



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

NAIARA DUTRA BARROSO GOMES

**EFEITO TRIPANOCIDA *IN SILICO* E *IN VITRO* DE *P*-AMINOCHALCONAS
SINTÉTICAS**

FORTALEZA

2023

NAIARA DUTRA BARROSO GOMES

**EFEITO TRIPANOCIDA *IN SILICO E IN VITRO* DE *P*-AMINOCHALCONAS
SINTÉTICAS**

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

Linha de Pesquisa: Biologia para Saúde.

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

FORTALEZA

2023

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)

- G615e Gomes, Naiara Dutra Barroso.
Efeito tripanocida in silico e in vitro de p-aminochalconas sintéticas / Naiara Dutra Barroso Gomes. –
2023.
105 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e
Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes.
1. Trypanosoma cruzi. 2. Doença de Chagas. 3. Simulação de Acoplamento Molecular. I. Título.
CDD 615
-

NAIARA DUTRA BARROSO GOMES

**EFEITO TRIPANOCIDA *IN SILICO E IN VITRO* DE *P*-AMINOCHALCONAS
SINTÉTICAS**

Dissertação de mestrado 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. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Hélcio Silva dos Santos
Universidade estadual Vale do Acaraú (UVA)

Profa. Dra. Lorena Mayana Beserra de Oliveira
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

*“Sou como uma haste fina que qualquer brisa verga,
mas nenhuma espada corta.”*

Maria Bethânia

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos, por todas as conquistas, e por todos os dias me permitir aprender sempre mais sobre a vida.

Aos meus pais, Elizabeth Dutra e Francisco Barroso, por todo o amor e cuidado e por nunca medirem esforços para a realização dos meus sonhos. Pelo apoio incondicional às minhas escolhas, estando sempre dispostos a me ajudar e acolher independente de qualquer situação. A vocês, todo meu amor e gratidão! Tudo que sou hoje, devo aos ensinamentos de vocês.

À minha irmã, Natália, pela preocupação comigo e por estar sempre na torcida pelas minhas conquistas. Minha “Coquinha”, obrigada por toda sua ajuda e seu companheirismo.

Ao meu esposo, Ricardo, pela paciência, apoio e companheirismo em todas as fases, principalmente nas mais difíceis. Além disso, agradeço o seu amor, zelo e carinho, sua admiração por mim e respeito de sempre às minhas decisões. Obrigada, meu amor! Sem seu suporte, não teria chegado até aqui.

Ao meu querido orientador, Prof. Ramon, que acreditou em mim e confiou no meu trabalho. Obrigada pelos conselhos, pelas conversas, por me acalmar em vários momentos, e, por sempre dizer “calma, vai dar tudo certo” quando eu estava desacreditada e ansiosa. Sem dúvidas, todo esse apoio me confortou e me fez chegar ao final do processo.

Ao Prof. Hércio Santos, por ter cedido as moléculas do estudo; aos professores Emmanuel Marinho, Márcia Marinho do Grupo de Química Teórica e Eletroquímica (GQTE), pela parceria e ensaios de docking molecular.

A todos os colegas do Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica (LBFBC), especialmente à Yasmim e ao Emanuel, dois amigos que vou levar comigo para a vida. Obrigada pela paciência, pelas risadas, pelos ensinamentos com os experimentos e apoio.

Às minhas demais amigas (Camilinha, Regina Amanda, Osiely, Layla, Catiúscia) que contribuíram neste período, compartilhando conversas, risadas, conselhos e apoio. Vocês

são muito importantes em minha vida e desejo tê-las por perto para que possamos continuar celebrando a vida. Agradeço a torcida por mim.

À banca, pelas considerações e contribuições ao trabalho.

Ao Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas (PGCF) e à Universidade Federal do Ceará (UFC). À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Meus agradecimentos, também, à todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho. Muito obrigada!!

RESUMO

A doença de Chagas (DC) é uma doença tropical negligenciada de preocupação mundial em saúde, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, sendo endêmica na América Latina e presente na América do Norte e Europa. O tratamento contra DC preconizado pela Organização Mundial de Saúde é o benznidazol, no entanto, essa terapia é limitada e de baixa segurança, havendo necessidade de novas opções terapêuticas. As chalconas são uma classe importante de compostos naturais que tem mostrado potencial antichagásico. Desta forma, o objetivo do estudo foi avaliar a atividade de *p*-aminochalconas sintéticas contra *T. cruzi*. As moléculas 1-(4-aminophenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one (CPAB) e 1-(4-aminophenyl)-5-phenylpenta-2,4-dien-1-one (CPAC) foram avaliadas quanto a sua citotoxicidade pelo ensaio de redução do MTT em células LLC-MK₂. A investigação do efeito em formas epimastigotas e tripomastigotas foi feita através da determinação do percentual de parasitos viáveis. Nos ensaios com as formas amastigotas foram utilizadas as concentrações de 15,6 e 31,2 µM. Em seguida, foram realizados ensaios de citometria de fluxo com as formas epimastigotas, a fim de avaliar o perfil de morte celular (7-AAD/AxPE), produção de ROS citoplasmáticas (DCFH₂-DA) e potencial transmembrânico mitocondrial (Rho123). Além disso, simulações de docking molecular foram realizadas com os alvos do parasito, como alvo as enzimas Tripanotiona redutase, cruzaina e TcGAPDH. Nas análises de citotoxicidade, foram observados valores de CC₅₀ estimada em 85,6 ± 9,2 µM para CPAB, enquanto a molécula CPAC, mostrou ser menos tóxica, com CC₅₀ 1115 ± 381,7 µM. As moléculas de interesse exibiram atividade contra as formas epimastigotas nos três tempos de tratamento para CPAB (IC₅₀ 24h = 38,4 ± 6,2 µM; IC₅₀ 48h = 20,7 ± 3,3 µM e IC₅₀ 72h = 19,2 ± 3,4 µM) e CPAC (IC₅₀ 24h = 74,8 ± 4,2 µM; IC₅₀ 48h = 61,6 ± 5 µM e IC₅₀ 72h = 52,3 ± 1,8 µM). O efeito sob as formas tripomastigotas mostrou que as chalconas CPAB e CPAC foram capazes de causar a morte parasitária, com valores de LC₅₀ estimados em 33,3 ± 3,9 µM e 73 ± 15,9 µM, respectivamente. As chalconas CPAB e CPAC foram capazes de reduzir o percentual de células infectadas e o número de amastigotas por células, demonstrados pelo índice de seletividade de 2,6 e 15,3, respectivamente. Os ensaios de citometria demonstraram que o efeito antichagásico das moléculas de estudo estavam relacionadas a uma possível atividade necrótica com alteração do potencial mitocondrial. Nos estudos de docking molecular, tendo como alvo as enzimas Tripanotiona redutase, cruzaina e TcGAPDH, foi possível observar interações com o sítio catalítico e outras regiões de importância desses principais alvos farmacológicos de *T. cruzi*. Assim, conclui-se que as chalconas de estudo apresentaram efeito antichagásico sobre as formas evolutivas de *T. cruzi*, com possível indução de necrose e *stress* oxidativo, sendo esse efeito potencialmente maior quando comparado com o fármaco de referência.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; Doença de Chagas; Simulação de Acoplamento Molecular.

ABSTRACT

Chagas disease (CD) is a neglected tropical disease of global health concern, caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*, being endemic in Latin America and present in North America and Europe. The treatment against CD recommended by the World Health Organization is benznidazole, however, this therapy is limited and of low safety, requiring new therapeutic options. Chalcones are an important class of natural compounds that have shown antichagasic potential. Thus, the aim of the study was to evaluate the activity of synthetic p-aminochalcones against *T. cruzi*. The molecules 1-(4-aminophenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one (CPAB) and 1-(4-aminophenyl)-5-phenylpenta-2,4-dien-1-one (CPAC) were evaluated for their cytotoxicity by the MTT reduction assay in LLC-MK2 cells. The investigation of the effect on epimastigotes and trypomastigotes was carried out by determining the percentage of viable parasites. In the tests with amastigotes, concentrations of 15.6 and 31.2 μM were used. Then, flow cytometry assays were performed with the epimastigotes forms, in order to evaluate the profile of cell death (7-AAD/AxPE), production of cytoplasmic ROS (DCFH2-DA) and mitochondrial transmembrane potential (Rho123). In addition, molecular docking simulations were performed with the parasite targets, such as Trypanothione reductase, cruzain and TcGAPDH enzymes. In the cytotoxicity analyses, CC50 values estimated at $85.6 \pm 9.2 \mu\text{M}$ were observed for CPAB, while the CPAC molecule proved to be less toxic, with CC50 $1115 \pm 381.7 \mu\text{M}$. The molecules of interest exhibited activity against the epimastigotes forms in the three treatment times for CPAB ($\text{IC}_{50} 24\text{h} = 38.4 \pm 6.2 \mu\text{M}$; $\text{IC}_{50} 48\text{h} = 20.7 \pm 3.3 \mu\text{M}$ and $\text{IC}_{50} 72\text{h} = 19.2 \pm 3.4 \mu\text{M}$) and CPAC ($24\text{h IC}_{50} = 74.8 \pm 4.2 \mu\text{M}$; $48\text{h IC}_{50} = 61.6 \pm 5 \mu\text{M}$ and $72\text{h IC}_{50} = 52.3 \pm 1.8 \mu\text{M}$). The effect on trypomastigotes showed that CPAB and CPAC chalcones were able to cause parasite death, with estimated LC50 values of $33.3 \pm 3.9 \mu\text{M}$ and $73 \pm 15.9 \mu\text{M}$, respectively. CPAB and CPAC chalcones were able to reduce the percentage of infected cells and the number of amastigotes per cell, demonstrated by the selectivity index of 2.6 and 15.3, respectively. Cytometry assays demonstrated that the antichagasic effect of the studied molecules was related to a possible necrotic activity with alteration of the mitochondrial potential. In molecular docking studies, targeting the enzymes Trypanothione reductase, cruzain and TcGAPDH, it was possible to observe interactions with the catalytic site and other important regions of these main pharmacological targets of *T. cruzi*. Thus, it is concluded that the studied chalcones had an antichagasic effect on the evolutionary forms of *T. cruzi*, with possible induction of necrosis and oxidative stress, with this effect being potentially greater when compared to the reference drug.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; Chagas disease; Molecular Coupling Simulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição mundial da Doença de Chagas.....	15
Figura 2 - Principais estágios de desenvolvimento do <i>T. cruzi</i>	18
Figura 3 - Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	19
Figura 4 - Estrutura básica de chalconas.....	23
Figura 5 - Delineamento experimental realizado no estudo.....	30
Figura 6 - Representação esquemática da distribuição de campos pela câmara de Neubauer.....	32
Figura 7 - Representação esquemática do procedimento de Plaqueamento de células LLC-MK ₂ e tratamentos com as substâncias do estudo.....	33
Figura 8 - Representação esquemática da realização do ensaio de MTT para avaliação da viabilidade celular.....	34
Figura 9 - Representação esquemática do procedimento de Plaqueamento e avaliação do efeito das chalconas sobre as formas epimastigotas.....	35
Figura 10 - Representação esquemática do procedimento de Plaqueamento e avaliação do efeito das chalconas sobre as formas tripomastigotas.....	37
Figura 11 - Representação esquemática do procedimento de Plaqueamento e avaliação do efeito das chalconas sobre as formas amastigotas.....	40
Figura 12 - Representação esquemática do procedimento de marcação com Ax-PE e 7AAD para avaliação do perfil de morte celular.....	41
Figura 13 - Representação esquemática do procedimento de marcação com DCFH-DA para avaliação do acúmulo citoplasmático de ERO.....	42
Figura 14 - Representação esquemática do procedimento de marcação com Rho123.....	43
Figura 15 – Avaliação da citotoxicidade das chalconas e Bz nas células hospedeiras LLC-MK ₂	49

Figura 16 – Efeito antiproliferativo de CPAB sobre as formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	50
Figura 17 – Efeito antiproliferativo de CPAC sobre as formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	51
Figura 18 – Efeito antiproliferativo de Bz sobre as formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	52
Figura 19 – Efeito tripanocida das chalconas e Bz sobre as formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	53
Figura 20 – Efeito antiamastigota de CPAB	55
Figura 21 – Efeito antiamastigota de CPAC	56
Figura 22 – Ensaios de perfil de morte de CPAB usando Ax-PE e 7AAD após 24 horas de incubação	58
Figura 23 – Ensaios de perfil de morte de CPAC usando Ax-PE e 7AAD após 24 horas de incubação	59
Figura 24 – Ensaios de perfil de morte de Benznidazol com as formas epimastigotas usando 7AAD e Ax-PE após 24 horas de incubação	60
Figura 25 - Análise das espécies reativas de oxigênio em epimastigotas tratadas com CPAB e CPAC por citometria de fluxo	66
Figura 26 – Análise de $\Delta\Psi_m$ das formas epimastigotas tratadas com as substâncias CPAB e CPAC por citometria de fluxo	67
Figura 27 – O MEP para as moléculas CPAB e CPAC computado no nível de teoria B3LYP/6-31G (d,p) na fase gasosa	68
Figura 28 – Complexo e mapas de interação dos ligantes com a enzima cruzafina	72
Figura 29 – Complexo e mapas de interação dos ligantes com a enzima GAPDH	74
Figura 30 – Complexo e mapas de interação dos ligantes com a enzima Tripanotiona redultase	76

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1 – Estruturas químicas, massa molar e nomenclaturas das chalconas.....	29
Tabela 2 – Resumo das atividades biológicas e citotoxicidade em LLC-MK ₂	54
Tabela 3 – Efeito de CPAB e CPAC sobre as formas amastigotas	57
Tabela 4 - Valores de energia de afinidade e RMSD dos complexos formados cruzaína, TcGAPDH e tripanotiona redutase.....	69
Tabela 5 - Interações entre CPAB, CPAC, Benznidazol e o inibidor co-cristalizado KB2 com a enzima cruzaína.....	71
Tabela 6 - Interações entre CPAB, CPAC, Benznidazol e o inibidor co-cristalizado BRZ com a enzima TcGAPDH.....	73
Tabela 7 - Interações entre CPAB, CPAC, Benznidazol e o inibidor co-cristalizado QUM com a enzima tripanotiona redutase.....	75

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

1,3-BPG	1,3-Bifosfoglicerato
7-AAD	7-aminoactinomycin D
ATP	Trifosfato de adenosina
BOD	Biochemical oxygen demand
Bz	Benznidazol
CC ₅₀	Concentração capaz de causar citotoxicidade em 50% das células
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
DC	Doença de Chagas
DCA	Doença de Chagas Aguda
DCFox	Forma oxidada de 2'7'-diclorofluoresceína
DCFH-DA	2'7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
D-G3P	Gliceraldeído-3-fosfato
DFT	Teoria do Funcional da Densidade
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsufóxido
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
G3P	D-gliceraldeído-3-fosfato
IC ₅₀	Concentração capaz de inibir o crescimento de 50% de epimastigotas
IFR	Intensidade de fluorescência relativa
LLC-MK ₂	Células epiteliais renais de macaco
LIT	Infusão de triptose
LC ₅₀	Concentração capaz de matar 50% de tripomastigotas
MEP	Potencial Eletrostático Molecular
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH ⁺	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidada
NO ₂	Radical nitro

NTR	Enzimas nitroreduases do tipo I
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pi	Fosfato inorgânico
PBS	Solução salina tamponada com fosfato estéril
PDB	Protein Data Bank
RE	Retículo endoplasmático
Rho	Rodamina 123
RMSD	<i>Root mean square deviation</i>
RPM	Rotação por minuto
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Sel	Índice de seletividade
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecilsulfato de sódio
TR	Tripanotona redutase

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
\leq	Menor ou igual
$<$	Menor
$>$	Maior
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
μ l	Microlitros
μ M	Micromolar
mg	Miligrama
ml	Mililitro
pH	Potencial Ácido
rpm	Rotações por minutos
Å	Angstrom
β	Beta
α	Alfa
mg	Miligrama
Δ	Delta
Ψ	Psi

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Histórico e epidemiologia da doença de Chagas	15
1.2 Vias de Transmissão da doença de Chagas	16
1.3 Biologia celular e ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
1.4 Tratamento farmacológico da doença de Chagas	19
1.5 Novos alvos farmacológicos	21
1.5.1 Cruzaína	21
1.5.2 Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	22
1.5.3 Tripanotiona redutase	22
1.6 Chalconas	23
1.7 Justificativa e relevância	24
2 OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo Geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Obtenção das moléculas	29
3.2 Avaliação <i>in vitro</i>	30
3.2.1 Cultivo e manutenção de células LLC-MK ₂	31
3.2.1.1 Avaliação da citotoxicidade sobre células LLC-MK ₂	31
3.2.2 Cultivo e manutenção das formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
3.2.2.1 Determinação do efeito das substâncias sobre as formas epimastigotas	35
3.2.3 Cultivo e manutenção das formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	36
3.2.3.1 Avaliação do efeito das substâncias sobre as formas tripomastigotas	36
3.2.4 Avaliação da atividade de CPAB e CPAC sobre formas amastigotas	37
3.3 Análises por citometria de fluxo	39
3.3.1 Perfil de morte celular utilizando Anexina V-PE e 7AAD	39

3.3.2	Análise da produção de ROS citoplasmáticas	40
3.3.3	Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial	42
3.4	Procedimentos computacionais	43
3.4.1	Estruturas <i>in silico</i>	43
3.4.2	Detalhes computacionais	43
3.4.3	Preparação e otimização dos ligantes	44
3.4.4	Procedimentos gerais de ancoragem	44
3.5	Análise Estatística	46
4.	RESULTADOS	48
4.1	Avaliação <i>in vitro</i>	48
4.1.1	Avaliação da toxicidade das substâncias em células hospedeiras	48
4.1.2	Efeito antiproliferativo sobre as formas epimastigotas	50
4.1.3	Efeito antiproliferativo sobre as formas tripomastigotas	52
4.1.4	Efeito anti-amastigota	54
4.2	Avaliação de Mecanismo de morte celular	57
4.2.1	Efeito apoptótico e necrótico das substâncias em estudo	57
4.2.2	Avaliação da produção de ERO citoplasmática	61
4.2.3	Efeito das moléculas no potencial transmembrânico mitocondrial	61
4.3	Resultados Teoria do funcional da densidade (DFT)	62
4.4	Avaliação de docking molecular	64
4.4.1	Docking molecular com os alvos enzimáticos	64
4.4.1.1	Cruzaína	65
4.4.1.2	TcGAPDH	67
4.4.1.3	Tripanotiona redutase	69
	DISCUSSÃO	73
	CONCLUSÃO	84
	REFERÊNCIAS	86

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico e epidemiologia da doença de Chagas

A doença de Chagas (DC), principal antropozoonose endêmica americana, foi descoberta inicialmente pelo sanitarista Carlos Chagas, em 1909. No trabalho pioneiro, o médico descreveu as formas epimastigotas em divisão e as formas tripomastigotas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi* no intestino anterior e posterior, respectivamente, de um triatomíneo da espécie *Panstrongylus megistus* capturado em uma cabana, no sertão de Minas Gerais. Na tentativa de controlar um surto de malária, o médico observou a presença de insetos hematófagos, na qual a população local chamava de barbeiros. Posteriormente, ao estudar estes insetos, o pesquisador descobriu a presença de um parasito flagelado no intestino do inseto que o denominou de *Trypanosoma cruzi* (LÓPEZ-VÉLEZ; NORMAN & BERN, 2020).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) e Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), estima-se que cerca de, aproximadamente, 8 milhões de pessoas sofrem com a DC em todo mundo, tendo sido considerado um problema de saúde pública global, com milhares de indivíduos infectados nas populações latinas, sul dos EUA e Europa, mas também presente em áreas -até então- não endêmicas, como Canadá e Austrália, graças à globalização e aos movimentos migratórios (JACKSON; PINTO & PETT, 2014; FLORES-FERRER et al., 2018). A doença é encontrada principalmente em áreas endêmicas de 21 países da América Latina, conforme apresentado na figura 1. Anualmente, há cerca de, aproximadamente, 12 mil óbitos anuais de DC e apenas 30% dos infectados, diagnosticados (DNDI, 2022).

Figura 1 – Distribuição mundial da Doença de Chagas.



Fonte: Adaptado de DNDI, 2022. Acesso em 01 de dezembro de 2022.

Segundo o boletim epidemiológico do Ministério da saúde, até o ano de 2020 foram registrados 146 novos casos de DC aguda (DCA) no Brasil. Em relação aos óbitos pela doença como causa básica, foram registrados de março a agosto do mesmo ano, 1.746 óbitos, com maior proporção nas regiões Sudeste e Nordeste (BRASIL, 2021). No entanto, de acordo com Zaidel et al., (2020), devido a pandemia de COVID-19, as populações vulneráveis se tornaram mais susceptíveis a ter complicações cardíacas ou gastrointestinais ocasionadas pelo vírus, contribuindo, desta forma, na cadeia causal de óbitos.

Notificações nos órgãos de Vigilância indicam que foram registrados, de 2007 a 2019, 3.060 casos de DCA, em diferentes estados do país, especialmente na região Norte, seguida da região Nordeste. No entanto, sabe-se que a doença nesta fase não é prontamente identificada, sendo diagnosticada somente após o desenvolvimento de complicações crônicas (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2018; SANTOS, 2020). Como resultado, é possível que o número de infectados na população brasileira sejam maiores do que os apontados estatisticamente pelos boletins epidemiológicos (DE ANDRADE LIMA et al., 2022).

1.2 Vias de transmissão, sinais e sintomas da Doença de Chagas

A infecção pelo *T. cruzi* pode ocorrer em diferentes rotas de transmissão, como, por via vetorial, que continua sendo a via predominante e clássica de contaminação através do triatomíneo hematófago. As espécies de maior importância clínica no país são *Triatoma infestans*, *T. sordida*, *T. brasiliensis* e *Panstrongylus megistus*. A transmissão por via oral é ocasionada pelo consumo de alimentos contaminados, como açaí, cana-de-açúcar ou frutas contendo as fezes ou vetor com as formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Em contrapartida, existem outras vias de transmissão, como por via transfusional, congênita, vertical e acidental (BERN et al., 2019).

Após o primeiro contato com os vetores infectados, inicia-se a fase aguda da DC, caracterizada pela alta taxa de parasitemia no sangue, sendo assintomático na maioria das vezes. As manifestações clínicas mais comuns nesta fase são mal estar geral, febre, aumento de nódulos linfáticos, hepatoesplenomegalia e manifestações cardíacas. Além dessas manifestações, a pessoa infectada também pode apresentar chagoma de inoculação

e sinal de Romaña, que são caracterizadas como edema cutâneo e bpalpebral ou unilateral, sendo caracterizados como sinais de portas de entrada quando a transmissão é por via vetorial. No entanto, na ausência desses sinais, a infecção é raramente identificada e diagnosticada (ACQUATELLA et al., 2018).

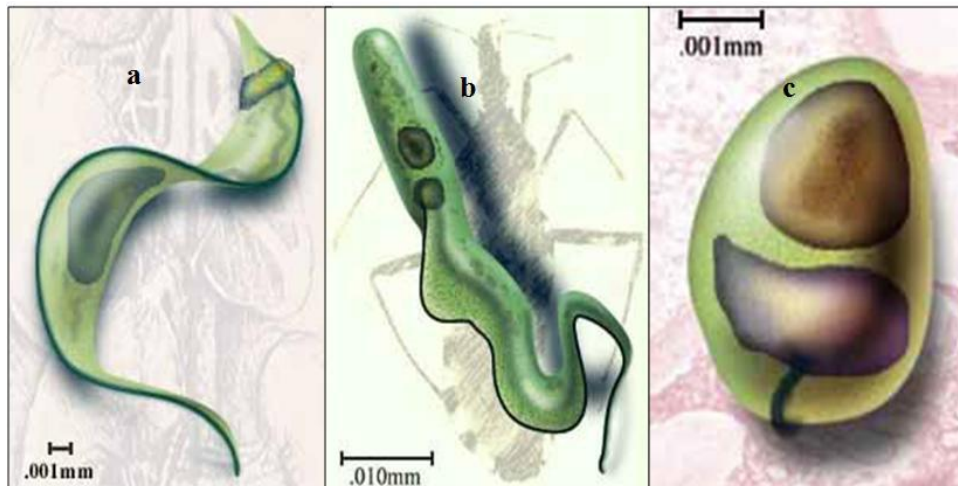
Um a dois meses após o início dos sintomas, a parasitemia cai abaixo dos níveis detectáveis e o paciente passa para a fase crônica da infecção. Quando caracterizada pela ausência de sinais e sintomas, é denominada forma indeterminada da doença. Essa forma é a mais frequente de infecção chagásica, a qual corresponde a um período assintomático, que pode levar de dez a vinte anos. Somente 20 a 30% desses indivíduos chagásicos desenvolvem cardiopatia chagásica crônica, que correspondem microscopicamente à presença de macrófagos e pequenos ou grandes linfócitos que migram dos vasos linfáticos para superfícies epicárdicas. Após a invasão dessas células mononucleares ao coração, a lise das células cardíacas do coração ocorre (BENCK; KRANSDORF & PATEL, 2018).

À medida que as fibras cardíacas são destruídas, a inflamação diminui e essas fibras são gradualmente substituídas por cicatrizes fibrosas. No entanto, essas lesões inflamatórias que envolvem o sistema de condução do coração, o nó sinusal, os nervos intracardíacos e o sistema nervoso autônomo do coração, podem levar à insuficiência cardíaca, com subsequente aumento do volume cardíaco por dilatação predominante (SIMÕES et al., 2018).

1.3 Biologia celular e ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado pertencente ao subfilo *Mastigophora*, ordem *Kinetoplastida* e família *Trypanosomatidae*, na qual, no seu ciclo biológico, existem dois tipos de hospedeiros: o hospedeiro vertebrado e outro invertebrado. Dentre os diversos estágios de desenvolvimento, destacam-se três formas evolutivas principais: formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas (Figura 2).

Figura 2 - Principais estágios de desenvolvimento do *T. cruzi*.



Fonte: Adaptado de SFE® Brazil, 2019.

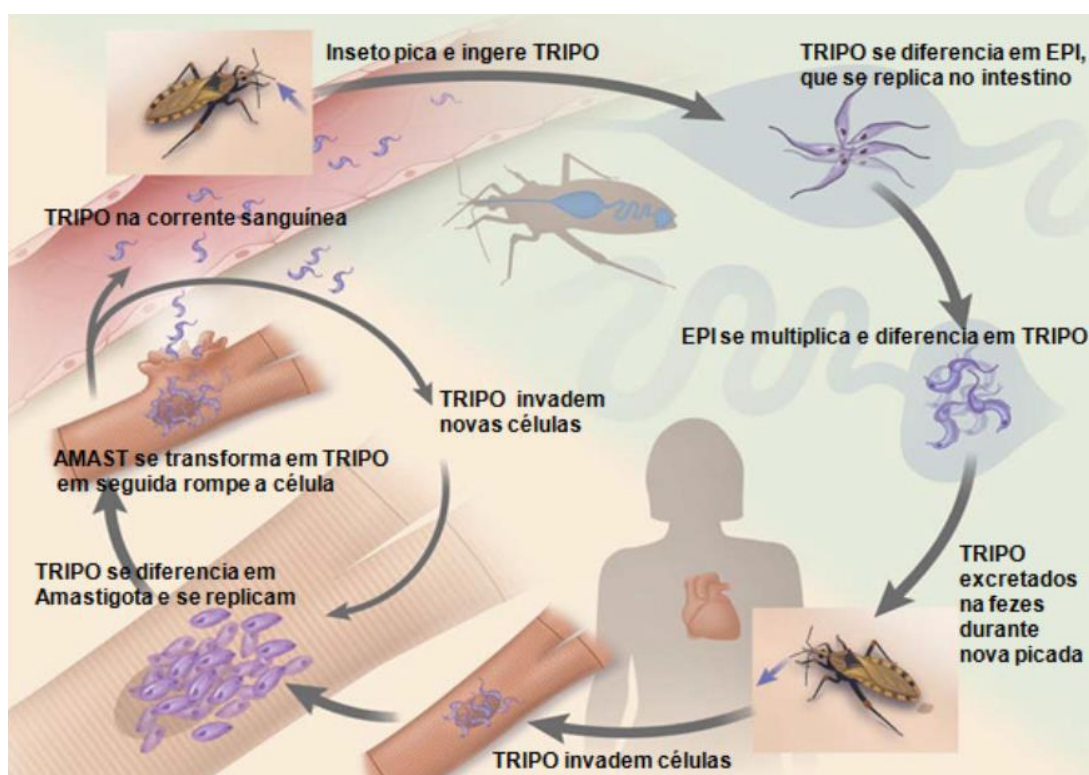
Legenda: Em a: forma tripomastigota; em b: forma epimastigota e em c: forma amastigota.

