARRÍA et al., 2021).

O envolvimento cardíaco é o principal e mais frequente conjunto de alterações decorrente da DC, o qual afeta de 14-45% dos pacientes crônicos devido a danos no sistema de condução nervosa e ao músculo cardíaco. As alterações iniciais estão relacionadas à contração ventricular alterada, enquanto as manifestações tardias incluem bradicardia severa, bloqueio atrioventricular, cardiomiopatia chagásica, ocorrência de aneurismas, formação de trombos e embolia. Adicionalmente, a ocorrência de mal súbito e tromboembolismo são as principais causas de morte de pacientes com forma cardíaca de DC. Podem ser observados ainda sintomas menos específicos, como fadiga,

palpitações, tontura, dispneia, dor no peito e edema (ECHAVARRÍA et al., 2021; PUNUKOLLU et al., 2007; VELASCO; MORILLO, 2020). As alterações morfológicas provocadas pela cardiopatia chagásica podem ser observadas na figura 5 a seguir.

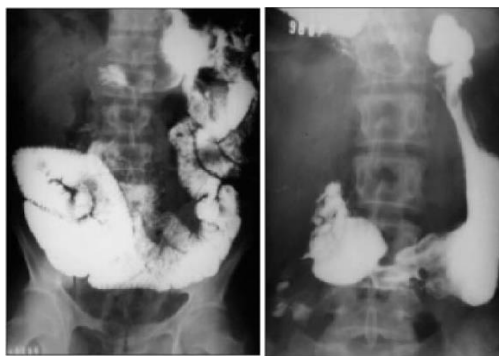
Figura 5 - Alterações morfológicas no coração decorrentes da cardiopatia chagásica.



Fonte - <https://patologia.iptsp.ufg.br/n/4931-coracao-cardiopatia-chagasica>. Acesso em 02/11/2021.

O envolvimento gastrointestinal (Figura 6) ocorre em apenas 10-21% dos pacientes crônicos manifesta-se através de distúrbios na motilidade gastrointestinal, incluindo disfagia, odinofagia, refluxo esofágico, perda de peso, aspiração, tosse e regurgitação. Além disso, nas formas gastrointestinais mais avançadas, ocorre a formação de alterações conhecidas como megaesôfago e megacólon. Essas manifestações consistem em dilatações nas musculaturas esofágica e da porção final do intestino grosso, respectivamente. O desenvolvimento de megacólon pode provocar constipação persistente, fecaloma e isquemia intestinal, contribuindo para um risco aumentado de câncer intestinal (DANTAS, 2021; DÍAZ ALCÁZAR; ZÚÑIGA DE MORA FIGUEROA; GARCÍA ROBLES, 2020).

Figura 6 - Envolvimento gastrointestinal em pacientes crônicos de DC.



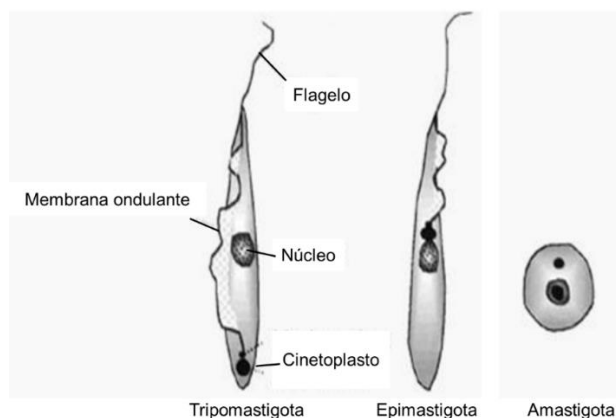
Fonte – Adaptado de DANTAS (2021). Acesso em 02/11/2021.

Esses danos aos órgãos decorrentes da infecção pelo *T. cruzi* é secundário ao efeito parasitário direto, mas relacionado principalmente à uma reação imune desencadeada a fim de controlar o parasito, com ativação das respostas imunes inata e humoral (BERN, 2015).

1.3. Ciclo de vida e fisiologia do *Trypanosoma cruzi*

De acordo com a nova classificação proposta para os eucariotos pela Sociedade Internacional de Parasitologia, o *T. cruzi* é um protozoário flagelado pertencente ao Supergrupo Excavata, Divisão Euglenozoa e Subdivisão Kinetoplastea (ADL et al., 2005). No seu ciclo biológico, existem dois hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado. Dentre os diversos estágios de desenvolvimento, destacam-se três formas evolutivas principais: formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas (Figura 7). As diferenças morfológicas entre essas formas são observadas de acordo com o formato, o local onde o flagelo e a membrana ondulante emergem e a posição do cinetoplasto, principal organela que contém o DNA mitocondrial, em relação ao núcleo celular (DE SOUZA, 1999).

Figura 7 - Principais estágios de desenvolvimento do *T. cruzi*.



Fonte – Adaptado de http://www.profbio.com.br/aulas/ac2_08.pdf. Acesso em 02/11/2021.

As formas epimastigotas apresentam formato alongado, com cinetoplasto em posição anterior ao núcleo e membrana ondulante pouco desenvolvida, estando essas formas existentes na porção superior do intestino do triatomíneo, onde se multiplicam. Os tripomastigotas apresentam posição do cinetoplasto semelhante à das formas epimastigotas, porém com membrana ondulante e flagelo mais desenvolvidos. São encontradas na porção distal do intestino do triatomíneo, bem como nas suas secreções, e na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, sendo formas não-replicativas infectantes do parasito. Por fim, os amastigotas são as formas de vida replicativas no hospedeiro vertebrado, apresentando formato esférico, e ausência de flagelo e membrana ondulante (DE SOUZA, 1999).

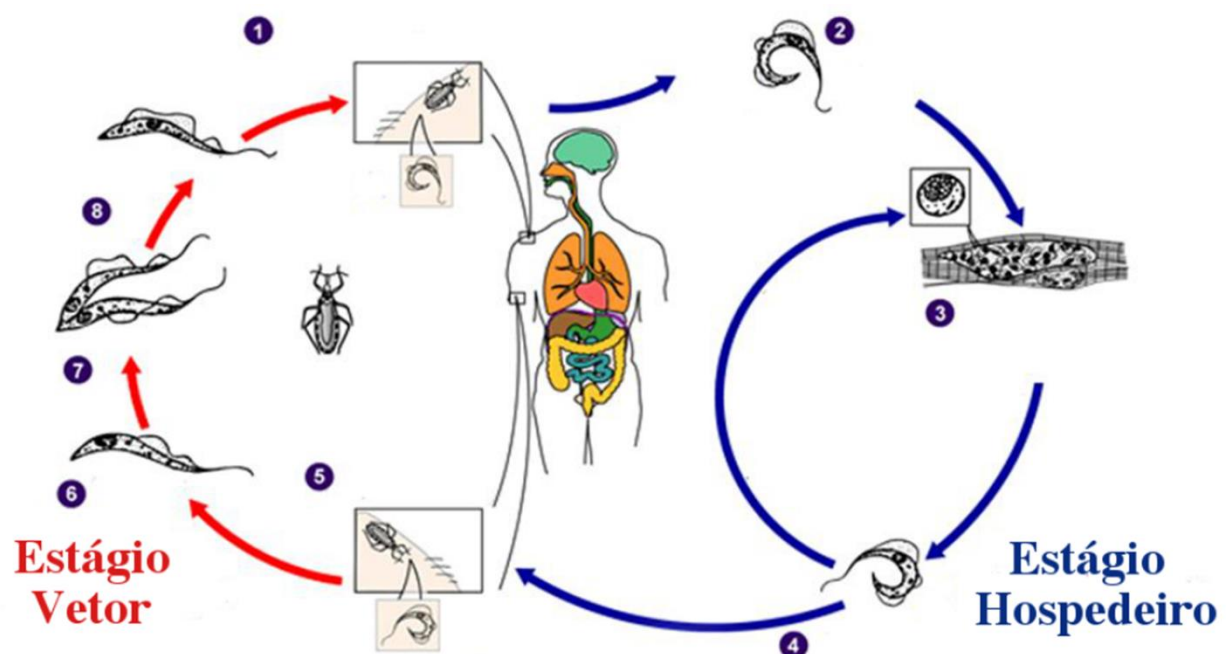
Conforme apresentado na figura 8, o hospedeiro invertebrado se infecta com *T. cruzi* quando o triatomíneo infectado realiza o repasto sanguíneo, depositando na pele do hospedeiro vertebrado fezes e urina contendo formas tripomastigotas metacíclicas. Quando essas formas penetram pelo local da picada, atingem a corrente sanguínea e são transportadas para diferentes tecidos. Em contato com as células, provocam alterações na arquitetura da membrana plasmática, o que favorece sua internalização. Em resposta, a célula infectada aprisiona o parasito em uma estrutura conhecida como o vacúolo parasitóforo (BERN et al., 2019; BRENER, 1997).

Em seguida, os lisossomos celulares se fundem ao vacúolo parasitóforo, formando o fagolisossomo. As enzimas lisossomais liberadas atuam para eliminação dos parasitos. Contudo, as formas tripomastigotas se diferenciam em amastigotas, resistentes aos mecanismos de defesa celular. Assim, multiplicam-se por mitose e diferenciam-se em

novas formas tripomastigotas, que provocam lise celular e caem na corrente sanguínea, reiniciando o ciclo no hospedeiro vertebrado (BERN et al., 2019; BRENER, 1997).

Ao fazer seu repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado, o triatomíneo se infecta com formas tripomastigota, que, ao chegarem no estômago do barbeiro, se diferenciam em epimastigotas, passando pelas formas esferomastigotas intermediárias. No intestino médio, as formas epimastigotas são capazes de se multiplicar, seguindo para o intestino inferior, onde ocorre a diferenciação em tripomastigotas metacíclicas, que podem ser excretadas sob superfícies durante o repasto sanguíneo do triatomíneo, podendo dar início a um novo ciclo de infecção (BERN et al., 2019; BRENER, 1997).

Figura 8 - Ciclo biológico do *T. cruzi* nos hospedeiros intermediário e definitivo.



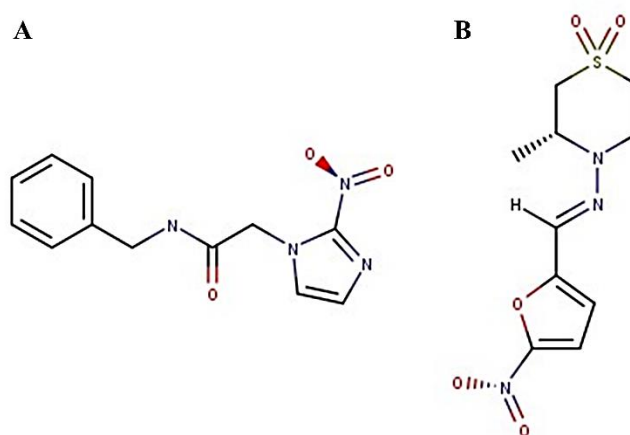
Legenda – O ciclo biológico do *T. cruzi* tem duas etapas, uma no hospedeiro invertebrado (triatomíneo) e outra no hospedeiro vertebrado (mamífero, ser humano, por exemplo). Durante o repasto sanguíneo (1), o barbeiro elimina fezes e urina contendo formas tripomastigota que são inoculadas na corrente sanguínea do ser humano (2), penetrando nas células e diferenciando-se em formas amastigotas (3), que se multiplicam e diferenciam-se em novas formas tripomastigotas (4). No hospedeiro invertebrado, que se infecta ao ingerir formas tripomastigota da corrente sanguínea do hospedeiro definitivo (5), as quais seguem para o estômago do invertebrado, diferenciando-se em epimastigotas (6), multiplicando-se na porção inicial e média do intestino (7) e diferenciando-se em novas formas tripomastigotas na porção final do intestino (8), estando essas formas prontas para serem eliminadas novamente durante um novo processo de repasto sanguíneo.

Fonte – Adaptado de FRANCO (2018). Acesso em 02/11/2021.

1.4. Tratamento farmacológico da Doença de Chagas

Ainda não existem vacinas disponíveis, mas há terapia farmacológica antichagásica disponível para o tratamento da doença (BERMUDEZ et al., 2016; RODRÍGUEZ-MORALES et al., 2015). O tratamento da DC é recomendado na fase aguda, forma congênita, infecções reativadas e DC crônica em crianças menores de 18 anos, além de pacientes com forma indeterminada de DC crônica. Contudo, as opções terapêuticas disponíveis são bastante limitadas, incluindo apenas o Benznidazol e o Nifurtimox, duas moléculas conhecidas como compostos nitroheterocíclicos (Figura 10) (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018a).

Figura 9 - Estruturas moleculares do Benznidazol (A) e Nifurtimox (B).



Fonte – Elaborados pelo autor com o software MarvinSketch.

Ambos os fármacos são utilizados há mais de 50 anos e apresentam segurança e eficácia bastante limitadas (CASTRO; DIAZ DE TORANZO, 1988; JACKSON; WYSSA; CHAPPUIS, 2020). Observa-se que a eficácia do tratamento com esses fármacos é inversamente proporcional ao período da infecção, sendo assim maior na fase aguda da doença (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018a).

Em esquemas terapêuticos que empregaram o Nifurtimox no tratamento da DC, foi observado que a eficácia de cura clínica em pacientes crônicos com fase indeterminada é maior em crianças, atingindo percentuais próximos aos 85%, quando comparados aos 10% de cura em adultos (ALTCHEH et al., 2021; KRATZ et al., 2018). Contudo, o uso desse medicamento tem sido encerrado em muitos países devido à ocorrência de reações adversas como irritabilidade, insônia, desorientação, mudanças de humor, parestesia e neuropatia periférica. Esse conjunto de reações adversas é observado em 97% dos

pacientes em uso de Nifurtimox, sendo a terapia descontinuada em 75% dos casos, o que é também relacionado aos longos esquemas posológicos (BERENSTEIN et al., 2021; CRESPILO-ANDÚJAR et al., 2018).

Por conta dos maiores benefícios, eficácia e tolerabilidade, o tratamento com benznidazol é preferível ao Nifurtimox (LOSADA GALVÁN et al., 2021). De acordo com alguns estudos, a cura sorológica de pacientes com DC congênita aproxima-se de 100%, e nos pacientes na fase aguda, 75%. Em pacientes crônicos, esta cura atinge apenas 60% dos pacientes acima de 13 anos e 40% em adultos com formas crônicas tardias (PEREZ-MOLINA et al., 2009). Os efeitos adversos mais comuns são reações de hipersensibilidade cutânea, intolerância digestiva, anorexia, astenia, dor de cabeça e insônia. Reações como neuropatia e supressão medular são consideradas raras, sendo a descontinuação do tratamento registrada em apenas 30% dos esquemas terapêuticos (VIOTTI et al., 2009).

Mesmo após 100 anos da sua primeira descrição, a DC ainda tem a sua fisiopatologia, bem como as interações parasito-hospedeiro, pouco conhecidas, dificultando a descoberta de ferramentas terapêuticas eficazes (CHAO; LEONE; VIGLIANO, 2020). Para agravar a situação, existem estudos que apontam a existência e realizam o mapeamento de cepas de *T. cruzi* resistentes ao tratamento farmacológico disponível (PETRAVICIUS et al., 2019; WILKINSON et al., 2008).

Somado a isso, o interesse econômico da indústria farmacêutica limita bastante o desenvolvimento de novos fármacos, visto que a DC é uma doença que aflige majoritariamente países subdesenvolvidos e populações de baixo poder aquisitivo. Portanto, é caracterizada como doença negligenciada, assim como a esquistossomose e leishmaniose, entre outras parasitoses (DNDI, 2021; THE LANCET, 2019).

Desse modo, destaca-se a importância de se empregar ferramentas como a nanotecnologia (TESSAROLO et al., 2018), o reposicionamento de fármacos (BELLERA et al., 2020), a síntese e prospecção de novas moléculas (DE MENEZES et al., 2019a) como estratégias contemporâneas para a DC (KRATZ, 2019).

1.4.1. Novas abordagens para o desenvolvimento de fármacos antichagásicos

Nos últimos anos, diversas pesquisas têm se voltado à identificação de rotas metabólicas exclusivas ou específicas nos tripanossomatídeos, para conhecer de forma

mais aprofundada a biologia do parasito, bem como guiar a pesquisa farmacológica. Nesse sentido, alguns processos bioquímicos vitais para esses microrganismos foram identificados, objetivando o desenvolvimento de inibidores seletivos capazes de interferir nesses processos e, conseqüentemente, causar a morte do parasito (MIRANDA; SAYÉ, 2019). À vista disso, enzimas como a cruzaina e a tripanotiona redutase se destacam, uma vez que exercem papel fundamental na sobrevivência do parasito no hospedeiro vertebrado (BATTISTA et al., 2020; PALOS et al., 2017).

1.4.1.1. *Cruzaina*

As cisteíno proteases são membros da família de peptidases semelhantes à papaína, tendo como principais membros a cruzaina, rodesiana e catepsina B. Essas enzimas são expressas durante todo o ciclo de vida dos tripanossomatídeos, sendo importantes em processos de diferenciação celular, nutrição, reprodução, invasão em células hospedeiras e sobrevivência à resposta imune. Além disso, o aumento da expressão dessas proteínas está diretamente relacionado à progressão de doenças causadas por esse grupo de parasitos (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2017).

A cruzaina de *T. cruzi* (TcCr), também conhecida como cruzipaína, é uma peptidase do tipo catepsina *L-like* e é a principal cisteíno protease presente nas formas de vida do *T. cruzi*, sendo formada por um domínio do tipo α -hélice e outro folha- β -pregueada (Figura 10); estando o sítio ativo localizado na interface entre essas duas subunidades (BARBOSA DA SILVA et al., 2019; BRAK et al., 2010).

Figura 10 - Estrutura tridimensional da enzima cruzaina de *T. cruzi*.



Fonte – Elaborado pelo autor utilizando o software BIOVIA Discovery Studio.

Essa proteína é expressa durante todos os estágios de vida do *T. cruzi*, estando compartimentalizada em diferentes locais de acordo com a forma evolutiva. No hospedeiro invertebrado, a TcCr participa da adesão entre o parasito e o intestino do barbeiro e é de suma importância durante a transformação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos, processo conhecido como metaciclogênese. Assim, a enzima contribui diretamente com a virulência das diferentes cepas de *T. cruzi*, uma vez que foram observadas diferenças importantes na expressão de TcCr em cepas distintas de *T. cruzi* (LOSINNO et al., 2021; SAN FRANCISCO et al., 2017).

No hospedeiro vertebrado, a TcCr participa de um importante processo de invasão das células (BURLEIGH; WOOLSEY, 2002). Além disso, a TcCr também exerce papel relevante na evasão à resposta imune do hospedeiro, através da clivagem de anticorpos e impedimento da ativação do sistema complemento, da resposta imune celular, além de impedir a síntese de fatores de transcrição pró-inflamatórios, como o NF- κ B (DOYLE et al., 2011; PONCE et al., 2013; SCHARFSTEIN, 2018).

Por fim, a TcCr está relacionada à degradação de compostos tóxicos para o parasito, visto que estudos com inibidores de cruzaina mostraram um aumento da concentração de compostos no Complexo de Golgi do *T. cruzi*, culminando com a morte do parasito (ENGEL et al., 2000; MOREIRA et al., 2017).

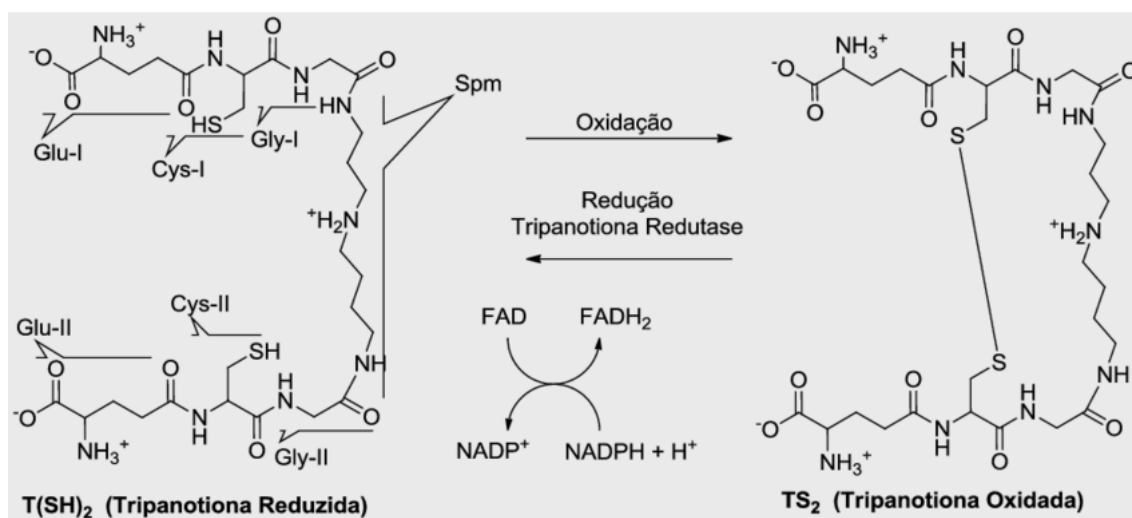
1.4.1.2. *Tripanotiona reductase*

Durante a resposta imune mediada contra *T. cruzi*, macrófagos e neutrófilos liberam espécies reativas de oxigênio (ERO) como mecanismo de defesa contra agentes infecciosos. Contudo, o parasito apresenta um interessante sistema antioxidante intracelular, que neutraliza essas ERO, influenciando diretamente na sobrevivência, proliferação e virulência do microrganismo (PIACENZA; TRUJILLO; RADI, 2019).

A tripanotiona (T(SH)₂) é um dos mediadores antioxidantes mais importantes para sobrevivência do *T. cruzi* no organismo do hospedeiro vertebrado. É uma molécula similar à glutathiona sintetizada pela enzima tripanotiona sintase. Atua neutralizando ERO por meio de reações redox, durante as quais é convertida em sua forma oxidada (TS₂). Em seguida, é reduzida de volta à sua forma ativa pela enzima tripanotiona reductase (TcTR), utilizando NADPH + H⁺ e FADH₂ como coenzima (GONZÁLEZ-CHÁVEZ et al., 2019). Esse processo está ilustrado na figura 11.

A TcTR está presente no citoplasma e na mitocôndria do *T. cruzi* com a finalidade de combater o estresse oxidativo mediado por ERO da resposta imune hospedeira (TETAUD et al., 2001). Dessa forma, essa enzima também constitui um importante alvo no desenvolvimento de alternativas terapêuticas para o desenvolvimento de moléculas com potencial tripanocida.

Figura 11 - Equilíbrio oxirredutor do *T. cruzi* mediado pela enzima tripanotona redutase.

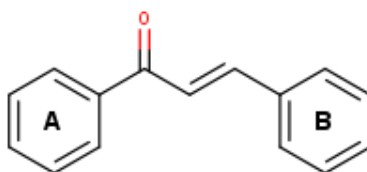


Fonte - PITA e PASCUTTI (2011).

1.5. Chalconas como fontes de novas moléculas bioativas

Chalconas são um grupo de moléculas cuja estrutura básica é um esqueleto 1,3-diaril-2-propen-1-ona, que consiste em dois anéis aromáticos (A e B) separados por um sistema cetônico α , β -insaturado, podendo ser substituída em quaisquer desses anéis. Assim, é possível a produção de uma grande diversidade de chalconas naturais e sintéticas (Figura 12) (ZHUANG et al., 2017).

Figura 12 - Estrutura básica de chalconas.



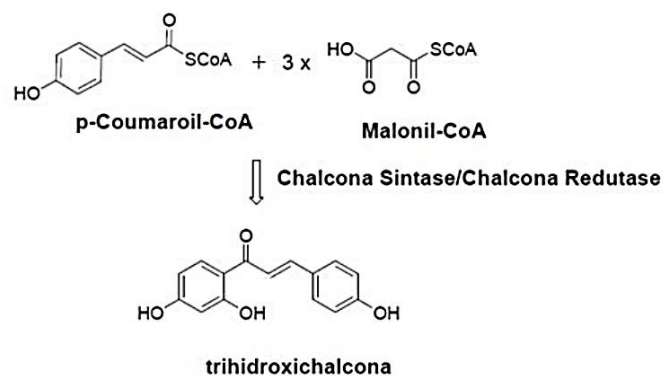
Fonte – Adaptado de ZHUANG (2017).

Quimicamente, as chalconas são classificadas em duas categorias: chalconas simples (ou clássicas) e chalconas híbridas, ambas conservando o sistema 1,3-diaril-2-propen-1-ona. As chalconas híbridas se subdividem em bis-chalconas (ex.: ruschalcona),

que contém dois esqueletos chalcônicos na sua organização, di-hidrochalconas (ex.: fleminchalconas), que apresentam o sistema α , β -insaturado com uma insaturação a menos, chalconas mímicas (ex.: piperlonguminas) e chalconas fundidas (ex.: oxifadichalconas). Nesse grupo também estão incluídas moléculas sem relação estrutural com as chalconas tradicionais, mas derivadas dessas moléculas em rotas biológicas específicas (LIARGKOVA et al., 2016; ZHUANG et al., 2017).

A síntese de chalconas naturais pelas plantas ocorre através da ação das enzimas chalcona sintase e chalcona redutase, utilizando como substratos os compostos malonil-CoA e p-coumaroil-CoA (Figura 13). Essa rota biossintética também está associada à produção de outros metabólitos secundários, como flavonóides (IRFAN et al., 2020).

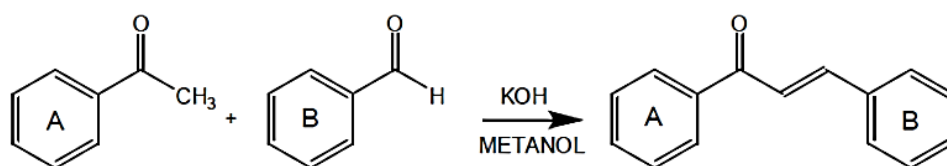
Figura 13 - Rota biológica de síntese de chalconas.



Fonte – Adaptado de MARAVALHO (2019).

Além do processo de síntese natural, as chalconas podem ser sintetizadas de modo rápido e fácil em laboratório. O principal tipo de reação empregado na síntese de chalconas é a condensação de Claisen-Schmidt (Figura 14), que acontece por meio de uma condensação entre um benzaldeído e uma metilcetona (acetofenona) na presença de catalisador em meio alcoólico ácido/alcalino (BHAMBRA et al., 2017).

Figura 14 - Síntese de chalconas através da reação de condensação de Claisen-Schmidt.



Legenda – A reação de condensação de Claisen-Schmidt consiste em uma reação em meio alcoólico (metanol) e alcalino (KOH) entre uma acetofenona (composto A) e um benzaldeído (B).

Fonte – Adaptado de HUO et al., 2021.

As chalconas tem atraído muito interesse de grupos de pesquisa por conta da facilidade de síntese, bem como por conta do seu amplo espectro de propriedades biológicas, como anti-inflamatória (YADAV et al., 2011), antioxidante (SÖKMEN; AKRAM KHAN, 2016), neuroprotetor (SOOKNUAL et al., 2020), antiviral (ELKHALIFA et al., 2021) e antimicobacteriano (RAMESH et al., 2020).

Além disso, apresenta efeito citotóxico em linhagens de células de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231), oral (SAS), próstata (PC-3), cólon (HCT-116) e câncer de fígado (HuH-7 e HepG2) (BADRIA et al., 2019; SHAIK et al., 2020). Em cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* sensíveis e resistentes, aminofenilchalconas apresentaram um excelente efeito sinérgico com norfloxacino, gentamicina e penicilina (FERRAZ et al., 2020; UŠJAK et al., 2019). Efeito semelhante foi observado em cepas resistentes de *S. aureus* com chalconas isoladas das flores de *Arrabidaea brachypoda* (REZENDE-JÚNIOR et al., 2020).

No contexto das doenças negligenciadas causadas por parasitos, chalconas como a cardamonina e a licochalcona A foram capazes de reduzir em mais de 50% a quantidade de ovos de *Schistosoma mansoni* em um modelo *in vivo*, além de induzirem alterações mitocondriais, condensação de cromatina e estresse oxidativo nesse parasito (CARVALHO et al., 2021; SOUZA et al., 2017).

Em tripanossomatídeos, derivados de chalconas e tiossemicarbazonas exibiram em *Leishmania amazonensis* efeito biológico e seletividade superiores a pentamidina (MENDES et al., 2019). Em *L. (Leishmania) infantum*, licochalcona apresentou efeito leishmanicida *in vitro* e em modelo experimental de leishmaniose (SOUZA et al., 2020).

Por fim, flavocauina B, uma chalcona natural encontrada em *Polygonum ferrugineum*, assim como derivados de trimetoxifenilchalconas e p-aminofenilchalconas exerceram efeito em cepas *T. cruzi* superiores àqueles do benznidazol (DE BRITO et al., 2022; MATOS et al., 2022; RODRIGUES et al., 2017).

Desse modo, esses efeitos de chalconas, sobretudo sobre tripanossomatídeos, ressalta o potencial promissor dessas moléculas na terapia antichagásica.

1.6. Justificativa

A DC, cujo agente etiológico é o *T. cruzi*, é uma patologia endêmica em países latino-americanos, mas que vem se tornando endêmica em regiões desenvolvidas, como Europa, Estados Unidos, Canadá e Austrália (SORIANO-ARANDES et al., 2016). Apesar da expansão desta parasitose, a mesma continua sendo um problema de saúde negligenciado, visto que não atrai interesse das indústrias farmacêuticas para a pesquisa de novas ferramentas farmacológicas, pois atinge majoritariamente populações com baixo poder aquisitivo (BALOUZ; AGÜERO; BUSCAGLIA, 2017; BESTETTI et al., 2016; CHAO; LEONE; VIGLIANO, 2020).

Além disso, o benznidazol é o único fármaco disponível para o tratamento da DC em nosso país, sendo dotado de baixa eficácia na fase crônica da doença e efeitos adversos consideráveis, causando baixa adesão ao tratamento. Nesse contexto, muitos grupos de pesquisa buscam moléculas promissoras para o desenvolvimento de novas terapias antichagásicas, sobretudo aquelas cujos efeitos antimicrobiano e antiparasitário são descritos.

Dentre as estratégias mais modernas para o desenvolvimento de terapias antichagásicas, destacam-se algumas enzimas consideradas alvos terapêuticos promissores, como as enzimas cruzaina e tripanotiona redutase, que são de suma importância para a sobrevivência e infectividade do parasito no organismo hospedeiro (BOMBAÇA et al., 2019; FERREIRA; ANDRICOPULO, 2017; RIVERA et al., 2009; SANTOS NASCIMENTO; DE AQUINO; DA SILVA-JÚNIOR, 2021). Desse modo, o desenvolvimento de substâncias inibidoras dessas enzimas constitui uma estratégia importante e promissora.

Chalconas são moléculas com potencial citotóxico (PRETI et al., 2018), antimicrobiano (UŠJAK et al., 2019), anti-inflamatório (GACCHE et al., 2008) e

leishmanicida (ASSOLINI et al., 2020). Além disso, estudos demonstram o efeito tripanocida de diversas moléculas desse grupo (CUARTAS et al., 2020; SALMAZZO et al., 2021). Esse efeito está relacionado com a inibição de cruzaina e/ou tripanotona reductase, causando morte do parasito e redução da replicação de formas intracelulares (DE SOUZA et al., 2020; MATADAMAS-MARTÍNEZ et al., 2019; ROCHA et al., 2018; VÁZQUEZ et al., 2017). Assim, essa classe de moléculas torna-se promissora para o desenvolvimento de novas moléculas antichagásicas.

Ademais, a facilidade de síntese de derivados chalcônicos permite o desenvolvimento de moléculas com propriedades físico-químicas e biológicas distintas e a seleção daqueles mais promissores conforme a eficácia e seletividade. Adicionalmente, a utilização de técnicas *in silico* de interação entre substâncias químicas e alvos terapêuticos possibilita o desenvolvimento racional, otimizando tempo e recursos financeiros (IRFAN et al., 2020).

Portanto, o presente trabalho visa contribuir para o conhecimento da doença e ampliar as informações acerca do desenvolvimento de novas moléculas no contexto da terapia antichagásica, bem como explorar as estratégias de inibição enzimática como propostas inovadoras de abordagem farmacológica.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito tripanocida *in vitro* e *in silico* de chalconas semissintéticas sobre cepa Y de *T. cruzi*.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade das chalconas sobre células hospedeiras;
- Analisar o potencial tripanocida das chalconas sobre formas epimastigota, tripomastigota e amastigota de *T. cruzi*;
- Investigar o mecanismo de morte celular das chalconas sobre *T. cruzi*;
- Avaliar alterações na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e no potencial transmembrânico mitocondrial induzidas por chalconas em *T. cruzi*;
- Identificar as possíveis interações das moléculas em estudo com as enzimas cruzafina e tripanotiona redutase de *T. cruzi*.

