



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO DERIVADO DA CHALCONA,
(E)-1-fenil-3- α naftilprop-2-en-1-ona (NaF), EM *Phytomonas*
*serpens***

TAMIRIS APARECIDA DE CARVALHO SANTOS

2020



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

TAMIRIS APARECIDA DE CARVALHO SANTOS

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO DERIVADO DA CHALCONA,
(E)-1-fenil-3- α naftilprop-2-en-1-ona (NaF), EM *Phytomonas serpens***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

Orientadora
Prof^a. Dr^a. Roberta Pereira Miranda Fernandes

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

S237a Santos, Tamiris Aparecida de Carvalho
Análise dos efeitos do derivado da chalcona, (E)-1-fenil-3- α -nafilprop-2-em-1-ona (NaF), em *Phytomonas serpens* / Tamiris Aparecida de Carvalho Santos ; orientadora Roberta Pereira Miranda Fernandes. – São Cristóvão, SE, 2020.
42 f. : il.

Dissertação (mestrado em Agricultura e Biodiversidade) -
Universidade Federal de Sergipe, 2020.

1. Biotecnologia. 2. Plantas – Parasito. 3. Tripanossomatídeo. 4. Stress oxidativo. 5. Fitomonas. I. Fernandes, Roberta Pereira Miranda, orient. II. Título.

CDU 602:593.1

TAMIRIS APARECIDA DE CARVALHO SANTOS

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO DERIVADO DA CHALCONA,
(E)-1-fenil-3- α naftilprop-2-en-1-ona (NaF), EM *Phytomonas serpens***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

APROVADA em 17 de fevereiro de 2020.

Prof. Dr. Péricles Barreto Alves
UFS

Prof. Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto
Fiocruz

Prof^a. Dr^a. Roberta Pereira Miranda Fernandes
UFS
(Orientadora)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

*A Deus pelo fôlego de vida e a saúde, a minha
família, em especial aos meus pais Luciana
Aparecida Rodrigues e Enoque Patrício de
Carvalho (in memoriam), e ao meu querido
amor Cleverton Santos Carvalho*
Dedico

AGRADECIMENTOS

Obrigada Deus, pela graça da vida e pela felicidade de viver este dia. O sonho se realizou, neste momento meus olhos se enchem de lágrimas, coração se enche de tanta alegria, ao meu Deus, dedico a minha primeira e mais pura gratidão.

Agradeço a minha família pelo apoio, pelo amor e pela paciência, o incentivo de vocês também me trouxe até aqui. Em especial a minha mãe que sempre esteve ao meu lado diante das batalhas da vida. Ao meu pai Enoque Patrício de Carvalho (*in memoriam*), ao meu esposo Cleverton dos Santos Carvalho por acreditar e apoiar meus sonhos. Aos meus irmãos Júnior e Joyce, a minha Margarida e a minha irmã de graduação Lázara Lopes.

Aos meus queridos amigos do laboratório de Enzimologia, sim, nós somos uma família, a Isabela Vasconcelos pela grande amizade compartilhada, ao Kleiton Paulo pela amizade e por tudo que me ensinou (-Taméuriss), a Mayara Mendes e ao Nikolas Chaves, ICs mais dedicados ainda não vi, aos amigos Rafael Salomão e Brenda Moutinho.

Minha querida orientadora Prof^a. Dra^a. Roberta Pereira Miranda Fernandes, pela ótima companhia e orientação. Obrigada prof^a. pelos ensinamentos compartilhados.

Ao prof. Dr. Ricardo Scher que muito me ajudou, sempre disposto em contribuir com meu trabalho.

Ao prof. Dr. Péricles Barreto Alves e a Gabriella Barroso Souza.

Agradeço a Universidade Federal de Sergipe e ao programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade, e a Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa.

Agradeço a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

Agradeço a fomentadora Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. Geral	2
2.2. Específicos	2
3. REVISÃO DE LITERATURA	2
3.1. Trypanosomatidae	2
3.1.1 O gênero <i>Phytomonas</i>	3
3.1.2 <i>Phytomonas serpens</i>	6
3.1.3 Mecanismos de morte em tripanossomatídeos	7
3.2. Chalconas	8
3.2.1 Atividades biológicas das chalconas	9
3.2.2 Derivados da chalcona contendo naftaleno	9
4. METODOLOGIA	10
4.1. Síntese e caracterização do derivado da chalcona NaF	10
4.2. Manutenção das promastigotas de <i>Phytomonas serpens</i>	11
4.3. Atividade antiprotozoária de NaF	11
4.3.1. Efeito de NaF na proliferação celular de <i>P. serpens</i> por contagem direta em câmara de Neubauer	11
4.3.2 Efeito permanente de NaF na redução da proliferação celular	11
4.3.3 Análise dos níveis de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	11
4.3.4 Análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)	11
4.3.5 Análise da integridade da membrana plasmática	12
4.3.6 Microscopia eletrônica de transmissão e varredura	12
4.3.7 Efeito de NaF na redução do número de promastigotas flageladas	12
4.4. Análise estatística	12
5. RESULTADOS	13
6. DISCUSSÃO	20
7. CONCLUSÃO	22
8. FINANCIAMENTO.....	22
9. PERSPECTIVAS	22
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representação esquemática da morfologia dos tripanossomatídeos.....	2
2	Murcha de Fitomonas em coqueiro (Hartrot) (A), Marchitez sorpressiva em palmeiras produtoras de óleo (B), ambas causadas pela <i>Phytomonas staheli</i>	5
3	Ciclo de vida e transmissão de <i>Phytomonas</i> spp. Parasitos ingeridos por insetos fitófagos atingem o trato intestinal e passam pela hemocele, migram pela hemolinfa para infectar as glândulas salivares. O inseto infectado transmite os parasitos via saliva quando se alimentam de outras plantas. Ilustração das principais culturas afetadas por <i>Phytomonas</i> spp.....	5
4	Estrutura da chalcona.....	8
5	Estrutura da chalcona (A), estrutura do derivado NaF (E)-1-fenil-3-onaftilprop-2-en-1-ona (B).....	10
6	Efeito de NaF na proliferação celular de <i>Phytomonas serpens</i> . Promastigotas (1×10^6 células) foram cultivadas em meio Schneider na ausência e na presença de NaF (6-96 μ M) por 24 horas à 26°C. A proliferação celular foi determinada por contagem direta dos parasitos em câmara de Neubauer.....	13
7	Avaliação do efeito permanente na proliferação das formas promastigotas de <i>P. serpens</i> tratadas com (● CN-células não tratadas, ■ 12, ★ 24, ▼ 48 e ◆ 96 μ M) de NaF. Parasitos (1×10^6 células) foram cultivadas em meio Schneider na ausência e na presença de NaF (12-96 μ M) por 24 horas a 26°C. Após tratamento 1×10^5 células foram reinoculadas em meio de cultura Schneider livre de NaF. A proliferação celular após exposição ao NaF foi obtida por contagem direta em câmara de Neubauer no período de (24 a 72h). Os dados foram representados pela média \pm E.P de experimentos em triplicata.....	13
8	Alterações no ($\Delta\psi_m$) de formas promastigotas de <i>P. serpens</i> tratadas com NaF. Parasitos (1×10^7 células) foram tratadas com 6, 12 e 24 μ M de NaF (correspondente a $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ e 1 X IC ₅₀). Células não tratadas (CN) foram utilizadas para o controle negativo. Células incubadas com CCCP (Carbonil cianeto 4-clorofenilhidrazona, 50 μ M) foram utilizadas como controle positivo. As células foram coradas com Rodamina 123 por 30 minutos a 26°C. A fluorescência foi determinada por citometria de fluxo. Os dados de médias de fluorescência representados pela média \pm E.P. As diferenças estatísticas foram analisadas por ANOVA e teste de Dunnett, (*), (**) e (***) indicam diferença estatística em relação ao controle não tratado(A). Histograma representativo do potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de <i>P. serpens</i> tratadas (□6, □12e □24 μ M) de NaF, controle negativo (□células vivas coradas com Rodamina 123), o (□CCCP) foi utilizado como controle positivo. As células foram analisadas por citometria de fluxo(B).....	14
9	Produção de espécies reativas a oxigênio (ROS) em formas promastigotas de <i>P. serpens</i> tratadas com NaF. Parasitos (1×10^7 células) foram tratados com 6, 12 e 24 μ M de NaF (correspondente a $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ e 1 X IC ₅₀) por 24 horas a 26 °C. As células foram coradas com a sonda H ₂ DCFDA por 30 minutos a 25°C, e a intensidade de fluorescência foi determinada por espectrofotometria. Células incubadas com H ₂ O ₂ (750 μ M) foram utilizadas como controle positivo (CP), células vivas não tratadas com NaF representam o controle negativo (CN). Os dados de fluorescência foram relativizados ao controle negativo. Os resultados foram expressos em média \pm E.P. As diferenças estatísticas foram analisadas	

- por ANOVA e teste de Dunnett, (*), (**) (***) indicam diferenças estatísticas em relação ao controle não tratado ($P>005$, $P>001$ e $P>0,001$, respectivamente)..... 15
- 10 Integridade da membrana de formas promastigotas de *P. serpens* tratadas com NaF. Parasitos (1×10^7 células) foram tratadas com 6, 24 e $96 \mu\text{M}$ de NaF (correspondente a $\frac{1}{4}$, 1X e 4X IC_{50}). As células foram coradas com iodeto de propídeo (PI) por 15 minutos a 26°C . Células não tratadas (CN) foram utilizadas como controle negativo. Células incubadas à (80°C) por 10 minutos foram utilizadas como controle positivo (CP). A intensidade de fluorescência foi determinada por espectrofotometria. Os dados de médias de fluorescência foram relativizados ao controle negativo representados pela média $\pm\text{E.P.}$ As diferenças estatísticas foram analisadas por ANOVA e teste de Dunnett, (*), (**) e (***) indicam diferença estatística em relação ao controle não tratado..... 16
- 11 Alterações morfológicas em formas promastigotas de *P. serpens* tratadas com NaF. (A, C, E) Controle, células não tratadas; (B, D, F) Promastigotas tratadas com $24 \mu\text{M}$. (A-F) os parasitos demonstraram morfologia típica (setas pretas) ou encurtamento flagelar (setas brancas). Promastigotas sem o flagelo (seta branca) foram facilmente encontradas após o tratamento com $24 \mu\text{M}$ de NaF. Barra = $10 \mu\text{m}$ 17
- 12 Redução de formas promastigotas flageladas de *P. serpens* tratadas com $24 \mu\text{M}$ de NaF. Parasitos (1×10^6 células) foram tratadas com $24 \mu\text{M}$ de NaF (correspondente 1X IC_{50}) por 24h. Células não tratadas (CN) foram utilizadas para o controle negativo. As células foram coradas com corante Giemsa e a contagem foi realizada por meio de contagem direta em microscópio óptico na lente 40X. Os dados foram representados pela média $\pm\text{E.P.}$ As diferenças estatísticas foram analisadas por teste t, (*), (**) e (***) indicam diferença estatística em relação ao controle não tratado..... 18
- 13 Microscopia eletrônica de transmissão de formas promastigotas de *P. serpens* tratadas com $24 \mu\text{M}$ de NaF (corresponde a 1X IC_{50}). (A) parasitos não tratadas apresentaram morfologia normal. O tratamento com $24 \mu\text{M}$ de NaF induziu inchaço na bolsa flagelar, no interior desta estrutura foram observadas estruturas membranares concêntricas (estrelas brancas), assim como a formação de autofagossomos com conteúdo variável (estrelas pretas), (G-H). As células tratadas com $24 \mu\text{M}$ também apresentaram perfils proeminentes de retículo endoplasmático, além da presença recorrente de estrutura membranares concêntricas no interior da mitocôndria (setas pretas) e no citosol (asteriscos pretos em detalhes). N: Núcleo; M: Mitocôndria; K: Cinetoplasto; F: Flagelo; ER: Retículo endoplasmático; G: Golgi. Barras= $5 \mu\text{m}$ 19

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Detecção e isolamento de tripanossomatídeos em plantas.....	4
2	Índice de variação de formas promastigotas de <i>P. serpens</i> tratadas com NaF. As células não tratadas representam o controle negativo, o controle positivo foi realizado com (CCCP) e concentrações de (6, 12 e 24µM) de NaF.....	14

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

NaF (E)-1-fenil-3- α naftilprop-2-en-1-ona
B.O.D Biochemical Oxygen Demand (Demanda Bioquímica de oxigênio)
CCCP (Carbonilcianeto 4-clorofenilhidrazona)
DMSO Dimetilsulfóxido
H₂DCFA (2', 7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato)
H₂O₂ Péroxido de Hidrogênio
PI Iodeto de propídeo
IC₅₀ Concentração Inibitória de 50%.
IV Índice de variação
PBS Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato salino)
Rh123 Rhodamine 123
ROS Reactive Oxygen Species
SFB Soro Fetal Bovino
($\Delta\psi_m$) Despolarização do potencial mitocondrial
FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz
UFS Universidade Federal de Sergipe

RESUMO

SANTOS, Tamiris Aparecida de Carvalho. **Análise dos efeitos do derivado da chalcona, (E)-1-fenil-3-naftilprop-2-en-1-ona (NaF), em *Phytomonas serpens*.** São Cristóvão: UFS, 2020. 42p. (Dissertação – Mestrado em Agricultura e Biodiversidade).*

O protozoário *Phytomonas serpens* pertence à família Trypanosomatidae. Esse fitoparasita apresenta relação de parasitismo com *Solanum lycopersicum* (L). (tomate), e tem sido usado como um modelo biológico para bioensaios com tripanossomatídeos. As chalconas são cetonas α , β insaturadas de ocorrência natural produzida no metabolismo secundário de plantas. Na síntese da chalcona podem ser feitas diferentes modificações, às quais dão origem aos derivados da chalcona, esses possuem a estrutura fundamental da chalcona e substituição de grupos químicos aos anéis aromáticos. Estas moléculas apresentam várias atividades biológicas entre as quais estão ações antibacteriana, antifúngica, antiprotozoária. A atividade antimicrobiana de moléculas contendo naftaleno também é relatada na literatura científica e o derivado (E)-1-fenil-3- α naftilprop-2-en-1-ona (NaF) apresenta substituição do anel benzeno B por um anel naftaleno. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiprotozoária e o efeito do derivado de chalcona (NaF) sobre a morfologia e fisiologia de formas promastigotas de *P. serpens*. O isolado de *P. serpens* utilizado foi doado da coleção de tripanossomatídeos da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). As promastigotas foram mantidas em meio Schneider suplementado com soro fetal bovino a 10% e antibiótico streptomomicina 1% e incubados em B.O.D. à $24 \pm 1^\circ\text{C}$. A atividade antiprotozoária de NaF foi avaliada através dos bioensaios de proliferação celular e efeito permanente na proliferação celular. Os efeitos fisiológicos avaliados foram integridade da membrana plasmática, as determinações dos níveis de ROS e despolarização do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) por espectrofotometria e citometria de fluxo, enquanto que os morfológicos por microscopia eletrônica de varredura e transmissão. Os resultados demonstraram que o tratamento com NaF após 24 h promove redução da proliferação celular de *P. serpens* (IC_{50} 21,52 μM), além de afetar processos fisiológicos importantes, como o balanço oxidativo e o potencial de membrana mitocondrial. As concentrações de 48 e 96 μM promoveram efeito permanente, uma vez que as promastigotas expostas a essas concentrações apresentaram crescimento reduzido. A concentração de 24 μM promove inchaço da bolsa flagelar e perda de flagelo nas formas promastigotas, além de formação de estruturas membranares concêntricas no interior da mitocôndria do parasita. No entanto, o fenótipo mais recorrente foi a autofagia, incluindo o aparecimento de autofagossomos, detectados em diferentes níveis de degradação, e o aparecimento de retículo endoplasmático. Assim, pode-se concluir que NaF apresenta atividade antiprotozoária sobre *P. serpens*. Os efeitos observados após tratamento com NaF são perda de flagelo e fenótipo de autofágico.