Para colonizar o hospedeiro mamífero e o vetor triatomíneo com sucesso, *T. cruzi* assume as três principais formas morfológicas distintas, mas em diferentes estágios de desenvolvimento. As formas epimastigotas e amastigotas se replicam no intestino posterior do vetor triatomíneo e por fissão binária em células de mamíferos, respectivamente. Enquanto as formas tripomastigotas estão presentes em dois estágios distintos do ciclo de vida: na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero e no reto e fezes dos vetores, como tripomastigotas metacíclicas (ACOSTA et al., 2017).

O ciclo biológico de *T. cruzi* (Figura 3) inicia quando as formas tripomastigotas metacíclicas infecciosas, através das fezes e urina contaminadas do vetor, são depositadas na pele ou mucosa do hospedeiro mamífero logo após o repasto sanguíneo. Uma vez internalizados, as formas tripomastigotas móveis infectam macrófagos locais, fibroblastos e outros tecidos no local da infecção. O parasito é levado para um vacúolo de membrana, chamado de vacúolo parasitóforo, na qual ele se funde com um lisossomo. Após sua exposição, com subsequente diminuição do pH, as formas tripomastigotas se diferenciam para a forma amastigota intracelular, na qual se replica a cada 12 horas, em um intervalo de 4 a 5 dias. É nesta etapa que essas formas se multiplicam assexuadamente para formação de pseudocistos, com predominância a diferentes tecidos, incluindo músculos cardíacos, lisos, esqueléticos e células reticuloendoteliais do fígado, baço e sistema linfático (EPTING; COATES & ENGMAN et al., 2010; OLAIA et al., 2021).

Logo após, as formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, que, após a lise celular, podem infectar tecidos adjacentes e então, iniciar novos ciclos replicativos. Os triatomíneos que se alimentam do sangue de um hospedeiro infectado podem ingerir as formas tripomastigotas que ao passarem pelo intestino médio do inseto, se transformam em uma forma intermediária, chamada esferomastigota. A diferenciação para as formas epimastigotas ocorre em resposta à diminuição dos níveis de glicose. As formas epimastigotas se multiplicam no intestino posterior e migram para o reto, onde se transformam em tripomastigotas metacíclicos infectantes, completando, desta forma, o ciclo de vida (FERREIRA et al., 2022).

Figura 3 - Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Adaptado de BERN (2015).

1.4 Tratamento farmacológico da doença de Chagas

O Benznidazol (Bz) e Nifurtimox são atualmente os únicos medicamentos utilizados para o tratamento da DC com eficácia comprovada e em uso desde o fim da década de 1960, que tem como objetivo eliminar o parasito, melhorando os resultados clínicos do paciente infectado e interrompendo o ciclo de transmissão. O Bz é considerado o tratamento de escolha no Brasil devido aos dados de eficácia mais abrangentes e por sua melhor tolerância. O Bz é um pró-fármaco, faz parte de um grupo de compostos

heterocíclicos, cujo nome químico é N-benzil-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida (JACKSON; WYSSA & CHAPPUIS, 2020).

Em *T. cruzi*, o Bz é ativado por enzimas nitroredutases do tipo I (NTR), insensíveis ao oxigênio e dependentes de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), que, ao catalisarem a redução do grupamento-2-nitro-1H-imidazol para uma hidroxilamina, por meio de um intermediário nitroso, liberam dialdeído glicoxal, um metabólito altamente reativo capaz de formar toxicidade em proteínas, lipídeos e DNA do *T. cruzi*, resultando em um efeito antichagásico contra formas intracelular e extracelular. No entanto, a produção de dialdeído glicoxal provavelmente não é o único mecanismo citotóxico produzido pelo Bz (MÜLLER KRATZ et al., 2018).

Desta forma, a descontinuidade do tratamento devido aos efeitos adversos e colaterais é frequentemente observada, geralmente variando de 15% a 20%, sendo mais frequente em adolescentes e adultos do que em crianças. Os efeitos mais comumente relatados incluem dermatia alérgica, náusea, vômitos e reações cutâneas. Menos frequentemente, tem sido relatado polineuropatia periférica e depressão de medula óssea (LEE et al., 2013).

Somando ao fato de a DC afetar predominantemente os grupos socioeconomicamente vulneráveis e se apresentar como uma doença negligenciada, esforços precisam ser alcançados na busca de estratégias farmacológicas seguras e eficazes.

1.5 Novos alvos farmacológicos para o desenvolvimento de fármacos antichagásicos

A pesquisa por novas alternativas terapêuticas para o tratamento da DC vem sendo realizada constantemente por instituições e grupos de pesquisa no mundo todo, que trabalham com estratégias visando a identificação de novos alvos farmacológicos. Dentre esses estudos, incluem a identificação de rotas metabólicas, bem como diferenças bioquímicas e farmacológicas entre as células do *T. cruzi* e as do hospedeiro, que podem ser usadas como alvos terapêuticos para desenvolver novos fármacos com mecanismos de ação direcionados (GARCÍA-HUERTAS & CARDONA-CASTRO, 2021).

A identificação desses alvos terapêuticos de *T. cruzi* é uma estratégia promissora para a identificação de moléculas com menor espectro de efeitos adversos do que os fármacos disponíveis no mercado. Essa abordagem se aplica na identificação de

moléculas que interagem com mais de um alvo, a fim de reduzir as falhas terapêuticas e toxicidade, evitando indução de resistência (JENWITHEESUK et al., 2008). Desta forma, algumas das enzimas mais promissoras como alvos terapêuticos em *T. cruzi* foram apresentados neste trabalho, como: Cruzaína, Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e Tripanotiona redutase (TR).

1.5.1 Cruzaína

Um alvo farmacológico amplamente estudado na DC é a cruzaína, principal cisteíno-protease de *T. cruzi*, pertencente à família das proteases ou hidrolases peptídicas que tem sido explorada como alvo molecular na descoberta de fármacos para tratamento da DC. As proteases desempenham um papel importante nesses organismos, sendo expressas em todo o ciclo e fases da vida do *T. cruzi*, e sendo a cruzaína identificada como a principal enzima responsável pela nutrição e desenvolvimento parasitário (HERRERA-MAYORGA et al., 2019).

A estrutura trimendimensional da cruzaína revela que esta protease se apresenta como um monômero com 215 resíduos de aminoácidos, na qual se encontra em dois domínios: um com predominância por α -hélices, e outro domínio com predominância por folhas- β antiparalelas. O seu sítio catalítico é envolvido por importantes resíduos de aminoácidos, como Cys25, His159 e Asn175, principalmente (BARBOSA DA SILVA et al., 2019).

A cruzaína está presente nos três estágios de desenvolvimento de *T. cruzi*, no entanto, sua localização nos compartimentos celulares pode variar. Nas formas epimastigotas e tripomastigotas, a sua localização encontra-se nos lisossomos e secretada para o meio extracelular, enquanto nas formas amastigotas, a cruzaína é expressa na superfície celular ou como proteína de membrana. A cruzaína permite ter uma variedade de funções, dentre as quais: papel chave na nutrição de *T. cruzi* mediante digestão lisossomal, participação na evasão do sistema biológico do hospedeiro, invasão e proliferação celular e interação com as células do hospedeiro (DOYLE et al., 2011; REYS-ESPINOSA et al., 2019).

1.5.2 *TcGAPDH*

Dentre as enzimas da via glicolítica de tripanossomatídeos, destaca-se a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (TcGAPDH), a qual exerce um controle significativo sobre a via glicolítica. A GAPDH é um homotetrâmero, que possui peso

molecular de 156.000 Dalton e 359 resíduos de aminoácidos por monômero, dispostos em dois domínios: o N-terminal ou domínio de ligação de NAD^+ e C-terminal ou domínio catalítico de classes α/β . O primeiro é formado por folhas β paralelas rodeadas por α hélices e o segundo inclui resíduos essenciais para a sua atividade catalítica, que correspondem, principalmente, aos resíduos His194 e Cys166 (CHELESKI et al., 2011; LOPES et al., 2018).

A GAPDH catalisa a oxidação e fosforilação do seu substrato, a gliceraldeído-3-fosfato (D-G3P), convertendo-o em ácido 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPG) na presença de fosfato inorgânico (Pi) e do cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma oxidada (NAD^+). Sua inibição altera o metabolismo energético e a produção de ATP, importantes para o ciclo de vida do parasito (LADAME et al., 2003; PARIONA-LLANOS et al., 2015).

Nos últimos anos, foram realizadas novas descobertas em relação as suas múltiplas funções, como resposta ao estresse oxidativo, manutenção da integridade do DNA, apoptose, autofagia e regulação do gene das histonas (SIROVER et al., 2011). Além disso, prevê-se que inibidores competitivos desta enzima, presentes em concentrações de até 100 vezes mais aos seus valores de K_1 , reduzem o fluxo glicolítico do parasito a zero. Assim, os inibidores da glicólise têm o potencial de servir como agentes eficazes anti- *T. cruzi* (BAKKER et al., 2000; BRESSI et al., 2001).

1.5.3 *Tripanotiona redutase*

A *Tripanotiona redutase* (TR) é uma flavoenzima dependente de NADPH, presente em tripanossomatídeos e que participa da proteção celular contra o estresse ou dano oxidativo mediado pelo sistema imunológico na infecção do hospedeiro mamífero, além de participar da defesa contra xenobióticos e manutenção do tiol redox (BELTRAN-HORTELANO; PEREZ-SILANES & GALIANO, 2017).

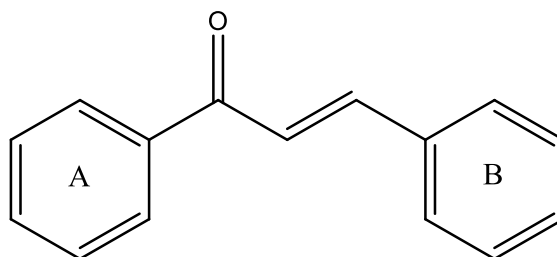
A TR é uma enzima envolvida no metabolismo do parasito reduzindo o grupo dissulfeto de $\text{T}[\text{S}_2]$ em *Tripanotiona* ditiol $\text{T}[\text{SH}_2]$, desencadeando uma cascata de eventos a fim de controlar ou neutralizar as espécies reativas de oxigênio (ROS). Na presença de ROS, o $\text{T}[\text{SH}_2]$ é oxidado e reduzido pela TR para manter o ambiente redutor no interior do parasito, levando a homeostase redox (BELTRAN-HORTELANO et al., 2022).

Essa reação é importante, uma vez que os radicais livres se ligam no sítio catalítico da TR, sofrem redução pela NADPH, gerando ânions radicais superóxidos, sendo responsáveis pela morte dos parasitos. Foi demonstrado por Mendonça et al., (2018), que a TR é de vital importância nestes organismos, visto que a deficiência ou inibição nas proteínas da via da síntese de TS₂ leva ao não desenvolvimento parasitário, conseqüentemente levando ao aumento da susceptibilidade do *T. cruzi* ao estresse oxidativo.

1.6 Chalconas

As chalconas (1,3-diaril-2-propen-1-ona) (Figura 4) são uma classe importante de compostos naturais, pertencente à família de flavonoides e importante classe de materiais orgânicos, que se encontra presente em frutas, vegetais e chá, principalmente. São fitoquímicos lipofílicos compostos por aldeído e acetofenona e dois resíduos aromáticos unidos por um sistema de carbonila α e β insaturados, as quais também podem formar facilmente ligações carbono-carbono, carbono-enxofre e carbono-nitrogênio (LI et al., 2019; MATHEW et al., 2019).

Figura 4 - Estrutura básica de chalconas.



Fonte – Elaborado pela autora com o software MarvinSketch.

Devido à sua simplicidade estrutural, várias sínteses de derivados de chalconas e avaliação da sua bioatividade foram descritas na literatura, tendo sido relatadas sua conjugação entre dupla ligação e o grupo carbonila presente na estrutura e ligação a enzimas e receptores enzimáticos, as quais dependerão da posição, número e natureza dos substituintes nos dois resíduos aromáticos presentes, além de ser um bom grupo de acceptor de Michael (ZHUANG et al., 2017; DE MELO et al., 2018).

Dados da literatura mostram que as chalconas naturais e sintéticas têm sido constantemente identificadas em aplicações clínicas e farmacêuticas, incluindo compostos com um amplo espectro de atividades biológicas, com propriedades

antibacterianas (TANG et al., 2019), antivirais (FU et al., 2020), anti-Alzheimer (ZHANG et al., 2018), anti-inflamatórias (STAURENGO-FERRARI et al., 2018) e anti-protozoárias (ORTALLI et al., 2018).

Além disso, as chalconas também possuem propriedades oxidantes em condições específicas, e esse efeito pode estar associado à sua atividade antitumoral, o qual é baseado em aumento da formação de superóxido, depleção de glutatona celular, geração de radicais fenóxido e vias de sinalização associadas à sobrevivência e morte celular (GUZY et al., 2010; ZHANG et al., 2017). Em contraste, também podem apresentar propriedades antioxidantes, apresentando efeito protetor em modelos experimentais causados pela produção excessiva de espécies oxidantes e, conseqüentemente, disfunção celular, causando danos ao DNA, proteínas e lipídeos (KWAK et al., 2012; TAKAC et al., 2020).

No contexto de doenças negligenciadas, as chalconas têm sido extensamente investigadas contra protozoários parasitos. Esses compostos derivados têm mostrado atividade *in vitro* e *in vivo*, contra *Leishmania braziliensis* e *L. donovani* (DE MELLO et al., 2014; GUPTA et al., 2014). Além disso, uma série de híbridos cumarina-chalconas foram sintetizadas e avaliadas como agentes tripanocidas promissoras, isso porque, esses compostos apresentaram atividade contra as três fases de desenvolvimento do *T. cruzi* (RODRIGUEZ et al., 2015). Desta forma, esses estudos tornam as chalconas candidatas potenciais promissoras, sobretudo, sobre os tripanossomatídeos.

1.7 Justificativa

Devido aos aspectos multifatoriais da DC que abrangem características biológicas, ecológicas, epidemiológicas, genéticas, clínicas e socioeconômicas, todo e qualquer controle da doença em humanos torna-se um desafio conjunto para os países. A DC representa um problema de saúde pública com altos índices de morbidade e mortalidade nas populações afetadas (MARTINS-MELO et al., 2019). Possui complicações crônicas importantes, como a cardiopatia chagásica e alterações digestivas, que causam grande comprometimento do estado geral de saúde dos pacientes afetados (ROJAS et al., 2018).

No Brasil, o BZ é o único medicamento disponível para o tratamento da DC, o qual foi desenvolvido há mais de quarenta anos e apresenta boa eficácia na fase aguda.

Em contraste, possui efeito limitado sobre as formas crônicas da doença, além de possuir efeitos adversos importantes, que limitam sua utilização clínica em terapias a longo prazo. Assim, o atual cenário farmacológico chama a atenção para a necessidade de buscar estratégias terapêuticas que promovam maior seletividade sobre os parasitas (BERN, 2015; CALDAS; SANTOS & NOVAES, 2019).

A atividade de chalconas vem sendo bastante investigada contra protozoários parasitas, apresentando resultados promissores. Em relação à leishmaniose, os resultados incluem a potente atividade *in vitro* e *in vivo* contra *Leishmania donovani* (GUPTA et al., 2014). Também foi observada atividade dessas moléculas contra *L. (Viannia) brasiliensis* (DE MELLO et al., 2014) e *L. panamensis* (CUELLAR et al., 2022).

As chalconas apresentam atividade anti-*Plasmodium falciparum* contra cepas suscetíveis e resistentes à cloroquina (SHARMA et al., 2014). A atividade antimalárica foi demonstrada tanto *in vitro* quanto *in vivo* (PANDEY et al., 2016). Também já existem relatos sobre a atividade de estruturas cumarina-chalcona contra *T. cruzi* (VAZQUEZ-RODRIGUEZ et al., 2016) e quinolona-chalconas contra *T. brucei* (ROUSSAKI et al., 2013).

Assim, as inúmeras atividades biológicas apresentadas pelas chalconas isoladas de plantas motivam esforços no sentido de desenvolvimento de novas moléculas naturais ou produzidas sinteticamente e que possuam aplicações biológicas. Os estudos para a síntese de novas moléculas objetivam a manipulação estrutural de seus anéis aromáticos por meio de reações químicas de estruturas sintetizadas com outras moléculas, a fim de potencializar e explorar cada vez mais suas atividades biológicas.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

- Avaliar o potencial tripanocida de *p*-aminochalconas sintéticas sobre a cepa Y de *T. cruzi*.

Objetivos específicos

- Determinar a citotoxicidade das chalconas CPAB e CPAC sobre as células hospedeiras LLC-MK₂;
- Analisar o efeito antiparasitário das chalconas CPAB e CPAC sobre as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* e a seletividade;
- Investigar os mecanismos das chalconas CPAB e CPAC de morte celular por apoptose e necrose sobre *T. cruzi*;
- Avaliar o efeito das chalconas CPAB e CPAC sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e o potencial transmembrânico mitocondrial induzidas em *T. cruzi*;
- Identificar as possíveis interações das chalconas CPAB e CPAC por docking molecular utilizando as enzimas parasitárias cruzaina, TcGAPDH e TR.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

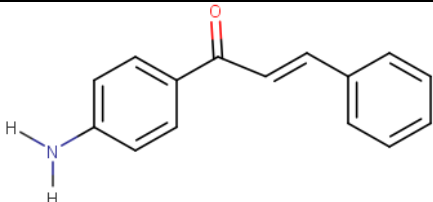
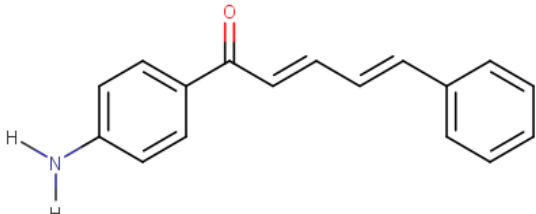
3.1 Obtenção das moléculas

As chalconas utilizadas no presente trabalho, demonstradas na tabela 1, foram cedidas pelo Laboratório de Síntese Orgânica, da Universidade Estadual do Vale do Acaraú (UVA), coordenado pelo prof. Dr. Helcio Silva dos Santos. As moléculas foram sintetizadas e caracterizadas conforme descrito previamente por Bandeira *et al* (2020). Na síntese, foi empregada a reação de condensação de Claisen-Schmidt em meio básico e a estrutura verificada por espectrometria de massa pela técnica de FTIR.

As substâncias foram diluídas na concentração de 0,2 M em dimetilsulfóxido (DMSO) estéril. Logo após, as soluções de trabalho (1000 – 15,2 μ M) foram preparadas por diluição seriada em solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS), constituído de NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM; Na₂HPO₄ 8,1 mM; ph 7,4. As diluições foram feitas de forma que a concentração final de DMSO nos experimentos não ultrapassasse 0,5%.

Adicionalmente, nos ensaios biológicos, foi utilizada uma solução DMSO a 0,5% para confirmar que o diluente não possuía efeitos tóxicos nas concentrações utilizadas.

Tabela 1: Estruturas químicas, massas molares, fórmulas moleculares e nomenclatura das chalconas obtidas por condensação de Claisen-Schmidt para o estudo no presente trabalho.

Estrutura química	Massa Molar (g/mol)	Fórmula Molecular	Nomeclatura IUPAC	Sigla
	224	C ₁₅ H ₁₃ NO	(E)-1-(4-aminophenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one	CPAB
	250	C ₁₇ H ₁₅ NO	(2E,4E)-1-(4-aminophenyl)-5-phenylpenta-2,4-dien-1-one	CPAC

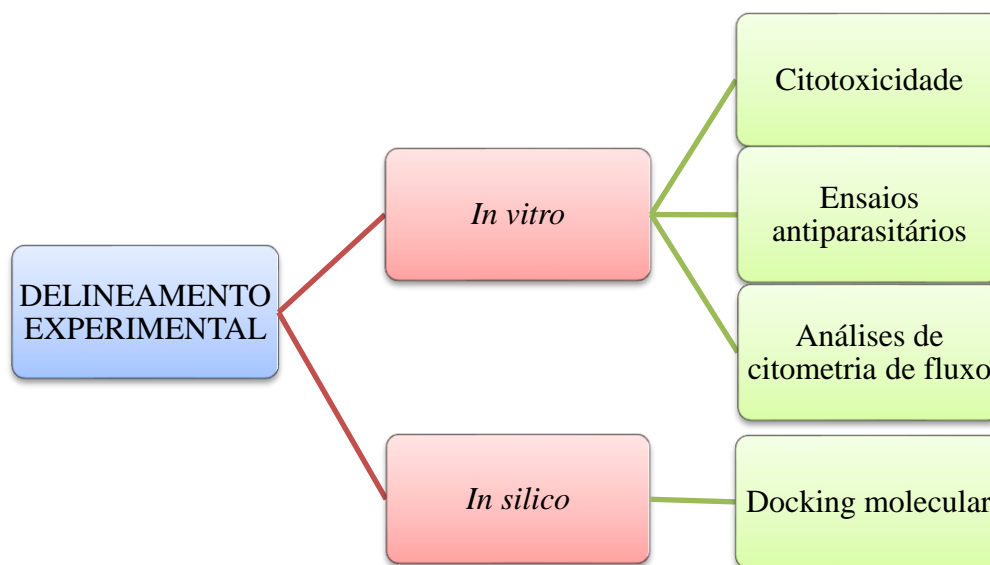
Legenda: Estruturas químicas das chalconas utilizadas no presente trabalho.

Fonte: Elaborado pela autora.

O (Bz), fármaco de referência, foi doado pelo Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE). A diluição das substâncias foi feita em DMSO estéril para obtenção de soluções estoque na concentração de 0,2 M. Para os ensaios, diluições seriadas foram feitas em PBS a fim de se obter as soluções de trabalho.

Foram realizados testes *in vitro* para avaliação do efeito da atividade das substâncias em estudo e em diferentes formas evolutivas de *T. cruzi*. Posteriormente, estas substâncias foram analisadas por abordagem computacional, envolvendo análises por docking molecular. O delineamento experimental está representado logo abaixo, na figura 5.

Figura 5: Delineamento experimental realizado no estudo



Legenda: Esquema de delineamento experimental baseado em experimentação *in vitro* e *in silico* utilizadas no estudo.

Fonte: Elaborado pela autora.

3.2 Avaliação *in vitro*

3.2.1 Cultivo e manutenção de Células LLC-MK₂

A citotoxicidade das chalconas do presente estudo foi investigada em células LLC-MK₂ com a finalidade de avaliar a seletividade das mesmas por *T. cruzi* em relação

às células hospedeiras. A linhagem celular LLC-MK₂ (ATCC CCL-7), estabelecida a partir de células epiteliais obtidas dos túbulos renais de macaco (*Macaca mulatta*), foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, pH 7,4), suplementado com 10% de SBF (Soro bovino fetal), penicilina (200 UI/mL) e estreptomicina (130 mg/mL). O cultivo das células foi realizado em garrafas plásticas estéreis (75 cm²) e mantido em estufa com 5% de CO₂ a 37,0 ± 0,3°C (DA SILVA et al., 2008).

O crescimento e densidade celular na monocamada foram avaliados diariamente através da observação por microscópio invertido até estas células atingirem o estado de confluência. Uma vez confluentes, o meio foi removido e as células lavadas com PBS estéril (5 mL), deslocadas em 1 mL de solução de Tripsina/EDTA (0,25%/0,04%), incubadas por 5 a 10 minutos a 37°C e inativadas em 2 mL de meio DMEM 10% SBF (DE MENEZES, 2019).

Para manutenção destas culturas, alíquotas foram transferidas para novas garrafas contendo meio de cultura. Para congelamento, as culturas confluentes foram lavadas, tripsinizadas e ressuspensas em meio DMEM suplementada com 10% de DMSO estéril. Em seguida, as células foram congeladas em *vials* de criopreservação a -20°C *overnight* e, em seguida, transferidas para freezer a -80°C.

3.2.1.1 Avaliação da citotoxicidade sobre células LLC-MK₂

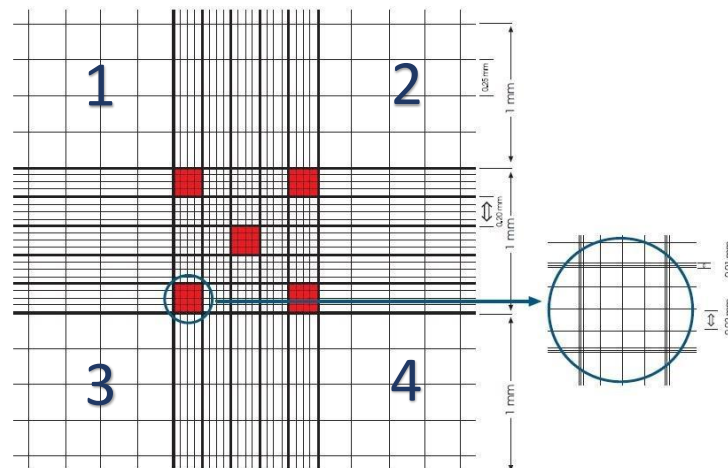
A avaliação da viabilidade celular foi realizada através do método colorimétrico empregando o sal MTT [Brometo de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio] previamente descrito por Mosmann (1983). Este teste é baseado na análise da atividade da desidrogenase dos produtos da reação de NADH e NADPH que, por sua vez, reduz a atividade formazan do MTT em células viáveis. A forma oxidada possui coloração amarela, que, quando em contato com as células viáveis, é internalizado por endocitose e reduzido no microambiente intracelular por desidrogenases citoplasmáticas e mitocondriais, em um sal de formazan de cor azul violácea.

Os cristais de formazan são excitados e solubilizados pela adição de agentes surfactantes, como o DMSO ou SDS (dodecilsulfato de sódio). A intensidade da cor

violácea produzida é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis e em condições devidamente otimizadas, o valor de absorbância é diretamente proporcional ao número de células viáveis, tendo os produtos finais lidos por espectrofotometria a 570 nm.

Para a realização deste ensaio, as culturas confluentes foram lavadas e tripsinizadas e, em seguida, a mistura transferida para um tubo falcon, centrifugada (4000 rpm) por 5 minutos, e o sobrenadante removido. O *pellet* foi ressuspensão em 1 mL de meio DMEM, e uma alíquota foi diluída em solução de azul de trypan (0,4% m/v em PBS) nas proporções de 1:10 e 1:100, e quantificadas em câmara de Neubauer, como demonstrado na figura 6.

Figura 6: Representação esquemática da distribuição de campos pela câmara de Neubauer.



