



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



**EFEITO DE DERIVADOS SINTÉTICOS DE CHALCONAS SOBRE FORMAS
EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi* Dm28c**

LISLAINY DA SILVA SANTOS

CAMPO GRANDE - MS

2025

LISLAINY DA SILVA SANTOS

**EFEITO DE DERIVADOS SINTÉTICOS DE CHALCONAS SOBRE FORMAS
EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi* Dm28c**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para graduação no curso de Ciência Biológicas Bacharelado, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS.

Orientadora: Profa. Dra. Alda Maria Teixeira Ferreira.

CAMPO GRANDE - MS

2025

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho de conclusão de curso foi possível graças ao apoio de diversas pessoas, às quais agradeço e dedico este trabalho.

À minha orientadora Profa. Dra. Alda Maria Teixeira Ferreira, por sempre me orientar, ensinar e me cuidar com tanto carinho, dedicação e atenção. Agradeço pelo apoio e confiança no meu trabalho, por acreditar no meu potencial e me ensinar ser uma aluna, pesquisadora e pessoa melhor.

Ao meu coorientador, amigo, dupla de laboratório e minha inspiração como cientista, Carlos Miguel de Freitas Simões. Agradeço pela sua orientação, didática, paciência, confiança e acima de tudo, sua amizade. Seu apoio foi essencial para a conclusão deste sonho e para minha formação.

Ao meu noivo, melhor amigo e colega de profissão, Luiz Felipe de Almeida Eckert. Sou extremamente grata por compartilhar a vida pessoal e profissional contigo, agradeço por sempre acreditar no meu potencial e apoiar todos meus objetivos.

Ao LabImunoBio e ao GTcruzi, pela recepção, acolhimento e por proporcionarem os recursos para realização deste trabalho. Em especial as professoras Inês Aparecida Tozetti e Cacilda Tezelli Junqueira Padovani, pelo carinho e oportunidades de aprendizado. E à técnica Carla Braga Leite, pela amizade, atenção e parceria.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), pelo fomento, infraestrutura e recepção.

À minha família, por todo apoio, incentivo a educação e dedicação em proporcionar o melhor durante minha trajetória.

Agradeço a todos os professores, servidores, colegas, amigos e pessoas que me ajudaram, apoiaram e contribuíram de algum modo durante esses anos de graduação. Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas (DC), enfermidade que afeta entre 6 a 7 milhões de pessoas no mundo. Apesar da gravidade da doença, no Brasil o benznidazol é o fármaco de referência para o tratamento, embora o medicamento apresente baixa eficácia na fase crônica da doença e efeitos colaterais indesejáveis. Dessa forma, há a necessidade em buscar novos tratamentos para a DC. Um grupo bioativo com grande potencial terapêutico tem sido alvo de interesse nos últimos anos devido à sua propriedade multialvos, e sua atividade antiparasitária: as chalconas, subgrupo pertencentes aos flavonoides. Sendo assim, derivados sintéticos de chalconas são compostos de interesse para atuarem de forma eficiente contra *T. cruzi*. Visando tal objetivo, este trabalho investigou o efeito de derivados sintéticos de chalconas sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*, determinando a concentração inibitória 50% (CI₅₀) e avaliando a morfologia dos parasitos tratados com CI₅₀. Trata-se de um estudo experimental, com ensaios *in vitro*, utilizando uma população de *T. cruzi* cepa Dm28c. Para os testes, foi utilizada a forma epimastigota do parasito, a qual foi submetida aos tratamentos com diferentes concentrações dos derivados sintéticos de chalconas por 72h para determinação da CI₅₀/72h. Para avaliação morfológica, os parasitos foram tratados com CI₅₀/72h de cada composto e posteriormente confeccionadas lâminas de microscopia e corados pelo método Panótico. Os experimentos foram realizados em triplicatas; para as análises foi utilizado o *software* Microsoft Excel 2020 e para a determinação das CI₅₀ utilizou-se o *software* GraphPad Prism 7,04. Dentre os achados deste trabalho, cinco dos seis derivados sintéticos de chalconas apresentaram atividade anti-*T. cruzi*, os quais foram capazes de afetar a morfologia dos parasitos, alterando o tamanho celular, visibilidade do flagelo e ocorrência de debris celulares. Contudo, sugere-se outros testes *in vitro* para elucidação dos mecanismos de ação dos compostos. Concluiu-se que os derivados sintéticos de chalconas foram ativos contra as formas epimastigotas de *T. cruzi* cepa Dm28c e apresentam-se como potenciais compostos terapêuticos para a DC.

Palavras-chave: Antiparasitário, doença de Chagas, flavonoides.

ABSTRACT

The protozoan *Trypanosoma cruzi* is the cause of Chagas disease (CD), a disease that affects between 6 to 7 million people in the world. Despite the severity of the disease, in Brazil, benznidazole is the reference drug for treatment, although it has low efficacy in the chronic phase of disease and causes undesirable side effects. Thus, there is a need to research new treatments for CD. A bioactive group with great therapeutic potential has drawn attention in recent years due to its multi-target property and antiparasitic activity: chalcones, a flavonoid subgroup. Synthetic chalcone derivatives are compounds of interest for their probable activity against *T. cruzi*. With this objective, this study investigated the effect of synthetic chalcone derivatives on epimastigote forms of *T. cruzi*, determining the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) and evaluating the morphology of the parasites treated with IC₅₀. This is an experimental study with *in vitro* assays using a population of *T. cruzi* strain Dm28c. For the tests, the epimastigote form of the parasite was used and subjected to treatments with different concentrations of synthetic chalcone derivatives for 72 hours to determine the IC_{50/72h}. For morphological evaluation, the parasites were treated with the IC_{50/72h} of each compound, followed by the preparation of microscopy slides and coloring using the Panoptic method. The experiments were performed in triplicate; for the analyses, Microsoft Excel 2020 was used, and for the determination of IC₅₀ values, it was utilized the GraphPad Prism 7.04. Among the findings of this study, five of the six synthetic chalcone derivatives showed anti-*T. cruzi* activity, as they were able to affect the parasite morphology by altering cell size, flagellum visibility, and the occurrence of cellular debris. However, other *in vitro* tests are suggested to allude to the mechanisms of action of the compounds. It was concluded that the synthetic chalcone derivatives were active against the epimastigote forms of *T. cruzi* strain Dm28c and present themselves as potential therapeutic compounds for CD.

Key words: Antiparasitic, Chagas disease, flavonoids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
Figura 02 - Ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
Figura 03 - Fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas.....	14
Figura 04 - Atividades biológicas dos flavonoides.....	15
Figura 05 - Estrutura básica C6-C3-C6 dos flavonoides.....	16
Figura 06 - Estrutura básica das chalconas.....	17
Figura 07 - Derivados sintéticos de chalconas.....	19
Figura 08 - Derivados sintéticos de chalconas selecionados para teste sobre formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
Figura 09 - Concentrações testadas no ensaio de viabilidade com MTS.....	24
Figura 10 - Morfologia de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> corados pelo método Panótico.....	28
Figura 11 - Efeito dos derivados sintéticos de chalconas sobre a morfologia de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - CI_{50} de derivados sintéticos de chalconas contra formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> durante 72h.....	25
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BNZ	Benznidazol
CI₅₀	Concentração inibitória média (concentração necessária para inibir/matar 50% dos parasitos)
CPs	Cisteína proteases
DC	Doença de Chagas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
ECG	Eletrocardiograma
<i>L. amazonensis</i>	<i>Leishmania amazonensis</i>
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i> (Infuso de Fígado e Tryptose)
MTS	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfopenil)-2H-tetrazólio)
NFX	Nifurtimox
NO	Óxido nítrico
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão fosfato-salino)
PMS	<i>Phenazine methosulfate</i> (Metossulfato de fenazina)
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SBF	Soro fetal bovino
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TR	Tripanotiona redutase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
1.2 Doença de Chagas.....	12
1.3 Tratamento.....	13
1.4 Flavonoides.....	15
1.5 Chalconas.....	17
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo Geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3 METODOLOGIA.....	21
3.1 Tipo de Estudo.....	21
3.2 Cultura de <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
3.3 Derivados sintéticos de chalconas.....	21
3.4 Ensaio de viabilidade com MTS.....	22
3.5 Avaliação da morfologia das formas epimastigotas tratadas com derivados sintéticos de chalconas.....	23
3.6 Análise estatística.....	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1 Ensaio de viabilidade de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> pelo método de MTS.....	25
4.2 Avaliação da morfologia das formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratadas com derivados sintéticos de chalconas.....	26
5 CONCLUSÃO.....	31
6 REFERÊNCIAS.....	32

1 INTRODUÇÃO

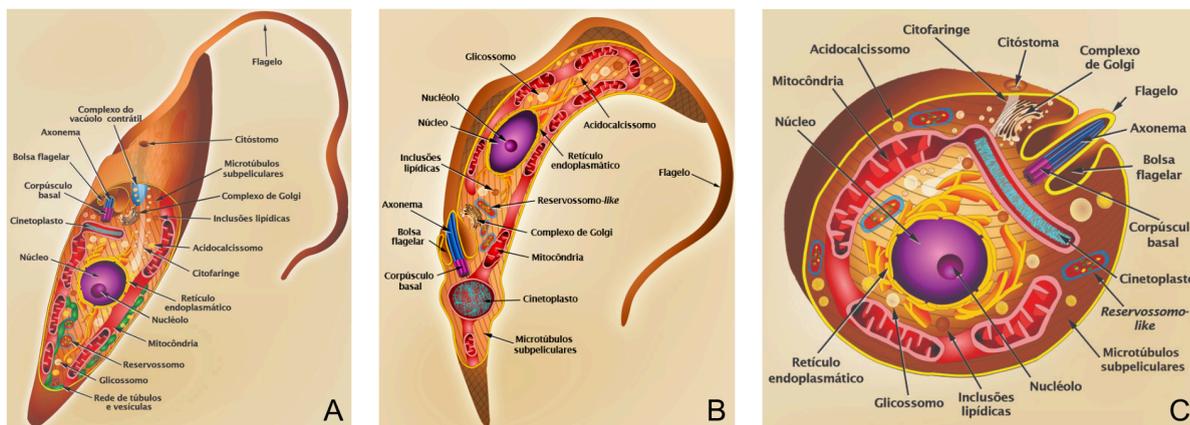
1.1 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi, agente etiológico da doença de Chagas (DC), é um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, caracterizado pela existência de um único flagelo e do cinetoplasto, estrutura que está localizada em uma região específica da única mitocôndria que concentra o DNA dessa organela, denominado kDNA (PORTAL DA DOENÇA DE CHAGAS, 2017; REY, 2008; WENDEL et al., 1992).