Palavras-chave: Tripanossomatídeos, estresse oxidativo, antiproliferativa, naftaleno, flagelo, fitomonas.

* Comitê Orientador: Roberta Pereira Miranda Fernandes – UFS (Orientadora)

ABSTRACT

SANTOS, Tamiris Aparecida de Carvalho. **Analysis of the effects from chalcone derivative, (E) -1-phenyl-3- α naphthylprop-2-en-1-one (NaF), in *Phytomonas serpens*.** São Cristóvão: UFS, 2020. 42p. (Dissertation– Mestrado em Agricultura e Biodiversidade).*

The protozoan *Phytomonas serpens* belongs to the Trypanosomatidae family. This phytoparasite has a parasitism relationship with *Solanum lycopersicum* (L). (tomato), and has been used as a biological model for trypanosomatid bioassays. Chalcones are α , β insaturated cetons naturally occurring produced in plant secondary metabolism. In the chemical synthesis different modifications in chalcone can be made giving chalcone derivatives. These have the fundamental structure of chalcone and substitution of chemical groups to aromatic rings. These molecules presents several biological activities such as antibacterial, antifungal and antiprotozoal. The antimicrobial activity of molecules containing naphthalene is also well reported in the scientific literature and the derivative (E) -1-phenyl-3- α naphthylprop-2-en-1-one (NaF) presents substitution of the benzene ring B for a naphthalene ring. The objective of this work was to evaluate the antiprotozoal activity and the effect of the chalcone derivative (NaF) on the morphology and physiology of promastigote forms of *P. serpens*. The *P. serpens* isolate used was donated from the collection of trypanosomatids of the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz). Promastigotes were maintained in Schneider medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% streptomycin antibiotic and incubated in B.O.D. at $24 \pm 1^\circ\text{C}$. The NaF derivative was synthesized and characterized at the Chemistry Department of the Federal University of Sergipe. The antiprotozoal activity of the NaF was evaluated through bioassays of cell proliferation and permanent effect. The physiological effects evaluated were integrity of the plasma membrane, determination of ROS levels and depolarization of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) by spectrophotometry and flow cytometry, while the morphological ones by scanning and transmission electron microscopy. The results showed that treatment with the NaF after 24h promotes a reduction in the cell proliferation of *P. serpens* (IC_{50} 21.52 μM), in addition to affecting important physiological processes, such as the oxidative balance and the potential of the mitochondrial membrane. The concentrations of 48 and 96 μM promoted a permanent effect, since the promastigotes exposed to these concentrations showed reduced growth. The concentration of 24 μM promotes swelling of the flagellar pocket and loss of flagellum in promastigote forms, in addition to the formation of concentric membrane structures within the parasite's mitochondria. However, the most recurrent phenotype observed was autophagy, including the appearance of autophagosomes, detected in different levels of cargo degradation, and endoplasmic reticulum profiles. Thus, it can be concluded that NaF showed antiprotozoal activity against *P. serpens*. The observed effects after NaF treatment were flagellum loss and autophagy phenotype.

Keywords: Trypanosomatids, oxidative stress, antiproliferative, naphthalene, scourge, phytomonas.

* Supervising Committee: Roberta Pereira Miranda Fernandes – UFS (Orientadora)

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os protozoários são micro-organismos unicelulares que podem infectar animais e plantas. Diversas doenças são causadas por protozoários, dentre as mais importantes estão as Leishmanioses na forma visceral e cutânea e a doença de Chagas.

O gênero *Phytomonas* pertence à família Trypanosomatidae, e agrupa espécies de protozoários flagelados que são parasitas de plantas. Dentre essas, algumas espécies de importância agrícola como coco, dendê, café, mandioca. Os parasitos podem infectar ductos de látex, floema, frutos e flores de plantas hospedeiras.

A *Phytomonas serpens* (Gibbs) é um tripanossomatídeo flagelado com alto grau de polimorfismo que parasita frutos do tomateiro (*Solanum esculentum*). Diferente das demais espécies do gênero *Phytomonas* que são encontradas no látex e na seiva de plantas, *P. serpens* parasita frutos. Dessa forma, é de fácil isolamento e manutenção em cultivos *in vitro*, sendo considerada um excelente modelo de estudo para as outras espécies do gênero *Phytomonas* e outros tripanossomatídeos. Essa espécie também apresenta moléculas e proteínas similares as de *Leishmania* ssp e *Trypanosoma* ssp., tripanossomatídeos de importância para a saúde. Por esses motivos, *P. serpens* tem sido utilizado como uma importante ferramenta de estudos bioquímicos e moleculares, não só de fitoparasito, mas também de parasitos de importância médica.

As principais espécies de fitomonas patogênicas são *Phytomonas staheli*, agente etiológico de doenças como murcha de fitomonas em coqueiros (*cocos nucifera*), doença denominada “hartrot”, “Marchitez sorpresiva” em dendezeiros (*Elaeis guineensis*) e a espécie *Phytomonas leptovosorum*, agente etiológico da necrose do cafeeiro. Tanto a necrose do cafeeiro quanto a murcha de fitomonas representam um potencial risco, uma vez que o Brasil se destaca como um dos principais produtores de café e coco no mercado mundial. O tratamento de doenças agrícolas causadas por protozoários baseia-se apenas no controle preventivo no qual é realizada a erradicação de plantas infectadas e controle de insetos vetores nas áreas de cultivos agrícolas. Por isso há necessidade de estudo de moléculas com atividade antiprotozoária sobre diferentes espécies de fitomonas.

Diversos compostos têm sido estudados visando o controle de tripanossomatídeos. Dentre esses se destaca a molécula chalcona (1,3-diaril-2-propan-1-ona) que são cetonas aromáticas constituídas de um sistema carbonila α β -insaturada que une dois anéis aromáticos. As chalconas podem ser de origem natural ou sintética. As plantas sintetizam chalconas no metabolismo secundário e as chalconas sintéticas são comumente obtidas por meio da reação de condensação de Claisen-Schmidt, reações simples e de baixo custo.

Os derivados de chalconas são obtidos por meio de modificações na molécula na estrutura fundamental da chalcona, como a substituição de grupos químicos nos anéis aromáticos. As modificações são de extrema importância, uma vez que influenciam no espectro de atividade biológica. Dentre as atividades dos derivados de chalconas já documentadas estão antiinflamatória, antioxidante, antibacteriana, larvicida, antifúngica, antitumoral, antiprotozoária.

O derivado de chalcona (E)-1-fenil-3- α naftilprop-2-en-1-ona (NaF) é formado pela substituição do anel B da chalcona por um anel naftalênico. As propriedades antimicrobianas dos derivados contendo naftaleno têm sido reportadas na literatura com diversos estudos com micro-organismos. O derivado NaF apresenta atividade antiprotozoária sobre as formas promastigotas de *P. serpens*, no entanto, seus efeitos na fisiologia e morfologia desse tripanossomatídeo ainda são desconhecidos.

As chalconas e seus derivados representam uma alternativa com viabilidade econômica para o tratamento de doenças causadas por *Phytomonas* ssp. Logo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do derivado NaF na fisiologia e na morfologia de promastigotas de *P. serpens*.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a atividade antiprotozoária do derivado de chalcona NaF e seus efeitos na morfologia e na fisiologia de promastigotas de *Phytomonas serpens*.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a viabilidade de promastigotas de *P. serpens* tratadas com NaF;
- Determinar a concentração mínima inibitória (IC₅₀) de NaF sobre promastigotas de *P. serpens*;
- Avaliar os efeitos morfofisiológicos de NaF sobre promastigotas de *P. serpens*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Trypanosomatidae

Os protozoários são importantes microrganismos causadores de diversas doenças em todo mundo. A família Trypanosomatidae pertence ao Reino Protista, Sub-reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Sub-filo Mastigophora, Classe Zoomastigophora, Ordem Kinetoplastida e Subordem Trypanosomatina (LEVINE et al., 1980).

A família Trypanosomatidae é composta por nove gêneros (*Leishmania*, *Trypanosoma*, *Endotrypanum*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Rhynchoidomonas* e *Phytomonas*). A classificação das espécies, nesses gêneros, envolve os aspectos morfológicos dos parasitos e especificidade em relação aos hospedeiros. Dentre as características desses microrganismos, pode-se citar a presença de um único flagelo, e as organelas glicossomos e cinetoplasto (Figura 1) (ELIAS, 2009).

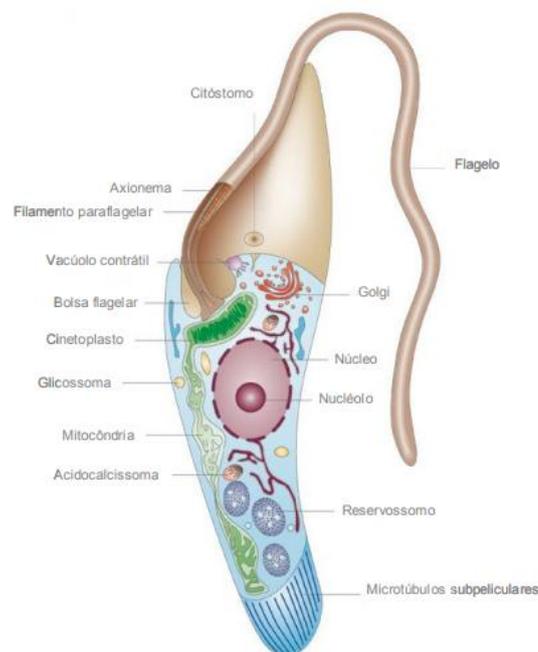


Figura 1. Representação esquemática da morfologia dos tripanossomatídeos (Adaptado DOCAMPO et al., 2005).

Alguns gêneros da família Trypanosomatidae apresentam importância à saúde humana. O gênero *Leishmania* é formado por espécies que causam as diversas formas de leishmanioses (visceral, mucocutânea e cutânea). A leishmaniose é uma doença infecciosa transmitida por mosquitos flebótomos do gênero *Lutzomyia* spp. contaminado por tripanosomatídeos do gênero *Leishmania* (ROCHA; PETRONI, 2017). A leishmaniose é considerada uma doença negligenciada de ocorrência global, porém predominante em áreas de populações vulneráveis como a África, Ásia e Américas. Em 2017 foram relatados 49.959 novos casos à Organização Pan-Americana da Saúde (SisLeish-PAHO/WHO) por cidades endêmicas (PAHO/WHO, 2019). No Brasil essa doença é endêmica, sendo a região nordeste com maior número de casos (PAHO/WHO, 2019; MELOS; ECHEVARRIA, 2012). O gênero *Trypanosoma* possui espécies que são agentes patológicos de importantes doenças, como por exemplo, a doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*). A doença de Chagas é considerada uma doença tropical negligenciada, crônica e endêmica em 21 países das Américas, afetando aproximadamente 6 milhões de pessoas. Estima-se que cerca de 70 milhões de pessoas vivem expostas ao risco de contrair essa doença. No Brasil, dados registrados em 2017 do Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) demonstram 4.543 óbitos devido à doença de Chagas. Essa doença é uma das quatro maiores causas de mortes por doenças infecciosas e parasitárias no Brasil (PAHO, 2019; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

3.1.1 O gênero *Phytomonas*

O gênero *Phytomonas* da família Trypanosomatidae é formado por protozoários flagelados que são parasitos de plantas (COSTA, 2006). Essa classe de parasito foi descrita pela primeira vez no Mediterrâneo, no látex de *Euphorbia pilulifera* por Lanfon (1909). Os parasitos encontrados foram nomeados *Leptomonas david* e posteriormente reclassificados em um novo gênero *Phytomonas* por Donovan (CAMARGO, 1999).

Esse gênero é composto por 200 espécies que parasitam cerca de 20 famílias de plantas, dentre essas são afetadas importantes culturas agrícolas, tais como coco, dendê, café e mandioca (Tabela1). As espécies de fitomonas apresentam distribuição global e já foram isoladas de diversos tecidos vegetais, tais como ductos de látex, floema, frutos, sementes e flores de plantas hospedeiras (COSTA, 2006; CAMARGO, 1999; SCHWELM et al., 2017; JASKOWSKA et al., 2015).

Tabela 1. Detecção e isolamento de tripanossomatídeos em plantas.