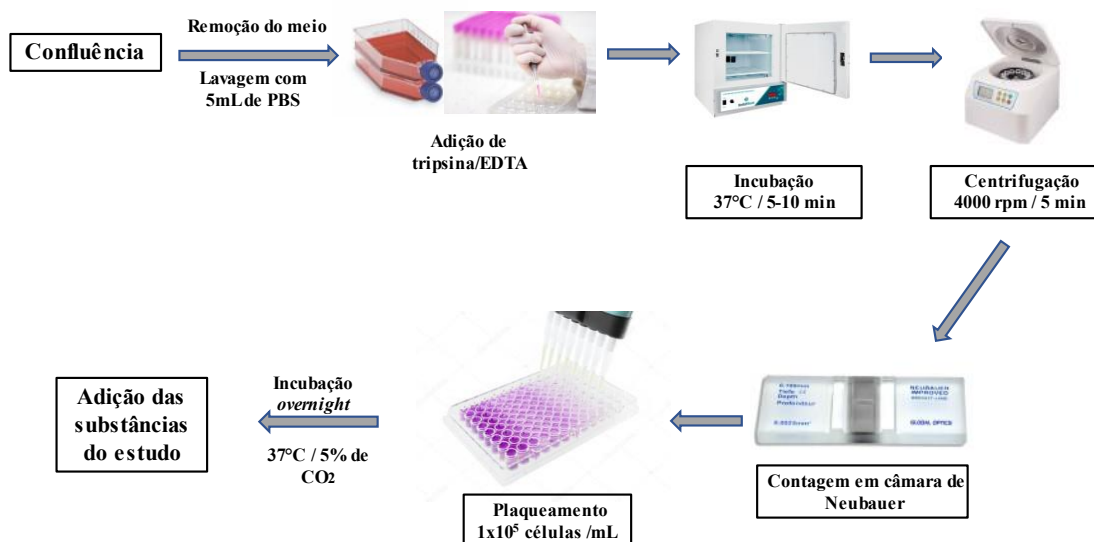
Fonte: Adaptado de <https://www.hhub.com.br/protocolos/Controle.pdf>. Acessado em: 01/12/2022
 Legenda: Os quatro campos maiores (1, 2, 3 e 4) foram utilizados para quantificação das células LLC-MK₂. Os cinco campos destacados em vermelho foram utilizados para a contagem de parasitos (formas epimastigota e tripomastigota).

A densidade celular (células/mL) foi determinada através da equação 2:

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

As células foram cultivadas na concentração de 1×10^5 células/mL, transferidas para placas estéreis de 96 poços (200 μ L/poço) e incubadas em estufa de CO_2 *overnight* e, em seguida, os poços tratados com as chalconas CPAB, CPAC e BZ (1000-15,6 μ M), conforme demonstrado na figura 7. Poços tratados com PBS foram utilizados como controle negativo e células tratadas com DMSO 0,5% para avaliação do efeito tóxico do diluente. Além disso, poços contendo apenas meio de cultura foram utilizados como branco (LIMA et al., 2016).

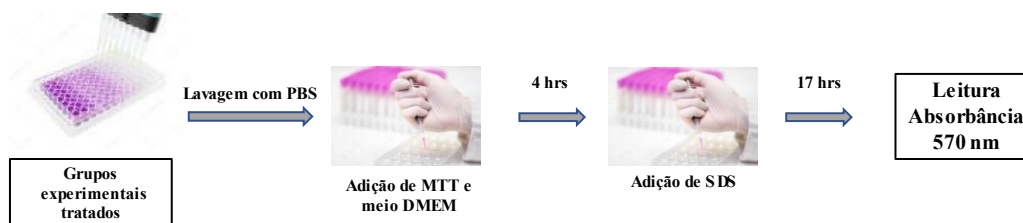
Figura 7: Representação esquemática do procedimento de plaqueamento sobre células hospedeiras LLC-MK₂ e tratamentos com as substâncias do estudo.



Fonte: elaborada pela autora.

Decorrido o período de 24 horas de incubação em estufa de CO_2 , cada poço foi lavado com 100 μ L de PBS estéril, e 10 μ L de solução de MTT (2,5 mg/mL) e 100 μ L de DMEM 10% SBF. Após 4 horas de incubação a 37°C, foram adicionados 90 μ L de solução de SDS (10% m/v em HCl 0,05N). A placa permaneceu por 17 horas em incubação solubilização dos cristais de formazan, sendo realizada a leitura por espectrofotometria em leitora de microplacas a 570 nm (Figura 8).

Figura 8: Representação esquemática da realização do ensaio de redução do MTT para avaliação da viabilidade celular.



Fonte: elaborada pela autora.

Os resultados foram avaliados através de uma regressão não-linear (curva fit) para estimativa da concentração capaz de causar 50% de citotoxicidade (CC_{50}).

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

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

Em que:

Abs T – Absorbância do grupo teste;

Abs BC – Absorbância do branco;

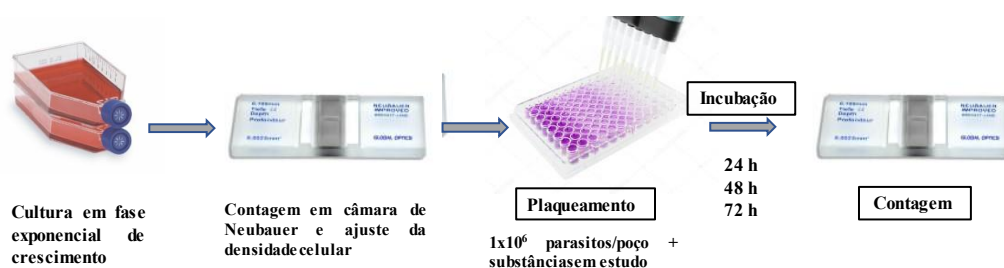
Abs CT – Absorbância do grupo controle.

3.2.2 Cultivo e manutenção das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

As formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram cedidas pelo Laboratório de Bioquímica de Parasitas da Universidade de São Paulo (USP) e cultivadas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) constituído de 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).

A manutenção das culturas foi feita por meio de repique realizado a cada 7-8 dias, quando sua concentração, na fase logarítmica, atingisse fase exponencial da curva de crescimento. Para estoque de cultura, as formas epimastigotas foram centrifugadas a 2800 rpm por 7 minutos. O *pellet* formado após a centrifugação foi ressuscitado em 95% SBF e 5% de DMSO estéril e estocadas em nitrogênio líquido.

Figura 9: Representação esquemática do procedimento de plaqueamento e avaliação do efeito das chalconas em formas epimastigotas



Fonte: elaborada pela autora.

3.2.2.1 Avaliação do efeito das substâncias CPAB e CPAC sobre as formas epimastigotas

A avaliação do efeito das substâncias de estudo foi realizada através da inibição do número de parasitos e quantificadas em câmara de Neubauer. As alíquotas contendo os parasitos na fase exponencial foram cultivadas em placas de 96 poços, de modo que a concentração inicial fosse ajustada para 1×10^6 células/mL ($200 \mu\text{L/poço}$), juntamente com as chalconas CPAB, CPAC e Bz ($1000\text{-}31,25 \mu\text{M}$), e incubadas a 28°C por 24, 48 e 72 horas, devido à facilidade de manipulação em condições de cultura (OLMO *et al.*, 2015), como demonstrado na figura 5. Além disso, as células foram tratadas com DMSO 0,5% para avaliar o efeito do veículo sobre a viabilidade celular, o PBS utilizado como controle negativo e o Bz como controle positivo.

Após os tempos de 24, 48 e 72 horas, alíquotas dos grupos experimentais foram colhidas para quantificação de parasitos viáveis, com observação de motilidade, morfologia típica e forma característica (LIMA *et al.*, 2016). Finalmente, o percentual de viabilidade dos parasitos foi determinado pela equação a seguir:

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

Onde:

T – Contagem de parasitos viáveis no grupo experimental;

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

Foram considerados viáveis os parasitos que, por observação, preservaram a sua mobilidade e formato típico. O percentual da viabilidade celular foi determinado utilizando a IC_{50} (concentração capaz de inibir o crescimento de 50% dos parasitos), determinada por regressão não-linear.

3.2.3 Cultivo e manutenção das formas tripomastigotas

A cultura das formas tripomastigotas de *T. cruzi* foi obtida a partir da infecção pelas células hospedeiras, conforme descrito por Lima e colaboradores (2016). As células LLC-MK₂ foram cultivadas em garrafas estéreis de 25 cm² na densidade de 1x10⁵ células/mL, utilizando meio DMEM 10% SBF em atmosfera de 5% de CO₂. Após 48 horas de incubação, as células foram infectadas com uma suspensão de tripomastigotas na proporção de 20 parasitos por célula e o meio de cultura passou a ser mantido por DMEM 2% SBF sem antibióticos.

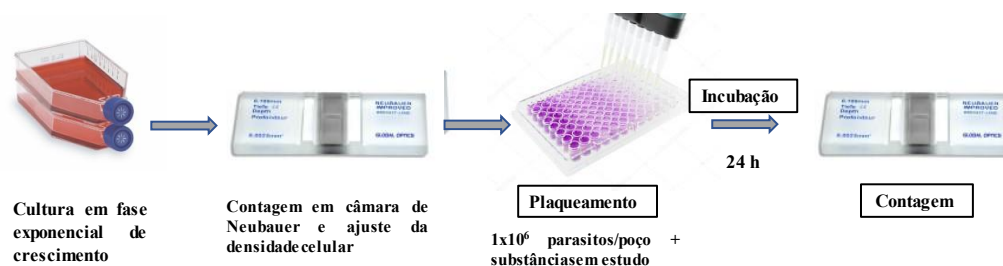
Após 72 horas, o meio das garrafas foi substituído e o sobrenadante centrifugado a 2800 rpm por 7 minutos, para obtenção das formas tripomastigotas utilizados neste ensaio e para obtenção das formas amastigotas. A densidade celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer, semelhante ao feito para as formas epimastigotas.

3.2.3.1 Avaliação do efeito das substâncias CPAB e CPAC sobre as formas tripomastigotas

Para avaliação do efeito das substâncias de estudo, os parasitos foram cultivados em placas de 96 poços em concentração de 1x10⁶ tripomastigotas/mL contendo meio DMEM 10% SBF e tratados com diferentes concentrações das substâncias CPAB, CPAC e Bz (1000 – 31,25 µM), mantidas por 24 horas em incubadora de CO₂ a 37°C. como controle negativo, foram considerados os parasitos não tratados, considerados como

100% de viabilidade (Figura 10). A solução de DMSO 0,5% foi utilizada como grupo veículo e o Bz, como fármaco de referência (MENEZES, 2017).

Figura 10: Representação esquemática do procedimento de plaqueamento e avaliação das chalconas em formas tripomastigotas.



Fonte: Elaborada pela autora.

O percentual de viabilidade celular após 24 horas de incubação foi calculado utilizando a mesma fórmula usada para as formas epimastigotas: a LC_{50} (concentração capaz de matar 50% de tripomastigotas) foi determinada por regressão não-linear. Foi calculado o índice de seletividade (Sel) da molécula sobre as formas tripomastigotas em relação às células hospedeiras, de acordo com a fórmula a seguir:

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

Onde:

CC_{50} – Concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade das células hospedeiras.

LC_{50} – Concentração letal para 50% dos parasitos.

3.2.4 Avaliação do efeito sobre as formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*

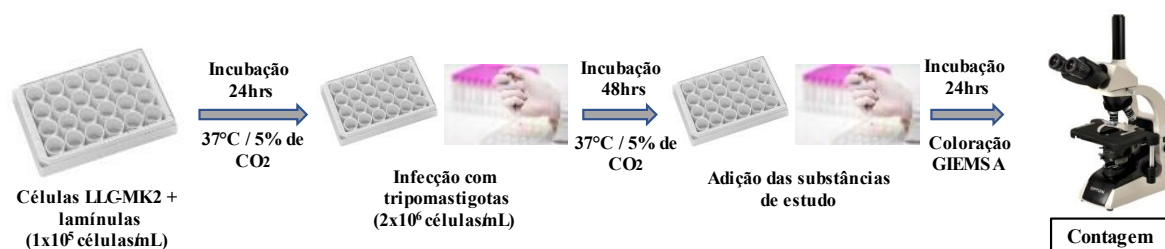
Para avaliar o efeito das chalconas CPAB e CPAC sobre a forma intracelular, as células LLC-MK₂ foram incubadas em concentração de 1×10^5 células/mL. As células foram cultivadas em placas de cultivos de 24 poços sobre lamínulas de vidro de 13 mm

de diâmetro durante 24 horas e incubadas em estufa de CO₂ a 37°C para que a cultura atingisse o estágio de confluência. Após 24 horas de aderência, as culturas com as células foram infectadas e incubadas com tripomastigotas (2×10^6 células/mL) em meio DMEM 2% SBF (MENEZES, 2017).

Após 48 horas de internalização dos parasitos e transformação das formas intracelulares, o sobrenadante foi desprezado e o meio foi substituído. Em seguida, os poços foram tratados com as substâncias CPAB, CPAC ou Bz nas concentrações de 31,2 e 15,6 μ M, de acordo com o valor da LC₅₀ encontrado, permanecendo em estufa de CO₂ por 24 horas. Após este período, as lamínulas foram retiradas dos poços, lavados com água destilada e fixados com solução de Bouin.

Após lavagem com água destilada e etanol 70% e desidratados com metanol por 2 minutos, as lâminas foram coradas utilizando solução de corante Giemsa (5% v/v em água destilada) por 60 minutos. Finalmente, o excesso de corante foi removido das lamínulas, secadas e montadas em lâmina utilizando entelan, conforme mostrado na figura 11 (ARAÚJO-JORGE & DE CASTRO, 2000).

Figura 11: Representação esquemática do procedimento de plaqueamento e avaliação das chalconas em formas amastigotas.



Fonte: Elaborada pela autora.

Por fim, foi calculada a quantidade de amastigotas por células, o percentual de células infectadas e o índice de sobrevivência (Sul). Este é utilizado como uma estimativa matemática para avaliar a capacidade que uma substância tem de remover parasitas de

uma célula hospedeira (células infectadas x amastigotas por célula infectada) (MARÍN *et al.*, 2015).

3.3 Análises por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica automatizada e individual de análise celular usada para o estudo de diversas características celulares, uma vez que um dos princípios deste método é a identificação e quantificação do comportamento biológico da população celular, diferenciação e elucidação dos modelos de morte celular por apoptose e necrose (BRAGA *et al.*, 2016). Além disso, permite ainda avaliar diversos parâmetros através de marcadores fluorescentes, onde cada partícula é analisada e os parâmetros detectados, medidos, armazenados e analisados em programas de computador (MCKINNON, 2018).

3.3.1 Avaliação do perfil de morte celular com marcação de Anexina V-PE e 7AAD

A avaliação do mecanismo de morte celular induzida por CPAB e CPAC foi realizada por citometria de fluxo, utilizando o 7-AAD (7-Aminoactinomicina D) e Anexina V marcada com a ficoeritrina (Ax/PE) como marcadores fluorescentes, no intuito de avaliar os eventos de morte celular por apoptose ou necrose, pelas formas epimastigotas, após o tratamento com as chalconas em estudo.

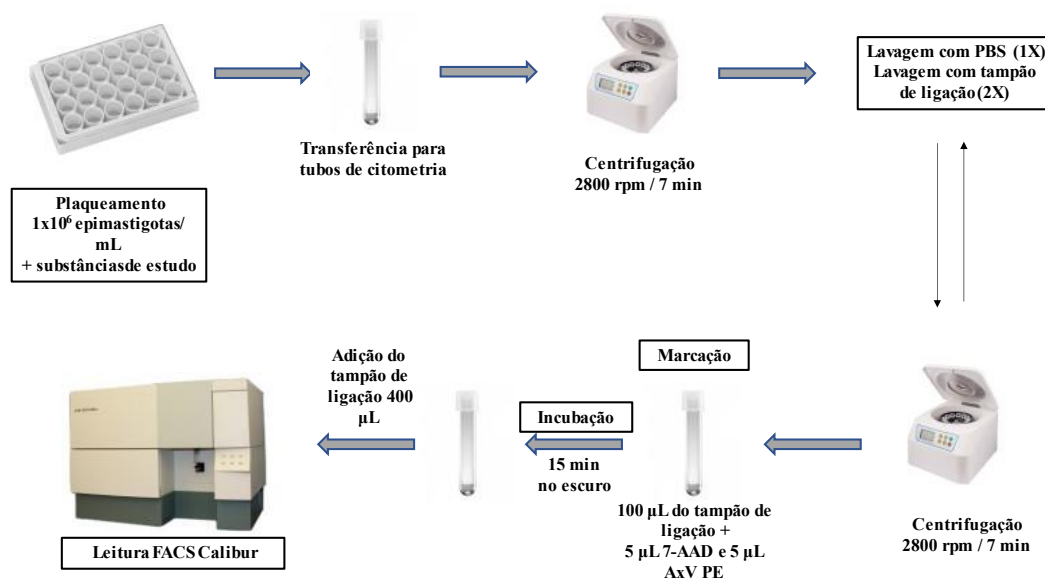
O 7-AAD é um corante capaz de se ligar com o DNA celular, no entanto, é incapaz de atravessar a membrana celular íntegra. Células que são vistas com alta marcação para 7-AAD são consideradas células necróticas, por perda de integridade de membrana (ZEMBRUSKI *et al.*, 2012). A Anexina V é uma proteína que apresenta alta afinidade na ligação à fosfatidilserina. Após indução da apoptose, a expressão da fosfatidilserina na superfície externa da membrana plasmática é iniciado e esses resíduos são translocados para a face externa da membrana, permitindo a ligação do marcador (WLODKOWIC & SKOMMER, 2012; KIM *et al.*, 2020).

Neste ensaio, as formas epimastigotas foram cultivadas em placas de cultivos de 24 poços em concentração de 1×10^6 /mL. Logo após, os poços foram tratados com CPAB e CPAC em concentrações de 125 e 250 μ M. Em seguida, os grupos experimentais foram transferidos para tubos de citometria, centrifugados a 2800 rpm por 7 minutos, lavados com tampão de ligação (HEPES 10 mM; NaCl 140 mM; CaCl₂ 2,5 mM; pH 7,4) e, em

seguida, realizada a marcação utilizando o kit comercial (100 μ L do tampão de ligação + 5 μ L de 7-AAD + 5 μ L de AxV PE) (Annexin V/PE Apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences) conforme as instruções do fabricante. Decorridos 15 minutos de incubação no escuro, foram adicionados 400 μ L do tampão de ligação em cada tubo, e as células analisadas no equipamento FACSCalibur com os detectores FL₂ (fluorescência laranja, de 564-606 nm) e FL₃ (fluorescência vermelha, de 675-710 nm) para AxV PE e 7-AAD, respectivamente (BD Biosciences, New Jersey, USA), sendo as informações adquiridas pelo *CellQuest Pro™ software*.

Foram adquiridos pelo menos 10.000 eventos em cada grupo e estes eventos foram divididos em quatro quadrantes: células viáveis (baixa marcação para ambos os fluorocromos), apoptose inicial (Ax/PE+ e 7-AAD-), apoptose tardia (marcação para ambos os fluorocromos: Ax/PE+ e 7-AAD+) e necrose (marcação para 7-AAD+ e Ax/PE). O fármaco Bz foi utilizado como controle positivo.

Figura 12: Representação esquemática do procedimento de marcação com Ax-PE e 7AAD para avaliação do perfil de morte celular



Fonte: Elaborado pela autora.

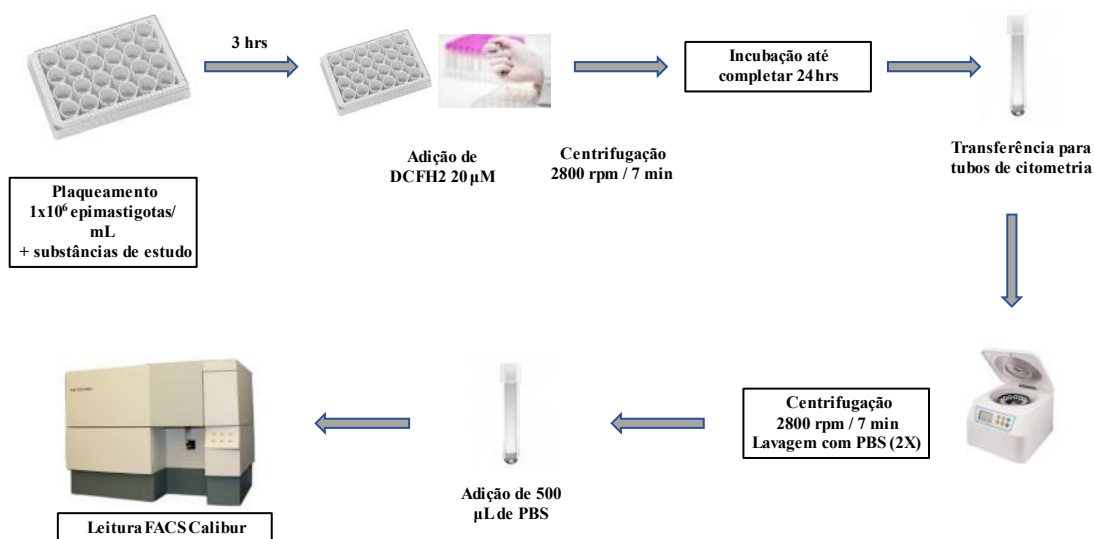
3.3.2 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio citoplasmáticas

O princípio deste ensaio se baseia na avaliação das espécies reativas de oxigênio (ERO) utilizando um composto estável não fluorescente lipofílico chamado 2',7'-

diacetato de diclorofluoresceína (DCFH₂-DA), que atravessa facilmente o interior das células. Dentro da célula, enzimas citosólica desacetilam o DCFH₂-DA para formar 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH₂), que devido a sua polaridade, fica contida no citoplasma celular (NEVILLE & LEZANNE, 2021). O DCFH₂ é então oxidado pelas ROS do citoplasma à 2',7'-diclorofluoresceína oxidada (DCFoxi), que possui fluorescência verde, na qual é excitado no comprimento de 488 nm e detectável em FL₁. Deste modo, a fluorescência verde gerada pela formação de DCFoxi é proporcional à capacidade oxidativa da célula. Portanto, a intensidade da fluorescência intracelular é diretamente proporcional à quantidade de ROS presentes no citoplasma das células (RAJNEESH et al., 2017).

Para incorporação de DCFH₂-DA no interior das células, 1x10⁶ epimastigotas/mL foram adicionados à placas de 24 poços na presença das substâncias CPAB e CPAC nas concentrações em 125 e 250 μM e o controle Luperox. Após 3 horas de tratamento, foram adicionados 10 μL de solução de DCFH-DA (concentração final de 20 μM em DMSO). A placa foi mantida no escuro até ao fim do período de tratamento. Após este período, os grupos experimentais foram transferidos para tubos de citometria, na qual foram lavadas duas vezes e ressuspensas em 500 μL de PBS para, logo após, serem analisadas em citometria de fluxo (MENEZES, 2017).

Figura 13: Representação esquemática do procedimento de marcação com DCFH₂-DA para avaliação do acúmulo citoplasmático de ROS.



Fonte: Elaborado pela autora.

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

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

Onde:

mTESTE – Média geométrica do grupo tratado;

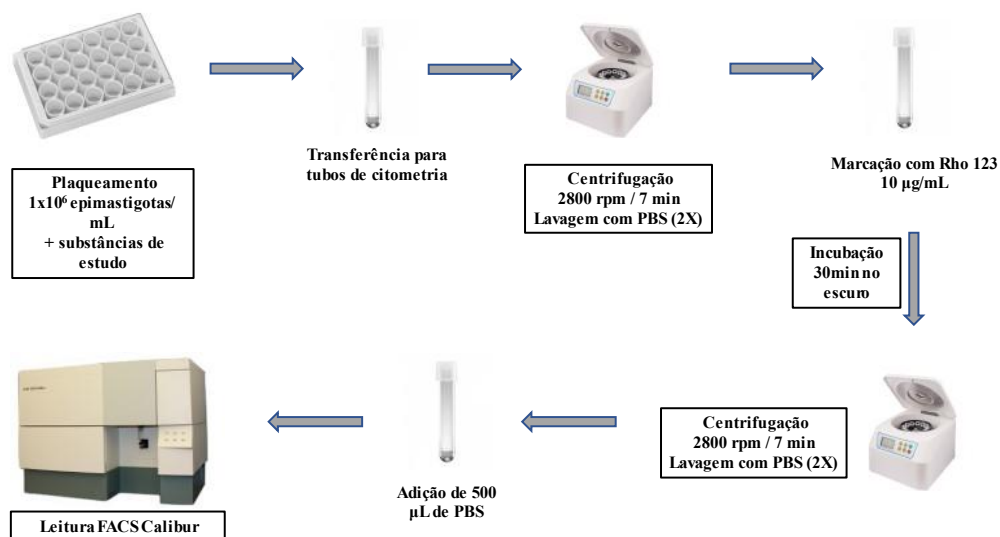
mCONTROLE – Média geométrica do grupo controle.

3.3.3 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Para análise do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi utilizado a rodamina 123 (Rho123), que é um fluorocromo específico para a marcação mitocondrial em células vivas. Por ser carregado positivamente, esse corante é atraído pelo potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, na qual, em condições normais, emite fluorescência vermelha (PERELMAN et al. 2012). No entanto, quando existe alterações no nível de integridade mitocondrial, ocorre uma redução de íons H⁺, e consequentemente, redução no acúmulo de Rho123, permitindo a emissão de fluorescência verde, por redução do acúmulo desse corante, que passa para o citoplasma, indicando alteração no $\Delta\Psi_m$ (MARCONDES et al., 2019).

Neste ensaio, as formas epimastigotas foram tratadas com as substâncias CPAB e CPAC nas concentrações de 125 e 250 μ M e incubadas durante 24 horas. Logo após, foram transferidas para tubos de citometria, centrifugadas a 2800 rpm por 7 minutos e lavadas com PBS 2 vezes. Em seguida, as células foram marcadas com Rho123 (concentração final de 10 μ g/mL), permanecendo incubadas durante 30 minutos no escuro, sendo então realizadas duas novas lavagens, ressuspensão em 500 μ L de PBS e lidas por citometria de fluxo, utilizando o detector FL₂, conforme demonstrado na figura 14. (DE MENEZES, 2019).

Figura 14: Representação esquemática do procedimento de marcação com Rho123 para avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial



Fonte: Elaborado pela autora.

3.4 Procedimentos computacionais

3.4.1 Estudos *in silico*

A avaliação teórica das interações entre as chalconas e as enzimas TcGAPDH, TR e cruzaina de *T. cruzi* foram realizados através de docking molecular, pelo Grupo de Química Teórica e Eletroquímica (GQTE), da Universidade Estadual do Ceará, coordenado pelo professor Dr. Emmanuel Silva Marinho.

3.4.2 Detalhes computacionais

Para realizar as simulações, foram utilizados os códigos: Autodocktools™, AutoDockVina™, Avogadro™ (<http://avogadro.cc/>), Discovery studio visualizer™ viewer, Gabedit 2.5.0, Marvin™ 19.8, 2020, (<http://www.chemaxon.com>), Pymol, UCSF Chimera™, Gauss View 5 e Gaussian 09 software (HUEY; MORRIS & FORLI, 2009; TROTT & OLSON, 2009; HANWELL et al., 2012; BIOVIA, 2016; ALLOUCHE, 2011;

CSIZMADIA, 1999; SCHRODINGER, 2015; PETTERSEN et al., 2004; FRISCH et al., 2020).

