



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

**JOÃO VICTOR SERRA NUNES**

ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DA CHALCONA (E)-1-(4-AMINOFENIL)-3-(2,2-DIFLUOROBENZO[D][1,3]DIOXOL-5-IL)PROP-2-EN-1-ONA EM  
*Trypanosoma cruzi* : UMA ABORDAGEM *IN SILICO* E *IN VITRO*

**FORTALEZA**

**2024**

JOÃO VICTOR SERRA NUNES

ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DA CHALCONA (E)-1-(4-AMINOFENIL)-3-(2,2-DIFLUOROBENZO[D][1,3]DIOXOL-5-IL)PROP-2-EN-1-ONA EM  
*Trypanosoma cruzi*: UMA ABORDAGEM *IN SILICO* E *IN VITRO*

Tese de doutorado 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 Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia para a saúde.

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

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Márcia Machado Marinho

FORTALEZA

2024

# FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

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

---

S496a Serra Nunes, João Victor.  
ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DA CHALCONA (E)-1-(4-AMINOFENIL)-3-(2,2-DIFLUOROBENZO[D][1,3]DIOXOL-5-IL)PROP-2-EN-1-ONA EM *Trypanosoma cruzi* : UMA ABORDAGEM IN SILICO E IN VITRO / João Victor Serra Nunes. – 2024.  
97 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2024.  
Orientação: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.  
Coorientação: Profa. Dra. Márcia Machado Marinho.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Chalconas. 3. Dinâmica Molecular. 4. Cruzaina. 5. ADMET. I. Título.  
CDD 615

---

JOÃO VICTOR SERRA NUNES

ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DA CHALCONA (E)-1-(4-AMINOFENIL)-3-(2,2-DIFLUOROBENZO[D][1,3]DIOXOL-5-IL)PROP-2-EN-1-ONA EM  
*Trypanosoma cruzi*: UMA ABORDAGEM *IN SILICO* E *IN VITRO*

Tese de doutorado 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)

---

Prof. Dr. Emmanuel Silva Marinho  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof. Dr. Aluisio Marques da Fonseca  
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

---

Profª. Dra. Clarissa Perdigão Mello  
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

---

Profª. Dra. Márcia Machado Marinho  
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

## RESUMO

A doença de Chagas (DC), endêmica em 20 países latino-americanos, afeta 7 milhões de pessoas no mundo, causa aproximadamente 14.000 mortes anuais e coloca mais de 75 milhões de pessoas em risco de infecção. O único tratamento disponível, com Benzonidazol, apresenta diversas limitações e contraindicações, tornando-se urgente o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Neste estudo, é descrita a síntese, caracterização e efeitos inibitórios da chalcona (*E*)-1-(4-aminophenyl)-3-(2,2-difluorbenzol[*d*][1,3]dioxol-5-yl)prop-2-en-1-one (DF) contra formas de *Trypanosoma cruzi* da cepa Y. A estrutura molecular desse composto foi caracterizada por espectrofotometria e citometria de fluxo e seu potencial contra *T. cruzi* foi avaliada através de ensaios *in vitro* e *in silico*. Os resultados do presente estudo mostraram que a chalcona apresentou efeito tripanocida e reduzida toxicidade quando comparada ao benzonidazol (referência). Além disso, também induziu alterações morfológicas como extravasamento celular e formação de poros na superfície do parasito, observados via microscopia eletrônica de varredura e corroborados pelos resultados da citometria de fluxo, via marcação com 7-AAD, indicativo de necrose, com melhor seletividade quando comparada ao benzonidazol. Os resultados da modelagem mostraram uma grande afinidade do ligante da chalcona com a enzima Cruzaína, crucial para o metabolismo e ciclo de vida do *T. cruzi*, formando um complexo estável interagindo no mesmo sítio do inibidor KB2 (ligante co-cristalizado na enzima Cruzaína). O estudo ADMET demonstrou que a chalcona possui propriedades de tamanho, lipofilicidade e polaridade que favorecem sua permeabilidade na membrana. Estes resultados são relevantes, uma vez que chalconas têm sido descritas como moléculas com potencial de inibição de crescimento ou de causar a morte de *T. cruzi*. Em conclusão, a chalcona (*E*)-1-(4-aminophenyl)-3-(2,2-difluorbenzol[*d*][1,3]dioxol-5-yl)prop-2-en-1-one (DF) aumenta as perspectivas para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*; Chalconas; Dinâmica Molecular; Cruzaína; ADMET.

## ABSTRACT

Chagas disease (CD), endemic in 20 Latin American countries, affects 7 million people worldwide, causes approximately 14,000 deaths annually, and puts more than 75 million people at risk of infection. The only available treatment, with Benzonidazole, has various limitations and contraindications, making the development of new therapeutic agents urgent. This study describes the synthesis, characterization, and inhibitory effects of the chalcone (E)-1-(4-aminophenyl)-3-(2,2-difluorobenz[d][1,3]dioxol-5-yl)prop-2-en-1-one (DF) against forms of *Trypanosoma cruzi* of the Y strain. The molecular structure of this compound was characterized by spectrophotometry and flow cytometry, and its potential against *T. cruzi* was evaluated through in vitro and in silico assays. The results of this study showed that the chalcone exhibited trypanocidal effects and reduced toxicity compared to Benzonidazole (reference). Furthermore, it induced morphological changes such as cell leakage and pore formation on the parasite surface, observed via scanning electron microscopy and corroborated by flow cytometry results using 7-AAD staining, indicative of necrosis, with better selectivity compared to Benzonidazole. Modeling results showed a high affinity of the chalcone ligand with the enzyme Cruzaine, crucial for the metabolism and life cycle of *T. cruzi*, forming a stable complex interacting at the same site as the inhibitor KB2 (ligand co-crystallized in the enzyme Cruzaine). The ADMET study demonstrated that the chalcone possesses size, lipophilicity, and polarity properties that favor its membrane permeability. These results are relevant since chalcones have been described as molecules with potential to inhibit growth or cause death of *T. cruzi*. In conclusion, the chalcone (E)-1-(4-aminophenyl)-3-(2,2-difluorobenz[d][1,3]dioxol-5-yl)prop-2-en-1-one (DF) enhances prospects for the development of new therapeutic agents..

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; Chalcones; Molecular Dynamics; Cruzain; ADMET.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	14
Figura 2 – Esqueleto básico das chalconas. ....	20
Figura 3 – Preparação da chalcona DF .....	26
Figura 4 – Equações de caracterização da chalcona .....	29
Figura 5 - Estimativa quantitativa de fármacos baseada na otimização multiparamétrica (MPO) .....	29
Figura 6 – Valores Constantes de Inibição.....	31
Figura 7 - Protocolo de tratamento das células LLC-MK2 com chalcona DF e Benzonidazol .....	33
Figura 8 - Protocolo de avaliação de viabilidade celular – Ensaio MTT.....	34
Figura 9 - Protocolo ensaio de redução de resazurina. ....	35
Figura 10 - Ensaio avaliação efeito tripanocida de chalcona DF .....	36
Figura 11 - Protocolo de marcação DCFH <sub>2</sub> -DA e avaliação de acúmulo citoplasmático de ROS.....	38
Tabela 1 - Dados RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz) e de <sup>13</sup> C (150 MHz) in (DMSO, δ, ppm, J/Hz) .....	41
Figura 12 - Superfície de Energia Potencial (SEP) e estrutura tridimensional otimizada .....	43
Figura 13 - Orbitais Moleculares Fronteiriços HOMO e LUMO da chalcona DF.....	44
Tabela 2 - Descritores globais de reatividade quântica .....	46
Figura 14 - Isosuperfícies das funções de Fukui Eletrônica da chalcona DF .....	47
Tabela 3 - Funções de Fukui Condensadas para chalcona DF. ....	48
Figura 15 - Potencial Eletrostático Molecular (MEP) da chalcona DF. ....	49
Tabela 4 - Propriedades físico-químicas da chalcona DF.....	50

Figura 16 - Análise topológica da chalcona DF. ....	51
Figura 17 - Radar MPO e Análise da relação Estrutura-Atividade da chalcona DF. ....	52
Tabela 5 - Propriedades farmacocinéticas.....	53
Figura 18 - Mapa de relação sensibilidade e especificidade. ....	54
Tabela 6 - Valores de energia livre de ligação e RMSD.....	55
Figura 19 - Sítio de ligação dos ligantes chalcona DF, Benznidazol e KB2 com a enzima Cruzaína. ....	57
Figura 20 - Determinação do RMSD do complexo Chalcona-Cruzaína. ....	58
Figura 21 - Citotoxicidade da chalcona DF em células LLC-MK2.....	59
Tabela 7 - Dados de toxicidade celular – chalcona DF e Benzonidazol.....	60
Figura 22 - Efeito antiproliferativo da chalcona DF em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> . .....	61
Figura 23 - Efeito da chalcona DF em formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> . ....	61
Figura 24 - Morte celular induzida por chalcona DF.....	62
Figura 25 - Produção de ROS no citoplasma induzida por chalcona DF. ....	63
Figura 26 - Efeito da chalcona DF no potencial transmembrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )...64	
Figura 27 - Análise morfológica de epimastigotas por MEV.....	65

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>7-AAD</b>	<b>7-aminoactinomicina</b>
<b>AxPE</b>	<b>Anexina V conjugada com Ficoeritrina</b>
<b>BOD</b>	<b>Demanda Bioquímica de Oxigênio</b>
<b>Bz</b>	<b>Benzonidazol</b>
<b>DC</b>	<b>Doença de Chagas</b>
<b>DCFH<sub>2</sub>-DA</b>	<b>Diacetato de 2',7'-Diclorofluoresceína</b>
<b>DF</b>	<b>Chalcona (E)-1-(4-aminophenyl)-3-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)prop-2-en-1-one</b>
<b>HOMO</b>	<b>Orbital Molecular Ocupado Mais Alto</b>
<b>KB2</b>	<b>Ligante co-cristalizado na enzima Cruzaína de <i>T. cruzi</i></b>
<b>LUMO</b>	<b>Orbital Molecular Desocupado Mais Baixo</b>
<b>MEP</b>	<b>Potencial Eletrostático Molecular</b>
<b>MEV</b>	<b>Microscopia Eletrônica de Varredura</b>
<b>MPO</b>	<b>Otimização Multiparamétrica</b>
<b>MTT</b>	<b>Ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio</b>
<b>P<sub>app</sub></b>	<b>Permeabilidade Aparente Passiva</b>
<b>RFI</b>	<b>Intensidade Relativa de Fluorescência</b>
<b>RMSD</b>	<b>Desvio Quadrático Médio</b>
<b>ROS</b>	<b>Espécies Reativas de Oxigênio</b>
<b>SeI</b>	<b>Índice de Seletividade</b>
<b>TcCr</b>	<b>Cruzaína de <i>Trypanosoma cruzi</i></b>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO, RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1. Histórico e epidemiologia da doença de Chagas.....</b>	<b>122</b>
<b>1.2. Ciclo biológico e fisiopatologia da Doença de Chagas.....</b>	<b>13</b>
<b>1.3. Tratamento farmacológico da doença de Chagas.....</b>	<b>17</b>
<b>1.4. Novas abordagens para o desenvolvimento de fármacos antichagásicos .....</b>	<b>18</b>
<b>1.5. Chalconas como fontes de novas moléculas bioativas.....</b>	<b>19</b>
<b>1.6. Justificativa e relevância.....</b>	<b>21</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1. Objetivo Geral .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos.....</b>	<b>24</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1. Síntese da chalcona (E)-1-(4-aminophenyl)-3-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)prop-2-en-1-one (DF .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2. Procedimentos gerais .....</b>	<b>26</b>
<b>3.3. Procedimentos computacionais.....</b>	<b>26</b>
3.3.1. Detalhes computacionais.....	26
3.3.2. Preparação e otimização dos ligantes.....	27
3.3.3. Estudo ADMET baseado em Otimização Multiparamétrica (MPO).....	29
3.3.4. Procedimentos de Docking Molecular .....	30
3.3.5. Simulação de Dinâmica Molecular (MD) .....	32
<b>3.4. Atividade anti-chagásica.....</b>	<b>32</b>
3.4.1. Preparação da amostra.....	32
3.4.2. Citotoxicidade em células hospedeiras de mamíferos.....	33
3.4.3. Efeito antiproliferativo em formas epimastigotas .....	34
3.4.4. Efeito tripanocida em formas tripomastigotas.....	36

<b>3.5.</b>	<b>Ensaio de citometria de fluxo.....</b>	<b>36</b>
3.5.1.	Vias de morte celular.....	36
3.5.2.	Acumulação citoplasmática de ROS .....	37
3.5.3.	Potencial transmembrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ).....	38
<b>3.6.</b>	<b>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....</b>	<b>39</b>
<b>3.7.</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>39</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1.</b>	<b>Análise estrutural.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2.</b>	<b>Preparação e otimização dos ligantes .....</b>	<b>42</b>
<b>4.3.</b>	<b>Estudo ADMET baseado em Otimização Multiparamétrica (MPO).....</b>	<b>50</b>
4.3.1.	Análise topológica.....	50
4.3.2.	Descritores farmacocinéticos previstos .....	53
4.3.3.	Sítio de metabolismo e predição de toxicidade aguda.....	54
<b>4.4.</b>	<b>Dinâmicas e <i>docking</i> molecular.....</b>	<b>55</b>
<b>4.5.</b>	<b>Atividade anti-chagásica.....</b>	<b>59</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>6.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>72</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>74</b>

# **INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO, RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

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

A Doença de Chagas (DC), ou Tripanossomíase Americana, é uma atropozoonose endêmica das Américas, que possui como agente etiológico o protozoário intracelular *Trypanosoma cruzi*, pertencente ao supergrupo Excavata e subgrupo Kinetoplastea (ADL *et al.*, 2005). Seu vetor são insetos triatomíneos de hábitos hematófagos (família Reduviidae, subfamília Triatominae) (LENT & WYGODZINSKY, 1979; VAHIA-LOUREIRO *et al.*, 1996), conhecidos como barbeiros, chupões e bicudos (AMATO NETO; PASTERNAK, 2009). A Doença de Chagas foi diagnosticada e descrita pela primeira vez pelo cientista Dr. Carlos Chagas, no município de Lassance, no ano de 1909 (CHAO; LEONE; VIGLIANO, 2020).

No final do século XX, a Doença de Chagas tornou-se reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e outras instituições de saúde pública como uma doença tropical negligenciada (DTN), porque afeta principalmente as populações de baixa renda, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade crônica em países tropicais em desenvolvimento, e tem sido historicamente sub-representada na alocação de recursos de promoção da saúde de organizações de pesquisa, governamentais e de auxílio público, gerando grande impacto econômico e social (BONNEY, 2014; THE LANCET, 2019 ; DNDI, 2021).

Inicialmente restrita às Américas, com área de ocorrência entre o México e o sul da América do Sul, a Doença de Chagas tornou-se um problema de saúde em regiões não endêmicas como Europa, Austrália, Japão e Estados Unidos, devido ao fluxo migratório de indivíduos oriundos de áreas endêmicas (RASSI; MARIN-NETO, 2010; LESLIE, 2011). Calcula-se entre 6 e 7 milhões o número de infectados, cerca de 70 milhões de pessoas em situação de risco de infecção, com 170 mil novos casos anuais e 10 mil óbitos por ano decorrentes de complicações da doença (DNDI, 2021; PÉREZ-MOLINA; NORMAN; LÓPEZ-VÉLEZ, 2012).

O impacto econômico mundial gerado pela doença de Chagas chega a US\$ 7,19 bilhões por ano (MORILLA; ROMERO, 2015). Somente no Brasil, US\$ 1,3 bilhões são gastos anualmente com pacientes em fase crônica da Doença de Chagas (WHO, 2016).

Segundo Boletim Epidemiológico do ano de 2020 do Ministério da Saúde, foram confirmados 146 novos casos de DC no território brasileiro. Com relação à mortalidade, durante o período de março a agosto de 2020, foram registrados 1.746 óbitos por doença de Chagas, com predominância nas regiões Sudeste e Nordeste. No entanto, é importante observar que pode existir uma subnotificação significativa devido à pandemia de COVID-19. ( ZAIDEL *et al.*, 2020; BRASIL, 2021).

## 1.2 Ciclo biológico e fisiopatologia da Doença de Chagas

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de chagas, é um protozoário flagelado, de ciclo biológico heteroxênico e parasito obrigatório, que possui um único flagelo (exceto na forma intracelular, que não possui flagelo externo) e uma única mitocôndria, alongada e termina em um cinetoplasto que contém o DNA mitocondrial. Durante seu ciclo de vida apresenta três diferentes formas evolutivas principais adaptadas as mudanças de ambiente e hospedeiro: epimastigota (forma proliferativa não infectante, presente no intestino médio do inseto), tripomastigota (forma não proliferativa infectante, presente na porção posterior do intestino do inseto) e amastigota (forma proliferativa intracelular) (ADADE *et al.*, 2013).

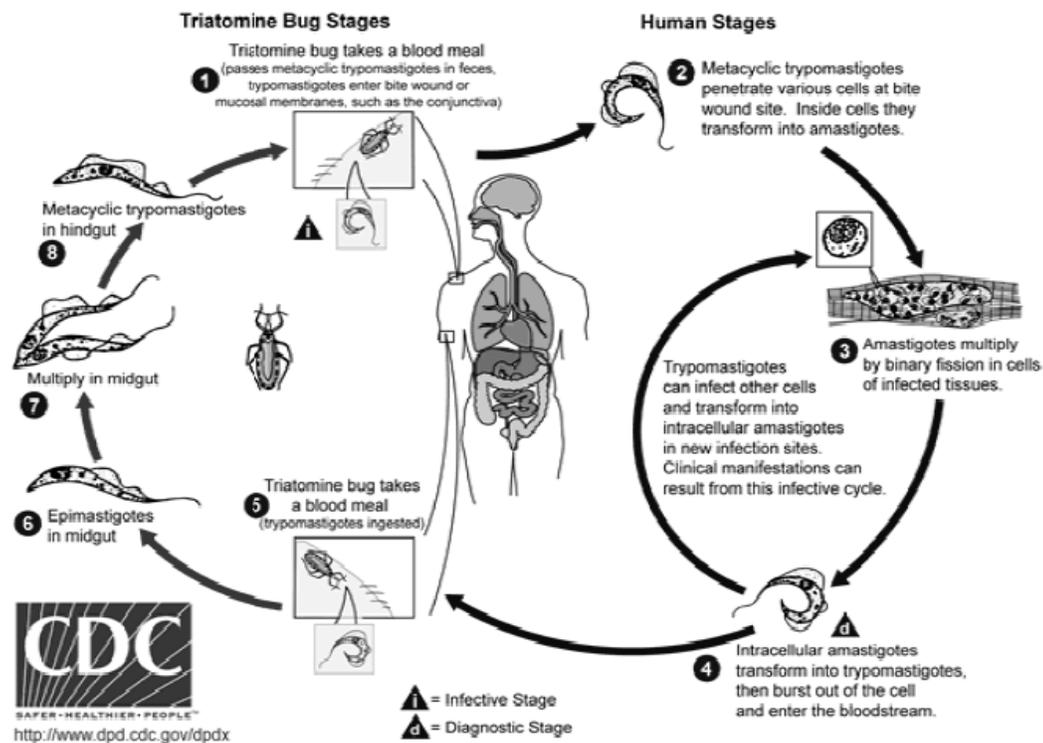
A identificação da forma evolutiva considera a posição do cinetoplasto e a localização do flagelo. Nos epimastigotas o cinetoplasto e a bolsa flagelar, da qual emerge o flagelo, estão em posição anterior ao núcleo. No tripomastigota o cinetoplasto situa-se na parte terminal do flagelo. Já nos amastigotas, o flagelo imperceptível e não proeminente (DIAS; COURA, 1997).

O ciclo do parasito se inicia quando o inseto vetor triatomíneo se alimenta do sangue de um hospedeiro vertebrado infectado contendo formas tripomastigotas sanguíneas. Uma vez ingeridas, as formas tripomastigotas vão para o estômago do inseto, onde a maioria é lisada por enzimas digestivas (CASTRO *et al.*, 2007). As formas tripomastigotas remanescentes se transformam em formas epimastigotas, que por sua vez migram para o intestino médio do inseto e dividem-se intensivamente por divisão binária mantendo a infecção no vetor (ALVES *et al.*, 2007). Parte desses epimastigotas migra para o intestino posterior onde se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas, forma infectante para várias espécies de mamíferos. A infecção ocorre quando o triatomíneo ao realizar o repasto sanguíneo deposita junto a região da picada

excrementos (fezes e urina) contaminados com formas tripomastigotas metacíclicas. Uma substância irritante que ocasiona prurido também é liberada pelo inseto. A coceira local faz com que os tripomastigotas metacíclicos sejam arrastados para o orifício da picada pelo próprio hospedeiro vertebrado (DE SOUZA *et al.* 2010).

As formas tripomastigotas metacíclicas são capazes de sobreviver e reproduzir-se em uma variedade de células nucleadas (SILVA *et al.*, 2007), onde se convertem em formas amastigotas; ocorre proliferação intracelular por sucessivas divisões binárias e diferenciação em formas tripomastigotas que rompem a célula e caem na circulação sanguínea (LIMA-COSTA *et al.*, 2010). Após a ruptura celular, as formas tripomastigotas liberadas na corrente sanguínea podem infectar células vizinhas, disseminar para outros órgãos ou serem ingeridas por outro inseto vetor reiniciando o ciclo (MUÑOS-SARAIVA *et al.*, 2012).

Figura 1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*



(Fonte: [www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html](http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html))

O *T. cruzi* não apresenta uma homogeneidade populacional, sendo constituído por várias cepas circulantes na natureza, podendo-se notar uma variabilidade genética entre

elas, como já descrito (MATTEI *et al.*, 1977; NOGUEIRA & COURA, 1989). Diversidade quanto à susceptibilidade à quimioterapia e diversidade de padrões biológicos, bioquímicos e moleculares pode ser encontrada em diferentes populações de *T. cruzi*, entretanto, populações de uma mesma área geográfica tendem a apresentar características semelhantes entre si (TOLEDO, 1997; STOTHARD, 1999; DEVERA *et al.*, 2002; ANDRADE, 2005; ANDRADE, *et al.*, 2011; DE OLIVEIRA E SILVA, 2013).

Uma das primeiras tentativas de classificação das cepas de *T. cruzi* foi realizada por Brener (1977) ao propor o uso das cepas Y e CL (Colombiana) como cepas polares, visto que, em animais, a infecção por Y apresentava tropismo por macrófagos, elevada parasitemia e evolução para o óbito, enquanto por CL se observava miotropia (tropismo por miócitos) e uma infecção de menor gravidade.

A maior parte das infecções advém da transmissão vetorial, através do contato com os excrementos do triatomíneo infectado (COURA, 2007; COURA; BORGES-PEREIRA, 2012). Porém, vem sendo observada uma diminuição desse tipo de transmissão devido às iniciativas regionais de combate aos vetores, em particular nos países do Cone Sul (SILVEIRA, 2002). No Brasil, tais esforços culminaram, em 2006, com o reconhecimento de país livre da infecção vetorial pelo *Triatoma infestans* (OPAS, 2006).