O protozoário apresenta três principais formas evolutivas que são morfologicamente distintas (Figura 01), sendo elas: epimastigota, tripomastigota e amastigota, as quais diferem pela posição do cinetoplasto em relação ao núcleo da célula e a emergência do flagelo (ZUMA; DOS SANTOS BARRIAS; DE SOUZA, 2021).

A forma epimastigota é alongada, com cinetoplasto anterior ao núcleo em forma de bastão, flagelo emerge da lateral e torna-se livre na região anterior, mede cerca de 20µm de comprimento, é encontrada apenas no trato digestivo do vetor e possui potencial replicativo e não infectante aos humanos (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010; ELIAS et al., 2001; KEMMERLING; BOSCO; GALANTI, 2010). A forma tripomastigota é alongada, com cinetoplasto posterior ao núcleo em forma arredondada, flagelo emerge da região posterior e se estende ao longo da célula, torna-se livre na região anterior formando a membrana ondulante, mede cerca de 20µm de comprimento, é a forma infectante e não replicativa do parasito, sendo tripomastigota sanguíneo encontrado no sangue de mamíferos (hospedeiro vertebrado), e tripomastigota metacíclico encontrado no intestino dos triatomíneos (hospedeiro invertebrado) (KEMMERLING; BOSCO; GALANTI, 2010; PORTAL DA DOENÇA DE CHAGAS, 2017; TEIXEIRA et al., 2011). A forma amastigota é arredondada, com cinetoplasto anterior ao núcleo em forma de bastão, sem flagelo emergente, mede cerca de 2µm de comprimento e é encontrada apenas no interior das células dos hospedeiros vertebrados, com potencial replicativo (GONÇALVES et al., 2018; TEIXEIRA et al., 2011).

Figura 01 - Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*.



Legenda: (A) Forma epimastigota; (B) Forma tripomastigota; (C) Forma amastigota.

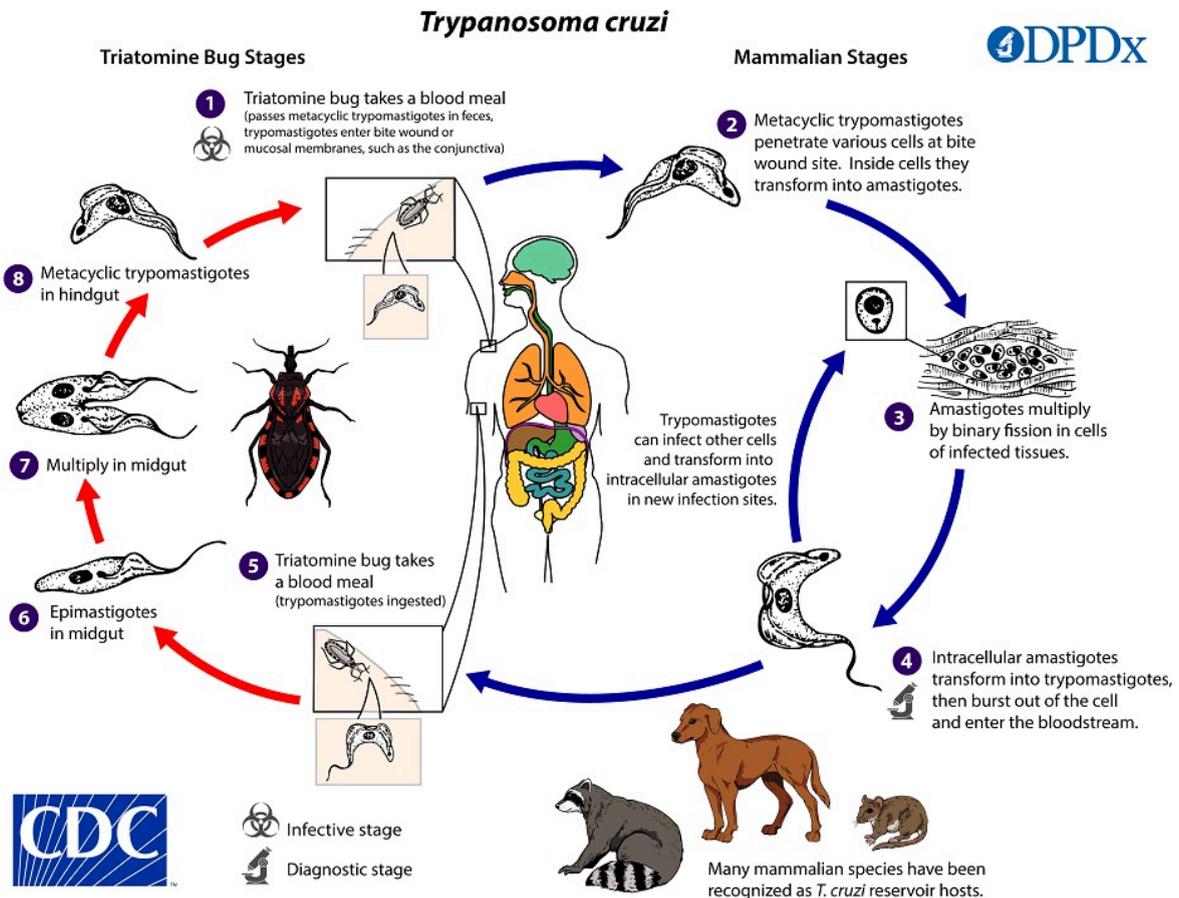
Fonte: Adaptado e traduzido de Teixeira et al., 2012.

O ciclo evolutivo de *T. cruzi* é complexo, sendo um ciclo heteroxênico (Figura 02), logo, possui dois hospedeiros (GARCIA; GONZALEZ; AZAMBUJA, 1999). Hospedeiros vertebrados, que são animais selvagens, animais domésticos e os humanos; e hospedeiros invertebrados, insetos vetores - triatomíneos (hemípteros hematófagos) principalmente da família Reduviidae (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010; REY, 2008; ZUMA; DOS SANTOS BARRIAS; DE SOUZA, 2021).

Na via clássica de transmissão, a vetorial, o parasito na forma epimastigota replica-se e diferencia-se no intestino posterior dos triatomíneos em tripomastigota metacíclico com alto potencial infeccioso, processo importante de metaciclogênese (ONYEKWELU, 2019; PINTO et al., 1999). Os tripomastigotas metacíclicos são liberados nos dejetos durante o repasto sanguíneo do inseto, infectando o hospedeiro vertebrado via local da picada ou através das membranas mucosas ou por meio de regiões com lesões pré existentes (NORRIS, 1998; SALASSA; ROMANO, 2019).

Esta forma do parasito infecta diversos tipos celulares, iniciando o processo pelas células do sistema fagocítico mononuclear (macrófagos e células dendríticas), rapidamente infectam células diferenciando-se em formas amastigotas, onde se multiplicam. Quando há uma grande quantidade de amastigotas ocorre outra diferenciação para formas tripomastigotas sanguíneas, cujo intenso movimento do seu flagelo e a secreção de enzimas que atuam na membrana plasmática das células hospedeiras, levam ao rompimento destas células infectadas (MARTÍN-ESCOLANO et al., 2022; TEIXEIRA et al., 2012). Quando um triatomíneo não infectado faz o repasto sanguíneo em animal vertebrado que encontra-se infectado, o vetor ingere o sangue com tripomastigotas que passarão a ser epimastigotas em seu intestino anterior, replicando-se e reiniciando o ciclo evolutivo do parasito (ONYEKWELU, 2019).

Figura 02 - Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2021.

A sobrevivência de *T. cruzi* está relacionada a sua interação com o hospedeiro, o que diz respeito a sua capacidade de infectar quase todos os tipos de células de diferentes mamíferos, o que estabelece uma infecção duradoura e de difícil resposta imunológica (JANSEN; XAVIER; ROQUE, 2018). Como também, o parasito possui grande diversidade genética e biológica, apresentando populações variantes, que resultam em diferenças nos níveis de parasitemia, mortalidade, manifestações clínicas da DC, resistência ao tratamento e ao sistema imune (ZINGALES; BARTHOLOMEU, 2022).

1.2 Doença de Chagas

A DC ou Tripanossomíase Americana, pertencente ao grupo das Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) (WHO, 2024b), foi descoberta em 1909 pelo pesquisador brasileiro

Carlos Chagas e é causada pelo protozoário *T. cruzi* (CHAGAS, 1909). Essa enfermidade afeta cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo, principalmente na América Latina onde essa enfermidade é endêmica (WHO, 2024a). Mais de 12 mil pessoas vão a óbito por ano devido à doença (PAHO, 2022) e mais de 75 milhões de pessoas estão em áreas com risco de infecção (WHO, 2024a). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde (2022b) estima-se que 1,9 a 4,6 milhões de pessoas estejam doentes, com uma média de óbitos de 4 mil pessoas por ano no país.

O agente etiológico da DC pode ser transmitido por diversas vias, sendo a via clássica a transmissão vetorial, onde há contato direto com as fezes/urina de triatomíneos hematófagos infectados com o protozoário (WHO, 2024a), popularmente conhecidos como barbeiros. Há outros modos de transmissão de *T. cruzi*, como a transmissão por alimentos contaminados, que é a mais frequente em território nacional; há ainda a transmissão por transfusão de sangue, transplante de órgãos, acidentes laboratoriais e passagem da mãe infectada para o filho durante a gravidez (transmissão vertical) (DIAS et al., 2016).