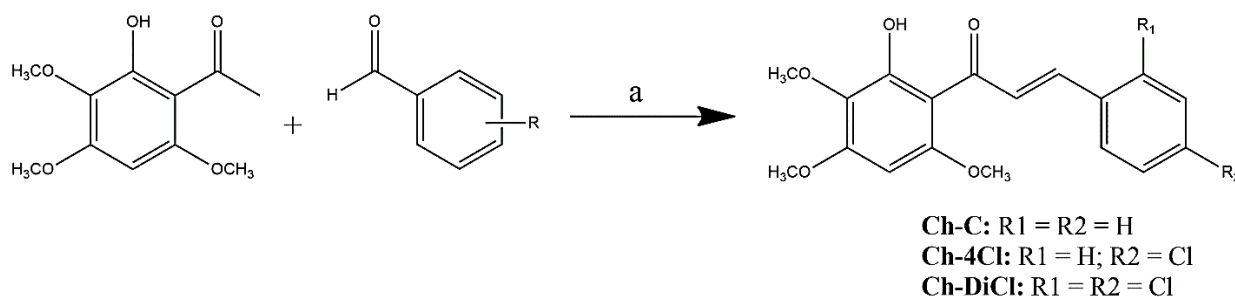
MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção e caracterização das substâncias de estudo

As chalconas do presente estudo foram sintetizadas e caracterizadas conforme descrito por DA SILVA e colaboradores (2020), e generosamente cedidas pelo Laboratório de Síntese Orgânica, da Universidade Estadual do Vale do Acaraú (UVA), coordenado pelo Prof. Dr. Hécio Silva dos Santos. Na síntese foi empregada a reação de condensação de Claisen-Schmidt em meio básico, como apresentado na figura 15. Nessa reação, em 5 mL de etanol, 2 mmol de 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona, isolada de *Croton anisodontus*, foram adicionados à diferentes soluções de benzaldeídos derivados (2 mmol), seguidos da adição de NaOH até a obtenção de uma solução 50% (p/v), permanecendo sob agitação durante 48 horas.

Figura 15 - Reação de Claisen-Schmidt em meio alcalino para obtenção de chalconas.



Legenda: a – NaOH 50 % (p/v), etanol, temperatura ambiente, 48 horas.

Fonte: Adaptado de DA SILVA e colaboradores (2020).

Os sólidos obtidos foram filtrados, lavados e as estruturas químicas caracterizadas, obtendo-se as moléculas Ch-C, Ch-4Cl e Ch-DiCl (quadro 1). A caracterização das moléculas foi realizada por espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) (APÊNDICE A). Os espectros de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) foram obtidos em equipamento Avance DPX-500 (BRUKER, Billerica, Massachusetts, EUA). Os espectros foram obtidos utilizando o clorofórmio deuterado como referência (CDCl_3), e as mudanças químicas reportadas como valores de δ em partes por milhão (ppm) relativos ao CDCl_3 .

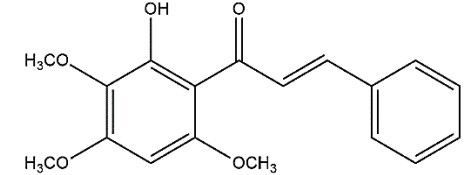
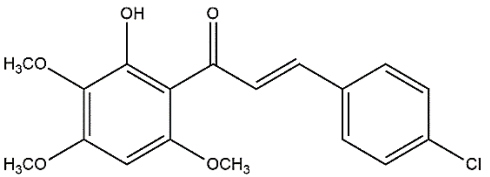
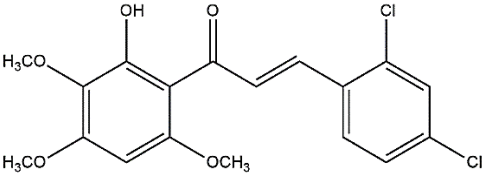
Para avaliação da presença de grupos químicos foi realizada a análise de espectroscopia de infravermelho (FTIR) usando o mofo de reflexão total atenuada (ATR) com o equipamento VERTEX 70V (BRUKER, Billerica, Massachusetts, EUA). Os

espectros foram obtidos a temperatura ambiente na faixa de número onda de 400 a 4000 cm^{-1} , acumulando 60 varreduras por espectro, com uma resolução de 2 cm^{-1} .

Os espectros de massas para as substâncias foram obtidos pela análise de CG-EM, com o equipamento GC-7890B/MSD-5977A (AGILENT TECHNOLOGIES, Santa Clara, Califórnia, EUA), com analisador de quadrupolo a 70 eV e coluna capilar RTX5-MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), com fluxo de injeção de 1,00 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando o gás hélio como gás de arraste. A temperatura do injetor foi mantida a 230 $^{\circ}\text{C}$ e no forno, foi utilizado um gradiente de temperatura: temperatura inicial de 40 $^{\circ}\text{C}$ e a temperatura aumentada a uma taxa de 3 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até atingir 280 $^{\circ}\text{C}$, onde permaneceu a essa temperatura até o fim da corrida analítica. As temperaturas da fonte de íons e interface de transmissão foram mantidas a 230 $^{\circ}\text{C}$ e 280 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

O Benzonidazol (Bz), fármaco de referência, foi doado pelo Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE). Todas as substâncias foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) estéril para obtenção de soluções estoque na concentração de 0,2 M. Para os ensaios, diluições seriadas foram feitas em solução tampão fosfato estéril (PBS, constituído de NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH_2PO_4 1,47 mM e Na_2HPO_4 8,1 mM; pH 7,4) a fim de se obter as soluções de trabalho, de modo que a concentração de DMSO nos grupos experimentais não excedesse 0,5%.

Quadro 1 – Estruturas químicas, massa e fórmula moleculares e nomenclatura das chalconas obtidas por condensação de Claisen-Schmidt.

Chalcona	Estrutura química	Massa Molar (g.mol ⁻¹)	Fórmula Molecular	Nome IUPAC
Ch-C		314,34	C ₁₈ H ₁₈ O ₅	(E)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil) -3-fenilprop-2-en-1-ona
Ch-4Cl		348,78	C ₁₈ H ₁₇ ClO ₅	(E)-3-(4-clorofenil) -1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil) prop-2-em-1-ona
Ch-DiCl		383,22	C ₁₈ H ₁₆ Cl ₂ O ₅	(E)-3-(2,4-diclorofenil) -1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil) prop-2-en-1-ona

Fonte: Elaborado pelo autor.

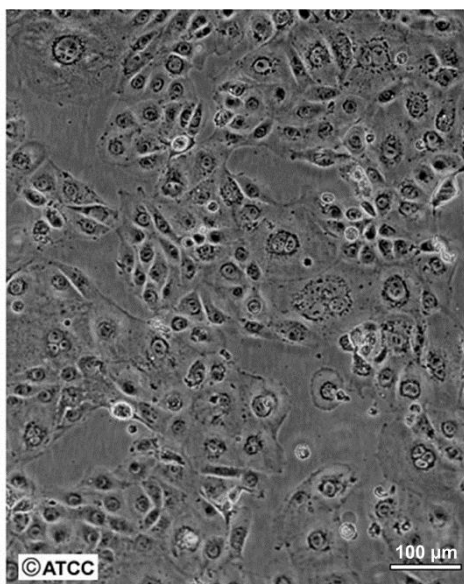
3.2. Avaliação da citotoxicidade em células hospedeiras

A citotoxicidade das chalconas foi investigada em células LLC-MK2 (Figura 16) com a finalidade de avaliar a seletividade das mesmas pelo *T. cruzi* em relação às células hospedeiras.

As células LLC-MK2 (ATCC CCL-7), uma linhagem de células epiteliais obtidas dos túbulos renais de macaco (*Macaca mulatta*), foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, pH 7,4), suplementado com 10% de SBF (Soro bovino fetal) e antibióticos (penicilina – 200 UI.mL⁻¹ e estreptomicina – 130 mg.mL⁻¹). As mesmas foram cultivadas em garrafas plásticas estéreis (75 cm²) em estufa de CO₂ (37,0 ± 0,3°C, 5% de CO₂).

As células foram cultivadas até atingirem a confluência (Figura 15). Após, o meio foi removido, as células lavadas com 5 mL de PBS estéril e deslocadas com 1 mL de solução de Tripsina/EDTA (0,25%/0,04%), incubadas por 5 a 10 minutos a 37°C, e inativadas com 2 mL de meio DMEM 10% SBF. Para manutenção da cultura, alíquotas foram transferidas para novas garrafas contendo meio de cultura.

Figura 16 - Fotomicrografia de linhagem de células LLC-MK2 em estado de confluência.



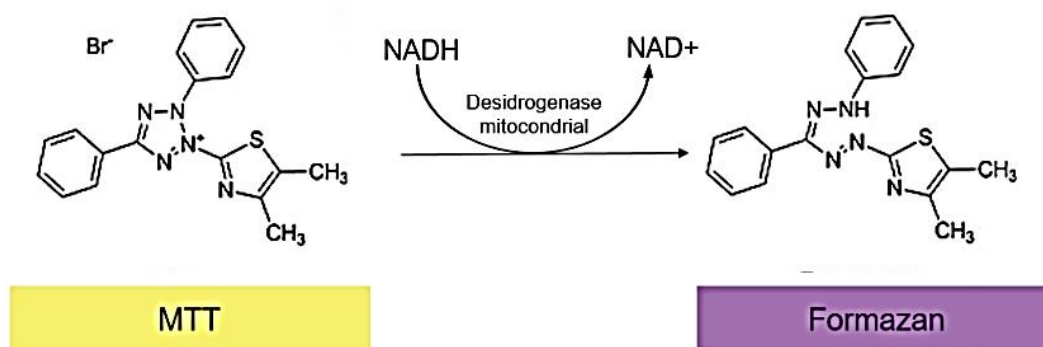
Fonte: Adaptado de <https://www.atcc.org/products/ccl-7>. Acesso em 18/08/2021.

Para congelamento, após a lavagem e deslocamento das células, as mesmas foram centrifugadas (4000 RPM por 5 minutos), o meio removido, e o *pellet* ressuspensão em

solução de congelamento (95% SBF e 5% DMSO estéril) e as células armazenadas em nitrogênio líquido.

Para avaliação da citotoxicidade das substâncias foi utilizado o ensaio de redução do MTT [Brometo de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio], previamente descrito (MOSMANN, 1983). Nesse ensaio, como demonstrado na figura 17, o sal de MTT, de cor amarela, é endocitado pelas células viáveis, onde é reduzido por enzimas intracelulares a um sal insolúvel de cor arroxeadada, o sal de formazan, que é solubilizado após a adição de surfactantes. Desse modo, a concentração de formazan produzida é medida espectrofotométrica a 570 nm e é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis.

Figura 17 - Reação de redução do sal de MTT à sal de formazan.

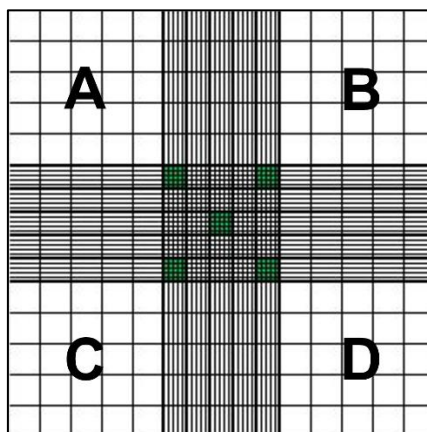


Fonte: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1104215/1/CT4271572final2.pdf>.

Acesso em 18/08/2021.

Culturas confluentes foram lavadas e tripsinizadas, como descrito anteriormente. Em seguida, a mistura foi transferida para um tubo falcon, centrifugada (4000 RPM por 5 minutos), e o sobrenadante removido. O *pellet* foi ressuspensão em 1 mL de meio DMEM, e uma alíquota foi diluída em solução de azul de trypan (0,4% m/v em PBS) nas proporções de 1:10 e 1:100, sendo esta segunda transferida para a Câmara de Neubauer, e a densidade celular determinada por contagem, como exposto na figura 18.

Figura 18 - Distribuição dos campos da Câmara de Neubauer.



Legenda: Os quatro campos maiores (A, B, C e D) foram utilizados para quantificação das células LLC-MK2, enquanto a contagem de parasitos (formas epimastigota e tripomastigota) foi realizada nos cinco campos verdes centrais.

Fonte: Adaptado de <https://docplayer.com.br/52936896-Etodos-de-contagem-microbiana.html>. Acessado em 19/08/2021.

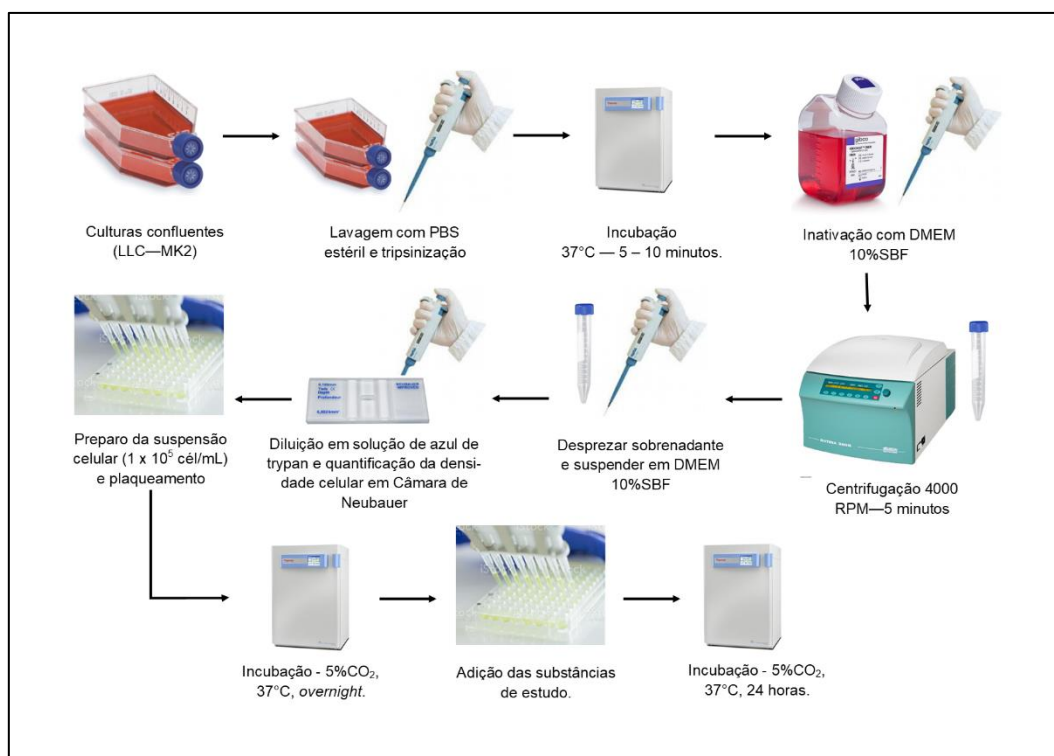
A densidade celular (células.mL⁻¹) foi determinada utilizando a seguinte equação:

Equação 1 – Determinação da densidade celular em câmara de Neubauer

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

Para os experimentos, a densidade celular foi ajustada para 10⁵ células.mL⁻¹ e transferida para placas estéreis de 96 poços (200 µL/poço). As placas foram incubadas em estufa de CO₂ *overnight* e, em seguida, os poços tratados com as chalconas CH-C, Ch-4Cl, Ch-DiCl ou Bz (1000-31,25 µM) (Figura 19). Como controle negativo, foram utilizados grupos não tratados, e células tratadas com DMSO 0,5% para avaliação da toxicidade do diluente. Além disso, poços contendo apenas meio de cultura foram utilizados como branco.

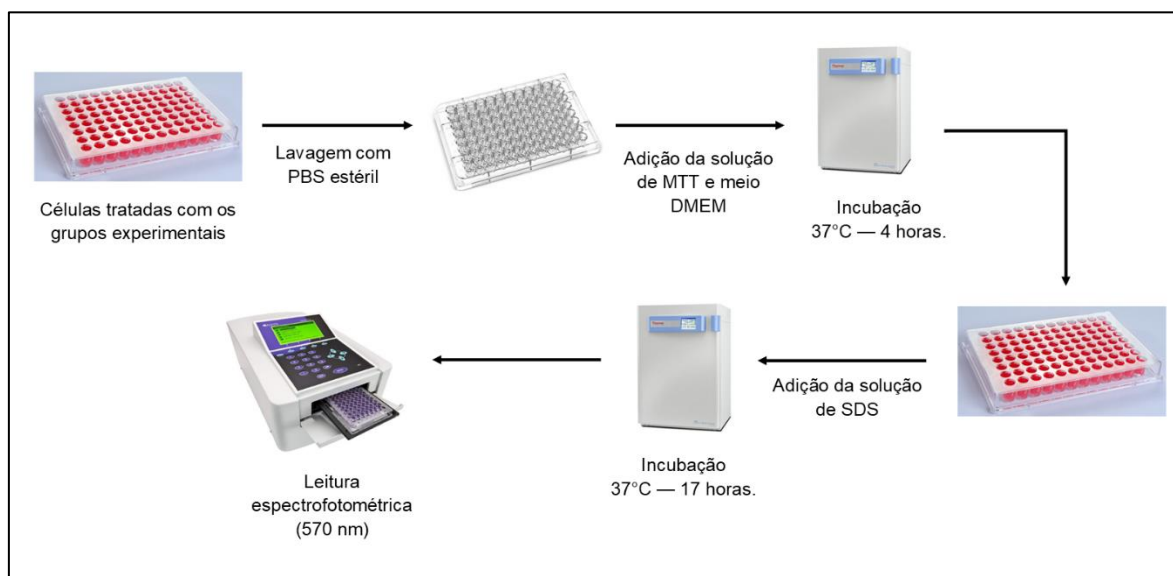
Figura 19 - Protocolo de plaqueamento de células LLC-MK2 e tratamento com as substâncias de estudo.



Fonte: Adaptado de MENEZES (2017).

Passadas 24 horas de incubação em estufa de CO₂, cada poço foi lavado com 100 μ L de PBS estéril, e 10 μ L de solução de MTT ($2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) foram adicionados, juntamente com 100 μ L de DMEM 10% SBF. As placas foram incubadas no escuro a 37°C durante 4 horas, sendo então adicionados 90 μ L de solução de SDS (10% m/v em HCl 0,05N). As placas foram incubadas durante 17 horas para solubilização dos cristais de formazan, sendo realizada a leitura por espectrofotometria em leitora de microplacas a 570 nm (Figura 20).

Figura 20 - Realização do ensaio de redução do MTT para avaliação da viabilidade celular.



Fonte: Adaptado de MENEZES (2017).

O percentual de viabilidade celular (%) foi determinado utilizando a seguinte equação:

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

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

Em que:

Abs T – Absorbância do grupo teste;

Abs BC – Absorbância do branco;

Abs CT – Absorbância do grupo controle.

Os percentuais de viabilidade celular foram utilizados para estimar, por regressão não-linear (curva fit) a concentração necessária para reduzir em 50% a viabilidade das células (CC₅₀).

3.3. Avaliação da atividade sobre formas epimastigota de *T. cruzi* cepa Y

As formas epimastigota (cepa Y) de *T. cruzi* foram cedidas pelo Laboratório de Bioquímica de Parasitas da Universidade de São Paulo (USP) e cultivadas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*, com NaCl 4 g.L⁻¹; Na₂HPO₄.12H₂O 11,6 g.L⁻¹; KCl 0,4 g.L⁻¹; glicose 2,2 g.L⁻¹; triptose 5 g.L⁻¹; infusão de fígado 5 g.L⁻¹; hemina bovina 25 mg.L⁻¹; pH

7,4) suplementado com 10% de SBF e antibióticos (penicilina – 200 UI.mL⁻¹ e estreptomicina – 50 mg.L⁻¹). As culturas foram mantidas a 28 ± 1°C em estufa BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) em garrafas estéreis (ARAÚJO-JORGE; CASTRO, 2000).

Os parasitos foram cultivados na densidade de 1 x 10⁶ células. mL⁻¹ e avaliados diariamente até atingirem a fase exponencial da curva de crescimento (6° ao 8° dia de cultivo) e, em seguida, subcultivados por transferência para um novo meio LIT. Para manutenção do estoque de células, as culturas foram centrifugadas (2800 RPM por 7 minutos), ressuspensas em 95% SBF e 5% de DMSO estéril e estocadas em nitrogênio líquido.

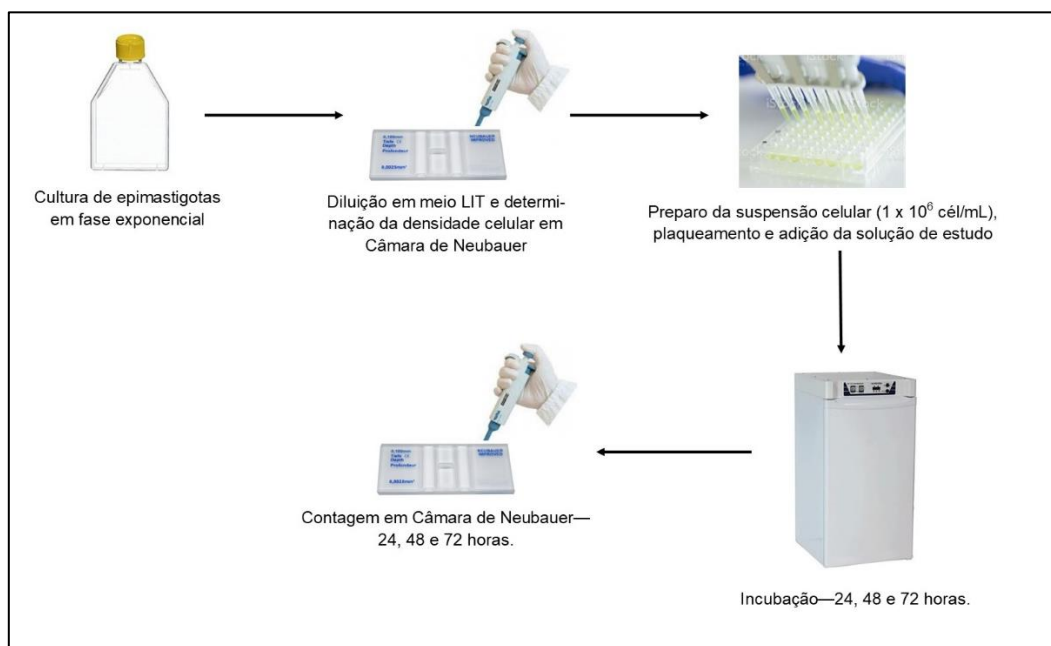
Para avaliação do efeito das substâncias do presente estudo nas formas epimastigotas, alíquotas contendo os parasitos na fase exponencial foram diluídas em meio LIT completo e transferidas para Câmara de Neubauer, sendo feita a determinação da densidade celular (células/mL) em cinco quadrantes do campo central, como descrito na figura 17. O cálculo foi feito empregando a seguinte equação:

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

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

Em seguida, os parasitos foram transferidos para placas estéreis de 96 poços, de modo que a concentração inicial fosse ajustada para 1 x 10⁶ células.mL⁻¹ (200 µL/poço), juntamente com as chalconas (CH-C, Ch-4Cl e Ch-DiCl) e Bz (1000-31,25 µM), como mostrado na figura 21. Além disso, as células foram tratadas com DMSO 0,5% para avaliar o efeito do veículo sobre a viabilidade celular, e PBS foi utilizado como controle negativo.

Figura 21 - Plaqueamento e avaliação do efeito de substâncias sob formas epimastigota.



Fonte: Adaptado de MENEZES (2017).

Após o tratamento, as placas foram incubadas em estufa BOD, sendo colhidas alíquotas dos grupos experimentais após 24, 48 e 72 horas para quantificação dos parasitos viáveis, com morfologia típica e mobilidade (LIMA et al., 2016). Finalmente, o percentual de viabilidade dos parasitos foi determinado pela equação a seguir:

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

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

Em que:

T – Contagem de parasitos viáveis no grupo experimental;

CT – Média da contagem de parasitos viáveis do grupo controle negativo.

Com os valores percentuais de viabilidade de formas epimastigotas, foi possível determinar a concentração capaz de inibir em 50% a proliferação dessas formas do parasito (IC_{50}), como descrito previamente.

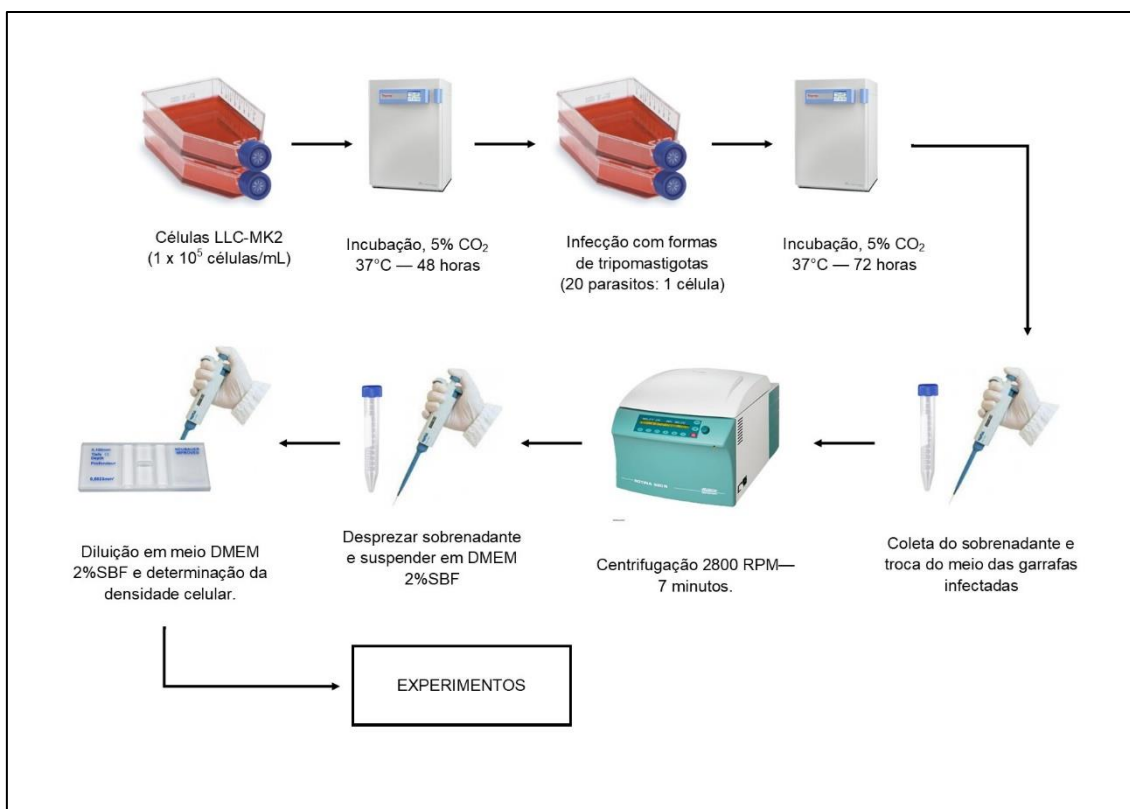
3.4. Avaliação do efeito tripanocida em formas tripomastigota de *T. cruzi* cepa Y

As formas tripomastigota de *T. cruzi* foram obtidas a partir da infecção de células hospedeiras, conforme descrito por LIMA e colaboradores (2016). Para isso, células LLC-MK2 foram cultivadas em garrafas estéreis de 25 cm² na concentração de 1×10^5

células. mL⁻¹ em meio DMEM 10% SBF. Após 48 horas de incubação em estufa de CO₂, o meio foi substituído por DMEM 2% SBF sem antibióticos, e as células infectadas com tripomastigotas na proporção de 20 parasitos por célula.

Após 72 horas, o meio das garrafas foi substituído, e o sobrenadante centrifugado (2800 RPM por 7 minutos) para obtenção dos tripomastigotas, procedimento realizado até o 6º dia pós-infecção. A densidade celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer, semelhante ao feito para as formas epimastigotas, e os tripomastigotas foram utilizados para os ensaios de avaliação do efeito das substâncias de estudo (figura 22) e obtenção de formas amastigotas.

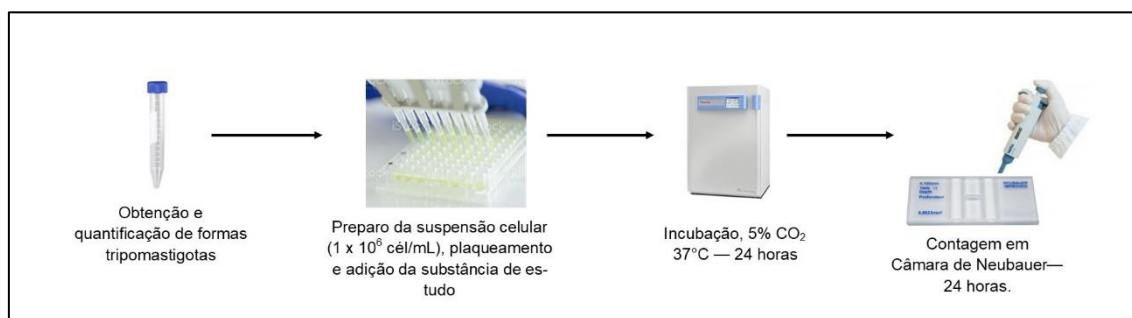
Figura 22 - Obtenção de formas tripomastigota de *T. cruzi*.



Fonte: Adaptado de MENEZES (2017).

Para avaliação do efeito tripanocida das substâncias em estudo, 10^6 tripomastigotas/mL foram incubadas com as chalconas (CH-C, Ch-4Cl e Ch-DiCl) e Bz (1000 – 31,25 μ M) em placas de 96 poços (200 μ L/poço) com meio DMEM 10% SBF. Parasitos não-tratados foram utilizados como controle negativo, sendo considerados como 100% de viabilidade (Figura 23). Além disso DMSO 0,5% foi utilizado como grupo veículo.

Figura 23 - Ensaio de avaliação da atividade tripanocida de substâncias



Fonte: Adaptado de MENEZES (2017).

Após 24 horas de incubação em estufa de CO₂, alíquotas foram coletadas dos grupos experimentais, e a quantidade de parasitos foi determinada por contagem em Câmara de Neubauer. O percentual de viabilidade celular foi calculado conforme a equação utilizada para as formas epimastigotas, e a concentração letal para 50% dos parasitos (LC₅₀) foi estimada por regressão não-linear. Além disso, foi calculado o índice de seletividade (IS) sobre as formas tripomastigotas em relação as células hospedeiras, de acordo com a seguinte equação:

Equação 5 – Cálculo do Índice de Seletividade.

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

Em que:

CC₅₀ – Concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade das células hospedeiras.

LC₅₀ – Concentração letal para 50% dos parasitos.

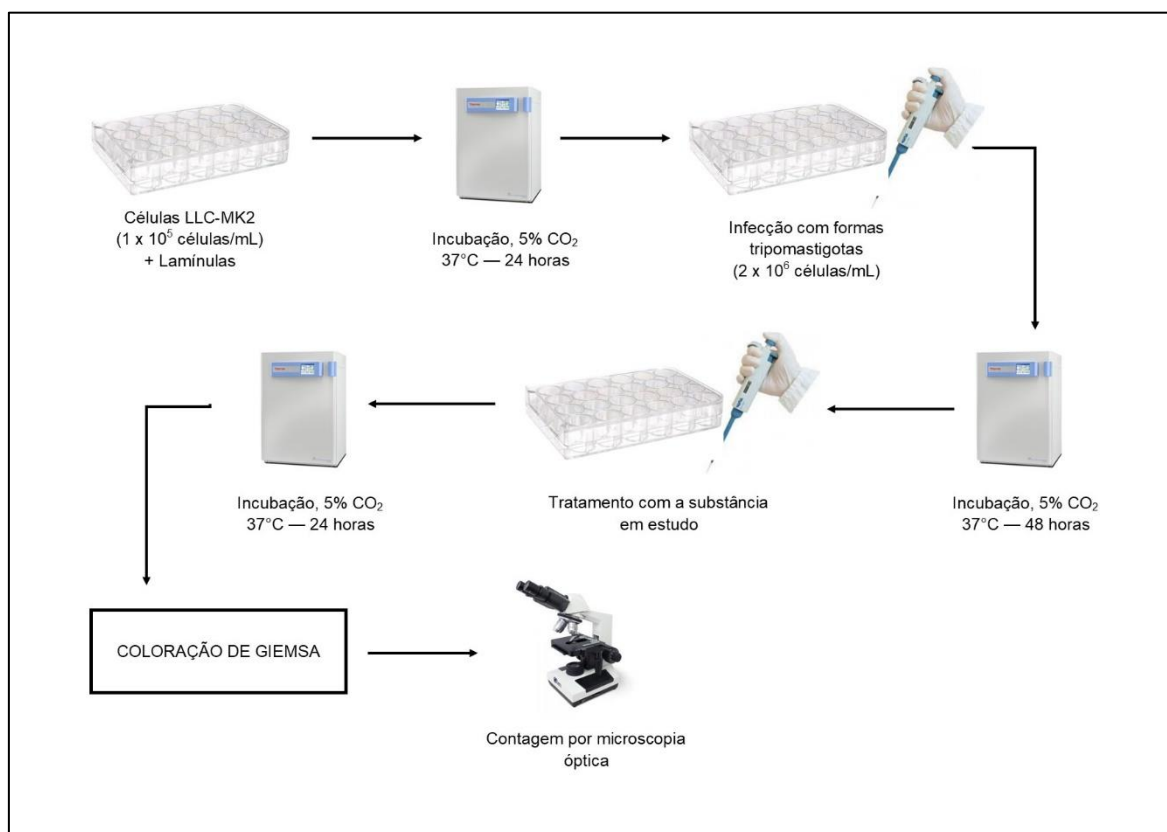
3.5. Avaliação do efeito sobre formas amastigota de *T. cruzi* cepa Y

Para avaliação do efeito da Ch-DiCl sobre amastigotas intracelulares, células LLC-MK2 (10^5 células.mL⁻¹) foram cultivadas em placas de 24 poços, sobre lamínulas estéreis de 13 mm de diâmetro durante 24 horas e incubadas em estufa de CO₂. Em seguida, as células foram infectadas com tripomastigotas (2×10^6 células.mL⁻¹) e incubadas durante 48 horas, sendo então tratadas com Ch-DiCl (150; 75; 37,5 e 18,75 μM) e permanecendo em estufa de CO₂ por 24 horas.