O segundo mecanismo de transmissão mais importante é a transfusão sanguínea (GASCON; BERN; PINAZO, 2010). A transfusão sanguínea é o principal mecanismo de transmissão em zonas urbanas. Entretanto, na atualidade, têm-se reconhecido um melhor controle da hemoterapia no Brasil e em outros países da América Latina (MORAES-SOUZA, 1999). O diagnóstico diferencial para doença de Chagas em doações sanguíneas e de órgãos, em áreas endêmicas, é de extrema importância para controle da infecção. Com o aumento do fluxo migratório de latino-americanos para outros continentes, a possibilidade de casos ocorrerem em áreas não endêmicas passa a merecer maior atenção (MAGUIRE *et al.*, 2006; SCHMUNIS, 2007).

A transmissão congênita pode ocorrer em qualquer fase da doença materna e pode se dar em qualquer época da gestação, sendo mais provável no último trimestre, ou ocorrer durante o parto, pelo contato das mucosas do feto com o sangue da mãe infectada (BRASIL, 2012). Já a infecção pela via oral é responsável por surtos de transmissão em áreas urbanas e regiões onde não há circulação de insetos vetores domiciliados (PEREIRA

*et al.*, 2009). Esta via de transmissão é geralmente associada com uma alta concentração parasitária, resultando em uma manifestação clínica aguda mais severa com altos índices de mortalidade. De forma semelhante, a transmissão por meio de transplante de órgãos tem adquirido relevância nas últimas décadas. Essa forma de transmissão apresenta manifestações clínicas graves uma vez que os receptores estão imunocomprometidos (BRASIL, 2012; PEREIRA; NAVARRO, 2013).

A doença de Chagas apresenta duas fases: aguda e crônica. Durante a fase aguda da doença, quando há uma grande proliferação do parasito, é possível sua detecção com exame de sangue direto. No entanto, na maioria dos casos tal forma passa despercebida devido ao não reconhecimento ou ausência de manifestações clínicas (RASSI *et al.*, 2000). Os casos sintomáticos apresentam febre, adenopatia generalizada, edema, hepatoesplenomegalia e, nos casos mais severos, miocardite e meningoencefalite. Os sinais e sintomas da fase aguda tendem a desaparecer após 4 a 8 semanas. Na maioria dos indivíduos a resposta imunológica é capaz de controlar a infecção, resultando em uma drástica redução da parasitemia (PRATA, 1994). Entretanto, em torno de 2 a 5% dos pacientes sintomáticos na fase aguda evoluem para o óbito (CHATELAIN, 2017).

A fase crônica da infecção pode manifestar-se como forma indeterminada que, a depender da área geográfica, pode apresentar índices entre 40 e 90% de infectados assintomáticos e sem anormalidades no eletrocardiograma e nos exames radiológicos do coração, esôfago e cólon. Esses casos, porém, continuam a mostrar reação sorológica positiva para Chagas, apresentando ao longo do tempo xenodiagnósticos e testes de PCR repetidamente positivos (DIAS & MACEDO, 2005; COURA, 2007).

Pacientes na forma indeterminada podem permanecer nesse quadro pelo resto da vida ou pode haver uma evolução da doença para as formas cardíaca (cardiopatia chagásica), digestiva (megaesôfago ou megacólon) ou ambas (cardio-digestiva) (BRENER, 1987; GUTIERREZ *et al.*, 2009; BILOLO *et al.*, 2010). A cardiopatia chagásica crônica é a manifestação mais significativa devido a sua frequência e severidade, aparecendo entre os 20 e 40 anos do indivíduo, entre 5 e 15 anos após a infecção. Seus sinais e sintomas são caracterizados por infiltração inflamatória, morte celular e fibrose intersticial reparativa, eventos que levam a distúrbios no sistema de condução cardíaco (bloqueio intraventricular e atrioventricular, disfunção no nódulo sinusal e arritmia ventricular) e miocardite, causando instabilidade elétrica (arritmia atrial), redução da contratilidade (trombose intracavitária e insuficiência cardíaca) e

distúrbios microvasculares que podem resultar em morte súbita. Alterações no sistema nervoso intracardíaco podem causar dor torácica atípica e morte súbita (MARIN-NETO *et al.*, 2007; PEREIRA; NAVARRO, 2013).

Na forma digestiva, as manifestações clínicas são causadas por disfunção no peristaltismo de esôfago e cólon, provocado por destruição do plexo mioentérico e tendo como consequência a formação do megaesôfago (disfagia, dor no peito e regurgitação) e megacólon (constipação crônica, dor abdominal e obstrução) (REZENDE-FILHO *et al.*, 2005; COURA, 2007). A natureza das modificações miocárdicas na fase crônica tem sido considerada um fenômeno autoimune (MICHAILOWSKY *et al.*, 2003; CUNHA NETO *et al.*, 2009; GUTIERREZ *et al.*, 2009). Entretanto, a persistência do parasito em tecidos também tem sido demonstrada (VAGO, *et al.*, 2000).

Casos de reativação da doença de Chagas foram descritos em pacientes leucêmicos e transplantados. A imunossupressão também pode levar a uma reativação da doença, com proliferação do parasito, lesões necróticas ou tumorais no cérebro (75%), e intensificação de miocardites (44%). Tais quadros são frequentemente observados em coinfeção com HIV e indivíduos transplantados (CORDOVA *et al.*, 2008).

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

Embora a Doença de Chagas seja causadora de morbidade e de um número elevado de óbitos, nos últimos 50 anos há apenas dois medicamentos disponíveis para o tratamento. O benzonidazol e o nifurtimox, duas moléculas conhecidas como compostos nitroheterocíclicos (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018a), são derivados nitroimidazólicos e sua eficácia terapêutica é especialmente dependente da fase da doença na qual o tratamento foi instituído. Ambos os fármacos apresentam segurança e eficácia bastante limitada (CASTRO; DIAZ DE TORANZO, 1988; JACKSON; WYSSA; CHAPPUIS, 2020). Considerado tóxico, o nifurtimox teve sua comercialização cancelada em diversos países, inclusive no Brasil (CANÇADO, 2002). Assim, o benzonidazol tornou-se o único medicamento usado no Brasil para tratar esta doença (MORILLA; ROMERO, 2015).

O tratamento disponível atualmente é eficaz logo após a infecção, no início da fase aguda (MORILLA; ROMERO, 2015), porém, uma vez que a doença tenha

progredido até as formas indeterminada ou crônica, nenhum medicamento apresenta efetividade satisfatória. A taxa média de cura entre casos agudos e recentes é de 80%, ao passo que é inferior a 20% entre os crônicos (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; SESTI-COSTA *et al.*, 2014). Além disso, o tratamento é contraindicado para pacientes com insuficiência renal ou hepática, e durante gravidez (MARIN-NETO *et al.*, 2009; RASSI; MARIN-NETO, 2010; HASSLOCHER-MORENO *et al.*, 2012), desencadeando muitos efeitos adversos ao longo do tratamento (PÉREZ-AYALA *et al.*, 2011). As reações adversas mais frequentes incluem manifestações de hipersensibilidade cutânea, intolerância digestiva, anorexia, astenia, dor de cabeça e insônia. Reações menos comuns, como neuropatia e supressão medular, são consideradas raras, e a interrupção do tratamento foi registrada em cerca de 30% dos protocolos terapêuticos (VIOTTI *et al.*, 2009).

Esses fatores contribuem para um desinteresse da indústria farmacêutica no desenvolvimento de novos fármacos para doença de Chagas, caracterizada como doença negligenciada, e destacam a importância de grupos de pesquisa ao empregar ferramentas como a nanotecnologia (TESSAROLO *et al.*, 2018), o reposicionamento de fármacos (BELLERA *et al.*, 2020) e a síntese e prospecção de novas moléculas (DE MENEZES *et al.*, 2019a) como estratégias contemporâneas de terapia (KRATZ, 2019).

#### **1.4 Novas abordagens para o desenvolvimento de fármacos antichagásicos**

Pesquisas com o intuito de desvendar novas rotas metabólicas específicas dos tripanossomatídeos, auxiliando no conhecimento mais aprofundado da biologia dos parasitos, tornaram-se guias nas pesquisas farmacológicas. Alguns desses 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). Duas enzimas destacam-se, a cruzaina e a tripanotiona redutase, uma vez que exercem papel fundamental na sobrevivência do parasito no hospedeiro vertebrado (PALOS *et al.*, 2017; BATTISTA *et al.*, 2020).

As cisteíno proteases são enzimas que desempenham papéis importantes em várias vias metabólicas e processos fisiológicos em organismos, incluindo a digestão de proteínas e a regulação da apoptose (morte celular programada). Os principais membros

desse grupo de enzimas em tripanossomatídeos são a cruzaina, rodesiana e catepsina B. Estas 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. A expressão dessas proteínas está diretamente relacionada à progressão de doenças causadas por esse grupo de parasitos (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2017).

A cruzaina de *Trypanosoma cruzi* (TcCr), peptidase do tipo catepsina L-like, é a principal cisteína protease presente durante o ciclo de vida do *T. cruzi*, constituída de dois domínios, um do tipo  $\alpha$ -hélice e outro folha- $\beta$ -pregueada, com o sítio ativo localizado na interface entre as duas subunidades ( BRAK *et al.*, 2010; BARBOSA DA SILVA *et al.*, 2019).

Dentro do ciclo de vida do *T. cruzi* a TcCr atua em diferentes processos. No hospedeiro invertebrado, a TcCr participa da adesão entre o parasito e o intestino do barbeiro e é importante durante o processo de metaciclogênese, contribuindo diretamente na virulência das diferentes cepas de *T. cruzi* ( SAN FRANCISCO *et al.*, 2017; LOSINNO *et al.*, 2021). No hospedeiro vertebrado, a TcCr participa do processo de invasão das células hospedeiras (BURLEIGH; WOOLSEY, 2002). Além disso, TcCr exerce importante papel na evasão à resposta imune do hospedeiro, através da clivagem de anticorpos e impedimento da ativação do sistema complemento, da resposta imune celular, e impedir a síntese de fatores de transcrição pró-inflamatórios, como o NF- $\kappa$ B (DOYLE *et al.*, 2011; PONCE *et al.*, 2013; SCHARFSTEIN, 2018).

Por fim, a TcCr também está relacionada à degradação de compostos tóxicos para o parasito, uma vez que estudos que induziram a inibição de cruzaina levaram a um aumento da morte dos parasitos, relacionado à concentração de compostos no Complexo de Golgi (ENGEL *et al.*, 2000; MOREIRA *et al.*, 2017).

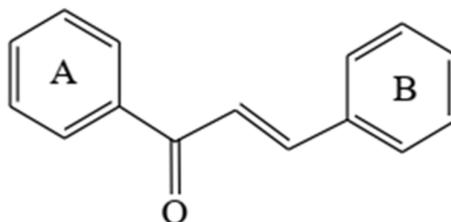
### **1.5 Chalconas como fontes de novas moléculas bioativas**

Chalconas são compostos fenólicos que pertencem a uma família de pequenas moléculas com ampla distribuição em diferentes partes aéreas de vegetais. Elas são caracterizadas por um esqueleto 1,3-diaril-2-propen-1-ona, constituído de dois anéis aromáticos ligados pelo sistema carbonila, aberto, de três carbonos  $\alpha,\beta$ -insaturados,

podendo ser substituída em quaisquer desses anéis (Figura 2). (ÁVILA *et al.*, 2008). Assim, é possível a produção de uma grande diversidade de chalconas naturais e sintéticas (ZHUANG *et al.*, 2017).

Em vegetais, a síntese de chalconas naturais ocorre pela ação das enzimas chalcona sintase e chalcona redutase, utilizando como substratos os compostos malonil-CoA e p-coumaroil-CoA (IRFAN *et al.*, 2020).

Figura 2: Esqueleto básico das chalconas.



Além do processo de síntese natural, as chalconas podem ser sintetizadas em laboratório, sendo um processo rápido e fácil. A principal reação empregada na síntese de chalconas é a condensação de Claisen-Schmidt, que ocorre através da condensação entre um benzaldeído e uma metilcetona (acetofenona) na presença de catalisador em meio alcoólico ácido/alcalino (BHAMBRA *et al.*, 2017).

A facilidade de síntese e a grande variedade de propriedades biológicas, como antioxidante (SÖKMEN; AKRAM KHAN, 2016) e antimicobacteriano (RAMESH *et al.*, 2020), tornaram as chalconas um alvo de grande interesse para grupos de pesquisa.

Estudos do efeito citotoxicidade de chalconas 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), apresentaram valores de concentrações citotóxicas inferiores a 50  $\mu$ M (BADRIA *et al.*, 2019; SHAIK *et al.*, 2020a). No campo da microbiologia, a ação de aminofenilchalconas em cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* sensíveis e resistentes, apresentou um excelente efeito sinérgico com norfloxacino, gentamicina e penicilina através da inibição das bombas de efluxo NorA e MepA (FERRAZ *et al.*, 2020; UŠJAK *et al.*, 2019). Efeito também observado em cepas resistentes de *S. aureus* com chalconas isoladas das flores de *Arrabidaea brachypoda* (REZENDE-JÚNIOR *et al.*, 2020).

O efeito antifúngico das chalconas tem sido amplamente documentado, incluindo atividade contra dermatófitos como *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus fumigatus*, espécies de *Tricophyton sp.* e *Microsporum sp.*, com valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) inferiores a 0,25 µg/mL (MIRZAEI; ABASTABAR; EMAMI, 2020). Notavelmente, diclorochalconas sintéticas demonstraram uma eficácia superior frente a cepas de *C. tropicalis* em comparação ao observado para o fluconazol (SHAIK *et al.*, 2020b).

No grupo das doenças negligenciadas causadas por parasitos, chalconas como a cardamonina e a licochalcona A induziram alterações morfológicas e bioquímicas em *Schistosoma mansoni* resistentes ao praziquantel (SOUZA *et al.*, 2017; CARVALHO *et al.*, 2021).

A ação de derivados de chalconas em diferentes espécies de tripanossomatídeos é evidenciada em diversas publicações. Em estudo com *Leishmania amazonensis* essas moléculas apresentaram efeito biológico superior a pentamidina e com maior seletividade (MENDES *et al.*, 2019). Em *Leishmania (Leishmania) infantum*, licochalcona apresentou efeito leishmanicida *in vitro* e em modelo experimental de leishmaniose (SOUZA *et al.*, 2020). Em espécies de *Trypanosoma*, flavocauina B, uma chalcona natural encontrada em *Polygonum ferrugineum*, exerceu efeito em cepas de *T. brucei* e *T. cruzi*, com efetividade superior ao benznidazol (RODRIGUES *et al.*, 2017). Portanto, os resultados promissores de chalconas, especialmente em relação aos tripanossomatídeos, destacam o potencial promissor dessas moléculas na terapia contra a doença de Chagas.

## 1.6 Justificativa e relevância

Endêmica em 21 países da América Latina e com registro de infecções em regiões não-endêmicas, a doença de Chagas é responsável pela maior parte das mortes causadas por doenças parasitárias. Entre 10% e 30% dos pacientes infectados desenvolve comorbidades que resultam em deficiência significativa com grande impacto social e econômico, incluindo desemprego e diminuição da capacidade de ganho (DNDI, 2018), sendo a cardiomiopatia a principal causa de morte (MORILLA *et al.*, 2015). Apesar de seu impacto em diferentes comunidades, a doença de Chagas continua no rol de Doenças Negligenciadas, não atraindo interesse da indústria farmacêutica para desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que afeta principalmente populações de baixa renda



## **OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito tripanocida *in vitro* e *in silico* de chalcona (E)-1-(4-aminophenyl)-3-(2,2,2 difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)prop-2-en-1-one (DF) sobre cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar de forma estrutural a chalcona DF;
- Realizar estudo ADMET baseado em otimização paramétrica (MPO) da chalcona DF;
- Avaliar a citotoxicidade da chalcona DF sobre células hospedeiras;
- Analisar o potencial tripanocida da chalcona DF as sobre formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*;
- Investigar o mecanismo de morte celular da chalcona DF sobre *Trypanosoma cruzi*;
- Avaliar alterações na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e no potencial transmembrânico mitocondrial induzidas por chalcona DF em *Trypanosoma cruzi*;
- Identificar as possíveis interações de chalcona DF com a enzima cruzaina de *Trypanosoma cruzi* (TcCr).

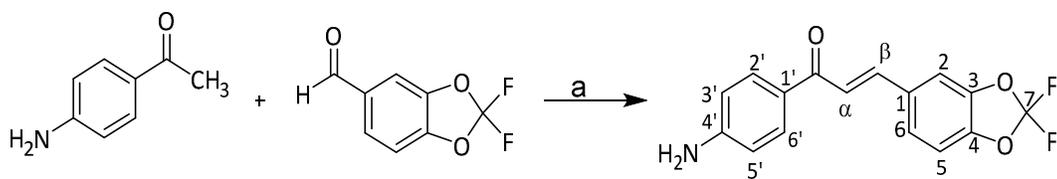
# **MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Síntese da chalcona (E)-1-(4-aminophenyl)-3-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)prop-2-en-1-one (DF)

A acetofenona (2 mmol) e o aldeído (2 mmol) foram colocados em um balão volumétrico, e 5 mL de solução de NaOH (hidróxido de sódio) etanólico (50%) foram adicionados e misturados com agitação por 48 horas à temperatura ambiente (Figura 3). O progresso da reação foi verificado por cromatografia em camada delgada (CCD) (n-hexano: acetato de etila, 1:1). Após 24 horas, a mistura de reação foi neutralizada com HCl diluído (10%) e água gelada adicionada. O produto foi obtido como um sólido amarelo filtrado sob pressão reduzida e lavado com água fria (GARCIA *et al.*, 2020; N. BANDEIRA *et al.*, 2019).

Figura 3: Preparação da chalcona DF.



Legenda: a) NaOH 50 % p v<sup>-1</sup>, etanol, t.a., 24 h.

#### 3.2 Procedimentos gerais

Os reagentes químicos foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram obtidos utilizando um espectrômetro Bruker, modelo Avance DPX-300 e modelo Avance DRX-500, operando a uma frequência de 300 MHz e 500 MHz para hidrogênio, e 75 MHz e 125 MHz para carbono, respectivamente. Os espectros foram medidos em solventes de CDCl<sub>3</sub>, e os deslocamentos químicos são relatados como valores de *d* em partes por milhão (ppm) em relação ao solvente.

#### 3.3. Procedimentos computacionais

##### 3.3.1. Detalhes computacionais

Para realizar as simulações e análises de descritores, foram utilizados os seguintes programas: AutoDockTools® (MORRIS *et al.*, 2009), AutoDockVina® (TROTT AND

OLSON, 2009), Avogadro® (<http://avogadro.cc/>) (HANWELL *et al.*, 2012), Discovery Studio Visualizer® (BIOVIA, 2015), Gabedit 2.5.0 (ALLOUCHE, 2011), MarvinSketch® versão 23.12.0, Chemaxon© (<http://www.chemaxon.com>) (CSIZMADIA, 1999), PyMOL (YUAN *et al.*, 2017), UCSF Chimera™ (PETTERSEN *et al.*, 2004), software Gaussian 76 (BINKLEY *et al.*, 1978), software Multiwfn 3.7 (LU & CHEN, 2012), e software VESTA 3.4.7 (MOMMA & IZUMI, 2011).

### 3.3.2 Preparação e otimização dos ligantes

Os cálculos químicos quânticos foram realizados utilizando o método da Teoria do Funcional da Densidade (DFT) na fase gasosa para a chalcona em questão (DITCHFIELD *et al.*, 1971; LEE *et al.*, 1988; BECKE, 1992). Inicialmente, a estrutura molecular foi desenhada utilizando o software Avogadro (HANWELL *et al.*, 2012). Em seguida, foi realizado o escaneamento relaxado da Superfície de Energia Potencial (PES) no nível computacional B3LYP/6-311++G(d,p) na fase gasosa, utilizando o software Gaussian 76 (BINKLEY *et al.*, 1978), para os ângulos diédricos  $\theta_1 = C3C4C11Ca$  (anel A) e  $\theta_2 = CaC\beta C20C22$  (anel B), com trinta e seis (36) etapas e uma variação de passo de  $10^\circ$ , a fim de obter a estrutura de energia mínima global.

Em seguida, a partir da estrutura de energia mínima global, os Orbitais Moleculares Fronteiriços (FMO) foram calculados no nível computacional B3LYP/6-311++G(d,p) na fase gasosa, e foram renderizados usando um isovalor de 0,03 com o software Avogadro (HANWELL *et al.*, 2012). Posteriormente, os descritores globais de reatividade quântica foram calculados: a diferença de energia HOMO-LUMO ( $\Delta E_{gap}$ , equação 1) (PEARSON, 1963), o Potencial de Ionização (I, equação 2) (KOOPMANS, 1934), a Afinidade Eletrônica (A, equação 3) (CHERMETTE, 1999), a Eletronegatividade ( $\chi$ , equação 4) (ICZKOWSKI & MARGRAVE, 1961; JANAK, 1978), a Dureza Global ( $\eta$ , equação 5) (YANG & PARR, 1985; PEARSON, 1987; VON SZENTPÁLY, 1991), a Suavidade Global ( $\sigma$ , equação 6) (PARR *et al.*, 1999), o Índice Global de Eletrofilicidade ( $\omega$ , equação 7) (OBOT *et al.*, 2015), e o Índice Global de Nucleofilicidade ( $\varepsilon$ , equação 8) (OBOT *et al.*, 2015).

A caracterização da reatividade local foi realizada calculando as Funções Eletrônica (equação 9) e Condensada (equações 10-12) de Fukui (FUKUI, 1982; OBOT *et al.*, 2015). As Funções Eletrônicas de Fukui para ataque nucleofílico, ataque eletrofílico

e ataque radical foram determinadas utilizando o software Multiwfn 3.7 (LU & CHEN, 2012), e as isossuperfícies foram renderizadas utilizando o software VESTA 3.4.7 (MOMMA & IZUMI, 2011), com isovalores de 0.000815808 para o ataque nucleofílico, 0.000755999 para o ataque eletrofílico e 0.000672964 para o ataque radical. As Funções Condensadas de Fukui para o ataque nucleofílico ( $f_k^+$ , equação 10), ataque eletrofílico ( $f_k^-$ , equação 11) e ataque radical ( $f_k^{\cdot}$ , equação 12) foram calculadas usando a análise de carga populacional Hirshfeld (HIRSHFELD, 1977). As equações 10 a 12 correspondem à carga atômica no átomo  $k$  nas espécies aniônica, neutra e catiônica para a chalcona em questão. A partir dos valores das Funções Condensadas de Fukui para os ataques nucleofílico e eletrofílico, foram obtidos o descritor dual (equação 13) (MORELL *et al.*, 2005) e o índice multifílico ( $\Delta\omega$ , equação 14) (PADMANABHAN *et al.*, 2007). Se ambos  $f_k^+$  e  $\Delta\omega$  forem positivos, o sítio reativo é susceptível a um ataque nucleofílico, e se ambos  $f_k^-$  e  $\Delta\omega$  forem negativos, o sítio reativo é susceptível a um ataque eletrofílico. Finalmente, o Potencial Eletrostático Molecular (MEP) foi calculado no mesmo nível de teoria, e a isosuperfície foi renderizada utilizando o software Gabedit 2.5.0 (ALLOUCHE, 2011), com um valor de isosuperfície de 0.01.