A DC apresenta duas fases: a aguda e a crônica (COURA; CASTRO, 2002). A fase aguda em sua maioria é assintomática e passa despercebida pelo indivíduo; nos casos sintomáticos, as manifestações clínicas são caracterizadas por febre, dores musculares, mal-estar, edema, cefaléia, miocardite e distúrbios respiratórios (DIAS; COURA, 1997; TEIXEIRA et al., 2006). A resposta imune durante a fase aguda da DC é intensa e essencial para o controle e redução da parasitemia, se eficaz as consequências inflamatórias são reduzidas (COURA, 2007).

A maioria dos casos agudos evoluem para a fase crônica indeterminada, fase em que a infecção ainda existe, porém há a ausência de sintomas; exames como eletrocardiograma (ECG) e radiografia do coração apresentam-se normais. Contudo, há risco dessa infecção vir a manifestar o quadro clínico compatível com a fase crônica sintomática, seja sua forma cardíaca ou digestiva (megaesôfago e megacólon) ou a junção de ambas, caracterizando a forma mista da doença (COURA, 2007; DIAS et al., 2016; HASSLOCHER-MORENO et al., 2021). Na fase crônica, a manutenção inflamatória e a redução da parasitemia permanecem, contudo é na fase crônica que a DC pode desenvolver formas mais graves, levando a cardiopatias e alterações do sistema digestivo (ANDRADE, 1999; DUTRA et al., 2009; MACALUSO et al., 2023).

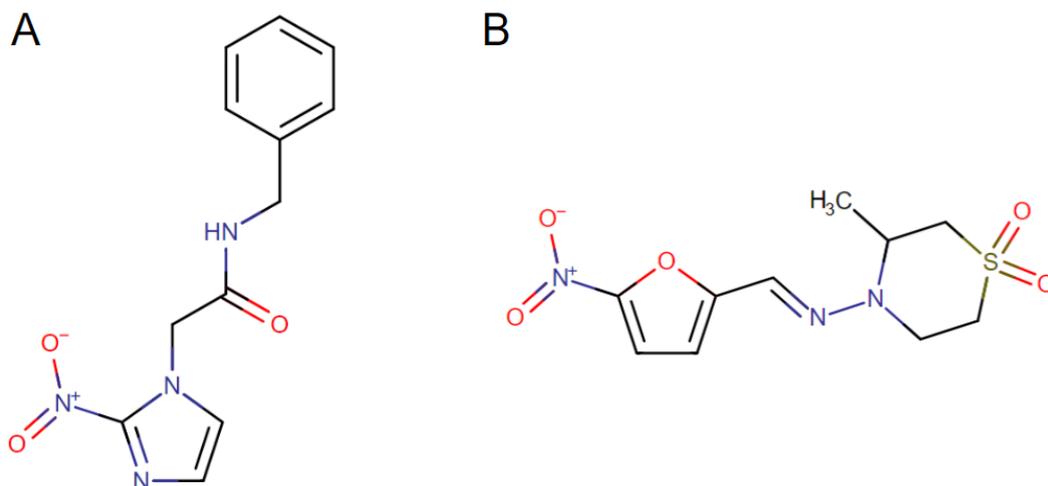
1.3 Tratamento

Desde 1970, dois fármacos são utilizados para o tratamento da DC (Figura 03), o nifurtimox (Lampit®) (NFX) e o benznidazol (Rochagam®) (BNZ). Ambos os medicamentos possuem alta eficácia na fase aguda da doença, mas baixa eficácia na fase crônica, além da

alta toxicidade e efeitos colaterais indesejáveis, e o período de tratamento ser em média de 60 dias, o que dificulta a continuidade do tratamento (GARCÍA-HUERTAS; CARDONA-CASTRO, 2021; MENDES et al., 2022; WHO, 2024a).

O BNZ causa danos ao DNA, RNA, proteínas e lipídios de *T. cruzi*, tornando-o suscetível ao dano oxidativo em todas as fases do ciclo de vida do parasito (DRUGBANK, 2022); já o NFX após ser metabolizado, gera radicais livres que bloqueiam a síntese do DNA e acelera a degradação do mesmo (DRUGBANK, 2023; MENDES et al., 2022). O resultado do tratamento varia de acordo com a fase da doença, tempo e dose do tratamento, a idade e a origem geográfica do indivíduo acometido (COURA; CASTRO, 2002). No Brasil, o medicamento de referência é o BNZ, enquanto o NFX é utilizado em casos de intolerância ou não resposta do organismo ao BNZ, sendo necessário a liberação pelo Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022a).

Figura 03 - Fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas.



Legenda: (A) Benznidazol; (B) Nifurtimox.

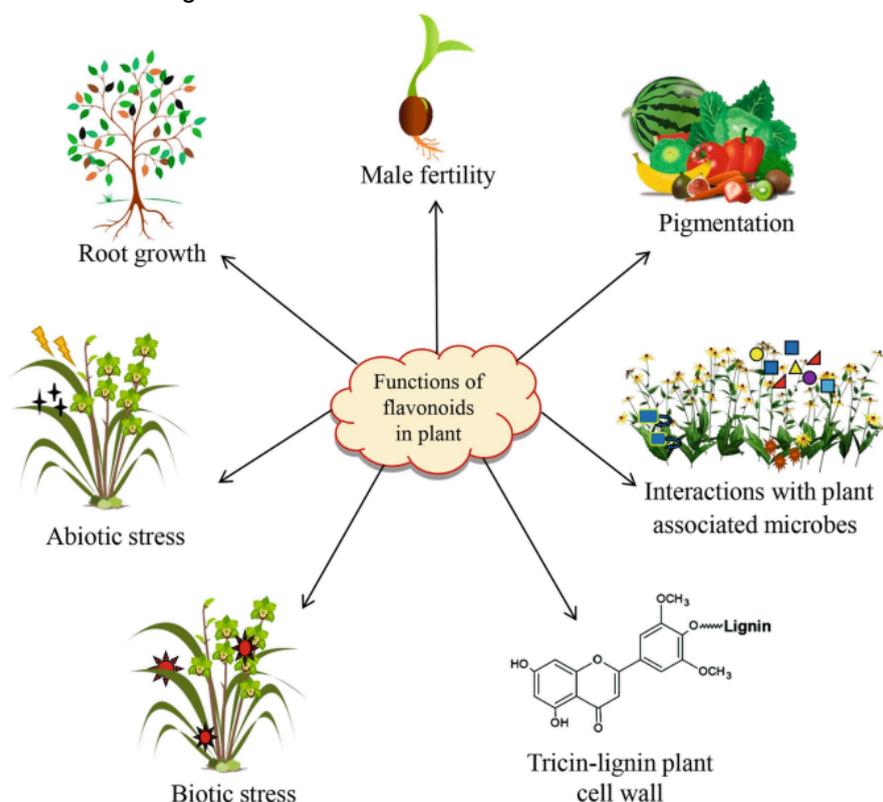
Fonte: DRUGBANK (2022, 2023).

O combate da DC é um grande desafio visto que é uma enfermidade com fases distintas, além de seu agente etiológico apresentar variações morfológicas relevantes, o que impacta diretamente em um diagnóstico rápido e preciso. Somada a essas informações, existe ainda a dificuldade do controle vetorial e do monitoramento com o intuito de reduzir os índices de transmissão da doença, e a falta de recursos terapêuticos eficazes na fase crônica da doença (DIAS et al., 2016; MASSAD, 2008; PEREIRA; NAVARRO, 2013).

1.4 Flavonoides

Os flavonoides são um importante grupo de metabólitos secundários de plantas, encontrados principalmente em frutos, caules, flores, sementes, ervas e vegetais (LIGA; PAUL; PÉTER, 2023). Desempenham uma ampla atividade biológica nas plantas, animais e bactérias, como proteção contra estresses abióticos e bióticos, regulação do transporte de hormônios de crescimento das plantas, coloração das flores, alelopatia, aroma e sabor dos frutos que conseqüentemente influenciam na polinização e dispersão de sementes (Figura 04) (CHEN et al., 2023; PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016).

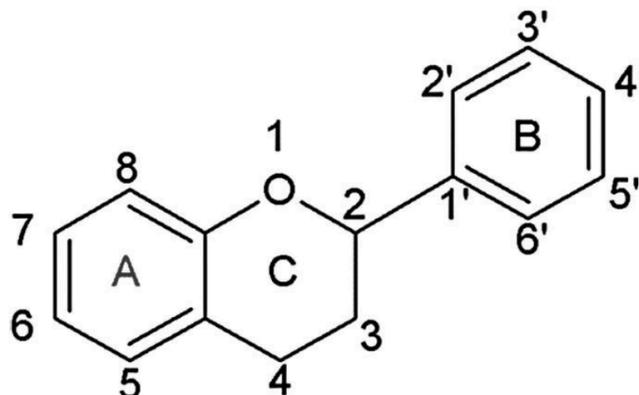
Figura 04 - Atividades biológicas dos flavonoides.



Fonte: DAS et al., 2024.

Estes metabólitos secundários pertencem ao grupo dos polifenóis, que são compostos orgânicos de baixo peso molecular. São sintetizados por diferentes vias, sendo elas a via fenilpropanoide, a via chiquimato e a via flavonoide (REHAN, 2021). Possuem uma estrutura básica com 15 átomos de carbono (Figura 05), dispostos em três anéis, C6-C3-C6, denominados A, B e C (CHEN et al., 2023). A e B são anéis de benzeno e C é um anel pirano heterocíclico de 3 átomos de carbono que contém um oxigênio, sendo o esqueleto básico benzo- γ -pirona (DIAS; PINTO; SILVA, 2021).

Figura 05 - Estrutura básica C6-C3-C6 dos flavonoides.



Fonte: Adaptado de Panche; Diwan; Chandra, 2016.