3.4.3 Preparação e otimização dos ligantes

Os cálculos da química quântica foram realizados usando o método da Teoria do Funcional da Densidade (DFT) no nível computacional B3LYP/6-31G (d,p) na fase gasosa para ambas as chalconas (BECKE, 1992; HEHRE & LATHAN, 1972; LEE; YANG & PARR, 1988). As moléculas de entrada foram desenhadas usando o *Gauss View 5* e os cálculos de otimização geométrica foram feitos usando o software Gaussian 09 (FRISCH et al., 2020). O Potencial Eletrostático Molecular (MEP) para ambas as moléculas foi calculado no mesmo nível de teoria e as isosuperfícies foram renderizadas usando o software Gabedit (ALLOUCHE, 2011) com um valor de $\sigma = 0,01$.

3.4.4 Procedimentos gerais do docking

Para estudar o possível mecanismo de ação das chalconas em *T. cruzi*, foram realizadas simulações de *docking* molecular entre o ligante e as enzimas TcGAPDH, tripanotiona redutase e cruzaina, enzimas-chaves do ciclo evolutivo do parasito (BELLUTI et al., 2014; BELTRAN-HORTELANO; PEREZ-SILANES & GALIANO, 2017; REYES-ESPINOSA et al., 2019). As estruturas proteicas foram obtidas no repositório Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). A estrutura da enzima TcGAPDH, está identificada como “Structure of Glycosomal Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from Trypanosoma cruzi Complexed with Chalepin, a Coumarin Derivative Inhibitor” (PDB 1K3T), depositada com resolução de 1.95 Å, determinada por X-Ray Diffraction, classificada como oxidoreductase em organismo *T. cruzi* (PAVÃO et al., 2002).

A estrutura da enzima tripanotiona redutase, está identificada como “Crystal Structure of Trypanosoma cruzi Trypanthione reductase in complex with the inhibitor Quinacrine Mustard” (PDB 1GXF), depositada com resolução de 2.70 Å, determinada por X-Ray Diffraction, classificada como oxidoreductase em organismo *T. cruzi* (SARAVANAMUTHU et al., 2004). Enquanto a estrutura da cruzaina foi identificada como “The Crystal Structure of Cruzain in Complex with a Tetrafluorophenoxymethyl

Ketone Inhibitor” (PDB 3IUT), com resolução de 1.20 Å e determinada por X-Ray Diffraction, classificada como hidrolase em organismo *T. cruzi* (BRAK *et al.*, 2010).

Para a realização das simulações de *docking* molecular, foi escolhido o código AUTODOCK vina (TROTT & OLSON, 2009), sendo configurados para executar o *Lamarckian Genetic Algorithm* – LGA. Para determinar o espaço de simulação, os *grid box* foram centralizados de forma a englobar todas as cadeias proteicas. Para a Cruzaina, o *grid box* foi centralizado nas coordenadas 6.612, -0.436 e 8.052 para os eixos x, y e z respectivamente com parâmetros de size 116 Å (x), 106 Å (y) e 126 Å (z). Para a enzima TcGAPDH o *grid box* foi centralizado nas coordenadas 19.822, 0.455 e 24.804 para os eixos x, y e z respectivamente com parâmetros de size 116Å (x), 112Å (y) e 122Å (z).

Para TR, o *grid box* foi centrado nas coordenadas 44.196, 3.102 e -0.054 para os eixos x, y e z respectivamente com parâmetros de size 126Å (x), 90Å (y) e 126Å (z). Ambos os *grids* foram centralizados de forma que a cadeia proteica ficasse totalmente dentro do espaço de simulação computacional. Como critérios de preparação da estrutura proteica, foi utilizada a metodologia proposta por Yan *et al* (2014), onde foram removidas todas as moléculas de água e as cargas de Gasteiger e os átomos de hidrogênio essenciais foram adicionados. A preparação foi realizada usando o código ADT-AutoDocktools (HUEY; MORRIS & FORLI 2009).

Foram realizadas 50 simulações independentes, sendo possível obter 20 poses por simulação, tanto para as simulações *docking* e *re-docking* (MARINHO *et al.*, 2020), e para melhorar o refinamento parcial dos cálculos individuais dos acoplamentos, o critério de *Exhaustiveness* foi ajustado para 64, mantendo a estrutura da proteína mantida rígida, enquanto todas as ligações e torções dos ligantes foram ajustadas para girar (NGUYEN *et al.*, 2017). Como critério de seleção da *best pose*, foi utilizado o parâmetro estatístico RMSD (*Root Mean Square Deviation*), tendo como valores ideais inferiores a 2 Å (YUSUF *et al.*, 2008).

Para avaliar a estabilidade dos complexos formados nas simulações, foi utilizada a energia de afinidade (ΔG), que tem parâmetros de idealidade com valores inferiores a -6.0 kcal/mol (SHITYAKOV; FORSTER, 2014). Utilizando os valores de energia de afinidade foram calculados os valores das constantes de inibição (K_1) (equação 1) de cada complexo (KADELA-TOMANEK *et al.*, 2021). Onde, K_i é a constante de inibição, T é a temperatura absoluta, 298K, R é a constante do gás, 8,32 J.mol⁻¹K⁻¹ e ΔG é a energia livre de ligação em KJ.mol⁻¹.

$$K_i = e^{(\Delta G/RT)}$$

Para avaliar a força das H-bond foram utilizados os parâmetros propostos por Imberty *et al* (1991), que se baseia nos valores das distâncias entre os átomos doadores e receptores, onde as interações que ficaram entre 2,5 Å e 3,1 Å são classificadas como fortes, entre 3,1 Å e 3,55 Å são consideradas de intensidade média e fracas as que ficaram com distancia superior a 3,55 Å.

Para a validação das simulações, foi realizada a técnica de re-docking, que consiste na simulação de docking com a molécula previamente depositada no registo PDB. Ressaltando que todas as simulações foram realizadas com os mesmos parâmetros para obtenção de dados comparativos com o fármaco benznidazol (Bz) (ChemSpider ID 29299) e com os ligantes 6-(1,1-dimethylallyl)-2-(1-hydroxy-1-methylethyl)-2,3-dihydro-7h-furo[3,2-g]chromen-7-one (BRZ), Quinacrine mustard (QUM) e (3S)-3-(4-((1S)-1,2-dimethyl-1-[(quinolin-6-ylmethyl)amino]propyl)-1H-1,2,3-triazol-1yl)heptan-2-one (KB2) que foram co-cristalizados nos cristais das proteínas TcGaAPDH, tripanotiona redutase e cruzáína, respectivamente.

3.5 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata (n=3). Os dados numéricos foram expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) e a normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para comparação dos grupos experimentais, foi utilizado o teste estatístico *one-way* ANOVA seguido de pós-teste de Dunnet e/ou pós-teste de Bonferroni, considerando *p<0,05 como critério de significância. Para a realização dos testes, foram utilizados os programas Microsoft Office Excel® 2010 e GraphPad Prism® versão 6.0.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

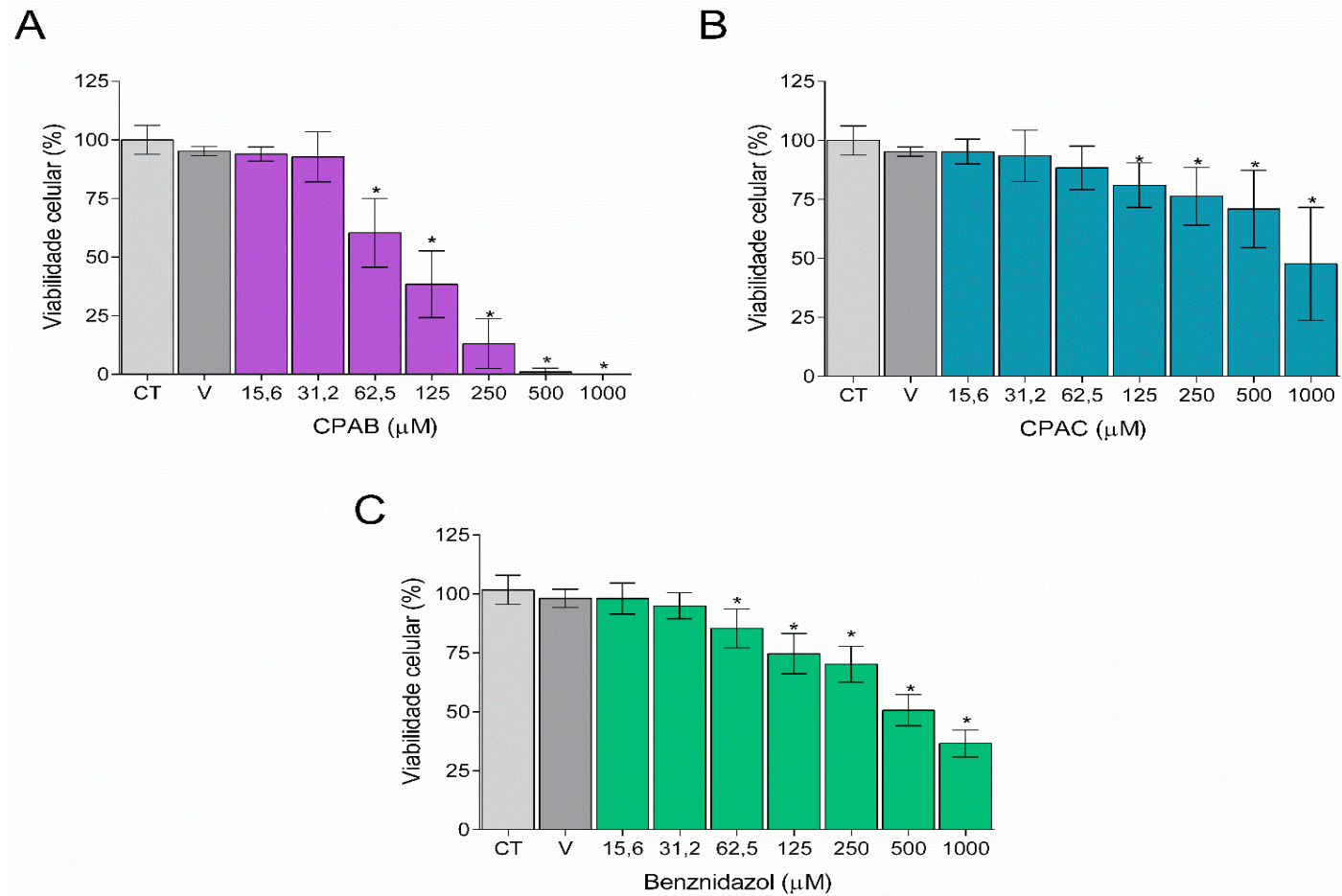
4.1 Avaliação *in vitro*

4.1.1 Avaliação da citotoxicidade das substâncias CPAB e CPAC em relação às células hospedeiras

No ensaio com as substâncias CPAB e CPAC, é possível observar toxicidade, com percentuais de viabilidade celular diminuídos de 0% a 57,7% e 81,0% e 95,2% μM nas concentrações entre 1000-62,5 μM e 125-15,6 μM , respectivamente. O Bz também apresentou, nas mesmas faixas de concentrações da CPAB, percentual de células viáveis de 36,58% a 85,35%.

Conforme apresentado na figura 15, a chalcona CPAB teve mais efeito citotóxico, com CC_{50} estimada em $85,6 \pm 9,2 \mu\text{M}$ e a CPAC, mostrou ser menos tóxica, com CC_{50} $1115 \pm 381,7 \mu\text{M}$, enquanto para o Bz foi de $502,60 \pm 57,80 \mu\text{M}$, maior quando comparado com CPAB.

Figura 15: Citotoxicidade das chalconas e benznidazol em células hospedeiras LLC-MK₂.



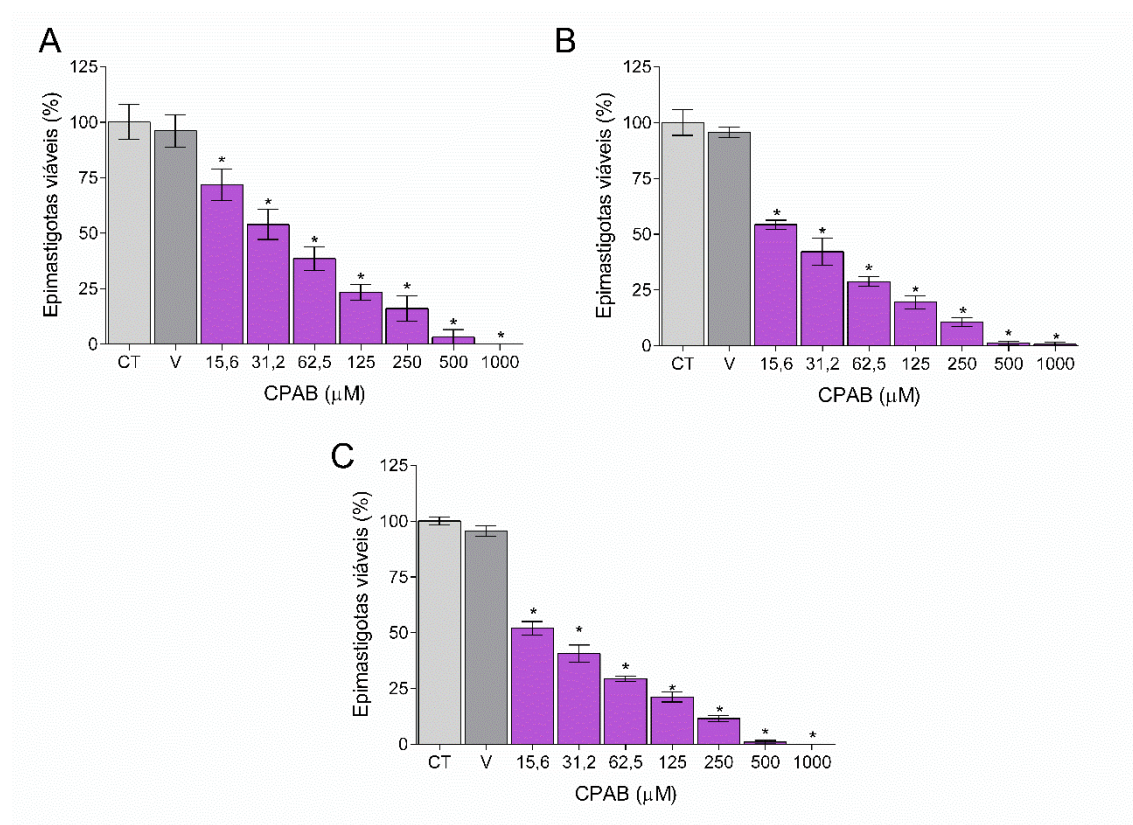
Legenda: CT – grupo controle; V – veículo (DMSO 0,5%). Os dados estão apresentados como média \pm EPM. A análise estatística foi feita por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

4.1.2 Efeito antiproliferativo das chalconas sobre as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Foi observado o efeito inibitório de modo concentração e tempo dependentes, sobre estas células. Os parasitos, após contato com as chalconas CPAB e CPAC, apresentaram ausência de flagelo, alterações do seu formato típico e/ou perda de motilidade.

Para a CPAB (figura 16), é possível observar, em 24 horas, percentuais de viabilidade de 0% a 71,8%, enquanto em 48 horas, os percentuais de 48 horas foram de 0,67% a 54,1%. O maior percentual foi encontrado, mesmo na menor concentração, para o tempo de 72 horas, em que se observam os seus valores de 0% a 52,0%. Desta forma, foram obtidos por regressão não-linear, os valores de IC_{50} estimados: $38,4 \pm 6,2 \mu M$, $20,7 \pm 3,3 \mu M$ e $19,2 \pm 3,4 \mu M$, nos tempos subsequentes.

Figura 16: Efeito antiproliferativo da CPAB sobre as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

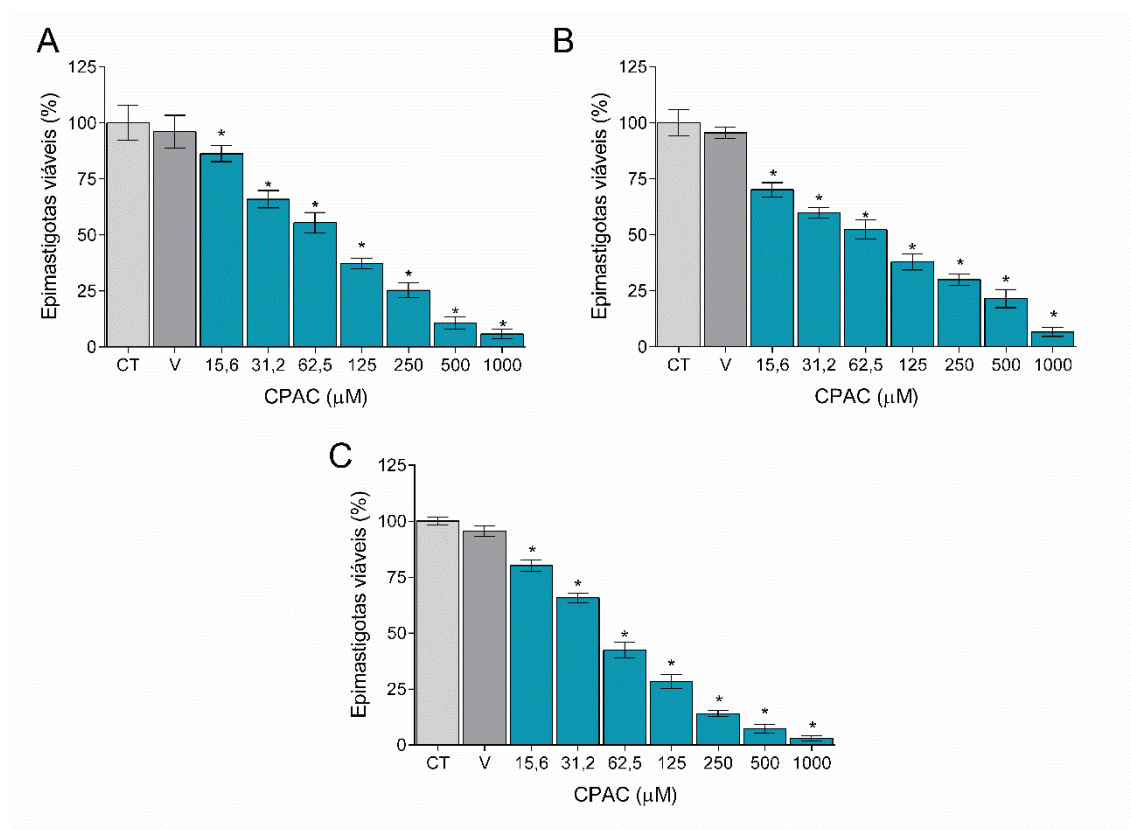


Legenda: As figuras representam o tratamento por 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C). CT = grupo controle; V = grupo veículo (DMSO 0,5%). Os dados foram expressos como média \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os efeitos da CPAC (figura 17) contra as formas epimastigotas também foram investigados, em que se observou efeito progressivo nos três tempos avaliados. Conforme demonstrado na tabela 3, os percentuais de viabilidade celular variaram de 5,8% a 86,2% em 24 horas; no entanto, em 48 horas, não se observou diminuição de viabilidade na maior concentração (6,6%), quando comparado com o primeiro tempo de incubação. Todavia, na menor concentração (15,6 μM), o seu percentual foi de 70,2%, enquanto o tempo de 72 horas após tratamento observou-se diminuição de 2,9% a 80,1%. Por conseguinte, foram obtidos por regressão não-linear, os valores de IC_{50} estimados: $74,8 \pm 4,2 \mu\text{M}$, $61,6 \pm 5 \mu\text{M}$ e $52,3 \pm 1,8 \mu\text{M}$, nos tempos subsequentes.

Figura 17: Efeito antiproliferativo da CPAC sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi*



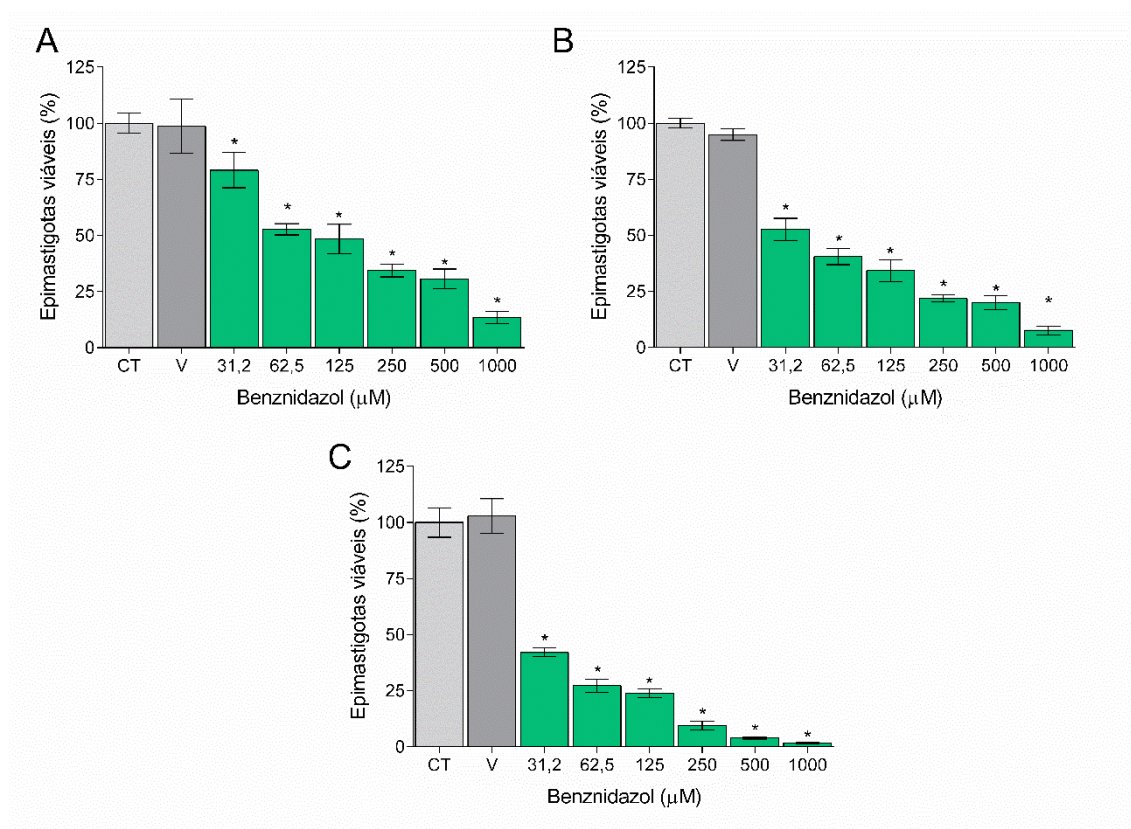
Legenda: As figuras representam o tratamento por 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C). CT = grupo controle; V = grupo veículo (DMSO 0,5%). Os dados foram expressos como média \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pela autora.

O fármaco de referência, Bz, foi avaliado nos mesmos tempos de incubação, ao qual o percentual de viabilidade de epimastigotas em 24 horas variou de 13,5% a 79,1%. No tempo de 48 horas, a viabilidade foi significativamente reduzida, tendo os seus valores

de 7,7% a 52,7%. Essa redução também foi observada em 72 horas, de 1,7% a 42,1%. Desta forma, foram obtidos por regressão não-linear, os valores de IC_{50} estimados: $115,1 \pm 16,3 \mu\text{M}$, $37,4 \pm 5,6 \mu\text{M}$ e $22,1 \pm 2,9 \mu\text{M}$, nos tempos subsequentes.

Figura 18: Efeito antiproliferativo do fármaco Benznidazol sobre as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*



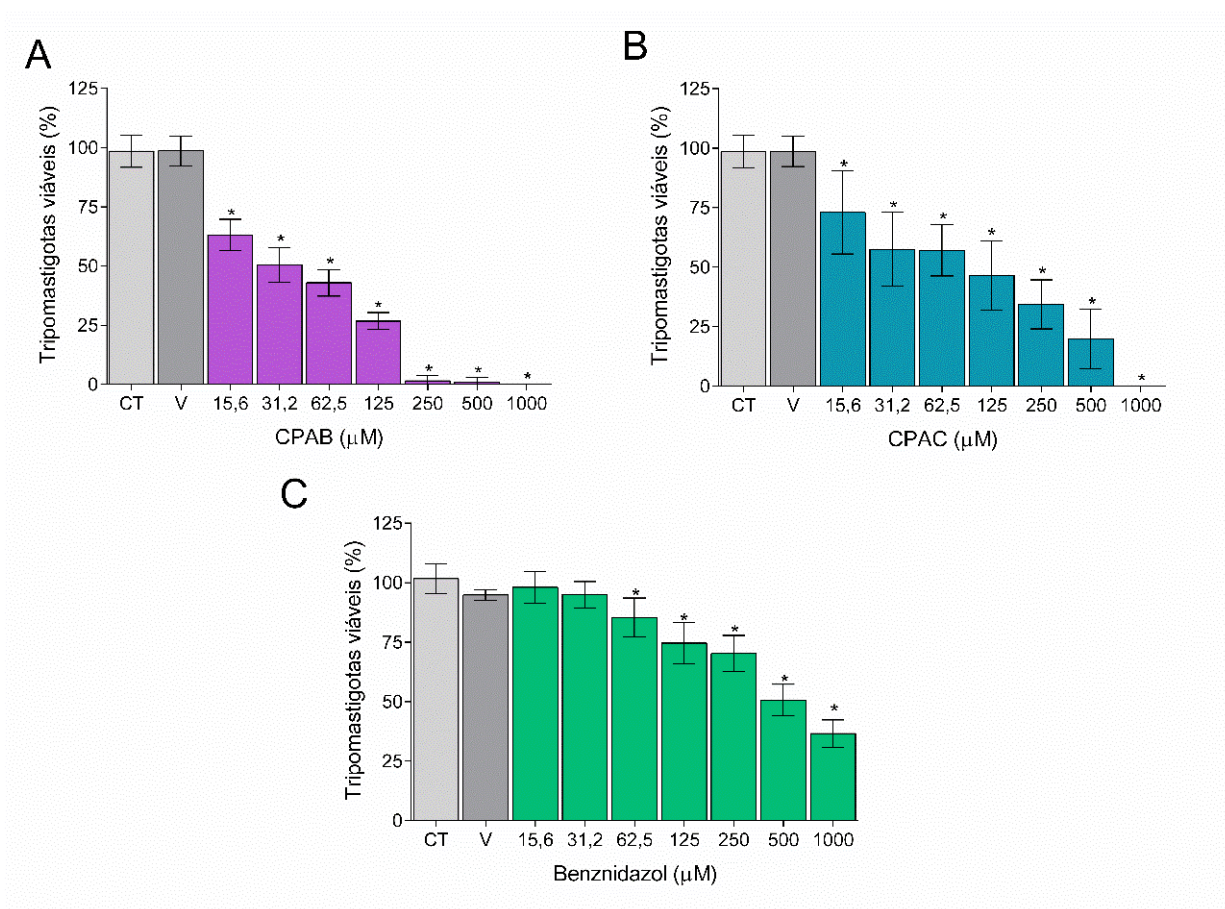
Legenda: As figuras representam o tratamento por 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C). CT = grupo controle; V = grupo veículo (DMSO 0,5%). Os dados foram expressos como média \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.
Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.3 Efeito tripanocida das chalconas contra as formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

As chalconas estudadas e o Bz foram avaliados contra as formas tripomastigotas e os resultados apresentados na figura 19. As formas tripomastigotas foram obtidas a partir do sobrenadante de células LLC-MK₂ infectadas. Após a incubação com as substâncias, foi possível observar que CPAB e CPAC foram capazes de causar morte em todas as concentrações avaliadas.