Figura 4: Equações de caracterização da chalcona

$$\Delta E_{GAP} = E_{LUMO} - E_{HOMO} \quad (1)$$

$$I = - E_{HOMO} \quad (2)$$

$$A = - E_{LUMO} \quad (3)$$

$$\chi = \frac{I + A}{2} \quad (4)$$

$$\eta = \frac{I - A}{2} \quad (5)$$

$$\sigma = \frac{1}{\eta} \quad (6)$$

$$\omega = \frac{\chi^2}{2\eta} \quad (7)$$

$$\varepsilon = \frac{1}{\omega} \quad (8)$$

$$f = \left( \frac{\partial \rho(r)}{\partial N} \right)_{v(r)} \quad (9)$$

$$f_k^+ = q_k(N + 1) - q_k(N) \quad (10)$$

$$f_k^- = q_k(N) - q_k(N - 1) \quad (11)$$

$$f_k^0 = \frac{q_k(N + 1) - q_k(N - 1)}{2} \quad (12)$$

$$\Delta f = f_k^+ - f_k^- \quad (13)$$

$$\Delta \omega = \omega \cdot \Delta f \quad (14)$$

Legenda: (1) Descritores Globais de Reatividade Quântica - diferença de energia HOMO-LUMO -  $\Delta E_{gap}$ ; (2) Potencial de Ionização -  $I$ ; (3) Afinidade Eletrônica -  $A$ ; (4) Eletronegatividade  $\chi$ ; (5) Dureza Global -  $\eta$ ; (6) Suavidade Global -  $\sigma$ ; (7) Índice Global de Eletrofilicidade -  $\omega$ ; (8) Índice Global de Nucleofilicidade -  $\varepsilon$ ; (9) Função Eletrônica de Fukui; (10) Função Condensada de Fukui – ataque nucleofílico; (11) Função Condensada de Fukui – ataque eletrofílico; (12) Função Condensada de Fukui – ataque ao radical; (13) Descritor Dual; (14) Índice Multifílico -  $\Delta \omega$ .

### 3.3.3 Estudo ADMET baseado em Otimização Multiparamétrica (MPO)

A representação bidimensional da estrutura química da chalcona DF foi desenhada e renderizada no programa MarvinSketch® de licença acadêmica para estimativa quantitativa de fármacos baseada na otimização multiparamétrica (MPO), como demonstrado na Figura 5 (WAGER *et al.*, 2010b).

Figura 5: Estimativa quantitativa de fármacos baseada na otimização multiparamétrica (MPO).

$$D = \sum_{i=1}^n w_k T_k(x_k^0)$$

Legenda:  $w$  – fator de ponderação;  $k$  – propriedade selecionada.

O estudo ADMET é uma abordagem crítica no desenvolvimento de fármacos, que avalia as propriedades de Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade de compostos candidatos a medicamentos. Esse estudo ajuda a prever como um novo fármaco se comportará no corpo humano, permitindo identificação precoce de possíveis problemas e otimização de suas propriedades farmacológicas.

Na equação,  $w$  é um fator de ponderação atribuído ao valor calculado  $x$  de uma propriedade  $k$ , que varia de 0 a 1, dentro ( $x_k \leq x_a$ ) ou fora ( $x_b < x_k$ ) do limiar de desejabilidade, que inclui os limites: lipofilicidade intrínseca ( $\log P \leq 3$ ) e dependente do pH ( $\log D \leq 2$ ), Peso Molecular ( $200 < MW \leq 500$  g/mol), Área de Superfície Polar Topológica ( $40 < TPSA \leq 90$  Å<sup>2</sup>), Doador de ligação de H (HBD  $\leq 1$ ) e  $pK_a \leq 8$ , o que resulta em um valor entre 0 e 6 ( $n = 6$ ) como parâmetro de viabilidade farmacocinética. Os resultados obtidos, então, serão comparados com as estimativas obtidas a partir dos preditores *on line* PreADMET – BMDRC (<https://preadmet.qsarhub.com/>) – ADMETboost – AI Drug Lab (<https://aidruglab.smu.edu/admet>) – e ADMET – LMC (<https://qsar.chem.msu.ru/admet/>) – (DA ROCHA *et al.*, 2023).

A predição do sítio de metabolismo foi realizada com base na relação entre a especificidade e a sensibilidade de grupos funcionais e fragmentos estruturais sendo metabolizados pelas isoformas do citocromo P450 (CYP450) que são predominantes no metabolismo da fase I (CYP2D6 e CYP3A4) e por reações conjugadas no metabolismo de fase II, utilizando o preditor *on line* XenoSite (<https://xenosite.org/>). Os resultados serão associados à identificação de fragmentos tóxicos no servidor *on line* SToxTox (<https://stoptox.mml.unc.edu/>) e por meio de previsões de substratos de CYP450s, toxicidade orgânica e toxicidade aguda a partir do consenso de previsão ADMET, que inclui concentração letal (LC<sub>50</sub>) em espécies aquáticas (peixe, *Daphnia magna* e algas) e dose letal (LD<sub>50</sub>) em roedores (*Mus musculus* e *Rattus norvegicus*).

### 3.3.4 Procedimentos de *Docking* Molecular

Para compreender o possível mecanismo de ação da chalcona sobre o *Trypanosoma cruzi*, foram realizadas simulações de *docking* molecular entre o ligante da chalcona e a enzima Cruzaína. Essa enzima é crucial para o ciclo evolutivo do parasito (DE ARAÚJO *et al.*, 2022). A estrutura da proteína foi obtida no repositório do Banco de Dados de Proteínas (Protein Data Bank - <https://www.rcsb.org/>), identificada como "Estrutura

Cristalina da Cruzaína em Complexo com um Inibidor Tetrafluorofenoximetilcetona" (PDB 3IUT), com uma resolução de 1,20 Å, determinada pelo método de Difração de Raios-X e classificada como hidrolase no organismo do *Trypanosoma cruzi* (BRAK *et al.*, 2010). Para realização das simulações de *docking* molecular, o código AutoDockVina® (TROTT & OLSON, 2009) foi configurado para executar o Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA). Para determinar o espaço de simulação, a *grid box* foi centralizada, abrangendo a enzima com coordenadas de 6,612, -0,436 e 8,052 para os eixos x, y e z, respectivamente. Além disso, os parâmetros de tamanho escolhidos foram 116 Å (x), 106 Å (y) e 126 Å (z). A metodologia proposta por Yan *et al.* (2014) foi utilizada na preparação da enzima Cruzaína, removendo todas as moléculas de água e cargas de Gasteiger, seguido pela adição de hidrogênios polares. Essa preparação da enzima foi realizada pelo código ADT – AutoDockTools® (MORRIS *et al.*, 2009).

Como protocolo padrão, foram realizadas 50 simulações independentes, obtendo vinte configurações por simulação para os estudos de *docking* molecular e *re-docking* (MARINHO *et al.*, 2020). Para aprimorar o refinamento parcial das simulações de *docking* individuais, o critério de exaustividade foi ajustado para 64, mantendo a proteína rígida, enquanto todos os ligantes de ligação e torções foram configurados para rotacionar (NGUYEN *et al.*, 2017).

Figura 6: Valores Constantes de Inibição

$$K_i = e^{\left(\frac{\Delta G}{RT}\right)}$$

Legenda:  $K_i$  - constante de inibição;  $T$  - temperatura absoluta (298 K);  $R$  - constante dos gases ( $8,32 \text{ J.mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ );  $\Delta G$  - energia livre de ligação ( $\text{kJ.mol}^{-1}$ )

O Desvio Quadrático Médio (RMSD) foi utilizado como critério de seleção para se obter a melhor configuração, tendo valores ideais inferiores a 2.0 Å (YUSUF *et al.*, 2008). Além disso, os valores da energia livre de ligação ( $\Delta G$ ) foram considerados apenas abaixo de -6.0 kcal/mol (MARINHO *et al.*, 2020; SHITYAKOV & FOERSTER, 2014). Em seguida, os valores da energia livre de ligação da melhor configuração foram utilizados para calcular os valores constantes de inibição ( $K_i$ ) (Figura 6) para cada complexo (KADELA-TOMANEK *et al.*, 2021).

Os limites propostos por Imberty *et al.*, (1991) foram utilizados para avaliar a força de ligação de hidrogênio com base nos valores das distâncias entre os átomos doadores e os receptores. Essas interações foram classificadas como fortes quando as distâncias estavam no intervalo de 2,5 Å a 3,1 Å; como médias com uma distância de 3,1 Å a 3,55 Å; como fracas quando as distâncias eram superiores a 5,0 Å. (IMBERTY *et al.*, 1991).

A técnica de *re-docking* foi realizada para validar todas as simulações. As simulações foram realizadas com os mesmos parâmetros para obter dados comparativos com o Benznidazol (Bz) (ChemSpider ID 29299) e com o ligante (3S)-3-(4-((1S)-1,2-dimetil-1-[(quinolin-6-ilmetil)amino]propil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)heptan-2-ona (KB2) co-cristalizado na enzima Cruzaína.

### 3.3.5 Simulação de Dinâmica Molecular (MD)

As simulações de Dinâmica Molecular (MD) foram conduzidas utilizando o software GROMACS (GRoningen MAchine for Chemical Simulation) na versão 2020.4 (BERENDSEN *et al.*, 1995). Para a realização da simulação, a melhor configuração obtida do *docking* foi utilizada. Os parâmetros necessários para a simulação e o sistema de solvatação foram obtidos através do site CHARMM-GUI (<https://www.charmm-gui.org/>). Foram realizadas dinâmicas de equilíbrio de 1 ns com os conjuntos NVT e NPT, a uma temperatura de 310 K. A última fase foi a produção e a simulação, realizada em 200 ns através do integrador Leap-Frog (VAN GUNSTEREN & BERENDSEN, 1988), com a mesma temperatura e pressão utilizadas na etapa de equilíbrio.

## 3.4 Atividade anti-chagásica

### 3.4.1 Preparação da amostra

O Benznidazol (Bz), fármaco de referência, foi doado pelo Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE). Todas as substâncias (Chalcona DF e Benzonidazol) 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 - NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM; pH 7,4) a fim de se obter as soluções de trabalho, de modo que a concentração de DMSO nos grupos experimentais não excedesse 0,5%.

### 3.4.2 Citotoxicidade em células hospedeiras de mamíferos

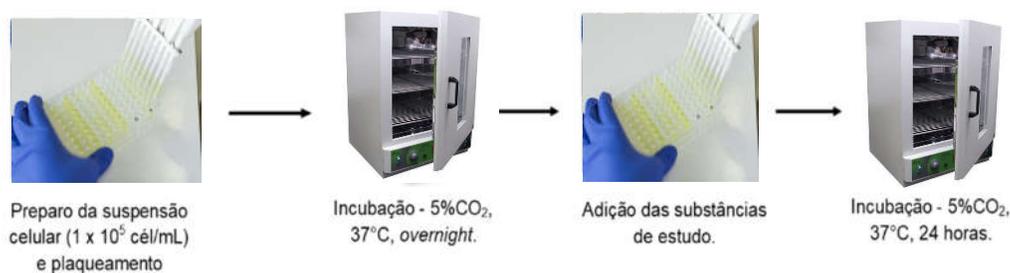
A citotoxicidade da chalcona DF foi investigada em células LLC-MK2 para avaliar a seletividade das mesmas pelo *Trypanosoma cruzi* em relação às células hospedeiras.

As células LLC-MK2 (ATCC CCL-7), 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 e estreptomicina – 130 mg/mL). Após atingirem estado de confluência, o meio foi removido e 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. As mesmas foram cultivadas em garrafas plásticas estéreis (75 cm<sup>2</sup>) em estufa de CO<sub>2</sub> (37,0 ± 0,3°C, 5% CO<sub>2</sub>).

A avaliação da citotoxicidade da chalcona DF foi realizada pelo ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), conforme descrito anteriormente (MOSMANN, 1983). Nesse ensaio a viabilidade celular é avaliada através da medição da concentração de formazan (coloração roxa), produzido através da metabolização do MTT (coloração amarela) pela célula, via espectrofotometria a 570 nm.

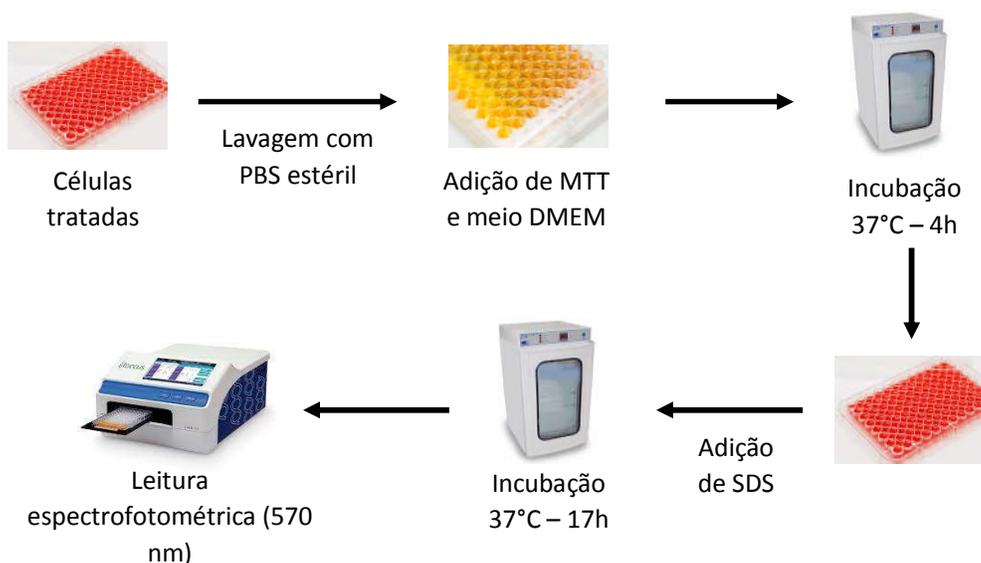
Para isso, uma suspensão contendo 1 × 10<sup>5</sup> células/mL de LLC-MK2 foi distribuído em placa de 96 poços (200 µL/poço) contendo DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e incubados *overnight* (37,0 ± 0,3°C, 5% de CO<sub>2</sub>). Posteriormente, os grupos experimentais foram tratados com a chalcona DF (1000 – 15,6 µM) ou Bz (1000 – 15,6 µM) por 24 horas (Figura 7).

Figura 7: Protocolo de tratamento das células LLC-MK2 com chalcona DF e Benzonidazol.



Após isso, cada poço foi lavado com 100  $\mu$ L de PBS estéril, e 10  $\mu$ L de solução de MTT (2,5 mg/mL) foram adicionados, juntamente com 100  $\mu$ L de DMEM 10% SBF, e as placas incubadas no escuro a 37°C por 4 horas. Em seguida, foi adicionada 90  $\mu$ L solução dodecil sulfato de sódio (SDS) (10% m/v em HCl 0,05N). Após 17 horas, a absorbância foi medida a 570 nm. O grupo controle foi tratado apenas com PBS e o branco foi ajustado com uma mistura de meio de cultura, MTT e SDS (Figura 8).

Figura 8: Protocolo de avaliação de viabilidade celular – Ensaio MTT.



A viabilidade celular do grupo controle foi considerada como 100%, sendo os outros grupos ajustados proporcionalmente à leitura da absorbância. A porcentagem de células viáveis foi utilizada para avaliar a concentração capaz de reduzir a viabilidade celular em 50% ( $CC_{50}$ ) por regressão não-linear.

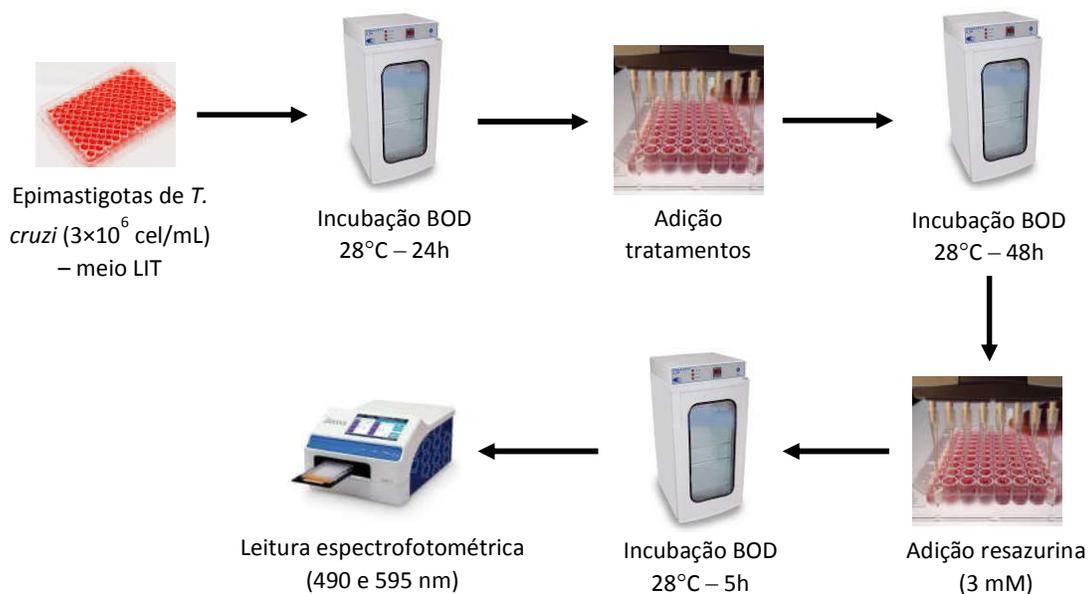
### 3.4.3 Efeito antiproliferativo em formas epimastigotas

As formas epimastigotas (cepa Y) de *Trypanosoma cruzi* foram cedidas pelo Laboratório de Bioquímica de Parasitos da Universidade de São Paulo (USP) e cultivadas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*, com NaCl 4 g/L;  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  11,6 g/L; KCl 0,4 g/L; glicose 2,2 g/L; triptose 5 g/L; infusão de fígado 5 g/L; hemina 25 mg/L; pH 7,4) suplementado com 10% de SBF e antibióticos (penicilina – 200 UI/mL e estreptomicina – 50 mg/L). As culturas foram mantidas a  $28 \pm 1^\circ C$  em estufa BOD (*Biochemical Oxygen*

*Demand*) em garrafas estéreis (ARAÚJO-JORGE; CASTRO, 2000). Os parasitos foram cultivados na densidade de  $1 \times 10^6$  células/mL e avaliados diariamente até atingirem a fase exponencial da curva de crescimento (6° ao 8° dia de cultivo)

Para avaliar o efeito antiproliferativo da chalcona DF contra as formas epimastigotas, um ensaio de redução de resazurina (ROLÓN *et al.*, 2006) foi realizado. Para tanto, uma suspensão de epimastigotas de *T. cruzi* ( $3 \times 10^6$  epimastigotas/mL) em meio LIT foi incubada em incubadora BOD a 28°C por 24 horas. Após isso, os parasitos foram incubados em placa de 96 poços (200 µL/poço) com a chalcona DF (1000 – 15,6 µM) ou Bz (1000 – 15,6 µM) por 48 horas, seguido da adição da solução de resazurina (3 mM) e nova incubação por 5 horas. Finalmente, a absorbância foi medida em 490 e 595 nm (Figura 9). A porcentagem de epimastigotas viáveis foi utilizada para determinar a concentração que inibiu o crescimento dos parasitos em 50% (IC<sub>50</sub>), via regressão não linear.

Figura 9: Protocolo ensaio de redução de resazurina.

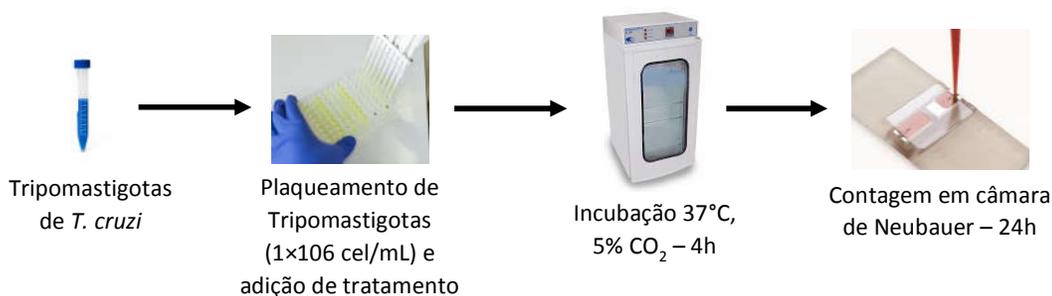


### 3.4.4 Efeito tripanocida em formas tripomastigotas

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

Para avaliação do efeito tripanocida, placas de 96 poços (200 µL/poço) foram incubadas com 1×10<sup>6</sup> tripomastigotas/mL/poço com a chalcona DF (1000 – 15,6 µM) ou Bz (1000 – 15,6 µM) por 24 horas em DMEM 10% FBS em incubadora BOD (5% de CO<sub>2</sub>, 37°C). Parasitos não tratados constituíram o controle negativo e considerados como 100% de viabilidade. A porcentagem de tripomastigotas viáveis foi determinada por contagem em câmara de Neubauer (Figura 10) (DE MENEZES *et al.*, 2019b), possibilitando determinar a concentração tripanocida para 50% dos parasitos (LC<sub>50</sub>) e o índice de seletividade (SeI), que é a razão entre CC<sub>50</sub> e LC<sub>50</sub> (KESSLER *et al.*, 2013).

Figura 10: Ensaio avaliação efeito tripanocida de chalcona DF.



## 3.5 Ensaios de citometria de fluxo

### 3.5.1 Vias de morte celular

A avaliação do mecanismo de morte celular dos epimastigotas foi realizada via citometria de fluxo, utilizando 7-aminoactinomicina D (7-AAD), marcador de perda de integridade de membrana, e Anexina V conjugada com ficoeritrina (AxPE), marcador

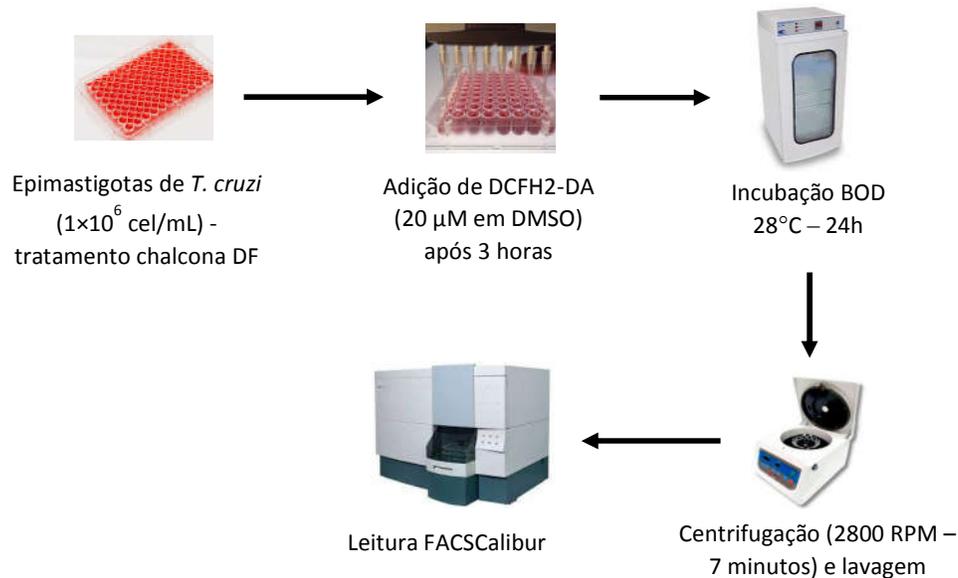
para a morte celular programada (CHAN *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2020). Com esse objetivo, 1 mL de suspensão contendo  $1 \times 10^6$  epimastigotas/mL foi cultivado em placa de 24 poços e tratado com chalcona DF (62,5 e 125  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas em uma incubadora BOD. Em seguida, as células foram marcadas com kit comercial (BD Biosciences) de acordo com as especificações do fabricante. Os dados (10.000 eventos selecionados) foram adquiridos em um citômetro de fluxo BD FACSCalibur (detectores FL2 e FL3 para AxPE e 7-AAD, respectivamente) utilizando o software CellQuest Pro™. Os eventos foram classificados e quantificados em porcentagem de acordo com a marcação com 7-AAD ou AxPE, seja individualmente ou com marcação dupla.