Os flavonoides podem ser subdivididos em diferentes grupos, de acordo com o carbono 2 do anel C que se liga ao anel B, grau de insaturação e oxidação do anel heterocíclico central, forma mais utilizada de classificação (LIGA; PAUL; PÉTER, 2023). Mas também podem ser classificados pelo tamanho molecular e pelo local de inserção de substituintes dos anéis A e B (DIAS; PINTO; SILVA, 2021). Estudos recentes dividem os flavonoides em sete subgrupos, sendo eles: flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, chalconas, flavanóis e antocianinas (CHEN et al., 2023; ZHUANG et al., 2023), os quais se diferem por modificações do esqueleto básico.

Dentre os compostos bioativos, os flavonoides se destacam por suas propriedades farmacológicas, principalmente a atividade antioxidante que está relacionada a posição e número de grupos hidroxila (-OH) do anel B, os quais podem doar elétrons de modo a estabilizar radicais livres, assim fornecendo proteção antioxidante através do estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio (ROS) (D'AMELIA et al., 2018; HAO et al., 2024; ŠAMEC et al., 2021). Possuem também atividade anti-inflamatória, anticancerígena, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitária, entre muitos outros (CHEN et al., 2023; HASNAT et al., 2024).

Apesar dos flavonoides serem amplamente distribuídos nas plantas e presentes em abundância nos alimentos, para o uso nos campos farmacêutico, médico, alimentar e cosmético necessita-se de grandes quantidades isoladas desses compostos para a bioeficácia na saúde humana (WANG et al., 2022). A extração direta das plantas não atende a esse requisito, pois há um baixo rendimento desses metabólitos secundários em relação a biomassa vegetal (SAJID et al., 2021).

Desse modo, a síntese química é a alternativa utilizada para atender às necessidades das indústrias e pesquisas, gerando flavonoides sintéticos (LIGA; PAUL;

PÉTER, 2023). Bem como é possível modificar as estruturas dos metabólitos, com métodos de introdução de elementos halogenados e grupos ativos ou a quelação de íons metálicos, gerando novos flavonoides (HAO et al., 2024; TARIQ et al., 2023). Contudo, a principal limitação em sintetizar quimicamente é caracterizar as propriedades químicas e físicas, como a estabilidade química, solubilidade, biodisponibilidade, pureza e farmacocinética (LIGA; PAUL; PÉTER, 2023; SAJID et al., 2021).

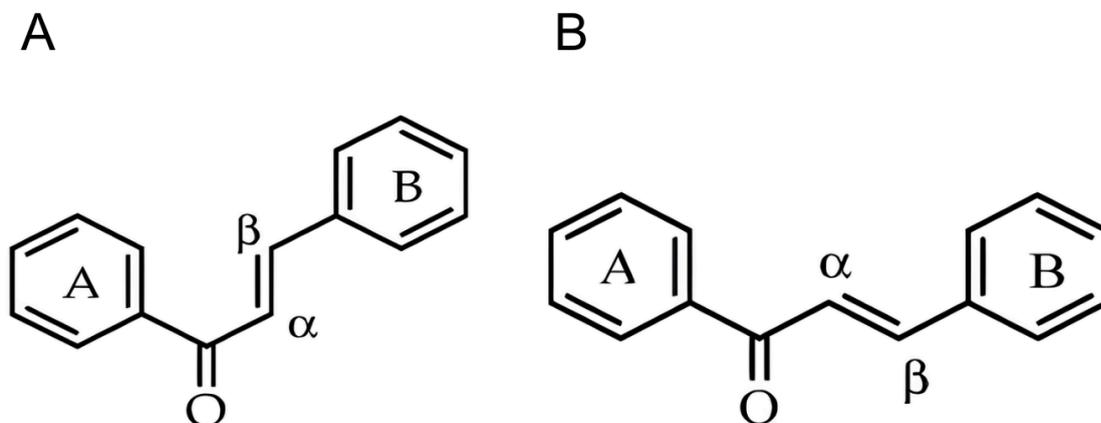
Devido às suas diversas propriedades farmacológicas para uso humano, mais de 10.000 flavonoides já foram isolados e identificados (CHEN et al., 2023) e têm atraído atenção significativa para estudos contra enfermidades. Considerando o desafio para o combate da DC, os flavonoides apresentam-se como produtos naturais bioativos com potencial ação anti-*T.cruzi*.

1.5 Chalconas

Chalconas são um subgrupo de flavonoides e um dos maiores grupos de produtos naturais bioativos (JASIM et al., 2021). Em sua forma natural, geralmente são sólidos cristalinos com diferentes cores (RAMMOHAN et al., 2020). As chalconas são consideradas precursoras biossintéticas dos subgrupos de flavonoides e isoflavonoides (CHEN et al., 2023).

As chalconas, 1,3-difenilprop-2-en-1-ona, são caracterizadas por sua cadeia aberta, não possuem o anel C, quimicamente são cetonas α,β -insaturadas com dois anéis aromáticos (A e B) ligados a uma alcenona de três carbonos, ocorrem na forma de isômeros cis ou trans (Figura 06), sendo o isômero trans a mais estável termodinamicamente (JASIM et al., 2021; RAJENDRAN et al., 2022; RAMMOHAN et al., 2020).

Figura 06 - Estrutura básica das chalconas.



Legenda: (A) Cis chalcona; (B) Trans chalcona.

Fonte: JASIM et al., 2021.

A estrutura básica das chalconas tem gerado grande interesse para as indústrias farmacêuticas, devido seus anéis heterocíclicos que são bioativos, bem como o número e a posição dos grupos hidroxila (-OH) que influenciam na bioatividade (CHEN et al., 2023; ZHUANG et al., 2017). A síntese de chalconas são de relativa facilidade para produção e modificação estrutural (MAHAPATRA; BHARTI; ASATI, 2015), sendo possível sintetizar chalconas semelhantes às da natureza ou acoplar e substituir biomoléculas para sintetizar chalconas sintéticas ou derivados sintéticos de chalconas, com propriedades destinadas a um fim terapêutico específico (OKOLO et al., 2021; RAJENDRAN et al., 2022).

Derivados sintéticos de chalconas possuem um enorme potencial terapêutico, visto que podem contribuir no combate a doenças através de suas propriedades multialvos, ou seja, propriedades de atuarem em múltiplas vias moleculares (ELKANZI et al., 2022).

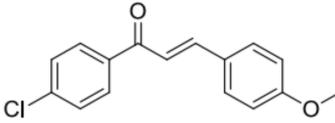
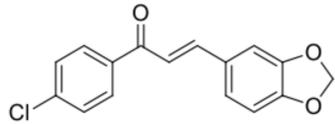
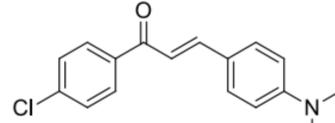
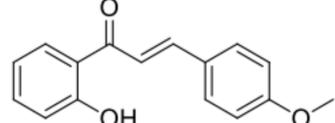
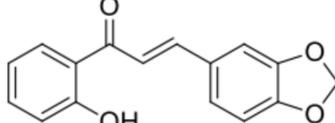
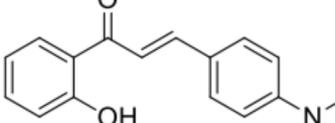
Dentre as diversas bioatividades das chalconas, a ação antiparasitária vem se destacando, com diversos estudos direcionados à família Trypanosomatidae, principalmente para os gêneros de grande importância médica, *Leishmania* e *Trypanosoma* (ESPINOZA-HICKS et al., 2019; MAGALHÃES et al., 2022; ZHEOAT et al., 2021).

Conforme Lourenço et al. (2023a), foram sintetizados dezessete derivados flavonóides (análogos de flavonol e chalcona) com propriedades multialvos para serem utilizados contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* (*L. amazonensis*), a fim de avaliar o potencial anti-*Leishmania* com métodos *in silico* e *in vitro*. Todos os compostos sintetizados apresentaram atividade contra o protozoário e baixa citotoxicidade contra células de mamíferos (LOURENÇO et al., 2023a).

Devido à ação anti-*Leishmania* dos derivados sintéticos de flavonóides (LOURENÇO et al., 2023a), a avaliação da potencial atividade anti-*T. cruzi* desses compostos é promissora, visto que *Leishmania* e *T. cruzi* fazem parte da família Trypanosomatidae (REY, 2008), com semelhanças morfológicas como a presença de cinetoplasto e flagelo, mas também possuem similaridades fisiológicas, filogenéticas e moleculares (KAUFER et al., 2017; MASLOV et al., 2013), aumentando a potencial ação dos compostos sintéticos contra ambos os parasitos (ESPINOZA-HICKS et al., 2019).

Dentre os dezessete derivados sintéticos de flavonoides sintetizados por Lourenço et al. (2023a), foram selecionados para este trabalho seis derivados sintéticos de chalconas (Figura 07) para serem testados contra *T. cruzi*, os quais apresentaram atividades intensas e promissoras contra *L. amazonensis*. Tendo ação multialvos, como no caso de inibirem as cisteína proteases (CPs) e induzirem a produção de óxido nítrico (NO) em células infectadas, além de apresentarem baixa ação citotóxica em células de mamíferos (LOURENÇO et al., 2023a; LOURENÇO et al., 2023b).

Figura 07 - Derivados sintéticos de chalconas.

Código	Nome IUPAC	Característica física	Estrutura
1A	(E)-1-(4-clorofenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona	Cristal amarelo claro	
1B	(E)-3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1-(4-clorofenil)prop-2-en-1-ona	Cristal amarelo claro	
1C	(E)-1-(4-clorofenil)-3-(4-(dimetilamino)fenil)prop-2-en-1-ona	Pó amorfo amarelo	
2A	(E)-1-(2-hidroxifenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona	Pó amorfo amarelo	
2B	(E)-3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1-(2-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona	Pó amorfo amarelo	
2C	(E)-3-(4-(dimetilamino)fenil)-1-(2-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona	Cristal roxo	

Fonte: Elaborado pela autora.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito de derivados sintéticos de chalconas sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* Dm28c.