Por fim, as lamínulas foram retiradas do poço, lavadas com água destilada e fixadas com solução de Bouin. Em seguida, foram lavadas com água destilada e etanol 70% e desidratadas com metanol por 2 minutos. Após, foram coradas utilizando solução de corante Giemsa (5% v/v em água destilada) por 60 minutos. Finalmente, as lamínulas foram lavadas para remoção do excesso de corante, secadas e montadas em lâmina utilizando entelan, conforme mostrado na figura 24 (ARAÚJO-JORGE, T; DE CASTRO, 2010).

A avaliação do efeito sobre as formas amastigotas foi feita por contagem em microscópio óptico da quantidade de células não infectadas e células infectadas, perfazendo um total de 300 células por grupo experimental. Os resultados foram expressos como percentual de células infectadas e quantidade de amastigotas/100 células infectadas (MONTEIRO et al., 2020).

Figura 24 - Avaliação do efeito em formas amastigota de *T. cruzi*.



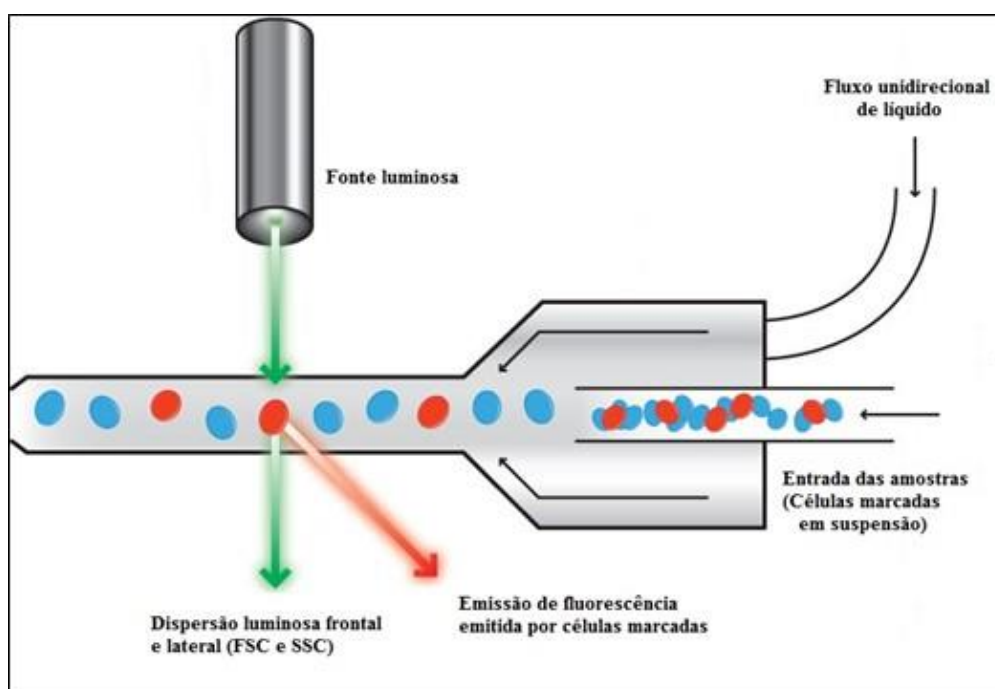
Fonte: Adaptado de MENEZES (2017).

3.6. Ensaios de citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para rápida análise de células e partículas suspensas em uma solução isotônica em fluxo através de um ou mais *lasers*, permitindo avaliar diversos parâmetros através de marcadores fluorescentes, como apresentado na figura 25. Cada partícula é analisada através de uma dispersão de luz visível e um ou mais parâmetros de fluorescência. Esta dispersão de luz é mensurada em duas diferentes direções, a direção frontal (FSC – *Forward Scatter*), que indica o tamanho de cada célula, e a lateral (SSC – *Side Scatter*), que indica a complexidade interna e granulosidade das células, característico de contato com organelas e outros componentes internos (MCKINNON, 2018).

Além disso, as células podem estar marcadas com fluorocromos, que são excitados por feixes luminosos, promovendo a emissão de luz em um comprimento de onda diferente, cuja intensidade é mensurada por detectores de fluorescência (FL1, FL2, FL3 e FL4). Por fim, estes sinais eletrônicos são detectados e convertidos em informações relativas a eventos celulares normais e patológicos da célula/partícula em análise (FLORES-GONZALEZ; CANCINO-DÍAZ; CHAVEZ-GALAN, 2020).

Figura 25 - Funcionamento do citômetro de fluxo.



Fonte: (MENEZES, 2017)

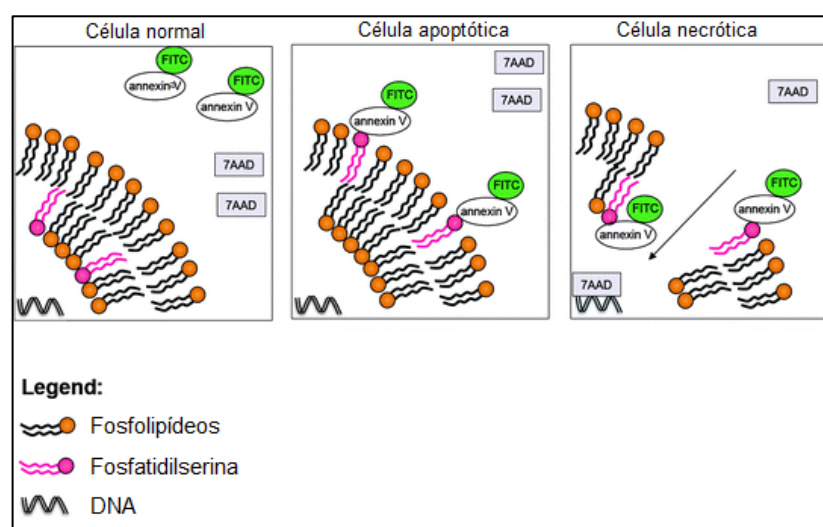
3.6.1. Avaliação do perfil de morte e integridade celular

Para avaliar os eventos de morte celular nas formas epimastigotas desencadeado pelo tratamento com as chalconas em estudo, foram utilizados os marcadores 7-Amino-Actinomicina D (7-AAD) e a Anexina V conjugada com Ficoeritrina (AxV PE).

O 7-AAD é um derivado fluorescente da actinomicina D, que é excitado no comprimento de onda de 488 nm e emite fluorescência em 647 nm. Esse fluorocromo intercala-se entre as fitas de DNA, porém é incapaz de atravessar a membrana plasmática íntegra. Desse modo, células que apresentam alta marcação com 7-AAD perderam a sua integridade de membrana, característica importante da morte celular por necrose (CHAN; MCCULLEY; KESSEL, 2017).

A Anexina V, em contrapartida, é uma proteína que, na presença de íons cálcio, liga-se à fosfatidilserina (PS), um lipídeo presente no folheto interno da membrana lipídica. A externalização de PS é um evento precoce da apoptose, estando relacionada ao reconhecimento por fagócitos e consequente remoção de corpos apoptóticos do tecido (KIM et al., 2020). O princípio destas duas marcações está demonstrado na figura 26.

Figura 26 - Avaliação do perfil de morte celular com os fluorocromos 7-AAD e AxV PE.



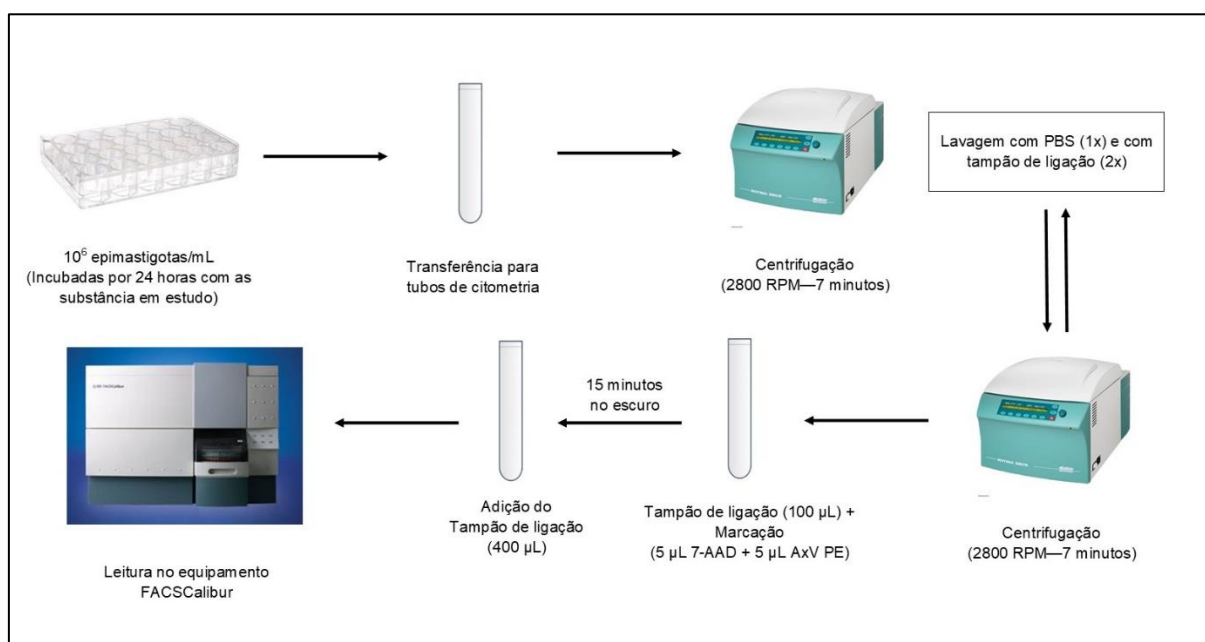
Fonte: Adaptado de ZIMMERMANN e MEYER (2011).

Para a realização deste ensaio, 1×10^6 epimastigotas.mL⁻¹ foram cultivados, como previamente descrito, em placas de 24 poços durante 24 horas na presença das substâncias em estudo (250 e 500 μ M). Em seguida, os grupos experimentais foram transferidos para tubos de citometria, centrifugados (2800 rpm/7 minutos), lavados com tampão de ligação (HEPES 10 mM; NaCl 140 mM; CaCl₂ 2,5 mM; pH 7,4) e a marcação

feita com kit comercial (100 μ L do tampão de ligação + 5 μ L de 7-AAD + 5 μ L de AxV PE) (Annexin V/PE Apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences) conforme as instruções do fabricante. Passados 15 minutos de incubação no escuro, foram adicionados 400 μ L do tampão de ligação em cada tubo, e as células analisadas no equipamento FACSCalibur com os detectores FL₂ (fluorescência laranja, de 564-606 nm) e FL₃ (fluorescência vermelha, de 675-710 nm) para AxV PE e 7-AAD, respectivamente (BD Biosciences, New Jersey, USA), sendo as informações adquiridas pelo *CellQuest Pro™ software* (Figura 27). Em cada grupo, foram adquiridos pelo menos 10.000 eventos, e os eventos foram divididos em quatro quadrantes: células viáveis (baixa marcação para ambos os corantes), células em necrose (alta marcação para 7-AAD), apoptose (alta marcação para AxV PE) e células duplamente marcadas.

Além disso, para mensurar o percentual de células que perderam a sua integridade de membrana, um outro ensaio foi realizado apenas utilizando a marcação com 7-AAD, seguindo as mesmas recomendações descritas. O resultado foi expresso como percentual de eventos com marcação positiva para 7-AAD, indicando dano de membrana.

Figura 27 - Procedimento de marcação com 7-AAD/AxV PE para avaliação do perfil de morte celular.



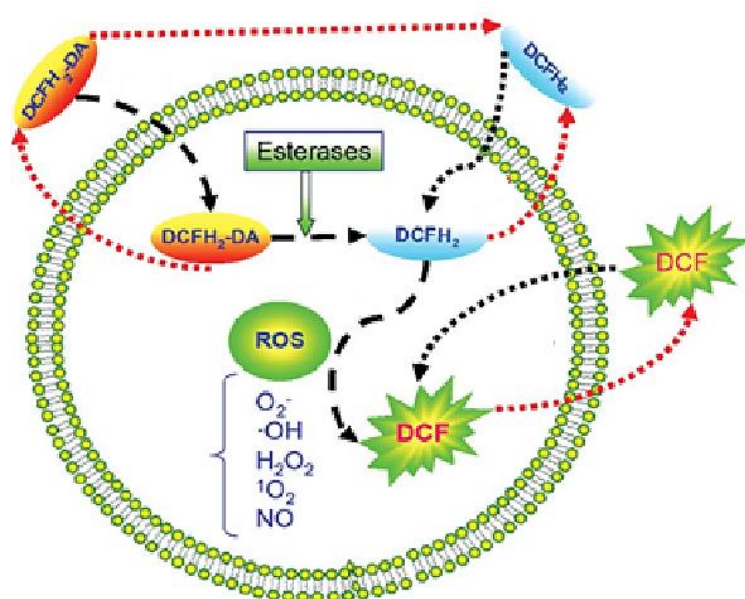
Fonte: Adaptado de MENEZES (2017).

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

Este ensaio baseia-se na capacidade da sonda 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH₂-DA), não-fluorescente, em atravessar a membrana

plasmática das células, sendo então clivada por esterases citoplasmáticas à 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH₂), que fica retida no citoplasma celular. O DCFH₂ é então oxidado pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) do citoplasma à 2',7'-diclorofluoresceína oxidada (DCF), como apresentado na figura 28. O DCF é excitado no comprimento de 488 nm e emite fluorescência detectável em FL₁ (fluorescência verde, de 515-545 nm). Desse modo, a intensidade da fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de ERO presentes no citoplasma das células (RAJNEESH et al., 2017).

Figura 28 - Processo de formação do DCF a partir da sonda DCFH₂-DA para determinação do acúmulo citoplasmático de ERO.

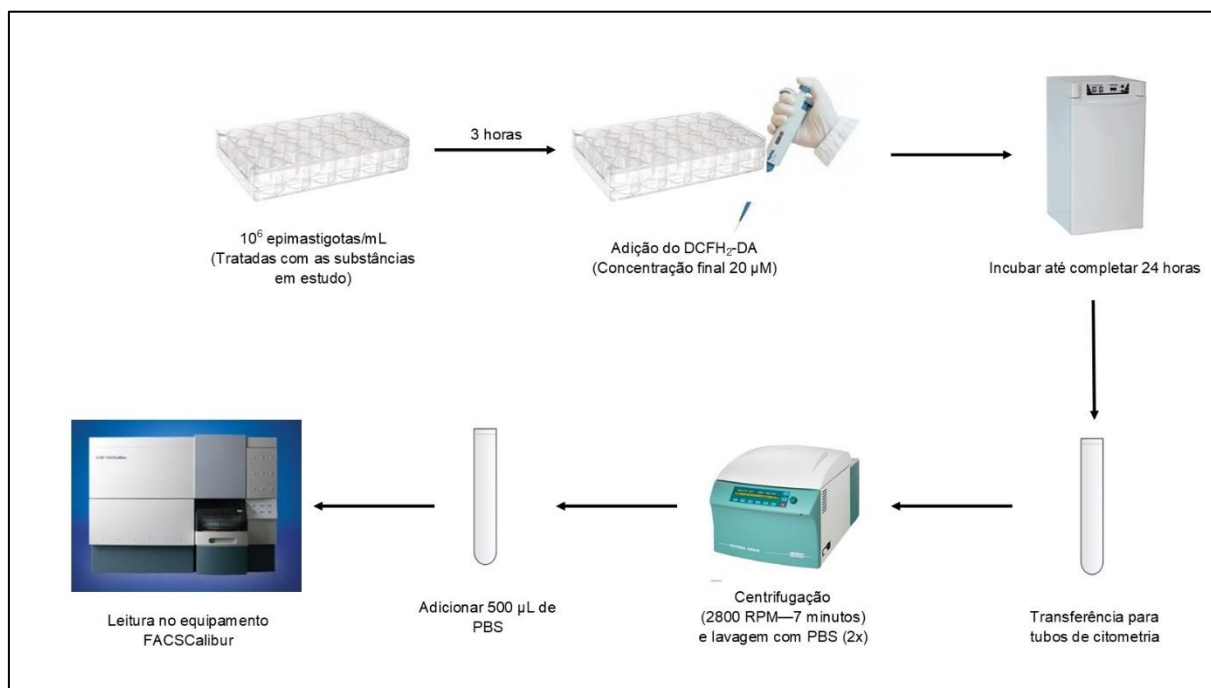


Legenda: A sonda lipofílica DCFH₂-DA penetra facilmente no citoplasma das células, sendo clivado por esterases citoplasmáticas em DCFH₂, uma molécula prontamente oxidável pelas ERO à DCF, uma molécula hidrofílica que apresenta fluorescência verde, cuja intensidade de fluorescência é uma medida da presença de ERO no citoplasma.

Fonte: Adaptado de PAVELESCU (2015).

Após 3 horas do tratamento das formas epimastigotas (10⁶ células.mL⁻¹ em placas de 24 poços) com as substâncias em estudo (250 e 500 μM), o DCFH₂-DA (concentração final de 20 μM em DMSO) foi adicionado e as placas incubadas no escuro (ARANDA et al., 2013). Passadas as 24 horas de tratamento, os grupos experimentais foram transferidos para tubos de citometria, lavados duas vezes e ressuspensos em 500 μL de PBS, sendo então feita a aquisição mínima de 10.000 eventos no equipamento FACSCalibur (Figura 29).

Figura 29 - Procedimento de marcação com DCFH₂-DA para avaliação do acúmulo citoplasmático de ERO.



Fonte: Adaptado de MENEZES (2017).

O acúmulo citoplasmático de ERO foi determinado através da média da intensidade de fluorescência relativa (IFR) proveniente da oxidação do DCFH₂ à DCF. Este valor é calculado a partir da média geométrica das intensidades de fluorescência dos grupos testes em relação ao controle, conforme a equação (KESSLER et al., 2013):

Equação 6 – Cálculo da Intensidade de Fluorescência Relativa.

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

Em que:

mTESTE – Média geométrica do grupo tratado;

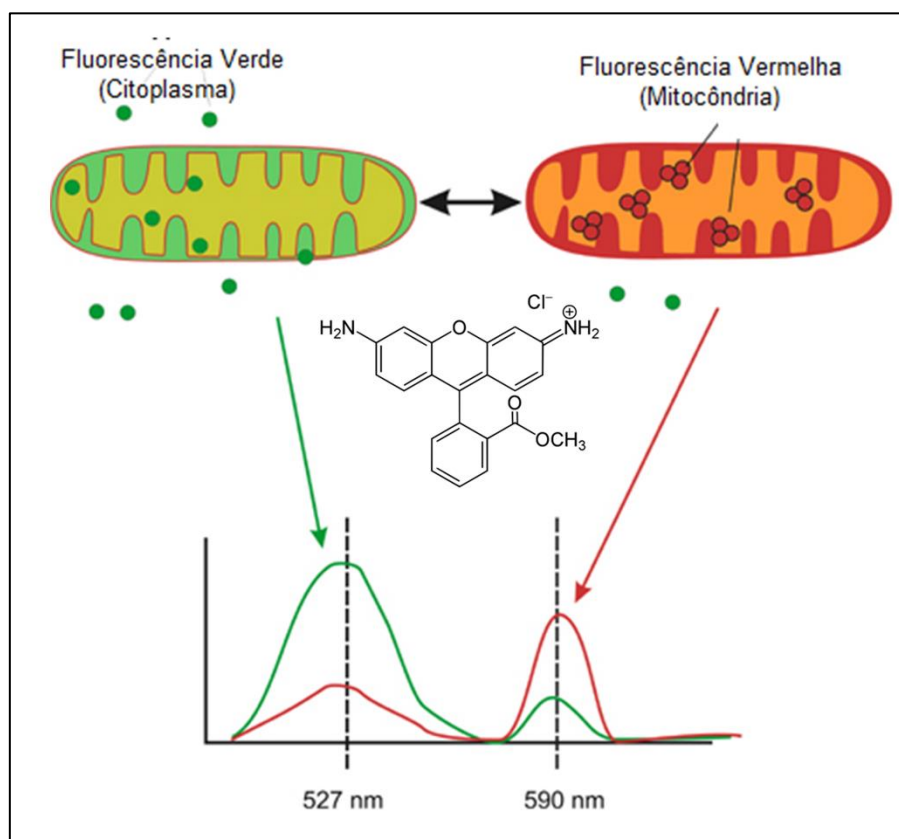
mCONTROLE – Média geométrica do grupo controle.

3.6.3. Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

A avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi feita utilizando o corante catiônico Rodamina 123 (Rho123) (MERCK®, Darmstadt, Alemanha). Em pH fisiológico, a Rho123 é fortemente atraído pelo potencial elétrico negativo do espaço intermembrana mitocondrial, onde emite fluorescência vermelha (JOHNSON; WALSH; CHEN, 1980; O'CONNOR et al., 1988).

Alterações no $\Delta\Psi_m$ e na integridade mitocondrial estão diretamente relacionados com o colapso de produção de energia e morte celular. A redução do acúmulo de Rho123 na mitocôndria gera um aumento relativo deste corante no citoplasma, onde emite fluorescência verde. Alterações no $\Delta\Psi_m$ podem ser mensurados através da redução da fluorescência vermelha, ou aumento da fluorescência verde, como mostra a figura 30 (O'CONNOR et al., 1988).

Figura 30 - Princípio da avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial com a sonda fluorescente Rho123.



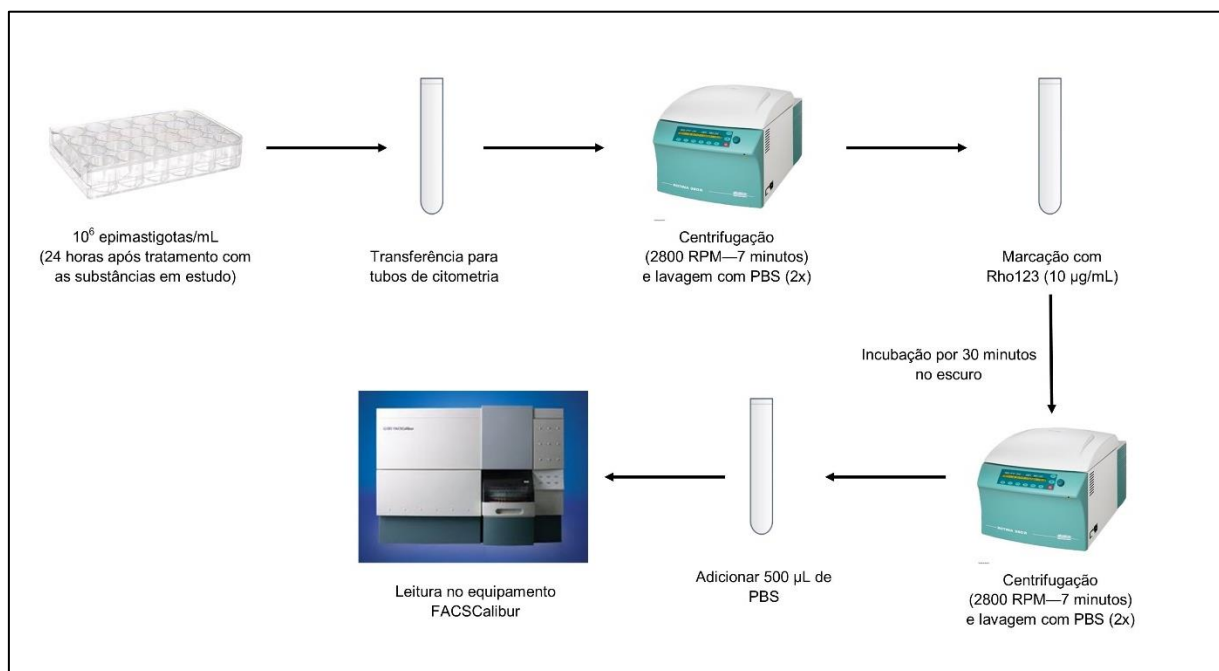
Legenda: O corante Rho123 tem alta afinidade pelas mitocôndrias, onde emite fluorescência vermelha. Em situações de dano mitocondrial, o acúmulo deste na organela reduz, aumentando o acúmulo citoplasmático de Rho123, ocasionando uma redução na fluorescência vermelha e aumento da fluorescência verde.

Fonte: Adaptado de <https://www.biotek.pt/pt/resources/application-notes/fluorescent-detection-of-drug-induced-mitochondrial-toxicity/>. Acesso em 26 de setembro de 2021.

As formas epimastigotas tratadas com as substâncias em estudo (500 e 250 μM) durante 24 horas foram transferidas para tubos de citometria, centrifugadas (2800 rpm/ 7 minutos) e lavadas com PBS 2 vezes. Em seguida, as células foram marcadas com Rho123 (concentração final de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), permanecendo incubadas durante 30 minutos

no escuro, sendo então realizadas duas novas lavagens, ressuspensão em 500 μL de PBS e leitura por citometria de fluxo, utilizando o detector FL₂ (DE MENEZES et al., 2019b) (Figura 31). Os resultados foram expressos em termos de IFR.

Figura 31 - Protocolo de marcação com Rho123 para avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial.



Fonte: Adaptado de MENEZES (2017).

3.7. Estudos *in silico*

Os ensaios de docking molecular para avaliação teórica das interações entre as chalconas do presente estudo e as enzimas cruzaina (TcCr) e tripanotona redutase (TcTR) de *Trypanosoma cruzi* foram realizados pelo Grupo de Química Teórica e Eletroquímica (GQTE), da Universidade Estadual do Ceará, coordenado pelo professor Dr. Emmanuel Silva Marinho.

3.7.1. Obtenção e preparo dos ligantes

As estruturas 2D das chalconas 1, 2 e 3, do benznidazol, e dos inibidores co-cristalizados foram desenhadas utilizando o *software* MarvinSkech[®] (<https://chemaxon.com/products/marvin>) (CSIZMADIA, 2019). As estruturas tridimensionais foram otimizadas utilizando o *software* Gaussian 09 através do método de Teoria do Funcional da Densidade (*Density Functional Theory*, DFT) (MARINHO et al., 2021).

3.7.2. Obtenção e preparo dos alvos proteicos

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

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

3.7.3. Simulações de Docking molecular

As simulações de docking molecular foram realizadas o algoritmo genético lamarckiano, o qual é utilizado pelo programa AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2010). Nestes ensaios, o grid box foi centralizado conforme descrito por MARINHO e colaboradores (2021). As coordenadas para a TcTR foram 126 Å x 90 Å x 126 Å, com dimensões (x, y, z) = (44,196; 3,102; -0,054), e 116 Å x 106 Å x 126 Å, com dimensões (x, y, z) = (6,612; -0,436; 8,052) para a TcCr. Para cada simulação com cada alvo, cinquenta simulações independentes foram realizadas, obtendo vinte poses cada, utilizando como 64 o critério de *exhaustiveness* (MARINHO et al., 2020).

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

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

PDB foram submetidos à simulação de docking. Para critérios de comparação, também foram realizadas as simulações com o benznizadol.

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

3.8. Análise estatística

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

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Citotoxicidade das substâncias em células LLC-MK2

A avaliação da citotoxicidade das chalconas em células hospedeiras foi feita utilizando células LLC-MK2 submetidas ao ensaio de redução do MTT. Os valores percentuais de viabilidade celular estão mostrados na tabela 1.

Conforme observado na figura 32A, Ch-C, sem substituições no anel B, apresentou toxicidade nas concentrações entre 1000 e 31,25 μM , com percentuais de viabilidade celular variando de 8,21% a 62,44%. Ch-4Cl, que possui um grupo cloro na posição 4 do anel B, apresentou efeito citotóxico reduzido, com viabilidade celular variando entre 43,03% e 83,20% nas concentrações compreendidas entre 1000 e 62,5 μM (Figura 32B). Interessantemente, Ch-DiCl, que possui dois átomos de cloro no anel B, apresentou citotoxicidade ainda menor, apenas nas três concentrações mais altas, variando entre 48,89% e 83,35% (Figura 32C). Para o Bz (Figura 32D), o percentual de células viáveis variou entre 36,58% e 85,35% na faixa de 1000 a 62,5 μM .

A toxicidade nas células hospedeiras foi também mensurada através da estimativa da concentração necessária para reduzir 50% da viabilidade das células hospedeiras (CC_{50}), apresentados na tabela 4. O Bz apresentou CC_{50} estimada em $502,60 \pm 57,80 \mu\text{M}$, maior se comparada a CC_{50} de Ch-C ($60,40 \pm 11,53 \mu\text{M}$). Além disso, observou-se uma redução da toxicidade de modo progressivo à adição de grupos cloro ao anel B, com valores de CC_{50} estimados em $658,50 \pm 138,30$ e $1100,00 \pm 259,70 \mu\text{M}$ para as chalconas Ch-4Cl e Ch-DiCl, respectivamente.

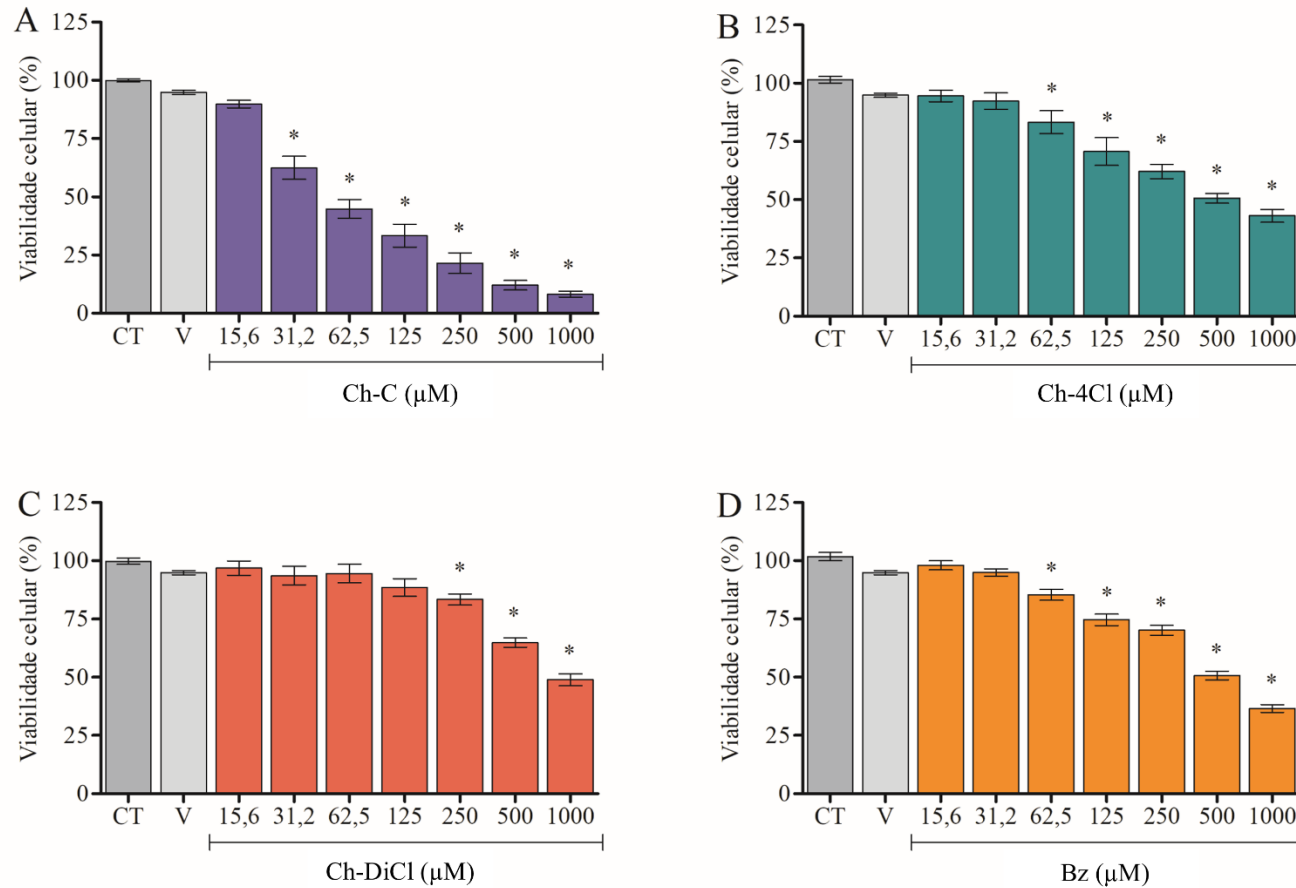
Tabela 1 - Percentuais de viabilidade celular de células LLC-MK2 tratadas com as substâncias em estudo.