### 3.5.2 Acumulação citoplasmática de ROS

O ROS (*Reactive Oxygen Species*) citoplasmático foi avaliado com o marcador 2',7'-Diclorofluoresceína diacetato (DCFH<sub>2</sub>-DA), de livre passagem através da membrana plasmática. Esterases citosólicas realizam a hidrólise de DCFH<sub>2</sub>-DA, formando DCFH<sub>2</sub>, e sua oxidação por ROS geram um produto emissor de fluorescência verde, a 2',7'-diclorofluoresceína oxidada (DCF) (RAJNEESH *et al.*, 2017). Ao ser excitado no comprimento de 488 nm, DCF emite fluorescência na faixa de 515-545 nm (verde).

Conforme descrito, formas epimastigotas de *T. cruzi* em uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL foram tratadas com chalcona DF (62,5 e 125  $\mu\text{M}$ ). Após 3 horas do tratamento, foi adicionado DCFH<sub>2</sub>-DA (concentração final de 20  $\mu\text{M}$  em DMSO), seguido de incubação em BOD por 24 horas. Para a leitura, os grupos experimentais foram transferidos para tubos de citometria, lavados duas vezes e ressuspensos em 500  $\mu\text{L}$  de PBS, sendo então feita a aquisição mínima de 10.000 eventos no equipamento FACSCalibur (Figura 11). Os resultados foram expressos pela Intensidade Relativa de Fluorescência (RFI), calculada a partir da média geométrica das intensidades de fluorescência dos grupos testes em relação ao controle (KESSLER *et al.*, 2013).

Figura 11: Protocolo de marcação DCFH<sub>2</sub>-DA e avaliação de acúmulo CITOPLASMÁTICO DE de ROS.



### 3.5.3 Potencial transmembrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )

O efeito da chalcona DF no potencial transmembrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) das formas epimastigotas de *T. cruzi* foi avaliado usando o marcador catiônico Rodamina 123 (Rho123) (MERCK®, Darmstadt, Alemanha), por sua capacidade de ser atraído pelo potencial elétrico negativo da matriz mitocondrial, emitindo uma fluorescência vermelha (O'CONNOR *et al.*, 1988; BARACCA *et al.*, 2003; ITOH *et al.*, 2017). Alterações na integridade mitocondrial estão relacionadas ao desequilíbrio das funções celulares e que podem levar à morte celular. Quando essa integridade é comprometida, ocorre um acúmulo de Rho123 no citoplasma celular, onde emite fluorescência na cor verde.

Com esse objetivo, formas epimastigotas de *T. cruzi* em concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL foram tratadas com a chalcona DF (62,5 e 125 µM) por 24 horas, seguido de centrifugação (2800 rpm/ 7 minutos) e duas lavagens com PBS. A marcação com Rho123 (concentração final de 10 µg/mL) foi realizada através de incubação durante 30 minutos no escuro, seguido de duas lavagens com PBS e ressuspensão em 500 µL de PBS para leitura por citometria de fluxo, utilizando detector FL<sub>2</sub> (DE MENEZES *et al.*, 2019b). Os resultados foram expressos como Intensidade Relativa de Fluorescência (RFI).

### 3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram tratadas com a chalcona DF em sua concentração de IC<sub>50</sub> (93,6 µM) em placa de 24 poços de fundo chato, com lamínula de vidro no fundo. Após incubação por 24 horas a 28°C, os parasitos foram lavados com PBS e fixados com uma solução de 2,5% de glutaraldeído (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pensilvânia). Após fixação por 2 horas à temperatura ambiente, os parasitos foram lavados com PBS e, em seguida, desidratados em série alcoólica crescente de etanol. Posteriormente, as amostras foram secas com CO<sub>2</sub>, montados em suportes de alumínio (stubs), revestidas com camada de 20 nm de ouro e observadas em um microscópio eletrônico de varredura FEG Quanta 450 (FEI, Oregon, EUA) em condição de alto vácuo, com as imagens sendo obtidas por detector Everhart–Thornley (ETD) em modo de elétron secundário (SE), para observação de alterações na superfície celular. Imagens digitais foram adquiridas com seus respectivos softwares e armazenadas (LIMA *et al.*, 2016).

### 3.7 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata (n=3) em três experimentos independentes. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média (SEM), e a comparação entre grupos experimentais foi realizada por One-way ANOVA ou Two-way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, utilizando p<0,05 como critério de significância. Microsoft Excel 2016 e GraphPad Prism 5.0 foram utilizados para análise e obtenção de gráficos (SWIFT, 1997).

# **RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análise estrutural

O espectro  $^1\text{H}$  NMR (Tabela 1) da chalcona DF apresentou sinais em 8,69 (s, H2), 7,45 (d,  $J = 8,25$  Hz, H6), 7,39 (d,  $J = 8,35$  Hz, H5), 8,22 (d,  $J = 8,60$  Hz, H2'/6') e 6,63 (d,  $J = 8,60$  Hz, H3'/5') ppm relativos aos hidrogênios aromáticos. Tais sinais também podem ser observados no espectro  $^{13}\text{C}$  NMR em  $\delta_{\text{C}}$  112,3 (C2), 110,0 (C5), 122,5 (C6), 130,3 (C2'/6') and 112,6 (C3'/5') ppm. Os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,71 (d,  $J = 15,80$  Hz) e 7,82 (d,  $J = 15,50$  Hz) foram atribuídos a dupletos referentes a hidrogênios  $\alpha,\beta$ -insaturados, cuja constante de acoplamento ( $J$ ) confirma a estereoquímica *E*. No espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR, esses sinais são observados em 125,2 ( $\text{C}\alpha$ ) e 143,3 ppm ( $\text{C}\beta$ ), relacionados aos carbonos olefinicos  $\alpha$  e  $\beta$ , respectivamente. O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  187,7 ppm refere-se ao grupo carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturado. Esse valor pode ser justificado devido à presença de insaturação  $\alpha,\beta$ , que causa um deslocamento para o campo magnético mais elevado, e a provável causa é a delocalização de carga pelo anel de benzeno ou pela ligação dupla, tornando o carbono carbonílico menos deficiente em elétrons (Tabela 1).

Tabela 1: Dados RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) in (DMSO,  $\delta$ , ppm, J/Hz)

C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	HMBC	
			$^2\text{J}$	$^3\text{J}$
1'	127,1		H-2'/H-6'	H-3'/H-5'
2'	130,3	8,22 (d, $J = 8,60$ Hz)	H-3'/H-5'	
3'	112,6	6,63 (d, $J = 8,60$ Hz)		
4'	155,0			
5'	112,6	6,63 (d, $J = 8,60$ Hz)		
6'	130,3	8,22 (d, $J = 8,60$ Hz)		
C=O	187,7		H- $\alpha$	H- $\beta$
$\text{C}\alpha$	125,2	7,71 (d, $J = 15,80$ Hz)	H- $\beta$	
$\text{C}\beta$	143,3	7,82 (d, $J = 15,50$ Hz)	H- $\alpha$	
1	126,7			
2	112,3	8,69 (s)		
3	153,7		H-2	
4	155,0			
5	110,0	7,39 (d, $J = 8,35$ Hz)	H-6	
6	122,5	7,45 (d, $J = 8,25$ Hz)	H-5	
7	185,5			

## 4.2 Preparação e otimização dos ligantes

No preparo da molécula de chalcona DF para os estudos de interação com a enzima Cruzaína, a molécula foi submetida a um cálculo quântico para obter a geometria molecular no mínimo global e suas propriedades eletrônicas, a fim de compreender seu comportamento químico. Inicialmente, foi realizada a análise do Potencial de Energia Superficial (PES) relaxado por meio de cálculos no nível de teoria B3LYP/6-311++G(d,p) em fase gasosa para obter a configuração no mínimo global de energia (Figura 12a).

Conforme observado na Figura 12a, a estrutura molecular da chalcona DF é quase planar. A curva em vermelho corresponde à rotação em torno do diédrico C3C4C11C $\alpha$ , que representa a rotação do anel A em torno do plano da estrutura  $\alpha,\beta$ -insaturada, enquanto o anel B permanece estacionário coplanar ao grupo carbonila. O valor mínimo de energia ocorre quando há um ângulo de aproximadamente  $-0.184^\circ$ , indicando uma leve distorção na posição do anel A. A curva em preto representa a rotação em torno do diédrico C $\alpha$ C $\beta$ C20C22, ou seja, o anel B gira em relação ao plano da estrutura insaturada, enquanto o anel A permanece estacionário coplanar ao grupo carbonila. É possível notar que o anel B permanece quase no mesmo plano da estrutura  $\alpha,\beta$ -insaturada da chalcona, e o mínimo de energia ocorre em uma angulação de aproximadamente  $-1.261^\circ$ . A partir desses dados, foi possível otimizar a molécula de chalcona de interesse no mesmo nível de teoria utilizado para o cálculo do PES, e essa estrutura otimizada é mostrada na Figura 12b.

Figura 12: Superfície de Energia Potencial (SEP) e estrutura tridimensional otimizada. (A) SEP relaxada no nível de teoria B3LYP/6-311++G(d,p) em fase gasosa e (B) estrutura tridimensional otimizada em seu espaço conformacional obedecendo ao estado de energia mais baixa.

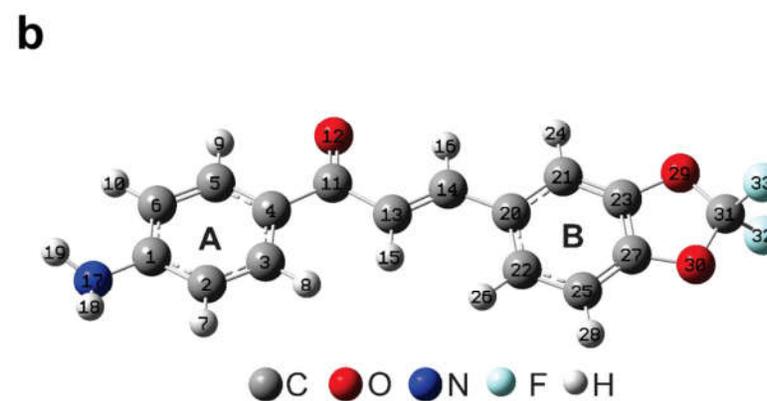
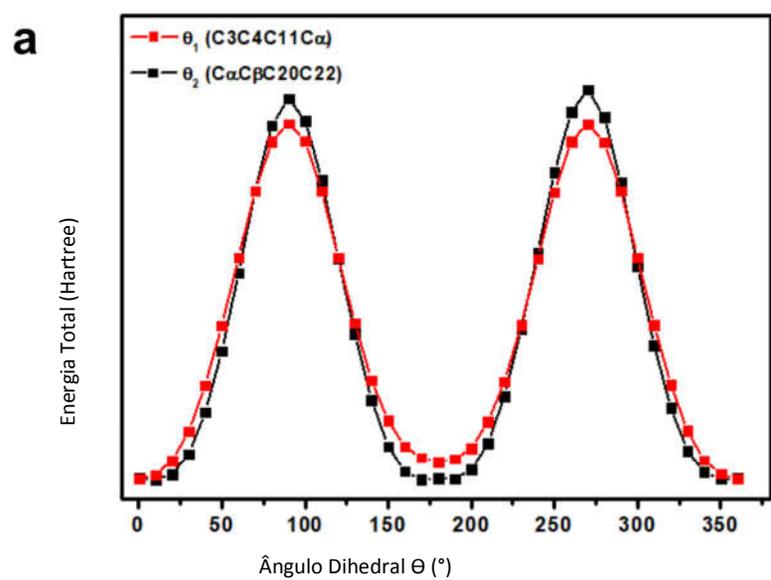
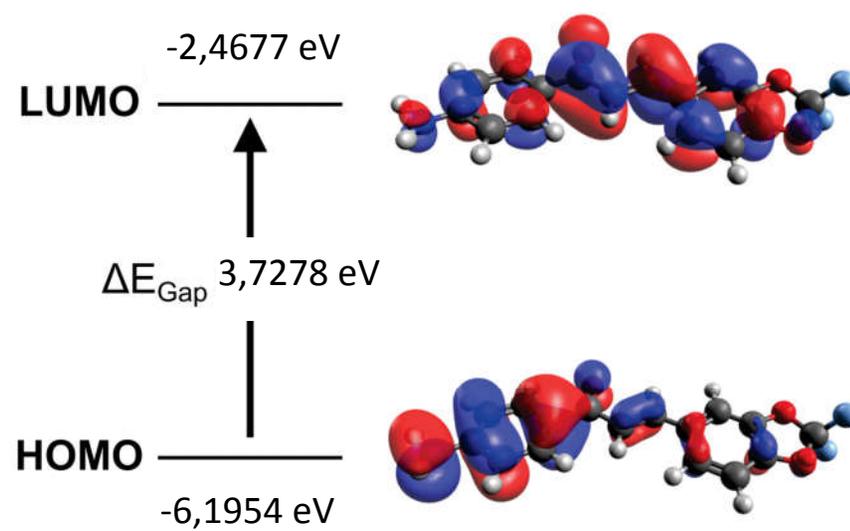


Figura 13: Orbitais Moleculares Fronteiriços HOMO e LUMO da chalcona DF. Orbitais calculados no nível de teoria B3LYP/6-311++G(d,p) em fase gasosa, e renderizados usando um valor de isovalor de 0.03 para ambos os orbitais.



Na Figura 13, são apresentadas as superfícies isoespaciais para o HOMO (Orbital Molecular Ocupado Mais Alto) e o LUMO (Orbital Molecular Desocupado Mais Baixo) da chalcona em questão, calculadas no nível de teoria B3LYP/6-311++G(d,p) em fase gasosa. Essas superfícies foram renderizadas utilizando o software Avogadro© com um de isovalor de 0,03. O HOMO está principalmente distribuído sobre o anel A, o grupo amina e o grupo carbonila, havendo uma distribuição leve sobre a ligação dupla C=C e os átomos C20, C21 e C27 no anel B. No caso do LUMO, a densidade eletrônica está principalmente distribuída sobre os anéis A e B, o grupo amina, o grupo carbonila e a ligação dupla C=C, e há uma distribuição leve sobre o átomo de oxigênio O29.

De acordo com essa distribuição da densidade eletrônica, pode-se observar que o HOMO é um orbital molecular  $\pi$ , e o LUMO é um orbital molecular  $\pi^*$ , indicando que interações da chalcona DF com resíduos de aminoácidos envolverão interações  $\pi$ . Se essa molécula doa densidade eletrônica usando o HOMO, a molécula usará o anel A para interagir com a outra molécula. No entanto, se essa molécula receber densidade eletrônica, espera-se que essa chalcona tenha um caráter eletrofílico mais pronunciado do que um caráter nucleofílico, pois a carga extra negativa pode se espalhar por toda a molécula devido ao LUMO. Essa tendência também pode ser observada a partir do valor de energia calculado para o HOMO e o LUMO, que são, respectivamente, -6,1954 eV e -2,4677 eV (Tabela 2). Esse resultado indica que o LUMO pode estabilizar a carga extra negativa que a chalcona DF recebe em uma interação química, o que está relacionado a um caráter eletrofílico mais pronunciado.

A partir desses valores de energia do HOMO e do LUMO, foi possível calcular os descritores globais de reatividade quântica, como mostrado na Tabela 2. De acordo com o resultado, observa-se que essa chalcona possui um alto potencial de ionização (6,1954 eV), relacionado a um caráter eletrofílico mais pronunciado quando comparado ao caráter nucleofílico. Fato evidenciado ao comparar os índices eletrofílico (5,0331 eV) e nucleofílico (0,1987 eV). Indicando que a chalcona DF deve se comportar como uma espécie eletrofílica.

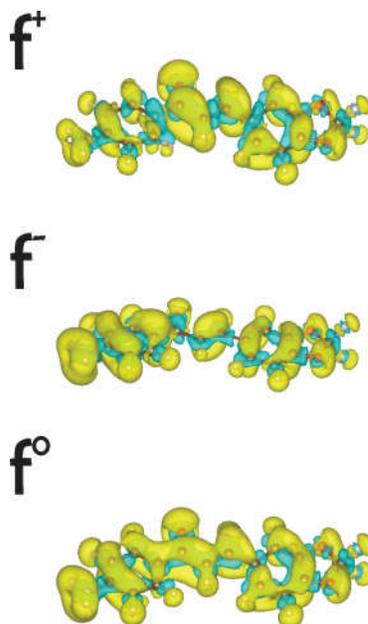
**Tabela 2:** Descritores globais de reatividade quântica calculados no nível de teoria B3LYP/6-311++G(d,p) em fase gasosa.

Descritores globais de reatividade quântica	Chalcona
Energia HOMO ( $E_{HOMO}/\text{eV}$ )	-6,1954
Energia LUMO ( $E_{LUMO}/\text{eV}$ )	-2,4677
Energia gap ( $\Delta E_{Gap}/\text{eV}$ )	3,7278
Potencial de Ionização (I / eV)	6,1954
Afinidade Eletrônica (A / eV)	2,4677
Electronegatividade ( $\chi/\text{eV}$ )	4,3316
Dureza Global ( $\eta/\text{eV}$ )	1,8639
Suavidade Global ( $\sigma/\text{eV}^{-1}$ )	0,5365
Índice Eletrofílico ( $\omega/\text{eV}$ )	5,0331
Índice Nucleofílico ( $\varepsilon/\text{eV}^{-1}$ )	0,1987

Na sequência, o comportamento químico da chalcona DF foi estudado localmente usando as funções de Fukui (Eletrônica e Condensada), o descritor dual e o índice multifílico. A função de Fukui Eletrônica, calculada a partir da densidade eletrônica da molécula, pode ser utilizada na compreensão do comportamento químico da molécula (nucleofílico, eletrofílico ou radical). As isosuperfícies para a função de Fukui Eletrônica são mostradas na Figura 14. A isosuperfície em verde corresponde a um valor positivo da função de Fukui, enquanto a azul está relacionada a um valor negativo. O  $f^+$  está relacionado ao ataque nucleofílico, o que significa a atuação da molécula como um eletrófilo; o  $f^-$  está relacionado ao ataque eletrofílico, o que significa a atuação da molécula como um nucleófilo; o  $f^o$  está relacionado ao ataque radical, o que significa a atuação da molécula como um espécie radical.

Para a chalcona DF, os sítios atômicos favoráveis a um ataque nucleofílico (Figura 14) são C1, C2, C3, C5, C6, C11, C13, C14, C21, C22, C23, C27, O12, O30, N17, C129 e F32. Para o ataque eletrofílico, os sítios atômicos mais suscetíveis são C2, C3, C4, C5, C6, C13, C14, C20, C21, C22, C23, C25, C27, O12, O29, O30, N17, F32 e F33. Esses resultados, em parte, concordam com os orbitais moleculares fronteiros vistos na Figura 14. Para a função  $f^+$ , a maioria dos átomos na molécula pode se comportar como um eletrófilo, pois o LUMO está distribuído por toda a molécula. Para a função  $f^-$ , o HOMO está principalmente distribuído sobre o anel A, com apenas os átomos do anel A doando sua densidade eletrônica. O resultado da função de Fukui Eletrônica sugere que a chalcona DF pode utilizar outros orbitais moleculares internos para doar densidade eletrônica. Por fim, os sítios atômicos que são suscetíveis a um ataque radical são C1, C2, C3, C4, C5, C6, C11, C13, C14, C21, C22, C23, C25, C27, O12, O30, N17, F32 e F33.

Figura 14: Isosuperfícies das funções de Fukui Eletrônica da chalcona DF, obtidas no nível de teoria B3LYP/6-311++G(d,p) na fase gasosa.



Para quantificação das funções de Fukui, foram calculadas as Funções de Fukui Condensadas utilizando a carga atômica Hirshfeld obtida a partir da densidade eletrônica (Tabela 3), onde o sinal matemático dos descritores dual e multifílico está diretamente

relacionado ao tipo de ataque (nucleofílico e eletrofílico), e quanto maior o valor da função de Fukui, maior a susceptibilidade a um determinado tipo de ataque.

Tabela 3. Funções de Fukui Condensadas para chalcona DF.

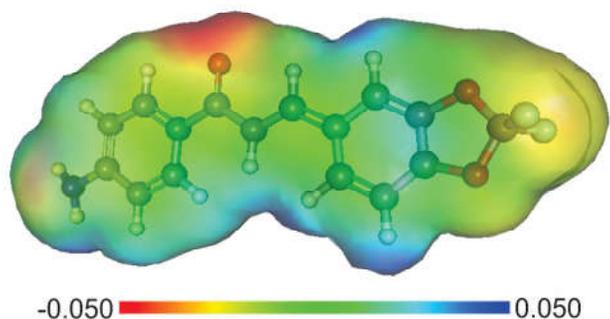
Átomo	$f_k^+$	$f_k^-$	$f_k^o$	$\Delta f$	$\Delta\omega$
C1	-0,03909	-0,04286	-0,04097	0,00377	0,018975
C2	-0,02267	-0,04702	-0,03485	0,024345	0,122531
C3	-0,0184	-0,02709	-0,02274	0,008694	0,043758
C4	-0,0012	-0,06283	-0,03202	0,061622	0,31015
C5	-0,03064	-0,03023	-0,03044	-0,00042	-0,00209
C6	-0,02487	-0,04951	-0,03719	0,024648	0,124056
H7	-0,01963	-0,02634	-0,02299	0,006708	0,033762
H8	-0,00964	-0,01795	-0,0138	0,008303	0,04179
H9	-0,02006	-0,02247	-0,02126	0,002409	0,012125
H10	-0,02088	-0,02767	-0,02428	0,00679	0,034175
C11	-0,07463	-0,01042	-0,04252	-0,06421	-0,32317
O12	-0,08847	-0,03499	-0,06173	-0,05348	-0,26916
C13	-0,05748	-0,03617	-0,04682	-0,0213	-0,10722
C14	-0,08124	-0,03541	-0,05832	-0,04583	-0,23066
H15	-0,02641	-0,01086	-0,01864	-0,01556	-0,07829
H16	-0,03162	-0,018	-0,02481	-0,01363	-0,06859
N17	-0,03085	-0,09364	-0,06224	0,062783	0,315993
H18	-0,02135	-0,03786	-0,0296	0,016506	0,083076
H19	-0,02125	-0,0382	-0,02973	0,016946	0,085291
C20	-0,02023	-0,02595	-0,02309	0,005714	0,028759
C21	-0,0355	-0,02105	-0,02828	-0,01445	-0,07271
C22	-0,03683	-0,0326	-0,03471	-0,00423	-0,02127
C23	-0,02595	-0,02692	-0,02644	0,000968	0,004872
H24	-0,02034	-0,01579	-0,01806	-0,00454	-0,02286
C25	-0,03098	-0,02472	-0,02785	-0,00626	-0,03153
H26	-0,01906	-0,0126	-0,01583	-0,00646	-0,03252
C27	-0,05065	-0,04342	-0,04704	-0,00723	-0,0364
H28	-0,0239	-0,01896	-0,02143	-0,00493	-0,02483
O29	-0,01839	-0,02365	-0,02102	0,005259	0,026469
O30	-0,02815	-0,03413	-0,03114	0,005979	0,030093
C31	-0,01147	-0,01099	-0,01123	-0,00048	-0,00241
F32	-0,01869	-0,01976	-0,01923	0,00107	0,005385
F33	-0,01866	-0,01969	-0,01917	0,001034	0,005204

Legenda: ataque nucleofílico ( $f_k^+$ ), ataque eletrofílico ( $f_k^-$ ), ataque radical ( $f_k^o$ ), o descritor dual ( $\Delta f$ ) e o índice multifílico ( $\Delta\omega$ ).