2.2 Objetivos específicos

Determinar a concentração capaz de inibir em 50% (CI₅₀) a viabilidade de formas epimastigotas de *T. cruzi* após tratamento com derivados sintéticos de chalconas.

Avaliar a morfologia de formas epimastigotas após tratamento com a CI₅₀ dos derivados sintéticos de chalconas.

3 METODOLOGIA

3.1 Tipo de Estudo

Pesquisa experimental, desenvolvida com ensaios *in vitro* utilizando como modelo experimental uma população clonal do protozoário *T. cruzi* da cepa (Dm28c) (CONTRERAS; MOREL; GOLDENBERG, 1985). O material experimental utilizado neste projeto está cadastrado no Sistema de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen) sob o número A64768A e não se enquadra na Lei 13.123/2015, que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético. O material original foi cedido pelo Dr. Stenio Perdigão Fragoso, pesquisador responsável pelo banco de microrganismos do Instituto Carlos Chagas - Fiocruz Paraná.

3.2 Cultura de *Trypanosoma cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c (CONTRERAS; MOREL; GOLDENBERG, 1985) foram mantidas em cultura a 28 °C em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (CAMARGO, 1964) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), com repiques periódicos a cada 3 dias, mantendo a cultura com concentração de 1×10^6 (DE ALMEIDA et al., 2021). Para os experimentos foram utilizados parasitos em fase exponencial de crescimento.

3.3 Derivados sintéticos de chalconas

Os derivados sintéticos de chalconas (Figura 08) foram cedidos pelo Dr. Dênis Pires de Lima do Laboratório de Síntese e Transformações de Moléculas Orgânicas (SINTMOL) do Instituto de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (INQUI - UFMS).

Figura 08 - Derivados sintéticos de chalconas selecionados para teste sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Código	Nome IUPAC	Massa molar
1A	(E)-1-(4-clorofenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona	272,73 g/mol
1B	(E)-3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1-(4-clorofenil)prop-2-en-1-ona	286,71 g/mol
1C	(E)-1-(4-clorofenil)-3-(4-(dimetilamino)fenil)prop-2-en-1-ona	285,77 g/mol
2A	(E)-1-(2-hidroxifenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona	254,28 g/mol
2B	(E)-3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1-(2-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona	268,26 g/mol
2C	(E)-3-(4-(dimetilamino)fenil)-1-(2-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona	267,32 g/mol

Fonte: Elaborado pela autora.

3.4 Ensaio de viabilidade com MTS

O ensaio de viabilidade com MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) foi utilizado para determinar as concentrações dos fármacos capazes de inibir 50% da viabilidade dos parasitos (CI_{50}). Esse método é baseado na avaliação quantitativa de células viáveis após a exposição dos compostos testados, pela incubação com MTS em associação ao agente acoplador de elétrons PMS (*Phenazine methosulfate*) (HENRIQUES et al., 2011), no qual foram testadas diferentes concentrações dos derivados sintéticos de chalconas (Figura 09).

As maiores concentrações foram determinadas de maneira a garantir que não houvesse mais de 1% de dimetilsulfóxido (DMSO) nas amostras. As concentrações testadas se diferem devido à massa molecular de cada composto.

Os parasitos em fase exponencial de crescimento, na forma epimastigota, foram adicionados em placas de 96 poços, em concentrações de 1×10^6 - para este teste essa densidade de parasitos oferece um resultado de maior confiabilidade (DE ALMEIDA et al., 2021). Os parasitos foram incubados com as diferentes concentrações de derivados sintéticos de chalconas a 28 °C por 72h. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

Após a incubação inicial, foram adicionados em cada poço 20 µL de MTS/PMS, deixando os parasitos em incubação por mais 4h. Após este procedimento, a densidade óptica foi medida a 492nm em espectrofotômetro µQuant. Como controle foi utilizado parasitos tratados apenas com PBS pH 7,0 (*Phosphate Buffered Saline*), sem adição de compostos.

Figura 09 - Concentrações testadas no ensaio de viabilidade com MTS.

Derivados sintéticos de chalconas	Concentrações testadas
1A	366,66; 183,33; 91,67; 45,83; 22,92 µM
1B	348,78; 174,39; 87,20; 43,60; 21,80 µM
1C	349,93; 174,97; 87,48; 43,74; 21,87 µM
2A	393,27; 196,63; 98,32; 49,16; 24,58 µM
2B	372,77; 186,39; 93,19; 46,60; 23,30 µM
2C	374,08; 187,04; 93,52; 46,76; 23,38 µM

Fonte: Elaborado pela autora.

3.5 Avaliação da morfologia das formas epimastigotas tratadas com derivados sintéticos de chalconas

A fim de observar se o tratamento com $CI_{50}/72h$ dos derivados sintéticos de chalconas provocam alterações morfológicas nas formas epimastigotas de *T. cruzi*, foram realizadas análises em microscópio óptico. Os parasitos foram coletados por centrifugação a 2.000xg por 5 minutos, lavados uma vez em PBS 1x e fixados com paraformaldeído a 4% por 30 minutos. Posteriormente, foram aplicados 10 µL de células em densidade de $5 \times 10^6/mL$, sobre uma lâmina de microscopia e corados pelo método Panótico (ciclohexadieno 0,1%, azobenzenosulfônicos 0,1% e fenotiazina 0,1%). As lâminas foram montadas em Permout® (Fisher Scientific) e examinadas em microscópio Nikon E600 em aumento de 1.000x.

O percentual de formas alteradas foi determinado a partir da análise microscópica e contagem de 200 parasitos para cada réplica de tratamento. A contagem foi iniciada no centro de cada lâmina e avançada sequencialmente em sentido horário até a determinação

do número total de parasitos. Este padrão foi adotado para garantir uniformidade na avaliação.

Na análise, foram considerados parasitos alterados aqueles que apresentavam flagelo reduzido ou ausente, morfologia distinta da fusiforme, a qual é característica da forma epimastigota de *T. cruzi*. Debris celulares também foram considerados como alterações, desde que fosse possível identificar o posicionamento do núcleo e do cinetoplasto/flagelo.

3.6 Análise estatística

Para avaliação morfológica, o percentual de formas celulares alteradas foi estimado contando-se 200 parasitos e calculada a média das triplicatas dos compostos e do controle.

As análises foram realizadas por meio do *software* Microsoft Excel 2020 e para a determinação das CI_{50} utilizou-se o *software* GraphPad Prism 7,04.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaio de viabilidade de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* pelo método de MTS

Com base nos dados obtidos, os compostos 1A, 1B, 1C, 2A e 2B apresentaram capacidade de reduzir a viabilidade dos parasitos. O composto 2C não apresentou atividade inibitória por essa metodologia.

Os valores de $CI_{50}/72h$ obtidos para cada composto sobre formas epimastigotas de *T. cruzi* pelo método de MTS encontram-se na tabela 01.

Tabela 01 - CI_{50} de derivados sintéticos de chalconas contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* durante 72h.

Composto	$CI_{50}/72h$ (μM)	R^2	Intervalo de Confiança
1A	131,38	0,9476	115,46 a 149,49
1B	115,31	0,9865	107,25 a 123,92
1C	60,99	0,9718	54,80 a 67,89
2A	136,46	0,9805	121,09 a 153,77
2B	25,90	0,9911	25,12 a 26,70
2C	-	-	-

Legenda: CI_{50} : Concentração Inibitória para 50% dos parasitos testados; R^2 : Coeficiente de determinação; (-): Sem atividade.

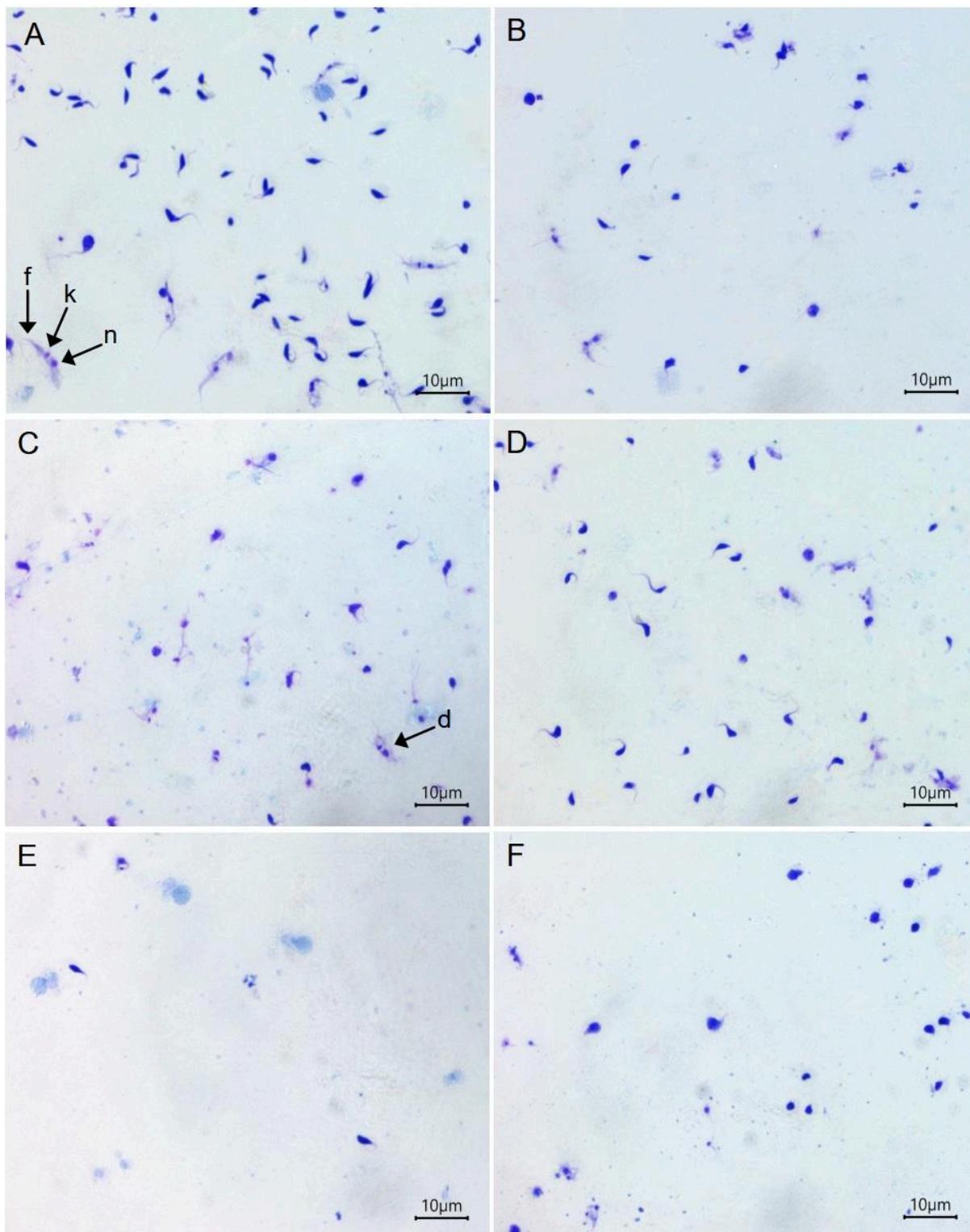
Por meio do teste de viabilidade, foi observado que os derivados sintéticos de chalconas possuem atividade contra formas epimastigotas de *T. cruzi*, com valores de CI_{50} que variam de 25,90 até 136,46 μM , sendo os compostos 2B e 1C os mais ativos.