Viabilidade de células hospedeiras – LLC-MK2 (%)				
Concentração (µM)	Ch-C	Ch-4Cl	Ch-DiCl	Bz
Controle	100,50 ± 1,56	101,50 ± 1,46	99,79 ± 1,30	100,40 ± 1,46
Veículo	94,80 ± 0,89	94,80 ± 0,89	94,80 ± 0,89	94,80 ± 0,89
1000	8,21 ± 1,28*	43,03 ± 2,77*	48,89 ± 2,55*	36,58 ± 1,67*
500	12,05 ± 2,01*	50,68 ± 2,10*	64,83 ± 2,01*	50,66 ± 1,91*
250	21,49 ± 4,38*	62,12 ± 3,07*	83,35 ± 2,32*	70,19 ± 2,20*
125	33,33 ± 4,90*	70,73 ± 6,03*	88,48 ± 3,76	74,60 ± 2,46*
62,5	44,86 ± 3,98*	83,28 ± 4,92*	94,50 ± 4,02	85,35 ± 2,37*
31,2	62,44 ± 4,88*	92,92 ± 3,51	93,56 ± 3,95	94,94 ± 1,58
15,6	89,78 ± 1,66	94,51 ± 2,49	96,83 ± 2,98	98,02 ± 1,90

Legenda - Os dados estão apresentados como média ± EPM. A análise estatística foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. *p<0,05 em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 32 - Citotoxicidade das chalconas Ch-C (A), Ch-4Cl (B) e Ch-DiCl (C) e Bz (D) em células hospedeiras LLC-MK2 (24 horas).



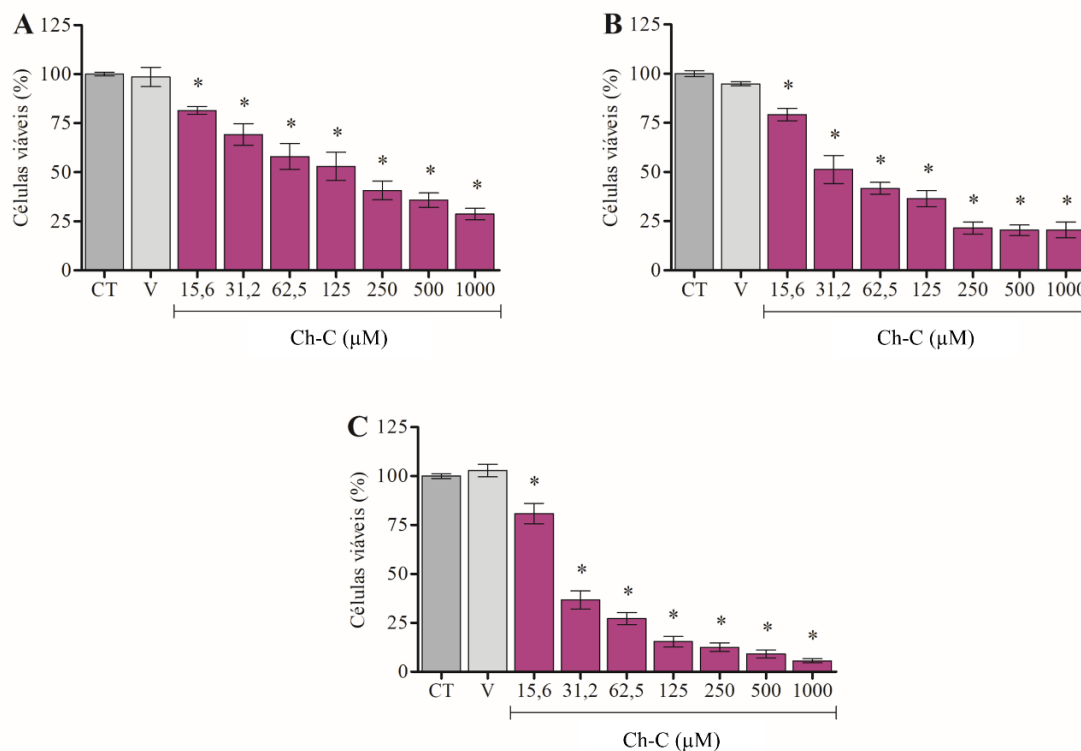
Legenda – CT – grupo controle; V – veículo (DMSO 0,5%). Os dados estão apresentados como média ± EPM. A análise estatística foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2. Efeito antiproliferativo em formas epimastigota

Para a avaliação do efeito antiproliferativo das substâncias em estudo, foram utilizadas as formas epimastigotas, sendo este avaliado através do percentual de parasitos viáveis. Conforme observado na figura 33, a CH-C foi capaz de inibir de modo concentração- e tempo-dependentes, sendo significativa em todas as concentrações testadas.

Para a Ch-C, no tempo de 24 horas (Figura 33A), foram observados percentuais de viabilidade celular entre 28,67% e 81,49%, semelhante aos percentuais obtidos no tempo de 48 horas (Figura 33B). Por fim, o maior efeito foi observado no tempo de 72 horas (Figura 33C), em que os percentuais de viabilidade celular variaram entre 5,68% e 80,86%, conforme apresentado na tabela 2. Foram estimados os seguintes valores de IC_{50} : $IC_{50}/24h = 81,5 \pm 19,4 \mu M$; $IC_{50}/48h = 35,1 \pm 7,6 \mu M$ e $IC_{50}/72h = 26,3 \pm 3,2 \mu M$ (Tabela 4).

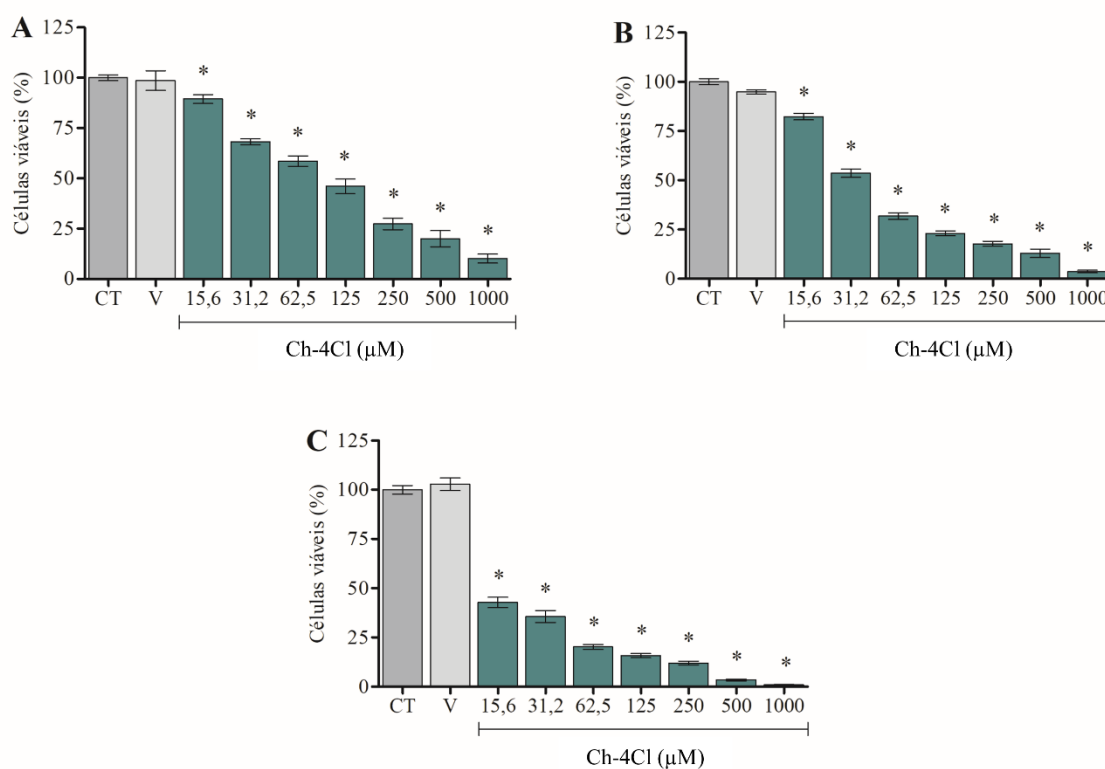
Figura 33 - Efeito antiproliferativo da Ch-C sobre as formas epimastigota de *T. cruzi*.



Legenda – CT – grupo controle; V – veículo (DMSO 0,5%). Os dados estão apresentados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Acima, estão apresentados os resultados de proliferação de formas epimastigotas nos tempos de 24 (A), 48 (B) e 72 horas (C). Fonte: Elaborado pelo autor.

A Ch-4Cl também apresentou efeito nos três tempos avaliados. Conforme a tabela 2, no tempo de 24 horas (figura 34A), os percentuais de viabilidade celular variaram de 10,14% a 89,44%. Quarenta e oito horas após o tratamento (figura 34B), o percentual de epimastigotas viáveis variou de 3,74% a 82,31%, enquanto no tempo de 72 horas (figura 34C), estes valores variaram de 0,91% a 42,80%. Foram estimados os seguintes valores de IC₅₀: IC₅₀/24h = 97,6 ± 14,2 μM; IC₅₀/48h = 41,1 ± 5,2 μM e IC₅₀/72h = 10,9 ± 2,4 μM (Tabela 4).

Figura 34 - Efeito da Ch-4Cl sobre as formas epimastigota de *T. cruzi*.

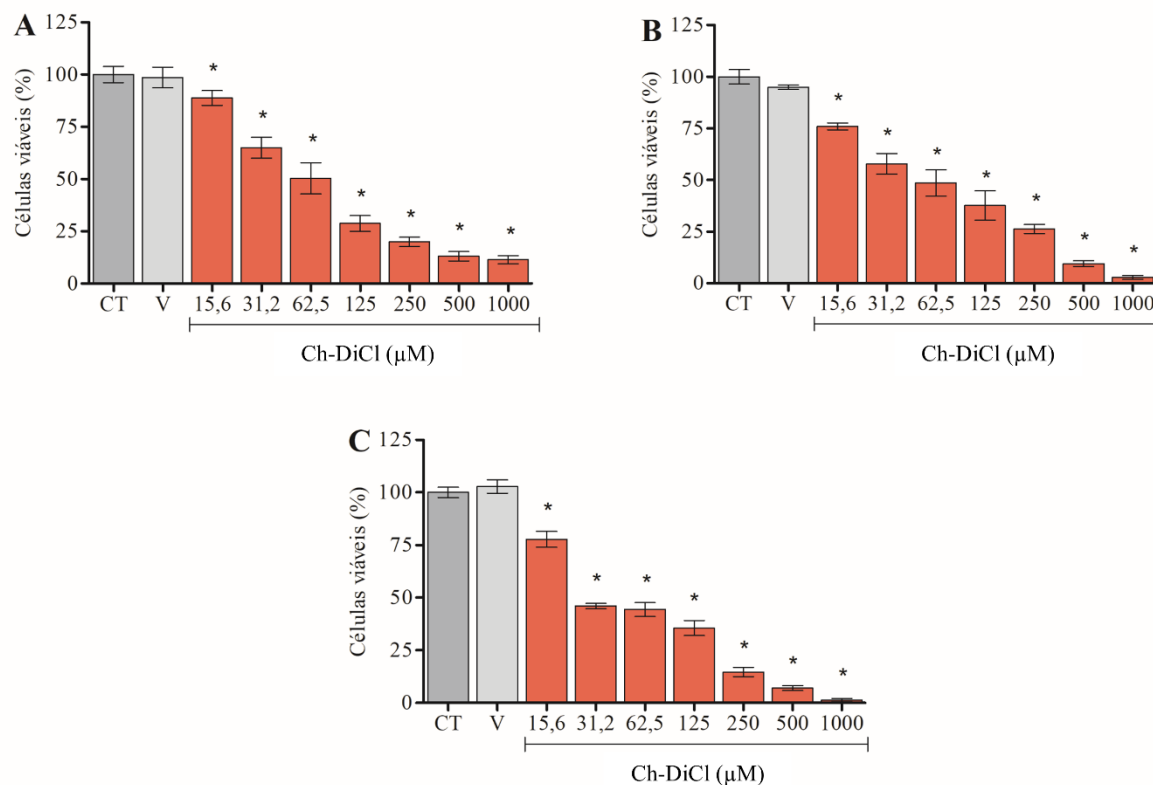


Legenda – CT – controle; V – veículo (DMSO ,5%). Os dados estão apresentados como média ± EPM. A análise estatística foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. *p<0,05 em relação ao grupo controle. Acima, estão apresentados os resultados de proliferação de formas epimastigotas nos tempos de 24 (A), 48 (B) e 72 horas (C). Fonte: Elaborado pelo autor.

A Ch-DiCl manteve o efeito tempo e concentração dependentes na inibição da proliferação das formas epimastigotas. No tempo de 24 horas (figura 35A), os percentuais de epimastigotas viáveis variaram entre 11,39% e 88,77% (tabela 2). Nos tempos de 48 (figura 35B) e 72 horas (figura 35C), este efeito foi maior, com valores percentuais variando de 2,88% a 76,01% e 1,39% a 77,76%, respectivamente (tabela 5). Foram

estimados os seguintes valores de IC_{50} : $IC_{50}/24h = 79,3 \pm 14,8 \mu M$; $IC_{50}/48h = 69,5 \pm 6,8 \mu M$ e $IC_{50}/72h = 41,5 \pm 6,8 \mu M$ (Tabela 4).

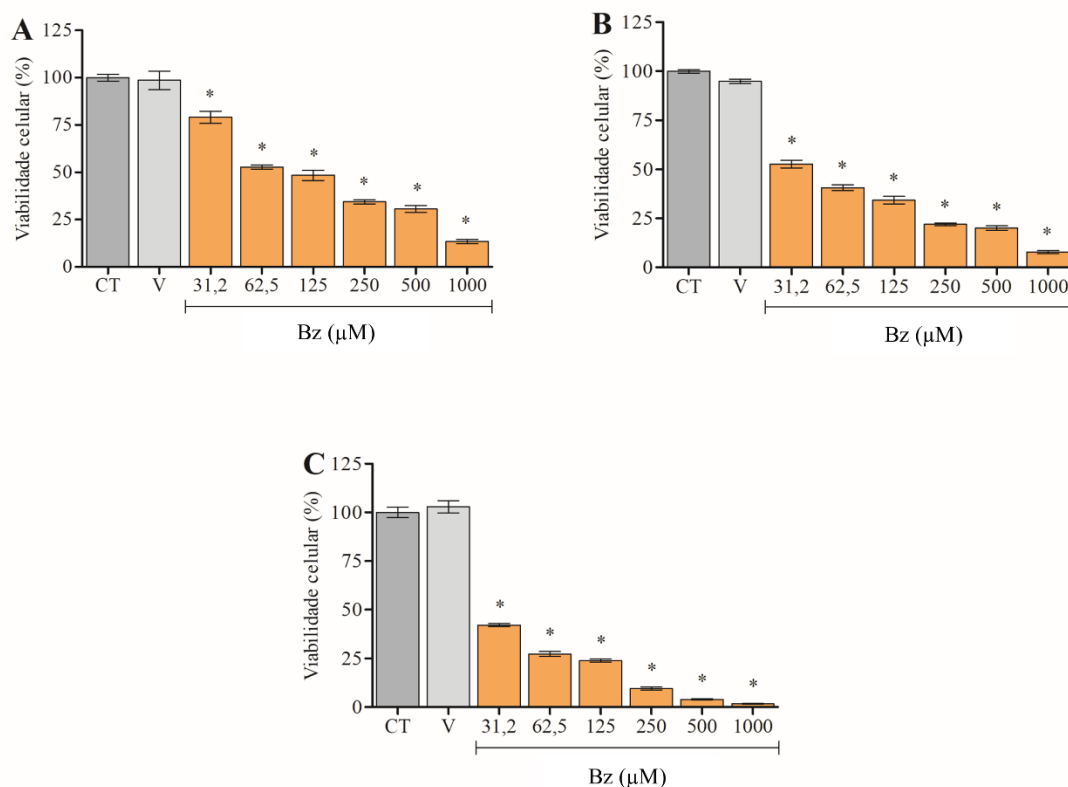
Figura 35 - Efeito da Ch-DiCl sobre as formas epimastigota de *T. cruzi*.



Legenda – CT – controle; V – veículo (DMSO, 5%). Os dados estão apresentados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Acima, estão apresentados os resultados de proliferação de formas epimastigotas nos tempos de 24 (A), 48 (B) e 72 horas (C). Fonte: Elaborado pelo autor.

Conforme apresentado para o Bz, na tabela 6, no tempo de 24 horas (figura 36A), o percentual de epimastigotas viáveis variou de 13,49% a 79,08%. No tempo de 48 horas (figura 36B), 7,69% a 52,68% dos epimastigotas apresentavam-se viáveis. O tratamento de 72 horas com o Bz (figura 36C) reduziu a viabilidade das formas epimastigotas entre 1,71% e 42,05%. Os valores percentuais de viabilidade das formas epimastigotas tratadas com as chalconas e Bz estão apresentados na tabela 2. Foram estimados os seguintes valores de IC_{50} : $IC_{50}/24h = 115,1 \pm 16,3 \mu M$; $IC_{50}/48h = 37,4 \pm 5,6 \mu M$ e $IC_{50}/72h = 2,1 \pm 2,9 \mu M$ (Tabela 4).

Figura 36 - Efeito do Bz em formas epimastigota de *T. cruzi*.



Legenda – CT – controle; V – veículo (DMSO, 5%). Os dados estão apresentados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Acima, estão apresentados os resultados de proliferação de formas epimastigotas nos tempos de 24 (A), 48 (B) e 72 horas (C). Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2 - Percentuais de viabilidade de formas epimastigota tratadas.

	Viabilidade celular de formas epimastigotas (%)											
	Ch-C			Ch-4Cl			Ch-4Cl			Bz		
	24 horas	48 horas	72 horas	24 horas	48 horas	72 horas	24 horas	48 horas	72 horas	24 horas	48 horas	72 horas
CT	100 ± 1,0	100,5 ± 1,5	100 ± 1,18	100 ± 1,36	100 ± 1,7	100 ± 2,2	100 ± 3,9	100 ± 3,45	100 ± 2,4	100 ± 1,8	100 ± 0,9	100 ± 2,7
V	98,6 ± 4,9	94,87 ± 1,05	102,8 ± 3,2	98,61 ± 4,9	94,9 ± 1,1	102,8 ± 3,2	98,6 ± 4,9	94,87 ± 1,05	102,8 ± 3,2	98,6 ± 4,9	94,9 ± 1,1	102,8 ± 3,2
1000	28,7 ± 3,0*	20,6 ± 4,00*	5,7 ± 1,0*	10,1 ± 2,2*	3,7 ± 0,7*	0,9 ± 0,2*	11,4 ± 2,0*	2,88 ± 0,96*	1,4 ± 0,8*	13,5 ± 1,1*	7,7 ± 0,8*	1,7 ± 0,2*
500	35,8 ± 3,7*	20,42 ± 2,6*	9,1 ± 1,9*	19,9 ± 4,1*	12,9 ± 2,2*	3,4 ± 0,5*	13,1 ± 2,3*	9,54 ± 1,36*	7,0 ± 1,2*	30,7 ± 1,8*	20,1 ± 1,3*	4,0 ± 0,2*
250	40,7 ± 4,8*	21,60 ± 3,1*	12,6 ± 2,2*	27,3 ± 2,8*	17,8 ± 1,3*	12,1 ± 0,9*	19,9 ± 2,2*	26,29 ± 2,2*	14,8 ± 2,2*	34,4 ± 1,8*	21,9 ± 0,7*	9,6 ± 0,8*
125	53,0 ± 7,2*	36,5 ± 4,01*	15,4 ± 2,7*	46,1 ± 3,7*	23,1 ± 1,3*	15,8 ± 1,1*	28,8 ± 3,8*	37,7 ± 7,1*	35,6 ± 3,6*	48,4 ± 2,7*	34,3 ± 2,0*	24 ± 0,8*
62,5	58,1 ± 6,6*	41,7 ± 3,00*	27,1 ± 3,1*	58,6 ± 2,6*	31,8 ± 1,7*	20,2 ± 1,2*	50,4 ± 7,4*	48,6 ± 6,3*	44,4 ± 3,3*	52,8 ± 1,0*	40,6 ± 1,5*	27,3 ± 1,2*
31,2	69,2 ± 5,5*	51,3 ± 7,2*	36,7 ± 4,6*	68,2 ± 1,4*	53,6 ± 2,1*	35,6 ± 3,1*	65 ± 5,1*	57,9 ± 5,0*	46,1 ± 1,3*	79,1 ± 3,2*	52,7 ± 2,0*	42,1 ± 0,8*
15,6	81,2 ± 1,9*	79,2 ± 3,2*	80,9 ± 5,3*	89,4 ± 2,2*	82,3 ± 1,7*	42,8 ± 2,6*	88,8 ± 3,6*	76,1 ± 1,7*	77,8 ± 3,7*	-	-	-

Legenda – Os dados estão apresentados como média ± EPM. A análise foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. *p<0,05 em relação ao grupo controle. Fonte:

Elaborado pelo autor.

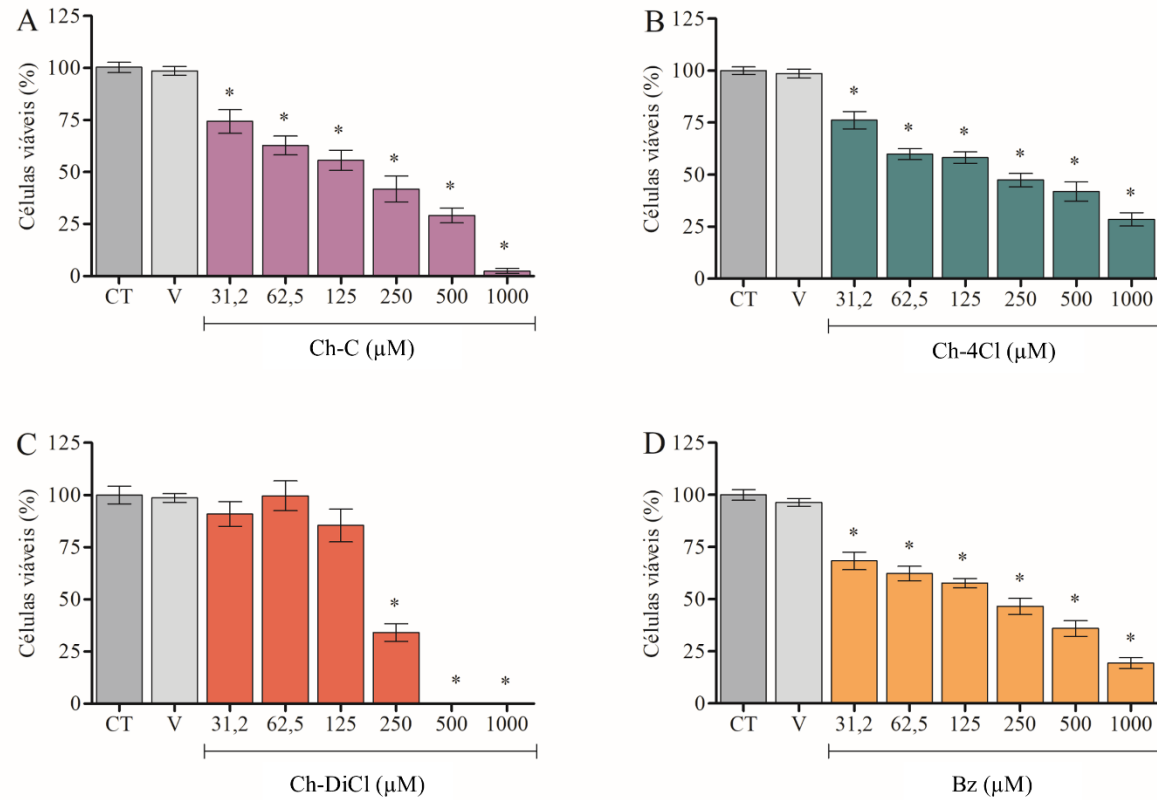
4.3. Efeito tripanocida em formas tripomastigota

As chalconas estudadas no presente trabalho foram testadas contra formas tripomastigotas, e os resultados estão ilustrados na figura 37 e tabela 3. Todas as chalconas sintetizadas foram capazes de matar as formas tripomastigotas em diferentes concentrações.

A Ch-C (figura 37A) apresentou significância em todas as concentrações testadas, com percentual de células viáveis variando de 2,46% a 74,28%. A Ch-4Cl (figura 37B) também apresentou efeito significativo em todas as concentrações testadas, com valores percentuais que variaram de 47,41% a 76,19%. A Ch-DiCl, por sua vez (figura 37C) apresentou efeito nas três maiores concentrações testadas, sendo capaz de, nas duas mais altas concentrações, matar 100% dos parasitos. O Bz (Figura 37D) apresentou significativo efeito sobre as formas tripomastigotas em todas as concentrações testadas, com percentuais de células viáveis variando entre 19,44% e 68,36%.

O efeito sobre as formas tripomastigotas pôde ser avaliado também através da estimativa dos valores de LC_{50} , sendo $165,2 \pm 25 \mu\text{M}$; $164,8 \pm 33 \mu\text{M}$; $147,4 \pm 20,9 \mu\text{M}$ e $161,4 \pm 31,8 \mu\text{M}$, respectivamente para as Ch-C, Ch-4Cl, Ch-DiCl e Bz. Com a avaliação do efeito sobre as formas tripomastigotas, bem como a citotoxicidade sobre células hospedeiras, a seletividade destas moléculas foi comparada através do cálculo do IS. Os valores de IS obtidos foram de 0,36; 3,99; 7,46 e 3,11 para Ch-C, Ch-4Cl, Ch-DiCl e Bz. A tabela 4 apresenta de maneira resumida os valores de CC_{50} , IC_{50} , LC_{50} e IS obtidos no presente estudo.

Figura 37 - Efeito das chalconas Ch-C (A), Ch-4Cl (B), Ch-DiCl (C) e Bz (D) sobre as formas tripomastigota de *T. cruzi* (24 horas).



Legenda – CT – controle; V – veículo (DMSO ,5%). Os dados estão apresentados como média ± EPM. A análise estatística foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3 - Percentuais de viabilidade de formas tripomastigota de *T. cruzi*.

Viabilidade de formas tripomastigotas (%)				
Concentração (μM)	Ch-C	Ch-4Cl	Ch-DiCl	Bz
Controle	100,30 \pm 2,46	100,00 \pm 1,83	100,00 \pm 4,24	100,00 \pm 2,55
Veículo	96,46 \pm 1,87	96,46 \pm 1,87	96,46 \pm 1,87	96,46 \pm 1,87
1000	2,46 \pm 1,30*	28,52 \pm 3,19*	0,00 \pm 0,00*	19,44 \pm 2,57*
500	29,14 \pm 3,51*	41,95 \pm 4,59*	0,00 \pm 0,00*	35,96 \pm 3,76*
250	41,87 \pm 6,19*	47,41 \pm 3,21*	34,13 \pm 4,25*	46,62 \pm 3,84*
125	55,68 \pm 4,87*	58,19 \pm 2,76*	85,44 \pm 7,88	57,76 \pm 2,15*
62,5	62,74 \pm 4,59*	59,88 \pm 2,62*	99,64 \pm 7,04	62,35 \pm 3,39*
31,2	74,28 \pm 5,64*	76,19 \pm 4,13*	90,91 \pm 5,90	68,36 \pm 4,20*

Legenda - Os dados estão apresentados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 - Valores estimados de CC₅₀, IC₅₀ e LC₅₀ para as substâncias em estudo.

	Tempo de incubação		
	24 horas	48 horas	72 horas
<u>Ch-C</u>			
CC ₅₀ (LLC-MK2)	60,4 ± 11,5	-	-
IC ₅₀ (Epimastigotas)	81,5 ± 19,4	35,1 ± 7,6	26,3 ± 3,2
LC ₅₀ (Tripomastigotas)	165,2 ± 25,0	-	-
IS	0,36	-	-
<u>Ch-4Cl</u>			
CC ₅₀ (LLC-MK2)	658,5 ± 138,3	-	-
IC ₅₀ (Epimastigotas)	97,6 ± 14,2	41,1 ± 5,2	10,9 ± 2,4
LC ₅₀ (Tripomastigotas)	164,8 ± 33,0	-	-
IS	3,99	-	-
<u>Ch-DiCl</u>			
CC ₅₀ (LLC-MK2)	1100 ± 259,7	-	-
IC ₅₀ (Epimastigotas)	79,3 ± 14,8	69,5 ± 14,6	41,5 ± 6,8
LC ₅₀ (Tripomastigotas)	147,4 ± 20,9	-	-
IS	7,46	-	-
<u>Bz</u>			
CC ₅₀ (LLC-MK2)	502,6 ± 57,8	-	-
IC ₅₀ (Epimastigotas)	115,1 ± 16,3	37,4 ± 5,6	22,1 ± 2,9
LC ₅₀ (Tripomastigotas)	161,4 ± 31,8	-	-
IS	3,11	-	-

Legenda – CC₅₀: Estimativa de concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade de células LLC-MK2 hospedeiras; IC₅₀: Concentração estimada capaz de inibir 50% da proliferação de formas epimastigotas; LC₅₀: Estimativa de concentração tripanocida para 50% das formas tripomastigotas.

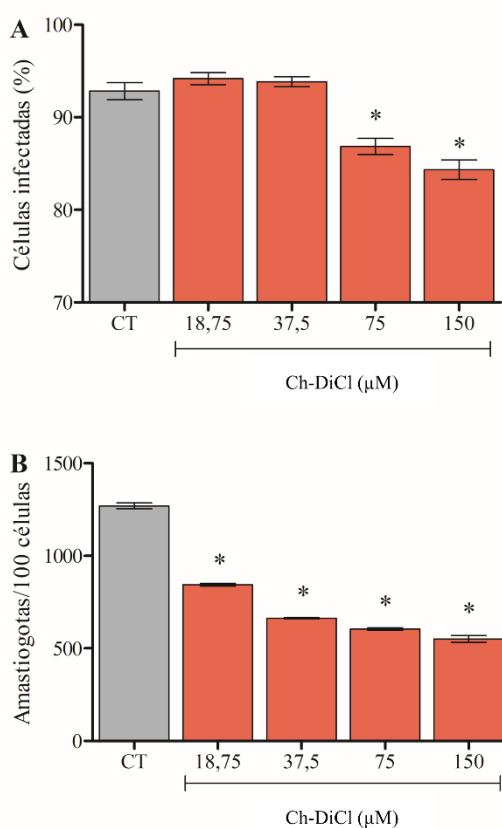
4.4. Efeito antiamastigota

Por apresentar o maior índice de seletividade, a Ch-DiCl foi utilizada para que fosse feita a avaliação do efeito desta molécula sobre as formas intracelulares de *T. cruzi*.

A Ch-DiCl reduziu de modo significativo o número de células infectadas (Figura 38A), com percentuais de 84,33% e 86,83% nas duas concentrações mais altas, comparados aos 92,83% de células infectadas no grupo controle.

Além disso, conforme mostrado na figura 38B, em todas as concentrações testadas, a Ch-DiCl foi capaz de reduzir a quantidade de parasitos intracelulares, com números de amastigotas variando de 550,40 a 843,80, comparado ao número médio de 1.270,00 amastigotas intracelulares do grupo controle (Tabela 5).