De acordo com a Tabela 3, os sítios atômicos mais suscetíveis a um ataque nucleofílico são C1, C2, C3, C4, C6, N17, C20, C23, O29, O30, F32 e F33, que estão relacionados às funções eletrônicas  $f^+$  e à distribuição do HOMO. Para o ataque eletrofílico, os sítios atômicos mais suscetíveis são C5, C11, O12, C13, C14, C21, C22, C25, C27 e C31, que estão relacionados à função eletrônica  $f^-$  e à distribuição do LUMO.

Para completar a caracterização eletrônica, o Potencial Eletrostático Molecular (MEP) foi calculado no mesmo nível computacional da otimização (Figura15). Nesta distribuição de carga, as regiões em vermelho estão negativamente carregadas; as regiões amarelo-alaranjadas estão parcialmente carregadas negativamente; as regiões verdes estão neutras; as regiões em azul claro estão parcialmente carregadas positivamente, e as regiões em azul estão positivamente carregadas.

Figura 15: Potencial Eletrostático Molecular (MEP) da chalcona DF. Calculado no nível de teoria B3LYP/6-311++G(d,p) na fase gasosa.



Observamos na Figura 15 uma distribuição de carga na cor amarela no anel A, relacionada à distribuição do HOMO sobre esses átomos. Por outro lado, no anel B, observamos uma distribuição de carga na cor verde, devido a dois átomos de flúor (F) e dois átomos de oxigênio (O) presentes, que possuem uma eletronegatividade mais alta do que os átomos de carbono do anel de benzeno. Os átomos de hidrogênio ligados aos anéis A e B têm uma distribuição de carga em azul claro. No entanto, os átomos de hidrogênio ligados ao átomo de nitrogênio no grupo amina têm uma distribuição azul, indicando um papel desses átomos nas Ligações de Hidrogênio, importantes na interação química com os resíduos de aminoácidos das proteínas-alvo. Finalmente, o átomo de oxigênio do grupo carbonila tem uma distribuição de carga vermelha, relacionada à maior eletronegatividade desse átomo, sendo importante para estabelecer Ligações de Hidrogênio.

### 4.3 Estudo ADMET baseado em Otimização Multiparamétrica (MPO)

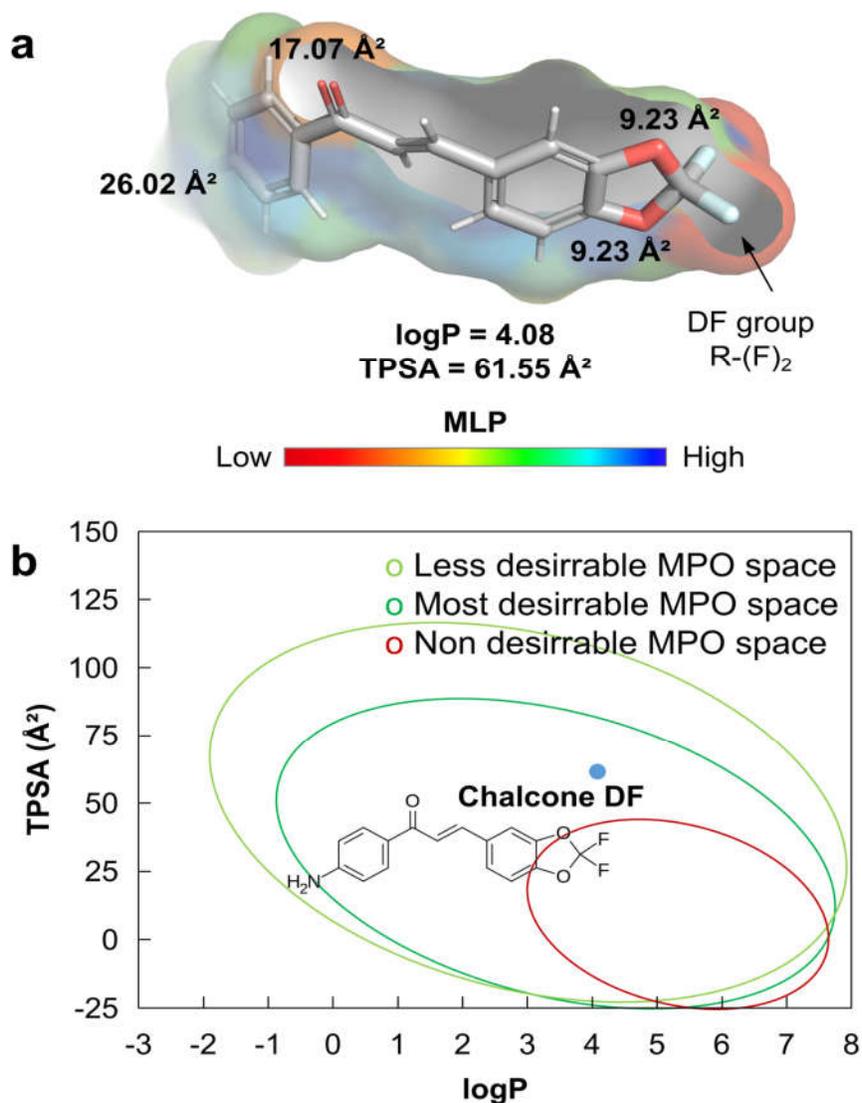
#### 4.3.1 Análise topológica

Em uma análise topológica inicial, é possível observar que a cetona em cadeia aberta e o fragmento de anilina contribuem fortemente para a polaridade da chalcona DF de 61,55 Å<sup>2</sup> (espectro vermelho), com áreas de superfície polar calculadas de 17,07 Å<sup>2</sup> e 26,02 Å<sup>2</sup> (Ertl, 2007), respectivamente (Figura 16a). Em adição, a chalcona DF também apresentou uma baixa lipofilicidade (logP 4,08) (Tabela 4)

Tabela 4: Propriedades físico-químicas da chalcona DF. Aplicadas aos limites de desejabilidade da regra da Pfizer, Inc..

Propriedade	Valor	T <sup>0</sup>
logP	4.08	0,46
logD	4.08	0,00
MW	303,26 g/mol	1,00
TPSA	61,55 Å <sup>2</sup>	1,00
HBD	1	0,75
pKa mais básico	3,04	1,00
Pontuação MPO		4,21

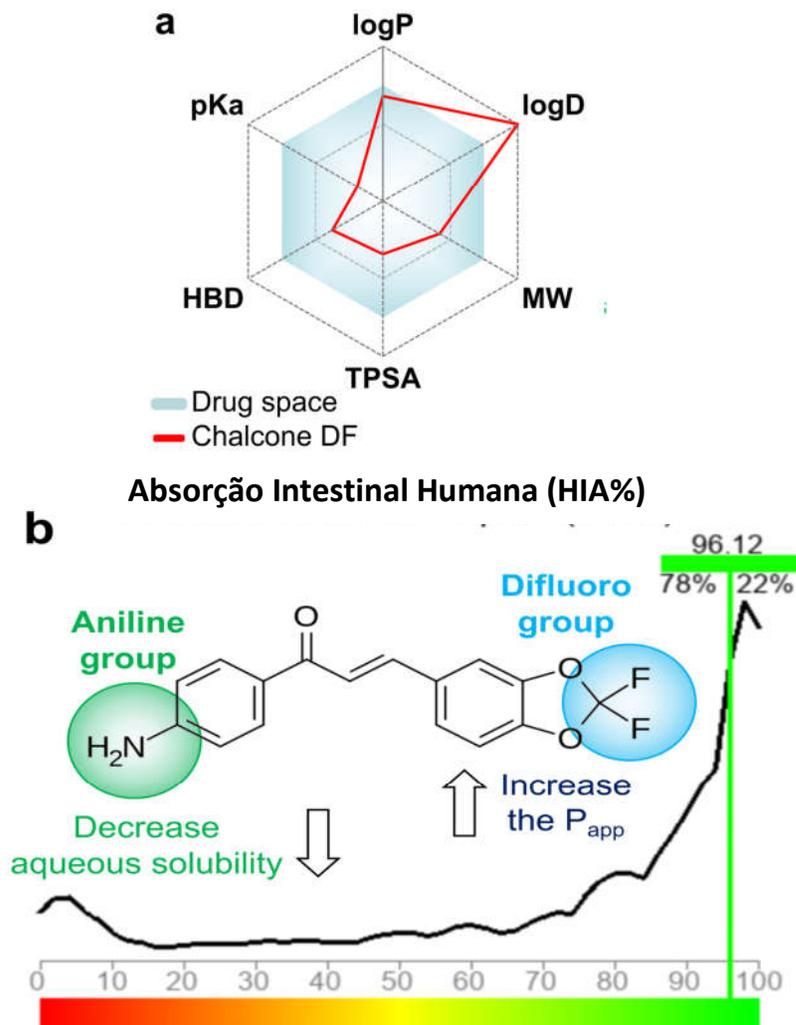
Figura 16: Análise topológica da chalcona DF. (a) Análise topológica; (b) Espaço de medicamentos MPO para estimar o alinhamento de atributos ADMET.



Na Figura 17a, é possível observar que a lipofilicidade calculada em pH 7,4 (logD) depende da distribuição das microespécies químicas da chalcona DF, onde a natureza básica (H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>) resulta em uma lipofilicidade de ordem crescente devido à formação do ácido conjugado tipo H<sub>2</sub>N, com um valor de pK<sub>a</sub> na ordem de 3,04 (Tabela 4), resultando em um escore de MPO = 4,21 (em uma escala de 0 a 6), o que indica farmacocinética viável (MPO > 4,0). Em uma análise de relação estrutura-atividade (Figura 17b), é possível observar que esse fragmento contribui para a diminuição da solubilidade aquosa da substância. Ao mesmo tempo, o grupo fluorado substituído desempenha um papel

fundamental no aumento da permeabilidade aparente passiva ( $P_{app}$ ) e estabilidade metabólica da chalcona (PETTERSSON *et al.*, 2016), aprimorando a absorção no trato gastrointestinal e resultando em uma HIA de pelo menos 96%.

Figura 17: Radar MPO e Análise da relação Estrutura-Atividade da chalcona DF. (a) Radar de espaço de medicamentos pelo algoritmo MPO; (b) Previsão de Absorção Intestinal Humana (HIA%) baseada em Relação Estrutura-Atividade (SAR).



### 4.3.2 Descritores farmacocinéticos previstos

As análises corroboraram a previsão de atributos farmacocinéticos, onde o  $P_{app}$  Caco-2 é estimado em  $2,1 \times 10^{-5}$  cm/s, e a probabilidade moderada de inibição da P-gp indica que a chalcona possui permeabilidade aparente maior do que o efluxo passivo. Entretanto, a baixa taxa de depuração estimada em 33,86 mL/min/kg ( $CL_{int,u} < 100$  mL/min/kg) indica que a estabilidade metabólica do composto promove uma boa bioabsorção oral (VAN DE WATERBEEMD & GIFFORD, 2003). Quando alinhados, esses atributos concordam com a HIA prevista de 96,12%, cuja lipofilicidade e natureza básica resultaram em uma taxa de ligação à proteína plasmática (PPB) inferior a 90%, estimando uma distribuição viável entre o fluido plasmático e os tecidos biológicos, aumentando a eficácia da chalcona.

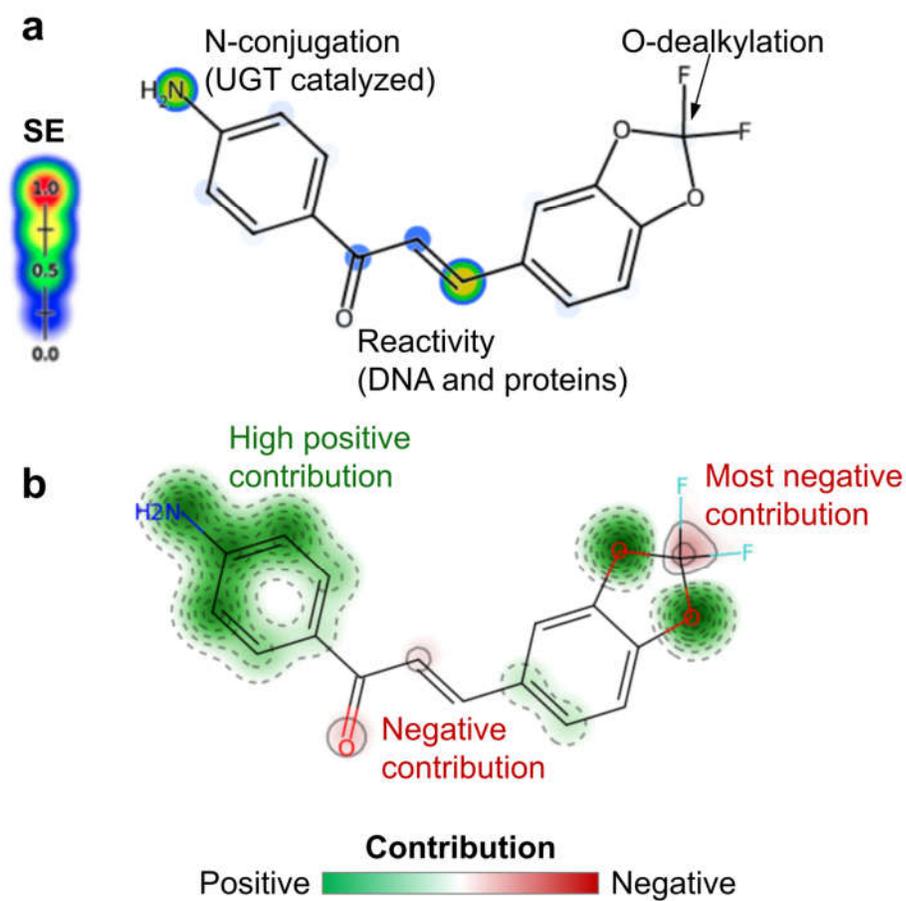
Tabela 5: Propriedades farmacocinéticas. Previstas por meio de testes de consenso ADMET entre as plataformas PreADMET e ADMETboost.

Propriedade	PreADMET	ADMETboost
$P_{app}$ Caco-2	$2,1 \times 10^{-5}$ cm/s	-5,19 log cm/s
Inibidor P-gp	Sim	35,89%
Taxa PPB	88,65%	58,15%
Substrato CYP2D6	Não	68,58%
Substrato CYP3A4	Não	35,03%
$CL_{int,u}$	-	33,86 mL/min/kg
LD <sub>50</sub> Roedor	-	2,51 mol/kg
LC <sub>50</sub> <i>Pimephales promelas</i> (peixe)	0,000501213 mg/L	-
LC <sub>50</sub> <i>Daphnia magna</i>	0,0198755 mg/L	-
LC <sub>50</sub> alga	0,0188578 mg/L	-

### 4.3.3 Sítio de metabolismo e predição de toxicidade aguda

No mapa relacionando sensibilidade e especificidade (Figura 18), podemos observar que o anel benzodioxol substituído tem um local de O-desalquilação no centro difluorossustituído, embora com baixa sensibilidade. Ao observar o risco tóxico dessa biotransformação, é possível notar uma contribuição negativa de baixa intensidade, refletindo uma fraca contribuição para a toxicidade aguda da chalcona (Figura 18b).

Figura 18: Mapa de relação sensibilidade e especificidade. (a) Predição do sítio de metabolismo; (b) Predição dos fragmentos tóxicos.



#### 4.4 Dinâmicas e *docking* molecular

Inicialmente, a raiz quadrada do desvio quadrático médio (RMSD) foi utilizado para validar estatisticamente as simulações de *docking* molecular e *re-docking* para a formação do complexo e seleção da melhor conformação. O RMSD é calculado com base na distância média entre os átomos do receptor e os átomos do ligante, e possui critérios de validação com valores abaixo de 2,0 Å. Todas as simulações realizadas (*docking* e *re-docking*) apresentaram valores de RMSD abaixo ou próximos a 2,0 Å, destacando a melhor pose do complexo Chalcona-Cruzaína, que apresentou um RMSD da ordem de 1,692 Å (Tabela 6).

A energia livre de ligação do complexo Chalcona-Cruzaína (Tabela 6) apresentou um  $\Delta G$  de -7,5 kcal/mol. Por outro lado, os complexos Bz-Cruzaína e KB2-Cruzaína apresentaram valores de energia livre de ligação de -6,0 kcal/mol e -5,6 kcal/mol, respectivamente. A constante de inibição (Tabela 5) mostrou valores de  $3,160 \times 10^{-6}$  (pKi = 5,50),  $3,979 \times 10^{-5}$  (pKi = 4,40) e  $7,818 \times 10^{-5}$  (pKi = 4,11) para Chalcona-Cruzaína, Bz-Cruzaína e KB2-Cruzaína, respectivamente.

Tabela 6: Valores de energia livre de ligação e RMSD. Valores referentes aos complexos formados após simulações de *docking* molecular e *re-docking* contra a enzima Cruzaína.

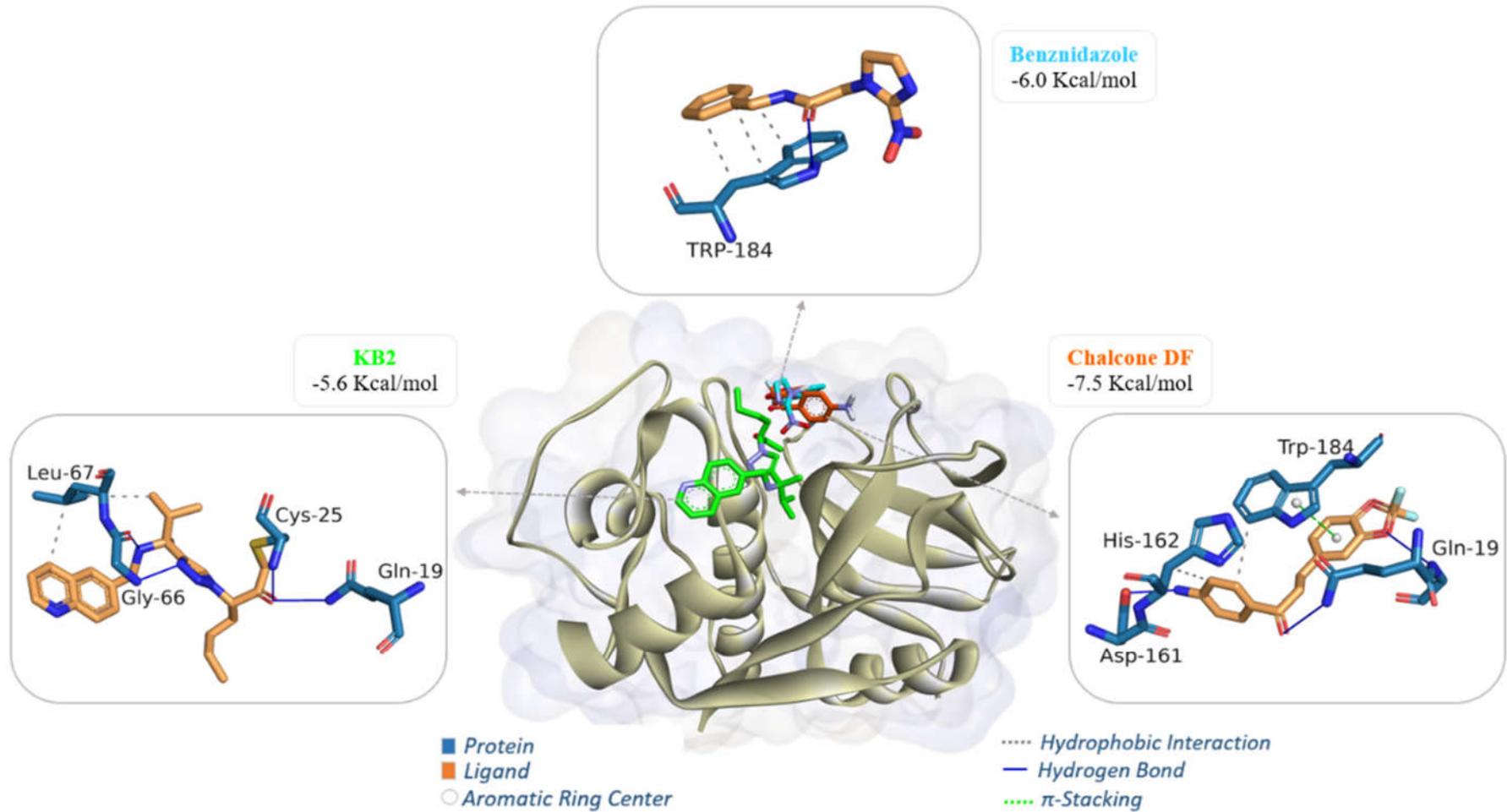
Complexo	Parâmetros			
	Energia (kcal/mol)	Ki	pKi	RMSD (Å)
Chalcona-cruzaina	-7,5	$3,160 \times 10^{-6}$	5,50	1,146
BZN-cruzaina	-6,0	$3,979 \times 10^{-5}$	4,40	1,729
KB2-cruzaina*	-5,6	$7,818 \times 10^{-5}$	4,11	1,590

Legenda: (BZN) Benzonidazol; (\*) ligante co-cristalizado; (KB2) KB2: (3S)-3-(4-((1S)-1,2-dimethyl-1-[(quinolin-6-ylmethyl)amino]propyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)heptan-2-one.