Embora o derivado sintético de chalcona 2C não tenha apresentado atividade dentro da faixa de concentração utilizada neste estudo, esse fato pode ser explicado pois o composto 2C é um sólido cristalino de baixa solubilidade em meio aquoso, propriedade física que dificulta a absorção do composto pelos parasitos, esse obstáculo foi descrito por Lourenço et al. (2023a) em ensaios *in vitro* com o composto 2C, o qual apresentou baixa ação em outra metodologia.

4.2 Avaliação da morfologia das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* tratadas com derivados sintéticos de chalconas

Após o tratamento com a $CI_{50}/72h$, pode-se observar na figura 10 que os derivados sintéticos de chalconas 1A, 1B, 1C, 2A e 2B alteraram a morfologia dos parasitos. O composto 2C não foi testado para essa metodologia por não apresentar atividade no ensaio de viabilidade.

Figura 10 - Morfologia de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* corados pelo método Panótico.



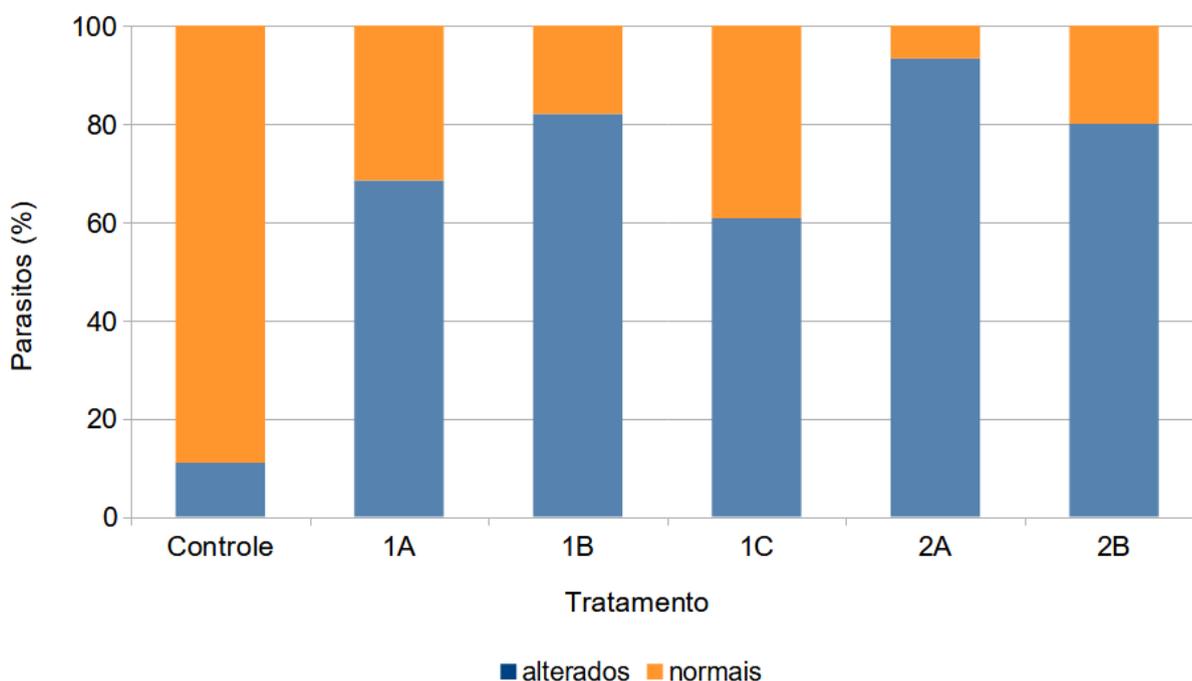
Legenda: (A) Parasitos não tratados - controle; (B) Parasitos tratados com 1A; (C) Parasitos tratados com 1B; (D) Parasitos tratados com 1C; (E) Parasitos tratados com 2A; (F) Parasitos tratados com 2B. Microscópio óptico, aumento de 1000x. As setas indicam as estruturas celulares: f (flagelo); k (cinetoplasto); n (núcleo); d (debris celulares).

Em todos os tratamentos com $CI_{50}/72h$ dos derivados sintéticos de chalconas houve alterações morfológicas de *T. cruzi*, em comparação com os parasitos não tratados (figura 10A).

Os diferentes tratamentos cujas formas epimastigotas de *T. cruzi* foram submetidas causaram a redução do tamanho celular, os parasitos apresentam-se arredondados e mais largos; alteraram a visibilidade do flagelo e provocaram a ocorrência de debris celulares, indicando morte celular.

Os dados apresentados na figura 11 mostram as alterações morfológicas em porcentagem, demonstrando a quantidade de células não funcionais em cada tratamento e no controle. As alterações morfológicas são constatadas em baixa quantidade no controle (figura 10A), apenas 11% dos parasitos, sendo comum encontrar parasitos não funcionais na cultura celular. O restante dos parasitos não tratados encontravam-se com morfologia considerada normal, com formato fusiforme e flagelo visível.

Figura 11 - Efeito dos derivados sintéticos de chalconas sobre a morfologia de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.



Em relação aos tratamentos, o composto 1A (figura 10B) foi capaz de alterar a morfologia de 68,5% dos parasitos, com a presença de debris celulares, indicando morte celular. O composto 1B (figura 10C) alterou 82% dos parasitos, com a ocorrência de debris celulares. Já o composto 1C (figura 10D) alterou 60,8% dos parasitos.

O tratamento com o composto 2A (figura 10E) foi capaz de induzir a morte celular na maioria dos parasitos, bem como havia a presença de debris celulares, alterando 93,3%

dos parasitos. O composto 2B (figura 10F) alterou 80% dos parasitos, os quais apresentaram morfologia arredondada.

Dessa forma, o composto 2A e 1B, respectivamente, apresentaram os maiores efeitos na morfologia das formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Os tratamentos com os derivados sintéticos de chalconas foram capazes de afetar a viabilidade e morfologia das formas epimastigotas de *T. cruzi*, essa atividade pode estar relacionada à propriedade multialvos das chalconas. Visto que, os mesmos compostos quando testados em *L. amazonensis* apresentaram resultados promissores como inibidores de CPs, aumentando a produção de NO e ROS em células infectadas e desestabilizando a membrana mitocondrial do protozoário (LOURENÇO et al., 2023a).

As chalconas têm como uma de suas características a atividade antioxidante, que previne danos oxidativos em células humanas, propriedade relacionada a posição e número de grupos hidroxila (-OH) (HAO et al., 2024). Considerando essa propriedade das chalconas, a ação antioxidante pode desestabilizar a homeostase oxidativa do parasito, gerando estresse oxidativo, que induz a produção de radicais livres, de modo a aumentar a concentração de NO (AGUIAR, 2013; PAIVA; MEDEI; BOZZA, 2018).

A mitocôndria única e ramificada de *T. cruzi* possui uma maquinaria bioenergética e metabólica, a qual é eficiente para lidar com os danos oxidativos do próprio ciclo de vida (BOMBAÇA et al., 2019). No entanto, não possui um sistema de defesa oxidativo como o dos mamíferos, com enzimas, por exemplo (MACHADO-SILVA et al., 2016), dessa forma é uma região vulnerável ao estresse oxidativo.

O estresse oxidativo, resulta na disfunção mitocondrial, aumento da produção de NO ou ROS (quando o parasito se encontra no meio intracelular) e danos ao DNA (AGUIAR, 2013; CAMPOS et al., 2011). A persistência do estresse oxidativo causa alterações morfológicas e fisiológicas no parasito, como a redução do tamanho e inchaço celular, desorganização das organelas e aumento da produção de ROS, resultando na morte celular (SANDES, 2016).

Além disso, *T. cruzi* possui como principal CPs a cruzipaína (também conhecida como cruzaína ou GP57/51), uma glicoproteína monomérica pertencente a família da catepsina, família polimórfica e multigênica (DUSCHAK; COUTO, 2009; LIMA et al., 2001). A cruzipaína é essencial para sobrevivência, invasão e multiplicação do parasito na célula hospedeira, estando presente em todas as formas e cepas de *T. cruzi* (SANTOS et al., 2021; UEHARA, 2010). Na forma epimastigota, a cruzipaína se encontra na organela reservossomo, onde é altamente expressada; na forma tripomastigota, se encontra no bolso flagelar; e na forma amastigota, se encontra na superfície da célula (FUJII, 2018). Atualmente, sabe-se que há quatro subtipos de cruzipaína, com diferentes sítios ativos e

funções dentro do protozoário, aumentando os mecanismos de seletividade e especificidade de *T. cruzi* (SANTOS et al., 2021).