Hospedeiro	Referências
Amora (<i>Morus</i> sp.)	Cavazzana et al.
Bergamota (<i>Citrus bergamia</i>)	Conchon et al.
Café (<i>Coffea arabica</i>)	Stahel; Felts
Caju (<i>Anacardium occidentale</i>)	Conchon et al.
Carambola (<i>Averhoa carambola</i>)	Conchon et al.
Caruru (<i>Amaranthus retroflexus</i>)	Sánchez-Moreno et al.
Cherimolia (<i>Annona cherimolia</i>)	Sánchez-Moreno et al.
Coqueiro (<i>Cocos nucifera</i>)	Parthasarathy et al.
Espécies de <i>Euphorbia</i>	Attias e De Souza; Fiorini et al.
Feijão guandu (<i>Cajanus flavus</i>)	Cavazzana et al.
Jiló (<i>Solanum gilo</i>)	Fiorini et al.
Laranja (<i>Citrus aurantium</i>)	Fiorini et al.; Carrara et al.
Leguminosas	Itow-Jankevicius et al.
Maçã (<i>Malus</i> sp.)	Cavazzana et al.
Mandioca (<i>Manihot palmata</i> ; <i>M. esculenta</i>)	Aragão; Vainstein et al.
Manga (<i>Mangifera indica</i>)	Sánchez-Moreno et al.
Milho (<i>Zea mays</i>)	Itow-Jankevicius et al.
Palmeira	Dollet et al.
Pêssego (<i>Prunus persica</i>)	Conchon et al.
Pitanga (<i>Eugenia</i> spp.)	Cavazzana et al.
Romã (<i>Punica granatum</i>)	Catarino et al.
Tangerina (<i>Citrus reticulata</i>)	Conchon et al.
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Gibbs; Fiorini et al.; Jankevicius et al.
<i>Trifolium glomeratum</i>	Sánchez-Moreno et al.
Urucum (<i>Bixa orellana</i>)	Sánchez-Moreno et al.
Uva (<i>Vitis vinifera</i>)	Almeida et al.
	Carrara et al.

Fonte: YOMADA-OGATTA, et al. (2015).

De forma geral, apenas duas espécies demonstram ser altamente patogênicas para as plantas, são elas a *Phytomonas staheli*, agente etiológico de doenças como murcha de fitomonas em coqueiros (*Cocos nucifera*), também denominada “Hartrot” e “Marchitez sorpresiva” em dendezeiros (*Elaeis guineensis*) e a espécie *Phytomonas leptovosorum*, agente etiológico da necrose do cafeeiro (JASKOWSKA et al., 2015).

Uma característica comum entre as espécies *Phytomonas staheli* e *Phytomonas leptovosorum* é o habitat, ambas as espécies habitam exclusivamente do floema em seu ciclo de vida na planta. A necrose do cafeeiro representa um potencial risco, uma vez que o Brasil se destaca como um dos principais produtores de café no mercado mundial, com estimativa de safra de 49,31 milhões de toneladas em 2019 (JASKOWSKA et al., 2015; SCHWELM et al., 2017; CONAB, 2019). É importante ressaltar que não há registros de tratamentos eficazes contra doenças de fitomonas, sendo a única a alternativa de controle baseada na erradicação de plantas infectadas (Figura 2) (JASKOWSKA et al., 2015).

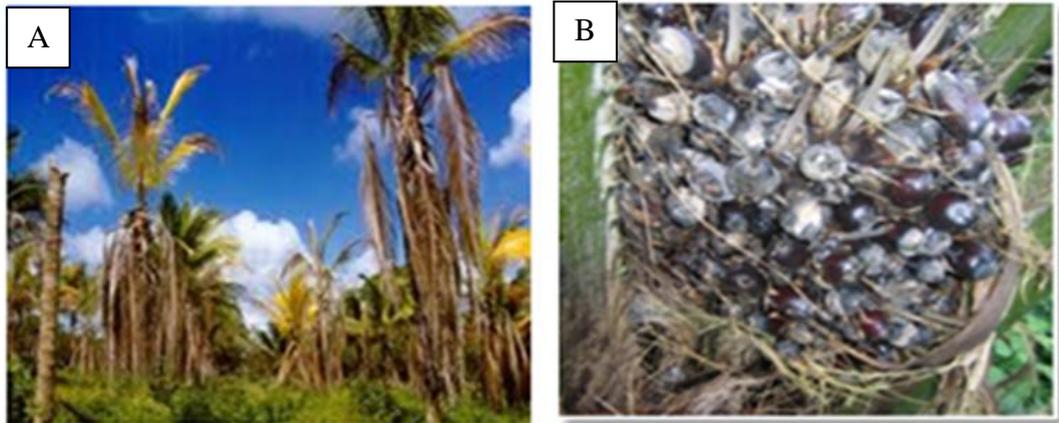


Figura 2. Murcha de fitomonas em coqueiro (Hartrot) (A), Marchitez sorpressiva em palmeiras produtoras de óleo (B), ambas causadas pela *Phytomonas staheli*.

Fonte: (A) <http://www.ceplac.gov.br/>, (B) <http://www.google/marchitez sorpressiva.com.br>

O ciclo de vida das fitomonas *Phytomonas* inclui o processo de transmissão que ocorre por vetores insetos fitófagos das famílias Coreidae, Lygaeidae, Pyrrhocoridae e Pentatomidae (BATISTOTI et al., 2001). A propagação ocorre nos tecidos vegetais, mais precisamente no floema, látex e nos frutos. A transmissão tem caráter persistente e propagativo, uma vez que o inseto infectado apresenta esses parasitos por todo trato digestivo, hemolinfa e nas suas glândulas salivares (Figura 3) (COSTA, 2006).

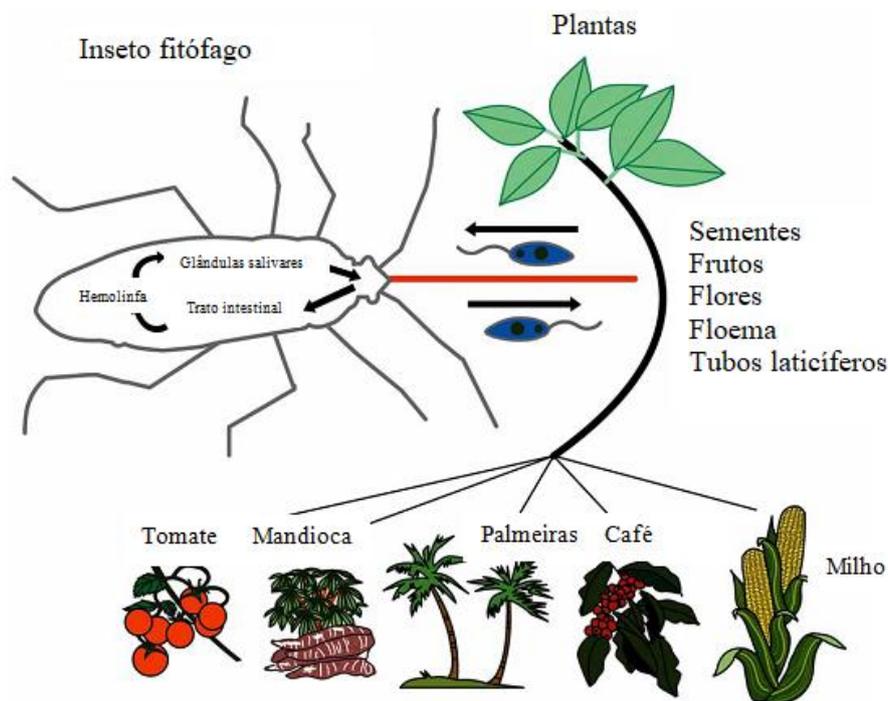


Figura 3. Ciclo de vida e transmissão de *Phytomonas* spp. Parasitos ingeridos por insetos fitófagos atingem o trato intestinal e passam pela hemocele, migram pela hemolinfa para infectar as glândulas salivares. O inseto infectado transmite os parasitos via saliva quando se alimentam de outras plantas. Ilustração das principais culturas afetadas por *Phytomonas* spp. Fonte: LOPES et al. (2010).

3.1.2 *Phytomonas serpens*

O tripanossomatídeo *Phytomonas serpens* é um parasito de tomateiros, essa espécie foi identificada pela primeira vez por Gibbs, que ao estudar a seiva de *Solanum lycopersicum* L. (tomate) observou protozoários flagelados com alto grau de polimorfismo. Esses parasitos foram classificados como específicos de tomate e denominados *Leptomonas serpens*, os quais posteriormente foram reclassificados por Podlipaev (1986) como *Phytomonas serpens* (GIBBS, 1957; JANKEVICIUS et al., 1989).

De forma geral, *P. serpens* possui similaridade celular com outras espécies do gênero *Phytomonas*, no entanto se difere dos demais por colonizar apenas frutos e dessa forma apresenta facilidade de isolamento e manutenção em cultivos *in vitro*, assim é considerado um modelo para estudos com tripanossomatídeos (COSTA, 2006).

As fitomonas durante todo seu ciclo de vida apresentam-se na forma promastigota pela definição de Hoare & Wallace (1966). Esta forma é caracterizada por um corpo celular alongado com a presença de um flagelo destacado que se projeta de uma bolsa flagelar na região anterior (JASKOWSKA et al., 2015). Tais variações estão relacionadas aos diferentes meios de cultura e hospedeiros (JANKEVICIUS et al., 1989).

Os vetores hospedeiros específicos para *Phytomonas serpens* são os hemípteros fitófagos (*Phthia picta*, família Coreidae, e *Nezara viridula*, família Pentatomidae) (ELIAS, 2009). O ciclo de vida é composto por planta-inseto, ou seja, a transmissão é feita do tomate para o inseto, e via inseto contaminando o tomate (COSTA, 2006). Os frutos infectados apresentam sintomas como a presença de manchas amareladas circulares localizadas em sua superfície. Embora a presença desse tripanossomatídeo em frutos de tomate não seja classificada como interação patogênica, ocorre depreciação na aparência do fruto, o que afeta negativamente a aceitação por parte dos consumidores (ELIAS, 2009).

A espécie *Phytomonas serpens* possui flagelo que emerge da bolsa flagelar e é preso à célula pelos corpos basais, os quais estão associados à mitocôndria. Essa bolsa é uma invaginação da membrana plasmática localizada na base do flagelo. O flagelo nos tripanossomatídeos além de ser responsável pela motilidade celular, também está envolvido com outros processos biológicos importantes, como reconhecimento celular e adesão (ROCHA et al., 2006; LANDFEAR; IGNATUSHCHENKO, 2001).

Um dos primeiros genomas de fitomonas a ser publicado foi o de *P. serpens*. Análises desse genoma demonstram a similaridade com espécies dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* que são de importância para a saúde humana, uma vez que apresentam em comum moléculas similares, tais como Gp63 relacionada à virulência em *Leishmania spp* e a cruzapaína de *Trypanosoma cruzi*. Assim, *P. serpens* tem sido considerada um fitoparasito de importância médica, devido a sua similaridade aos tripanossomatídeos *T. cruzi* e *T. brucei*, micro-organismos causadores da doença de Chagas e doença do sono, respectivamente (JASKOWSKA et al., 2015; PORCEL et al., 2014; SANTOS et al., 2007; SANTOS-JÚNIOR et al., 2018).

O estudo do gênero *Phytomonas* pela comunidade científica iniciou quando constatou-se que as espécies de tripanossomatídeos deste gênero eram agentes patogênicos responsáveis por diversas doenças graves em cultivos de interesse econômico, tais como coco (“*hartrot*”), palmeiras produtoras de óleo (“*marchitez sorpressiva*”), mandioca (“*chochamento das raízes*”) e café (necrose do floema), principalmente na América Latina (DOLLET, 1984).

3.1.3 Mecanismos de morte em tripanosomatídeos

Os três principais mecanismos de morte celular são apoptose celular (MCP), autofagia e necrose. A apoptose pode ocorrer por exposição a medicamentos, choques térmicos e condições de estresse oxidativo. A identificação de apoptose se dá por marcadores típicos de eucariotas superiores, tais como a fragmentação do DNA, externalização da fosfatidilserina na camada externa da membrana plasmática, assim como a perda de $\Delta\Psi_m$ e a liberação do citocromo C. Em tripanosomatídeos, tais indícios não são suficientes para afirmar que existe mecanismo apoptótico, logo em tripanosomatídeos o processo apoptótico ainda não é reconhecido (MENNA-BARRETO, 2019). Alguns autores relatam que a apoptose pode ser induzida por espécies reativas de oxigênio (ROS) que resulta em alterações do potencial de membrana mitocondrial. Em células de câncer HepG2 foi sugerido que as elevações dos níveis de ROS induzidas pelo derivado de chalcona foi o principal fator de indução a apoptose (ZHU et al., 2019).

A autofagia celular vem do grego (comer-se a si mesmo), neste processo ocorre digestão das organelas danificadas promovendo reciclagem e limpeza celular. A autofagia participa de importantes processos no desenvolvimento em tripanosomatídeos como crescimento e diferenciação. A autofagia é mediada por uma série de proteínas chamadas proteínas ATGs, tais proteínas regulam todas as etapas do processo autofágico. Na macroautofagia o material a ser degradado é envolvido por uma estrutura de dupla membrana chamada fagóforo, que formará o autofagossomo e encaminhará o material para a degradação lisossômica. Na microautofagia o material a ser degradado é englobado por uma invaginação da membrana do lisossoma formando pequenas vesículas de membrana única no interior dos lisossomas. A autofagia mediada por chaperonas é extremamente seletiva, nesse processo proteínas alvo se ligam a chaperonas citoplasmáticas por meio de motivos pentapeptídeos, ocorre a ligação do substrato-chaperona ao receptor LAMP-2A do tecido lisossômico, subsequentemente ocorre a dimerização do receptor e a formação de um canal, por esse canal moléculas alvo entram na organela para serem degradadas (MENNA-BARRETO, 2019).

A indução contínua da autofagia pode levar ao colapso do equilíbrio celular, resultando em morte celular autofágica, quando o controle da homeostase é perdido e passa a ocorrer autofagia intensa e a degradação de estruturas como organelas e macromoléculas. Dentre os indícios que indicam o fenótipo de autofagia estão a presença de estruturas de mielina, órgãos multivesiculares e o elevado número de autofagossomos (MENNA-BARRETO, 2019). Em tripanosomatídeos as condições de estresse, além do tratamento com drogas, induzem fenótipo autofágico, neste processo ocorre a presença de estruturas membranares concêntricas similares a fagóforos, além do aparecimento de perfis de retículo endoplasmáticos os quais são reportados como principais reservas para fagóforos (MENNA-BARRETO, 2019).