Com relação às interações envolvidas na formação do complexo enzima-ligante, foi possível identificar que o complexo Chalcona-Cruzaína é formado por três ligações de hidrogênio, sendo duas fortes com os átomos de oxigênio da chalcona com os resíduos Gln 19 A (2,99 Å) e Asp 161 A (2,41 Å), e uma de intensidade média com o aminoácido Gln 19 A (3,36 Å). Além disso, esse complexo apresenta duas interações hidrofóbicas envolvendo os aminoácidos His 162 A (3,78 Å) e Trp 184 A (3,53 Å), e uma interação de empilhamento  $\pi$  com a cadeia lateral aromática de Trp 184 A (3,67 Å) (Figura 19). A droga de referência (Bz) interage com a enzima Cruzaína formando quatro interações hidrofóbicas com os aminoácidos Trp 184 A (3,52, 3,67 e 3,78 Å) e Trp 188 A (3,99 Å), uma ligação de hidrogênio com o resíduo Gln 21 A (3,54 Å) e uma interação de empilhamento  $\pi$  com o resíduo Trp 184 A (4,54 Å). O complexo KB2-Cruzaína (simulação de re-ancoragem) apresentou quatro ligações de hidrogênio envolvendo os aminoácidos Gln 19 A (2,28 Å), Cys 25 A (2,18 Å), Gly 66 A (1,87 Å e 2,27 Å), e duas interações hidrofóbicas com os aminoácidos Leu 67 A (3,59 e 3,88 Å) (Tabela 6).

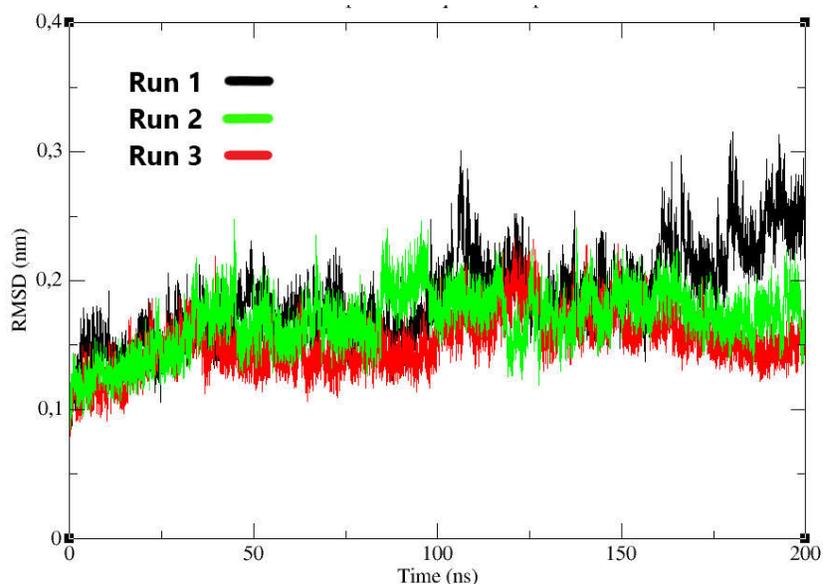
O RMSD das simulações de dinâmica molecular estava disponível para o complexo Chalcona-Cruzaína atingir o equilíbrio, sendo que o intervalo de tempo foi determinado usando o C- $\alpha$  da enzima como referência. O complexo Chalcona-Cruzaína (Figura 20) apresentou, nas três replicatas, valores de RMSD abaixo de 2,0 Å ao atingir o equilíbrio a partir de 125 ns. Em seguida, a análise IPE foi realizada apenas no intervalo de tempo em que o complexo atingiu o equilíbrio (nos últimos 200 ns da simulação de dinâmica molecular).

Figura 19: Sítio de ligação dos ligantes chalcona DF, Benznidazol e KB2 com a enzima cruzafina.



Através da soma das energias de curto alcance de Coulomb e Lennard-Jones, foi obtido o valor de IPE de  $-104,6391 \text{ kJ mol}^{-1}$  ( $\pm 14,0380$ ) entre a enzima Cruzaína e o ligante chalcona. O ligante chalcona apresenta uma afinidade maior pela enzima Cruzaína do que a droga de referência (Bz) e o ligante KB2 co-cristalizado. Além disso, a chalcona apresentou o maior valor de pKi em relação às moléculas Bz e KB2, indicando que baixa concentração de chalcona tem atuação inibitória junto a enzima Cruzaína. Com relação ao sítio de ligação, o ligante chalcona interage no mesmo sítio de ligação que a droga de referência (Bz) (Figura 19); além disso, esse ligante interage no sítio do inibidor KB2 co-cristalizado (Tabela 6), formado pelos aminoácidos Trp 184 A e Gln 19 A.

Figura 20: Determinação do RMSD do complexo Chalcona-Cruzaína (preto, vermelho e verde). Simulações de dinâmica molecular realizadas em triplicata.

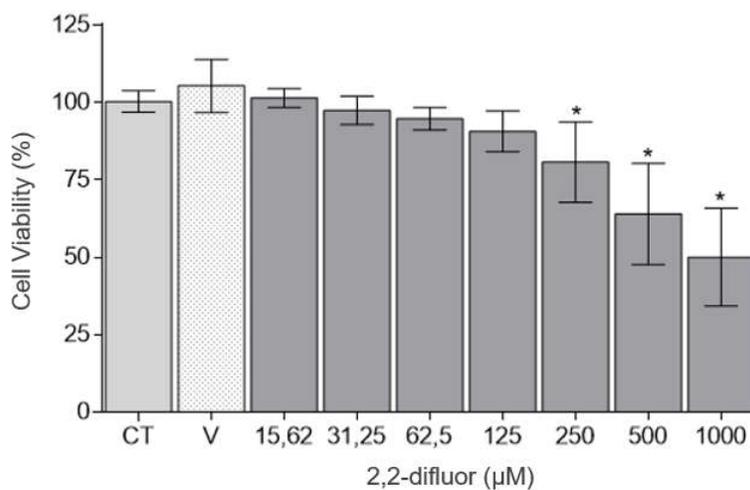


Quanto à estabilidade do complexo Chalcona-Cruzaína, os resultados da dinâmica molecular indicaram que o sistema atingiu o equilíbrio a partir de 100 ns nas três replicatas, apresentando um valor de RMSD máximo de  $1,5 \text{ \AA}$ , indicando a formação do complexo Chalcona-Cruzaína. Essa alta estabilidade é atribuída à interação potencialmente forte entre o ligante chalcona e as cadeias laterais dos resíduos Gln19, Met145, Trp184 e Trp188.

#### 4.5 Atividade anti-chagásica

Células LLC-MK2 foram utilizadas para avaliar a toxicidade da substância em células hospedeiras. A chalcona DF reduziu a viabilidade celular nas concentrações de 250, 500 e 1000  $\mu\text{M}$ , com percentuais de 80,7%, 63,9% e 50,0%, respectivamente (Figura 21). A citotoxicidade foi também estimada com um  $\text{CC}_{50}$  de  $985 \pm 156 \mu\text{M}$ , conforme apresentado na Tabela 7, sendo menos tóxica do que o valor de Bz ( $\text{CC}_{50} = 502,6 \pm 57,8 \mu\text{M}$ ).

Figura 21: Citotoxicidade da chalcona DF (2,2-difluorocalcona) em células LLC-MK2. Resultados expressos em média  $\pm$  EPM, analisados com ANOVA unidirecional e pós-teste de Bonferroni, com  $*p < 0,05$  vs. CT; CT – controle, V – veículo (DMSO 0,5%).



O efeito antiparasitário da chalcona DF contra o *T. cruzi* foi quantificado com formas epimastigotas e tripomastigotas. A chalcona DF prejudicou o crescimento dos epimastigotas em todas as concentrações testadas, com a porcentagem de células viáveis variando entre 17,6% e 82,6% em 1000  $\mu\text{M}$  e 15,6  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Figura 22). Os valores estimados de  $\text{IC}_{50}$  foram  $93,6 \pm 17,0$  para DF e  $37,4 \pm 5,6$  para Bz (Tabela 7). A chalcona DF conseguiu eliminar as formas tripomastigotas em todas as concentrações testadas (Figura 23). Os valores de  $\text{LC}_{50}$  para DF e Bz foram  $46,9 \pm 9,2$  e  $161,4 \pm 31,8$   $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Dessa forma, foi possível calcular o SeI (Tabela 7), que foi de 3,1 para Bz, menor valor obtido para DF, de 21,0. Isso indica que a toxicidade da DF foi mais seletiva para as células parasitárias em comparação com as células hospedeiras de mamíferos.

Tabela 7: Dados de toxicidade celular – chalcona DF e Benzonidazol.

	Descrição	Concentração ( $\mu\text{M}$ )	
		DF	Bz
$\text{CC}_{50}$	Concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade de células LLC-MK2	$985,0 \pm 156,0$	$502,6 \pm 57,8$
$\text{IC}_{50}$	Concentração que prejudica em 50% o crescimento de epimastigotas	$93,6 \pm 17,0$	$37,4 \pm 5,6$
$\text{LC}_{50}$	Concentração capaz de matar 50% de Trypomastigotas	$46,9 \pm 9,2$	$161,4 \pm 31,8$
SeI	Índice de seletividade (SeI); $\text{CC}_{50} / \text{LC}_{50}$	21,0	3,1

Figura 22: Efeito antiproliferativo da chalcona DF em formas epimastigotas de *T. cruzi*. Resultados expressos em média  $\pm$  EPM, analisados com ANOVA unidirecional e pós-teste de Bonferroni, com  $*p < 0,05$  vs. CT; CT – controle, V – veículo (DMSO 0,5%).

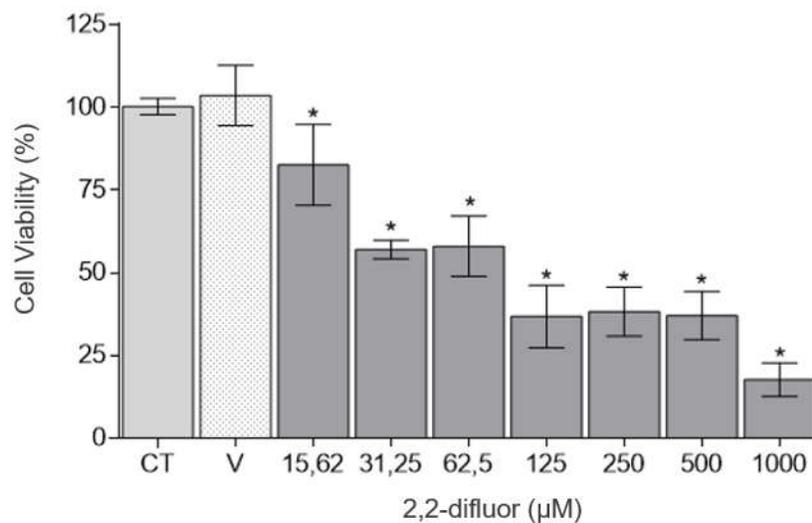
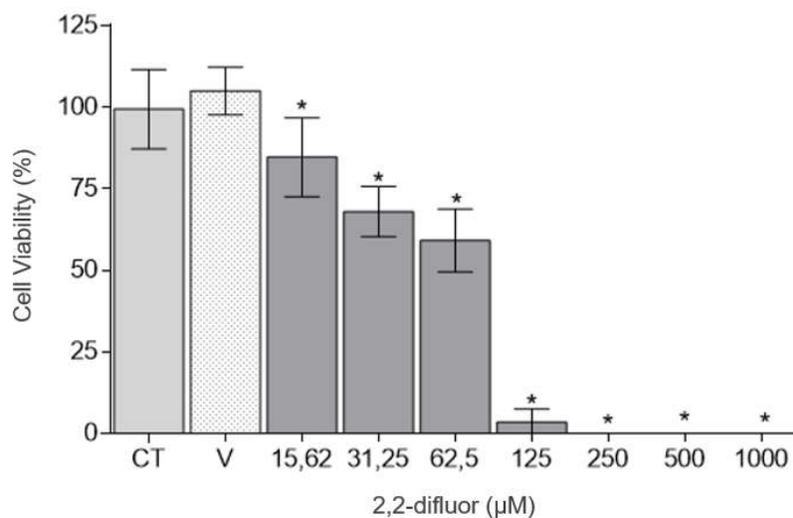
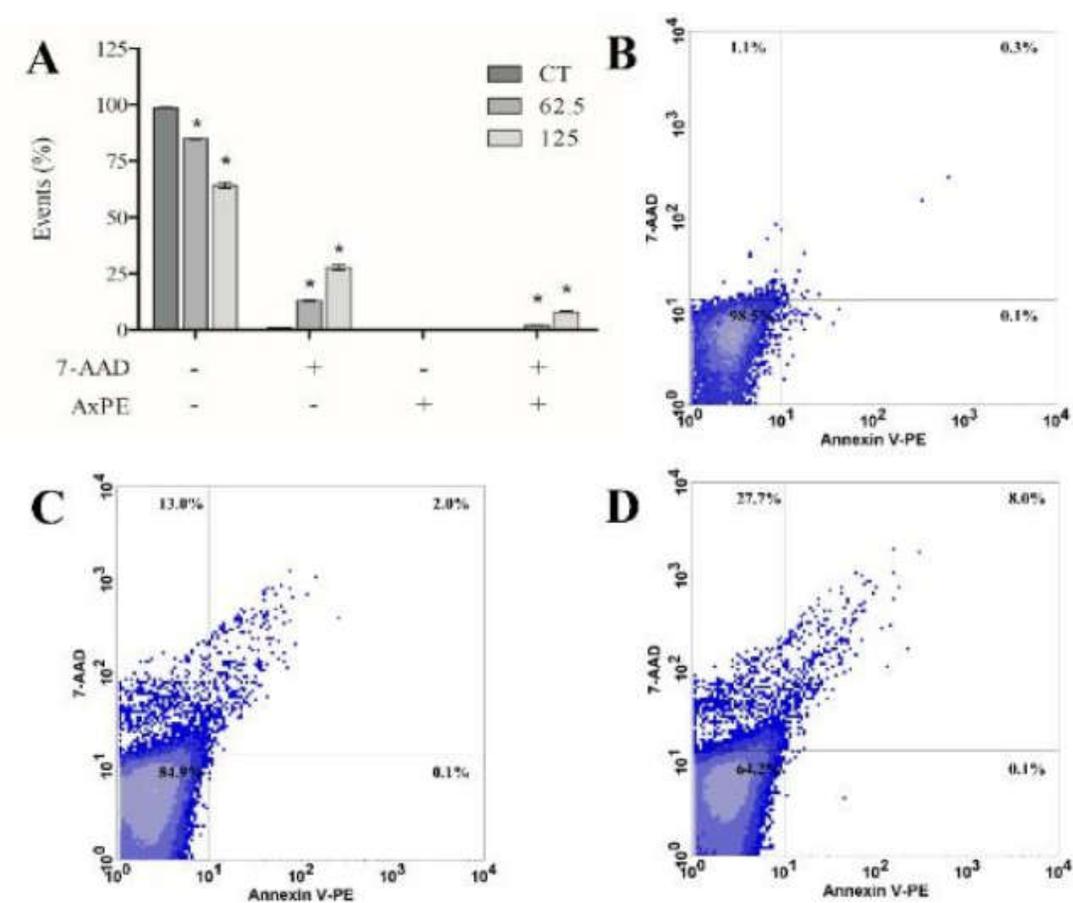


Figura 23: Efeito da chalcona DF em formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Resultados expressos em média  $\pm$  EPM, analisados com ANOVA unidirecional e pós-teste de Bonferroni, com  $*p < 0,05$  vs. CT; CT – controle, V – veículo (DMSO 0,5%).



Para avaliar o efeito da chalcona DF no perfil de morte celular em epimastigotas, realizou-se o ensaio de citometria de fluxo. A chalcona DF aumentou a marcação com 7-AAD e a dupla marcação (Figura 24). Esses resultados são evidenciados nos gráficos de dispersão (Figura 24), os quais mostram que o tratamento com DF desloca eventos, ou células, para os quadrantes superiores. DF 62,5  $\mu\text{M}$  apresentou 13,0% de eventos marcados com 7-AAD e 2,0% de dupla marcação; DF 125  $\mu\text{M}$  apresentou 27,7% de células marcadas com 7-AAD e 8,0% de dupla marcação, considerando que o controle apresentou >95% de eventos não marcados.

Figura 24: Morte celular induzida por chalcona DF. (A) Análise estatística da porcentagem de eventos marcados com 7-aminoactinomicina D (7-AAD) e Anexina V conjugada com ficocianina (AxPE). Resultados expressos em média  $\pm$  SEM, analisados com ANOVA Two-way e pós-teste de Bonferroni, \* $p < 0,05$  em comparação com o controle negativo (CT); (B) Gráficos de densidade de CT, (C) DF 62,5  $\mu\text{M}$  e (D) DF 125  $\mu\text{M}$ .



Na avaliação do acúmulo de ROS citoplasmáticos, o DF 62,5  $\mu\text{M}$  aumentou a intensidade de fluorescência aproximadamente 48%, enquanto o DF 125  $\mu\text{M}$  aumentou 62% (Figura 25A). Esses resultados são evidenciados pelo histograma, que mostra um deslocamento dos eventos expostos ao DF para a direita, indicando um aumento na fluorescência (Figura 25B). Adicionalmente, o DF reduziu a fluorescência de Rho123 em 25% e 50% nas mesmas concentrações (Figura 26A), levando ao deslocamento do histograma para o lado esquerdo, indicando uma diminuição no potencial transmembrana mitocondrial (Figura 26B).

Figura 25: Produção de ROS no citoplasma induzida por chalcona DF. (A) Análise estatística da intensidade de fluorescência relativa relacionada ao DCFH<sub>2</sub>, analisada no filtro de fluorescência verde (FL1). Resultados expressos em média  $\pm$  SEM, analisados com ANOVA One-way e Two-way e pós-teste de Bonferroni, \* $p < 0,05$  em comparação com o controle (CT); (B) Histograma da intensidade de fluorescência; controle representado em preto, DF 62,5  $\mu\text{M}$  em azul-claro e DF 125  $\mu\text{M}$  em azul-marinho.

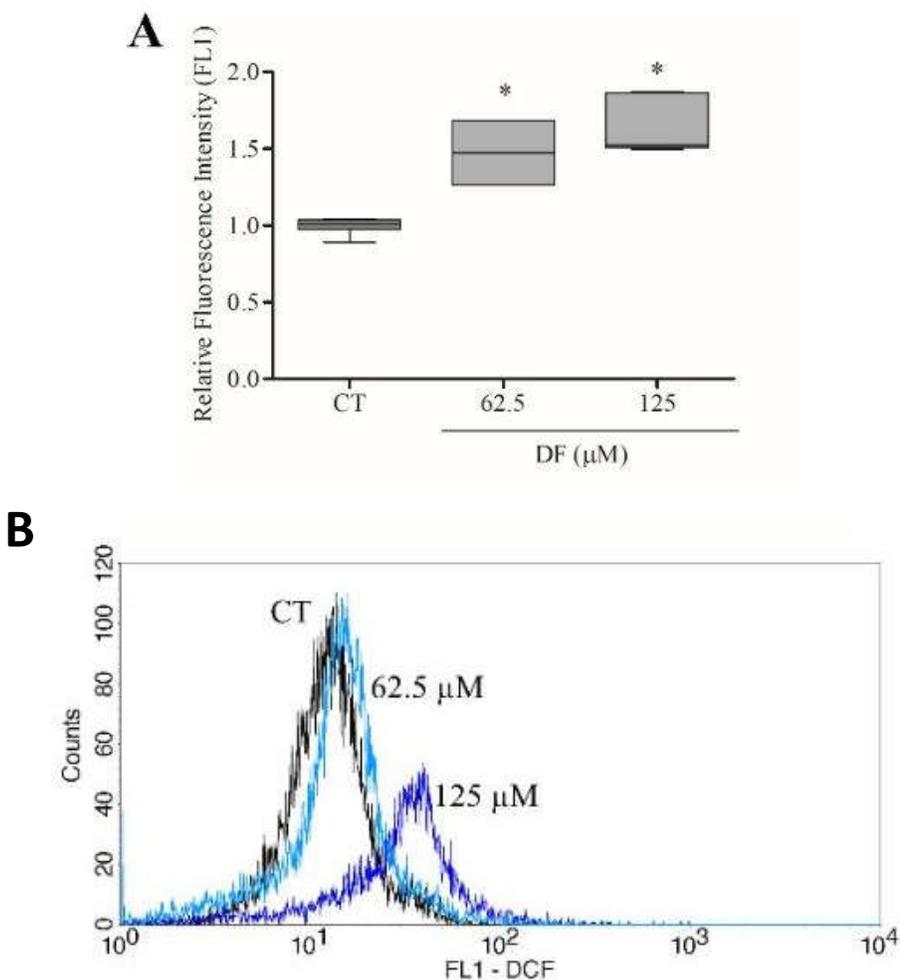
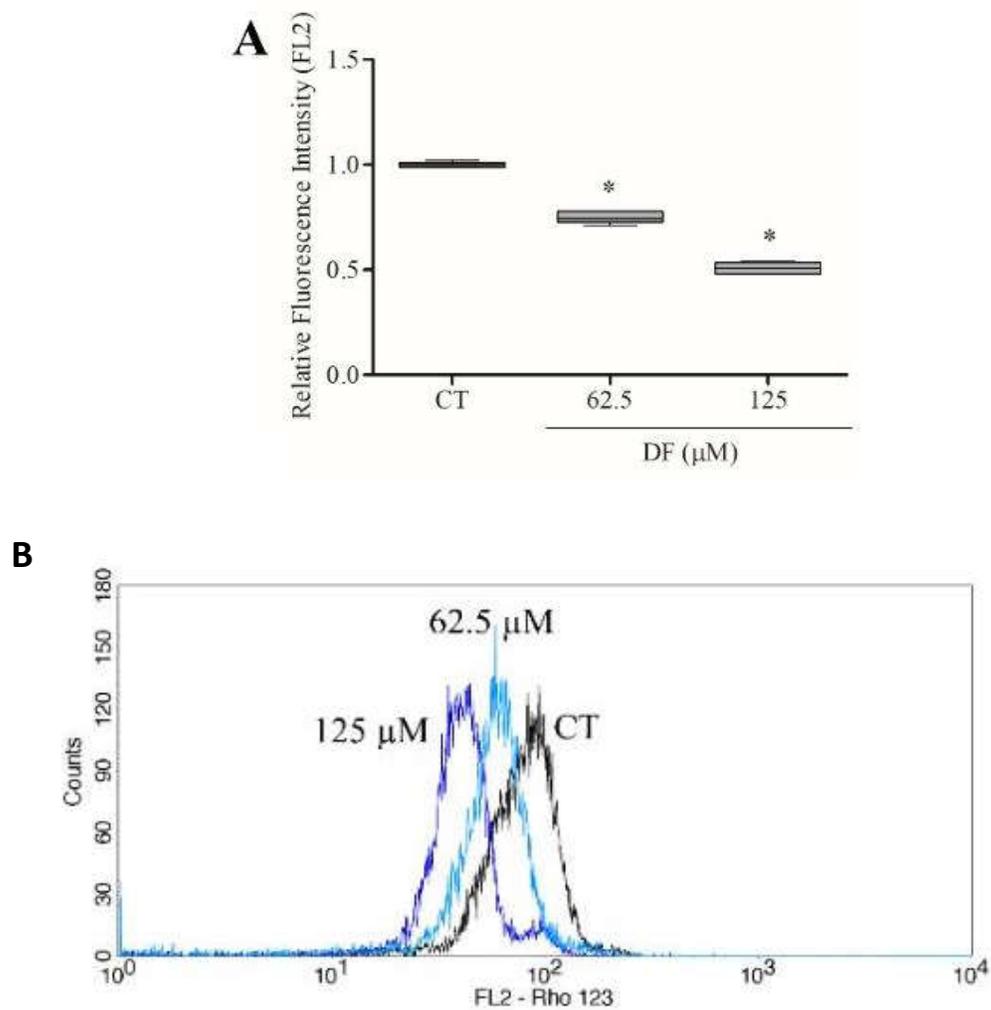
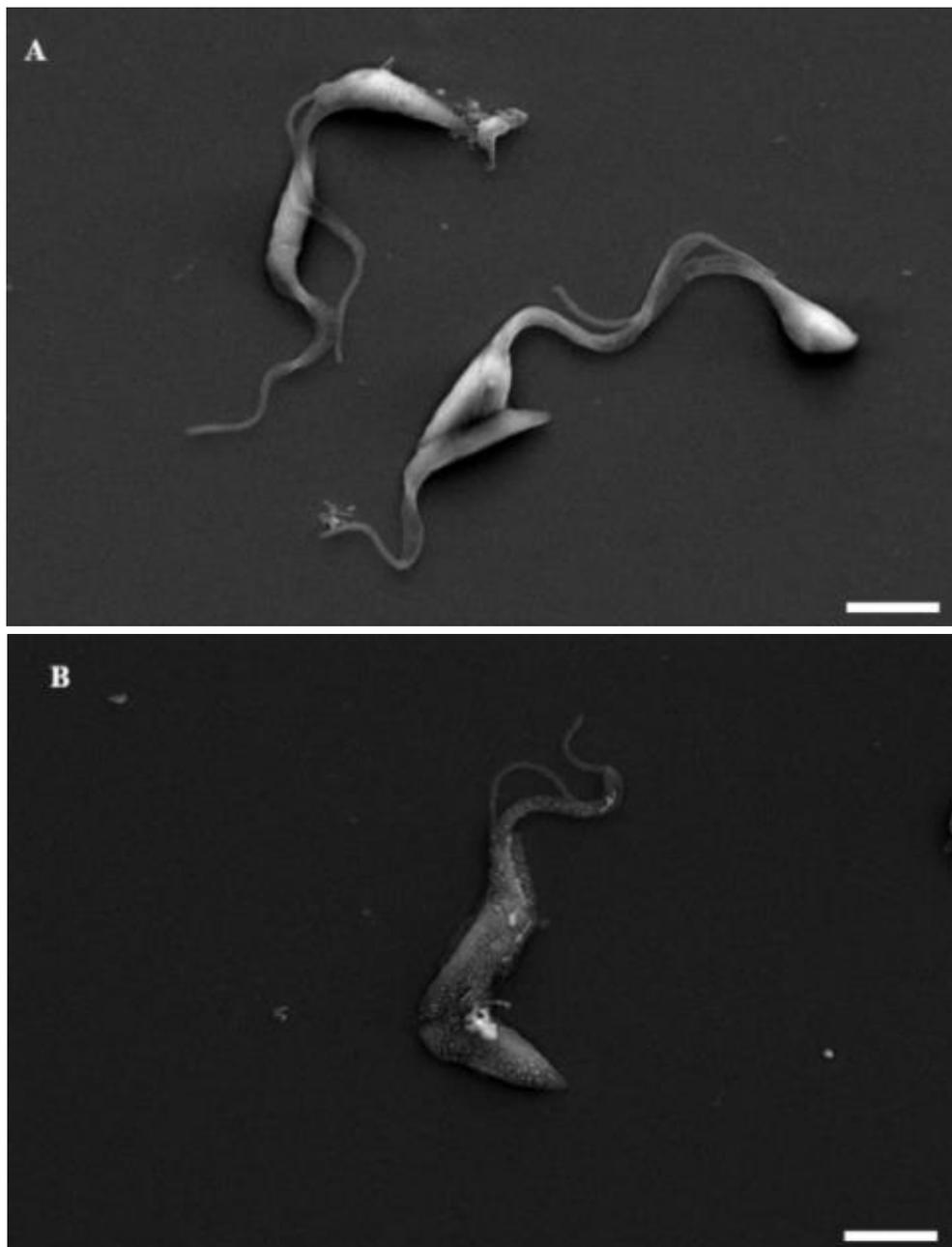