De acordo com Lourenço et al. (2023b), os derivados sintéticos de chalconas possuem o mecanismo de ação de inibir catepsinas do tipo L. A cruzipaína quando madura contém uma porção catalítica de extrema semelhança às catepsinas do tipo L (GEA et al., 2006), logo esses compostos podem atuar na inibição da cruzipaína, de modo a reduzir e levar a morte da população celular.

Além disso, o estresse oxidativo e a inibição da cruzipaína podem estar correlacionados, pois a cruzipaína é importante para a sinalização e equilíbrio de NO (STEMPIN et al., 2008); por conseguinte, com a inibição da cruzipaína, os mecanismos de proteção da ação oxidativa são desestabilizados, levando a morte celular dos parasitos.

No estudo de Dutra et al. (2023), chalconas sintéticas analisadas *in silico* interagiram com a cruzipaína e tripanotona reductase (TR), sendo possíveis alvos de ação, em destaque para a TR que regula o metabolismo redox de *T. cruzi* (cepa Y). Nos testes *in vitro*, as chalconas sintéticas causaram redução das populações das formas epimastigotas e tripomastigotas, danos a membrana e a mitocôndria, e acúmulo de ROS, devido ao estresse oxidativo (DUTRA et al., 2023).

Ribeiro (2023) avaliou uma chalcona sintética inédita contra as três formas de *T. cruzi* (cepa Y). A chalcona apresentou interações com a cruzipaína e com a TR nas análises de docking molecular, além de induzir a morte celular por danos na membrana do parasito na avaliação por citometria de fluxo, e também aumentou a produção de ROS, mecanismos de ação relacionados ao estresse oxidativo.

Em ambos os estudos (DUTRA et al., 2023; RIBEIRO, 2023), os mecanismos de ação foram similares, demonstrando que as propriedades das chalconas permanecem mesmo com alterações nos radicais. Sendo compostos que atuam fortemente nas enzimas de importância para o parasito e no estresse oxidativo.

Com base nos dados da literatura (DUTRA et al., 2023; LOURENÇO et al., 2023a; LOURENÇO et al., 2023b; RIBEIRO, 2023), os derivados sintéticos de chalconas aqui testados possuem mecanismos de ação multialvos contra *T. cruzi*. Porém, é necessário a realização de outros testes *in vitro* para elucidação dos mecanismos de ação dos compostos. Em destaque para o composto 2A que apresentou lise celular dos parasitos, atividade particular observada neste composto.

Ademais, os derivados sintéticos de chalconas analisados neste estudo não apresentaram registros na literatura contra *T. cruzi*, indicando que nosso grupo de pesquisa foi o primeiro a realizar essa associação.

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, concluímos que os derivados sintéticos de chalconas foram ativos contra as formas epimastigotas de *T. cruzi* cepa Dm28c. Dos seis compostos testados, cinco apresentaram atividade contra a viabilidade e causaram alterações morfológicas nos parasitos. Sendo que o composto 2B apresentou-se como o mais ativo contra a viabilidade tendo a menor $CI_{50}/72h$; e o composto 2A causou as maiores alterações na morfologia dos parasitos, resultando na morte celular.

6 REFERÊNCIAS

AGUIAR, Pedro Henrique Nascimento. **Estresse Oxidativo e Lesões no DNA: Papel da 8-oxoguanina na Viabilidade do *Trypanosoma cruzi***. 2013. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

ANDRADE, Z. A. **Immunopathology of Chagas disease**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 94, supl. 1, p. 71–80, set. 1999.

BOMBAÇA, A. C. S.; VIANA, P. G.; SANTOS, A. C. C. et al. **Mitochondrial dysfunction and ROS production are essential for anti-*Trypanosoma cruzi* activity of β -lapachone-derived naphthoimidazoles**. Free Radical Biology and Medicine, v. 130, p. 408-418, 2019. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.11.012.

CAMARGO, E. P. **Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi***. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 6, n. 3, p. 93-100, 1964.

CAMPOS, P. C.; SILVA, V. G.; FURTADO, C. et al. ***Trypanosoma cruzi* MSH2: Functional analyses on different parasite strains provide evidence for a role on the oxidative stress response**. Molecular and Biochemical Parasitology, v. 176, n. 1, p. 8-16, 2011. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2010.11.001.

CHAGAS, C. **Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem**. Mem Inst Oswaldo Cruz; 1: 159-218, 1909.

CHEN, S.; WANG, X.; CHENG, Y. et al. **A review of classification, biosynthesis, biological activities and potential applications of flavonoids**. Molecules, v. 28, p. 4982, 2023. DOI: 10.3390/molecules28134982.

CONTRERAS, V.; MOREL, C.; GOLDENBERG, S. **Stage-specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis**. Molecular and Biochemical Parasitology, v. 14, n. 1, p. 83–96, jan. 1985.

COURA, J. R. **Chagas disease: what is known and what is needed – a background article**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 102, n. 1, p. 22-113, out. 2007.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. D. **A critical review on Chagas disease chemotherapy.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 97, n. 1, p. 3–24, jan. 2002.

D'AMELIA, V.; AVERSANO, R.; CHIAIESE, P. et al. **The antioxidant properties of plant flavonoids: their exploitation by molecular plant breeding.** Phytochemistry Reviews, v. 17, p. 611–625, 2018. DOI: 10.1007/s11101-018-9568-y.

DE ALMEIDA, J. M. et al. **Synergistic effect and ultrastructural changes in *Trypanosoma cruzi* caused by isoobtusilactone A in short exposure of time.** PloS One, v. 16, n. 1, p. e0245882, 2021.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. **Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction.** International Journal of Cell Biology, v. 2010, p. 1–18, 2010.

DIAS, J. R.; COURA, J. C. P. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral.** Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997. 486 p.

DIAS, J. C. P. et al. **II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015.** Epidemiologia e Serviços de Saúde, v. 25, n. 21, p. 1–10, jun. 2016.

DIAS, M. C.; PINTO, D. C. G. A.; SILVA, A. M. S. **Plant flavonoids: chemical characteristics and biological activity.** Molecules, v. 26, p. 5377, 2021. DOI: 10.3390/molecules26175377.

DRUGBANK. **Benznidazole.** 2022. Disponível em: <https://go.drugbank.com/drugs/DB11989>. Acesso em: 12 jan. 2024.

DRUGBANK. **Nifurtimox.** 2023. Disponível em: <https://go.drugbank.com/drugs/DB11820>. Acesso em: 12 jan. 2024.

DUSCHAK, Vilma G.; COUTO, Alicia S. **Cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi*: a sulfated glycoprotein antigen as relevant candidate for vaccine development and drug target. A review.** Current Medicinal Chemistry, v. 16, n. 24, 2009. DOI: 10.2174/092986709788802971.

DUTRA, N. B. G.; PAULA, E. M.; RODRIGUES, L. R. et al. **Trypanocidal potential of synthetic p-aminochalcones: In silico and in vitro evaluation**. *Bioorganic Chemistry*, v. 141, p. 106931, 2023. DOI: 10.1016/j.bioorg.2023.106931.

DUTRA, W. O. et al. **Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. suppl 1, p. 208–218, jul. 2009.

ELIAS, M. C. Q. B. et al. **Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation**. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 112, n. 1, p. 79–90, jan. 2001.

ELKANZI, N. A. A. et al. **Synthesis of chalcones derivatives and their biological activities: a review**. *ACS Omega*, v. 7, n. 32, p. 27769–27786, 2022. DOI: 10.1021/acsomega.2c01779.

ESPINOZA-HICKS, J. C. et al. **Novel prenyloxy chalcones as potential leishmanicidal and trypanocidal agents: design, synthesis and evaluation**. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 167, p. 402–413, 1 abr. 2019. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.02.028.

FUJII, Drielli Gomes Vital. **Aplicação de planejamento baseado na estrutura do receptor na busca de inibidores de cisteíno-proteases parasitárias (cruzaína (*T. cruzi*) e PCB (Leishmanioses))**. 2018. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9138/tde-26072018-160153/>. Acesso em: 10 fev. 2025.

GARCIA, E.; GONZALEZ, M.; AZAMBUJA, P. **Biological factors involving *Trypanosoma cruzi* life cycle in the invertebrate vector, *Rhodnius prolixus***. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, n. suppl 1, p. 213–216, set. 1999.

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

GEA, S. et al. **Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* cysteine protease in the host-parasite interplay**. *Inmunología*, v. 25, p. 225–238, 2006.

GONÇALVES, C. S. et al. **Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation.** Parasites & Vectors, v. 11, n. 1, p. 83, dez. 2018.

HAO, B. et al. **Advances in flavonoid research: sources, biological activities, and developmental prospectives.** Current Issues in Molecular Biology, v. 46, p. 2884–2925, 2024. DOI: 10.3390/cimb46040181.

HASNAT, H. et al. **Flavonoids: a treasure house of prospective pharmacological potentials.** Heliyon, v. 10, p. e27533, 2024. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e27533.

HASSLOCHER-MORENO, A. M. et al. **Indeterminate form of Chagas disease: historical, conceptual, clinical, and prognostic aspects.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 54, p. e0254-2021, 2021.

HENRIQUES, C. et al. **Tetrazolium salt based methods for high-throughput evaluation of anti-parasite chemotherapy.** Analytical Methods, v. 3, n. 9, p. 2148–2155, 2011.

JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C. D. C.; ROQUE, A. L. R. ***Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil.** Parasites & Vectors, v. 11, n. 1, p. 502, dez. 2018.

JASIM, H. A. et al. **Chalcones: synthetic chemistry follows where nature leads.** Biomolecules, v. 11, p. 1203, 2021. DOI: 10.3390/biom11081203.