A autofagia foi observada em *Trypanosoma cruzi* exposto a naftoquinona e seus derivados. Salomão e colaboradores (2013) observaram alterações presentes na ultraestrutura do parasito, tais como perfis de retículo endoplasmático em torno de diferentes estruturas celulares como lípidios e organelas, e a presença de estruturas membranosas de mielina.

A necrose em tripanosomatídeos pode ser desencadeada por estresse químico ou físico, esse mecanismo de morte tem como principal característica a ruptura da membrana plasmática (MENNA-BARRETO, 2019). Os óleos essenciais são metabólitos secundários que têm sido utilizados em diversas áreas da biotecnologia e a atividade biológica dos óleos essenciais de plantas tem sido amplamente estudada. Os óleos essenciais de *Varronia curassavica* e *Lantana camara* apresentam atividade antiprotozoária sobre *Phytomonas serpens* (SILVA et al., 2019; PEREIRA, 2019) devido a perda da integridade da membrana plasmática desses parasitos. Os óleos essenciais apresentam caráter lipofílico e atravessam a membrana citoplasmática perturbando a estrutura de diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípidios, os danos na membrana podem resultar no vazamento de macromoléculas e lise celular (BAKKALI et al., 2008).

O estresse oxidativo é um outro fator relevante ligado ao processo de necrose celular. A mitocôndria é uma organela relacionada ao processo de produção de energia (ATP), essa organela tem sido considerada um alvo para fármacos em tripanossomatídeos. O funcionamento adequado da função mitocondrial, assim como a manutenção do potencial da membrana desta organela, são essenciais para sobrevivência celular (FIDALGO; GILLE, 2011). As espécies reativas a oxigênio (ROS) são produtos do metabolismo mitocondrial, a acumulação de ROS, assim como a despolarização da membrana mitocondrial, pode causar a disfunção da mitocôndria e resultar em morte celular (FONSECA-SILVA et al., 2015).

3.2 Chalconas

Dentre os compostos que vem sendo estudados para o controle de tripanossomatídeos estão a molécula chalcona e seus derivados. As chalconas ou (1,3-diaril-2-propan-1-ona) são cetonas aromáticas constituídas de um sistema carbonila α β -insaturada que une dois anéis aromáticos (Figura 4) (FERREIRA et al., 2018).

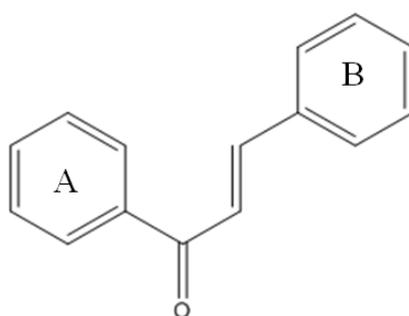


Figura 4. Estrutura da chalcona.

Esses compostos orgânicos ocorrem na natureza e são de fácil síntese em laboratório. Diversas famílias de plantas produzem chalconas a partir do metabolismo secundário, mas essas moléculas são metabólitos primários nas famílias Fabaceae, Asteraceae e Moraceae (NAPOLITANO et al., 2016; DÍAZ-TIELAS et al., 2016). As chalconas extraídas de plantas *Zuccagnia punctata* possuem atividade antifúngica no controle de fungos como *Fusarium verticillioides* e *Fusarium graminearum*, o emprego de chalconas naturais resulta em redução do crescimento micelial destes fungos fitopatogênicos (JIMENEZ et al., 2014).

As chalconas sintéticas podem ser obtidas por diversos métodos, dentre esses, a reação mais utilizada é a condensação de Claisen-Schmidt (CALVINO et al., 2006), que ocorre entre o benzaldeído e a acetofenona. Para a formação dos derivados são realizadas modificações na estrutura molecular da chalcona, as modificações ocorrem por meio da adição de grupos químicos em um ou em ambos os anéis aromáticos. Tais modificações podem alterar a eficiência biológica da molécula (BLANCO; NASCIMENTO-JÚNIOR, 2017).

Diversas modificações podem ser realizadas na chalcona de acordo com as características dos substituintes, pode-se classificar as interações quanto aos efeitos estéricos, devido a substituintes volumosos, efeitos eletrônicos, quando átomos ou substituintes com diferentes eletronegatividades, ou ainda a presença de sítio ácido/base podendo formar pontes de hidrogênio e/ou complexos intra e intermoleculares (CESARIN-SOBRINHO; NETTO-FERREIRA, 2001).

3.2.1 Atividade biológica das chalconas

Dentre as atividades biológicas dos derivados de chalconas já documentadas estão antiinflamatória, antituberculosa, antiviral, anti-HIV, antiulcerativa, anticonvulsivantes, anti-hiperglicêmica, antihistamínica, antioxidante, antibacteriana, larvicida, antifúngica, antitumoral, antiprotozoária (ROZMER; PERJÉSI, 2016; YAZDAN et al., 2015; BOCELLI, 2016; BEGUM et al., 2011; JIMENEZ et al., 2014; REBELLO, 2005; ORTALLI, et al., 2018).

Ao promover modificações na estrutura da chalcona para formação de derivados, Blanco & Nascimento-Júnior (2017) observaram que a substituição do grupo amino por um grupo nitro afetou negativamente a atividade antiprotozoária do derivado da chalcona sobre formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*, por outro lado, a adição de uma subunidade benzil promoveu aumento da atividade (BLANCO; NASCIMENTO-JÚNIOR, 2017).

A atividade antiprotozoária das chalconas e seus derivados já foi demonstrada. Quatro derivados induziram a perda da capacidade do parasito *Leishmania (Viannia) braziliensis* de infectar macrófagos (MELLO et al., 2014). A atividade leishmanicida das chalconas também foi descrita por Ortalli e colaboradores (2018), que constataram inibição “*in vitro*” de *Leishmania donovani* em formas de promastigotas e amastigotas após tratamento com dez derivados da chalcona. É importante resaltar que não foram observados efeitos citotóxicos a células humanas. As características de baixa toxicidade à humanos, aliadas à atividade leishmanicida podem indicar um potencial das chalconas para criação de drogas leishmanicidas (ORTALLI et al., 2018).

3.2.2 Derivados da chalcona contendo naftaleno

Os derivados de chalcona contendo o grupo naftaleno (naftalil) são comumente relatados e possuem atividades biológicas importantes, tais como a antimicrobiana. O derivado da chalcona onde o anel benzeno B foi substituído pelo anel naftaleno apresenta atividade antibacteriana uma vez que foi observada uma redução de cerca de 48,8% na biomassa e 60,2% na viabilidade do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* (BOCELLI, 2016).

A atividade antiprotozoária de uma série de dez derivados de chalconas foi avaliada em formas promastigotas de *P. serpens*, foi possível constatar que a presença da metoxila nos anéis A e B de chalconas derivadas do anel benzeno melhoram a atividade sobre os parasitos (SOUZA, 2019).

No estudo de dez derivados da chalcona, um deles apresentou maior atividade antiprotozoária em *P. serpens*, esse possui em sua estrutura a substituição do anel benzeno B da estrutura fundamental da chalcona por um anel naftaleno, tal substituição pode estar relacionada ao aumento da atividade antiprotozoária deste derivado (SOUZA, 2019).

As substituições de ambos os anéis podem alterar a eficiência dos derivados de chalcona, dois derivados nos quais foram igualmente substituídos o anel benzeno pelo anel naftaleno no anel B, e com diferentes substituintes no anel A, apresentaram diferentes atividades (SOUZA, 2019). Foi possível constatar que a inserção de um grupo metilendioxido no anel A promoveu aumento da atividade antiprotozoária em relação a formas promastigotas de *P. serpens* quando comparado a substituição por um grupo metoxi (SOUZA, 2019).

Além dos estudos com micro-organismos, diversos derivados de chalconas contendo o naftaleno têm sido avaliados quanto à sua atividade inibitória sobre células que causam câncer, Park e colaboradores (2018) mostraram que o tratamento com derivado de chalcona contendo o naftaleno promoveu a geração de ROS em células de câncer de colón.

Os derivados de chalcona com contendo anel naftaleno substituído ao anel benzeno B da chalcona, ou também chamadas 1-naftil chalconas são capazes de induzir morte celular apoptótica em células de câncer de mama, indicando o potencial das chalconas naftalênicas para estudos relacionados à saúde (WANG et al., 2020).

Outro estudo demonstrou o efeito de um derivado de chalcona contendo o naftaleno no anel B e duas unidades metoxi no anel A, a estrutura nomeada como (2E)-1-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-3-(1-naphthyl)-2-propene-1-one ou A23 reduziu a viabilidade de células malignas hematológicas sem demonstrar efeito citotóxico em células normais (MAIORAL et al., 2017).

Não há tratamento efetivo para doenças causadas por fitomonas e o screening de novas moléculas é dificultado pelas dificuldades de isolamento e manutenção no laboratório das espécies fitopatogênicas. Os derivados da chalcona podem apresentar uma possibilidade de desenvolvimento de tratamento, uma vez que são de fácil síntese e de baixo custo. Para o desenvolvimento de um novo produto, estudos detalhados de uma molécula sobre organismos ou célula são necessários. NaF possui forte atividade antiprotozoária sobre *P. serpens*, no entanto até o presente momento não há estudos relacionados aos efeitos morfológicos e fisiológicos de NaF sobre as células destes tripanossomatídeos.

4. METODOLOGIA

4.1. Síntese e caracterização do derivado da chalcona NaF

O derivado da chalcona (E)-1-fenil-3- α naftilprop-2-en-1-ona (NaF) foi sintetizado através da condensação aldólica (condensação de Claisen-Schmidt), a identificação e caracterização foi realizada por espectrometria de absorção na região do infravermelho (FTIR), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e detector de ionização em chama (CG/EM/DIC), espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C (DEPT135 $^\circ$), espectrometria de massas de alta resolução (EMAR), conforme descrito em Souza (2019). NaF foi obtido por meio de doação do Prof. Péricles Barreto Alves do Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe. A estrutura da chalcona (A) e estrutura de NaF (B) (Figura 5). A dissolução de NaF foi realizada com solvente dimetilsulfóxido (DMSO) à 1%.

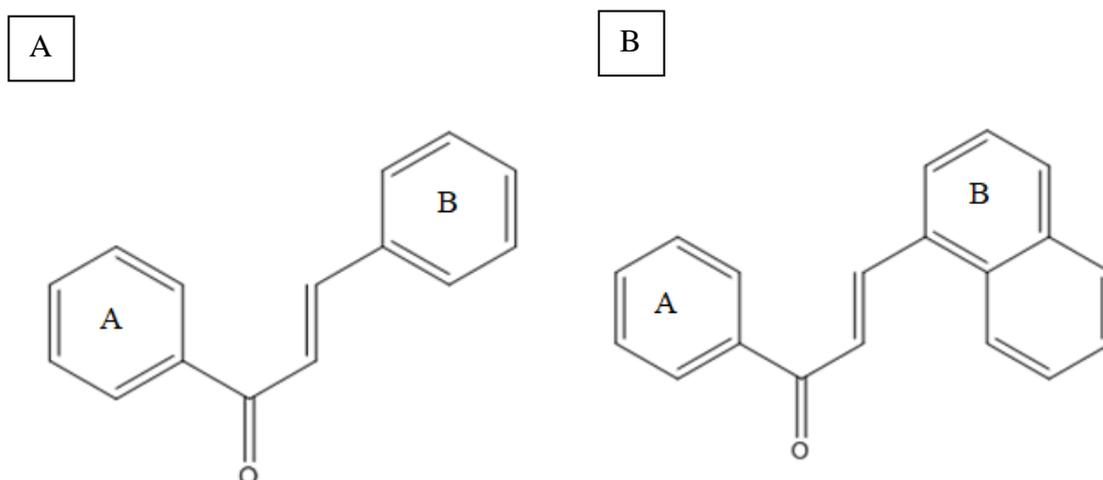


Figura 5. Estrutura da chalcona (A), estrutura de NaF (E)-1-fenil-3- α naftilprop-2-en-1-ona (B). Fonte: Souza (2019).

4.2. Manutenção das promastigotas de *Phytomonas serpens*

O isolado de *Phytomonas serpens* (9T) foi obtido por meio de doação da coleção de tripanossomatídeos da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ. As formas promastigotas de *P. serpens* foram mantidas e cultivadas em meio Schneider suplementado com soro fetal bovino a 10% e antibiótico streptomomicina 1%. As culturas foram incubadas em B.O.D à 24 ±1°C.

4.3. Atividade antiprotozoária de NaF

4.3.1. Efeito de NaF na proliferação celular de *P. serpens* por contagem direta em câmara de Neubauer

As promastigotas (1.10^6 células/mL) foram cultivadas na ausência (meio de cultura suplementado) e em presença de diferentes concentrações (6-96 µM) de NaF. As células foram incubadas durante 24 h em B.O.D à 24 ±1°C. A contagem dos parasitos foi realizada em câmara de Neubauer em microscópio óptico na objetiva de 10X.

4.3.2. Efeito permanente de NaF na redução da proliferação celular

As promastigotas (5.10^5 células/mL) foram cultivadas em ausência de NaF (meio de cultura suplementado) e presença de diferentes concentrações (12-96 µM) de NaF. As células foram incubadas durante 24h em B.O.D à 24 ±1°C e após incubação as células foram submetidas a cinco lavagens em PBS (tampão fosfato salino). Após lavagem 1.10^5 células/mL foram reinoculadas em placa de 12 poços contendo meio de cultura suplementado livre de NaF. A proliferação celular foi avaliada no período de 72 horas através de contagens diárias em câmara de Neubauer e microscópio óptico na objetiva de 10X.