Figura 38 - Efeito antiamastigota da Ch-DiCl em cepa Y de *T. cruzi* (24 horas).



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

Tabela 5 - Efeito da Ch-DiCl sobre as formas amastigota de *T. cruzi*.

Efeito antiamastigota		
Concentração (μM)	Células infectadas (%)	Nº de amastigotas/100 células
Controle	92,83 \pm 0,91	1270,00 \pm 15,54
150	84,33 \pm 1,05*	550,40 \pm 17,99*
75	86,83 \pm 0,87*	604,50 \pm 6,99*
37,5	93,83 \pm 0,54	662,80 \pm 4,03*
18,75	94,17 \pm 0,65	843,80 \pm 7,08*

Legenda - Os dados estão apresentados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5. Avaliação do perfil de morte e integridade celular

Para avaliação do perfil de morte celular das substâncias em estudo sobre as formas epimastigotas, foram realizados ensaios de citometria de fluxo. Conforme a tabela 6, o tratamento com as chalconas em ambas as concentrações aumentou a marcação apenas com 7-AAD (7-AAD+/AxPE-) e dupla marcação com 7-AAD e Anexina V (7-AAD+/AxPE+), não apresentando marcação significativa apenas com Anexina V (7-AAD-/AxPE+). O comportamento das populações mediante o tratamento com as substâncias em estudo pode ser observado na figura 39.

A Ch-C apresentou percentuais de marcação apenas com 7-AAD iguais a 40,67% e 57,60% para as concentrações de 250 e 500 μM , respectivamente. Além disso, a ocorrência de dupla marcação também foi significativa, iguais a 6,89% e 6,41% para estas mesmas concentrações.

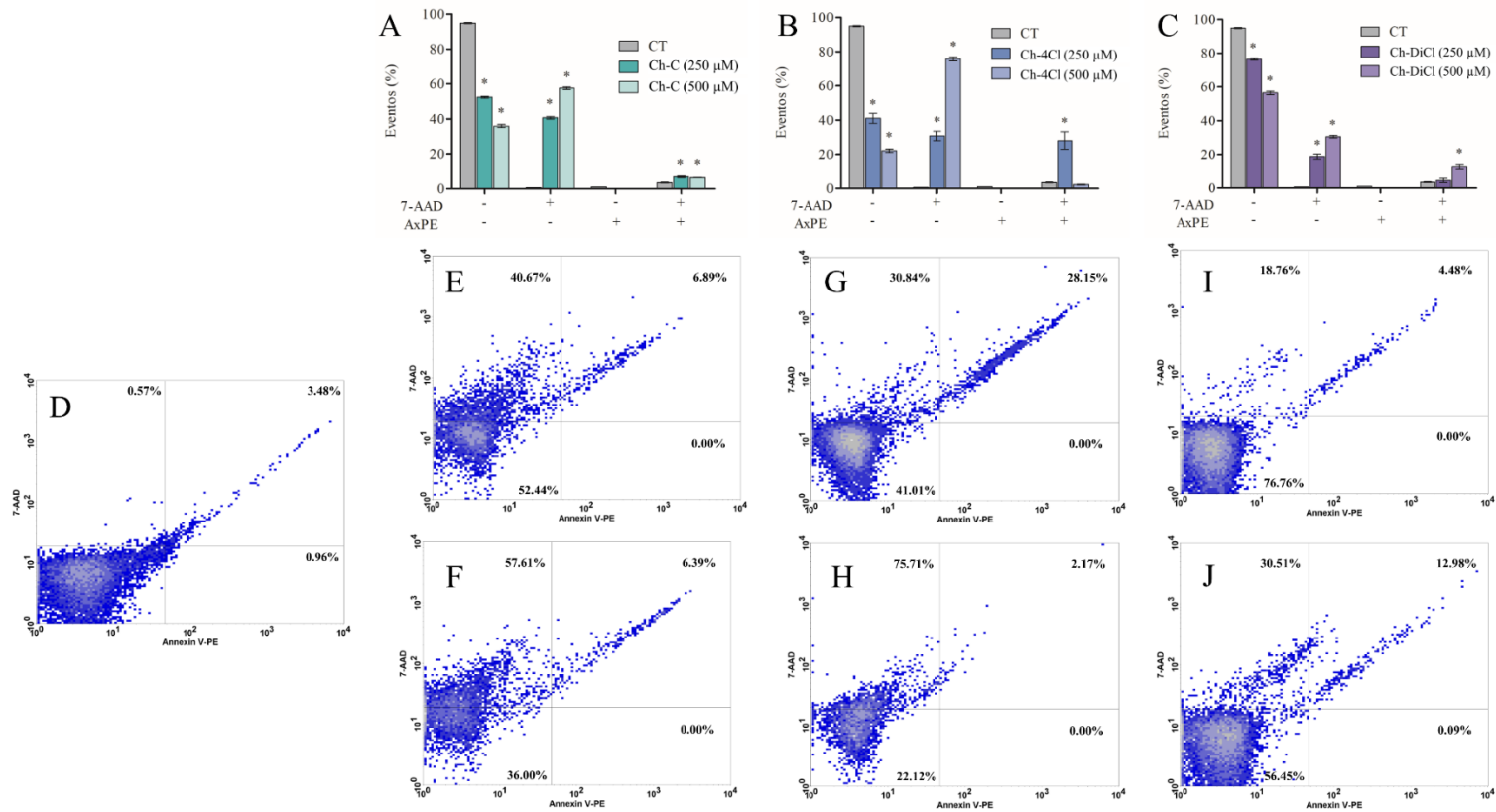
A Ch-4Cl, apresentou, nestas mesmas concentrações, percentuais iguais a 30,84% e 75,71% para eventos 7-AAD+/AxPE-. Por fim, os grupos tratados com a Ch-DiCl tiveram percentuais de células 7-AAD+/AxPE- iguais a 18,76% e 56,45%, para as concentrações de 250 e 500 μM , respectivamente, bem como 12,97% de células com dupla marcação na concentração mais alta.

Tabela 6 - Percentuais de eventos celulares marcados com 7-AAD/AxPE.

Marcação	Eventos (%)						
	Controle	Ch-C (μM)		Ch-4Cl (μM)		Ch-DiCl (μM)	
		250	500	250	500	250	500
7AAD-/AxPE-	94,99 \pm 0,28	52,44 \pm 0,59*	36,00 \pm 0,84*	41,01 \pm 2,96*	22,11 \pm 1,11*	76,41 \pm 0,68*	56,45 \pm 1,13*
7AAD+/AxPE-	0,55 \pm 0,05	40,67 \pm 0,74*	57,60 \pm 0,81 *	30,84 \pm 2,69*	75,71 \pm 1,14*	18,76 \pm 1,50*	30,51 \pm 0,83*
7AAD-/AxPE+	0,93 \pm 0,03	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
7AAD+/AxPE+	3,48 \pm 0,27	6,89 \pm 0,50*	6,41 \pm 0,11*	0,00 \pm 0,00	2,18 \pm 0,22	4,48 \pm 1,25	12,97 \pm 1,31*

Legenda – 7-AAD – 7-Aminoactinomicina D; AxPE – Anexina V conjugada com ficoeritrina. Os dados estão apresentados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Fonte: Elaborado pelo autor.

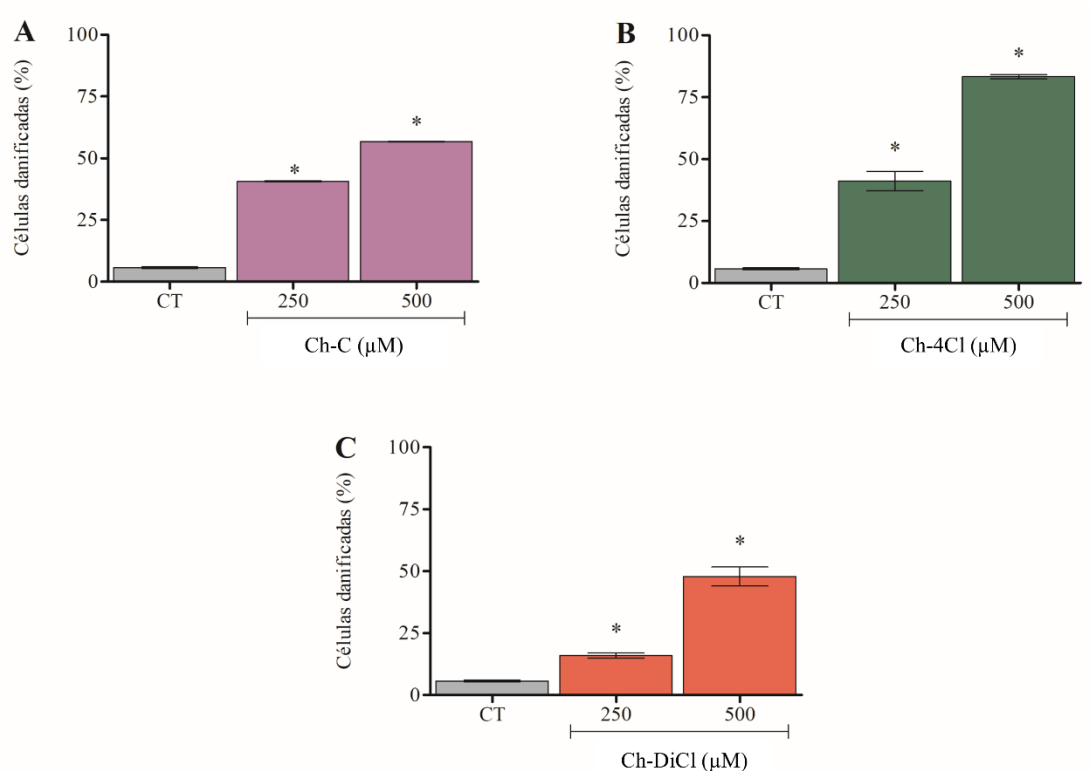
Figura 39 - Perfil de morte celular induzido pelas chalconas em estudo sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi*, avaliado por citometria de fluxo.



Legenda – Nas figuras A, B e C, tem-se os resultados apresentados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (CT). Nos gráficos de dot plot de D-J, têm-se o comportamento das populações mediante tratamento com as chalconas 1 (E-F), 2 (G-H) e 3 (I-J), em que o tratamento com as substâncias provocou o deslocamento da população de células para o quadrante superior esquerdo (7-AAD+/AxPE-), com menor deslocamento para o quadrante superior direito (7-AAD+/AxPE+). Fonte: Elaborado pelo autor.

Além deste ensaio de avaliação do perfil de morte celular, a avaliação da marcação apenas com 7-AAD foi realizada para que se fossem quantificadas as células danificadas, estando os resultados apresentados na figura 40, e os valores percentuais na tabela 7. Nas concentrações de 250 e 500 μM da CH-C, o percentual de epimastigotas que apresentaram marcação com 7-AAD foram iguais a 40,66% e 56,78%, enquanto o tratamento com a Ch-4Cl levou a percentuais de 41,16% e 83,26%; e o tratamento com a Ch-DiCl, 15,97% e 47,86%, para estas duas concentrações.

Figura 40 - Células epimastigotas que apresentaram marcação com 7-AAD em avaliação por citometria de fluxo.



Legenda – CT – controle. Os dados estão apresentados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Estão representados os percentuais de células danificadas tratadas com as chalconas 1 (A), 2 (B) e 3 (C). Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 7 - Percentuais de formas epimastigotas danificadas.

	Células danificadas (%)
Controle	5,74 ± 0,39
Ch-C – 250 µM	40,66 ± 0,32*
Ch-C – 500 µM	56,78 ± 0,18*
Ch-4Cl – 250 µM	41,16 ± 3,97*
Ch-4Cl – 500 µM	83,26 ± 0,81*
Ch-DiCl – 250 µM	15,97 ± 1,01*
Ch-DiCl – 500 µM	47,86 ± 3,81*

Legenda - Os dados estão apresentados como média ± EPM. A análise estatística foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. *p<0,05 em relação ao grupo controle. Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6. Acúmulo citoplasmático de espécies reativas de oxigênio

Além da avaliação do perfil de morte celular induzida pelo tratamento com as substâncias em estudo, a mensuração do acúmulo de espécies reativas de oxigênio no citoplasma foi realizada utilizando a sonda fluorescente DCFH₂-DA.

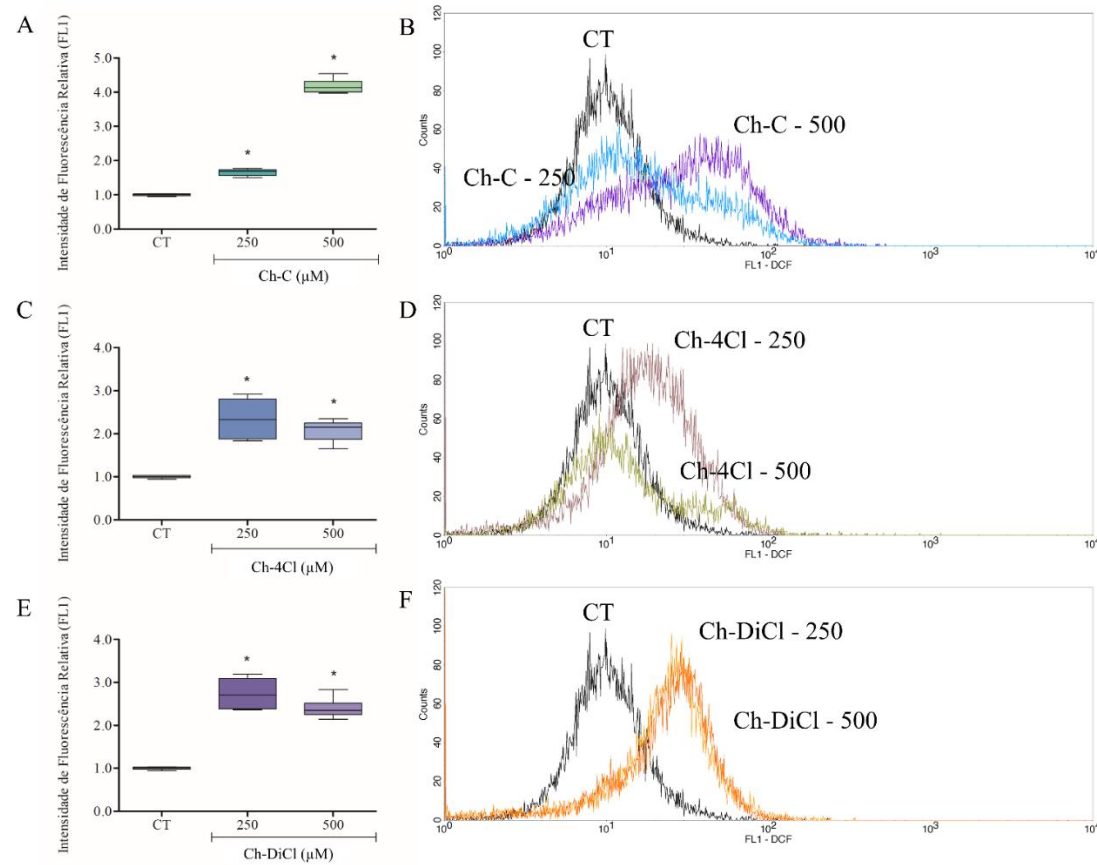
Conforme apresentado na tabela 8, o tratamento com as chalconas provocou um aumento da intensidade de fluorescência relativa. Nas concentrações de 250 µM e 500 µM, a CH-C provocou um aumento na fluorescência superior a 65%, enquanto na concentração mais alta, este aumento foi maior que 300%. Para as Ch-4Cl e 3, os aumentos na fluorescência foram superiores a 200%. Esse comportamento pode ser observado na figura 41, através do deslocamento do pico do histograma para o lado direito.

Tabela 8 - Intensidade de fluorescência relativa de formas epimastigotas tratadas com as chalconas e marcadas com DCFH₂-DA.

	Intensidade de Fluorescência Relativa (FL₁)
Controle	1,00 ± 0,01
Ch-C – 250 µM	1,65 ± 0,03*
Ch-C – 500 µM	4,18 ± 0,06*
Ch-4Cl – 250 µM	2,35 ± 0,15*
Ch-4Cl – 500 µM	2,06 ± 0,07*
Ch-DiCl – 250 µM	2,74 ± 0,11*
Ch-DiCl – 500 µM	2,39 ± 0,07*

Legenda - Os dados estão apresentados como média ± EPM. A análise estatística foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. *p<0,05 em relação ao grupo controle. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 41 - Intensidade de fluorescência relativa de formas epimastigotas tratadas com as chalconas e marcadas com DCFH₂-DA por citometria de fluxo.



Legenda – CT – controle. Os dados estão apresentados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Estão representados os resultados de intensidade de fluorescência relativa das células tratadas com as chalconas Ch-C (A), Ch-4Cl (C) e Ch-DiCl (E) e marcadas com DCFH₂-DA, bem como seus respectivos histogramas B, D e F. Fonte: Elaborado pelo autor.

4.7. Efeito no potencial transmembrânico mitocondrial

Também foram realizados ensaios de citometria de fluxo com Rho123 para avaliar o potencial transmembrânico mitocondrial das formas epimastigotas tratadas do presente estudo.

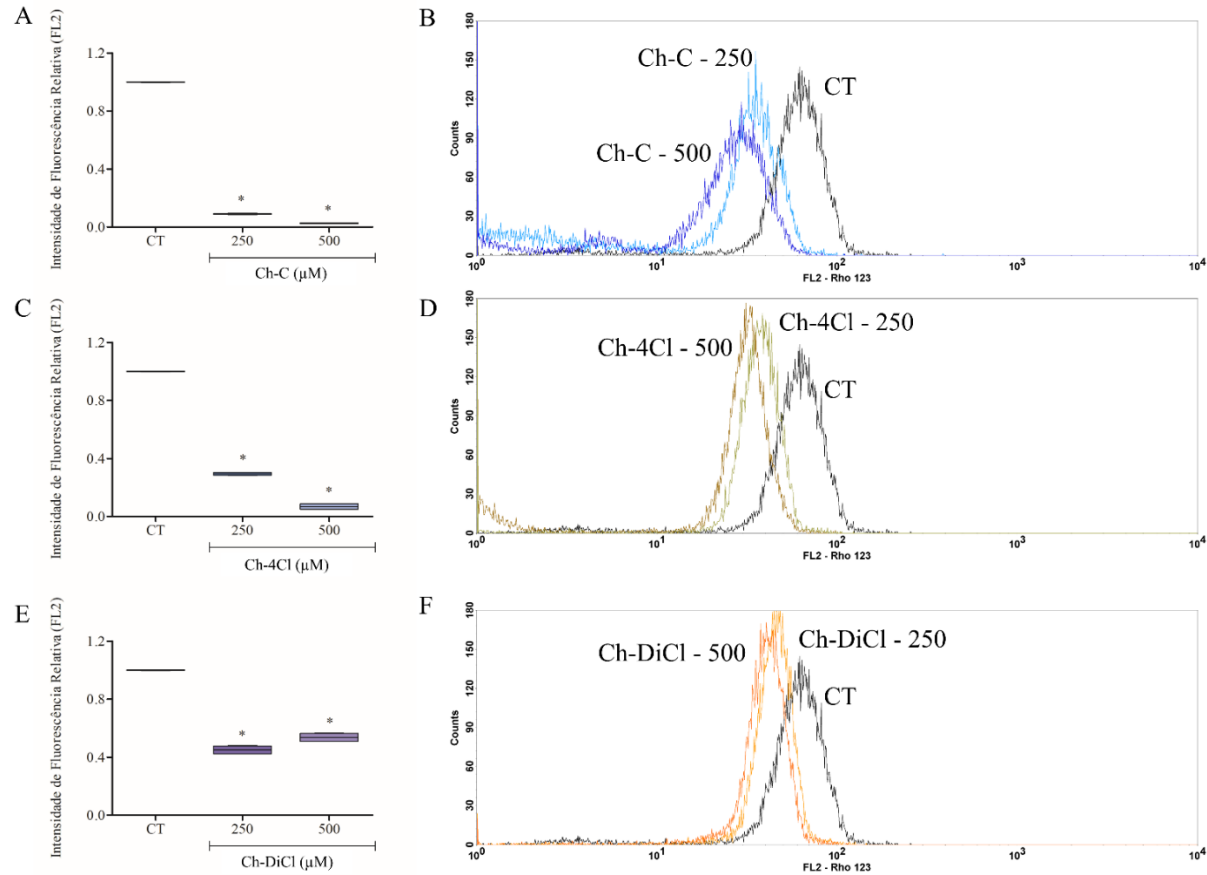
Conforme demonstrado na tabela 9, o tratamento com a Ch-C, em ambas as concentrações, foi capaz de reduziu de maneira acentuada o potencial mitocondrial das formas epimastigotas. Já a Ch-4Cl, foi capaz de reduzi-lo em pelo menos 70%. Por fim, a Ch-DiCl causou uma redução no potencial mitocondrial pela metade. Esse efeito pode ser observado na figura 42, a seguir, com o deslocamento do pico do histograma para o lado esquerdo.

Tabela 9 - Valores de intensidade de fluorescência de formas epimastigotas tratadas com as chalconas e marcadas com Rho123.

	Intensidade de Fluorescência Relativa (FL₂)
Controle	1,00 ± 0,01
Ch-C – 250 µM	0,09 ± 0,01*
Ch-C – 500 µM	0,02 ± 0,01*
Ch-4Cl – 250 µM	0,29 ± 0,01*
Ch-4Cl – 500 µM	0,07 ± 0,01*
Ch-DiCl – 250 µM	0,45 ± 0,01*
Ch-DiCl – 500 µM	0,53 ± 0,01*

Legenda - Os dados estão apresentados como média ± EPM. A análise estatística foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. *p<0,05 em relação ao grupo controle. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 42 - Intensidade de fluorescência relativa de formas epimastigotas tratadas com as chalconas e marcadas com Rho123 por citometria de fluxo.



Legenda – CT – controle. Os dados estão apresentados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Estão representados os resultados de intensidade de fluorescência relativa das células tratadas com as chalconas Ch-C (A), Ch-4Cl (C) e Ch-DiCl (E) e marcadas com Rho123, bem como seus respectivos histogramas B, D e F. Fonte: Elaborado pelo autor.

4.8. Estudos *in silico* de interação com a enzima tripanotiona redutase

O primeiro alvo investigado foi a enzima tripanotiona, sendo todos os resultados analisados em comparação com o inibidor co-cristalizado QUM. A Ch-C interagiu em um sítio diferente das outras moléculas estudadas, enquanto Ch-4Cl e Ch-DiCl ao do inibidor co-cristalizado. O Bz interagiu em outra subunidade, semelhante à QUM (Figura 43).

Nas simulações, foi observado que todas as moléculas do estudo, incluindo o Bz, apresentaram valores de energia de afinidade inferiores ao do inibidor (Tabela 10).

Tabela 10 - Energia de afinidade e valores de RMSD dos complexos formados pelos ligantes e a enzima tripanotiona redutase obtidos por docking molecular.

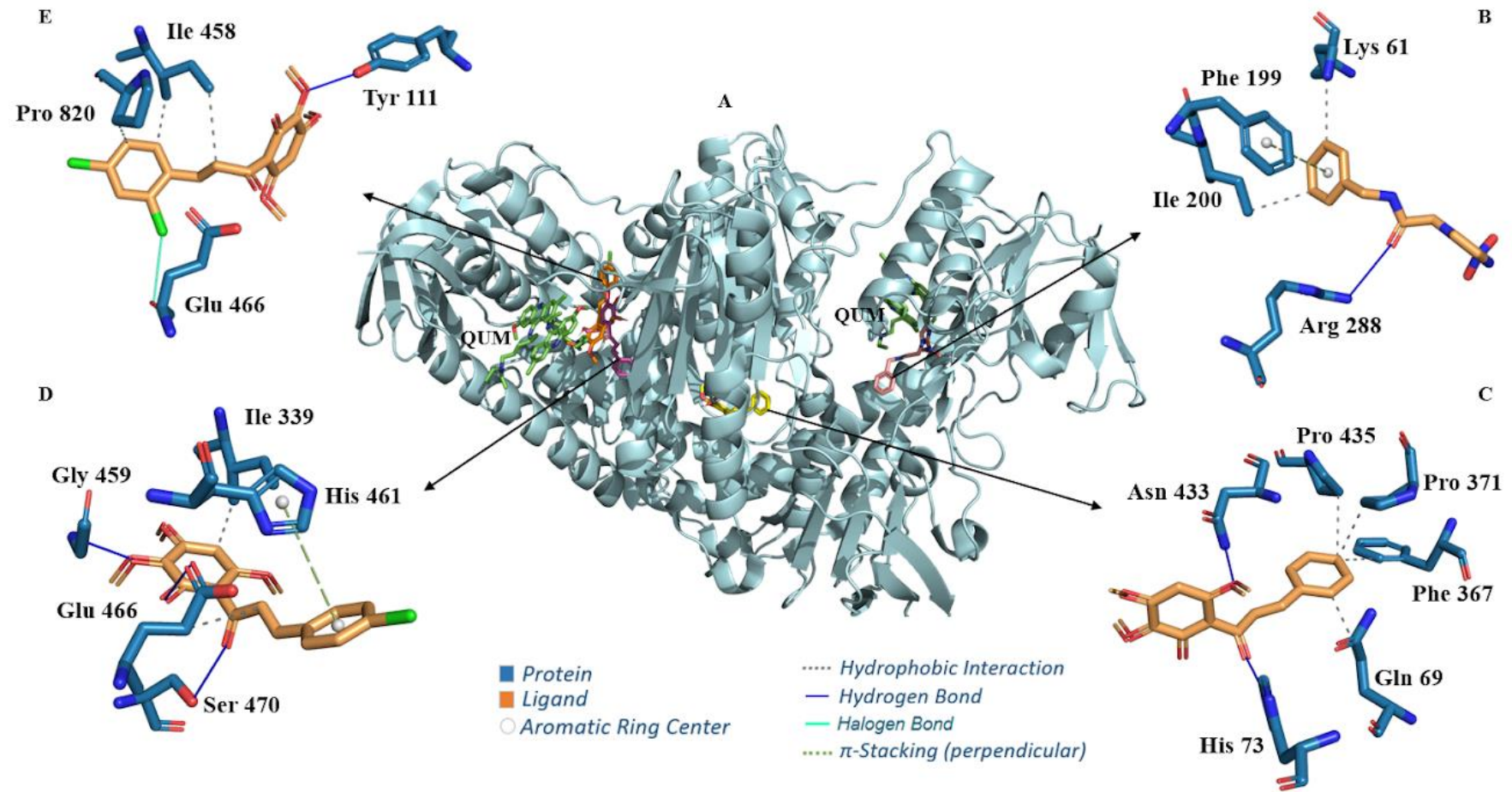
Ligantes/Enzima	Tripanotiona redutase	
	Energia de afinidade (kcal.mol ⁻¹)	RMSD (Å)
CH-C	-6,3	1,315
Ch-4Cl	-6,4	1,952
Ch-DiCl	-6,2	1,853
Bz	-7,6	1,641
QUM*	-5,7	2,016

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

Quanto ao tipo de interações entre os ligantes e a enzima em questão (tabela 11), a Ch-C formou interações hidrofóbicas com os resíduos de Gln94A, Phe367A, Pro371A e Pro453B, além de ligações de hidrogênio com resíduos de His73A e Asn433A.

A Ch-4Cl formou interações hidrofóbicas com resíduos de Glu466A e Ile339B, ligações de hidrogênio com Gly459A, Glu466A e Ser470A, e interações π -stacking com His 461A. Já a Ch-DiCl, com dois átomos de cloro, formou interações hidrofóbicas com Pro820A e Ile458B. Além disso, foram formadas ligações de hidrogênio com Tyr111B e ponte halogênica com Glu466A. Diferentemente, o Bz formou interações hidrofóbicas com Lys61A e Ile200A, ligações de hidrogênio com Arg288A e π -stacking com Phe199A.

Figura 43 - Complexo e mapas de interação dos ligantes com a enzima tripanotona redutase.



Legenda – Complexo e mapas de interação da enzima cruzaina (A) com os ligantes Bz (B) Ch-C (C), Ch-4Cl (D) e Ch-DiCl (E). Fonte – Elaborado pelo autor.

Tabela 11 - Interações entre os ligantes com a enzima tripanotona redutase.

Ligantes	Resíduos	Interação	Distância (Å)
Ch-C	Gln 69A	Hidrofóbica	3,89
	Phe 367A	Hidrofóbica	3,58
	Pro 371A	Hidrofóbica	3,62
	Pro 435B	Hidrofóbica	3,81
	His 73A	Ligação de H	2,07
	Asn 433A	Ligação de H	2,81
Ch-4Cl	Glu 466A	Hidrofóbica	3,94
	Ile 339B	Hidrofóbica	3,40
	Gly 459A	Ligação de H	2,07
	Glu 466A	Ligação de H	2,54
	Ser 470A	Ligação de H	2,38
	His 461A	π -Stacking	5,01
Ch-DiCl	Pro 820A	Hidrofóbica	3,89
	Ile 458B	Hidrofóbica	4,00
	Ile 458B	Hidrofóbica	3,52
	Tyr 111B	Ligação de H	2,69
	Glu 466A	Ligação halogênica	3,45
Bz	Lys 61A	Hidrofóbica	3,87
	Ile 200A	Hidrofóbica	3,75
	Arg 288A	Ligação de H	3,27
	Phe 199A	π -Stacking	5,40
QUM*	Leu 18A	Hidrofóbica	3,90
	Trp 22A	Hidrofóbica	3,47
	Trp 22A	Hidrofóbica	3,49
	Met 114A	Hidrofóbica	3,91
	Asp 117A	Hidrofóbica	3,30
	Leu 18B	Hidrofóbica	3,87
	Trp 22B	Hidrofóbica	3,41
	Trp 22B	Hidrofóbica	3,40
	Asp 117B	Hidrofóbica	3,34
	Tyr 111B	Hidrofóbica	3,32
	Ile 339B	Hidrofóbica	3,37
	Tyr 111B	Ligação de H	3,22
	Ser 110B	Ligação halogênica	3,15
	Ser 110B	Ligação halogênica	3,61
	Trp 22A	π -Stacking	4,09
	Trp 22A	π -Stacking	3,73
	Glu 113B	π -Stacking	4,97
	Asp 117B	π -Stacking	4,92
	Glu 113A	Salt bridges	4,96
	Asp 117A	Salt bridges	4,91

Legenda - *QUM: mostarda quinacrina. Fonte: Elaborado pelo autor.

4.9. Estudos *in silico* de interação com a enzima cruzaina

Para avaliar o potencial de interação das moléculas do estudo com alvos de importância para a sobrevivência do parasito, estudos de docking molecular foram realizados, sendo as simulações inicialmente realizadas com a enzima cruzaina.

Conforme apresentado na figura 44, pode-se observar que todas as moléculas estudadas, incluindo o benznidazol, apresentaram potenciais interações em sítios distintos do KB2, inibidor co-cristalizado. Com os resultados da tabela 12, mostra-se que as

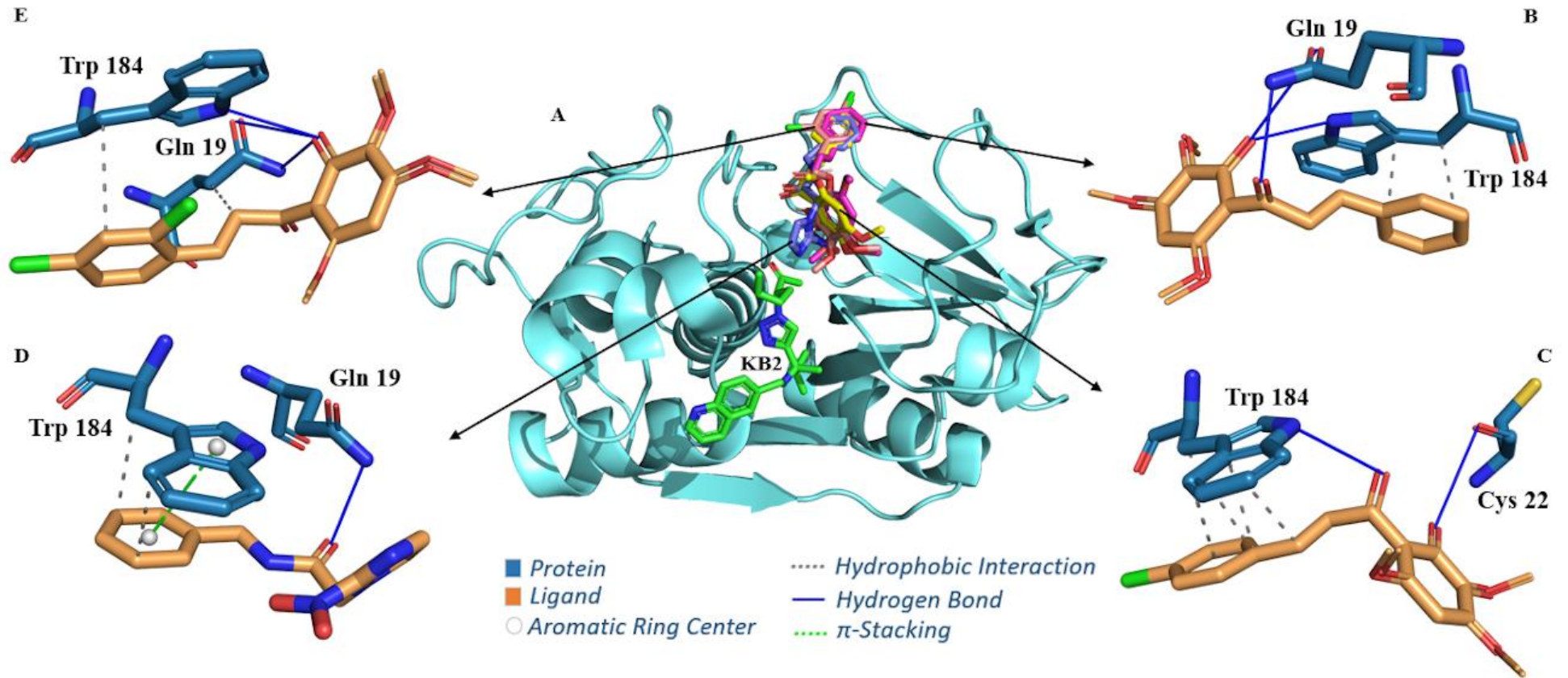
chalconas Ch-4Cl e Ch-DiCl apresentaram valores de energia de afinidade iguais a -6,0 e -6,1 kcal.mol⁻¹. Em comparação, a Ch-C e o benznidazol apresentaram valores de energia de ligação inferiores a -6,0 kcal/mol, valor considerado mínimo para interações com boa estabilidade.