Figura 26: Efeito da chalcona DF no potencial transmembrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). (A) Análise estatística da intensidade de fluorescência relativa relacionada ao Rho123, analisado no filtro de fluorescência vermelha (FL2). Resultados expressos em média  $\pm$  SEM, analisados com ANOVA One-way e pós-teste de Bonferroni, \* $p < 0,05$  em comparação com o controle (CT); (B) Histograma da intensidade de fluorescência; controle representado em preto, DF 62,5  $\mu\text{M}$  em azul-claro e DF 125  $\mu\text{M}$  em azul-marinho.



Finalmente, após 24 horas de tratamento com chalcona DF (93,6  $\mu\text{M}$ ), foram analisadas as mudanças morfológicas nas formas epimastigotas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Uma comparação entre os parasitos não tratados (controle) (Figura 27A) e os parasitos tratados com chalcona revelou extravasamento celular com a presença de poros no grupo tratado (Figura 27B), que são evidências típicas de necrose, corroborando os dados da citometria de fluxo

Figura 27: Análise morfológica de epimastigotas por MEV. (A) Epimastigotas controle não tratado e (B) Epimastigotas tratados com  $\text{IC}_{50}$  de chalcona DF. Barras de escala: 10  $\mu\text{M}$ .



# **DISCUSSÃO**

## 5. DISCUSSÃO

A via do mevalonato é uma importante rota metabólica em diversos organismos responsável pela síntese de diversos compostos essenciais. O papel de chalconas como precursores de flavonóides nessa via tem despertado interesse nessas moléculas no desenvolvimento de novas terapias para doenças infecciosas, como as doenças negligenciadas causadas por protozoários (SOUSA-BATISTA *et al.*, 2018; SINHA *et al.*, 2019). Devido a sua versatilidade, chalconas têm se tornado objeto de pesquisas para novas terapias, principalmente contra leishmaniose, modulando infecção e inflamação em modelos *in vitro* (MIRANDA-SAPLA *et al.*, 2019; ZHEOAT *et al.*, 2021). As similaridades estruturais e metabólicas entre os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* fazem com que muitos compostos leishmanicidas também apresentem um efeito antichagásico (CARTUCHE *et al.*, 2020). Entretanto, não existem tantos relatos do emprego de chalconas na busca por novos fármacos antichagásicos.

A partir da produção de chalconas sintéticas em laboratório e de relatos de efeitos inibitórios de crescimento e proliferação, bem como a atuação no bloqueio de rotas metabólicas, em células fúngicas e cancerígenas (FREITAS *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2020), reforça-se o interesse no estudo desse grupo de moléculas como promissor agente antichagásico.

No presente estudo, a síntese, caracterização e efeitos inibitórios da chalcona (E)-1-(4-aminofenil)-3-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)prop-2-en-1-ona (DF) contra as formas da cepa Y do *T. cruzi*, bem como as suas interações teóricas com a cruzaina de *T. cruzi*. Os estudos de atividades biológica e teórica foram realizadas a fim de se avaliar seus efeitos em células hospedeiras e em duas formas de sobrevivência do *T. cruzi*.

Inicialmente, realizou-se estudo ADMET baseado em otimização paramétrica (MPO) da chalcona DF. Um sistema MPO, composto por medicamentos e candidatos a medicamentos disponíveis comercialmente, proposto pela Pfizer, Inc., sugere que compostos fracamente ácidos, com baixa lipofilicidade ( $\log P < 5$ ), que são maiores e mais polares do que substâncias ativas no sistema nervoso central (TPSA 40~90 Å<sup>2</sup>), dentro de uma faixa de peso molecular de 200-500 g/mol, apresentam um alinhamento sistemático entre atributos *in vitro* de ADMET, dentro de um limite de permeabilidade aparente passiva alta ( $P_{app} > 10 \times 10^{-6}$  cm/s) e baixa depuração hepática ( $CL_{int,u} < 100$  mL/min/kg), atributos associados a medicamentos com excelente absorção oral e melhor

estabilidade metabólica, proporcionando uma bioabsorção oral viável (WAGER *et al.*, 2010a, 2016). Ao alinharmos os atributos TPSA x logP, é possível observar que a chalcona reside no limite médio de desejabilidade, especialmente com o TPSA calculado entre 40~90 Å<sup>2</sup>. No entanto, ela apresenta uma lipofilicidade mais inclinada em direção à fase orgânica (logP > 3), proporcionando um alinhamento favorável entre os atributos ADMET (WAGER *et al.*, 2016) (Figura 16b).

A avaliação do efeito em células hospedeiras LLC-MK2 é frequentemente conduzida para escolher substâncias com baixa toxicidade, além de determinar as concentrações para outras análises. Essas células são empregadas em experimentos de atividade antichagásica devido à sua alta suscetibilidade à infecção e facilidade de cultivo (ADADE, 2010).

Os resultados do presente estudo mostram que a chalcona DF possui efeito tripanocida, sendo capaz de induzir alterações morfológicas, como extravasamento celular e presença de poros na membrana plasmática, evidenciadas pelas observações em MEV. Estes achados corroboram os dados da citometria de fluxo indicativos de necrose, destacados pela coloração por 7-AA, associada à perda de integridade da membrana e possivelmente vinculado a danos nas organelas, o que pode comprometer significativamente a capacidade de recuperação dos parasitos (MENNA-BARRETO, 2019).

A morte celular foi relacionada ao estresse oxidativo intracitoplasmático, o que pode ter causado a despolarização do potencial de membrana mitocondrial. Esses resultados são relevantes porque as chalconas têm sido descritas como moléculas com potencial para inibir o crescimento ou causar a morte de *Trypanosoma cruzi* (ZHEOAT *et al.*, 2021). Além disso, chalconas derivadas de esqueletos de substituintes metoxi substituídos por flúor mostraram potencial antimicrobiano aprimorado com base em estudos de design racional (BURMAOGLU *et al.*, 2017). No entanto, os estudos com *T. cruzi* ainda são limitados. A ação de Metoxichalconas isoladas de *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg (Myrtaceae) afetando significativamente formas epimastigotas de *T. cruzi*, e com baixa indução de citotoxicidade, foi demonstrada por Salmazzo *et al.* (2021). Da mesma forma, a chalcona derivada, 4-nitrochalcona, e extratos ricos em chalcona de raiz de *Lonchocarpus culturatus* exibiram atividade leishmanicida *in vitro*, incluindo *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. major* (ASSOLINI *et al.*, 2020;

GARCIA *et al.*, 2021; OCHOA *et al.*, 2019; ORTALLI *et al.*, 2018; STAFFEN *et al.*, 2022).

A chalcona DF foi capaz de aumentar o Índice de Seletividade (SeI) em sete vezes quando comparado ao benzonidazol, com valores de LC<sub>50</sub> para chalcona DF e benzonidazol de  $46,9 \pm 9,2$  e  $161,4 \pm 31,8$   $\mu\text{M}$ , respectivamente. No entanto, os valores encontrados no presente estudo ainda são inferiores aos preconizado pela OMS, que recomenda um *cutoff* de SeI > 50 (NWAKA & HUDSON, 2006), estes foram sete vezes maiores quando comparados com a droga padrão para tratamento. Contudo, os dados são favoráveis para a continuidade dos estudos para síntese de novas moléculas que apresentem um maior efeito antichagásico, associadas a uma baixa toxicidade.

No contexto das doenças negligenciadas, como a doença de Chagas, a busca por novas moléculas de baixo custo de produção, baixa toxicidade e elevada eficácia, com o intuito de substituir o benzonidazol, ainda é um desafio para grupos de pesquisa (WALTON *et al.*, 1987). Entretanto, estudos com chalconas à base de indanona, chalconas preniloxi e chalconas isoladas do extrato de *L. culturatus* apresentaram efeito anti-chagásico em *T. brucei* e *T. cruzi* (BETECK *et al.*, 2019; BORTOLUZZI *et al.*, 2021; ESPINOZA-HICKS *et al.*, 2019). A flúorchalcona do presente estudo apresentou uma citotoxicidade mínima nas células hospedeiras e um efeito antiparasitário mais elevado, com uma seletividade sete vezes mais elevada em comparação com o medicamento de referência, tornando-a, assim, uma molécula com grande potencial como um agente tripanocida mais seguro.

Diversas rotas farmacológicas têm sido estudadas na pesquisa e desenvolvimento de substâncias tripanocidas. No entanto, a maioria envolve substâncias que causam um desequilíbrio redox na célula do protozoário, com risco de efeitos deletérios nas células hospedeiras. O benzonidazol, especialmente, atua por meio do mecanismo de estresse nitro redutivo, envolvendo a modificação covalente de macromoléculas (WALTON *et al.*, 1987). Nesse sentido, vários alvos enzimáticos têm sido estudados como alvos farmacológicos. Inibidores da enzima glicolítica Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH) têm sido aplicados em estudos de triagem virtual baseada em farmacóforos (MURONETZ *et al.*, 2019). Recentemente, uma chalcona hidroximetoxinitrofenila semi-sintética mostrou potencial tripanocida ao inibir a enzima cruzaína, uma cisteína protease envolvida em todas as etapas do desenvolvimento e diferenciação do parasito (MATOS *et al.*, 2022). Além disso, a enzima tripanotiona redutase, envolvida na redução do

dissulfeto de tripanotiona, uma das principais defesas antioxidantes do parasito, tem sido descrita como alvo para chalconas inibitórias. Por ser uma enzima específica do parasito, as substâncias geralmente causam baixa toxicidade nas células hospedeiras de mamíferos (ORTALLI *et al.*, 2018).

A produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) durante o estresse oxidativo contribui para a morte do parasito devido a peroxidação lipídica, danos em membranas, DNA e organelas (BANERJEE *et al.*, 2018; DAS *et al.*, 2021; DE MENEZES *et al.*, 2019b). Além disso, nas mitocôndrias dos tripanossomatídeos, as chalconas podem prejudicar processos importantes da cadeia transportadora de elétrons, como o complexo III e a fumarato redutase, reduzindo a produção de ATP e desencadeando a morte celular do parasito. Assim, os resultados do presente estudo são promissores, uma vez que as chalconas apresentam uma ampla relação químico-farmacológica com as biomoléculas presentes em *T. cruzi*.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises topológicas sugerem que a farmacóforo baseado no substituinte difluoreto 803 pode aumentar a lipofilicidade da chalcona, melhorando a permeabilidade celular do composto e possibilitando a absorção e difusão farmacocinética da molécula. As simulações de ancoragem molecular mostraram que o ligante de chalcona tem uma afinidade maior pela enzima Cruzaína do que a droga de referência (Bz), e o ligante KB2 co-cristalizado interage no mesmo local de ligação que a droga de referência (Bz). Em relação à estabilidade do complexo Chalcona-Cruzaína, os resultados de MD indicaram que o sistema atingiu o equilíbrio a partir de 100 ns nas três replicatas, apresentando o valor RMSD de no máximo 1,5 Å, indicando a formação do complexo Chalcona-Cruzaína. Essa alta estabilidade se deve à interação potencialmente forte entre o ligante de chalcona e as cadeias laterais dos resíduos Gln19, Met145, Trp184 e Trp188.

Os resultados deste estudo mostram que a chalcona DF tem um efeito tripanocida, uma redução significativa na toxicidade em comparação com a droga padrão, sem prejudicar o efeito parasitário, sendo capaz de induzir alterações morfológicas como extravasamento celular e presença de poros, observados por microscopia eletrônica de varredura, além de dados de citometria de fluxo, destacados pela coloração com 7-AAD, indicativa de necrose, com melhor seletividade do que o benzonidazol, a droga de referência. A morte celular foi relacionada ao estresse oxidativo intracitoplasmático, que pode ter causado a despolarização do potencial transmembrana mitocondrial. Esses resultados são relevantes, pois a chalcona tem sido descrita como uma molécula com potencial para inibir o crescimento ou causar a morte do *Trypanosoma cruzi*.

## **REFERÊNCIAS**

## 7. REFERÊNCIAS

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

ADADE C. M.; OLIVEIRA I. R.; PAIS J. A.; SOUTO-PADRÓN T. MELITTIN peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. **Toxicon**, v.69: p.227-39, 2013.

ADL, S. M. *et al.* The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. **J. Euk. Microb.** 52(5):399-451; 2005.

ALLOUCHE, A.-R. Gabedit-A graphical user interface for computational chemistry softwares. **J. Comput. Chem.** 32, 174–182, 2011.

ALVES, M. J., COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival. **IUBMB Life**; v.5 (45): p.274-279, 2007.

AMATO NETO, V.; PASTERNAK, J. Centenário da doença de Chagas. **Rev. Saúde Pública** . vol.43, n.2, pp.381-382, 2009.

ANDRADE, S. G. Biodemas, Zimodemas e Esquizodemas: sua relação com a patologia da Doença de Chagas. In: **COURA, J. R. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitarias**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005.

ANDRADE, S. G. *et al.* Biological, biochemical and molecular features of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients infected through oral transmission during a 2005 outbreak in the state of Santa Catarina, Brazil: its correspondence with the new *T. cruzi* Taxonomy Consensus (2009). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 8, Dec. 2011.

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

ASSOLINI, J.P., DA SILVA, T.P., DA SILVA BORTOLETI, B.T., GONÇALVES, M.D., TOMIOTTO-PELLISSIER, F., SAHD, C.S., CARLOTO, A.C.M., FEUSER, P.E., CORDEIRO, A.P., SAYER, C., HERMES DE ARAÚJO, P.H., COSTA, I.N., CONCHON-COSTA, I., MIRANDA-SAPLA, M.M., PAVANELLI, W.R. 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** 884, 173392, 2020.

ÁVILA, H.P., SMÂNIA, E. DE F.A., MONACHE, F.D., SMÂNIA, A. Structure–activity relationship of antibacterial chalcones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 16, 9790–9794, 2008.

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.

BANERJEE, P., ECKERT, A.O., SCHREY, A.K., PREISSNER, R. ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. **Nucleic Acids Research** 46, W257–W263, 2018.

BARACCA, A., SGARBI, G., SOLAINI, G., LENZA, G. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F<sub>0</sub> during ATP synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics** 1606, 137–146, 2003.

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.

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

BECKE, A.D., Density-functional thermochemistry. I. The effect of the exchange-only gradient correction. **The Journal of Chemical Physics** 96, 2155–2160, 1992.

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

BERENDSEN, H.J.C., VAN DER SPOEL, D., VAN DRUNEN, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer Physics Communications** 91, 43–56, 1995.

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.

BETECK, R.M., LEGOABE, L.J., ISAACS, M., HOPPE, H.C. In vitro Anti-*Trypanosomal* Activities of Indanone-Based Chalcones. **Drug Res (Stuttg)** 69, 337–341, 2019.

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

BINKLEY, J.S., WHITESIDE, R., HARIHARAN, P.C., SEEGER, R., HEHRE, W.J., LATHAN, W.A., NEWTON, M.D., DITCHFIELD, R., POPLER, J.A., GAUSSIAN 76: an ab initio molecular orbital program ( No. **BNL-24136, 6738000**), 1978.

BIOLO, A. *et al.* Chagas Cardiomyopathy-Where Do We Stand After a Hundred Years? **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 52, p. 300-316, 2010.

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

BONNEY, K. M. Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat? **Parasite** (Paris, France), v. 21, p. 11, 2014.

BORTOLUZZI, A.A.M., STAFFEN, I.V., BANHUK, F.W., GRIEBLER, A., MATOS, P.K., AYALA, T.S., DA SILVA, E.A.A., SARRAGIOTTO, M.H., SCHUQUEL, I.T.A., JORGE, T.C.M., MENOLLI, R.A. Determination of chemical structure and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of extracts from the roots of *Lonchocarpus cultratus* (Vell.) A.M.G. Azevedo & H.C. Lima. **Saudi Journal of Biological Sciences** 28, 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. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em Saúde. Doença de Chagas. 2012.

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

BRENER, Z. Intraespecific variations in *Trypanosoma cruzi*: two type of parasite populations presenting distinct characteristics. **PAHO**, v. 347, p.11-21, 1977.

BRENER, Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas' disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 205-212, 1987.

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

BURMAOGLU, S., ALGUL, O., GOBEK, A., AKTAS ANIL, D., ULGER, M., ERTURK, B.G., KAPLAN, E., DOGEN, A., ASLAN, G. Design of potent fluoro-substituted chalcones as antimicrobial agents. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry** 32, 490–495, 2017.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiologial treatment of chagas disease with benznidazole. **Rev. Inst. Med. Trop.** v. 44, n.1, p. 29-37, 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.

CASTRO D. P. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural studies of adhesion, lysis and biofilm formation by Serratia marcescens. **Exp Parasitol.**;v. 117, n. 2, p.201-207, 2007.

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.

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

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

CHATELAIN, E. Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 15, p. 98–103, 2017.

CHERMETTE, H., Chemical reactivity indexes in density functional theory. **J. Comput. Chem.** 20, 129–154, 1999.

CORDOVA, E. *et al.* Reactivation of Chagas disease with central nervous system involvement in HIV-infected patients in Argentina, 1992–2007 **International Journal of Infectious Diseases**. v. 12 , issue 6, p587–592, 2008.

COURA, J. R. Chagas disease : what is known and what is needed – A background article. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 113–122, 2007.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta tropica**, v.115, n. 1-2, p. 5–13, 2012.

CSIZMADIA, P. MarvinSketch and MarvinView: Molecule Applets for the World Wide Web. In: Proceedings of The 3rd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry. **Presented at the The 3rd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, MDPI, Sciforum.net**, p. 1775, 1999.

CUNHA-NETO, E. *et al.* Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro , v. 104, supl. 1, July 2009.

DA ROCHA, M.N., DA FONSECA, A.M., DANTAS, A.N.M., DOS SANTOS, H.S., MARINHO, E.S., MARINHO, G.S.. In Silico Study in MPO and Molecular Docking of the Synthetic Drynaran Analogues Against the Chronic Tinnitus: Modulation of the M1 Muscarinic Acetylcholine Receptor. **Mol Biotechnol**, 2023.

DAS, A., KAMRAN, MOHD., ALI, N. HO-3867 Induces ROS-Dependent Stress Response and Apoptotic Cell Death in *Leishmania donovani*. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** 11, 774899, 2021.

DE ARAÚJO, J.I.F., AIRES, N.L., ALMEIDA-NETO, F.W.Q., MARINHO, M.M., MARINHO, E.M., PAULA MAGALHÃES, E., DE MENEZES, R.R.P.P.B., SAMPAIO, T.L., MARIA COSTA MARTINS, A., TEIXEIRA, E.H., RAFAELA FREITAS DOTTO, A., AMARAL, W. DO, TEIXEIRA, A.M.R., DE LIMA-NETO, P., MARINHO, E.S., DOS SANTOS, H.S. Antiproliferative activity on *Trypanosoma cruzi* (Y strain) of the triterpene 3 $\beta$ ,6 $\beta$ ,16 $\beta$ -trihidroxilup-20 (29)-ene isolated from *Combretum leprosum*. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics** 40, 12302–12315, 2022.