4.3.3. Análise dos níveis de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são subprodutos do metabolismo oxidativo. O H₂DCFDA é uma sonda permeável não fluorescente, mas que na presença de ROS celular emite fluorescência verde indicando células em estado oxidativo. Os níveis de ROS foram determinados utilizando H₂DCFDA. Promastigotas (1.10^6 células/mL) foram cultivadas em ausência e presença de diferentes concentrações (6-24µM) de NaF e incubadas durante 24h em B.O.D à 24 ±1°C. Após o período de incubação, 1.10^7 células/mL foram ressuspensas em PBS e incubadas com H₂DCFDA (20µM) por 30 minutos. Simultaneamente foi preparado o controle positivo, no qual células cultivadas em meio de cultura, livre de NaF, foram incubadas por 30 minutos em 750 µM de H₂O₂ e também coradas com o H₂DCFDA. A fluorescência foi medida no comprimento de onda (492/527nm) por meio de espectrofotômetro leitor de microplaca (modelo Synergy H1 e auxílio do programa Gen52.06).

4.3.4. Análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

Para avaliar o efeito de NaF sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) foi utilizada Rodamina 123 (Rh123), uma sonda fluorescente lipofílica e catiônica (GARNER et al., 1997; GRAVANCE et al., 2000). As promastigotas (1.10^6 células/mL) foram cultivadas na ausência e na presença de diferentes concentrações (6, 12 e 24 µM) de NaF e incubadas durante 24h em B.O.D à 24 ±1°C. Como controle positivo, foram utilizadas células cultivadas em meio de cultura livre de NaF e incubadas com CCCP (50 µM) durante 15 minutos em ausência de luz. Como controle negativo, foram usadas células cultivadas livres de NaF (CN). As células foram coradas com Rodamina 123 (10µg/mL) em ausência de luz por 15 minutos e analisadas por citometria de fluxo em Citômetro Attune® Acoustic Focusing (Life Technologies) no comprimento de onda de 515/575nm (excitação/emissão). Um total de 10.000 eventos foram adquiridos e analisados pelo programa Attune® Cytometer Software.

O índice de variação (IV) foi determinado pela equação $(MT - MC)/MC$, no qual MT representa a média de fluorescência dos parasitos tratados, e MC a média de fluorescência dos não tratados.

4.3.5. Análise da integridade da membrana plasmática

Para a avaliação da integridade da membrana celular foi utilizado o Iodeto de Propídeo (PI), um marcador de DNA fluorescente. Esse marcador penetra nas células quando ocorre perda da integridade da membrana celular. As formas promastigotas (1.10^6 células/mL) foram cultivadas em ausência e presença de diferentes concentrações (6, 24 e $96\mu\text{M}$) de NaF e incubadas durante 24h em B.O.D à $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Após o período de incubação, 1.10^7 células/mL ressuspendidas em PBS (tampão fosfato salino) foram incubadas com PI ($20\mu\text{M}$) por 30 minutos em ausência de luz. Simultaneamente foi preparado o controle positivo, no qual foram utilizadas células cultivadas em meio de cultura livre de NaF que foram incubadas em banho-maria por 10 minutos a 80°C . A fluorescência foi medida no comprimento de onda (493/632nm) por meio de espectrofotômetro leitor de microplaca (modelo Synergy H1 e auxílio do programa Gen52. 06).

4.3.6. Microscopia eletrônica de transmissão e varredura

Para avaliar o efeito de NaF na ultraestrutura de *P. serpens*, promastigotas (5.10^6 células/mL) foram cultivadas em ausência (meio de cultura livre de NaF) e presença da concentração de $24\mu\text{M}$ de NaF, por 24h em B.O.D à $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Após incubação, as células foram submetidas a três lavagens em PBS (tampão fosfato salino) e fixadas em tampão glutaraldeído 2,5% em cacodilato 0,1 M (pH 7,2) em temperatura ambiente 25°C , por 40 minutos. As células foram pós-fixadas em solução 1% de tetróxido de ósmio (OsO_4), 0,8 % de ferricianeto de potássio e 2,5 Mm (cloreto de cálcio) CaCl_2 por 20 minutos a 25°C . A desidratação das células foi realizada com acetona em série ascendente. Após esse processo foi realizada a infiltração em resina PolyBed 812. Seções ultrafinas foram coradas com acetato de uracila e citrato de chumbo e examinadas utilizando o microscópio eletrônico de transmissão JEOL1011 (Tokyo, Japão).

Alternativamente, os parasitos fixados e pós-fixados foram desidratados em série ascendente de etanol, o processo de secagem foi realizado pelo método de CO_2 crítico, montadas em “stub” de alumínio e revestidas com uma camada de ouro de 20nm de espessura. As análises foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM6390LV (Tóquio, Japão). Todas as análises ultraestruturais foram realizadas na plataforma de Microscopia eletrônica, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ.

4.3.7. Efeito de NaF na redução do número promastigotas flageladas

Para quantificar o efeito de NaF na redução do número de promastigotas flageladas, células (1.10^6 células/mL) foram cultivadas em ausência de NaF e na presença de $24\mu\text{M}$ de NaF por 24h em B.O.D à $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Após incubação, as células foram fixadas em metanol e coradas com corante Giemsa, as lâminas foram avaliadas sob microscópio óptico. A quantificação foi realizada pela leitura de quatro campos para cada lâmina pela contagem do número total de promastigotas e de promastigotas flageladas. A porcentagem de % redução de flagelos foi calculada em relação a quantidade total de promastigotas visualizadas por campo de leitura.

4.4. Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão. A IC_{50} foi calculada por regressão sigmoidal, as análises dos dados foram realizadas com auxílio do programa GraphPad Prism 7.01. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando Two-Way ANOVA e médias foram comparadas por teste t, Dunnett e teste de Tuckey ($p^* < 0,05$, $p^{**} < 0,01$, $p^{***} < 0,001$).

5. RESULTADOS

5.1. Efeito de NaF na proliferação celular de *P. serpens*

Todas as concentrações de NaF promoveram a redução da proliferação celular de *P. serpens* (Figura 6). A IC_{50} , calculada por contagem direta em câmara de Neubauer, foi de 21,52 μM . As concentrações de 48 e 96 μM apresentaram a maior eficiência em reduzir a proliferação celular, pois resultaram em 66,9% e 75,4 % de redução do crescimento.

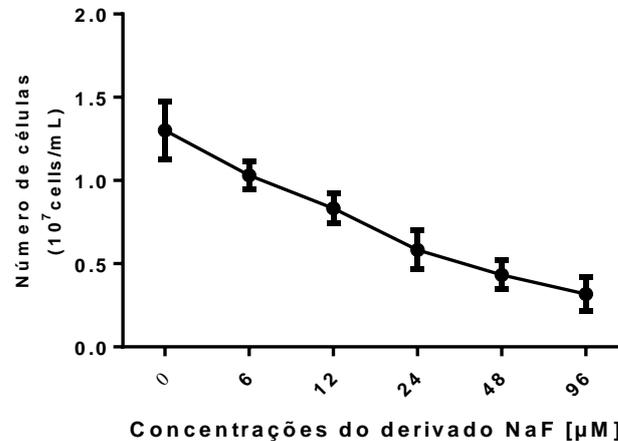


Figura 6. Efeito de NaF na proliferação celular de *Phytomonas serpens*. Promastigotas (1×10^6 células) foram cultivadas em meio Schneider na ausência e na presença de NaF (6-96 μM) por 24 horas à 26°C. A proliferação celular foi determinada por contagem direta dos parasitos em câmara de Neubauer.

Nossos resultados também demonstram o efeito permanente na redução da proliferação celular em promastigotas expostas às concentrações de 48 e 96 μM de NaF (Figura 7). Após 72h de reinoculação as concentrações de 48 e 96 μM apresentaram crescimento reduzido em relação ao controle. As porcentagens de redução de crescimento foram de 89,78 e 94,8%, respectivamente.

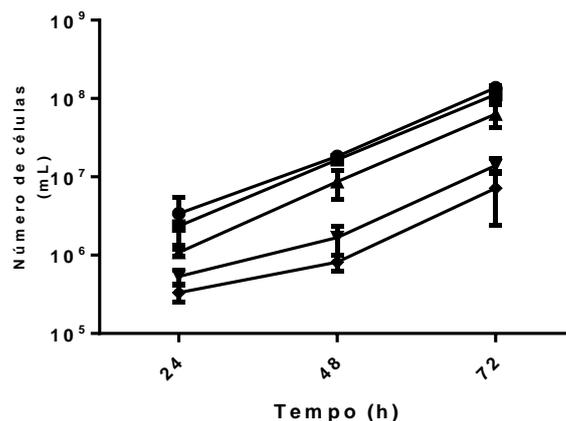


Figura 7. Avaliação do efeito permanente na proliferação das formas promastigotas de *P. serpens* tratadas com (●) CN-células não tratadas, (■) 12, (▲) 24, (▼) 48 e (◆) 96 μM de NaF. Parasitos (1×10^6 células) foram cultivadas em meio Schneider na ausência e na presença de NaF (12-96 μM) por 24 horas a 26°C. Após tratamento 1×10^5 células foram reinoculadas em meio de cultura Schneider livre de NaF. A proliferação celular após exposição ao NaF foi obtida por contagem direta em câmara de Neubauer no período de (24 a 72h). Os dados foram representados pela média \pm E.P de experimentos em triplicata.

5.2. Análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

Todas as concentrações de NaF induziram alterações do potencial mitocondrial (Figura 8).

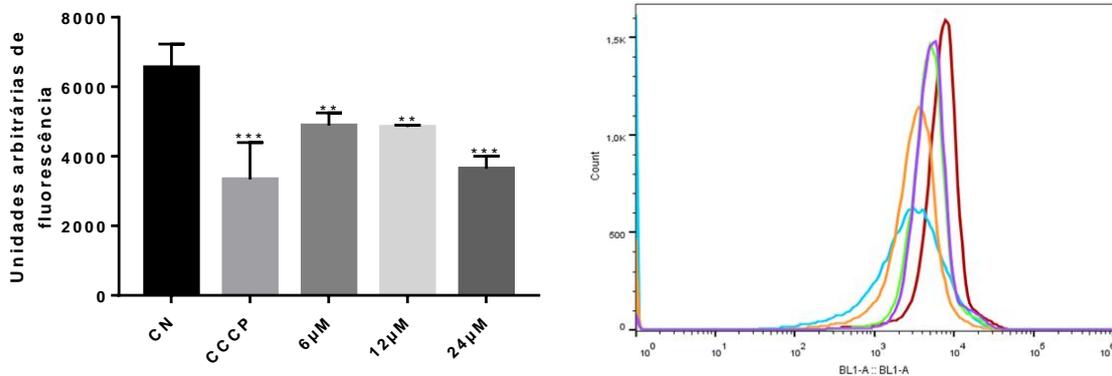


Figura 8. Alterações no ($\Delta\psi_m$) de formas promastigotas de *P. serpens* tratadas com NaF. Parasitos (1×10^7 células) foram tratadas com 6, 12 e 24 μM de NaF (correspondente a $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ e 1 X IC_{50}). Células não tratadas (CN) foram utilizadas para o controle negativo. Células incubadas com CCCP (Carbonil cianeto 4-clorofenilhidrazona, $50 \mu\text{M}$) foram utilizadas como controle positivo. As células foram coradas com Rodamina 123 por 30 minutos a 26°C . A fluorescência foi determinada por citometria de fluxo. Os dados de médias de fluorescência representados pela média \pm E.P. As diferenças estatísticas foram analisadas por ANOVA e teste de Dunnett, (*), (**) e (***) indicam diferença estatística em relação ao controle não tratado(A). Histograma representativo do potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de *P. serpens* tratadas (6 μM , 12 μM , 24 μM) de NaF, controle negativo (células vivas coradas com Rodamina 123), o CCCP foi utilizado como controle positivo. As células foram analisadas por citometria de fluxo(B).

O índice de variação (IV) é determinado pela equação $(\text{MT}-\text{MC})/\text{MC}$, onde MT representa a fluorescência de parasitos tratados, e MC a média da fluorescência de parasitos não tratados. Índices de variação com valores negativos indicam despolarização da membrana mitocondrial. Todas as concentrações de NaF induziram a despolarização em relação ao controle não tratado. A concentração de 24 μM induziu despolarização da membrana com valor de IV de -0,443, o tratamento 24 μM foi estatisticamente igual ao controle positivo CCCP (Tabela 2).

Tabela 2. Índice de variação de formas promastigotas de *P. serpens* tratadas com NaF. As células não tratadas representam o controle negativo, o controle positivo foi realizado com (CCCP) e concentrações de (6, 12 e 24 μM) de NaF.

Tratamentos	Índice de variação (IV)
Controle negativo	0
CCCP	-0,491***
6 μM	-0,256**
12 μM	-0,261**
24 μM	-0,443***

¹ *, significativo a 5% de probabilidade, ** significativo a 1% de probabilidade, ***significativo a 0,1% de probabilidade pelo teste Tuckey.

5.3. Análise dos níveis de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Foi observado o acúmulo de ROS em promastigotas tratadas com a 24 μ M correspondente a IC₅₀ de NaF (Figura 9). A concentração de 24 μ M induziu aumento de aproximadamente 1 vez no acúmulo de ROS em relação ao controle não tratado, sendo estatisticamente igual ao controle positivo CP (dados não mostrados).

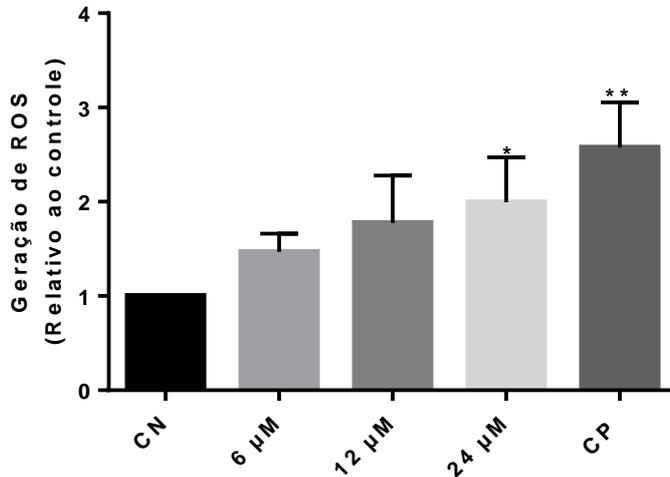


Figura 9. Produção de espécies reativas a oxigênio (ROS) em formas promastigotas de *P. serpens* tratadas com NaF. Parasitos (1×10^7 células) foram tratados com 6, 12 e 24 μ M de NaF (correspondente a $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ e 1 X IC₅₀) por 24 horas a 26 °C. As células foram coradas com a sonda H₂DCFDA por 30 minutos a 25°C, e a intensidade de fluorescência foi determinada por espectrofotometria. Células incubadas com H₂O₂ (750 μ M) foram utilizadas como controle positivo (CP), células vivas não tratadas com NaF representam o controle negativo (CN). Os dados de fluorescência foram relativizados ao controle negativo. Os resultados foram expressos em média \pm E.P. As diferenças estatísticas foram analisadas por ANOVA e teste de Dunnett, (*), (**), (***) indicam diferenças estatísticas em relação ao controle não tratado ($P > 0,05$, $P > 0,01$ e $P > 0,001$, respectivamente).