Tabela 12 - Energia de afinidade e valores de RMSD dos complexos formados pelos ligantes e a enzima cruzaina obtidos por docking molecular.

Ligantes/Enzima	Cruzaina	
	Energia de afinidade (kcal.mol ⁻¹)	RMSD (Å)
Ch-C	-5,8	1,723
Ch-4Cl	-6,0	1,808
Ch-DiCl	-6,1	1,559
Bz	-5,7	1,602
KB2*	-5,3	1,489

Legenda – *KB2:((3S)-3-(4-((1S)-1,2-dimetil-1-[(quinolin-6-ilmetil)amino]propil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)heptan-2-ona. RMSD (*Root Mean Square Deviation*). Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 44 - Complexo e mapas de interação dos ligantes com a enzima cruzaina.



Legenda – Complexo e mapas de interação da enzima cruzaina (A) com os ligantes Ch-C (B), Ch-4Cl (C), Bz (D) e Ch-DiCl (E). Fonte – Elaborado pelo autor.

Quando analisados os possíveis tipos de interações ligante-proteína, bem com as suas distâncias (Tabela 13), observa-se que todas as chalconas apresentaram interações hidrofóbicas e de hidrogênio de diferentes intensidades com o resíduo de Trp184A. Ch-C e Ch-DiCl formaram ligações de hidrogênio com o resíduo Gln19A, e a Ch-4Cl é única das três moléculas capaz de formar ligações de hidrogênio com o resíduo de Cys22A. O benzimidazol formou interações hidrofóbicas e π -stacking com os resíduos de Trp184A, além de interações de hidrogênio com Gln19A.

Tabela 13 - Interações entre os ligantes com a enzima cruzafina.

Ligantes	Resíduos	Interação	Distância (Å)
Ch-C	Trp184A	Hidrofóbica	3,65
	Trp184A	Hidrofóbica	3,80
	Gln19A	Ligação de H	3,21
	Gln19A	Ligação de H	2,31
	Trp184A	Ligação de H	2,31
Ch-4Cl	Trp184A	Hidrofóbica	3,58
	Trp184A	Hidrofóbica	3,61
	Trp184A	Hidrofóbica	3,73
	Trp184A	Hidrofóbica	3,75
	Cys22A	Ligação de H	3,31
	Trp184A	Ligação de H	2,53
Ch-DiCl	Gln19A	Hidrofóbica	3,92
	Trp184A	Hidrofóbica	3,82
	Gln19A	Ligação de H	3,11
	Gln19A	Ligação de H	3,24
	Trp184A	Ligação de H	2,43
Bz	Trp184A	Hidrofóbica	3,72
	Trp184A	Hidrofóbica	2,61
	Gln19A	Ligação de H	2,40
	Trp184A	π -Stacking	3,96
KB2*	Leu67A	Hidrofóbica	3,88
	Leu67A	Hidrofóbica	3,59
	Gln19A	Ligação de H	2,28
	Cys25A	Ligação de H	2,18
	Gly66A	Ligação de H	1,87
	Gly66A	Ligação de H	2,27

Legenda - *KB2:((3S)-3-(4-((1S)-1,2-dimetil-1-[(quinolin-6-ilmetil)amino]propil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)heptan-2-ona. Fonte: Elaborado pelo autor.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Por conta da sua versatilidade, chalconas naturais e sintéticas têm sido utilizadas no desenvolvimento de novas terapias para doenças infecciosas, como aquelas causadas por bactérias resistentes (AL-SAHEB et al., 2020; UŠJAK et al., 2019), fungos (OSMANIYE et al., 2018) e doenças parasitárias negligenciadas, entre elas malária (DEVI et al., 2018; REETA et al., 2019) e leishmaniose (SOUZA et al., 2020).

Chalconas são precursores de flavonoides na via do mevalonato, compartilhando propriedades biológicas semelhantes (SOUSA-BATISTA et al., 2018). Nesse contexto, chalconas e flavonas naturais obtidas de *Polygonum saliciform* mostraram um importante efeito *in vitro* contra cinetoplastídeos, como *T. b. brucei*, *T. congolense* e *L. mexicana* (ZHEOAT et al., 2021). Trans-chalconas modularam a infecção e inflamação causada por *L. amazonensis* em um modelo *in vitro* (MIRANDA-SAPLA et al., 2019). Por conta das suas similaridades estruturais e metabólicas, muitos compostos leishmanicidas apresentam um considerável efeito em *T. cruzi* (CARTUCHE et al., 2020). Contudo, existem poucas pesquisas que empregam chalconas na busca por novos fármacos antichagásicos.

Recentemente, novas chalconas foram sintetizadas utilizando como substrato uma acetofenona natural isolada de *C. anisodontus* (FREITAS et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2020). Essas moléculas mostraram efeitos inibitórios em espécies do gênero *Candida* sp., bem como citotoxicidade em células cancerígenas. Adicionalmente, elas aumentaram a sensibilidade bacteriana a ciprofloxacino e gentamicina através da inibição de bombas de efluxo. Apesar do efeito antimicrobiano e citotóxico em células cancerígenas, não existem estudos acerca do efeito em *T. cruzi* dessas chalconas, sendo assim um grupo de moléculas como candidatas a agentes antichagásicos.

No presente estudo, foi descrita pela primeira vez o efeito tripanocida de três novas 2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenilchalconas, bem como as suas interações teóricas com a cruzaina e a tripanotiona redutase de *T. cruzi*. Essas moléculas foram sintetizadas e caracterizadas previamente, e os estudos de atividades biológica e teórica foram realizadas a fim de se avaliar seus efeitos em células hospedeiras e nas principais formas de sobrevivência do *T. cruzi*.

O efeito em células LLC-MK2 hospedeiras é comumente realizado para selecionar substâncias de baixa toxicidade, bem como selecionar concentrações para outras

avaliações. Estas células são utilizadas em experimentos de atividade tripanocida por conta da sua alta suscetibilidade à infecção e facilidade de cultivo (ADADE, 2010).

A citotoxicidade observada na Ch-C foi drasticamente reduzida devido à presença de átomos de cloro no anel B, especialmente para a Ch-DiCl, que apresenta 2- e 4-cloro substituições. De acordo com a literatura, muitos dos efeitos biológicos demonstrados por chalconas estão relacionados com a sua capacidade de interagir com resíduos de aminoácidos nucleofílicos presentes nas biomoléculas, em um mecanismo reacional do tipo acceptor de Michael (OTERO et al., 2014).

Aceptores de Michael são moléculas que apresentam, na sua estrutura, um sistema carbonílico α , β -insaturado, de caráter eletrofílico, que são capazes de interagir com regiões como aminas, tióis e resíduos de cisteína de biomoléculas como a glutatona (FOTOUHI et al., 2018; GENEST et al., 2021; HEARN et al., 2021; SLAWIK et al., 2017). Essa reação envolve a formação de um carbocátion intermediário de alta reatividade, conferindo às chalconas uma reatividade intrínseca, que justifica muitos dos efeitos biológicos dessas moléculas (ADELUSI et al., 2021; EGBUJOR et al., 2021; MAYER; OFIAL, 2019; SANTOS; MOREIRA, 2007).

A redução da toxicidade em células LLC-MK2 provocada pela adição de átomos de cloro no anel B pode estar envolvida, além do efeito retirador de elétrons desse átomo, com o impedimento estérico provocado por átomos volumosos, atrapalhando a interação de grupos reativos com alvos biológicos (RAZMI et al., 2013).

Chalconas alílicas derivadas de vanilina foram sintetizadas e suas atividades antimaláricas avaliadas. A chalcona 4-cloro substituída mostrou-se como a mais ativa contra *P. falciparum* 3D7, sensível à cloroquina. Este efeito foi maior quando esta substituição foi no anel B, em comparação com a substituição no anel A (SHARMA et al., 2014). Essa funcionalização no anel B aumentou também a atividade antimalárica de quinolinilchalconas em cepas resistentes à cloroquina de *P. falciparum*, com interações semelhantes àsquelas observadas em estudos *in silico* com cloroquina (HAMEED et al., 2019).

As moléculas do presente estudo apresentaram um efeito em formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. Contudo, não foram observadas diferenças entre as moléculas cloro substituídas em comparação com a Ch-C, destacada pelos valores de IC₅₀ e LC₅₀ semelhantes. Assim, o efeito tripanocida dessas moléculas parece não ser mediado

pela reação de Michael, mas através de interferência em vias metabólicas do parasito. Dessa forma, a halogenação do anel B reduziu a citotoxicidade sem interferir no efeito antiparasitário das moléculas.

A adição de cloro no anel B foi capaz de aumentar a seletividade em comparação à Ch-C, cujo IS foi de 0,36, enquanto as chalconas 2 e 3 apresentaram IS de 3,99 e 7,46, respectivamente. Esse efeito ocorreu devido à uma redução da toxicidade em células hospedeiras, sem significativo comprometimento do efeito no parasito. Apesar disso, os valores encontrados no presente trabalho são inferiores ao preconizado pela OMS, que recomenda o uso de um *cutoff* de IS > 50 (NWAKA; HUDSON, 2006). Mesmo assim, o presente estudo contribui para o conhecimento científico de forma a permitir o desenvolvimento de moléculas menos tóxicas sem comprometimento de seu efeito antiparasitário.

Como sendo a mais seletiva dentre as moléculas, a Ch-DiCl foi selecionada para a avaliação do efeito anti-amastigota. Essa chalcona reduziu principalmente a quantidade de amastigotas dentro das células infectadas, bem como reduziu o percentual de células infectadas nas duas concentrações mais altas. Isso pode indicar um possível impedimento na proliferação intracelular dos amastigotas, como o observado por uma 4-nitrochalcona em formas amastigota de *L. amazonensis* (ASSOLINI et al., 2020).

Anteriormente, um melhor efeito contra amastigotas de *T. cruzi* foi obtido quando comparados os ensaios biológicos de uma fração rica em chalconas de *Lonchocarpus culturatus* comparada com uma fração pobre em chalconas (BORTOLUZZI et al., 2021). Essa redução na viabilidade de amastigotas, bem como na infectividade, provocada pelas chalconas, pode estar relacionada com interferência em processos celulares de importância para a sobrevivência parasitária.

Para investigar a participação de eventos necróticos e apoptóticos na morte dos parasitos, marcações com Anexina V-PE e 7-AAD foram utilizadas, respectivamente (DE MENEZES et al., 2019a). Todas as moléculas promoveram marcação única com 7-AAD e dupla marcação, caracterizando um processo de morte celular necrótico, o qual está relacionado a perda de integridade de membrana e que pode estar associado a dano de organelas, comprometendo drasticamente a recuperação dos parasitos (MENNA-BARRETO, 2019).

Necrose induzida por chalconas em *T. cruzi* tem sido pouco descrita na literatura. Contudo, alguns autores observaram que este mecanismo está associado ao efeito destas moléculas em células cancerígenas (DOS SANTOS et al., 2019). Além disto, este processo de morte é muito bem descrito para outras substâncias, como o ácido betulínico, um sesquiterpeno que promove dano de membrana e estresse oxidativo em *T. cruzi*, ressaltado pela produção de espécies reativas de oxigênio e disfunção mitocondrial (SOUSA et al., 2017). Derivados do ácido p-cumárico, estruturalmente relacionados com chalconas, também provocaram dano de membrana e necrose em *T. cruzi* (LOPES et al., 2019). No presente estudo, de modo semelhante, o estresse oxidativo foi evidenciado pela produção de ERO e diminuição do potencial mitocondrial.

Estes eventos foram provocados em *L. amazonensis* pela A3K2A3, um derivado estruturalmente relacionado com chalconas e curcuminóides, com indução da depleção na produção de ATP mitocondrial (GARCIA et al., 2017). Este efeito também foi observado no tratamento de *L. donovani* com derivados de β -aminoácidos e chalconas, com inibição do complexo III mitocondrial, sendo estes compostos promissores como alternativas para doenças causadas por tripanossomatídeos (CHANDRAKAR et al., 2019). Nesse sentido, três chalconas promoveram alterações ultraestruturais na mitocôndria de *L. (V.) braziliensis*, incluindo perda das cristas e inchaço desta organela, ambos causados pelo aumento na produção de ERO (DE MELLO et al., 2016). Desse modo, é possível que o efeito das chalconas do presente estudo esteja relacionado a alterações na permeabilidade de membrana, inchaço celular e perda da arquitetura mitocondrial, iniciados pelo estresse oxidativo.

Vale ressaltar que a manutenção da função mitocondrial é importante no balanço redox em tripanossomatídeos e na produção e neutralização de ERO. Ademais, o estresse oxidativo nestes organismos é maior, quando comparado com eucariotos, visto que apresentam maior necessidade de sobrevivência em ambientes inóspitos durante o seu ciclo de vida. Assim, enzimas antioxidantes como a tripanotiona reductase (TcTR) são essenciais para a sobrevivência do parasito (BOMBAÇA et al., 2019). Desse modo, o desenvolvimento de inibidores de TcTR tem sido uma importante estratégia no desenvolvimento de novos agentes antichagásicos (DA ROSA et al., 2017; HARTMANN et al., 2017; VAZQUEZ-JIMENEZ et al., 2019).

A neutralização de ERO ocorre com o consumo do substrato da tripanotiona dissulfeto (TS₂) pela TcTR, e a inibição desta enzima é relacionada com a disfunção no

balanço redox do parasito (TURCANO et al., 2020). Derivados 1,4-di-N-óxido inibiram a enzima TcTR em formas epimastigotas de um modo melhor que o benzonidazol (CHACÓN-VARGAS et al., 2017). Compostos naturais da região do semiárido brasileiro exibiram uma interessante interação com TcTR em um estudo *in silico*, os quais foram confirmados por estudos biológicos *in vitro* (DA PAIXÃO; PITA, 2019).

Derivados de *Diaspyros crassiflora* exibiram interações teóricas com TcTR de *T. cruzi* e mostraram uma inibição com esta enzima, indicando que estes compostos são promissores para a terapia antichagásica (ULIASSI et al., 2017). O metabólito 5-hidróxi-2-metil-1,4-naftoquinona, obtido da plumbagina, é listado também como um inibidor de TcTR no gênero *Leishmania* sp., resultados estes associados com inchaço mitocondrial, aumento da produção de ERO e morte celular (AWASTHI et al., 2016).

Por fim, a inibição de TcTR de *L. infantum* é relacionada com a despolarização mitocondrial, redução do $\Delta\Psi_m$, depleção de ATP e aumento da produção de peróxido de hidrogênio, levando à peroxidação lipídica da membrana plasmática do parasito e morte celular (INACIO et al., 2021). Derivados da licochalcona A que inibiram a TcTR apresentaram resultados encorajadores em estudos com *Leishmania* sp., levando à uma redução da viabilidade de promastigotas e amastigotas (ORTALLI et al., 2018). Contudo, existem ainda poucos estudos relacionando chalconas com a inibição de sistemas redox do *T. cruzi*. Desse modo, os achados do presente estudo na função mitocondrial e morte celular do parasito reforçam a importância do design molecular de chalconas utilizando proteínas do parasito como alvos no desenvolvimento de novas terapias para doenças negligenciadas, como a Doença de Chagas.

A inibição da enzima TcTR pela QUM ocorre por conta da sua interação com resíduos de aminoácidos do centro redox ativo, como Tyr111 e Cys53 (DA ROCHA PITA et al., 2009; SARAVANAMUTHU et al., 2004). A região hidrofóbica da enzima, formada por Phe396, Pro398, Leu399, Cys469, Ser470, Met471 e Arg472, confere alta seletividade para a enzima parasitária, comparada à isoforma humana, com uma melhor interação com o substrato tripanotiona dissulfeto (DA PAIXÃO; PITA, 2019). As moléculas do presente estudo interagiram com Tyr111A, bem com Ser470A, de forma que podem interferir diretamente na atividade da enzima, causando estresse oxidativo.

Em tripanossomatídeos, existe uma alta homologia em isoformas da tripanotiona redutase e na sua funcionalidade. Em *L. infantum*, a região formada pela His461 e Glu466

é relacionada com a desprotonação do NADPH e do FADH₂, enquanto o resíduo Ile339 é importante na atividade do centro catalítico da enzima (MAAMRI, SARRA; BENAROUS, KHEDIDJA; YOUSFI, 2021). Esses mesmos resíduos são relevantes no sítio catalítico, e no acoplamento do NADPH e FADH₂ da tripanotona redutase em *L. braziliensis*, juntamente com o resíduo de Thr374 (DA SILVA et al., 2019).

Finalmente, Ile339 e Tyr111 são apontados também como importantes para a conversão do substrato, TS₂, no sítio catalítico da enzima em *Trypanosoma brucei*, e as interações com estes diferentes resíduos pode estar relacionada com a inibição desta enzima em tripanossomatídeos em geral (O'SULLIVAN et al., 2015). Isso reforça o efeito potencial das presentes substâncias em inibir a TcTR, o que é apoiado pelo estresse oxidativo causada por elas.

Para o *T. cruzi*, a diferenciação entre as três principais formas de sobrevivência, a infectividade e a proliferação em células hospedeiras é mediada por proteases, como a cruzaina (TcCr), a principal cisteína protease presente no parasito (ALVAREZ et al., 2021). O bloqueio desta enzima é associado com uma interferência na metacicloênese, nutrição, redução da infectividade, inibição da proliferação e, conseqüentemente, morte do parasito, principalmente nas formas tripomastigotas e amastigotas (BATISTA et al., 2015; LOSINNO et al., 2021).

As chalconas Ch-C e Ch-DiCl interagiram com Gln19, enquanto a Ch-4Cl interagiu com Cys22. Além disso, todas as chalconas estudadas interagiram com Trp184. No centro catalítico da TcCr, Cys25 é apontado como sendo o principal resíduo diretamente relacionado com a atividade desta enzima, porém outros resíduos, como Cys22, Gln19, Ser61, Glu65, Gln66, Leu67 e Asp16, são também importantes para a estabilização do ligante nesta região (BRAK et al., 2010; SILVA-JÚNIOR et al., 2016). Dessa maneira, interações com estes aminoácidos por derivados de benzoiltioureas (PEREIRA et al., 2021) e N-propionil-N'-benzeneacil-hidrazona (DELGADO-MALDONADO et al., 2020) medeiam os efeitos inibitórios destas substâncias nesta enzima. Além disso, interações com o resíduo Trp184 são relacionados ao favorecimento da ligação com Gln19 no sítio ativo, o que também pode ser utilizado no design racional de inibidores de cruzaina, como as chalconas (DA SILVA-JUNIOR et al., 2018).

A relevância da cruzaina para a sobrevivência do parasito tem levado muitos grupos de pesquisa ao desenvolvimento e *screening* virtual de substâncias com potencial

inibitório para este alvo molecular (HERRERA-MAYORGA et al., 2019). Híbridos de pirazol-imidazol e pirazol-tetra-hidropirimidina inibiram a atividade cisteíno protease, através da ligação ao sítio ativo da enzima, com efeito em formas tripomastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y (MONTEIRO et al., 2019). Derivados de tiofen-2-iminotiazolidina também apresentaram interações *in silico* no sítio catalítico da TcCr e reduziram a sobrevivência de formas tripomastigotas e amastigotas (SILVA-JÚNIOR et al., 2016).

O potencial antichagásico de imidas cíclicas é relacionado à inibição reversível a TcCr, cuja triagem foi feita por docking molecular, corroborando com os seus achados *in silico* (FERREIRA, 2019). (*E*)-cinâmico-N-acil-hidrazonas sintéticas apresentaram um potente efeito como agentes tripanocidas, associados à inibição desta protease (CARVALHO et al., 2012).

Chalconas são outro grupo de moléculas cujo efeito na enzima cruzaina é conhecido (LI et al., 1996). Derivados de chalconas e hidrazidas são apontadas como inibidores teóricos desta enzima, sendo os seus efeitos biológicos avaliados, obtendo moléculas promissoras no contexto da terapia antichagásica (BORCHHARDT et al., 2010; VITAL; ARRIBAS; TROSSINI, 2013). Previamente, di-hidrochalconas foram isoladas de *Metrodorea stipularis*, e estas substâncias foram efetivas em *P. falciparum* e *T. cruzi*. Esses efeitos foram relacionados à inibição da enzima cruzaina (APONTE et al., 2008).

Em suma, as chalconas apresentaram interações com as enzimas cruzaina e tripanotiona reductase, importantes enzimas para a manutenção da sobrevivência do parasito e infectividade, com ocorrência de dano de membrana, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial. Além disso, a adição 2,4-dicloro no anel B reduziu a toxicidade às células hospedeiras, sem que ocorresse perda significativa do efeito antiparasitário, que foi comparável, senão superior ao fármaco de referência. Esses resultados indicam que esses grupos de moléculas são potenciais candidatos para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas para o tratamento da Doença de Chagas.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

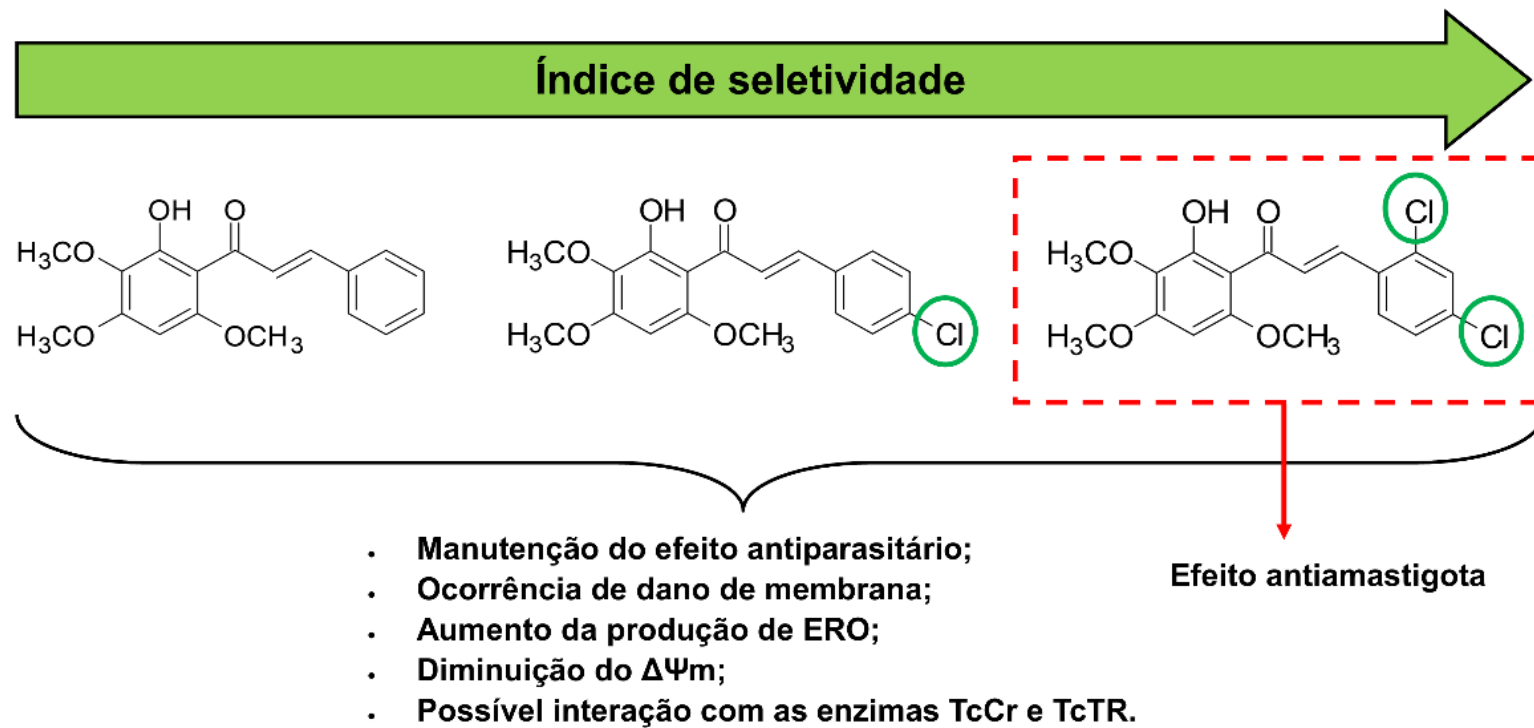
A adição de átomos de cloro ao anel B de trimetoxifenilchalconas aumentou a seletividade destas moléculas frente às formas de vida de *Trypanosoma cruzi* através da redução da citotoxicidade em células hospedeiras, sem alterar consideravelmente o efeito tripanocida. Isso pode estar relacionado com o efeito retirador de elétrons dos átomos de cloro e pelo impedimento estérico exercido por esse átomo, impedindo a interação com sistemas biológicos das células hospedeiras.

A maior seletividade do Ch-DiCl possibilitou o seu uso contra os amastigotas, o qual reduziu o percentual de células infectadas e o número dessas formas intracelulares, indicando potencialidade para aplicação em modelos crônicos de DC.

Adicionalmente, as chalconas provocaram necrose no parasito, com ocorrência de estresse oxidativo, aumento na produção de ERO e diminuição do potencial transmembrânico mitocondrial. O efeito observado sobre as formas de vida do parasito pode estar relacionado a possível interação entre as moléculas e as enzimas cruzaina e tripanotiona redutase, conforme demonstrado nos ensaios de docking molecular.

Portanto, o presente trabalho ressalta o papel de chalconas como potenciais ferramentas farmacológicas no contexto da terapia antichagásica, sobretudo quanto a modificações estruturais que possibilitem a redução da toxicidade destas moléculas sem comprometimento do efeito antiparasitário. Além disso, os dados deste trabalho ressaltam as proteínas cruzaina e tripanotiona redutase como alvos terapêuticos nos ensaios de atividade tripanocida.

7. RESUMO GRÁFICO



REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

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

ADELUSI, T. I. et al. Signaling pathways and proteins targeted by antidiabetic chalcones. **Life Sciences**, v. 284, p. 118982, nov. 2021.

ADL, S. M. et al. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 399–451, out. 2005.

AL-SAHEB, R. et al. Synthesis of new pyrazolone and pyrazole-based adamantyl chalcones and antimicrobial activity. **Bioscience reports**, v. 40, n. 9, 2020.

ALTCHEH, J. et al. Prospective, historically controlled study to evaluate the efficacy and safety of a new paediatric formulation of nifurtimox in children aged 0 to 17 years with Chagas disease one year after treatment (CHICO). **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 1, p. e0008912, 2021.

ALVAREZ, V. E. et al. Update on relevant trypanosome peptidases: Validated targets and future challenges. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1869, n. 2, 2021.

ANTINORI, S. et al. Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. **European journal of internal medicine**, v. 43, p. 6–15, set. 2017.

APONTE, J. C. et al. Synthesis, cytotoxicity, and anti-Trypanosoma cruzi activity of new chalcones. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 19, p. 6230–6234, 2008.

ARANDA, A. et al. Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: A quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 2, p. 954–963, 2013.

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

ARAÚJO-JORGE, T. C.; CASTRO, S. L. DE. Planejamento de experimentos e escolha dos modelos: hospedeiro e parasita. **Doença de chagas: manual para experimentação**

animal [online], p. 175–196, 2000.

ASSOLINI, J. P. et al. 4-nitrochalcone exerts leishmanicidal effect on *L. amazonensis* promastigotes and intracellular amastigotes, and the 4-nitrochalcone encapsulation in beeswax copaiba oil nanoparticles reduces macrophages cytotoxicity. **European Journal of Pharmacology**, v. 884, p. 173392, 2020.

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

BADRIA, F. A. et al. Anticancer Indole-Based Chalcones: A Structural and Theoretical Analysis. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 20, 16 out. 2019.

BALOUZ, V.; AGÜERO, F.; BUSCAGLIA, C. A. Chagas Disease Diagnostic Applications: Present Knowledge and Future Steps. **Advances in parasitology**, v. 97, p. 1–45, 2017.

BARBOSA DA SILVA, E. et al. Cruzain structures: apocruzain and cruzain bound to S-methyl thiomethanesulfonate and implications for drug design. **Acta crystallographica. Section F, Structural biology communications**, v. 75, n. Pt 6, p. 419–427, 1 jun. 2019.

BATISTA, C. M. et al. Trypanosoma cruzi intracellular amastigotes isolated by nitrogen decompression are capable of endocytosis and cargo storage in reservosomes. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–18, 2015.

BATTISTA, T. et al. Targeting Trypanothione Reductase, a Key Enzyme in the Redox Trypanosomatid Metabolism, to Develop New Drugs against Leishmaniasis and Trypanosomiasis. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 8, 21 abr. 2020.

BELLERA, C. L. et al. In Silico Drug Repositioning for Chagas Disease. **Current medicinal chemistry**, v. 27, n. 5, p. 662–675, 2020.

BERENSTEIN, A. J. et al. Adverse Events Associated with Nifurtimox Treatment for Chagas Disease in Children and Adults. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 65, n. 2, 2021.

BERMUDEZ, J. et al. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta tropica**, v. 156, p. 1–16, abr. 2016.

BERN, C. Chagas' Disease. **The new england journal of medicine**, v. 375, n. 5, p. 456–466, 2015.

BERN, C. et al. Chagas Disease in the United States: a Public Health Approach. **Clinical microbiology reviews**, v. 33, n. 1, 2019.

BESTETTI, R. B. et al. Could Carlos Chagas' assumption on the relationship between goiter and chronic Chagas heart disease be correct? A historical reappraisal. **International journal of cardiology**, v. 202, p. 410–2, 1 jan. 2016.

BHAMBRA, A. S. et al. Synthesis and antitrypanosomal activities of novel pyridylchalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 128, p. 213–218, 2017.

BOMBAÇA, A. C. S. et al. Mitochondrial dysfunction and ROS production are essential for anti-Trypanosoma cruzi activity of β -lapachone-derived naphthoimidazoles. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 130, n. July 2018, p. 408–418, 2019.

BORCHHARDT, D. M. et al. Biochemical evaluation of a series of synthetic chalcone and hydrazide derivatives as novel inhibitors of cruzain from trypanosoma cruzi. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 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 Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 1, p. 99–108, 2021.

BRAK, K. et al. Nonpeptidic tetrafluorophenoxymethyl ketone cruzain inhibitors as promising new leads for Chagas disease chemotherapy. **Journal of medicinal chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1763–73, 25 fev. 2010.

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

BRENER, Z. Typanosoma cruzi: morfologia e ciclo evolutivo. **Scielo Books**, p. 24–31, 1997.

BURLEIGH, B. A.; WOOLSEY, A. M. Cell signalling and Trypanosoma cruzi invasion. **Cellular microbiology**, v. 4, n. 11, p. 701–11, nov. 2002.

CARTUCHE, L. et al. Antikinetoplastid activity of indolocarbazoles from streptomyces

sanyensis. **Biomolecules**, v. 10, n. 4, p. 1–14, 2020.