CPAB apresentou efeito em todas as concentrações testadas, particularmente nas maiores concentrações (250-1000 μM), com percentual de células viáveis variando de 0% a 63,1%. A CPAC também apresentou efeito significativo, incluindo 100% de morte na maior concentração (1000 μM), conforme representado pela figura 19, mas significativas nas demais concentrações, com percentuais que variou de 0% a 73,0% (tabela 8). O fármaco Bz também causou morte parasitária, em todas as concentrações testadas, com percentuais de viabilidade de 19,4% a 68,4% (15,6-31,2 μM). Em todos os grupos tratados, o DMSO não excedeu a 0,5% e, por isso, não causou morte celular.

Figura 19: Efeito tripanocida das chalconas CPAB, CPAC e Bz sobre as formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.



Legenda: As figuras representam o tratamento por 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C). CT = grupo controle; V = grupo veículo (DMSO 0,5%). Os dados foram expressos como média \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pela autora.

Os valores de LC₅₀ foram estimados em 33,3 ± 3,9 μM, 73 ± 15,9 μM e 161,4 ± 31,8 μM, para CPAB, CPAC e Bz, respectivamente. Por conseguinte, para identificar as substâncias avaliadas neste estudo apresentavam, de fato, efeito tripanocida e citotoxicidade adequados, foi realizado o cálculo do índice de seletividade (IS), através da divisão entre a CC₅₀ e a LC₅₀. Os valores obtidos foram de 2,6, 15,3 e 3,11 para CPAB, CPAC e Bz, respectivamente.

Tabela 2: Resumo da atividade biológica de CPAB, CPAC e Bz em *Trypanosoma cruzi* e citotoxicidade em LLC-MK₂

	Tempo de Exposição		
	24 h	48 h	72 h
CPAB			
IC ₅₀ (Epimastigota)	38,4 ± 6,2 μM	20,7 ± 3,3 μM	19,2 ± 3,4 μM
LC ₅₀ (Tripomastigota)	33,3 ± 3,9 μM	-	-
CC ₅₀ (LLC-MK ₂)	85,6 ± 9,2 μM	-	-
Sel	2,6	-	-
CPAC			
IC ₅₀ (Epimastigota)	74,8 ± 4,2 μM	61,6 ± 5 μM	52,3 ± 1,8 μM
LC ₅₀ (Tripomastigota)	73 ± 15,9 μM	-	-
CC ₅₀ (LLC-MK ₂)	1115 ± 381,7 μM	-	-
Sel	15,3	-	-
Benznidazol			
IC ₅₀ (Epimastigota)	115,1 ± 16,3 μM	37,4 ± 5,6 μM	22,1 ± 2,9 μM
LC ₅₀ (Tripomastigota)	161,4 ± 31,8 μM	-	-
CC ₅₀ (LLC-MK ₂)	502,6 ± 57,8 μM	-	-
Sel	3,11	-	-

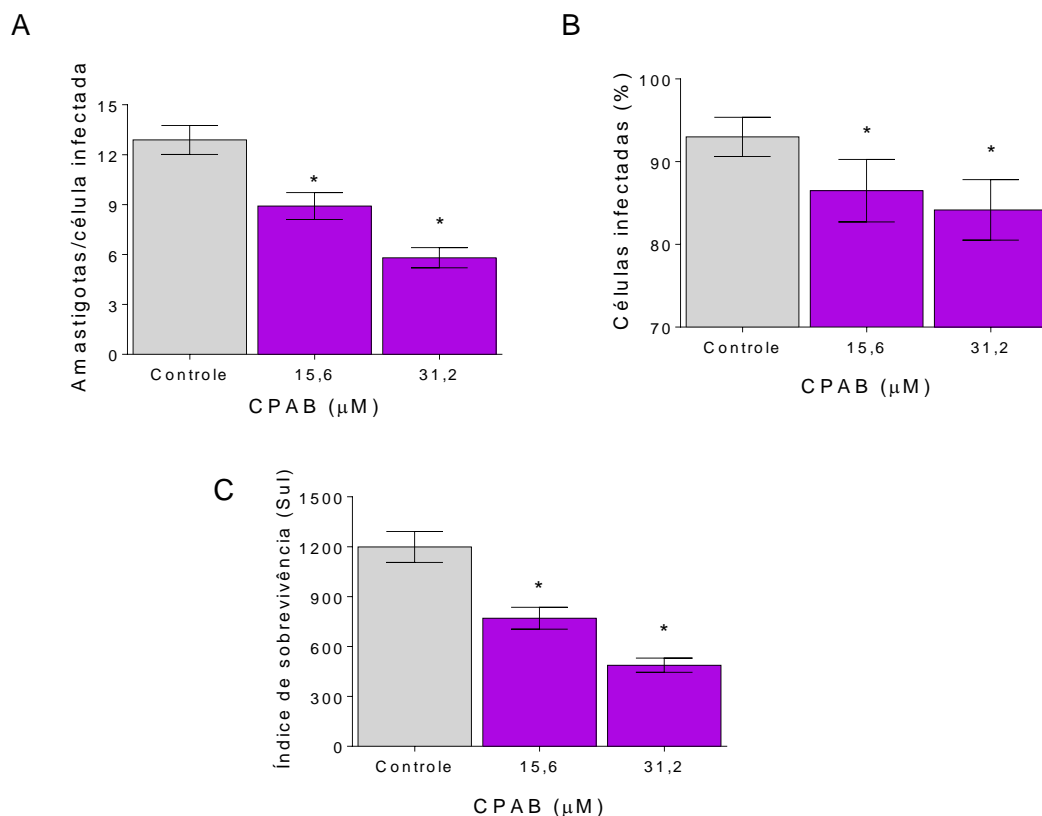
Legenda: CC₅₀: Estimativa de concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade de células LLC-MK₂ hospedeiras; IC₅₀: Concentração estimada capaz de inibir 50% da proliferação de formas epimastigotas; LC₅₀: Estimativa de concentração tripanocida para 50% das formas tripomastigotas.

4.1.4 Efeito anti-amastigota de CPAB e CPAC sobre *Trypanosoma cruzi*

A fim de avaliar o efeito de ambas as substâncias sobre a forma intracelular de *T. cruzi*, as células LLC-MK₂ foram infectadas. Após 24 horas de incubação com CPAB e CPAC, nas menores concentrações (15,6 e 31,2 μM), as lâminas foram analisadas por contagem do número de células infectadas e pelo número de amastigotas, além da redução do índice de sobrevivência (Sul).

Como se observa na figura 20, em relação ao grupo controle, a CPAB apresentou redução de modo significativo, confirmados pelos valores percentuais de viabilidade celular, o percentual de células infectadas (86,5% e 84,1%) e da contagem de amastigotas por células infectadas ($770 \pm 26,7$ e $487,5 \pm 17,4$), comparados pelo grupo controle que foi de $93 \pm 0,96$ e $1199 \pm 38,1$, respectivamente (tabela 3).

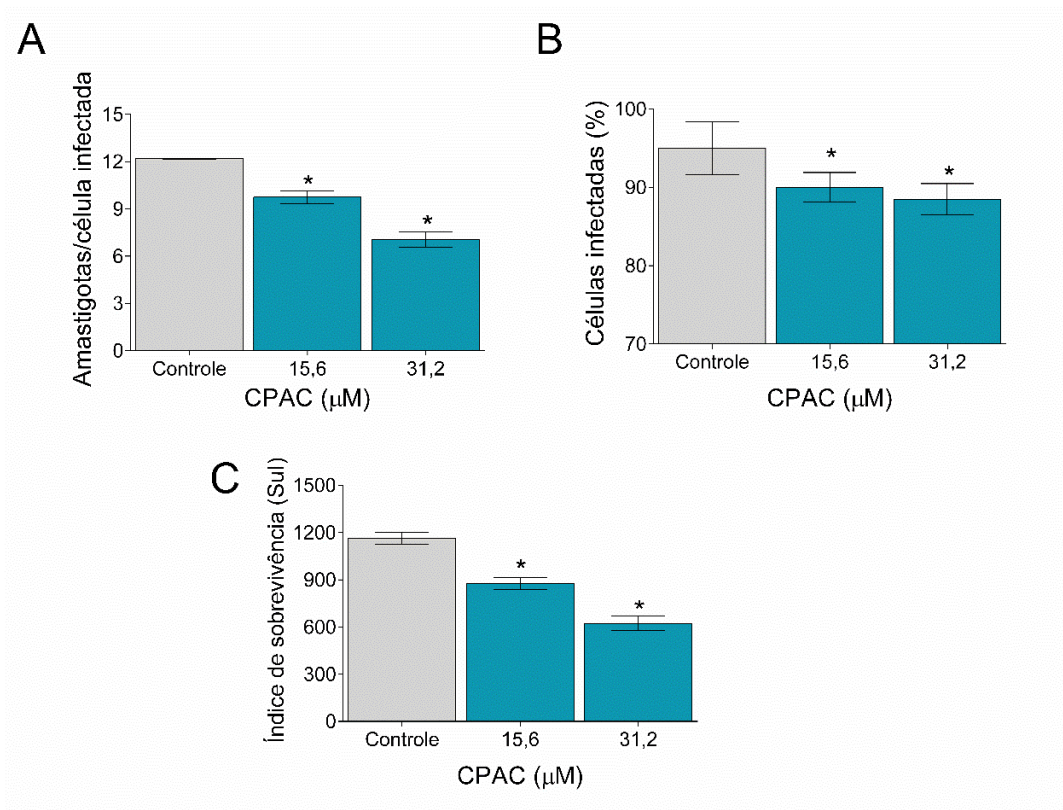
Figura 20: Efeito anti-amastigota da chalcona CPAB



Legenda: Em (A) contagem de amastigotas por célula infectada; (B) percentual de células LLC-MK₂ infectadas e (C) índice de sobrevivência dos grupos experimentais. Os dados são apresentados como média \pm EPM. A análise estatística foi realizada por one-way ANOVA, seguida de pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Além disso, o efeito anti-amastigota de CPAC foi observado na figura 21, na qual observou-se que essa substância foi capaz de reduzir a quantidade do número de células infectadas, com percentuais de células 88,5% e 90,0% nas concentrações 31,2 e 15,6 μM , respectivamente. Ademais, também foi capaz de reduzir o número de amastigotas, em relação ao grupo controle ($1164 \pm 15,6$) variando de $623,0 \pm 18,9$ e $877,7 \pm 15,7$ nas mesmas concentrações.

Figura 21: Efeito anti-amastigota da chalcona CPAC



Legenda: Em (A) contagem de amastigotas por célula infectada; (B) percentual de células LLC-MK₂ infectadas e (C) índice de sobrevivência dos grupos experimentais. Os dados são apresentados como média \pm EPM. A análise estatística foi realizada por one-way ANOVA, seguida de pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

A seguir, são apresentados os valores percentuais em células infectadas, concentrações e número de amastigotas a cada 100 células de ambas as chalconas (CPAB e CPAC) apresentadas neste estudo.

Tabela 3: Efeito de CPAB e CPAC sobre as formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Efeito anti-amastigota		
Concentração (μM)	Células infectadas (%)	Nº de amastigotas/100 células
Controle	93,0 \pm 0,96	1199,0 \pm 38,1
<u>CPAB</u>		
31,2	84,1 \pm 1,4*	487,5 \pm 17,4*
15,6	86,5 \pm 1,5*	770,0 \pm 26,7*
Controle	95,0 \pm 1,36	1164 \pm 15,6
<u>CPAC</u>		
31,2	88,5 \pm 0,80*	623,0 \pm 18,9*
15,6	90,0 \pm 0,77*	877,7 \pm 15,7*

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

Fonte: Elaborado pelo autor.

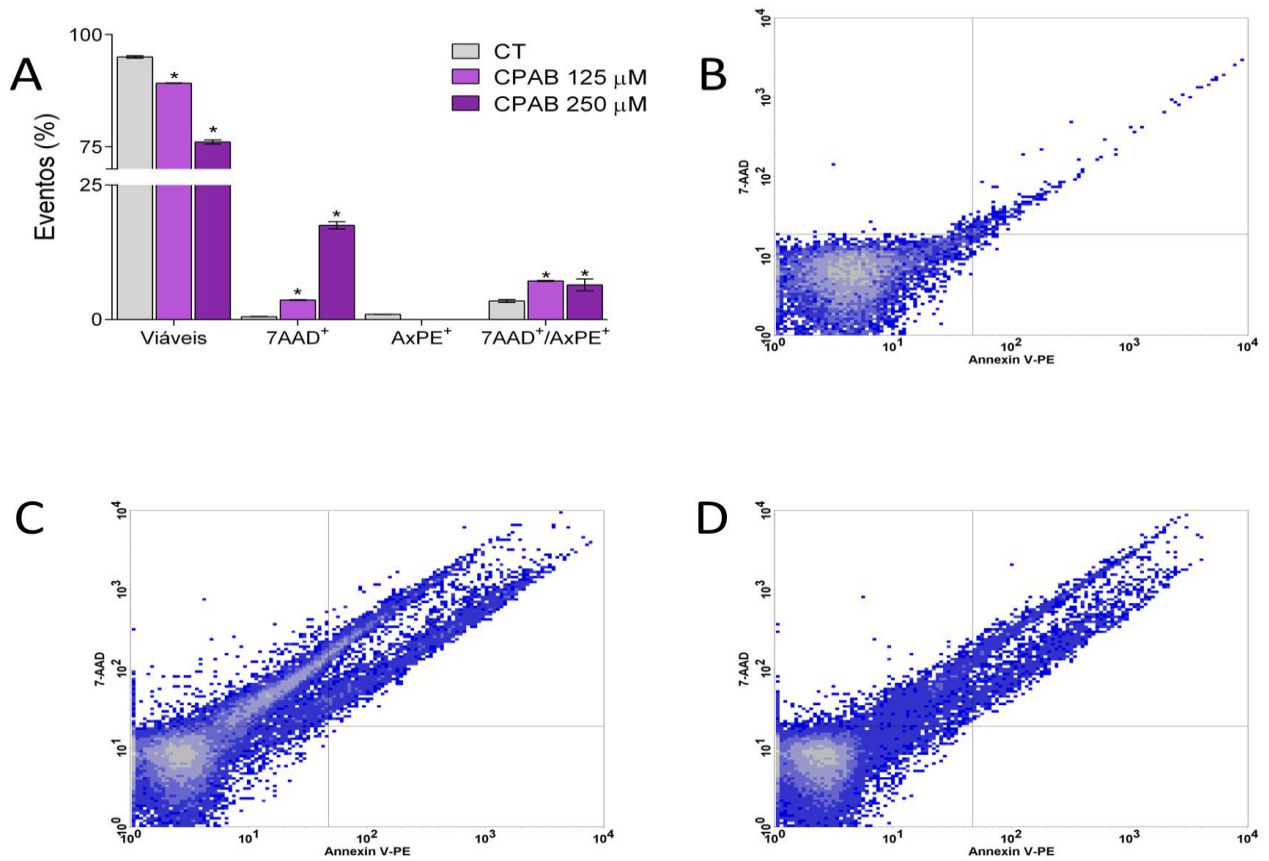
4.2 Avaliação do perfil de morte celular em cepa Y de *Trypanosoma cruzi*

4.2.1 Efeito apoptótico e/ou necrótico pelas formas epimastigotas

Com o objetivo de identificar possíveis alterações celulares indicativas de apoptose ou necrose induzidas pelas substâncias CPAB e CPAC, as formas epimastigotas foram utilizadas no ensaio de citometria de fluxo. Para interpretação dos dados, as células foram divididas em quatro populações celulares distintas: células viáveis quando há baixa marcação para os fluorocromos (7AAD⁻/Ax-PE⁻); células necróticas marcadas somente com 7AAD (7AAD⁺/Ax-PE⁻); células apoptóticas, marcadas unicamente com Ax-PE (7AAD⁻/Ax-PE⁺) e células em apoptose tardia ou necrose secundária, marcadas duplamente (7AAD⁺/Ax-PE⁺).

Neste ensaio, os resultados encontrados para CPAB indicam a ocorrência de eventos necróticos e apoptóticos, caracterizados por células necróticas pela marcação de 7AAD⁺ e por dupla marcação, com valores de 3.6% e 7.1% (125 μM) e 17.5% e 6.4% (250 μM), respectivamente, conforme demonstrado na figura 22.

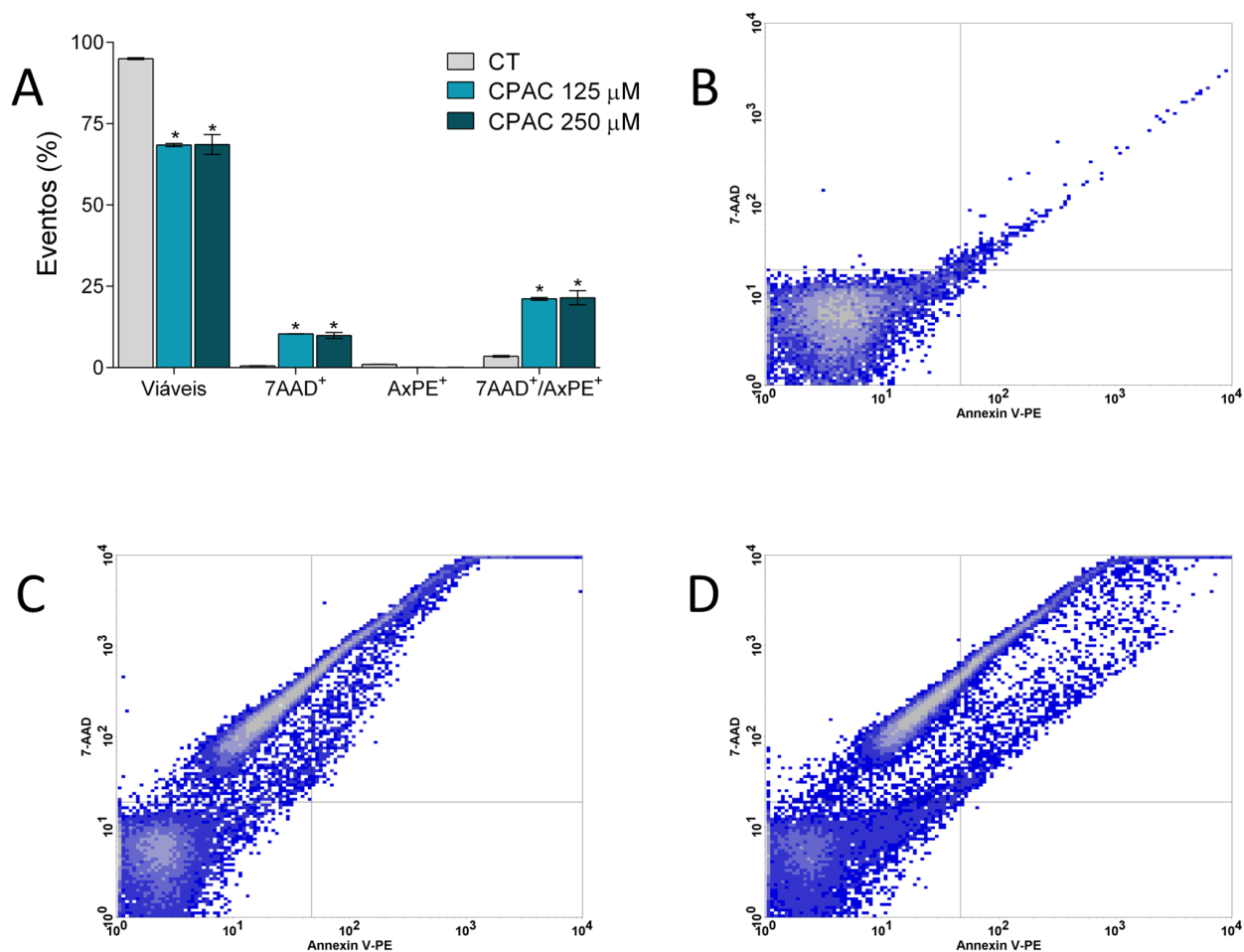
Figura 22: Ensaios de perfil de morte com as formas epimastigotas usando 7AAD e Ax-PE após 24 horas de incubação.



Legenda: Ensaios de perfil de morte após 24 horas de incubação com as formas epimastigotas e as concentrações de 125 e 250 μM para CPAB. Os dados foram expressos como percentual de eventos \pm EPM. A análise foi feita por one-way ANOVA seguido de pós-teste de Dunnet. $*p < 0,05$ v.s grupo controle (A). Nos gráficos de dot plot, mostram-se o grupo controle (B); Em (C e D) têm-se deslocamento da população celular da CPAB para o quadrante superior esquerdo (7AAD+/Ax-PE-) e direito (7AAD+/Ax-PE+).
Fonte: Elaborado pela autora.

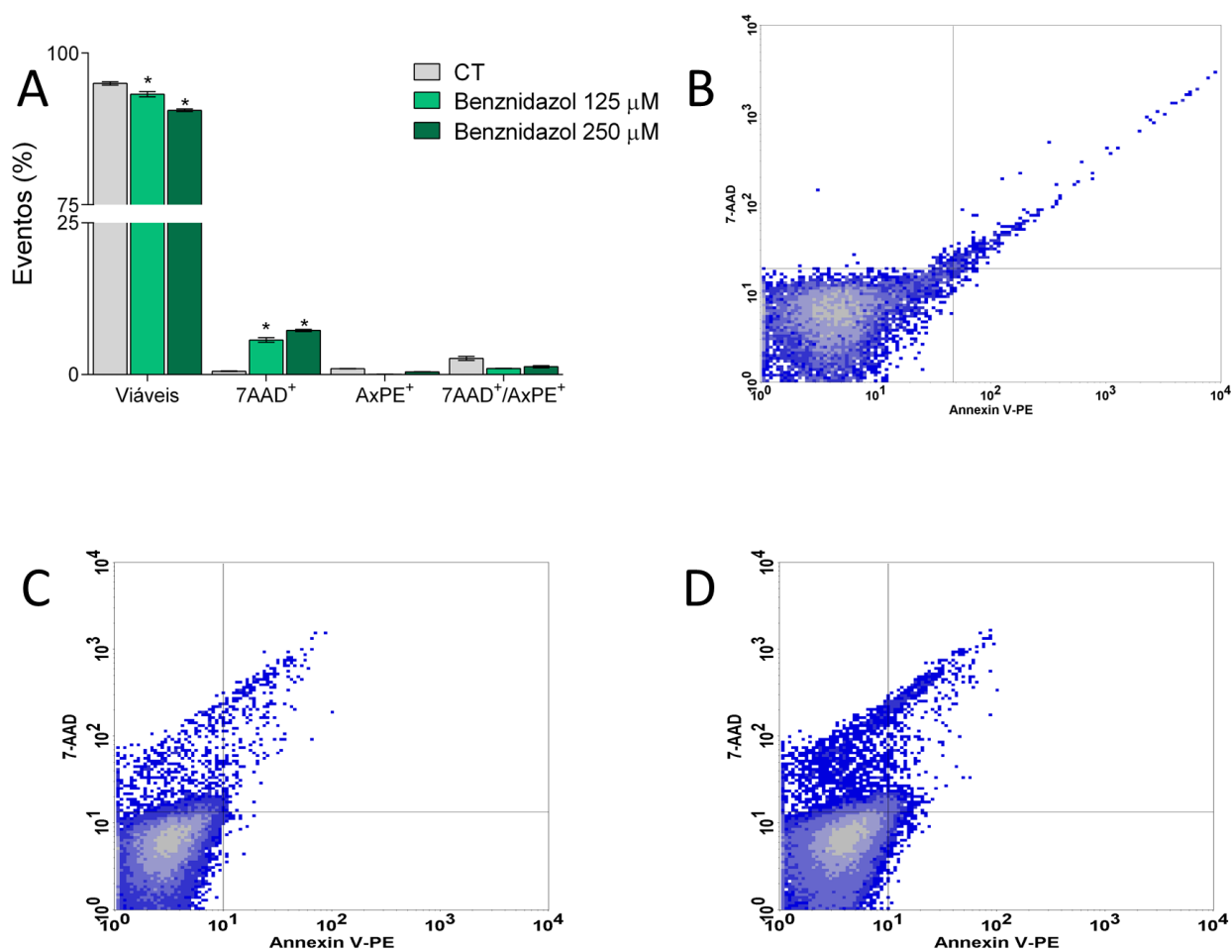
Nos ensaios com a CPAC (Figura 23), é possível observar que a substância causou 10.3% de marcação 7AAD+/AxPE- e 21.2% para 7AAD+/AxPE+, na concentração de 125 μM , enquanto que na concentração de 250 μM , o percentual de marcação 7AAD+/AxPE- e 7AAD+/AxPE+ foi de 9.8% e 21.4% e benznidazol (figura 24).

Figura 23: Ensaios de perfil de morte com as formas epimastigotas usando 7AAD e Ax-PE após 24 horas de incubação.



Legenda: Ensaios de perfil de morte após 24 horas de incubação com as formas epimastigotas e as concentrações de 125 e 250 μ M para CPAC. Os dados foram expressos como percentual de eventos \pm EPM. A análise foi feita por one-way ANOVA seguido de pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ v.s grupo controle (A). Nos gráficos de dot plot, mostram-se o grupo controle (B); Em (C e D) têm-se deslocamento da população celular da CPAC para o quadrante superior esquerdo (7AAD⁺/Ax-PE⁻) e direito (7AAD⁺/Ax-PE⁺).
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 24: Ensaios de perfil de morte de Benznidazol com as formas epimastigotas usando 7AAD e Ax-PE após 24 horas de incubação.



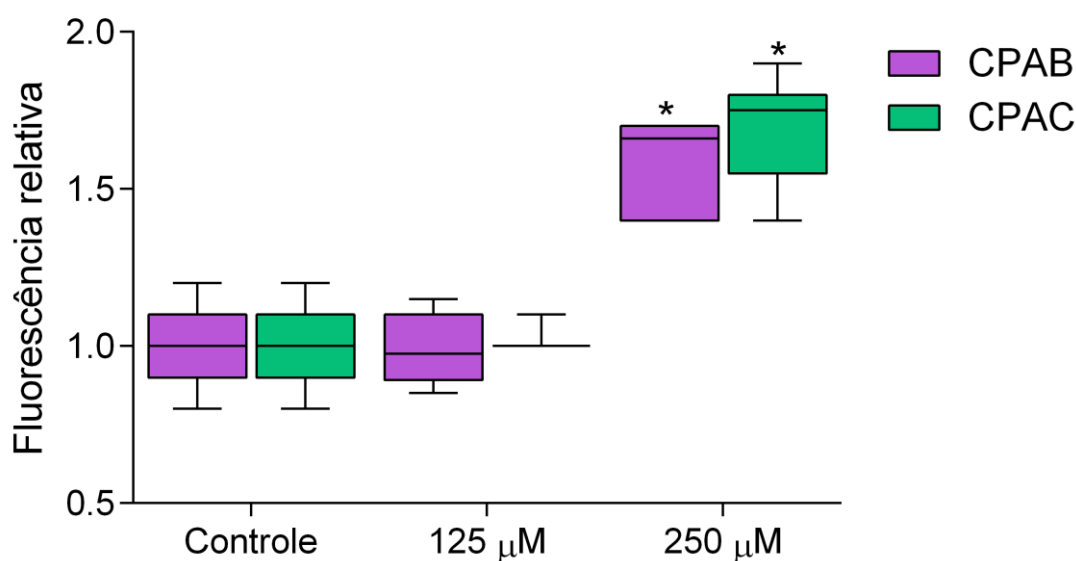
Legenda: Ensaios de perfil de morte após 24 horas de incubação com as formas epimastigotas e as concentrações de 125 e 250 µM para Benznidazol. Os dados foram expressos como percentual de eventos \pm EPM. A análise foi feita por one-way ANOVA seguido de pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ v.s grupo controle (A). Nos gráficos de dot plot, mostram-se o grupo controle (B); Em (C e D) têm-se deslocamento da população celular da CPAC para o quadrante superior esquerdo (7AAD⁺/Ax-PE⁻) e direito (7AAD⁺/Ax-PE⁺).

Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.2 Avaliação de produção de espécies reativas de oxigênio

Com o objetivo de investigar o *stress* oxidativo celular, a sonda fluorescente DCFH2-DA foi utilizada nas formas epimastigotas, a fim de mensurar o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) no citoplasma desses parasitos. A análise da produção de ROS foi analisada e após 24 horas de incubação, é demonstrado aumento da fluorescência de DCF, o que demonstra indução de *stress* oxidativo nestas células.

Figura 25: Análise das espécies reativas de oxigênio em epimastigotas tratadas com CPAB e CPAC por citometria de fluxo.



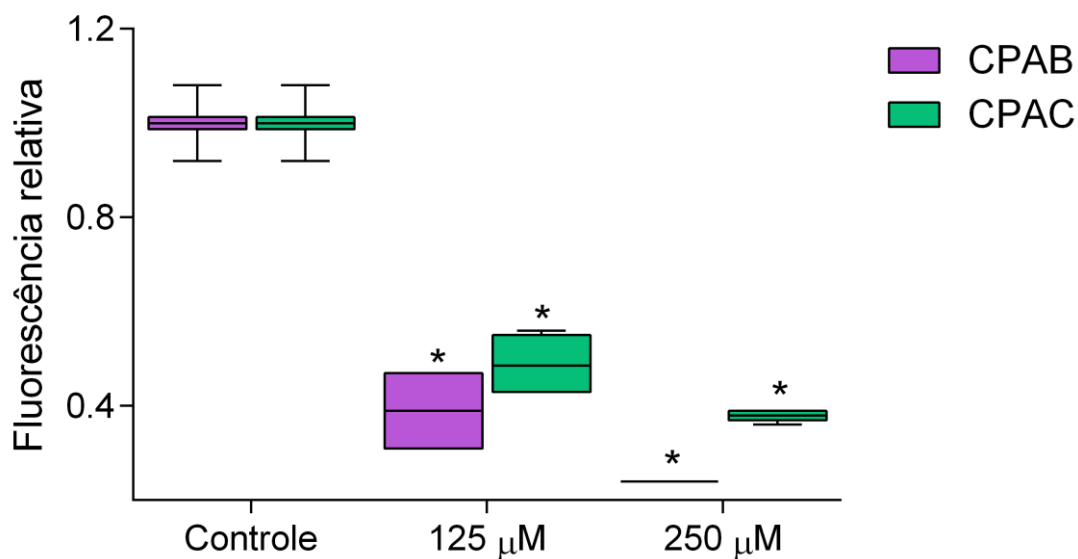
Legenda: CT – controle. Intensidade de fluorescência relativa das formas epimastigotas após o tratamento com as substâncias CPAB (A) e CPAC (B) em concentrações 125 e 250 µM. Os dados foram expressos por intensidade de fluorescência relativa das células em comparação ao grupo controle. A análise foi feita por one-way ANOVA seguido de pós-teste de Dunnet. *p<0,05 v.s grupo controle.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.3 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Neste ensaio, as formas epimastigotas foram incubadas na presença de rodamina 123 (Rho123) e tratadas com as substâncias em estudo, a fim de investigar se as substâncias em estudo induziram alguma alteração no potencial mitocondrial de *T. cruzi*.

Figura 26: Análise de $\Delta\Psi_m$ das formas epimastigotas tratadas com as substâncias CPAB e CPAC por citometria de fluxo.



Legenda: CT – controle. A figura mostra o potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) avaliado pela intensidade de fluorescência relativa, representados pela redução do potencial transmembrânico mitocondrial nas formas epimastigotas, utilizando as duas substâncias de interesse, CPAB e CPAC, respectivamente. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre os grupos. Os dados são apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle.

Fonte: Elaborado pela autora.

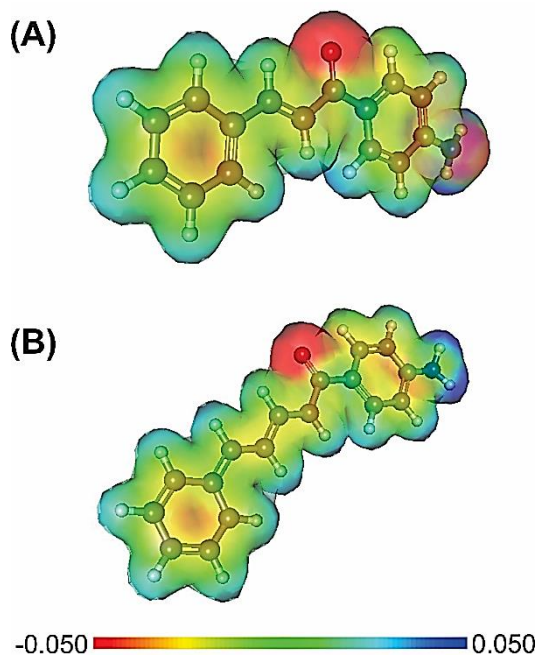
Após 24 horas de incubação, é possível observar uma redução acentuada do acúmulo de corante nas mitocôndrias, uma vez que a rodamina se acumula apenas em mitocôndrias intactas. Para ambas as substâncias de estudo, é evidenciado potencial transmembrânico mitocondrial alterado nestes parasitos, após à indução com as substâncias de interesse.

4.3 Resultados da Teoria do Funcional da Densidade (DFT)

A Figura 27 mostra as isosuperfícies para o Potencial Eletrostático Molecular (MEP) para as moléculas CPAB e CPAC, respectivamente. A região de cor vermelha está descrevendo uma região de carga negativa, a região de cor amarela está relacionada a uma região de carga parcialmente negativa, a de cor verde está relacionada a uma distribuição

de carga neutra, a de cor azul clara está relacionada a uma região de carga parcial positiva região, e a de cor azul para uma região carregada positivamente.

Figura 27: Potencial Eletrostático Molecular para as moléculas CPAB (A) e CPAC (B) computado no nível de teoria B3LYP/6-31G (d,p) na fase gasosa.



Fonte: Elaborado pela autora.

A distribuição de carga para ambas as moléculas é bastante semelhante: a estrutura α,β -insaturada e os dois anéis fenil têm uma distribuição amarela para a isosuperfície MEP que está associada à distribuição dos elétrons π em toda a estrutura molecular. Todos os átomos de hidrogênio ligados a átomos de carbono têm uma distribuição azul clara, uma vez que o esqueleto de carbono da molécula tem elétrons π em ressonância.

Os átomos de oxigênio para o grupo carbonila em ambas as moléculas têm uma distribuição vermelha para o MEP, que está associada a uma distribuição de carga negativa e isso já é esperado, pois o átomo de oxigênio tem a maior eletronegatividade, portanto, este átomo pode acomodar melhor a carga negativa.

Finalmente o átomo de nitrogênio tem uma pequena diferença: para a molécula CPAB, o nitrogênio tem uma carga negativa (distribuição de cor vermelha para o MEP),

no entanto, na molécula de CPAC, o nitrogênio tem uma distribuição de cor amarela. A molécula de CPAC tem um esqueleto de carbono maior quando comparada à molécula de CPAB, portanto, o efeito de ressonância pode espalhar a densidade eletrônica por toda a estrutura molecular de forma mais eficaz do que a estrutura da molécula de CPAB. Assim, o átomo de nitrogênio na molécula de CPAB deve interagir mais com os resíduos de aminoácidos, pois tem mais carga para doar.

4.4 Docking molecular das substâncias CPAB e CPAC com alvos enzimáticos

4.4.1 Docking molecular com alvos enzimáticos

As três principais enzimas envolvidas no metabolismo dos parasitos (TcGAPDH, cruzaiína e tripanotiona redutase) foram avaliadas no estudo. Primeiramente, foi utilizado o RMSD (*Root-Mean-Square Deviation*) para validação estatística dos resultados das simulações de formação dos complexos e escolha da *best pose*. O RMSD é calculado com base na medida da distância média entre os átomos dos dois ligantes, tendo critério de validação valores próximos de 2 Å.

Todas as simulações realizadas (*docking* e *re-docking*) apresentaram valores de RMSD inferiores ou próximo a 2 Å, com exceção do complexo CPAB-TcGAPDH que apresentou um desvio na ordem de 2,565. Vale destacar as *best pose* dos complexos CPAB-cruzaína, CPAC-cruzaína e CPAC-Tripanotiona que apresentaram RMSD na ordem de 1,146; 1,325 e 1,360 Å respectivamente (tabela 4).

Tabela 4: valores de energia de afinidade e RMSD dos complexos formados após simulações de docking frente às enzimas cruzaiína, TcGAPDH e Tripanotiona redutase.

Complexo	Parâmetros			
	Energia (kcal/mol)	Ki	pKi	RMSD (Å)
CPAB-cruzaína	-5.7	6,604 x10 ⁻⁵	4,18	1,146
CPAC- cruzaína	-6.1	3,361 x10 ⁻⁵	4,47	1,325
Bz- cruzaína	-6.0	3,979 x10 ⁻⁵	4,40	1,729
KB2- cruzaína*	-5.6	7,818 x10 ⁻⁵	4,11	1,590
CPAB-TcGAPDH	-6.6	1,444 x10 ⁻⁵	4,84	2,565

CPAC-TcGAPDH	-6.8	1,030 x10 ⁻⁵	4,99	1,909
Bz-TcGAPDH	-6.3	2,397 x10 ⁻⁵	4,62	1,778
BRZ- TcGAPDH	-8.0	1,358 x10 ⁻⁶	5,87	1,726
CPAB-Tripanotiona	-6.4	2,024 x10 ⁻⁵	4,69	1,788
CPAC-Tripanotiona	-7.0	7,351 x10 ⁻⁶	5,13	1,360
Bz-Tripanotiona	-7.4	3,741 x10 ⁻⁶	5,43	1,526
QUM-Tripanotiona	-6.4	2,024 x10 ⁻⁵	4,69	1,372

Legenda: *ligante co-cristalizado (redocking); Bz: benznidazol; BRZ: 6-(1,1-dimethylallyl)-2-(1-hydroxy-1-methylethyl)-2,3-dihydro-7h-furo[3,2-g]chromen-7-one ; QUM: Quinacrine mustard; KB2: (3S)-3-(4-((1S)-1,2-dimethyl-1-[(quinolin-6-ylmethyl)amino]propyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)heptan-2-one.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.1.1 *Cruzaína*

Em relação à energia de afinidade, os complexos CPAB-cruzaína e CPAC-cruzaína apresentaram energia na ordem de -5,7 e -6,1 kcal/mol respectivamente. Os complexos Bz-cruzaína e KB2-cruzaína apresentaram na ordem de -6,0 e -5,6 kcal/mol respectivamente. As constantes de inibição ficaram na ordem de $6,604 \times 10^{-5}$ (pKi = 4,18), $3,361 \times 10^{-5}$ (pKi = 4,47), $3,979 \times 10^{-5}$ (pKi = 4,40) e $7,818 \times 10^{-6}$ (pKi = 4,11) para a os complexos CPAB-cruzaína, CPAC-cruzaína, Bz-cruzaína e KB2-cruzaína respectivamente, conforme demonstrado na tabela 8.

No que se refere às interações envolvidas na formação do complexo proteína-ligante, foi possível identificar que o complexo CPAB-cruzaína é formado por duas interações hidrofóbicas envolvendo os resíduos Phe 39B e Pro 44A com distâncias nas ordens de 3,70 e 3,73 Å e uma interação do tipo π -stacking com o resíduo de cadeia lateral aromática Phe 39 (4,25 Å). O complexo CPAC-cruzaína é formado por cinco interações hidrofóbicas com os resíduos Phe 39A (3,72Å), Gly 42A (3,85 Å), Pro 44A (3,69 e 3,51 Å) e Leu 45A (3,51 Å), duas ligações de hidrogênio com o resíduo Arg 10A (3,07 e 3,01 Å) e uma interação do tipo π -stacking com o resíduo aromático Phe 39 (4,24 Å) (Tabela 5).

Tabela 5: Interações entre CPAB, CPAC, Bz e KB2 com a cruzaina.

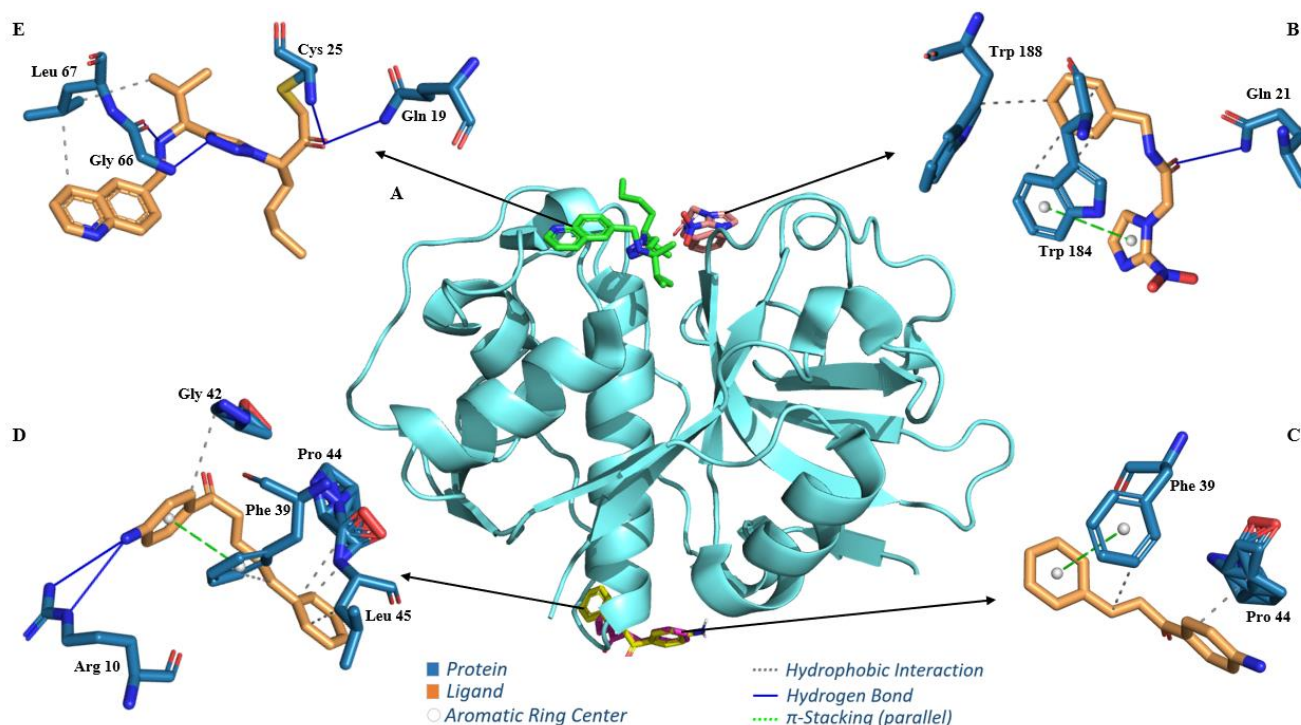
Ligante	Receptor	Interação	Distância (Å)
CPAB	Phe 39B	Hidrofóbica	3,70
	Pro 44A	Hidrofóbica	3,73
	Phe 39A	π -stacking	4,25
CPAC	Phe 39A	Hidrofóbica	3,72
	Gly 42A	Hidrofóbica	3,85
	Pro 44A	Hidrofóbica	3,69
	Pro 44A	Hidrofóbica	3,61
	Leu 45A	Hidrofóbica	3,51
	Arg 10A	Ligação de H	3,07
	Arg 10A	Ligação de H	3,01
	Phe 39A	π -stacking	4,24
Bz	Trp 184A	Hidrofóbica	3,52
	Trp 184A	Hidrofóbica	3,78
	Trp 184A	Hidrofóbica	3,67
	Trp 188A	Hidrofóbica	3,99
	Gln 21A	Ligação de H	3,54
	Trp 184A	π -stacking	4,54
	KB2*	Leu 67A	Hidrofóbica
Leu 67A		Hidrofóbica	3,59
Gln 19A		Ligação de H	2,28
Cys 25A		Ligação de H	2,18
Gly 66A		Ligação de H	1,87
Gly 66A		Ligação de H	2,27

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

Fonte: Elaborado pela autora.

O complexo Bz-cruzaina foi formado por quatro interações hidrofóbicas com os resíduos Trp (3,52; 3,67 e 3,78 Å) e Trp 188A (3,99 Å), uma ligação de hidrogênio com o resíduo Gln 21A (3,54 Å) e uma π -stacking com o resíduo Trp 184A (4,54 Å). As simulações de Re-docking indicaram que o complexo KB2-cruzaina foi formado por duas interações hidrofóbicas com o resíduo Leu 67A (3,59 e 3,88 Å), e quatro ligações de hidrogênio envolvendo os resíduos Gln 19A(2,28 Å), Cys 25A(2,18 Å), Gly 66A (1,87 e 2,27Å), conforme demonstrado pela Figura 28.

Figura 28: Complexo e mapas de interação dos ligantes com a enzima cruzaina



Legenda: Complexo e mapas com os ligantes (A); Mapas de interações do fármaco benznidazol (B), dos ligantes CPAB (C), CPAC (D) e do inibidor co-cristalizado KB2 (E).

Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.1.2 *TcGAPDH*

Os complexos CPAB-*TcGAPDH* e CPAC-*TcGAPDH* apresentaram energia de afinidade na ordem de -6,6 e -6,8 kcal/mol, respectivamente. Os complexos Bz-*TcGAPDH* e KB2-*TcGAPDH* apresentaram na ordem de -6,3 e -8,0 kcal/mol, respectivamente. As constantes de inibição ficaram na ordem de $1,444 \times 10^{-5}$ (pKi = 4,84), $1,030 \times 10^{-5}$ (pKi = 4,99), $2,397 \times 10^{-5}$ (pKi = 4,62) e $1,358 \times 10^{-6}$ (pKi = 5,87) para os complexos CPAB-*TcGAPDH*, CPAC-*TcGAPDH*, Bz-*TcGAPDH* e KB2-*TcGAPDH* como mostra a tabela 9.

Nas interações envolvidas na formação do complexo proteína-ligante foi possível identificar que CPAB-*TcGAPDH* é formado por sete interações hidrofóbicas envolvendo os resíduos Val 203A (3,66 Å), Ile 1090D (3,60; 3,76 e 3,81 Å), Ala 1212D (3,61 Å), Thr 1274D (3,91 Å) e Glu 1413D (3,62 Å), e duas ligações de hidrogênio com os resíduos Asn 1412D e Glu 1413D com distâncias na ordem de 3,08 e 3,56 Å. O complexo CPAC-

TcGAPDH foi formado por cinco interações hidrofóbicas envolvendo os resíduos Val 219A (3,67 e 3,88 Å), Pro 612B (3,91 Å), Val 937C (3,72 Å) e Ile 1379D (3,63 Å), duas ligações de hidrogênio com os resíduos His 912C (3,48 Å) e Ser 965 C (3,17 Å) e uma interação do tipo π -stacking com o resíduo His 912C (4,13 Å) (tabela 6).

Tabela 6: Interações entre a CPAB, CPAC, Bz e KB2 com a TcGAPDH

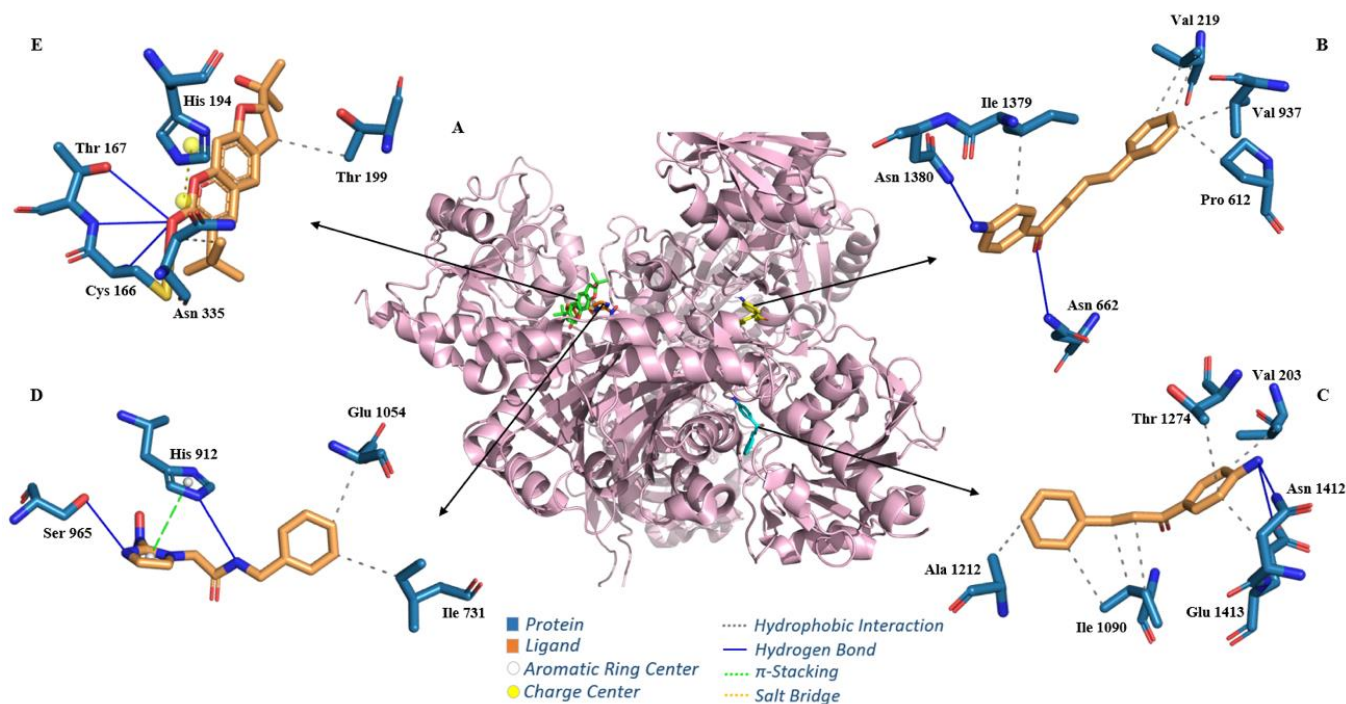
Ligante	Receptor	Interação	Distancia (Å)
CPAB	Val 203A	Hidrofóbica	3,66
	Ile 1090D	Hidrofóbica	3,81
	Ile 1090D	Hidrofóbica	3,60
	Ile 1090D	Hidrofóbica	3,76
	Ala 1212D	Hidrofóbica	3,61
	Thr 1274D	Hidrofóbica	3,91
	Glu 1413D	Hidrofóbica	3,62
	Asn 1412D	Ligação de H	3,08
	Glu 1413D	Ligação de H	3,56
CPAC	Val 219 ^a	Hidrofóbica	3,88
	Val 219 ^a	Hidrofóbica	3,67
	Pro 612B	Hidrofóbica	3,63
	Val 937C	Hidrofóbica	3,72
	Ile 1379D	Hidrofóbica	3,63
	Asn 662B	Ligação de H	3,52
	Asn 1380D	Ligação de H	2,90
	BZN	Ile 731C	Hidrofóbica
Glu 1054C		Hidrofóbica	3,64
His 912C		Ligação de H	3,48
Ser 965C		Ligação de H	3,17
His 912C		π -stacking	4,13
BRZ*	Thr 199C	Hidrofóbica	3,90
	Asn 335C	Hidrofóbica	3,47
	Cys 166C	Ligação de H	2,79
	Thr 167C	Ligação de H	2,80
	Thr 167C	Ligação de H	3,05
	His 194C	Ligação de H	3,95

Legenda: *ligante co-cristalizado (redocking); BRZ: 6-(1,1-dimethylallyl)-2-(1-hydroxy-1-methylethyl)-2,3-dihydro-7h-furo[3,2-g]chromen-7-one.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O complexo BRZ- TcGAPDH, obtido por simulações de re-docking foi formando por quatro H-bond envolvendo os resíduos Thr 167 C (2,80 e 3,05 Å), Cys 166C (2,79 Å) e His 194C (3,95 Å) e duas interações hidrofóbicas envolvendo os resíduos Thr 199C (3,90 Å) e Asn 335C (3,47 Å), conforme a figura abaixo:

Figura 29: Complexo e mapas de interação dos ligantes com a enzima TcGAPDH



Legenda: Complexo de interação da enzima com os ligantes (A); Mapas de interações dos ligantes CPAC (B), CPAB (C), do fármaco benznidazol (D), e do inibidor co-cristalizado BRZ (E).

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

4.4.1.3 *Tripanotiona reductase*

A energia de afinidade dos complexos CPAB-Tripanotiona e CPAC-Tripanotiona foi na ordem de -6,4 e -7,0 kcal/mol respectivamente. Os complexos Bz-Tripanotiona e QUM-Tripanotiona apresentaram na ordem de -7,4 e -6,4 kcal/mol respectivamente. As constantes de inibição ficaram na ordem de $2,024 \times 10^{-5}$ (pKi = 4,69), $7,351 \times 10^{-6}$ (pKi = 5,13), $3,741 \times 10^{-6}$ (pKi = 5,43) e $2,024 \times 10^{-5}$ (pKi = 4,69) para os complexos CPAB-Tripanotiona, CPAC-Tripanotiona, Bz-Tripanotiona e KB2-Tripanotiona, respectivamente (tabela 5).

Nas interações envolvidas na formação do complexo proteína-ligante, foi possível identificar que CPAB-Tripanotiona foi formado por cinco interações hidrofóbicas envolvendo os resíduos Phe 45B (3,83 Å), Trp 127B (3,61 Å), Trp 164B (3,62 e 3,66 Å) e Arg 291B (3,63 Å), e duas ligações de hidrogênio com os resíduos Trp 164B e Ser 289D com distâncias na ordem de 3,05 e 3,03 Å. Enquanto o complexo CPAC-Tripanotiona foi formado por três interações hidrofóbicas envolvendo os resíduos Thr 52B (3,74 Å), Ala

160B (3,96 Å) e Ala 338B (3,62 Å), e duas ligações de hidrogênio com os resíduos Trp 335B com distâncias na ordem de 2,62 e 2,73 Å (figura 30).