KAUFER, A. et al. **The evolution of trypanosomatid taxonomy.** Parasites & Vectors, v. 10, p. 287, 2017. DOI: 10.1186/s13071-017-2204-7.

KEMMERLING, U.; BOSCO, C.; GALANTI, N. **Infection and invasion mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in the congenital transmission of Chagas' disease: a proposal.** Biological Research, v. 43, n. 3, 2010.

LIGA, S.; PAUL, C.; PÉTER, F. **Flavonoids: overview of biosynthesis, biological activity, and current extraction techniques.** Plants, v. 12, p. 2732, 2023. DOI: 10.3390/plants12142732.

LIMA, A. P. et al. **Cysteine protease isoforms from *Trypanosoma cruzi*, cruzipain 2 and cruzain, present different substrate preference and susceptibility to inhibitors.** Molecular and Biochemical Parasitology, v. 114, n. 1, p. 41-52, 2001. DOI: 10.1016/s0166-6851(01)00236-5.

LOURENÇO, E. M. G. et al. **Investigation of the potential targets behind the promising and highly selective antileishmanial action of synthetic flavonoid derivatives.** ACS Infectious Diseases, v. 9, n. 10, p. 2048-2061, 13 out. 2023a. DOI: 10.1021/acsinfecdis.3c00336.

LOURENÇO, E. M. G. et al. **Flavonoid derivatives as new potent inhibitors of cysteine proteases: an important step toward the design of new compounds for the treatment of leishmaniasis.** Microorganisms, v. 11, p. 225, 2023b. DOI: 10.3390/microorganisms11010225.

MACALUSO, G. et al. **A review on the immunological response against *Trypanosoma cruzi*.** Pathogens, v. 12, n. 2, p. 282, 8 fev. 2023.

MACHADO-SILVA, A.; CERQUEIRA, P. G.; GRAZIELLE-SILVA, V. et al. **How *Trypanosoma cruzi* deals with oxidative stress: Antioxidant defence and DNA repair pathways.** Mutation Research - Reviews in Mutation Research, v. 767, p. 8-22, 2016. DOI: 10.1016/j.mrrev.2015.12.003.

MAGALHÃES, E. P. 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, 1 jul. 2022. DOI: 10.1016/j.cbi.2022.109920.

MAHAPATRA, D. K.; BHARTI, S. K.; ASATI, V. **Chalcone scaffolds as anti-infective agents: structural and molecular target perspectives.** European Journal of Medicinal Chemistry, v. 101, p. 496–524, 2015.

MARTÍN-ESCOLANO, J. et al. **An updated view of the *Trypanosoma cruzi* life cycle: intervention points for an effective treatment.** ACS Infectious Diseases, v. 8, n. 6, p. 1107–1115, 10 jun. 2022.

MASLOV, D. A. et al. **Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed.** Trends in Parasitology, v. 29, n. 1, p. 43-52, jan. 2013. DOI: 10.1016/j.pt.2012.11.001.

MASSAD, E. **The elimination of Chagas' disease from Brazil.** Epidemiology and Infection, v. 136, n. 9, p. 1153–1164, set. 2008.

MENDES, F. D. S. N. S. et al. **Critical analysis of Chagas disease treatment in different countries.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 117, p. e210034, 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). **Doença de Chagas.** 2022a. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/doenca-de-chagas>. Acesso em: 12 fev. 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). **Secretaria de Vigilância em Saúde.** Boletim epidemiológico. Número especial. 2022b. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2022/boletim-especial-de-doenca-de-chagas-numero-especial-abril-de-2022>. Acesso em: 10 jan. 2024.

NORRIS, K. A. **Stable transfection of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes with the trypomastigote-specific complement regulatory protein cDNA confers complement resistance.** Infection and Immunity, v. 66, n. 6, p. 2460–2465, jun. 1998.

OKOLO, E. N. et al. **New chalcone derivatives as potential antimicrobial and antioxidant agents.** Scientific Reports, v. 11, p. 21781, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-01292-5.

ONYEKWELU, K. C. **Life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the invertebrate and the vertebrate hosts.** In: DE SOUZA, W. (Ed.). *Biology of Trypanosoma cruzi*. [s.l.]: IntechOpen, 2019.

PAHO – PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease.** 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease#3>. Acesso em: 10 jan. 2024.

PAIVA, C. N.; MEDEI, E.; BOZZA, M. T. **ROS and *Trypanosoma cruzi*: Fuel to infection, poison to the heart.** PLoS Pathogens, v. 14, n. 4, p. e1006928, 2018. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006928.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. **Flavonoids: an overview.** Journal of Nutritional Science, v. 5, p. e47, 2016. DOI: 10.1017/jns.2016.41.

PEREIRA, P. C.; NAVARRO, E. **Challenges and perspectives of Chagas disease: a review.** Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, v. 19, n. 1, p. 34, 2013.

PINTO, P. L. S. et al. **Life cycle of *Trypanosoma cruzi* (Y strain) in mice.** Revista do Hospital das Clínicas, v. 54, n. 5, p. 141–146, out. 1999.

PORTAL DA DOENÇA DE CHAGAS. 2017. **Organização estrutural.** Disponível em: <https://chagas.fiocruz.br/parasita/organizacao-estrutural/>. Acesso em: 19 jan. 2024.

RAJENDRAN, G. et al. **Chalcone: A promising bioactive scaffold in medicinal chemistry.** Pharmaceuticals (Basel, Switzerland), v. 15, n. 10, p. 1250, 2022. DOI: 10.3390/ph15101250.

RAMMOHAN, A. et al. **Chalcone synthesis, properties and medicinal applications: a review.** Environmental Chemistry Letters, v. 18, p. 433–458, 2020. DOI: 10.1007/s10311-019-00959-w.

REY, L. **Parasitologia: parasitas e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

REHAN, M. **Biosynthesis of diverse class flavonoids via shikimate and phenylpropanoid pathway.** In: ZEPKA, L. Q.; NASCIMENTO, T. C. D.; JACOB-LOPES, E. (Ed.). Bioactive compounds. Rijeka: IntechOpen, 2021. p. Ch. 6.

RIBEIRO, Lyanna Rodrigues. **Efeito tripanocida da chalcona (2e,4e)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)-5-fenilpenta-2,4-dien-1-ona em cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.** 2023.

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

ŠAMEC, D. et al. **The role of polyphenols in abiotic stress response: The influence of molecular structure**. *Plants*, v. 10, p. 118, 2021. DOI: 10.3390/plants10010118.

SAJID, M. et al. **Synthetic biology towards improved flavonoid pharmacokinetics**. *Biomolecules*, v. 11, p. 754, 2021. DOI: 10.3390/biom11050754.

SANDES, Jana Messias. **Caracterização molecular e ultraestrutural do estresse do retículo endoplasmático de *Trypanosoma cruzi***. Recife: Jana Messias Sandes, 2016.

SANTOS, V. C. et al. **The gene repertoire of the main cysteine protease of *Trypanosoma cruzi*, cruzipain, reveals four sub-types with distinct active sites**. *Scientific Reports*, v. 11, p. 18231, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-97490-2.

STEMPIN, C. C. et al. **Cruzipain and SP600125 induce p38 activation, alter NO/arginase balance and favor the survival of *Trypanosoma cruzi* in macrophages**. *Acta Tropica*, v. 106, n. 2, p. 119-127, 2008. DOI: 10.1016/j.actatropica.2008.02.004.

TARIQ, H. et al. **Flavonoid production: Current trends in plant metabolic engineering and de novo microbial production**. *Metabolites*, v. 13, p. 124, 2023. DOI: 10.3390/metabo13010124.

TEIXEIRA, A. R. L. et al. **Chagas disease**. *Postgraduate Medical Journal*, v. 82, n. 974, p. 788–798, 1 dez. 2006.

TEIXEIRA, A. R. L. et al. **Pathogenesis of Chagas' disease: Parasite persistence and autoimmunity**. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 24, n. 3, p. 592–630, jul. 2011.

TEIXEIRA, D. E. et al. **Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease**. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 8, p. e1749, 28 ago. 2012.

UEHARA, Livia Almeida. **Determinação da relevância da cruzipaina na interação de *Trypanosoma cruzi* com *Rhodnius prolixus***. Rio de Janeiro, 2010.

WANG, L.; CHEN, M.; LAM, P. Y. et al. **Multifaceted roles of flavonoids mediating plant-microbe interactions.** *Microbiome*, v. 10, p. 233, 2022. DOI: 10.1186/s40168-022-01420-x.

WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M. E. et al. **Chagas disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine.** São Paulo: ISBT Brazil'92, 1992. p. 13-29.

WHO (World Health Organization). **Chagas disease (also known as American trypanosomiasis).** 2024a. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))). Acesso em: 10 jan. 2024.

WHO (World Health Organization). **Neglected tropical diseases.** 2024b. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/. Acesso em: 10 jan. 2024.

ZHEOAT, A. M. et al. **Antitrypanosomal and antileishmanial activity of chalcones and flavanones from *Polygonum salicifolium*.** *Pathogens*, v. 10, p. 175, 2021. DOI: 10.3390/pathogens10020175.

ZHUANG, C. et al. **Chalcone: A privileged structure in medicinal chemistry.** *Chemical Reviews*, v. 117, p. 7762–7810, 2017.

ZHUANG, W.-B. et al. **The classification, molecular structure and biological biosynthesis of flavonoids, and their roles in biotic and abiotic stresses.** *Molecules*, v. 28, p. 3599, 2023. DOI: 10.3390/molecules28083599.

ZINGALES, B.; BARTHOLOMEU, D. C. ***Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Impact on transmission cycles and Chagas disease.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 117, p. e210193, 2022.

ZUMA, A. A.; DOS SANTOS BARRIAS, E.; DE SOUZA, W. **Basic biology of *Trypanosoma cruzi*.** *Current Pharmaceutical Design*, v. 27, n. 14, p. 1671–1732, abr. 2021.