CARVALHO, L. S. A. et al. Cardamonin Presents in Vivo Activity against *Schistosoma mansoni* and Inhibits Potato Apyrase. **Chemistry & Biodiversity**, v. 18, n. 11, p. e2100604, 27 nov. 2021.

CARVALHO, S. A. et al. Design and synthesis of new (E)-cinnamic N-acylhydrazones as potent antitrypanosomal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 512–521, 2012.

CASTRO-ARROYAVE, D.; MONROY, M. C.; IRURITA, M. I. Integrated vector control of Chagas disease in Guatemala: a case of social innovation in health. **Infectious diseases of poverty**, v. 9, n. 1, p. 25, 14 abr. 2020.

CASTRO, J. A.; DIAZ DE TORANZO, E. G. Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas' disease). **Biomedical and environmental sciences : BES**, v. 1, n. 1, p. 19–33, jun. 1988.

CEARÁ. **Boletim das Doenças Tropicais Negligenciadas** Secretaria de Saúde, Governo do Estado do Ceará, , 2021.

CEVALLOS, A. M.; HERNÁNDEZ, R. Chagas' disease: pregnancy and congenital transmission. **BioMed research international**, v. 2014, p. 401864, 2014.

CHACÓN-VARGAS, K. F. et al. Trypanocidal activity of quinoxaline 1,4 Di-N-oxide derivatives as trypanothione reductase inhibitors. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 1–18, 2017.

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

CHANDRAKAR, P. et al. β -Amino acid derivatives as mitochondrial complex III inhibitors of *L. donovani*: A promising chemotype targeting visceral leishmaniasis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 182, p. 111632, 2019.

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

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood

and oral transmissions--a comprehensive review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277–82, maio 2015.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S6-7, 24 jun. 2010.

CRESPILLO-ANDÚJAR, C. et al. Toxicity of nifurtimox as second-line treatment after benznidazole intolerance in patients with chronic Chagas disease: when available options fail. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 12, p. 1344.e1-1344.e4, dez. 2018.

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

CUARTAS, V. et al. New thiazolyl-pyrazoline derivatives bearing nitrogen mustard as potential antimicrobial and antiprotozoal agents. **Archiv der Pharmazie**, v. 353, n. 5, 2020.

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

DA ROCHA PITA, S. S. et al. Molecular docking of a series of peptidomimetics in the trypanothione binding site of *T. cruzi* Trypanothione Reductase. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 28, n. 4, p. 330–335, nov. 2009.

DA ROSA, R. et al. Design and synthesis of a new series of 3,5-disubstituted isoxazoles active against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 128, p. 25–35, 2017.

DA SILVA-JUNIOR, E. F. et al. Molecular Docking Studies Applied to a Dataset of Cruzain Inhibitors. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 14, n. 1, p. 68–78, 21 mar. 2018.

DA SILVA, A. D. et al. Insights about resveratrol analogs against trypanothione reductase of *Leishmania braziliensis*: Molecular modeling, computational docking and in vitro antileishmanial studies. **Journal of biomolecular structure & dynamics**, v. 37, n. 11, p. 2960–2969, jul. 2019.

DA SILVA, P. T. et al. Cytotoxic and antifungal activity of chalcones synthesized from natural acetophenone isolated from *Croton anisodontus*. **Revista Virtual de Quimica**, v. 12, n. 3, p. 712–723, 2020a.

DA SILVA, P. T. et al. Structural, vibrational and electrochemical analysis and antibacterial potential of isomeric chalcones derived from natural acetophenone. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 10, n. 14, 2020b.

DANTAS, R. O. Management of Esophageal Dysphagia in Chagas Disease. **Dysphagia**, v. 36, n. 3, p. 517–522, 2021.

DE BRITO, D. H. A. et al. Synthesis, structural and spectroscopic analysis, and antiproliferative activity of chalcone derivate (E)-1-(4-aminophenyl)-3-(benzo[b]thiophen-2-yl)prop-2-en-1-one in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Molecular Structure**, v. 1253, p. 132197, abr. 2022.

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

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

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

DE SOUZA, M. L. et al. Discovery of Potent, Reversible, and Competitive Cruzain Inhibitors with Trypanocidal Activity: A Structure-Based Drug Design Approach. **Journal of chemical information and modeling**, v. 60, n. 2, p. 1028–1041, 2020.

DE SOUZA, W. A Short Review on the Morphology of *Trypanosoma cruzi*: From 1909 to 1999. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. SUPPL. 1, p. 17–36, 1999.

DELGADO-MALDONADO, T. et al. Synthesis and biological evaluation in vitro and in silico of N-propionyl-N'-benzeneacylhydrazone derivatives as cruzain inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular Diversity**, 20 nov. 2020.

DEVI, K. et al. Synthesis and Evaluation of Antiplasmodial Activity of 2,2,2-

Trifluoroethoxychalcones and 2-Fluoroethoxy Chalcones against Plasmodium falciparum in Culture. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 23, n. 5, maio 2018.

DÍAZ ALCÁZAR, M. D. M.; ZÚÑIGA DE MORA FIGUEROA, B.; GARCÍA ROBLES, A. Megacolon with infectious etiology that is infrequent in our country: Chagas disease. **Revista española de enfermedades digestivas : organo oficial de la Sociedad Española de Patología Digestiva**, v. 112, n. 5, p. 423–424, maio 2020.

DNDI. **Drugs for Neglected Diseases initiative**. Disponível em:

<https://dndi.org/diseases/chagas/facts/?gclid=Cj0KCQjw8eOLBhC1ARIsAOzx5cHnGf8ACy2v40oGaaWo6XAJLEb-K25zSElnDlzV2Pg_-9MdiA7AbzUaAnC7EALw_wcB>.

DOS SANTOS, M. B. et al. Antiproliferative activity and p53 upregulation effects of chalcones on human breast cancer cells. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 1093–1099, 2019.

DOYLE, P. S. et al. The Trypanosoma cruzi protease cruzain mediates immune evasion. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 9, p. e1002139, set. 2011.

ECHAVARRÍA, N. G. et al. Chagas Disease: Chronic Chagas Cardiomyopathy. **Current problems in cardiology**, v. 46, n. 3, p. 100507, mar. 2021.

EGBUJOR, M. C. et al. Activation of Nrf2 signaling pathway by natural and synthetic chalcones: a therapeutic road map for oxidative stress. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 14, n. 4, p. 465–480, 3 abr. 2021.

ELKHALIFA, D. et al. A comprehensive review on the antiviral activities of chalcones. **Journal of drug targeting**, v. 29, n. 4, p. 403–419, 2021.

ENGEL, J. C. et al. Upregulation of the secretory pathway in cysteine protease inhibitor-resistant Trypanosoma cruzi. **Journal of cell science**, v. 113 (Pt 8, p. 1345–54, abr. 2000.

FERRAZ, C. A. N. et al. Potentiation of antibiotic activity by chalcone (E)-1-(4'-aminophenyl)-3-(furan-2-yl)-prop-2-en-1-one against gram-positive and gram-negative MDR strains. **Microbial pathogenesis**, v. 148, p. 104453, nov. 2020.

FERREIRA, E. I. Drug Design and Development for Neglected Diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 23, p. 4298–4300, 2019.

- FERREIRA, L. G.; ANDRICOPULO, A. D. Targeting cysteine proteases in trypanosomatid disease drug discovery. **Pharmacology & therapeutics**, v. 180, p. 49–61, dez. 2017.
- FIDALGO, A. S. O. DE B. V. et al. Insect vectors of Chagas disease (*Trypanosoma cruzi*) in Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 2, p. 174–182, 2018.
- FILIGHEDDU, M. T.; GÓRGOLAS, M.; RAMOS, J. M. Orally-transmitted Chagas disease. **Medicina clinica**, v. 148, n. 3, p. 125–131, 9 fev. 2017.
- FLORES-GONZALEZ, J.; CANCINO-DÍAZ, J. C.; CHAVEZ-GALAN, L. Flow Cytometry: From Experimental Design to Its Application in the Diagnosis and Monitoring of Respiratory Diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 22, 22 nov. 2020.
- FOTOUHI, L. et al. Electrochemically Induced Michael Addition Reaction: An Overview. **The Chemical Record**, v. 18, n. 11, p. 1633–1657, 19 nov. 2018.
- FRANCO, C. **Discovery of broad spectrum compounds against *Trypanosoma cruzi* throughout high content screening (PORTUGUESE)**. [s.l: s.n.].
- FREITAS, T. S. DE et al. Direct antibacterial and antibiotic resistance modulatory activity of chalcones synthesized from the natural product 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyacetophenone. **FEMS Microbiology Letters**, v. 367, n. 15, p. 1–8, 2020.
- GACCHE, R. et al. Antioxidant and anti-inflammatory related activities of selected synthetic chalcones: Structure-activity relationship studies using computational tools. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 7, p. 897–901, 2008.
- GARCIA, F. P. et al. A3K2A3-induced apoptotic cell death of *Leishmania amazonensis* occurs through caspase- and ATP-dependent mitochondrial dysfunction. **Apoptosis**, v. 22, n. 1, p. 57–71, 2017.
- GENEST, A. et al. Zwitterionic Silicone Materials Derived from Aza-Michael Reaction of Amino-Functional PDMS with Acrylic Acid. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 42, n. 5, p. 2000372, 16 mar. 2021.
- GEYSILLENE CASTRO MATOS, M. et al. Quantum mechanical, molecular docking, molecular dynamics, ADMET and antiproliferative activity on *Trypanosoma cruzi* (Y

strain) of chalcone (E)-1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl)-3-(3-nitrophenyl)prop-2-en-1-one derived from a natural product. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 24, n. 8, p. 5052–5069, 2022.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, Z. et al. Gamma-glutamylcysteine synthetase and trypanothione 1 exert high control on the antioxidant system in *Trypanosoma cruzi* contributing to drug resistance and infectivity. **Redox biology**, v. 26, p. 101231, 2019.

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

HAMEED, A. et al. Anti-malarial, cytotoxicity and molecular docking studies of quinolinyl chalcones as potential anti-malarial agent. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 33, n. 7, p. 677–688, 2019.

HARTMANN, A. P. et al. Synthesis and 2D-QSAR studies of neolignan-based diaryl-tetrahydrofuran and -furan analogues with remarkable activity against *Trypanosoma cruzi* and assessment of the trypanothione reductase activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 140, p. 187–199, 2017.

HEARN, B. R. et al. Attenuation of the Reaction of Michael Acceptors with Biologically Important Nucleophiles. **Bioconjugate Chemistry**, v. 32, n. 4, p. 794–800, 21 abr. 2021.

HERRERA-MAYORGA, V. et al. Structure-based virtual screening and in vitro evaluation of new *trypanosoma cruzi* cruzain inhibitors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, p. 1–13, 2019.

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

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

INACIO, J. D. F. et al. Epigallocatechin-O-3-Gallate Inhibits Trypanothione Reductase of *Leishmania infantum*, Causing Alterations in Redox Balance and Leading to Parasite Death. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. March,

p. 1–11, 2021.

IRFAN, R. et al. A Comprehensive Review of Aminochalcones. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 22, 17 nov. 2020.

JACKSON, Y.; WYSSA, B.; CHAPPUIS, F. Tolerance to nifurtimox and benznidazole in adult patients with chronic Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 3, p. 690–696, 1 mar. 2020.

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

KADELA-TOMANEK, M. et al. Lipophilicity , Pharmacokinetic Properties , and Molecular Docking Study on SARS-CoV-2 Target for Betulin Triazole Derivatives with Attached 1 , 4-Quinone. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 6, p. 781, 2021.

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

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

KRATZ, J. M. et al. Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. **Expert review of clinical pharmacology**, v. 11, n. 10, p. 943–957, out. 2018.

KRATZ, J. M. Drug discovery for chagas disease: A viewpoint. **Acta tropica**, v. 198, p. 105107, out. 2019.

LEE, B. Y. et al. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 342–348, abr. 2013.

LI, R. et al. Structure-based design of parasitic protease inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 9, p. 1421–1427, 1996.

LIARGKOVA, T. et al. Simple chalcones and bis-chalcones ethers as possible pleiotropic agents. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 31, n. 2, p. 302–13, 2016.

- LIMA, D. B. et al. Antiparasitic effect of *Dinoponera quadriceps* giant ant venom. **Toxicon**, v. 120, p. 128–132, 2016.
- LOPES, S. P. et al. Trypanocidal mechanism of action and in silico studies of p-coumaric acid derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 23, p. 1–21, 2019.
- LOSADA GALVÁN, I. et al. Benznidazole for the treatment of Chagas disease. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 19, n. 5, p. 547–556, 2021.
- LOSINNO, A. D. et al. Induction of autophagy increases the proteolytic activity of reservosomes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Autophagy**, v. 17, n. 2, p. 439–456, 2021.
- MAAMRI, SARRA; BENAROUS, KHEDIDJA; YOUSFI, M. Identification of 3-Methoxycarpachromene and Masticadienonic Acid as New Target Inhibitors against Trypanothione Reductase from *Leishmania Infantum* Using Molecular Docking and ADMET Prediction. **Molecules**, v. 26, n. 3335, p. 10, 2021.
- MARAVALHO, I. V. S. Síntese de chalconas e seus derivados heterocíclicos com potencial fotofísico. **Universidade de Brasilia, Instituto de Química**, p. 39, 2019.
- MARINHO, E. M. et al. Virtual screening based on molecular docking of possible inhibitors of Covid-19 main protease. **Microbial pathogenesis**, v. 148, p. 104365, nov. 2020.
- MARINHO, M. M. et al. Quantum computational investigations and molecular docking studies on amentoflavone. **Heliyon**, v. 7, n. 1, 2021.
- MATADAMAS-MARTÍNEZ, F. et al. *Leishmania mexicana* Trypanothione Reductase Inhibitors: Computational and Biological Studies. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 18, 4 set. 2019.
- MAYER, R. J.; OFIAL, A. R. Nucleophilicity of Glutathione: A Link to Michael Acceptor Reactivities. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 58, n. 49, p. 17704–17708, 2 dez. 2019.
- MCKINNON, K. M. Flow Cytometry: An Overview. **Current Protocols in Immunology**, v. 120, n. 1, p. 5.1.1-5.1.11, 1 jan. 2018.

MENDES, E. P. et al. Evaluation of novel chalcone-thiosemicarbazones derivatives as potential Anti-leishmania amazonensis agents and its HSA binding studies.

Biomolecules, v. 9, n. 11, p. 1–19, 2019.

MENEZES, R. R. P. P. B. DE. **EFEITO TRIPANOCIDA DO (-) -ALFA-BISABOLOL SOBRE A CEPA Y DE Trypanosoma cruzi**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2017.

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

MIRANDA-SAPLA, M. M. et al. trans-Chalcone modulates Leishmania amazonensis infection in vitro by Nrf2 overexpression affecting iron availability. **European Journal of Pharmacology**, v. 853, n. August 2018, p. 275–288, 2019.

MIRANDA, M. R.; SAYÉ, M. M. Chagas Disease Treatment: From New Therapeutic Targets to Drug Discovery and Repositioning. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 36, p. 6517–6518, 13 dez. 2019.

MONTEIRO, M. E. et al. Synthesis, structure-activity relationship and trypanocidal activity of pyrazole-imidazoline and new pyrazole-tetrahydropyrimidine hybrids as promising chemotherapeutic agents for Chagas disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 182, p. 1–13, 2019.

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

MOREIRA, C. M. DO N. et al. Knockout of the gamma subunit of the AP-1 adaptor complex in the human parasite Trypanosoma cruzi impairs infectivity and differentiation and prevents the maturation and targeting of the major protease cruzipain. **PloS one**, v. 12, n. 7, p. e0179615, 2017.

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

NWAKA, S.; HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 5, n. 11, p. 941–55, nov. 2006.

- O'CONNOR, J. E. et al. Use of rhodamine 123 to investigate alterations in mitochondrial activity in isolated mouse liver mitochondria. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 151, n. 1, p. 568–73, 29 fev. 1988.
- O'SULLIVAN, M. C. et al. Dibenzosuberyl substituted polyamines and analogs of clomipramine as effective inhibitors of trypanothione reductase; molecular docking, and assessment of trypanocidal activities. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 23, n. 5, p. 996–1010, 1 mar. 2015.
- OLIVEIRA, M. M. et al. Spectroscopic characterization and efflux pump modulation of a thiophene curcumin derivative. **Journal of Molecular Structure**, v. 1215, 2020.
- OMS. OMS. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1>. Acesso em: 27 out. 2021.
- ORTALLI, M. et al. Identification of chalcone-based antileishmanial agents targeting trypanothione reductase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 152, p. 527–541, 2018.
- OSMANIYE, D. et al. Synthesis and Anticandidal Activity of New Imidazole-Chalcones. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 23, n. 4, abr. 2018.
- OTERO, E. et al. Synthesis, leishmanicidal and Cytotoxic activity of triclosan-chalcone, triclosan-chromone and triclosan-coumarin hybrids. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 13251–13266, 2014.
- PALOS, I. et al. Repositioning FDA drugs as potential cruzain inhibitors from *Trypanosoma cruzi*: Virtual screening, in vitro and in vivo studies. **Molecules**, v. 22, n. 6, 2017.
- PAVELESCU, L. A. On reactive oxygen species measurement in living systems. **Journal of medicine and life**, v. 8 Spec Iss, p. 38–42, 2015.
- PEREIRA, P. M. L. et al. In vitro evaluation of antitrypanosomal activity and molecular docking of benzoylthioureas. **Parasitology International**, v. 80, p. 102225, fev. 2021.
- PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet (London, England)**, v. 391, n. 10115, p. 82–94, 2018a.
- PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p.

82–94, 6 jan. 2018b.

PEREZ-MOLINA, J. A et al. Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. {[Review]} [45 refs]. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 6, p. 1139–1147, 2009.

PETRAVICIUS, P. O. et al. Mapping benznidazole resistance in trypanosomatids and exploring evolutionary histories of nitroreductases and ABCG transporter protein sequences. **Acta tropica**, v. 200, p. 105161, dez. 2019.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, out. 2004.

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

PITA, S.; PASCUTTI, P. Therapeutic Targets in Chagas' Disease: a Focus on Trypanothione Reductase. **Revista Virtual de Química**, v. 3, 1 out. 2011.

PONCE, N. E. et al. Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas disease, modulates interleukin-6-induced STAT3 phosphorylation via gp130 cleavage in different host cells. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1832, n. 3, p. 485–94, mar. 2013.

PRETI, D. et al. Design, synthesis, in vitro antiproliferative activity and apoptosis-inducing studies of 1-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-3-(2'-alkoxycarbonylindolyl)-2-propen-1-one derivatives obtained by a molecular hybridisation approach. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 1225–1238, 2018.

PUNUKOLLU, G. et al. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. **International journal of cardiology**, v. 115, n. 3, p. 279–83, 14 fev. 2007.

RADISIC, M. V; REPETTO, S. A. American trypanosomiasis (Chagas disease) in solid organ transplantation. **Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society**, v. 22, n. 6, p. e13429, dez. 2020.

RAJNEESH et al. Detection of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cyanobacteria Using the Oxidant-sensing Probe 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (DCFH-DA). **Bio-protocol**, v. 7, n. 17, p. e2545, 5 set. 2017.

RAMESH, D. et al. Indole chalcones: Design, synthesis, in vitro and in silico evaluation against *Mycobacterium tuberculosis*. **European journal of medicinal chemistry**, v. 198, p. 112358, 15 jul. 2020.

RAZMI, A. et al. Evaluation of anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of novel chalcone derivatives. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. SUPPL., p. 149–155, 2013.

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

REZENDE-JÚNIOR, L. M. et al. Chalcones Isolated from *Arrabidaea brachypoda* Flowers as Inhibitors of NorA and MepA Multidrug Efflux Pumps of *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 6, 20 jun. 2020.

RIVERA, G. et al. New Therapeutic Targets for Drug Design Against *Trypanosoma cruzi*, Advances and Perspectives. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 25, p. 3286–3293, 2009.

ROCHA, D. A. et al. Synthesis and structure-activity relationship studies of cruzain and rhodesain inhibitors. **European journal of medicinal chemistry**, v. 157, p. 1426–1459, 5 set. 2018.

RODRIGUES, D. F. et al. Trypanocidal Activity of Flavokawin B, a Component of *Polygonum ferrugineum* Wedd. **Planta medica**, v. 83, n. 3–04, p. 239–244, fev. 2017.

RODRÍGUEZ-MORALES, O. et al. Experimental Vaccines against Chagas Disease: A Journey through History. **Journal of immunology research**, v. 2015, p. 489758, 2015.

SALMAZZO, G. R. et al. Chemical composition and antiproliferative, antioxidant and trypanocidal activities of the fruits from *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg (Myrtaceae). **Natural Product Research**, v. 35, n. 5, p. 853–857, 2021.

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

SANTANA, K. H. et al. Epidemiology of Chagas disease in pregnant women and

congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in the Americas: systematic review and meta-analysis. **Tropical Medicine & International Health**, v. 25, n. 7, p. 752–763, 26 jul. 2020.

SANTOS, M.; MOREIRA, R. Michael Acceptors as Cysteine Protease Inhibitors. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 10, p. 1040–1050, 1 out. 2007.

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

SARAVANAMUTHU, A. et al. Two interacting binding sites for quinacrine derivatives in the active site of trypanothione reductase: a template for drug design. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 28, p. 29493–500, 9 jul. 2004.

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

SHAIK, A. B. et al. Antiproliferative Activities. **Molecules**, v. 25, p. 3188–3203, 2020.

SHARMA, N. et al. Design, economical synthesis and antiplasmodial evaluation of vanillin derived allylated chalcones and their marked synergism with artemisinin against chloroquine resistant strains of *Plasmodium falciparum*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 79, p. 350–368, 2014.

SHITYAKOV, S.; FÖRSTER, C. In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood–brain barrier choline transporter. **Advances and applications in bioinformatics and chemistry: AABC**, v. 7, p. 23–36, 2014.

SILVA-JÚNIOR, E. F. et al. Design, synthesis, molecular docking and biological evaluation of thiophen-2-iminothiazolidine derivatives for use against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 18, p. 4228–4240, 2016.

SLAWIK, C. et al. Glutathione Adduct Patterns of Michael-Acceptor Carbonyls. **Environmental science & technology**, v. 51, n. 7, p. 4018–4026, 2017.

SÖKMEN, M.; AKRAM KHAN, M. The antioxidant activity of some curcuminoids and chalcones. **Inflammopharmacology**, v. 24, n. 2–3, p. 81–6, jun. 2016.

- SOOKNUAL, P. et al. Synthesis and neuroprotective effects of novel chalcone-triazole hybrids. **Bioorganic chemistry**, v. 105, p. 104384, 2020.
- SORIANO-ARANDES, A. et al. Control and management of congenital Chagas disease in Europe and other non-endemic countries: current policies and practices. **Tropical medicine & international health : TM & IH**, v. 21, n. 5, p. 590–6, maio 2016.
- SOUSA-BATISTA, A. DE J. et al. New chalcone compound as a promising antileishmanial drug for an old neglected disease: Biological evaluation using radiolabelled biodistribution. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 13, p. 139–142, 2018.
- SOUSA, P. L. et al. Betulinic acid induces cell death by necrosis in *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 174, n. November 2016, p. 72–75, 2017.
- SOUZA, J. M. et al. Licochalcone a Exhibits Leishmanicidal Activity in vitro and in Experimental Model of Leishmania (*Leishmania*) Infantum. **Frontiers in veterinary science**, v. 7, p. 527, 2020.
- SOUZA, R. L. et al. Licochalcone A induces morphological and biochemical alterations in *Schistosoma mansoni* adult worms. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 96, p. 64–71, dez. 2017.
- TESSAROLO, L. D. et al. Nanoencapsulation of benznidazole in calcium carbonate increases its selectivity to *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 145, n. 9, p. 1191–1198, 2018.
- TETAUD, E. et al. Molecular characterisation of mitochondrial and cytosolic trypanothione-dependent tryparedoxin peroxidases in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 116, n. 2, p. 171–83, 3 set. 2001.
- THE LANCET. Chagas disease: still a neglected emergency. **Lancet (London, England)**, v. 394, n. 10209, p. 1592, 2019.
- TROTT, O.; OLSON, A. Autodock vina: improving the speed and accuracy of docking. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010.
- TURCANO, L. et al. Spiro-containing derivatives show antiparasitic activity against *trypanosoma brucei* through inhibition of the trypanothione reductase enzyme. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 5, p. 1–17, 2020.

- ULIASSI, E. et al. Crassiflorone derivatives that inhibit *Trypanosoma brucei* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (TbGAPDH) and *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase (TcTR) and display trypanocidal activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 141, p. 138–148, 2017.
- UŠJAK, D. et al. Antimicrobial activity of novel chalcones and modulation of virulence factors in hospital strains of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbial pathogenesis**, v. 131, p. 186–196, jun. 2019.
- VAZQUEZ-JIMENEZ, L. K. K. et al. Analysis of the effect of methyl 2-acetamide-3-methylquinoxaline-7-carboxylate 1,4-di-N-oxide on the relative expression of the trypanothione reductase gene in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 32, n. 3 Special, p. 1447–1452, maio 2019.
- VÁZQUEZ, K. et al. Trypanothione Reductase: A Target for the Development of Anti-*Trypanosoma cruzi* Drugs. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 11, p. 939–946, 2017.
- VELASCO, A.; MORILLO, C. A. Chagas heart disease: A contemporary review. **Journal of Nuclear Cardiology**, v. 27, n. 2, p. 445–451, 18 abr. 2020.
- VIOTTI, R. et al. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 7, n. 2, p. 157–63, mar. 2009.
- VISUALIZER, D. S. **v4. 0.100. 13345**, 2005. (Nota técnica).
- VITAL, D.; ARRIBAS, M.; TROSSINI, G. Molecular Modeling and Docking Application to Evaluate Cruzain Inhibitory Activity by Chalcones and Hydrazides. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 11, n. 3, p. 249–255, 2013.
- WILKINSON, S. R. et al. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 13, p. 5022–7, 1 abr. 2008.
- YADAV, V. R. et al. The role of chalcones in suppression of NF- κ B-mediated inflammation and cancer. **International immunopharmacology**, v. 11, n. 3, p. 295–309, mar. 2011.
- ZAIDEL, E. J. et al. COVID-19: Implications for People with Chagas Disease. **Global**

heart, v. 15, n. 1, p. 69, 13 out. 2020.

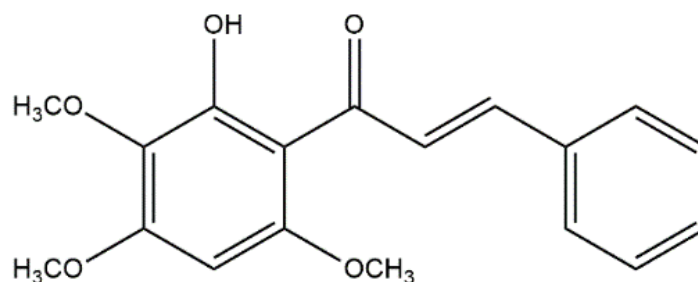
ZHEOAT, A. M. et al. Antitrypanosomal and antileishmanial activity of chalcones and flavanones from polygonum salicifolium. **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 1–9, 2021.

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

ZIMMERMANN, M.; MEYER, N. Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 740, p. 57–63, 2011.

APÊNDICE

APÊNDICE A – DADOS DE CARACTERIZAÇÃO DE Ch-C: (*E*)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil) -3-fenilprop-2-en-1-ona



Sólido amarelo (Rendimento: 38%), ponto de fusão: 135,4 – 136,1 °C; FT-IR (KBr, cm^{-1}): 1634, 1600, 1588, 1575, 1480, 1167. ^1H RMN (CDCl_3 , ppm): 3,96 (s, MeO-3'); 3,96 (s, MeO-4'); 3,85 (s, MeO-6'); 6,01 (s, H-5'); 7,42 (m, H-4); 7,43 (m, H-3/5); 7,60 (dd, H-2/6, $J=7,53; 1,77$ Hz); 7,79 (d, H_α , $J=15,6$ Hz); 7,88 (d, H_β , $J=15,6$ Hz). ^{13}C RMN (CDCl_3 , ppm): 193,5 (C=O); 60,9 (MeO-3'); 56,3 (MeO-4'); 56,2 (MeO-6'); 107,1 (C-1'); 158,7 (C-2'); 131,2 (C-3'); 159,5 (C-4'); 87,3 (C-5'); 158,8 (C-6'); 135,7 (C-1); 128,6 (C-2/6); 129,1 (C-3/5); 130,3 (C-4); 127,7 (C α); 142,8 (C β). EM: m/z (M^+ . 314), calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_5/314$.