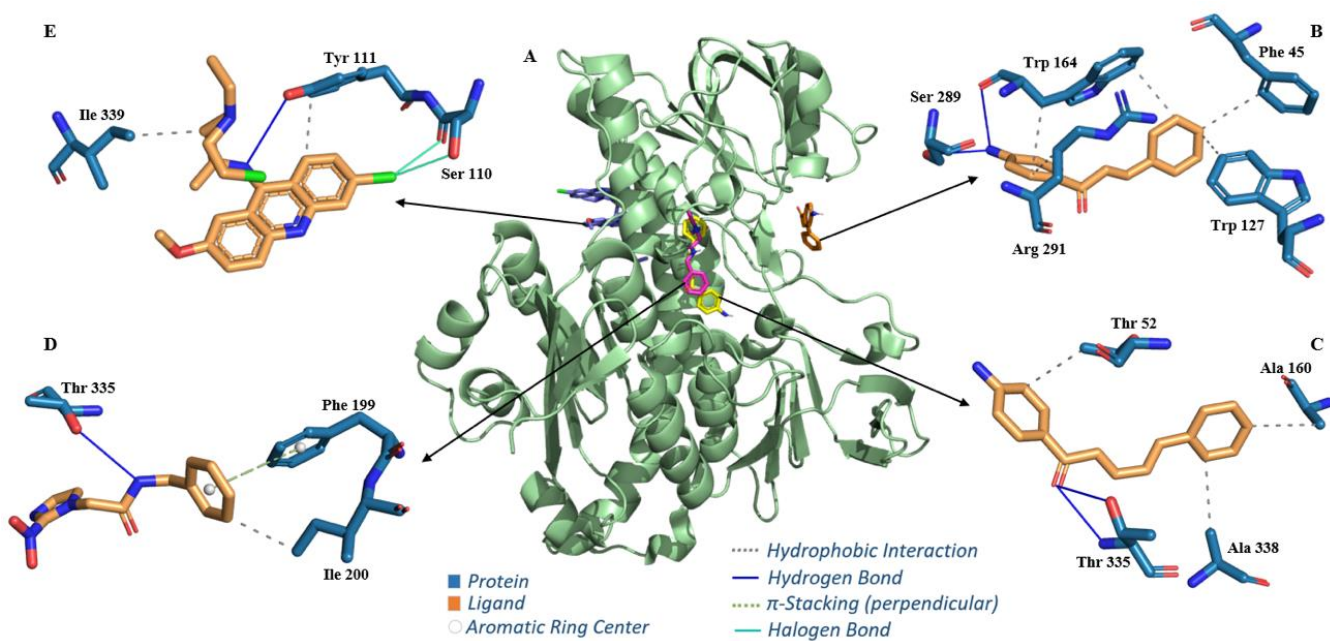
Tabela 7: Interações entre a CPAB, CPAC, Bz e KB2 com Tripanotiona redutase.

ligante	receptor	Interação	Distancia (Å)
CPAB	Phe 45B	Hidrofóbica	3,83
	Trp 127B	Hidrofóbica	3,53
	Trp 164B	Hidrofóbica	3,66
	Trp 164B	Hidrofóbica	3,62
	Arg 291B	Hidrofóbica	3,63
	Trp 164B	Ligação de H	3,05
	Ser 289B	Ligação de H	3,03
CPAC	Thr 52B	Hidrofóbica	3,74
	Ala 160B	Hidrofóbica	3,96
	Ala 338B	Hidrofóbica	3,62
	Thr 335B	Ligação de H	2,73
	Thr 335B	Ligação de H	2,62
Bz	Ile 200B	Hidrofóbica	3,60
	Thr 335B	Ligação de H	2,95
	Thr 335B	Ligação de H	2,76
	Phe 199B	π -stacking	5,00
QUM*	Tyr 111B	Hidrofóbica	3,32
	Tyr 111B	Ligação de H	3,22
	Ser 100B	Lig. halogênio	3,15
	Ser 100B	Lig. halogênio	3,61

Legenda: *ligante co-cristalizado (redocking); Bz: Benznidazol; QUM: Quinacrine mustard;
Fonte: Elaborado pela autora.

Já na interação do fármaco Bz com a tripanotiona redutase foi possível identificar duas ligações de hidrogênio com o resíduo Thr 335B (2,76 e 2,95 Å), uma π -stacking com o resíduo de cadeia lateral aromática Phe 199B (5,00 Å) e uma interação hidrofóbica com a Ile 200B na ordem de 3,60 Å. As simulações de re-*docking* envolvendo o inibidor co-cristalizado QUM, identificaram a presença de duas interações com o resíduo Tyr 111B, uma hidrofóbica com distância de 3,32 Å e uma ligação de hidrogênio na ordem de 3,22 Å. Também foram identificadas duas ligações com halogênios envolvendo a cadeia lateral do resíduo Ser 100B com distâncias na ordem de 3,15 e 3,61 Å (Tabela 7).

Figura 30: Complexo e mapas de interação dos ligantes com a enzima tripanotona redutase



Legenda: Complexo de interação da enzima com os ligantes (A); Mapas de interações dos ligantes CPAC (B), CPAB (C), do fármaco benznidazol (D), e do inibidor co-cristalizado QUM (E).

Fonte: Elaborado pela autora.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Apesar de ser uma doença zoonótica, a doença de Chagas (DC) se expandiu das áreas rurais para as áreas urbanas, e de regiões endêmicas para não endêmicas. Considerada uma doença negligenciada, a DC afeta a vida de milhões de pessoas em todo o mundo e ameaça a saúde de outros milhões. A procura de medicamentos contra estas doenças negligenciadas, particularmente a DC, é uma necessidade urgente, devido ao número reduzido de medicamentos disponíveis, aos efeitos toxicológicos e à resistência parasitária (MIRANDA-ARBOLEDA et al., 2021).

Embora os produtos naturais derivados de plantas tenham sido, ao longo dos anos, uma boa alternativa como principal fonte de medicamentos, especialmente para agentes anticancerígenos e antimicrobianos (HARVEY, 2008; CARROLL et al., 2022), o processo de desenvolvimento de fármacos é afetado pela baixa disponibilidade de substâncias naturais, uma vez que as substâncias bioativas são normalmente encontradas em baixas concentrações. Por esse motivo, os produtos naturais são tomados como modelos, cujas estruturas são modificadas e otimizadas por síntese orgânica (THOMFORD et al., 2018).

Além dos produtos naturais, os produtos sintéticos oferecem uma fonte abundante de compostos que auxiliam na concepção de produtos moleculares farmacologicamente importantes. Considerada precursora de flavonoides e isoflavonoides, as chalconas se apresentam como um conjunto diversificado de atividades farmacológicas já conhecidas (SINGH; ANAND & KUMAR, 2014).

Em um estudo recente publicado por Devi e colaboradores (2018), duas séries de chalconas com grupos 2,2,2-trifluoroetoxi substituídos nas posições *p* e *m* do anel A e 2-fluoroetoxi substituídos na posição *o* do anel 1-fenil foram sintetizados e, usando um ensaio de inibição, apresentaram atividade antiplasmodial fraca e aumentada, respectivamente, indicando que os grupos apresentavam atividade dependendo da posição do anel. Este e outros achados fortalecem o interesse científico de se estudar este grupo de moléculas.

Embora algumas das suas atividades biológicas já tenham sido estudadas, têm-se investigado e analisado suas características estruturais contra parasitos protozoários, devido à sua facilidade de obtenção e numerosas possibilidades de substituição em anéis

aromáticos que permitem a modificação da estrutura através da sua troca por outros substitutos e, principalmente, devido à grande variedade de atividades biológicas que apresentam (GONZÁLEZ et al., 2020). Contudo, existem poucas pesquisas que correlacionam as chalconas à busca por novos fármacos antichagásicos.

No nosso estudo, o efeito tripanocida de duas novas *p*-aminochalconas foi descrito pela primeira vez, bem como os ensaios biológicos para avaliar o seu efeito nas células hospedeiras e nas principais formas de vida do *T. cruzi*. Em paralelo, foram realizadas interações teóricas com as principais enzimas do *T. cruzi* para avaliar os possíveis mecanismos de ação envolvidos nesse efeito.

Recentemente, foi desenvolvida uma nova série de *p*-aminochalconas sintéticas utilizando a reação de condensação de Claisen Schmidt. Estas moléculas foram investigadas em diferentes modelos experimentais para avaliação de derivados de chalconas com potencial bioativo. Como exemplo, podemos mencionar o estudo de aminolchalconas para avaliação antimicrobiana, em que mostraram uma importante atividade antimicrobiana em sinergia com a gentamicina, norfloxacino e penicilina contra estirpes multiresistentes de *Staphylococcus aureus* (FERRAZ et al., 2020).

Neste estudo, foram realizados ensaios *in vitro* para avaliação das atividades biológicas das moléculas de interesse, em células hospedeiras e nas principais formas de sobrevivência do *T. cruzi*. Embora muitas chalconas tenham sido sintetizadas e testadas contra parasitos protozoários, o número de características estruturais conhecidas envolvidas nestas propriedades biológicas é ainda pequeno. Diante disso, nós avaliamos a citotoxicidade utilizando as células LLC-MK₂, as quais vêm sendo constantemente utilizadas como modelo celular para infecção por *T. cruzi* devido à sua facilidade de cultivo e suscetibilidade à infecção (ZINGALES et al., 1997; C ALMEIDA & SOUTO-PADRÓN, 2010).

Nos ensaios biológicos apresentados neste trabalho, foi utilizada a cepa Y de *T. cruzi*, uma vez que a mesma apresenta resistência parcial e importante ao Bz, constituindo, assim, um modelo importante de investigação. Inicialmente, a citotoxicidade foi avaliada em células hospedeiras e observada nas chalconas de estudo. A CPAB, em comparação com a CPAC, apresentou maior toxicidade, enquanto o benznidazol apresentou ser menos tóxico quando a citotoxicidade foi correlacionada. De acordo com a literatura, as substituições dos elétrons no anel B e as ligações de hidrogênio

em C-2' afetam a atividade biológica parasitária, e que esse mecanismo pode ser responsável pelo aumento de citotoxicidade. (GONZÁLEZ et al., 2020).

Normalmente, o efeito biológico das chalconas se correlaciona com a presença da dupla ligação em conjugação com a funcionalidade carbonil, responsável pelas atividades biológicas, em um mecanismo reacional do tipo acceptor de Michael (SINGH; ANAND & KUMAR, 2014). Além disso, a presença de átomos eletro atraentes parece diminuir essa interação pelo efeito retirador de elétrons do acceptor de Michael (GONZÁLEZ et al., 2020).

Neste mesmo sentido, Bello e colaboradores (2011), sintetizaram várias chalconas polimetoxiladas substituídas no anel A, especialmente a trimetoxilação em posições *orto* e *meta* em relação às posições carbonilas no sistema insaturado, e eles perceberam que a atividade contra *L. braziliensis* melhorou significativamente, enquanto que o anel B que possuía grupos em diferentes posições não influenciou nesta mesma atividade. Da mesma forma, é relatado em outro estudo que os grupos doadores de elétrons ligados ao anel B favorecem a atividade parasitária em comparação aos grupos que retiram elétrons, como é demonstrado que a atividade antitripanossomal aumenta com o aumento da halogenação do anel B (BETECK et al., 2019).

No ensaio, as moléculas de estudo apresentaram efeito sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Foi observado efeito inibitório concentração e tempo dependente. No entanto, em CPAC, foi observado um maior índice de seletividade (IS), em comparação com a molécula CPAB, cujos valores foram de 15,3 e 2,6, respectivamente. A principal mudança observada com o aumento da cadeia alifática foi a diminuição da toxicidade, o que explica o aumento da seletividade nesta molécula. Em um estudo realizado por Magalhães et al., (2022), também é observado que a citotoxicidade da chalcona 1 foi drasticamente reduzida com as cloro substituições no anel B. Este mecanismo do tipo Michael também é relatado para outros compostos α,β -insaturados, como lactonas e ésteres de ácido cinâmico, relacionados com a sua capacidade de interagir com resíduos de aminoácidos nucleofílicos (OTETO et al., 2014).

Em um estudo *in vitro* envolvendo a atividade de duas chalconas (2'4'-dimetoxi-6'-hidroxichalcona e 2'5'-dimetoxi-4',6'-dihidroxichalcona) contra *T. brucei* e *L. mexicana* mostrou que em relação a estrutura-atividade, as posições *hidroxi* e *metoxi* das

chalconas influenciou na atividade tripanocida sem aumentar a toxicidade em linhagem celular de fibroblasto de humano (ZHEOAT et al., 2021).

Em outro estudo descrito por Zulu et al., (2020), ao realizar a síntese de derivados de chalconas à base de arilpirrol, em que o anel aromático não substituído ligado à porção arilpirrol (anel B), mostrou boa atividade contra *T. brucei* (IC₅₀ de 11,5 µM). Ao introduzir um átomo de flúor, na posição *para*, percebeu-se aumento da atividade; no entanto, a atividade foi diminuída ao fazer a substituição do flúor por cloro. Além disso, a presença da funcionalidade trifluorometil (CF₃) na posição *para* resultou em um composto com boa atividade, já o isômero de CF₃ na posição *meta* apresentou atividade reduzida. A troca de CF₃ com outro substituinte retirador de elétrons (NO₂) na posição *para*, também mostrou atividade biológica melhorada com um IC₅₀ < 6 µM, indicando que uma combinação de grupos doadores e retiradores de elétrons no anel B parecem ser necessárias para a atividade desses compostos.

Um estudo descrito por Matos et al., (2022), avaliou pela primeira vez o potencial antiproliferativo de derivados de chalcona de um produto natural sobre *T. cruzi* cepa Y. A chalcona foi capaz de eliminar totalmente as formas tripomastigotas em todas as concentrações testadas, apresentando LC50 inferior à droga de referência. O efeito anti *T. cruzi* pode ser atribuído através de alguns aspectos estruturais da chalcona como o grupo nitro (NO₂) presente, o que pode ser reduzido enzimaticamente formando um radical nitro, e a presença de grupos metoxila no anel A do chalcona.

As formas amastigotas de *T. cruzi* são replicativas intracelulares que infectam mamíferos e, por isso, é o principal alvo de qualquer droga prospectiva para tratar infecções crônicas por *T. cruzi*. Assim, substâncias com efeitos anti-amastigotas é a única abordagem adequada para triagem de drogas, pois, são aqueles que se aproximam do alvo terapêutico, incluindo mecanismos de ação dependentes da célula hospedeira (VERMEERSCH et al., 2009). O efeito anti-amastigota das chalconas neste estudo foi avaliado em diferentes concentrações onde a citotoxicidade contra as células hospedeiras era baixa e as moléculas eram capazes de reduzir principalmente a quantidade de amastigotas nas células infectadas, no entanto, o efeito sobre as formas amastigotas não mudou.

Efeitos anti-amastigotas semelhantes das chalconas já foram relatados na literatura. Estudos com 3-nitro-2',4',6'-trimetoxichalcona em *Leishmania spp*, descritos por

Escrivani et al. (2021) e prenyloxy chalconas em *L. brasilienses* (GONZÁLEZ et al., 2020), reforçam o efeito contra estes parasitas, sugerindo que a reduzida viabilidade e infecciosidade dos amastigotas causados pelas chalconas pode estar relacionada com interferências em processos celulares importantes para a sobrevivência do parasita.

Em um estudo pioneiro na avaliação do efeito de 4-nitrochalconas encapsulada contra *L. amazonensis*, mostrou que houve redução do percentual de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófagos, além do aumento de ROS e diminuição do potencial transmembrânico mitocondrial (ASSOLINI et al., 2020). Além disso, algumas chalconas podem apresentar propriedades pró-oxidantes, reduzindo os mecanismos antioxidantes ou aumentando as ROS (DE MELO et al., 2014; WANG et al., 2015).

Neste contexto, a Tripanotiona redutase (TR), por ser uma enzima que desempenha um importante papel na defesa antioxidante em tripanossomatídeos, mantém um ambiente redutor no interior das formas amastigotas, protegendo-o contra o estresse oxidativo. Os resultados de inibição da via TR e cruzaína, principalmente, poderiam alcançar a fase de triagem clínica como candidatos a fármacos anti *T. cruzi* (PITA & PASCUTTI, 2011).

Ainda no nosso estudo, as alterações das características bioquímicas do *T. cruzi* foram avaliadas, através de ensaios de citometria, a fim de identificar os perfis de morte celular e o efeito biológico das moléculas em estudo. Assim, foram realizadas experiências com epimastigotas coradas com 7AAD e Anexina V-PE. Para ambas as moléculas, o ensaio promoveu marcação de 7AAD e dupla marcação, indicativo de apoptose tardia.

O efeito das chalconas em células cancerígenas é observado em alguns estudos, como por exemplo, no trabalho de Safwat et al., (2021), no qual realizando ensaios com a Anexina V-FITC frente a alguns derivados de chalconas-tienopirimidina, observou-se que em relação às células HepG2, obteve-se apenas eventos apoptóticos; no entanto, em células MCF-7, o tratamento com os compostos mostrou um aumento significativo na apoptose tardia e necrótica. Esse resultado pode ser atribuído ao fato de esses derivados de chalconas consigam inibir a síntese de DNA e conseqüentemente a parada do ciclo celular, assim como relatado com o anel de pirimidina de 5-fluorouracil que também ocorre essa inibição (LONGLEY; HARKIN & JOHNSTON, 2003).

Além disso, foi relatado um aumento da concentração de citocromo c, caspase-3, caspase-9 e mecanismos de reparo de DNA em células cancerosas HCT116 tratadas com os derivados de chalconas (2E)-3-(acridina-9-il)-1-(2,6-dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona (TAKAC et al., 2018). Recentemente, foi estabelecido que as chalconas (naturais ou sintéticas) exerciam suas atividades antiproliferativas via indução de stress oxidativo (FU et al., 2019). Portanto, foi investigado o *stress* oxidativo induzido pelas chalconas CPAB e CPAC em nosso estudo, no qual evidenciou aumento da fluorescência de DCF e consequentemente produção de ERO mostrando *stress* oxidativo citoplasmático induzido pelas moléculas de estudo.

Evidências recentes sugerem que os parasitos podem se beneficiar desse ambiente pro-oxidativo para se multiplicar, indicando que ERO pode funcionar como uma molécula de sinalização, contribuindo para a sobrevivência de *T. cruzi* no interior das células; no entanto, a sua produção excessiva pode causar a morte parasitária (GOES et al., 2016; PAIVA; MEDEI & BOZZA, 2018). Por exemplo, o tratamento com trans-chalconas em modelos de *L. amazonensis* resultou em um mecanismo de morte por necrose caracterizada por danos na membrana plasmática do protozoário com extravasamento de conteúdo celular (MIRANDA-SAPLA et al., 2019).

Foi ainda relatado o efeito das moléculas em estudo sobre o potencial de membrana mitocondrial. Percebeu-se que tanto CPAB como CPAC provocaram despolarização mitocondrial após 24 horas, verificado pelo decréscimo da acumulação de Rho123 na maior concentração testada (250 μ M). Essa organela está relacionada com a via intrínseca do apoptose, que culmina em liberação de citocromo c mitocondrial com concomitante redução do potencial transmembranar mitocondrial, com sinalização apoptótica. Além disso, o comprometimento mitocondrial é uma consequência da morte por necrose, uma vez que há colapso da produção de ATP. Nosso estudo está de acordo com outros trabalhos, que avaliaram alguns derivados de chalconas que estavam envolvidos em despolarização mitocondrial em diferentes linhagens celulares (DE MOURA ESCOBAR et al., 2019; LATIF et al., 2020; KHUSNUTDINOVA et al., 2021).

Por exemplo, no estudo de De Mello et al., (2016) alguns derivados de chalconas também apresentaram alterações na permeabilidade de membrana de *L. braziliensis*, causando aumento da produção de ROS. Além disso, as chalconas também podem contribuir para a apoptose de células HepG2 através do aumento da geração de ROS que,

em último caso, altera o potencial da membrana mitocondrial dessas células (ZHU et al., 2019). Por outro lado, verificou-se que os análogos de chalconas com um grupo de tieno [2,3-d-pirimidina,2-yl] causavam potencial despolarização de membrana, acelerando a geração de ROS em células HCT-116, e aumentando o percentual de células apoptóticas precoces e tardias (WANG et al., 2020).

No presente estudo, as chalconas foram capazes de interagir com as principais enzimas sobrevivência de *T. cruzi*, como GAPDH, cruzaina e TR, responsáveis pela via glicolítica, diferenciação celular e mediadores antioxidantes do parasito, respectivamente. Além disso, o aumento da cadeia alifática insaturada, conseqüentemente, acarreta uma maior quantidade de estruturas de ressonância na molécula CPAC o que a torna mais estabilizada perante a ataques eletrofílicos ou nucleofílicos, assim como mais interações hidrofóbicas e aumento de lipofilicidade; essa mudança em sua estrutura, aumentou o índice de seletividade da molécula em relação à célula hospedeira sobre o parasito, bem como sua toxicidade sobre a célula hospedeira se mostrou bastante inferior em comparação com CPAB e Bz. Desse modo, os grupos de moléculas derivados de chalconas são considerados protótipos promissores para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas para o tratamento da DC.

Para obter informações sobre o mecanismo de interação das chalconas, o docking molecular foi realizada com a principal cisteíno-protease do *T. cruzi*. A cruzaina pertence à família das papaínas e tem sido amplamente estudada na quimioterapia contra a DC, uma vez que é a principal protease presente em todas as fases do ciclo de vida do parasito. Desempenha um papel importante, estando envolvido na degradação de proteínas para a nutrição, remodelação de células hospedeiras e evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro (LOSINNO et al., 2021).

Alguns estudos vêm explorando a estrutura cristalográfica da cruzaina e os seus principais resíduos de aminoácidos presentes no sítio catalítico, sendo a tríade catalítica composta pelos resíduos Cys25, His159 e Asn175, no entanto, outros resíduos encontrados no complexo CPAB-cruzaina como Phe39B, Pro44A e Phe39A, também são importantes para estabilização do ligante, mostrando interações hidrofóbicas e π -stacking, uma vez que ocorre interferência na atividade enzimática. Diante disso, um estudo envolvendo a avaliação bioquímica de derivados de chalconas e hidrazidas também foi realizado, demonstrando inibição *in vitro* contra a enzima cruzaina, com os valores de

IC₅₀ na faixa de 25 µM, sugerindo potenciais candidatos contra a DC (BORCHHARDT et al., 2010).

Da mesma forma, o nosso ensaio demonstrou que os resíduos Phe39A, Gly42A, Pro44A, Leu45A, Arg10A e Phe39A foram relacionados no complexo CPAC-cruzaína. Por conseguinte, o complexo de acoplamento do ligante de benzoiltioureas e cruzaína mostraram que esses compostos poderiam interagir com essa enzima por ligações de hidrogênio, de acordo com a orientação do composto, com os resíduos Leu160, Ser64 e Gly66 (PEREIRA et al., 2021).

Curiosamente, as chalconas CPAB e CPAC mostraram interação com a enzima em diferentes regiões. Contudo, ao comparar as suas estruturas químicas, nota-se que a única diferença é o aumento da cadeia alifática insaturada, o que foi suficiente para causar uma mudança importante no local da interação. Estes dados podem indicar que o aumento da lipofilicidade pode aumentar a interação com a enzima alvo numa região importante para a atividade catalítica.

Observa-se que ambas as substâncias se ligaram próximas ao sítio ativo, indicando possível potencial inibitório sobre a cruzaína. O bloqueio dessa enzima está associado ao comprometimento da metacicloogênese, redução da infecção e inibição da proliferação, o que, conseqüentemente, vai gerar a morte do parasito (LOSINNO et al., 2021). O estudo de Silva-Júnior et al., (2016) envolvendo a síntese de tiofen-2-iminotiazolidina mostrou possível interação com a cruzaína e IC₅₀ de 2.4 µM, além disso, os resultados *in vitro* confirmaram a inibição *in silico* com a enzima, mostrando inibição nos dois ensaios avaliados.

Um estudo descrito por Brito e colaboradores (2022), onde sintetizaram e caracterizaram uma chalcona e avaliaram sua atividade *in vitro* e *in silico* contra *T. cruzi*. Em relação à atividade *in vitro* contra *T. cruzi*, o composto exibiu-se mais ativo nas formas tripomastigotas do que nas formas epimastigotas. Além disso, apresentou efeito inibitório mais potente que o benznidazol. A partir da análise *in silico*, utilizando *docking molecular*, os autores mostraram que as formas tripomastigotas foram capazes de interagir com as enzimas cruzaína, tripanotiona redutase e TcGAPDH, indicando boa afinidade para o bolsão ativo.

Ainda neste contexto, avaliamos uma enzima exclusiva dos tripanossomatídeos: a TR, que exerce função redutora no interior do parasito, protegendo-o contra ERO. Além disso, apresenta diferenças significativas em relação à glutathione reductase encontrada nos mamíferos, que a torna alvo terapêutico potencial para fármacos antichagásicos. Estruturalmente, a TR é um homodímero, com sítio ativo em região hidrofóbica e carregado negativamente, é útil na ligação das cadeias hidrofóbicas do substrato, havendo complementariedade de carga entre enzima e ligante, que compreende regiões além do sítio ativo (ILARI et al., 2017). O TS₂ pode ser dividido esquematicamente em sete monômeros (Glu-I, Cys-I, Gly-I, SPM, Gly-II, Cys-II e Glu-II) que, no sítio ativo da TR, interagem principalmente com S15, W22, V54, V59, I107, S110, Y111, T335, I339, H461', P462', T463', S464', E466' e E467' (BOND et al., 1999).

Sendo a TR um alvo interessante para o desenvolvimento de inibidores, a estratégia do uso de compostos α,β -insaturados com essa atividade foi recentemente descrita por Sülsen et al., (2016), que demonstrou que a psilostacina e psilostacina C, isoladas de *Ambrosia tenuifolia* e *Ambrosia scabra*, apresentaram aumento de ROS após 4 horas de indução. Ante o exposto, o uso de substâncias bioativas, tanto naturais como sintéticas e a enzima TR demonstram uma boa estratégia na busca por novos agentes antichagásicos e um alvo promissor no desenvolvimento de novos fármacos, respectivamente. Dada sua importância no sistema redox de *T. cruzi*, um estudo demonstrou que a inibição de TR em *L. infantum* causava despolarização mitocondrial com perda concomitante de ATP intracelular e desencadeava um aumento de H₂O₂ tratados com Epigalocatequina 3-*O*-galato, resultando em morte do parasita (INACIO et al., 2021).

No nosso estudo, o complexo CPAB-tripanotiona foi formado por interações hidrofóbicas envolvendo resíduos Phe45B, Trp127B, Trp164B, Arg291B e ligações de hidrogênio Trp164B e Ser289D, respectivamente. Enquanto o complexo CPAC-tripanotiona envolveu os resíduos Thr52B, Ala160B e Ala338B, formado por três interações hidrofóbicas e duas ligações de hidrogênio com os resíduos Trp335B. Ambos os complexos permitiram identificar sítios de ligação do inibidor, que juntos formam uma região alvo para inibição competitiva por inibidores de TR, além de proporcionar uma maior seletividade no mecanismo de inibição dessa enzima, sugerindo que as chalconas podem prejudicar o equilíbrio antioxidante dos parasitos, levando ao desenvolvimento de

stress oxidativo e resultando na destruição de componentes macromoleculares celulares, promovendo a morte parasitária (SÜLSEN et al., 2016; INACIO et al., 2021).

O estudo de Barrera et al., (2013) identificou quatro lactonas sesquiterpênicas bioativas no mecanismo de defesa de *L. Mexicana* contra o *stress oxidativo*, observando um aumento significativo de geração de ROS pelos parasitos. Em outros trabalhos é relatado que a inibição da atividade da enzima, do dano parasitário, bem como da disfunção do balanço redox do parasito pelas lactonas se deve graças aos grupos sulfrídila pela adição do tipo Michael, o que pode ser explicado pelas diferenças no número de elementos alquilantes, lipofilicidade e ambiente químico do grupo sulfidrílico (CHAWLA & MADHUBALA, 2010; CHATURVEDI et al., 2011).

Outro alvo importante considerado como potencial terapêutico contra o *T. cruzi* é chamada de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (TcGAPDH), tendo em vista que esta enzima metabólica e glicolítica clássica, está presente no glicosoma dos tripanossomatídeos. A TcGAPDH é uma enzima homotetramérica que possui 359 resíduos de aminoácidos, na qual se apresenta com dois domínios: um catalítico e um cofator chamado de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+), em que o seu mecanismo de reação ocorre através do sítio catalítico, na qual é constituído por uma cisteína. A fosforilação oxidativa do substrato gliceraldeído-3-fosfato (D-G3P) é convertido em 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPG) na presença de um fosfato inorgânico e do cofator NAD^+ na sua forma oxidada (PARIONA-LLANOS et al., 2015; LOPES et al., 2018).

Além do cofator presente (NAD^+) e do substrato (D-G3P), o resíduo de cisteína (Cys166), presente no sítio catalítico da enzima, possui um papel essencial no mecanismo de catálise. Diante disso, CPAB e CPAC interagiram com diferentes resíduos de aminoácidos. Enquanto CPAB interagiu com Val 203A, Ile 1090D, Ala 1212D, Thr 1274D, Glu 1413D, Asn 1412D e Glu 1413D, CPAC interagiu com Val 219A, Pro 612B, Val 937C, Ile 1379D, His 912C, Ser 965C e His 912C. Além de Cys166 estar no sítio catalítico e ser um importante resíduo relacionado com a atividade da enzima, outros resíduos também são importantes para a estabilização do ligante nesta região, e por isso, descritos na literatura, como por exemplo, os resíduos Val 219A, Pro 612B e Ile 1379D, complexados com a chalcona e a enzima de interesse (DE BRITO et al., 2022).