5.4. Análise da integridade da membrana plasmática

Incubação das células tratadas com até 96 μM (equivalente à 4 X a IC_{50}) de NaF mostrou que essa molécula promove a mortalidade celular sem perda da integridade da membrana plasmática. Foi observado que as células tratadas em todas as de NaF apresentam fluorescências iguais as células não tratadas (Figura 10).

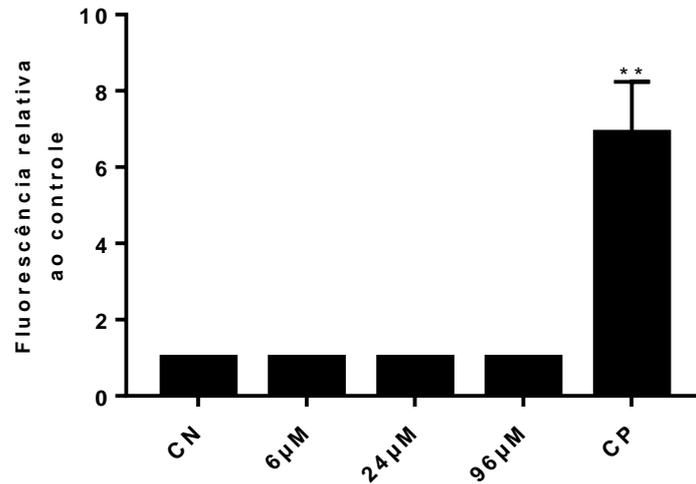


Figura 10. Integridade da membrana de formas promastigotas de *P. serpens* tratadas com NaF. Parasitos (1×10^7 células) foram tratadas com 6, 24 e 96 μM de NaF (correspondente a $\frac{1}{4}$, 1X e 4X IC_{50}). As células foram coradas com iodeto de propídeo (PI) por 15 minutos a 26°C. Células não tratadas (CN) foram utilizadas como controle negativo. Células incubadas à (80°C) por 10 minutos foram utilizadas como controle positivo (CP). A intensidade de fluorescência foi determinada por espectrofotometria. Os dados de médias de fluorescência foram relativizados ao controle negativo representados pela média \pm E.P. As diferenças estatísticas foram analisadas por ANOVA e teste de Dunnett, (*), (**) e (***) indicam diferença estatística em relação ao controle não tratado.

5.5. Alterações morfológicas em formas promastigotas de *P. serpens* induzidas por NaF

Para avaliar a influência de NaF na morfologia dos parasitos foi realizada a microscopia de varredura. Os resultados demonstraram a perda de flagelo em formas promastigotas tratadas com 24 μM em comparação com células não tratadas. A perda de flagelo também foi visualizada em células não tratadas, porém em menor porcentagem (Figura 11).

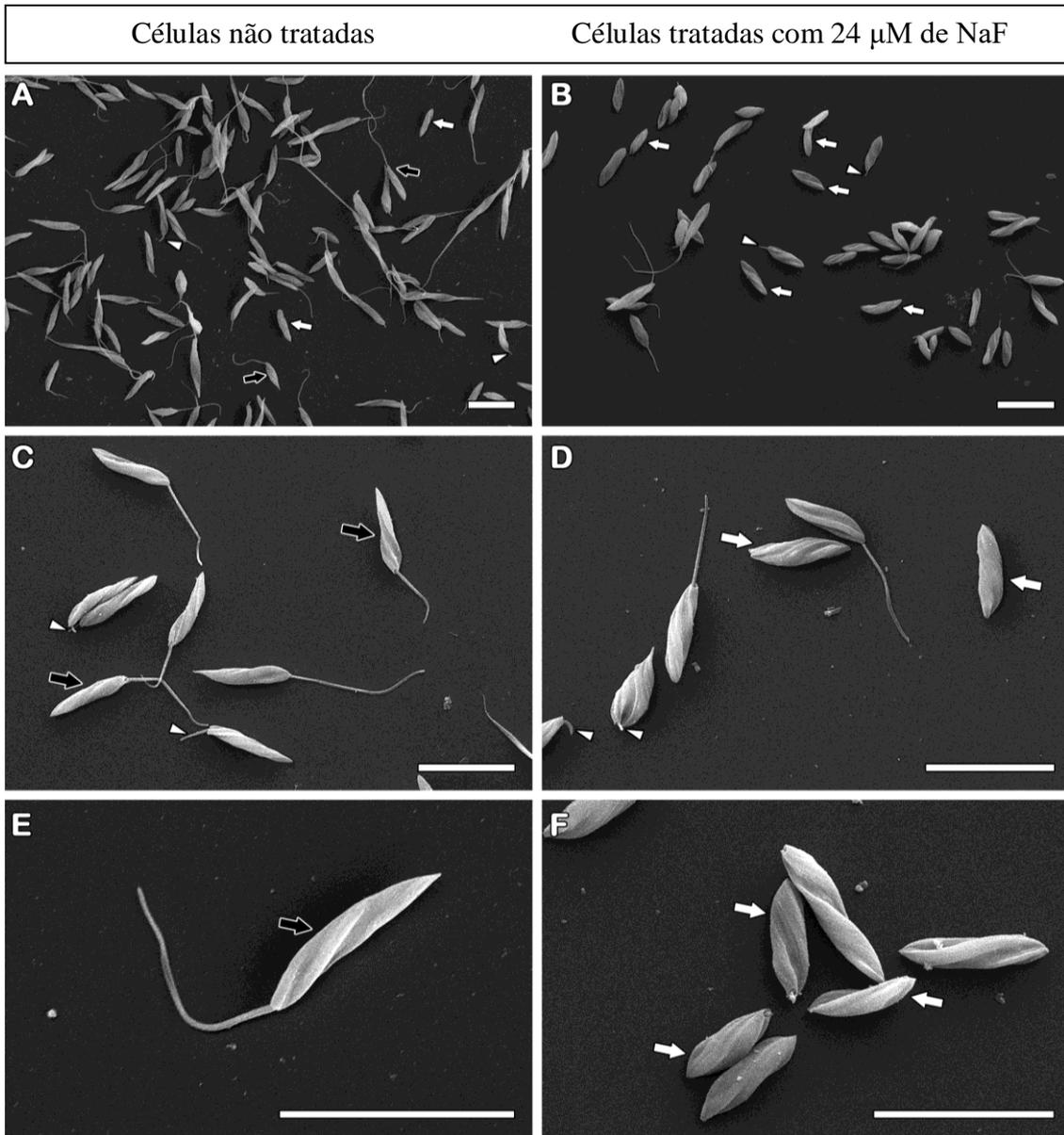


Figura 11. Alterações morfológicas em formas promastigotas de *P. serpens* tratadas com NaF. (A, C, E) Controle, células não tratadas; (B, D, F) Promastigotas tratadas com 24 μM . (A-F) os parasitos demonstraram morfologia típica (setas pretas) ou encurtamento flagelar (setas brancas). Promastigotas sem o flagelo (seta branca) foram facilmente encontradas após o tratamento com 24 μM de NaF. Barra = 10 μm .

O número de promastigotas sem flagelo foi significativamente maior em células tratadas com NaF, quando comparadas as não tratadas (Figura 12).

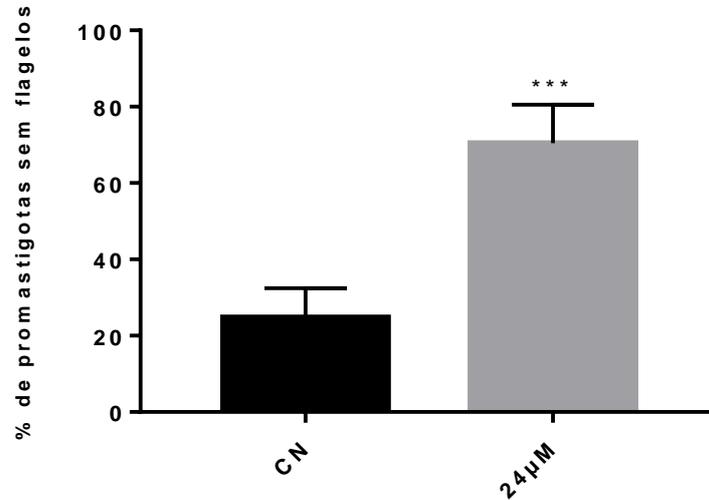


Figura 12. Redução de formas promastigotas flageladas de *P. serpens* tratadas com 24 μM de NaF. Parasitos (1×10^6 células) foram tratadas com 24 μM de NaF (correspondente 1X IC₅₀) por 24h. Células não tratadas (CN) foram utilizadas para o controle negativo. As células foram coradas com corante Giemsa e a contagem foi realizada por meio de contagem direta em microscópio óptico na lente 40X. Os dados foram representados pela média \pm E.P. As diferenças estatísticas foram analisadas por teste t, (*), (**) e (***) indicam diferença estatística em relação ao controle não tratado.

Foram observadas alterações na ultraestrutura de formas promastigotas de *P. serpens* tratadas com NaF. O tratamento com 24 μM de NaF induziu inchaço da bolsa flagelar e a formação de estruturas membranares concêntricas no interior desta estrutura. Além da formação de autofagossomos de diferentes níveis de degradação. Também foi possível observar perfis proeminentes no retículo endoplasmático, além da presença recorrente de estrutura membranares concêntricas no interior da mitocôndria (Figura 13).

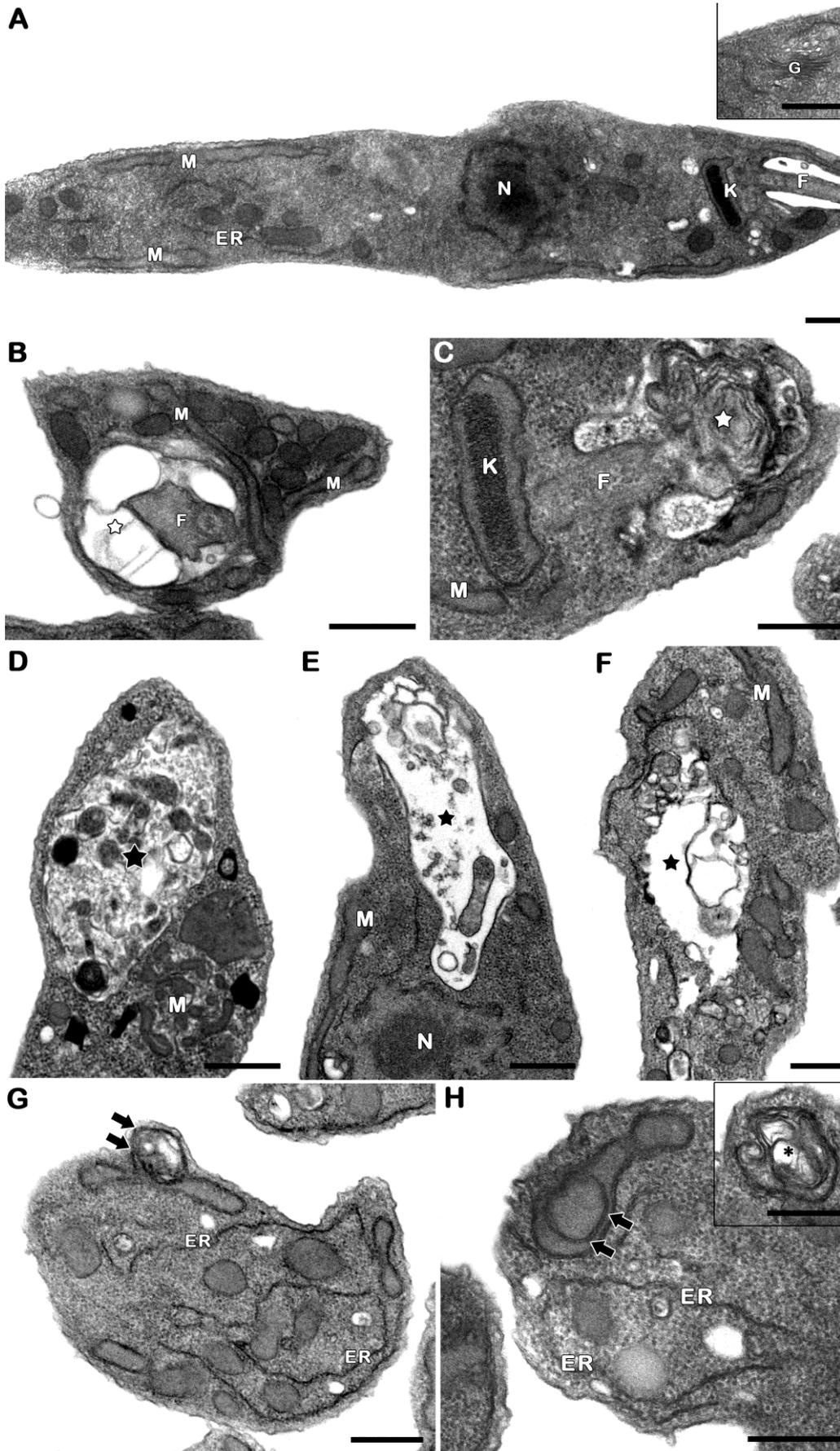


Figura 13. Microscopia eletrônica de transmissão de formas promastigotas de *P. serpens* tratadas com 24 μM de NaF (corresponde a 1X IC_{50}). (A) parasitos não tratadas apresentaram morfologia normal. O tratamento com 24 μM de NaF induziu inchaço na bolsa flagelar, no interior desta estrutura foram observadas estruturas membranares concêntricas (estrelas brancas), assim como a formação de autofagossomos com conteúdo variável (estrelas pretas), (G-H). As células tratadas com 24 μM também apresentaram perfils proeminentes de retículo endoplasmático, além da presença recorrente de estrutura membranares concêntricas no interior da mitocôndria (setas pretas) e no citosol (asteriscos pretos em detalhes). N: Núcleo; M: Mitocôndria; K: Cinetoplasto; F: Flagelo; ER: Retículo endoplasmático; G: Golgi. Barras= 5 μm .