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

DE MENEZES, R.R.P.P.B., SAMPAIO, T.L., LIMA, D.B., SOUSA, P.L., DE AZEVEDO, I.E.P., MAGALHÃES, E.P., TESSAROLO, L.D., MARINHO, M.M., DOS SANTOS, R.P., MARTINS, A.M.C. Antiparasitic effect of (-)- $\alpha$ -bisabolol against *Trypanosoma cruzi* Y strain forms. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 95, 114860, 2019b.

DE OLIVEIRA E SILVA, J. *et al.* Molecular and biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from children from Jequitinhonha Valley, State of Minas Gerais, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 46, n. 4, Aug. 2013.

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. *et al.* Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction.. **Int J Cell Biol.** v.363(3): p.828-34, 2010.

DEVERA, R. *et al.* Biodemas de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas de humanos de três áreas endêmicas de Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 35, n.4, Aug. 2002.

DIAS, J.; COURA. J.. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral.** Editora FIOCRUZ. 1997.

DIAS, J. C. P. & MACEDO, V. O. Doença de Chagas. In: **Coura, J. R. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

DITCHFIELD, R., HEHRE, W.J., POPLE, J.A., Self-Consistent Molecular-Orbital Methods. IX. An Extended Gaussian-Type Basis for Molecular-Orbital Studies of Organic Molecules. **The Journal of Chemical Physics** 54, 724–728, 1971.

DNDI. **Drugs for Neglected Diseases initiative.** Disponível em: <[https://dndi.org/diseases/chagas/facts/?gclid=Cj0KCQjw8eOLBhC1ARIsAOzx5cHnGf8ACy2v40oGaaWo6XAJLEb-K25zSElnDIzV2Pg\\_-9MdiA7AbzUaAnC7EALw\\_wcB](https://dndi.org/diseases/chagas/facts/?gclid=Cj0KCQjw8eOLBhC1ARIsAOzx5cHnGf8ACy2v40oGaaWo6XAJLEb-K25zSElnDIzV2Pg_-9MdiA7AbzUaAnC7EALw_wcB)>.

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

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.

ESPINOZA-HICKS, J.C., CHACÓN-VARGAS, K.F., HERNÁNDEZ-RIVERA, J.L., NOGUEDA-TORRES, B., TAMARIZ, J., SÁNCHEZ-TORRES, L.E., CAMACHO-DÁVILA, A. Novel prenyloxy chalcones as potential leishmanicidal and trypanocidal agents: Design, synthesis and evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry** 167, 402–413, 2019.

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

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.

FUKUI, K., Role of Frontier Orbitals in Chemical Reactions. **Science** 218, 747–754, 1982.

GARCIA, T.R., DE FREITAS, T.S., DOS SANTOS, H.S., BANDEIRA, P.N., JULIÃO, M.S.S., ROCHA, J.E., NOGUEIRA, C.E.S., PEREIRA, R.L.S., BARRETO, A.C.H., FREIRE, P.T.C., COUTINHO, H.D.M., TEIXEIRA, A.M.R. Structural, vibrational and electrochemical analysis and antibiotic activity study of chalcone (2E)-1-(3',-methoxy-4',-hydroxyphenyl)-3-(3-nitrophenyl)prop-2-en-1-one. **Journal of Molecular Structure** 1216, 128358, 2020.

GARCIA, A.R., OLIVEIRA, D.M.P., JESUS, J.B., SOUZA, A.M.T., SODERO, A.C.R.,

VERMELHO, A.B., LEAL, I.C.R., SOUZA, R.O.M.A., MIRANDA, L.S.M., PINHEIRO, A.S., RODRIGUES, I.A. Identification of Chalcone Derivatives as Inhibitors of *Leishmania infantum* Arginase and Promising Antileishmanial **Agents**. **Front. Chem.** 8, 624678, 2021.

GASCON J.; BERN C.; PINAZO M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Trop.**, v.115(1-2): p.22-7, 2010.

GUTIERREZ, F. R. S. *et al.* The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. **Parasite Immunology**, v. 31, p. 673-685, 2009.

HANWELL, M.D., CURTIS, D.E., LONIE, D.C., VANDERMEERSCH, T., ZUREK, E., HUTCHISON, G.R. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **J Cheminform** 4, 17, 2012.

HASSLOCHER-MORENO, A. M.; DO BRASIL P. E.; DE SOUSA A. S.; XAVIER S. S.; CHAMBELA M. C.; SPERANDIO DA SILVA, G. M. J. Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. **Antimicrob Chemother.** v.67(5):p.1261-6, 2012.

HIRSHFELD, F.L., Bonded-atom fragments for describing molecular charge densities. **Theoret. Chim. Acta** 44, 129–138, 1977.

ICZKOWSKI, R.P., MARGRAVE, J.L. Electronegativity. **J. Am. Chem. Soc.** 83, 3547–3551, 1961.

IMBERTY, A., HARDMAN, K.D., CARVER, J.P., PEREZ, S. Molecular modelling of protein-carbohydrate interactions. Docking of monosaccharides in the binding site of concanavalin A. **Glycobiology** 1, 631–642, 1991.

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

ITOH, H., NISHIKAWA, S., HARAGUCHI, T., ARIKAWA, Y., HIYAMA, M., ISERI, T., ITOH, Y., NAKAICHI, M., TAURA, Y., TANI, K., ITAMOTO, K. Identification of

rhodamine 123-positive stem cell subpopulations in canine hepatocellular carcinoma cells. **Biomedical Reports** 7, 73–78, 2017.

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.

JANAK, J.F., . Proof that  $\partial E / \partial n_i = \epsilon$  in density-functional theory. **Phys. Rev. B** 18, 7165–7168, 1978.

KADELA-TOMANEK, M., JASTRZEBSKA, M., MARCINIEC, K., CHROBAK, E., BEBENEK, E., BORYCZKA, S. Lipophilicity, Pharmacokinetic Properties, and Molecular Docking Study on SARS-CoV-2 Target for Betulin Triazole Derivatives with Attached 1,4-Quinone. **Pharmaceutics** 13, 781, 2021.

KESSLER, R.L., SOARES, M.J., PROBST, C.M., KRIEGER, M.A. *Trypanosoma cruzi* Response to Sterol Biosynthesis Inhibitors: Morphophysiological Alterations Leading to Cell Death. **PLoS ONE** 8, e55497, 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-Württemberg, Germany)**, v. 7, n. 24, p. 2002988, dez. 2020.

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

KOOPMANS, T., 1934. Über die Zuordnung von Wellenfunktionen und Eigenwerten zu den Einzelnen Elektronen Eines Atoms. **Physica** 1, 104–113, 1934.

LEE, C., YANG, W., PARR, R.G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Phys. Rev. B** 37, 785–789, 1988.

LENT, H., & WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their Significance as Vectors of Chagas Disease. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.** 163:123-520, 1979.

LESLIE M. Drug Developers Finally Talk Aim At a Neglected Disease. **Science**, v. v.333, 2011.

LIMA, D.B., SOUSA, P.L., TORRES, A.F.C., RODRIGUES, K.A. DA F., MELLO, C.P., MENEZES, R.R.P.P.B. DE, TESSAROLO, L.D., QUINET, Y.P., DE OLIVEIRA, M.R., MARTINS, A.M.C. Antiparasitic effect of *Dinoponera quadriceps* giant ant venom. **Toxicon** 120, 128–132, 2016.

LIMA-COSTA M. F.; MATOS, D. L.; RIBEIRO, A. L.; STROKE. Chagas disease predicts 10-year stroke mortality in community dwelling elderly: the Bambui cohort study of aging. **Int J Cell Biol.** v.41(11):p. 2477-82, 2010.

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.

LU, T., CHEN, F., Multiwfn: A multifunctional wavefunction analyzer. **J. Comput. Chem.** 33, 580–592, 2012.

MAGUIRE, J. H. A risk score for predicting death in class Chagas' heart disease. **New England Journal of Medicine**, v. 355, p. 2490-2491, 2006.

MARIN-NETO J. A.; CUNHA-NETO E.; MACIEL B. C.; SIMÕES M. V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115(9): p.1109–1123, 2007.

MARIN-NETO, J. A. *et al.* The BENEFIT trial : testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. June, p. 319–324, 2009.

MARINHO, E.M., BATISTA DE ANDRADE NETO, J., SILVA, J., ROCHA DA SILVA, C., CAVALCANTI, B.C., MARINHO, E.S., NOBRE JÚNIOR, H.V. Virtual screening based on molecular docking of possible inhibitors of Covid-19 main protease. **Microbial Pathogenesis** 148, 104365, 2020.

MATADAMAS-MARTÍNEZ, F. *et al.* Leishmania mexicana Trypanothione Reductase Inhibitors: Computational and Biological Studies. **Molecules** (Basel, Switzerland), v. 24, n. 18, 4 set. 2019.

MATOS, M.G.C., DA SILVA, L.P., ALMEIDA-NETO, F.W. DE Q., MARINHO, E.M., DE MENEZES, R., SAMPAIO, T.L., DA ROCHA, M.N., RIBEIRO, L.R., MAGALHAES, E., TEIXEIRA, A.M.R., DOS SANTOS, H.S., MARINHO, E.S., DE LIMA-NETO, P., MARTINS, A.M.C., MONTEIRO, N.K.V., MARINHO, M.M. Quantum mechanical, molecular docking, molecular dynamics, ADMET and antiproliferative activity on *Trypanosoma cruzi* (Y strain) of chalcone (E)-1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl)-3-(3-nitrophenyl)prop-2-en-1-one derived from a natural product. **Phys. Chem. Chem. Phys.** 24, 5052–5069, 2022.

MATTEI, D. M. *et al.* Biochemical Strain Characterization of *Trypanosoma cruzi* by Restriction Endonuclease Cleavage of Kinetoplast-DNA. **FEBS Letters**, v.74, p264-268, 1977.

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

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.

MICHAILOWSKY, V. *et al.* Humoral and cellular immune responses to *Trypanosoma cruzi* derived paraflagellar rod proteins in patients with Chagas' disease. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 3165-3171, 2003.

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.

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.

MIRZAEI, H.; ABASTABAR, M.; EMAMI, S. Indole-derived chalcones as anti-dermatophyte agents: In vitro evaluation and in silico study. **Computational Biology and Chemistry**, v. 84, p. 107189, fev. 2020.

MOMMA, K., IZUMI, F., VESTA 3 for three-dimensional visualization of crystal, volumetric and morphology data. **J Appl Crystallogr** 44, 1272–1276, 2011.

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.

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

MORAES-SOUZA, H. Chagas infection transmission control: situation of transfusional transmission in Brazil and other countries of Latin America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 419-423, 1999.

MORELL, C., GRAND, A., TORO-LABBÉ, A. New Dual Descriptor for Chemical Reactivity. **J. Phys. Chem. A** 109, 205–212, 2005.

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

MORRIS, G.M., HUEY, R., LINDSTROM, W., SANNER, M.F., BELEW, R.K., GOODSELL, D.S., OLSON, A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **J. Comput. Chem.** 30, 2785–2791, 2009.

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

MURONETZ, V.I., MELNIKOVA, A.K., BARINOVA, K.V., SCHMALHAUSEN, E.V. Inhibitors of Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase and Unexpected Effects of Its Reduced Activity. **Biochemistry Moscow** 84, 1268–1279, 2019.

MUÑOS-SARAIVA, S.G.; HABERLAND, A.; WALLUKAT, G.; SCHIMKE, I. Chronic Chagas' heart disease: From pathogenesis to treatment regimes. **Applied Cardiopulmonary Pathophysiology**, vol.16, p. 55-81, 2012.

N. BANDEIRA, P., L. G. LEMOS, T., S. SANTOS, H., C. S. DE CARVALHO, M., P. PINHEIRO, D., O. DE MORAES FILHO, M., PESSOA, C., W. A. BARROS-NEPOMUCENO, F., H. S. RODRIGUES, T., R. V. RIBEIRO, P., S. MAGALHÃES, H., M. R. TEIXEIRA, A. Synthesis, structural characterization, and cytotoxic evaluation of chalcone derivatives. **Med Chem Res** 28, 2037–2049, 2019.

NGUYEN, D.D., XIAO, T., WANG, M., WEI, G.-W. Rigidity Strengthening: A Mechanism for Protein–Ligand Binding. **J. Chem. Inf. Model.** 57, 1715–1721, 2017.

NOGUEIRA, N. & COURA, J. R. American Trypanosomiasis (Chagas' Disease). In: **WARREN, K. S., MAHMOUD, A. D. F. Tropical and geographical medicine.** 2 ed. Nova York: McGraw Hill, 1989.

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

OBOT, I.B., MACDONALD, D.D., GASEM, Z.M., Density functional theory (DFT) as a powerful tool for designing new organic corrosion inhibitors. Part 1: An overview. **Corrosion Science** 99, 1–30, 2015.

OCHOA, R., GARCÍA, E., ROBLEDO, S.M., CARDONA G, W. Virtual and experimental screening of phenylfuranalcones as potential anti-Leishmania candidates. **Journal of Molecular Graphics and Modelling** 91, 164–171, 2019.

O'CONNOR, J.E., VARGAS, J.L., KIMLER, B.F., HERNANDEZ-YAGO, J., GRISOLIA, S. Use of Rhodamine 123 to investigate alterations in mitochondrial activity

in isolated mouse liver mitochondria. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 151, 568–573.

OLIVEIRA, M. M. *et al.* Spectroscopic characterization and efflux pump modulation of a thiophene curcumin derivative. **Journal of Molecular Structure**, v. 1215, 2020.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Enfermedad de Chagas (tripanosomíasis americana). Consultado a partir de: <http://www.paho.org/spanish/ad/dpc/cd/chagas.htm>, em 15 de julho de 2006.

ORTALLI, M., ILARI, A., COLOTTI, G., DE IONNA, I., BATTISTA, T., BISI, A., GOBBI, S., RAMPA, A., DI MARTINO, R.M.C., GENTILOMI, G.A., VARANI, S., BELLUTI, F. Identification of chalcone-based antileishmanial agents targeting trypanothione reductase. **European Journal of Medicinal Chemistry** 152, 527–541, 2018.

PADMANABHAN, J., PARTHASARATHI, R., ELANGO, M., SUBRAMANIAN, V., KRISHNAMOORTHY, B.S., GUTIERREZ-OLIVA, S., TORO-LABBÉ, A., ROY, D.R., CHATTARAJ, P.K. Multiphilic Descriptor for Chemical Reactivity and Selectivity. **J. Phys. Chem. A** 111, 9130–9138, 2007.

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.

PARR, R.G., SZENTPÁLY, L. V., LIU, S., Electrophilicity Index. **J. Am. Chem. Soc.** 121, 1922–1924, 1999.

PEARSON, R.G., 1963. Hard and Soft Acids and Bases. **J. Am. Chem. Soc.** 85, 3533–3539, 1963.

PEARSON, R.G., Recent advances in the concept of hard and soft acids and bases. **J. Chem. Educ.** 64, 561, 1987.

PEREIRA P. C.; NAVARRO E. C. J. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. **Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**. v.19 (1): p.34, 2013.

PEREIRA K. S.; SCHMIDT F. L.; GUARALDO A. M.; FRANCO R. M.; DIAS V. L.; PASSOS L. A. J. Chagas' disease as a foodborne illness. **Food Prot.**,v.72(2): p.441-6, 2009.

PÉREZ -AYALA A.; PÉREZ-MOLINA J.A.; NORMAN F.; NAVARRO M.; MONGE-MAILLO B.; DÍAZ MENÉNDEZ M.; PERIS-GARCÍA J.; FLORES M.; CAÑAVATE C.; LÓPEZ-VÉLEZ R. Chagas disease in Latin American migrants: a Spanish challenge. **Clin Microbiol Infect**. v.17(7): p.1108-13, 2011.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; NORMAN, F.; LÓPEZ VÉLEZ, R. Chagas Disease in Non-Endemic Countries: Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment. **Current Infectious Disease Reports**, v. 14, n. 3, p. 263–274, 3 jun. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22477037>>.

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

PETTERSEN, E.F., GODDARD, T.D., HUANG, C.C., COUCH, G.S., GREENBLATT, D.M., MENG, E.C., FERRIN, T.E. UCSF Chimera: A visualization system for exploratory research and analysis. **J. Comput. Chem**. 25, 1605–1612, 2004.

PETTERSSON, M., HOU, X., KUHN, M., WAGER, T.T., KAUFFMAN, G.W., VERHOEST, P.R. Quantitative Assessment of the Impact of Fluorine Substitution on P-Glycoprotein (P-gp) Mediated Efflux, Permeability, Lipophilicity, and Metabolic Stability. **J. Med. Chem**. 59, 5284–5296, 2016.

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.

PRATA, A. Chaga's disease. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 8, p. 61-76, 1994.

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.

RASSI, A. *et al.* **Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 231-244, 2000.

RASSI, JR., A; MARIN-NETO, J. A..Chagas disease. **The Lancet**, Volume 375, p. 1388-1402, 2010.

REZENDE-FILHO, J. *et al.* Métodos radiológicos e manométricos para o diagnóstico da esofagopatia e da colopatia chagásica. In: **COURA, J. R. (Ed.). Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 653-666, 2005.

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.

RODRIGUES, J. H.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORRÊA, A. G.; SANGI, D. P.; NAKAMURA, C. V. A quinoxaline derivative as a potent chemotherapeutic agent, alone

or in combination with benznidazole, against *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**. v.9(1): e85706., 2014.

ROLÓN, M., VEGA, C., ESCARIO, J.A., GÓMEZ-BARRIO, A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitol Res** 99, 103–107, 2006.

SALMAZZO, G.R., VERDAN, M.H., SILVA, F., CICARELLI, R.M., MOTA, J. DA S., SALVADOR, M.J., DE CARVALHO, J.E., CARDOSO, C.A.L. Chemical composition and antiproliferative, antioxidant and trypanocidal activities of the fruits from *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg (Myrtaceae). **Natural Product Research** 35, 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.

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

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.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 75-85, 2007.

SESTI-COSTA R.; CARNEIRO, Z. A.; SILVA, M. C.; SANTOS, M.; SILVA, G. K.; MILANEZI, C.; DA SILVA, R. S.; SILVA, J. S. Ruthenium complex with benznidazole and nitric oxide as a new candidate for the treatment of chagas disease. **PLoS Negl Trop Dis**. 8(10):e3207, 2014.

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

SHAIK, A. B. *et al.* Design, Facile Synthesis and Characterization of Dichloro Substituted Chalcones and Dihydropyrazole Derivatives for Their Antifungal, Antitubercular and Antiproliferative Activities. **Molecules**, v. 25, n. 14, p. 3188, 13 jul. 2020b.

SHITYAKOV, S., FOERSTER, C. In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood&ndash;brain barrier choline transporter. **AABC** 23, 2014.

SILVA C. F.; MEUSER M. B.; DE SOUZA E. M.; MEIRELLES M. N.; STEPHENS C.E.; SOM P.; BOYKIN D. W.; SOEIRO M. N. Cellular effects of reversed amidines on *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51(11): p.3803-9, 2007.

SILVEIRA, A. C. El Control de la Enfermedad de Chagas em los Países del Cono Sur de América — Historia de una Iniciativa Internacional 1991/2001. **OPAS**, Brazil, 2002.

SINHA, S. *et al.* In vitro anti-malarial efficacy of chalcones: Cytotoxicity profile, mechanism of action and their effect on erythrocytes. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2019.

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

STAFFEN, I.V., BANHUK, F.W., TOMIOTTO-PELLISSIER, F., DA SILVA BORTOLETI, B.T., PAVANELLI, W.R., AYALA, T.S., MENOLLI, R.A. Chalcone-rich extracts from *Lonchocarpus cultratus* roots present in vitro leishmanicidal and immunomodulatory activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** 74, 77–87, 2022.

STOTHARD, J. R. *et al.* Genetic diversity and genetic exchange in *Trypanosoma cruzi*: dual drug-resistant "progeny" from episomal transformants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, supl. 1, Sept. 1999.

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.

SWIFT, M.L.. GraphPad Prism, Data Analysis, and Scientific Graphing. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.** 37, 411–412, 1997.

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.

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

TOLEDO, M. J. O. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Chemotherapy with Benznidazole in Mice Inoculated with Strains from Paraná State and from Different Endemic Areas of Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 39, n. 5, Sept. 1997.

TROTT, O., OLSON, A.J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **J. Comput. Chem.** NA-NA, 2009.

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.

VAGO, A. R. *et al.* Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues

of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. **American Journal Pathology**, v. 156, p. 1805-1809, 2000.

VAHIA-LOUREIRO, A. M. *et al.* Biologia dos Triatomíneos **Arq. Brasil Med**, v. 70, p. 623-625, 1996.

VAN DE WATERBEEMD; H., GIFFORD, E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? **Nat Rev Drug Discov** 2, 192–204, 2003.

VAN GUNSTEREN, W.F., BERENDSEN, H.J.C. A Leap-frog Algorithm for Stochastic Dynamics. **Molecular Simulation** 1, 173–185, 1988.

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.

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.

VON SZENTPÁLY, L., Studies on electronegativity equalization. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM** 233, 71–81, 1991.

WAGER, T.T., CHANDRASEKARAN, R.Y., HOU, X., TROUTMAN, M.D., VERHOEST, P.R., VILLALOBOS, A., WILL, Y. Defining Desirable Central Nervous System Drug Space through the Alignment of Molecular Properties, in Vitro ADME, and Safety Attributes. **ACS Chem. Neurosci.** 1, 420–434, 2010a.

WAGER, T.T., HOU, X., VERHOEST, P.R., VILLALOBOS, A. Moving beyond Rules: The Development of a Central Nervous System Multiparameter Optimization (CNS MPO) Approach To Enable Alignment of Druglike Properties. **ACS Chem. Neurosci.** 1, 435–449, 2010b.

WAGER, T.T., HOU, X., VERHOEST, P.R., VILLALOBOS, A. Central Nervous System Multiparameter Optimization Desirability: Application in Drug Discovery. **ACS Chem. Neurosci.** 7, 767–775, 2016.

WALTON, M.I., BLEEHEN, N.M., WORKMAN, P. Heat-stimulated nitroreductive bioactivation of the 2-nitroimidazole benzimidazole in vitro. **Biochemical Pharmacology** 36, 2627–2632, 1987.

World Health Organization (WHO). “Chagas disease (American trypanosomiasis)”. Fact sheet N° 340 Updated March 2016. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2016.

YAN, J., ZHANG, G., PAN, J., WANG, Y.  $\alpha$ -Glucosidase inhibition by luteolin: Kinetics, interaction and molecular docking. **International Journal of Biological Macromolecules** 64, 213–223, 2014.

YANG, W., PARR, R.G., Hardness, softness, and the Fukui function in the electronic theory of metals and catalysis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 82, 6723–6726, 1985.

YUAN, S., CHAN, H.C.S., HU, Z. Using PyMOL as a platform for computational drug design. **WIREs Comput Mol Sci** 7, 2017.

YUSUF, D., DAVIS, A.M., KLEYWEGT, G.J., SCHMITT, S. An Alternative Method for the Evaluation of Docking Performance: RSR vs RMSD. **J. Chem. Inf. Model.** 48, 1411–1422, 2008.

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.