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

As chalconas CPAB e CPAC foram capazes de causar uma redução significativa na viabilidade celular nas concentrações testadas nas formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, além de causar uma considerável redução na quantidade de células infectadas e o número de amastigotas intracelulares.

Além disso, a partir das avaliações de modelagem estrutural, envolvendo docking molecular, concluímos que as chalconas tem o potencial de se acomodar dentro do sítio de ligação das principais enzimas de *T. cruzi* e, portanto, atuar como um competidor para esse substrato.

O mecanismo de ação das chalconas pode estar relacionado com danos de membrana provocados pela redução do potencial transmembrânico mitocondrial. O melhor índice de seletividade de CPAC, pode ser atribuído à presença de maior cadeia alifática insaturada presente na estrutura química da molécula, tornando-a mais lipofílica. Este aumento da cadeia alifática em CPAC, contribuiu para uma diminuição importante em sua citotoxicidade quando comparada à CPAB e ao fármaco de referência, tornando CPAC promissora para estudos posteriores.

Assim, este estudo destaca o papel das chalconas como drogas potenciais para o tratamento da DC, sobretudo, a bioatividade dessas moléculas de se correlacionar aos grupos doadores e receptores de elétrons ligados aos anéis aromáticos em ambos os lados da estrutura de carbonila α,β -insaturada, o que chama atenção para ensaios adicionais *in vitro* e *in vivo*, visando o desenvolvimento de novos candidatos a medicamentos.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

ACOSTA, Nidia et al. Hosts and vectors of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in the Chagas disease endemic region of the Paraguayan Chaco. **Parasitology**, v. 144, n. 7, p. 884-898, 2017.

ACQUATELLA, Harry et al. Recommendations for multimodality cardiac imaging in patients with Chagas disease: a report from the American Society of Echocardiography in Collaboration with the InterAmerican Association of Echocardiography (ECOSIAC) and the Cardiovascular Imaging Department of the Brazilian Society of Cardiology (DIC-SBC). *Journal of the American Society of Echocardiography*, v. 31, n. 1, p. 3-25, 2018.

ALLOUCHE, Abdul-Rahman. Gabedit—A graphical user interface for computational chemistry softwares. **Journal of computational chemistry**, v. 32, n. 1, p. 174-182, 2011.

ARAÚJO-JORGE, Tania C. de; CASTRO, Solange Lisboa de. **Doença de Chagas: manual para experimentação animal**. Editora FioCruz, 2000.

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

BANDEIRA, Paulo Nogueira et al. In Vitro Antifungal Activity Against *Trychophyton Rubrum* of p-Aminochalcones and 3'-Methoxy-4'-Hydroxy Chalcone. **Revista Virtual de Quimica**, v. 12, n. 3, p. 703-711, 2020.

BARBOSA DA SILVA, Elany 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. 6, p. 419-427, 2019.

BARRERA, Patricia et al. Natural sesquiterpene lactones induce oxidative stress in *Leishmania mexicana*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

BAKKER, Barbara M. et al. Compartmentation protects trypanosomes from the dangerous design of glycolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 5, p. 2087-2092, 2000.

BECKE, Axel D. Density-functional thermochemistry. II. The effect of the Perdew–Wang generalized-gradient correlation correction. **The Journal of chemical physics**, v. 97, n. 12, p. 9173-9177, 1992.

BELLO, Murilo Lamim et al. Trimethoxy-chalcone derivatives inhibit growth of *Leishmania braziliensis*: Synthesis, biological evaluation, molecular modeling and structure–activity relationship (SAR). **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 19, n. 16, p. 5046-5052, 2011.

BELLUTI, Federica et al. Toward the development of dual-targeted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/trypanothione reductase inhibitors against *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. **ChemMedChem**, v. 9, n. 2, p. 371-382, 2014.

BELTRAN-HORTELANO, Ivan; PEREZ-SILANES, Silvia; GALIANO, Silvia. Trypanothione reductase and superoxide dismutase as current drug targets for *Trypanosoma cruzi*: an overview of compounds with activity against Chagas disease. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 11, p. 1066-1138, 2017.

BELTRAN-HORTELANO, Iván et al. Examination of multiple *Trypanosoma cruzi* targets in a new drug discovery approach for Chagas disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, p. 116577, 2022.

BENCK, Lillian; KRANSDORF, Evan; PATEL, Jignesh. Diagnosis and management of Chagas cardiomyopathy in the United States. *Current cardiology reports*, v. 20, n. 12, p. 1-8, 2018.

BERN, Caryn. Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456-466, 2015.

BERN, Caryn et al. Chagas disease in the United States: a public health approach. **Clinical microbiology reviews**, v. 33, n. 1, p. e00023-19, 2019.

BETECK, Richard M. et al. In vitro Anti-trypanosomal activities of indanone-based chalcones. **Drug Research**, v. 69, n. 06, p. 337-341, 2019.

BIOVIA, Dassault Systèmes. Discovery studio modeling environment, release 2017, San Diego: DassaultSystèmes, 2016. **Available from:**(Accessed 1 September 2016), 2016.

BOND, Charles S. et al. Crystal structure of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors. **Structure**, v. 7, n. 1, p. 81-89, 1999.

BORCHHARDT, Deise M. et al. Biochemical evaluation of a series of synthetic chalcone and hydrazide derivatives as novel inhibitors of cruzain from Trypanosoma cruzi. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 142-150, 2010.

BRAGA, Karla Márcia et al. Citometria De Fluxo: Histórico, Princípios Básicos E Aplicações Em Pesquisa. **Enciclopédia Biosfera**, v. 13, n. 23, 2016.

BRAK, Katrien et al. Nonpeptidic tetrafluorophenoxymethyl ketone cruzain inhibitors as promising new leads for Chagas disease chemotherapy. **Journal of medicinal chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1763-1773, 2010.

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

BRESSI, Jerome C. et al. Adenosine analogues as selective inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Trypanosomatidae via structure-based drug design. **Journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 13, p. 2080-2093, 2001.

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

C ALMEIDA, Camila Marques Adade; SOUTO-PADRÓN, Thaís. Contributions of ultrastructural studies to the cell biology of trypanosmatids: targets for anti-parasitic drugs. **The Open Parasitology Journal**, v. 4, n. 1, 2010.

CALDAS, Ivo S.; SANTOS, Elda G.; NOVAES, Rômulo D. An evaluation of benznidazole as a Chagas disease therapeutic. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 20, n. 15, p. 1797-1807, 2019.

CARROLL, Anthony R. et al. Marine natural products. **Natural product reports**, 2022.

CHAWLA, Bhavna; MADHUBALA, Rentala. Drug targets in Leishmania. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 34, n. 1, p. 1-13, 2010.

CHELESKI, Juliana et al. Expression, purification and kinetic characterization of His-tagged glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. **Protein Expression and Purification**, v. 76, n. 2, p. 190-196, 2011.

CHATURVEDI, Devdutt. Sesquiterpene lactones: structural diversity and their biological activities, In-Opportunity, Challenges and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry. **ISBN: 978-81-308-0448-4, Research Signpost, Trivandrum**, p. 313-334, 2011.

CUELLAR, José E. et al. Coumaro-chalcones synthesized under solvent-free conditions as potential agents against malaria, leishmania and trypanosomiasis. **Heliyon**, v. 8, n. 2, p. e08939, 2022.

CSIZMADIA, P. MarvinSketch and MarvinView: Molecule Applets for the World Wide Web. 1775. 2019.

DA SILVA, R. et al. Trypanocidal structure–activity relationship for cis-and trans-methylpluviatolide. **Phytochemistry**, v. 69, n. 9, p. 1890-1894, 2008.

DE ANDRADE LIMA, Sérgio Beltrão et al. Monitoramento de casos da Doença de Chagas Aguda no Brasil: um estudo descritivo. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 4, p. e27311427487-e27311427487, 2022.

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

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

DE MELLO, Tatiane FP et al. Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Experimental Parasitology**, v. 136, p. 27-34, 2014.

DE MELLO, Tatiane FP et al. Ultrastructural and morphological changes in *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* treated with synthetic chalcones. **Experimental parasitology**, v. 160, p. 23-30, 2016.

DE MELLO, Marcos Vinícius Palmeira et al. A comprehensive review of chalcone derivatives as antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 150, p. 920-929, 2018.

DE MOURA ESCOBAR, Stephane Janaina et al. Cytotoxic effects of 4'-hydroxychalcone on human neuroblastoma cells (SH-SY5Y). **Toxicology In Vitro**, v. 61, p. 104640, 2019.

DEVI, Kavita et al. Synthesis and Evaluation of Antiplasmodial Activity of 2, 2, 2-Trifluoroethoxychalcones and 2-Fluoroethoxy Chalcones against *Plasmodium falciparum* in Culture. **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 1174, 2018.

DNDI. **Drugs for Neglected Diseases initiative**. Disponível em: <https://dndi.org/diseases/chagas/facts/?gclid=Cj0KCQjw8eOLBhC1ARIsAOzx5cHnGf8ACy2v40oGaaWo6XAJLEb-K25zSElnDizV2Pg_-9MdiA7AbzUaAnC7EALw_wcB>.

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

ESCRIVANI, Douglas O. et al. Chalcones identify cTXNPx as a potential antileishmanial drug target. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 15, n. 11, p. e0009951, 2021.

EPTING, Conrad L.; COATES, Bria M.; ENGMAN, David M. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Experimental parasitology**, v. 126, n. 3, p. 283-291, 2010.

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, Roberto Rodrigues et al. The Search for Biomarkers and Treatments in Chagas Disease: Insights From TGF-Beta Studies and Immunogenetics. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, p. 1310, 2022.

FU, Yun et al. New chalcone derivatives: Synthesis, antiviral activity and mechanism of action. **RSC Advances**, v. 10, n. 41, p. 24483-24490, 2020.

FU, Dong-Jun et al., Discovery of novel chalcone-dithiocarbamates as ROS-mediated apoptosis inducers by inhibiting catalase. **Bioorganic chemistry**, v. 86, p. 375-385, 2019.

FLORES-FERRER, Alheli et al. Evolutionary ecology of Chagas disease; what do we know and what do we need?. **Evolutionary Applications**, v. 11, n. 4, p. 470-487, 2018.

FRISCH, M. J. et al. Gaussian 16, Revision C. 01. Gaussian, Inc., Wallingford CT. 2016. **Google Scholar There is no corresponding record for this reference**, 2020.

GARCÍA-HUERTAS, Paola; CARDONA-CASTRO, Nora. Advances in the treatment of Chagas disease: Promising new drugs, plants and targets. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 142, p. 112020, 2021.

GOES, Grazielle R. et al. Trypanosoma cruzi needs a signal provided by reactive oxygen species to infect macrophages. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004555, 2016.

GONZÁLEZ, Luis A. et al. Effect of substituents in the A and B rings of chalcones on antiparasite activity. **Archiv der Pharmazie**, v. 353, n. 12, p. 2000157, 2020.

GUZY, J. et al. Activation of oxidative stress response by hydroxyl substituted chalcones and cyclic chalcone analogues in mitochondria. **FEBS letters**, v. 584, n. 3, p. 567-570, 2010.

GUPTA, Shweta et al. Synthesis and biological evaluation of chalcones as potential antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 81, p. 359-366, 2014.

HARVEY, Alan L. Natural products in drug discovery. *Drug discovery today*, v. 13, n. 19-20, p. 894-901, 2008.

HANWELL, Marcus D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 1-17, 2012.

HEHRE, Warren J.; LATHAN, William A. Self-Consistent Molecular Orbital Methods. XIV. An Extended Gaussian-Type Basis for Molecular Orbital Studies of Organic Molecules. Inclusion of Second Row Elements. **The Journal of Chemical Physics**, v. 56, n. 11, p. 5255-5257, 1972.

HERRERA-MAYORGA, Verónica et al. Structure-based virtual screening and in vitro evaluation of new trypanosoma cruzi cruzain inhibitors. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 7, p. 1742, 2019.

HUEY, Ruth; MORRIS, Garrett M.; FORLI, Stefano. Using AutoDock 4 and AutoDock vina with AutoDockTools: a tutorial. **The Scripps Research Institute Molecular Graphics Laboratory**, v. 10550, p. 92037, 2012.

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

INACIO, Job DF et al. Epigallocatechin-O-3-Gallate Inhibits Trypanothione Reductase of Leishmania infantum, Causing Alterations in Redox Balance and Leading to Parasite Death. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 241, 2021.

JACKSON, Yves; WYSSA, Baptiste; CHAPPUIS, François. Tolerance to nifurtimox and benznidazole in adult patients with chronic Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 3, p. 690-696, 2020.

JACKSON, Yves; PINTO, Angie; PETT, Sarah. Chagas disease in Australia and New Zealand: risks and needs for public health interventions. **Tropical Medicine & International Health**, v. 19, n. 2, p. 212-218, 2014.

JENWITHEESUK, Ekachai et al. Novel paradigms for drug discovery: computational multitarget screening. **Trends in pharmacological sciences**, v. 29, n. 2, p. 62-71, 2008.

KADELA-TOMANEK, Monika et al. Lipophilicity, pharmacokinetic properties, and molecular docking study on SARS-CoV-2 target for betulin triazole derivatives with attached 1,4-quinone. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 6, p. 781, 2021.

KESSLER, Rafael Luis et al. Trypanosoma cruzi response to sterol biosynthesis inhibitors: morphophysiological alterations leading to cell death. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e55497, 2013.

KIM, Hyunjin et al. A Quenched Annexin V-Fluorophore for the Real-Time Fluorescence Imaging of Apoptotic Processes In Vitro and In Vivo. **Advanced Science**, v. 7, n. 24, p. 2002988, 2020.

KHUSNUTDINOVA, Elmira et al. Novel a-ring chalcone derivatives of oleanolic and ursolic amides with anti-proliferative effect mediated through ROS-triggered apoptosis. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 18, p. 9796, 2021.

KWAK, Jieun et al. The chalcone derivative Chana 1 protects against amyloid β peptide-induced oxidative stress and cognitive impairment. **International journal of molecular medicine**, v. 30, n. 1, p. 193-198, 2012.

LADAME, Sylvain et al. Crystal structure of Trypanosoma cruzi glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with an analogue of 1, 3-bisphospho-d-glyceric acid: Selective inhibition by structure-based design. **European journal of biochemistry**, v. 270, n. 22, p. 4574-4586, 2003.

LATIF, Ahmed Dhahir et al. Protoflavone-chalcone hybrids exhibit enhanced antitumor action through modulating redox balance, depolarizing the mitochondrial membrane, and inhibiting ATR-dependent signaling. **Antioxidants**, v. 9, n. 6, p. 519, 2020.

LEE, Bruce Y. et al. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **The Lancet infectious diseases**, v. 13, n. 4, p. 342-348, 2013.

LEE, Chengteh; YANG, Weitao; PARR, Robert G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Physical review B**, v. 37, n. 2, p. 785, 1988.

LI, Yuanyuan et al. Synthesis and antibacterial activity of four natural chalcones and their derivatives. **Tetrahedron Letters**, v. 60, n. 43, p. 151165, 2019.

LIMA, Danya Bandeira et al. Antiparasitic effect of Dinoponera quadriceps giant ant venom. **Toxicon**, v. 120, p. 128-132, 2016.

LONGLEY, Daniel B.; HARKIN, D. Paul; JOHNSTON, Patrick G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature reviews cancer**, v. 3, n. 5, p. 330-338, 2003.

LOSINNO, Antonella Denise et al. Induction of autophagy increases the proteolytic activity of reservosomes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Autophagy**, v. 17, n. 2, p. 439-456, 2021.

LOPES, Camila Madeira Tavares et al. *Trypanosoma janseni* n. sp.(Trypanosomatida: Trypanosomatidae) isolated from *Didelphis aurita* (Mammalia: Didelphidae) in the Atlantic Rainforest of Rio de Janeiro, Brazil: integrative taxonomy and phylogeography within the *Trypanosoma cruzi* clade. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, p. 45-55, 2018.

LÓPEZ-VÉLEZ, Rogelio; NORMAN, Francesca F.; BERN, Caryn. American trypanosomiasis (Chagas disease). In: **Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases**. Elsevier, 2020. p. 762-775..

MAGALHÃES, Emanuel Paula et al. Chloride substitution on 2-hydroxy-3, 4, 6-trimethoxyphenylchalcones improves in vitro selectivity on *Trypanosoma cruzi* strain Y. **Chemico-Biological Interactions**, v. 361, p. 109920, 2022.

MARCONDES, Natália Aydos et al. Comparison of JC-1 and MitoTracker probes for mitochondrial viability assessment in stored canine platelet concentrates: A flow cytometry study. **Cytometry Part A**, v. 95, n. 2, p. 214-218, 2019.

MARÍN, Clotilde et al. In vitro leishmanicidal activity of 1, 3-disubstituted 5-nitroindazoles. **Acta tropica**, v. 148, p. 170-178, 2015.

MARTINS-MELO, Francisco Rogerlândio; CASTRO, Marcia C.; WERNECK, Guilherme Loureiro. Levels and trends in Chagas disease-related mortality in Brazil, 2000–2019. **Acta Tropica**, v. 220, p. 105948, 2021.

MARINHO, Emanuelle Machado et al. Virtual screening based on molecular docking of possible inhibitors of Covid-19 main protease. **Microbial Pathogenesis**, v. 148, p. 104365, 2020.

MATHEW, Elizabeth et al. Third-order nonlinear optical studies of two novel chalcone derivatives using Z-scan technique and DFT method. **Optics & Laser Technology**, v. 120, p. 105697, 2019.

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

MENDES, Edinéia Pastro 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. 643, 2019.

MENEZES, Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de. Efeito tripanocida do (-)-alfa-bisabolol sobre a cepa y de *Trypanosoma cruzi*. 2017.

MENDONÇA, Andréa Aparecida Santos et al. Relevance of trypanothione reductase inhibitors on *Trypanosoma cruzi* infection: A systematic review, meta-analysis, and in silico integrated approach. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, 2018.

MIRANDA-ARBOLEDA, Andrés F. et al. Roadblocks in Chagas disease care in endemic and nonendemic countries: Argentina, Colombia, Spain, and the United States. The NET-Heart project. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 12, p. e0009954, 2021.

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

MONTEIRO, Marília Lopes et al. Antichagasic effect of hemocyanin derived from antimicrobial peptides of *Penaeus monodon* shrimp. **Experimental Parasitology**, v. 215, p. 107930, 2020.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MÜLLER KRATZ, Jadel et al. Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 10, p. 943-957, 2018.

MCKINNON, Katherine M. Flow cytometry: an overview. **Current protocols in immunology**, v. 120, n. 1, p. 5.1. 1-5.1. 11, 2018.

NEVILLE, S.; LEZANNE, OOI. A simple microplate assay for reactive oxygen species generation and rapid cellular protein normalization. **Bio-protocol**, v. 11, n. 1, 2021.

NGUYEN, Duc D. et al. Rigidity strengthening: A mechanism for protein–ligand binding. **Journal of chemical information and modeling**, v. 57, n. 7, p. 1715-1721, 2017.

OLAIA, Nicoly et al. Biology of Chagas disease vectors: biological cycle and emergence rates of *Rhodnius marabaensis* Souza et al., 2016 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) under laboratory conditions. *Parasitology Research*, v. 120, n. 8, p. 2939-2945, 2021.

OLMO, Francisco et al. Synthesis and evaluation of in vitro and in vivo trypanocidal properties of a new imidazole-containing nitrophthalazine derivative. **European journal of medicinal chemistry**, v. 106, p. 106-119, 2015.

ORTALLI, Margherita et al. Identification of chalcone-based antileishmanial agents targeting trypanothione reductase. **European journal of medicinal chemistry**, v. 152, p. 527-541, 2018.

OTERO, Elver et al. Synthesis, leishmanicidal and cytotoxic activity of triclosan-chalcone, triclosan-chromone and triclosan-coumarin hybrids. *Molecules*, v. 19, n. 9, p. 13251-13266, 2014.

PAIVA, Claudia N.; MEDEI, Emiliano; BOZZA, Marcelo T. ROS and Trypanosoma cruzi: Fuel to infection, poison to the heart. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 4, p. e1006928, 2018.

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

PAVÃO, F. et al. Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Å resolution. **FEBS letters**, v. 520, n. 1-3, p. 13-17, 2002.

PANDEY, Ashutosh Kumar et al. 4, 5-Dihydrooxazole-pyrazoline hybrids: Synthesis and their evaluation as potential antimalarial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 123, p. 476-486, 2016.

PEREIRA, Patricia ML et al. In vitro evaluation of antitrypanosomal activity and molecular docking of benzoylthioureas. **Parasitology International**, v. 80, p. 102225, 2021.

PERELMAN, A. et al. JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. **Cell death & disease**, v. 3, n. 11, p. e430-e430, 2012.

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

PITA, Samuel SR; PASCUTTI, Pedro G. Alvos terapêuticos na doença de Chagas: a tripanotona redutase como foco. *Revista Virtual de Química*, v. 3, n. 4, p. 307-324, 2011.

RAJNEESH, Jainendra Pathak 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, 2017.

REYES-ESPINOSA, Francisco et al. Structure-Based Virtual Screening and In Vitro Evaluation of New *Trypanosoma cruzi* Cruzain Inhibitors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, 2019.

REYES-ESPINOSA, Francisco et al. In silico analysis of homologous heterodimers of cruzipain-chagasin from structural models built by homology. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 6, p. 1320, 2019.

RODRIGUEZ, S. V. et al. Synthesis and trypanocidal properties of new coumarin-chalcone derivatives. **Med. Chem**, v. 5, p. 173-177, 2015.

ROJAS, Lyda Z. et al. Electrocardiographic abnormalities in Chagas disease in the general population: A systematic review and meta-analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 6, p. e0006567, 2018.

ROUSSAKI, Marina et al. Synthesis and anti-parasitic activity of a novel quinolinone–chalcone series. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 23, n. 23, p. 6436-6441, 2013.

SAFWAT, Ghada M. et al. Synthesis, Anticancer Assessment, and Molecular Docking of Novel Chalcone-Thienopyrimidine Derivatives in HepG2 and MCF-7 Cell Lines. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2021, 2021.

SANTOS, Emily F. et al. Acute Chagas disease in Brazil from 2001 to 2018: A nationwide spatiotemporal analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 8, p. e0008445, 2020.

SARAVANAMUTHU, Ahilan et al. Two interacting binding sites for quinacrine derivatives in the active site of trypanothione reductase: a template for drug design. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 28, p. 29493-29500, 2004.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Abril, 2020. Boletim Epidemiológico – Doença de Chagas. Disponível em: <<https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/April/23/boletim-especial-chagas-20abr20.pdf>>

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

SIMÕES, Marcus Vinicius et al. Chagas disease cardiomyopathy. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 31, p. 173-189, 2018.

SINGH, Parvesh; ANAND, Amit; KUMAR, Vipran. Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. *European journal of medicinal chemistry*, v. 85, p. 758-777, 2014.

SIROVER, Michael A. On the functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: biochemical mechanisms and regulatory control. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, v. 1810, n. 8, p. 741-751, 2011.

SÜLSEN, Valeria P. et al. Mode of action of the sesquiterpene lactones psilostachyin and psilostachyin C on *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0150526, 2016.

SCHRÖDINGER, L. L. C. PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.3 Schrödinger, LLC). **line**, v. 62, p. 5, 2015.

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

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

STAURENGO-FERRARI, Larissa et al. Trans-chalcone attenuates pain and inflammation in experimental acute gout arthritis in mice. **Frontiers in pharmacology**, p. 1123, 2018.

TANG, Xu et al. Novel chalcone derivatives containing a 1, 2, 4-triazine moiety: Design, synthesis, antibacterial and antiviral activities. **RSC advances**, v. 9, n. 11, p. 6011-6020, 2019.

TAKAC, Peter et al. Antiproliferative effect of acridine chalcone is mediated by induction of oxidative stress. **Biomolecules**, v. 10, n. 2, p. 345, 2020.

TAKAC, Peter et al. New chalcone derivative exhibits antiproliferative potential by inducing G2/M cell cycle arrest, mitochondrial-mediated apoptosis and modulation of MAPK signalling pathway. **Chemico-biological interactions**, v. 292, p. 37-49, 2018.

THOMFORD, Nicholas Ekow et al. Natural products for drug discovery in the 21st century: innovations for novel drug discovery. *International journal of molecular sciences*, v. 19, n. 6, p. 1578, 2018.

TROTT, O.; OLSON, A. J. Software news and update AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function. **Efficient Optimization, and Multithreading**, 2009.

VAZQUEZ-RODRIGUEZ, Saleta et al. Facing Chagas' Disease: Trypanocidal Properties of New Coumarin-chalcone Scaffolds. **Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 6, p. 537-543, 2016.

VERMEERSCH, Marieke et al. In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 53, n. 9, p. 3855-3859, 2009.

WANG, Fu-Cheng et al. Synthesis and cytotoxic activity of chalcone analogues containing a thieno [2, 3-d] pyrimidin-2-yl group as the A-ring or B-ring. **Bioorganic Chemistry**, v. 94, p. 103346, 2020.

WANG, L.-H. et al. SL4, a chalcone-based compound, induces apoptosis in human cancer cells by activation of the ROS/MAPK signalling pathway. *Cell Proliferation*, v. 48, n. 6, p. 718-728, 2015.

WLODKOWIC, Donald; SKOMMER, Joanna; DARZYNKIEWICZ, Z. Cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances. **Experimental oncology**, v. 34, n. 3, p. 255, 2012.

YAN, Jiakai et al. α -Glucosidase inhibition by luteolin: Kinetics, interaction and molecular docking. **International journal of biological macromolecules**, v. 64, p. 213-223, 2014.

YUSUF, Dilmurat et al. An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. **Journal of chemical information and modeling**, v. 48, n. 7, p. 1411-1422, 2008.

ZAIDEL, Ezequiel José et al. COVID-19: implications for people with Chagas disease. **Global heart**, v. 15, n. 1, 2020.

ZHANG, Saiyang et al. A novel chalcone derivative S17 induces apoptosis through ROS dependent DR5 up-regulation in gastric cancer cells. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

ZHANG, Xu et al. Multi-targetable chalcone analogs to treat deadly Alzheimer's disease: Current view and upcoming advice. **Bioorganic Chemistry**, v. 80, p. 86-93, 2018.

ZEMBRUSKI, Nadine CL et al. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. **Analytical biochemistry**, v. 429, n. 1, p. 79-81, 2012.

ZHEOAT, Ahmed M. et al. Antitrypanosomal and antileishmanial activity of chalcones and flavanones from *Polygonum salicifolium*. **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 175, 2021.

ZINGALES, Bianca et al. Biological parameters and molecular markers of clone CL Brener-the reference organism of the *Trypanosoma cruzi* genome project. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 6, p. 811-814, 1997.

ZHU, Hongtian et al. Synthesis of chalcone derivatives: inducing apoptosis of HepG2 cells via regulating reactive oxygen species and mitochondrial pathway. **Frontiers in pharmacology**, p. 1341, 2019.

ZULU, Ayanda I. et al. Synthesis, structure and in vitro anti-trypanosomal activity of non-toxic arylpyrrole-based chalcone derivatives. **Molecules**, v. 25, n. 7, p. 1668, 2020.

ZHUANG, Chunlin et al. Chalcone: a privileged structure in medicinal chemistry. **Chemical reviews**, v. 117, n. 12, p. 7762-7810, 2017.