6. DISCUSSÃO

As doenças agrícolas causadas por parasitos do gênero *Phytomonas* como a necrose do floema do cafeeiro (*Phytomonas leptovosorum*) e a murcha de fitomonas em coqueiros (*Phytomonas staheli*), causam prejuízo econômicos. Em 2001 a murcha de fitomonas atingiu 43% das plantações de coqueiro no estado do Amazonas no Brasil, sendo que os plantios mais afetados foram dizimados em apenas dois anos (ARAÚJO et al., 2003). Em relação à necrose do floema do cafeeiro, essa representa um potencial risco, uma vez que o Brasil se destaca no mercado como produtor de café. Tais doenças não possuem tratamentos eficazes registrados, as alternativas de controle têm se baseado na erradicação de plantas infectadas (JASKOWSKA et al., 2015).

Tais parasitos apresentam dificuldade para multiplicação *in vitro*, tornando escassos os estudos visando o tratamento dessa classe de parasitos. Estudos visando o controle de *Phytomonas staheli* foram realizados por Luque et al. (2000), realizados cerca de vinte anos atrás. Outro estudo com *Phytomonas sp* isolada de *Euphorbia characias* foi realizado por Magán et al. (2004).

A busca por novos compostos que apresentem propriedades biológicas tem se tornado um desafio. Devido a sua atividade biológica e biodisponibilidade, os produtos naturais são uma alternativa e também servem como um modelo para a síntese de novas estruturas com atividade quimioterapêutica contra doenças (WINKLER et al., 2007). Neste contexto, a chalcona e seus derivados têm sido consideradas moléculas promissoras apresentando diversas atividades biológicas (DÍAZ-TIELAS et al., 2016). Neste estudo, NaF apresentou atividade antiprotozoária sobre formas promastigotas de *P. serpens* com IC_{50} de 21,52 μM . Também foi possível observar o efeito permanente dessa molécula, uma vez que promastigotas expostas por 24h com NaF e re-cultivadas em meio livre de NaF apresentaram redução na proliferação celular. A atividade antiprotozoária dos derivados de chalcona já foi reportada (ORTALLI et al., 2018; MELLO et al., 2014; MELLO et al., 2016; ESPINOZA-HICKS et al., 2019; LEEZA ZAIDI et al., 2015). Produtos naturais como os óleos essenciais de *Varronia curassavica* e *Lantana camara* e alcaloides como tomatina e tomatidina também apresentam atividade antiprotozoária contra *P. serpens* (SILVA et al., 2019; PEREIRA, 2019; MEDINA et al., 2015). Em trabalhos anteriores de nosso grupo, NaF foi selecionado como o mais eficiente na redução da viabilidade celular de *P. serpens*.

NaF (24 μM , aproximadamente 1X IC_{50}) induziu significativo incremento nos níveis de ROS acompanhado de despolarização do potencial de membrana mitocondrial em promastigotas de *P. serpens*. O aumento na produção de ROS por chalconas já foi observado em células de câncer (ZHU et al., 2019). Embora não tenha sido reportado nenhum estudo relacionando a chalcona, ou seus derivados, e a produção de ROS em tripanossomatídeos, outros metabólicos secundários de plantas como os sesquiterpenoides afetam a produção de ROS desses micro-organismos, Bombaça e colaboradores (2018) observaram incremento dos níveis de ROS e a redução do potencial de membrana mitocondrial, além do inchaço da

mitocondrial em *Trypanossoma cruzi* tratados com Pgd sesquiterpenoide isolado de plantas. A apigenina, uma flavona simples produzida no metabolismo secundário de plantas, promove a elevação dos níveis de ROS e a despolarização do potencial de membrana mitocondrial em tripanossomatídeos, Fonseca-Silva e colaboradores (2015) observaram em promastigotas de *Leishmania amazonensis*, expostas a apigenina, a elevação dos níveis de (ROS), e a despolarização da membrana mitocondrial, o que resultou em disfunção mitocondrial, com inchaço da mitocôndria, além do rompimento do complexo de Golgi, resultando em colapso mitocondrial e morte celular.

O efeito de moléculas sobre a geração de ROS e o potencial de membrana mitocondrial têm sido reportado em tripanossomatídeos. Salomão e colaboradores (2013) observaram o colapso do potencial de membrana mitocondrial mediado pela geração de ROS em *Trypanossoma cruzi*, expostos à naftoquinonas. Mendonça e colaboradores (2018) observaram o incremento de ROS e despolarização de membrana mitocondrial em espécies de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum* tratadas com derivados de naftoquinonas.

Outras moléculas sintéticas induzem geração de ROS em tripanossomatídeos. Rodrigues e colaboradores (2019) observaram alterações mitocondriais, além da geração de ROS e despolarização do potencial de membrana em promastigotas de *Leishmania amazonensis* tratadas com clomipramine. A mitocôndria é uma organela relacionada ao processo de produção de energia (ATP), essa organela tem sido considerada um alvo para fármacos em tripanossomatídeos. O funcionamento adequado da mitocôndria, assim como a manutenção do potencial da membrana dessa organela, são essenciais para sobrevivência celular (FIDALGO; GILLE, 2011). A molécula 4-Aminoquinoline induziu a despolarização da membrana mitocondrial, assim como incremento de ROS, a diminuição de ATP intracelular, além da permeabilização da membrana plasmática em *Leishmania infantum*. A inibição do metabolismo energético em *Leishmania* tem papel fundamental no mecanismo leishmanicida (MANZANO et al., 2019).

O tratamento com NaF não induziu perda da integridade da membrana plasmática das promastigotas, mesmo em concentração de 96 μM que causou 75% da mortalidade celular não houve efeito sobre a membrana plasmática. Nossos resultados corroboraram com Mello e colaboradores (2016), que observaram morte celular em *Leishmania (Viannia) braziliensis* com ausência de danos na membrana plasmática tratadas com três derivados de chalconas. Esse fato sugere que o possível mecanismo de ação da chalcona não está relacionado à necrose, pois a principal característica de necrose é a presença de danos à membrana plasmática (MENNA-BARRETO, 2019).

As promastigotas de *P. serpens* apresentaram significativamente redução no número de flagelos quando expostas a 24 μM de NaF. A microscopia de transmissão revelou que além da perda de flagelo, NaF também promove o inchaço da bolsa flagelar. Alterações no flagelo de tripanossomatídeos tem sido observadas com o tratamento de moléculas de origem natural ou sintética, dentre as alterações estão o encurtamento e a perda de flagelo (BARRIS et al., 2019), além da formação de bolhas na membrana flagelar (SALOMÃO et al., 2013), e distorção flagelar (RODRIGUES et al., 2019).

O tratamento com NaF induziu alterações nas ultraestruturas dos parasitos, foram observados perfis de retículo endoplasmático e autofagossomos de variados níveis de degradação, além da presença de estruturas membranares concêntricas na mitocôndria. A autofagia em tripanossomatídeos é caracterizada pela presença de estruturas membranares concêntricas, além de perfis de retículo endoplasmáticos (MENNA-BARRETO, 2019). Tais características foram observadas em promastigotas tratadas com a IC_{50} de NaF.

A autofagia em tripanossomatídeos com o uso de moléculas de origem natural foi reportada por Bombaça e colaboradores (2018), que avaliaram o efeito de três sesquiterpenoides oriundos de plantas na indução de fenótipo autofágico em *Trypanossoma cruzi*, foram observadas alterações na ultraestrutura dos parasitos como o inchamento mitocondrial a formação de proeminentes perfis de retículo endoplasmáticos em torno de

diferentes estruturas celulares (sesquiterpenoide Pgd), além do incremento no número de autofagossomas (sesquiterpenoide Efr), o aparecimento de perfis de retículo endoplasmático, assim como o aumento no número de autofagossomas, também foram observadas em *P. serpens* tratadas com NaF. Salomão e colaboradores (2013) avaliaram os efeitos de quatro naftoquinonas sobre *Trypanossoma cruzi* e observaram características autofágicas como estruturas membranosas e o aparecimento de retículo endoplasmático circundante ao reservossomos e intensa vacualização do citosol. O tratamento com clomipramine induziu o incremento de perfis de retículo endoplasmático e a acumulação de vacúolos autofágicos em *Leishmania amazonensis* (RODRIGUES et al., 2019).

A autofagia promove digestão das organelas danificadas, causando a reciclagem e limpeza celular. Condições de estresse como restrição nutricional ou exposição a drogas induzem o processo autofágico. A indução contínua da autofagia pode levar ao colapso do equilíbrio celular, resultando em morte celular autofágica (MENNA-BARRETO, 2019).

7. CONCLUSÃO

Conclui-se que NaF apresenta atividade antiprotozoária, agindo de forma permanente, além de promover alteração em parâmetros fisiológicos como o potencial de membrana mitocondrial, e elevações dos níveis de (ROS), além de induzir alterações na ultraestrutura do parasito como a perda de flagelo e inchaço da bolsa flagelar. NaF induz fenótipo autofágico dos parasitos, podendo assim representar uma possível promissora molécula tripanocida, sendo necessários estudos complementares relacionados a sua seletividade e toxicidade.

8. FINANCIAMENTO

Esse estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e Fundação de Apoio à Pesquisa e a Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC/SE) - Brasil.

9. PERSPECTIVAS

De forma a confirmar e melhor compreender o processo autofágicos nestes parasitas, serão realizados estudos futuros com marcador específico para autofagia nas promastigotas de *P. serpens*. Para estudar a influência do grupo naftaleno no anel B, serão realizados testes com a estrutura fundamental da chalcona, onde essa apresenta um anel benzeno no anel B.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, J. C. A. de; PEREIRA, J. C. R.; GASPAROTTO, L. Murcha-de-phytomonas do no Amazonas. **Circular Técnica**, n.17, Embrapa, Manaus, Amazonas, Brasil, 2003.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food Chem. Toxicol**, v.46, p.446–475, 2008.
- BARRIAS, E.; REIGNAULT, L. C.; CALOGEROPOULOU, T.; SOUZA, W. de. In vitro activities of adamantylidene-substituted alkylphosphocholine TCAN26 against *Trypanosoma cruzi*: Antiproliferative and ultrastructural effects. **Experimental Parasitology**, v. 206, p. 1-7, 2019.
- BATISTOTI, M.; CAVAZZANA JR., M.; SERRANO, M. G.; OGATTA, S. F.; BACCAN, G. C.; JANKEVICIUS, J. V.; TEIXEIRA, M. M.; JANKEVICIUS, S. I. Genetic variability of trypanosomatids isolated from phytophagous hemiptera defined by morphological, biochemical, and molecular taxonomic markers. **J Parasitol**, v. 87, n. 6, p. 1335–1341, 2001.
- BEGUM, N. A.; ROY, N.; LASKAR, R. A.; ROY, K. Mosquito larvicidal studies of some chalcone analogues and their derived products: Structure-activity relationship analysis. **Medicinal Chemistry Research**, v. 20, n. 2, p. 184–191, 2011.
- BLANCO, V. R.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. Leishmaniose: Aspectos Gerais Relacionados com a Doença, o Ciclo do Parasita, Fármacos Disponíveis, Novos Protótipos e Vacinas. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 861–876, 2017.
- BOCELLI, M. D. **Estudos da atividade de chalconas no controle de biofilmes bacterianos**. 2016. 92 p.. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos - São Carlos – SP, 2016.
- BOMBAÇA, A. C. S.; DOSSOW, D. V.; BARBOSA, J. M. C.; PAZ, C.; BURGOS, V.; MENNA-BARRETO, R. F. S. Trypanocidal Activity of Natural Sesquiterpenoids Involves Mitochondrial Dysfunction, ROS Production and Autophagic Phenotype in *Trypanosoma cruzi*. **Molecules**, v. 23, p. 1-14, 2018.
- CALVINO, V.; PICALLO, M.; LOPEZ-PEINADO, A. J.; MARTÍN-ARANDA, R. M.; DURÁN-VALLE, C. J. Ultrasound accelerated Claisen–Schmidt condensation: A green route to chalcones. **Applied Surface Science**, v. 252, p. 6071–6074, 2006.
- CAMARGO, E. P. *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. **Adv. Parasitol**, v.42, p.29-112, 1999.
- CESARIN-SOBRINHO, D.; NETTO-FERREIRA, J. C. Efeito da substituição por átomos de flúor no equilíbrio conformacional de chalcona. **Quim. Nova**, v. 24, n. 5, p. 604-611, 2001.
- CONAB (Companhia de Nacional de Abastecimento) Acompanhamento da safra Café, v. 5-Safra 2019, n. 4 – Quarto levantamento, 2019.
- COSTA, P. M. de O. **Exploração do genoma de *Phytomonas serpens***. 2006. 104 p.. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ,

2006.

DÍAZ-TIELAS, C.; GRAÑA, E.; REIGOSA, M. J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A. M. Biological Activities and Novel Applications of Chalcones. **Planta Daninha**, v. 34, n.3, p. 607–616, 2016.

DOCAMPO, R.; SOUZA, W.; MIRANDA, K.; ROHOLFF, P. & MORENO, N. J. M. Acidocalcisomes: conserved from bacteria to man. **Nat. Reviews Microbiology**, v. 3, p. 251-261, 2005.

DOLLET, M. Plant diseases caused by flagellate protozoa (*Phytomonas*). **Annual review of Phytopathology**, v. 22, n. 1, p. 115-132, 1984.

ELIAS, C. G. R. **Expressão de moléculas similares à cruzipaina em *Phytomonas serpens***. 2009. 116 p.. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro- Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Rio de Janeiro- RJ, 2009.

ESPINOZA-HICKS, J. C.; CHÁCON-VARGAS, K. F.; HERNANDÉZ-RIVERA, J. L.; NOGUEDA-TORRES, B.; TAMARIZ, J.; SÁNCHEZ-TORRES, L. E.; CAMACHO-D'AVILA, A. Novel prenyloxy chalcones as potential leishmanicidal and trypanocidal agents: Design, synthesis and evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.167, p. 402- 413, 2019.

FERREIRA, M. K. A.; FONTENELLE, R. O. S.; MAGALHÃES, F. E. A.; BANDEIRA, P. N.; MENEZES, J. E. S. A.; DOS SANTOS, H. S. Potencial Farmacológico de Chalconas: Uma Breve Revisão. **Rev. Virtual Quim**, v. 10, n.5, p. 1455–1473, 2018.

FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. **Pharm Res**, v. 11, p. 2758-2770, 2011.

FONSECA-SILVA, F.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. Effect of Apigenin on *Leishmania amazonensis* Is Associated with Reactive Oxygen Species Production Followed by Mitochondrial Dysfunction. **J. Nat. Prod**, 2015.

GARNER, D. L.; THOMAS, C. A.; JOERG, H. W.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biol Reprod**, v.57, p.1401-1406, 1997.

GIBBS, A. J. *Leptomonas-serpens* nsp. parasitic in the digestive tract and salivary glands of *Nezara-viridula* (Pentatomidae) and in the sap of *Solanum-lycopersicum* (tomato) and other plants. **Parasitology**, v. 47, n. 3–4, p. 297–303, 1957.

GRAVANCE, C. G.; GARNER, D. L.; BAUMBER, J.; BALL, B. A. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v.53, p.1691-1703, 2000.

HOARE, C. A.; WALLACE, F. G. Developmental Stages of Trypanosomatid Flagellates: a New Terminology. **Nature**, v. 212, p. 1385-1386, 1966.

JANKEVICIUS, J. V.; JANKEVFCIUS, S. I.; CAMPANER, M.; CONCHON, I.; MAEDA, L. A.; TELXEIRA, M. M.; FREYMULIER, E.; CAMARGO, E. P. Life cycle and culturing

of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a trypanosomatid parasite of tomatoes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 265-271, 1989.

JASKOWSKA, E.; BUTLER, C.; PRESTON, G.; KELLY, S. *Phytomonas*: trypanosomatids adapted to plant environments. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 1, p. 1-17, 2015.

JIMENEZ, C. M.; SAMPIETRO, D. A.; SGARIGLIA, M. A.; SOBERÓN, J.R.; VATTUONE, M. A. Isolation, Identification and Usefulness of Antifungal Compounds from *Zuccagnia punctata* for Control of Toxigenic Ear Rot Pathogens. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 10, p. 1461-1464, 2014.

LANDFEAR, S. M.; IGNATUSHCHENKO, M. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. **Mol. Biochem. Parasitol**, v.115, p.1-17, 2001.

LEEZA ZAIDI, S.; MITTAL, S.; RAJALA, M. S.; AVECILLA, F.; HUSAIN, M.; AZAM, A. Synthesis, characterization and antiamebic activity of chalcones bearing N-substituted ethanamine tail. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.98, p. 179- 189, 2015.

LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O.; COX, F. E. G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B. M.; LEEDALE, G. F.; LOEBLICH, A. R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F. G. A Newly Revised Classification of the Protozoa. **The Journal of Protozoology**, v. 27, n. 1, p. 37–58, 1980.

LOPES, A. H.; SOUTO-PADRÓN, T.; DIAS, F. A.; GOMES, M. T.; RODRIGUES, G. C.; ZIMMERMANN, L. T.; ALVES E SILVA, T. L.; VERMELHO, A. B. Trypanosomatids: odd organisms, devastating diseases. **Open Parasitology Journal**, v. 4, p. 30-59, 2010.

LUQUE, F.; FERNANDEZ-RAMOS, C.; ENTRALA, E.; ROSALES, M. J.; SALAS, M. C.; NAVARRO, J.; SANCHEZ-MORENO, M. Biochemical and ultrastructural alterations caused by newly synthesized 1,2,4-triazole[1,5a]pyrimidine derivatives against *Phytomonas staheli* (Trypanosomatidae). **Toxicology in vitro**, v. 14, p. 487-495, 2000.

MAGÁN, R.; MARÍN, C.; SALAS, J. M.; BARRERA-PÉREZ, M.; ROSALES, M. J.; SÁNCHEZ-MORENO, M. Cytotoxicity of Three New Triazolo-pyrimidine Derivatives against the Plant Trypanosomatid: *Phytomonas* sp. Isolated from *Euphorbia characias*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n.6, p. 651-656, 2004.

MAIORAL, M. F.; BODACK, C. D. N.; STEFANES, N. M.; BIGOLIN, A.; MASCARELLO, A.; CHIARADIA-DELATORRE, L. D.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J.; SANTOS-SILVA, M. C. Cytotoxic effect of a novel naphthylchalcone against multiple cancer cells focusing on hematologic malignancies. **Biochimie**, v. 140, p. 48-57, 2017.

MANZANO, J. I.; KONSTANTINOVIC, J.; SCACCABAROZZI, D.; PEREA, A.; PAVIC, A.; CAVICCHINI, L.; BASILICO, N.; GAMARRO, F.; SOLAJA, B. A. 4-Aminoquinoline-based compounds as antileishmanial agents that inhibit the energy metabolism of *Leishmania*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 180, p. 28-40, 2019.

MEDINA, J. M.; RODRIGUES, J. C. F.; MOREIRA, O. C.; ATELLA, G.; SOUZA, W.; BARRABIN, H. Mechanisms of growth inhibition of *Phytomonas serpens* by the alkaloids tomatine and tomatidine. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 48-55, 2015.

MELLO, T. F. P. de; CARDOSO, B. M.; BITENCOURT, H. R.; DONATTI, L.; ARISTIDES, S. M. A.; LONARDONI, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V. Ultrastructural and morphological changes in *Leishmania (Viannia) braziliensis* treated with synthetic chalcones. **Experimental Parasitology**, v.160, p. 23-30, 2016.

MELLO, T. F. P. de; BITENCOURT, H. R.; PEDROSO, R. B.; ARISTIDES, S. M. A.; LONARDONI, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V. Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in *Leishmania(Viannia) braziliensis*. **Experimental Parasitology**, v. 136, n. 1, p. 27–34, 2014.

MELOS, J. L. R.; ECHEVARRIA, A. Trypanosomatids Metabolic Systems as Potential Chemotherapeutic Targets. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 4, p. 374–392, 2012.

MENDONÇA, D. V. C.; LAGE, D. P.; CALIXTO, S. L.; OTTONI, F. M.; TAVARES, G. S. V. de.; LUDOLF, F.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; SCHNEIDER, M. S DUARTE, M. C. TAVARES, C. A. P.; ALVES, R. J.; COIMBRA, E. S.; COELHO, E. A. F. Antileishmanial activity of a naphthoquinone derivate against promastigote and amastigote stages of *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and its mechanism of action against *L. amazonensis* species. **Parasitology Research**, v.117, p. 391-403, 2018.

MENNA-BARRETO, R. F. S. Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over) kill. **Cell Death and Disease**, v.10, n. 93, p.1-11, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Panorama da doença de Chagas no Brasil**. Boletim epidemiológico, v.50, novembro de 2019.

NAPOLITANO, H. B.; CAMPOS, D. M. B.; VAZ, W. F.; GARRO, F. L. T. Inovação e Biotecnologia na Biodiversidade do Cerrado. **Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science**, v. 5, n. 2, p. 162, 2016.

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

PAHO | Chagas disease. Disponível em:

<https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=en>. Acesso em: 28 jan. 2020.

PAHO | WHO. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas. Epidemiological Report. march n. 7, 2019.

PARK, J.; SHIN, S. Y.; KOH, D.; LEE, Y. H.; LIM, Y. Relation between structures of naphthalenylchalcone derivatives and their cytotoxic effects on HCT116 human colon cancer cells. **Appl Biol Chem**, v. 61, n. 3, p. 267–272, 2018.

PEREIRA, K. L. G. **Diversidade química e genética, variação sazonal em Lantana camara L. e atividade tripanocida do óleo essencial sobre Phytomonas serpens GIBBS**. 2019. 92 p.. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Biodiversidade) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão -SE, 2019.

PODLIPAEV, S. A. *Phytomonas elmanssiani* (Mastigophora: Trypanosomadina) from the plant *Cynanchum sibiricum* (Asclepiadaceae) in Central Asia and Kazakhstan. **Proc. Zool. Inst. Acad. Sci.**, v.144, p. 61-65, 1986.

PORCEL, B. M.; DENOEUDE, F.; OPPERDOES, F.; NOEL, B.; MADOU, M. A.; HAMMARTON, T. C.; FIELD, M. C.; DA SILVA, C.; COULOUX, A.; POULAIN, J.; KATINKA, M.; JABBARI, K.; AURY, J. M.; CAMPBELL, D. A.; CINTRON, R.; DICKENS, N. J.; DOCAMPO, R.; STURM, N. R.; KOUMANDOU, V. L.; FABRE, S.; FLEGONTOV, P.; LUKES, J.; MICHAELI, S.; MOTTRAM, J. C.; SZÖÖR, B.; ZILBERSTEIN, D.; BRINGAUD, F.; WINCKER, P.; DOLLET, M. The Streamlined Genome of *Phytomonas* spp. Relative to Human Pathogenic Kinetoplastids Reveals a Parasite Tailored for Plants. **PLoS Genet**, v. 10, p. 1-24, 2014.

REBELLO, J. M. DE. **Avaliação da atividade antioxidante e antifúngica de análogos sintéticos da acetofenona e pró-oxidante e antitumoral de chalconas sintéticas**. 2005. 130 p.. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis –SC, 2005.

ROCHA, G. P. da; PETRONI, T. F. Leishmaniose Visceral E Tegumentar Americana Visceral and Cutaneous Leishmaniasis. **Revista Saúde UniToledo**, v. 01, n. 02, p. 40–55, 2017.

ROCHA, G. M.; BRANDÃO, B. A.; MORTARA, R. A.; ATTIAS, M.; SOUZA, W.; CARVALHO, T. M. U. The flagellar attachment zone of *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. **J. Struct. Biol.**, v. 154, p. 89-99, 2006.

RODRIGUES, J. H. S. da.; MIRANDA, N.; VOLPATO, H.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V. The antidepressant clomipramine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* through a mitochondrial pathway. **Parasitology Research**, v. 118, p. 977-989, 2019.

ROZMER, Z.; PERJÉSI, P. Naturally occurring chalcones and their biological activities. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, n. 1, p. 87–120, 2016.

SALOMÃO, K.; SANTANA, N. A. de; MOLINA, M. T.; CASTRO, S. L. de.; MENNA-BARRETO, R. F S. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial swelling and membrane potential collapse as primary evidence of the mode of action of naphthoquinone analogues. **BMC Microbiology**, v. 13, n.196, p. 1-12, 2013.

SANTOS JUNIOR, A. C. M.; RICART, C. A. O.; PONTES, A. H.; FONTES, W.; SOUZA, A. R.; CASTRO, M. S.; SOUSA, M. V.; LIMA, B. D. Proteome analysis of *Phytomonas serpens*, a phytoparasite of medical interest. **PloS one**, v. 13, n. 10, p. 1-15, 2018.

SANTOS, A. L. S.; D'AVILA-LEVY, C. M.; ELIAS, C. G. R.; VERMELHO, A.B.; BRANQUINHA, M. H. *Phytomonas serpens*: immunological similarities with the human trypanosomatid pathogens. **Microbes Infect**, v. 9, p. 915-921, 2007.

SCHWELM, A.; BADSTÖBER, J.; BULMAN, S.; DESOIGNIES, N.; ETEMADI, M.; FALLOON, R. E.; GACHON, C. M. M.; LEGREVE, A.; LUKES, J.; MERZ, U.; NENOROKOVA, A.; STRITTMATTER, M.; SULLIVAN, B. K.; NEUHAUSER, S. Not in your usual Top 10: protists that infect plants and algae. **Molecular plant pathology**, v. 19, n. 4, p. 1029-1044, 2017.

SILVA, K. P.; SANTOS, T. A. C.; MOUTINHO, B. L.; DA SILVA, R. S.; PINTO, V. S.; BLANK, A. F.; CORRÊA, C. B.; SCHER, R.; FERNANDES, R. P. M. Using *Varronia curassavica* (Cordiaceae) essential oil for the biocontrol of *Phytomonas*. **Industrial Crops & Products**, v. 139, 2019.

SOUZA, G. B. **Síntese de chalconas por condensação de Claisen Schmidt: um estudo da relação estrutura versus atividades biológicas**. 2019. 163 p.. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão-SE, 2019.

WANG, G.; LIU, W.; GONG, Z.; HUANG, Y.; LI, Y.; PENG, Z. Synthesis, biological evaluation, and molecular modelling of new naphthalene-chalcone derivatives as potential anticancer agents on MCF-7 breast cancer cells by targeting tubulin colchicine binding site. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 139-144, 2020.

YAMADA-OGATTA, S. F.; NAKAZATO, G.; FURLANETO, M. C.; NOGUEIRA, M. A. **Tópicos especiais em microbiologia**. Londrina: UEL / Departamento de Microbiologia, 2015.

YAZDAN, S. K.; SAGAR, D. V.; SHAIK, A. B. Chemical and Biological Potentials of Chalcones: A Review. **Organic & Medicinal Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 1-19, 2015.

WINKLER, J. D.; LONDREGAN, A. T.; HAMANN, M. T. Synthetic Modification of Manzamine A via Grubbs Metathesis. Novel Structures with Enhanced Antibacterial and Antiprotozoal Properties. **Org. Lett**, v. 9, n. 22, p. 4467-4469, 2007.

ZHU, H.; TANG, L.; ZHANG, C.; WEI, B.; YANG, P.; HE, D.; ZHENG, L.; ZHANG, Y. Synthesis of Chalcone Derivatives: Inducing Apoptosis of HepG2 Cells via Regulating Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Pathway. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1-13, 2019.