Figura A-1 -Espectro de RMN 1 H (CDCl_3 , 500 MHz) da chalcona (*E*)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil) -3-fenilprop-2-en-1-ona

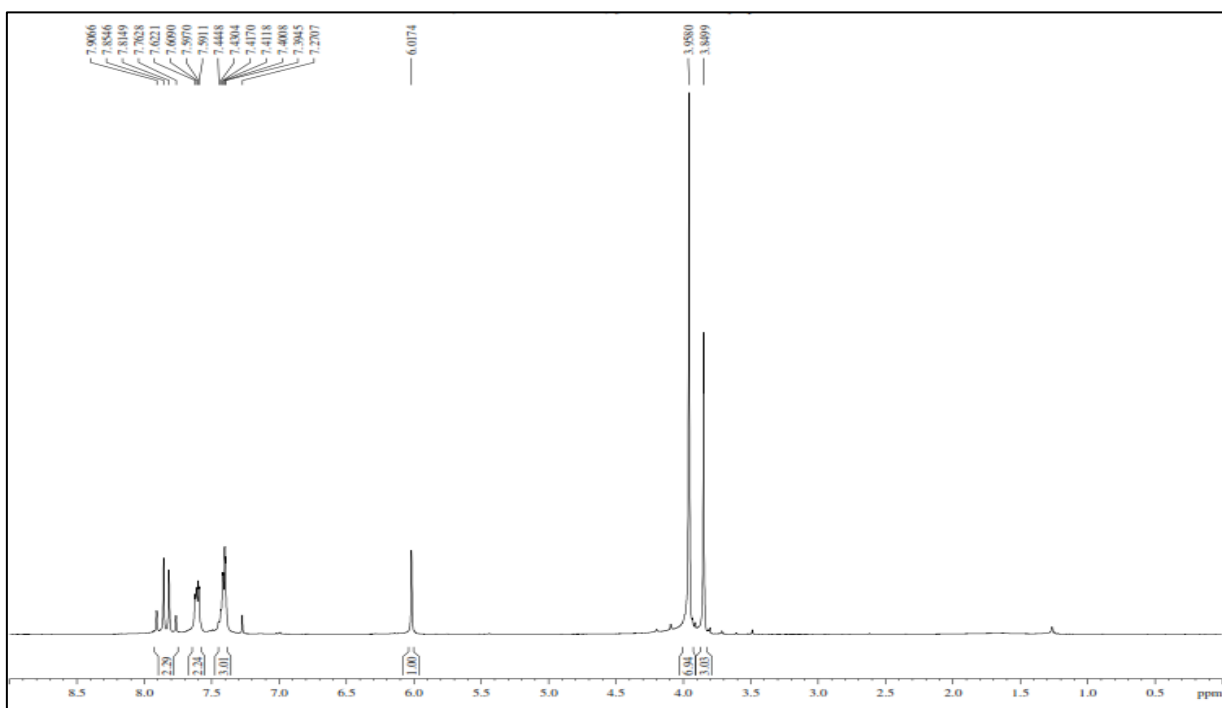


Figura A-2 - Expansão do espectro de RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz) da chalcona (*E*)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona

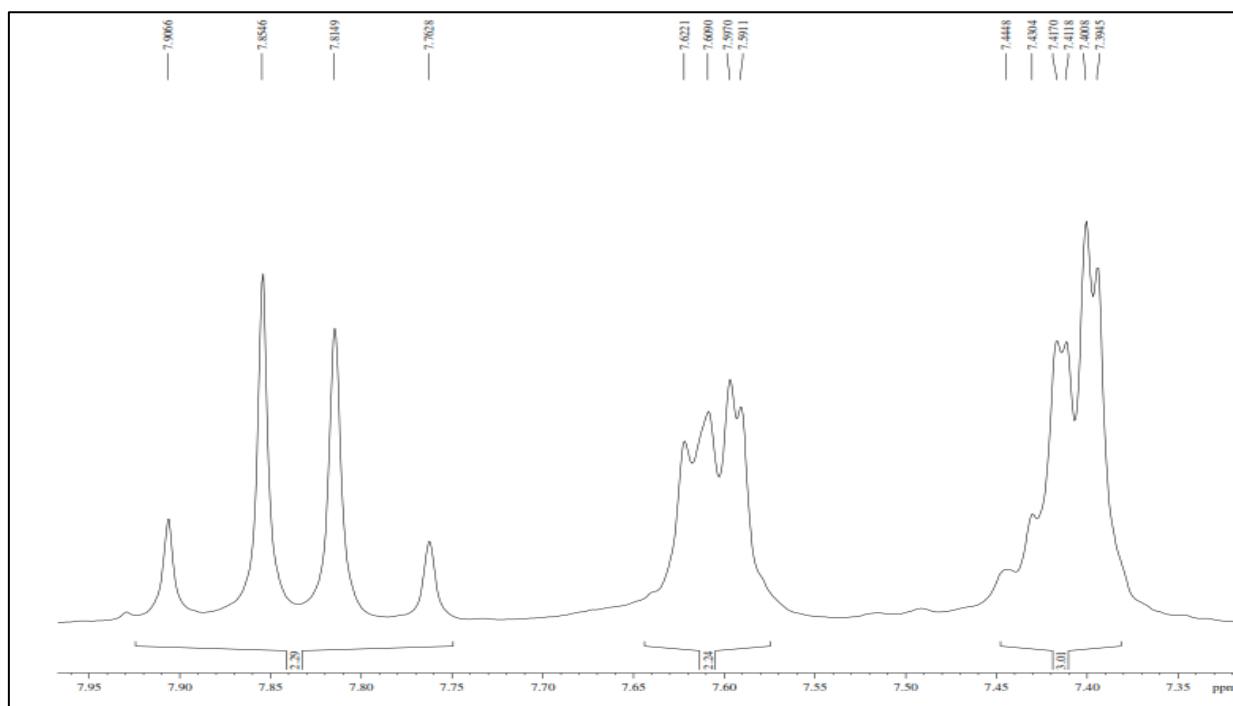


Figura A-3 - Espectro de RMN¹³C (CDCl₃, 125 MHz) da chalcona (*E*)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona

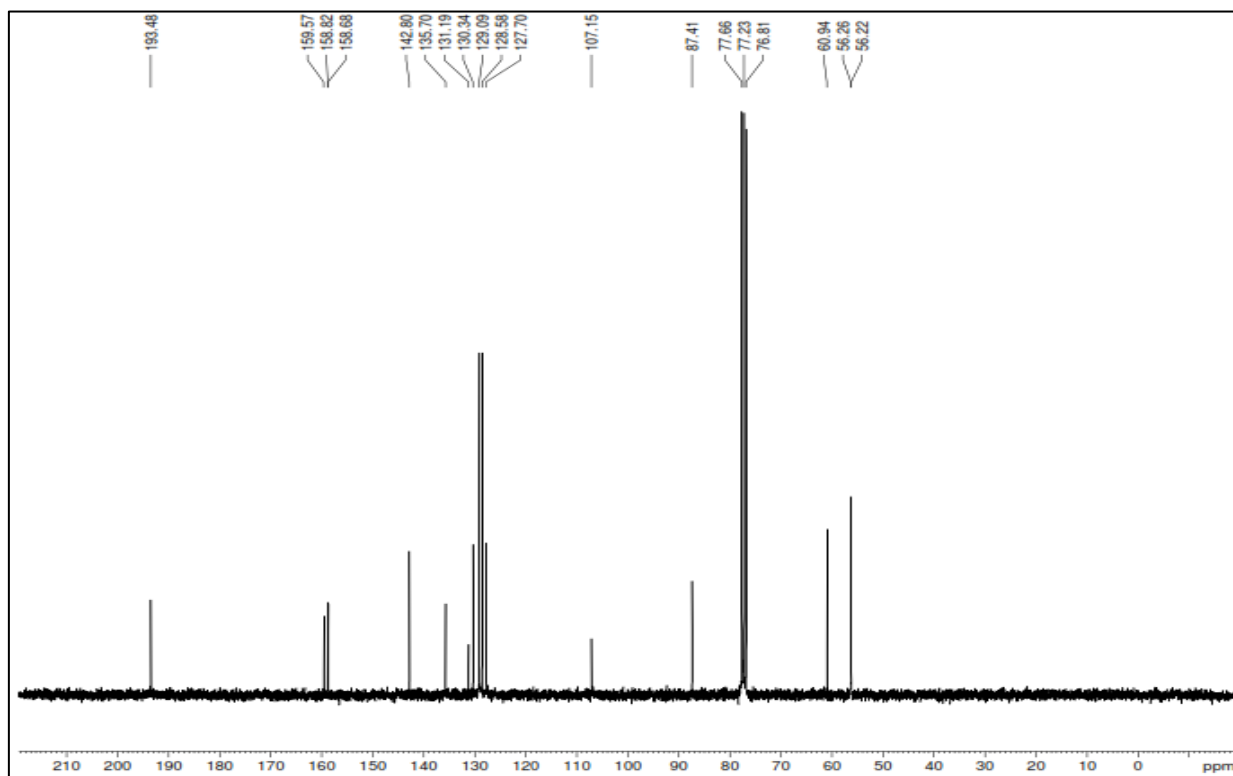
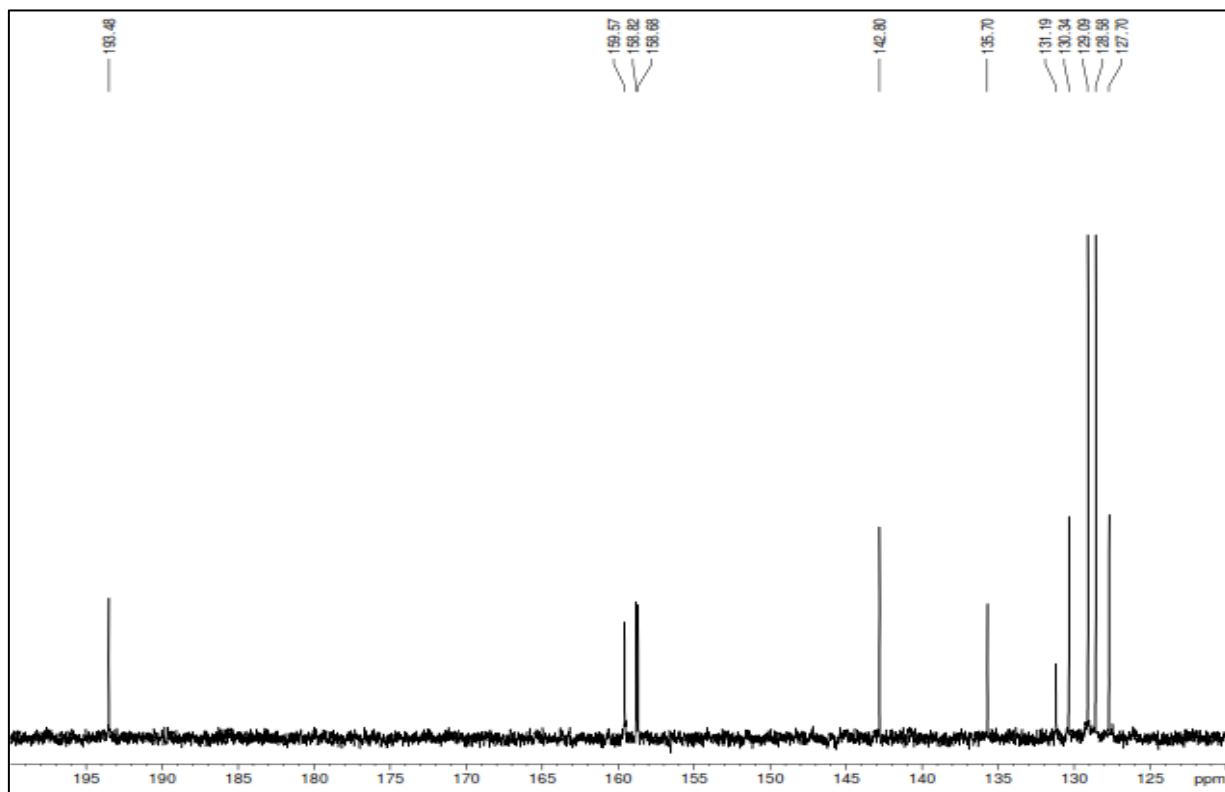
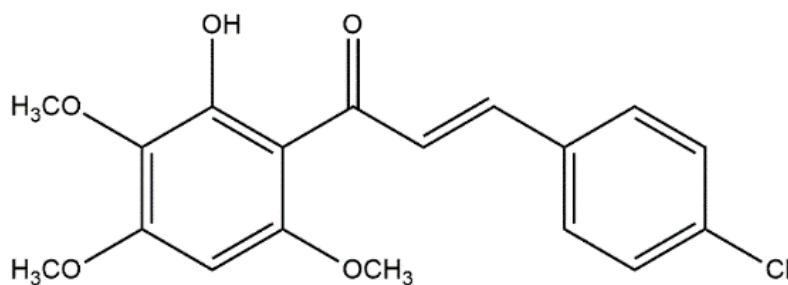


Figura A-4 - Expansão do espectro de RMN¹³C (CDCl₃, 125 MHz) da chalcona (*E*)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona



APÊNDICE B – DADOS DE CARACTERIZAÇÃO DE Ch-4Cl: (*E*)-3-(4-clorofenil)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona



Sólido amarelo (Rendimento: 74,68 %), ponto de fusão: 94,3 – 96,8 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , ppm): 3,96 (s, MeO-3'); 3,96 (s, MeO-4'); 3,94 (s, MeO-6'); 6,02 (s, H-5'); 7,38 (d, $J = 8,35$, H-2/6); 7,53 (d, $J = 8,35$, H-3/5); 7,79 (d, H_α , $J = 15,6$ Hz); 7,83 (d, H_β , $J = 15,6$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3 , ppm): 193,5 (C=O); 60,9 (MeO-3'); 60,9 (MeO-4'); 60,9 (MeO-6'); 106,5 (C-1'); 159,0 (C-2'); 129,7 (C-3'); 159,6 (C-4'); 87,4 (C-5'); 159,2 (C-6'); 134,2 (C-1); 131,2 (C-2/6); 131,7 (C-3/5); 136,2 (C-4); 128,2 (C α); 141,3 (C β). EM m/z (M^+ . 348), calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{ClO}_5/348$.

Figura B-1 - Espectro de RMN 1 H (CDCl_3 , 500 MHz) da chalcona (*E*)-3-(4-clorofenil)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona

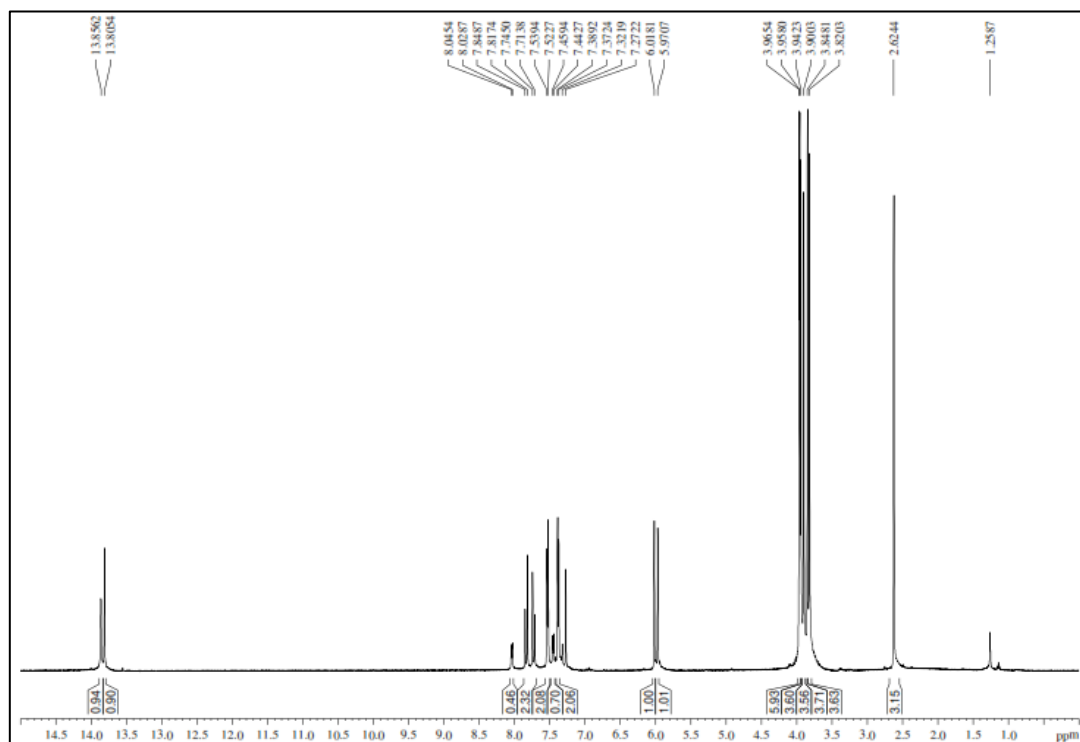


Figura B-2 - Expansão do espectro de RMN¹ H (CDCl₃, 500 MHz) da chalcona (*E*)-3-(4-clorofenil)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona

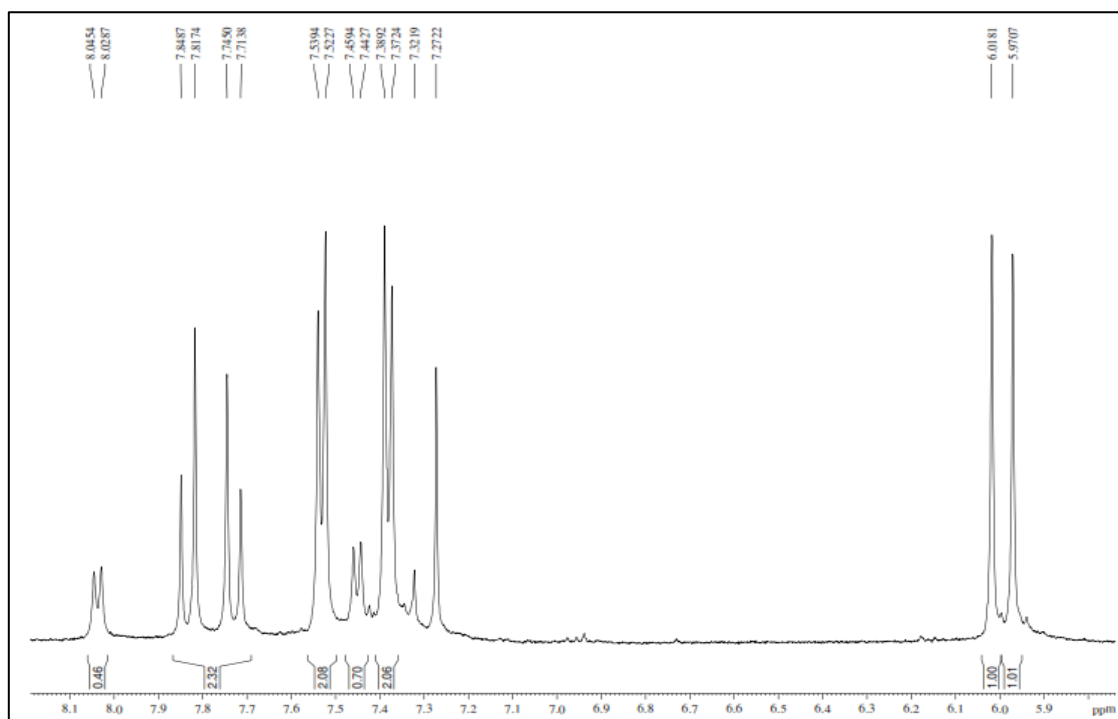


Figura B-3 - Espectro de RMN¹³ C (CDCl₃, 125 MHz) da chalcona (*E*)-3-(4-clorofenil)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona

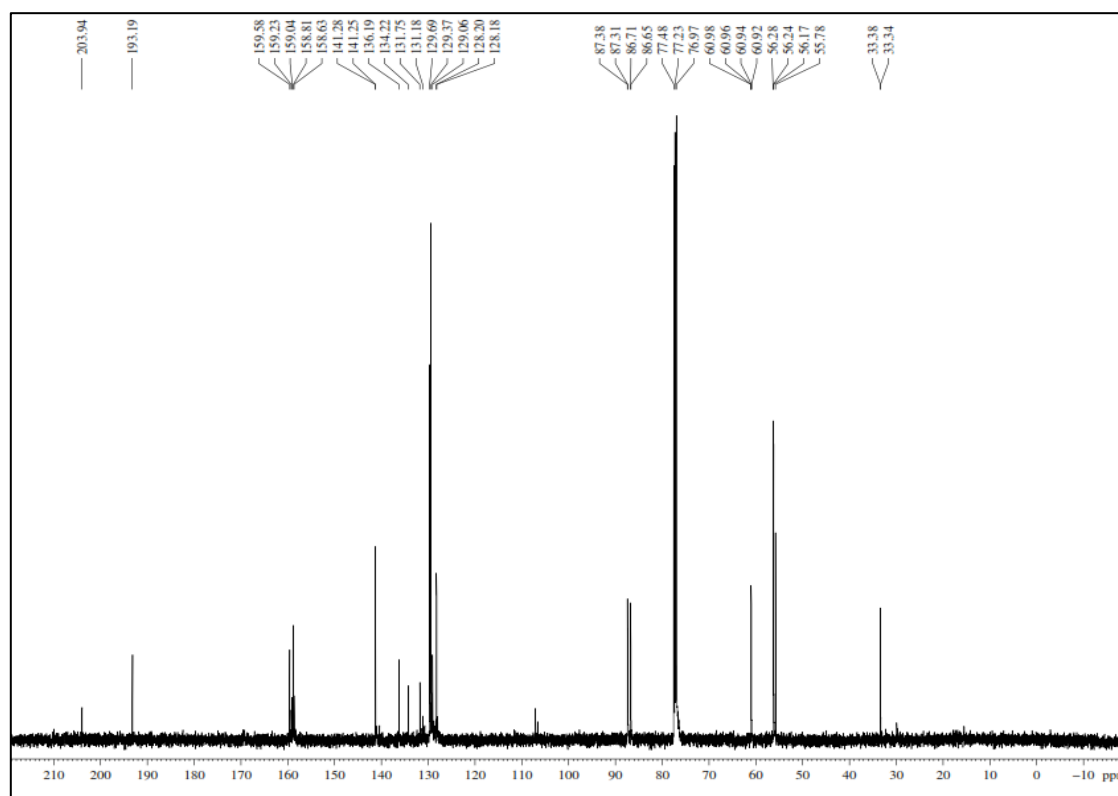
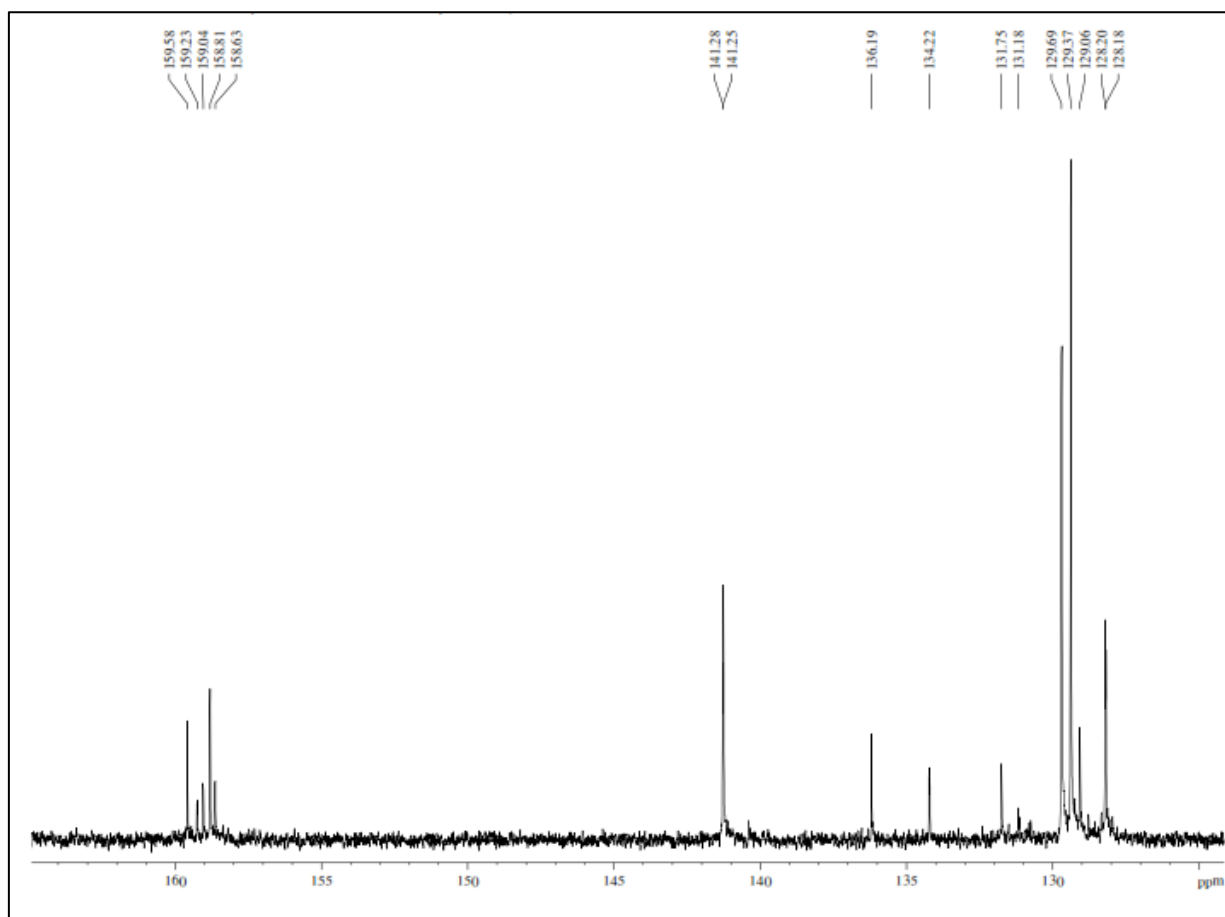
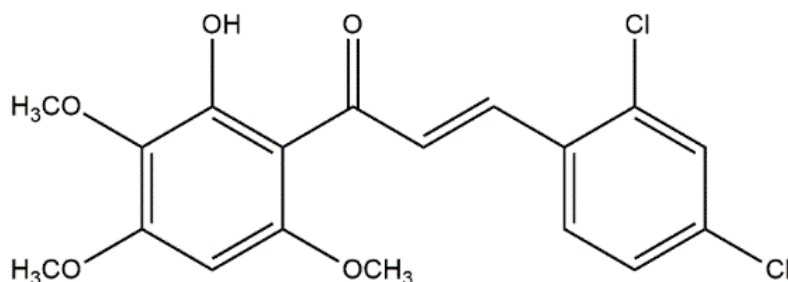


Figura B-4 - Expansão do espectro de RMN¹³C (CDCl₃, 125 MHz) da chalcona (*E*)-3-(4-clorofenil)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona



APÊNDICE C – DADOS DE CARACTERIZAÇÃO DE Ch-DiCl: (*E*)-3-(2,4-diclorofenil)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona



Sólido amarelo (Rendimento: 73,93 %), ponto de fusão 164,3 – 164,8 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , ppm): 3,98 (s, MeO-3'); 3,94 (s, MeO-4'); 3,85 (s, MeO-6'); 6,01 (s, H-5'); 7,62 (d, $J = 8,5$, H-3); 7,46 (d, $J = 1,5$, H-5); 7,30 (d, $J = 1,5$, H-6); 7,80 (d, $H\alpha$, $J = 15,5$ Hz); 8,06 (d, $H\beta$, $J = 15,5$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3 , ppm): 192,6 (C=O); 60,7 (MeO-3'); 56,1 (MeO-4'); 56,1 (MeO-6'); 106,8 (C-1'); 158,7 (C-2'); 130,4 (C-3'); 159,4 (C-4'); 87,1 (C-5'); 158,6 (C-6'); 134,2 (C-1); 136,8 (C-2); 135,5 (C-3); 136,0 (C-4); 131,7 (C-5); 128,5 (C-6); 127,5 (C α); 130,1 (C β). EM m/z (M^+ . 383), calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{O}_5/383$.

Figura C-1 - Espectro de RMN 1 H (CDCl_3 , 500 MHz) da chalcona (*E*)-3-(2,4-diclorofenil)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona

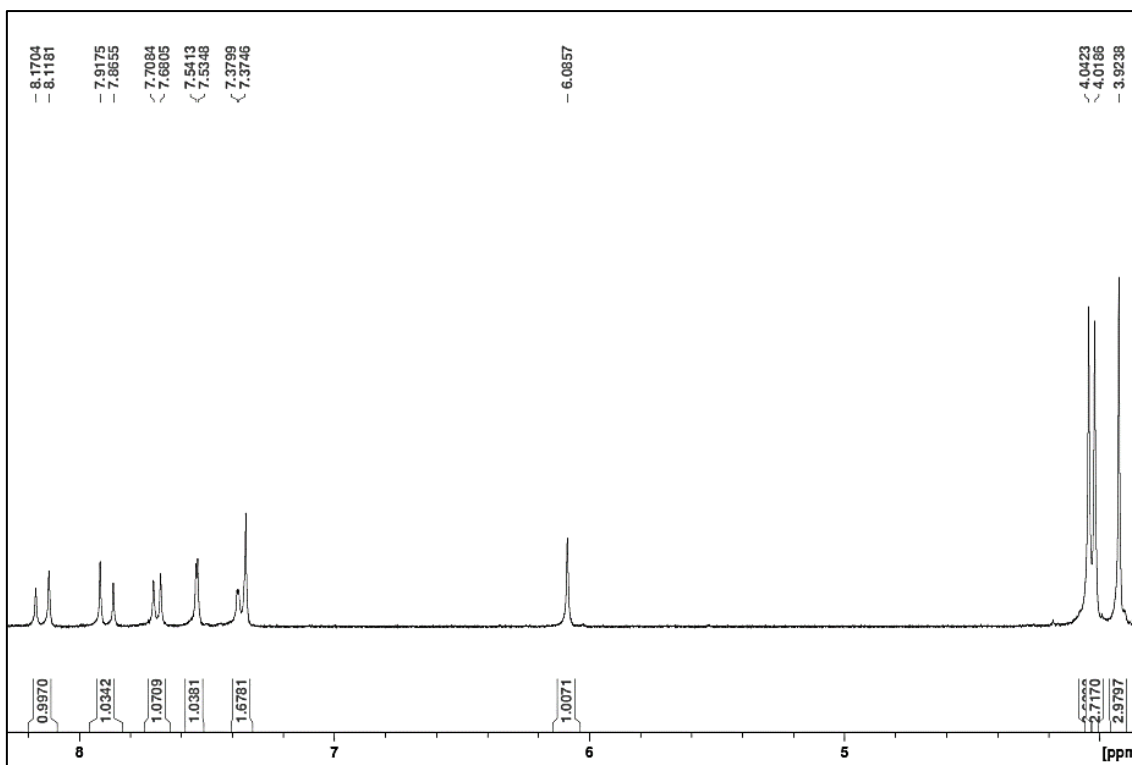


Figura C-2 - Expansão do espectro de RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz) da chalcona (*E*)-3-(2,4-diclorofenil)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona

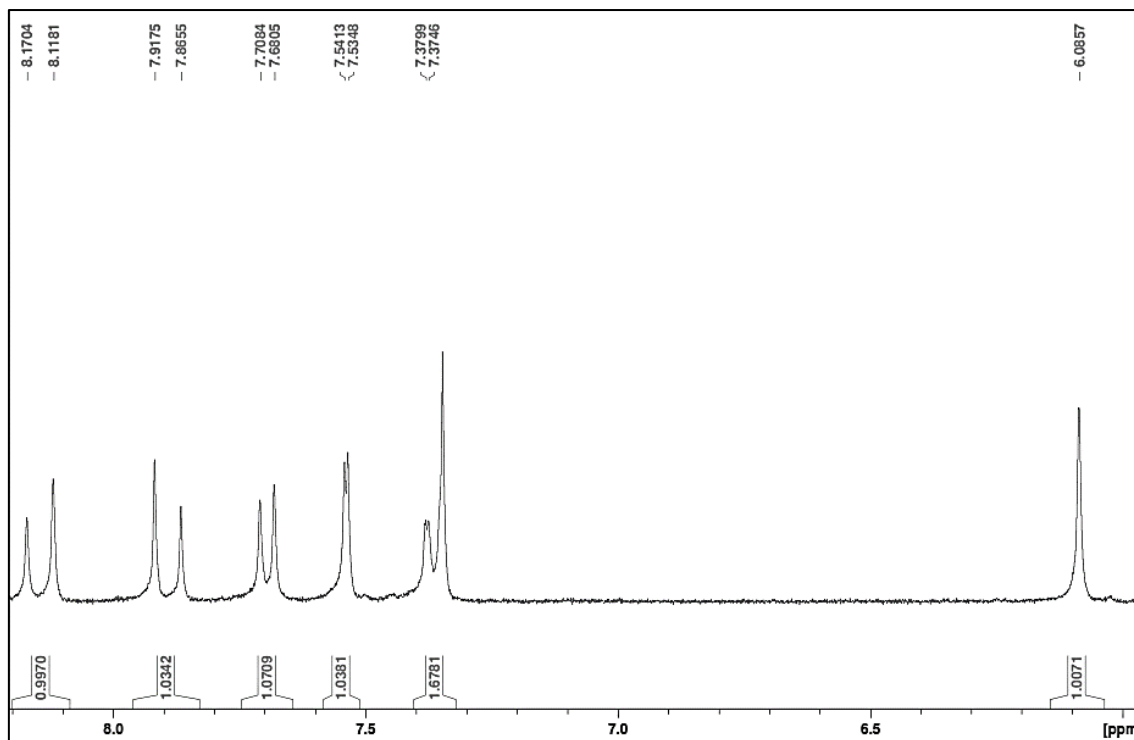


Figura C-3 - Espectro de RMN¹³C (CDCl₃, 125 MHz) da chalcona (*E*)-3-(2,4-diclorofenil)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona

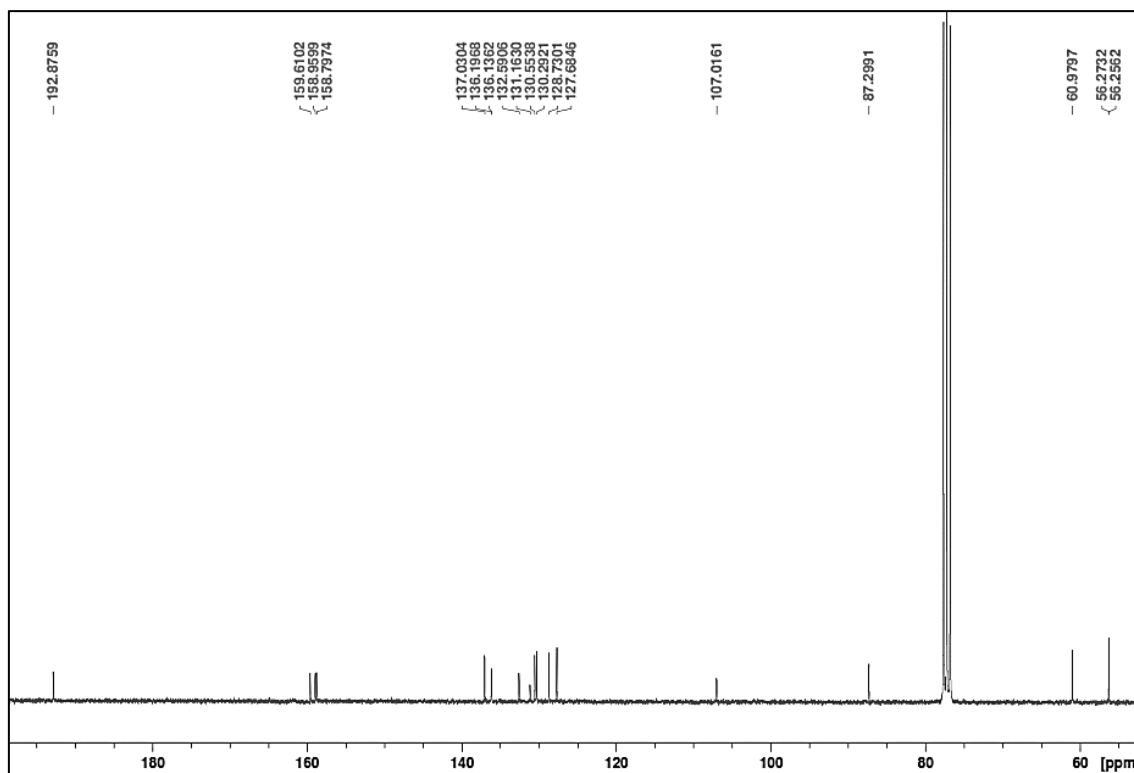


Figura C-4 - Expansão do espectro de RMN¹³C (CDCl₃, 125 MHz) da chalcona (*E*)-3-(2,4-diclorofenil)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona

