UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA – DCV

GRADUAÇÃO DE FARMÁCIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DE CHALCONAS SINTÉTICAS COM POTENCIAL LEISHMANICIDA E IMUNOMODULADOR

YALLA ALMEIDA DE JESUS OLIVEIRA

SALVADOR, BAHIA

2025

UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA – DCV

COLEGIADO DE FARMÁCIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DE CHALCONAS SINTÉTICAS COM POTENCIAL LEISHMANICIDA E IMUNOMODULADOR

YALLA ALMEIDA DE JESUS OLIVEIRA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado de Farmácia para obtenção do grau de bacharelado em Farmácia.

Orientadora: Profª. Dra. Elisalva Teixeira Guimarães

Coorientadora: MSc. Rebeca Pinheiro de Jesus Silva

SALVADOR, BAHIA

2025

FOLHA DE APROVAÇÃO

YALLA ALMEIDA DE JESUS OLIVEIRA

AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DE CHALCONAS SINTÉTICAS COM POTENCIAL LEISHMANICIDA E IMUNOMODULADOR

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Colegiado de Farmácia, em 16 de dezembro de 2025, como requisito para obtenção do grau de bacharelado em Farmácia, pela Universidade do Estado da Bahia (UNEB).

BANCA EXAMINADORA:

Elisalva Teixeira Guimarães

Profª. Dra. Elisalva Teixeira Guimarães – Orientadora – UNEB

Laísia Falcão Alonso Uzêda

Profª. MSc. Laísia Falcão Alonso Uzêda– Membro interno – UNEB

Francisnaira da Silva Santos

Profª. MSc. Francisnaira da Silva Santos – Membro externo

SALVADOR, BAHIA

2025

AGRADECIMENTOS

Não teria sentido começar esse texto sem citar o tamanho e o quão fascinantes são as promessas do divino em minha vida. Agradeço imensamente a Deus e aos meus guias por sempre estarem ao meu lado, emanando forças para me ajudar nessa caminhada (que não foi nada fácil), mas que me fez acreditar que, independentemente da situação que eu estivesse passando, eu jamais estive só. Em meio a tantas batalhas, eu renasci.

Aos meus pais, Joalia e Luis Anselmo, que são os maestros da minha existência, até este momento não está catalogado neste mundo o sentimento de gratidão por tudo o que vocês fizeram em minha vida e seguem fazendo. Eu amo imensamente vocês. Mesmo quando a saudade apertava, encontramos meios de conectar o nosso amor e carinho. Todas as vezes que pensei em parar, pensar em vocês foi combustível para me impulsionar novamente. À minha irmã Ingrid e à minha sobrinha Luna, vocês fazem parte dessa história.

À minha família, que me apoiou e acreditou nos meus sonhos. Obrigada tia Sônia, tia Edna e primos Priscila, Cláudio e Vilton. E a todos que me incentivam diariamente, minha eterna gratidão. Amo vocês.

À minha outra irmã da vida, Iasmin, que me acolheu nos meus piores e melhores momentos. Você não é só uma amiga, é o meu apoio e incentivo diário. Somos unidas por um laço incondicional que se renova constantemente, por puro amor. Obrigada por tudo, amo você.

Aos meus amigos e parceiros acadêmicos Luiza, Jeyslane, Geovana, Maria Eduarda, Antônio, Pedro e Robert, que durante esses cinco anos deixaram o processo mais leve e me arrancaram as melhores risadas. Jamais esquecerei, vocês são incríveis. Amo muito vocês. E às demais pessoas que não foram citadas, mas que durante esse percurso tive o prazer de conhecer, muito obrigada.

À minha amada orientadora, minha mãe acadêmica, Elisalva. Você me lapidou, me ensinou e enxergou em mim um potencial que nem eu acreditava ter. Gratidão por me apresentar e me permitir viver a pesquisa. Ver o seu amor e entrega por ela foi o que me inspirou. Dos puxões de orelha aos abraços apertados cheios de amor, gratidão.

A minha coorientadora, Rebeca (Beca), que me acompanhou em diversos momentos deste trabalho e percurso e que sempre esteve disposta a me ajudar neste processo, para você também, os meus mais sinceros agradecimentos por toda troca de conhecimento e paciência.

Calma, eu não esqueci de vocês. Ao GEPPE e a todos que durante esse tempo de pesquisa compartilharam ricos conhecimentos e trocas afetuosas comigo. Rebeca, Beatriz, Brenda, Catarina, Alina e Octávio, esse agradecimento é especialmente para vocês. Esse trabalho lindo não teria sentido sem a ajuda de cada um de vocês.

Para finalizar, à minha eterna casa, à UNEB, que abriu as portas e me trouxe uma perspectiva de futuro acadêmico imensurável. À FIOCRUZ e às instituições de fomento, que foram meu apoio para concluir esse trabalho. Muito obrigada.

RESUMO

Introdução: A leishmaniose trata-se de um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidas por flebotomíneos, que pode se apresentar nas formas clínicas: Tegumentar Americana (LTA) e Visceral (LV). O arsenal terapêutico disponível permanece limitado por toxicidade, custo, baixa adesão e resistência medicamentosa, ressaltando a necessidade de novas terapias. **Objetivo:** O presente trabalho avaliou a atividade antileishmania, citotóxica e o potencial imunomodulador das chalconas sintéticas FER13 e FER38. **Materiais e métodos:** As chalconas sintéticas foram obtidas em colaboração com a Universidade Federal da Paraíba (UFPB). A citotoxicidade (CC_{50}), a atividade antileishmania (CI_{50}) e o índice de seletividade ($IS=CC_{50}/CI_{50}$) foram determinados pelo ensaio de Alamar Blue. Macrófagos infectados com *L. braziliensis* foram avaliados após tratamento com 5 e 10 µM das chalconas. As citocinas TNF-α, IL-6, IL-1β e IL-10 foram quantificadas por ELISA e o óxido nítrico (NO) pelo método de Griess. **Resultados e discussão:** FER13 e FER38 apresentaram baixa citotoxicidade (CC_{50} = 28,65 ± 10,53 µM e 35,53 ± 6,24 µM) comparadas à anfotericina B (2,08 ± 1,55 µM). FER13 foi mais potente para promastigotas (IC_{50} = 3,40 ± 1,2 µM) que FER38 (IC_{50} = 7,83 ± 2,37 µM), ambas com IS superiores (8,3 e 4,5, respectivamente) à anfotericina B (1,4). Ambas reduziram a infecção intracelular e a quantidade de amastigotas por macrófagos. No perfil imunológico, FER13 e FER38 reduziram TNF-α (após 4 horas), IL-6, IL-10 e NO (após 24 horas), mas induziram a produção de IL-1β, evidenciando modulação seletiva da resposta inflamatória capaz de conter excesso de inflamação enquanto mantém atividade antiparasitária. **Considerações finais:** Os compostos FER13 e FER38 apresentam atividade antileishmania promissora e sua ação pode estar correlacionada ao seu efeito imunomodulador.

Palavra-chave: Imunomodulação; Chalcona; *Leishmania braziliensis;* Macrófagos

ABSTRACT

Introduction: Leishmaniasis is a group of diseases caused by protozoa of the genus Leishmania, transmitted by sandflies, which can present in the following clinical forms: American Tegumentary (LTA) and Visceral (VL). The available therapeutic arsenal remains limited by toxicity, cost, low adherence, and drug resistance, highlighting the need for new therapies**. Objective:** The present study evaluated the antileishmania activity, cytotoxicity, and immunomodulatory potential of the synthetic chalcones FER13 and FER38**. Materials and methods:** The synthetic chalcones were obtained in collaboration with the Federal University of Paraíba (UFPB). Cytotoxicity (CC_{50}), antileishmania activity (CI_{50}), and selectivity index ($SI=CC_{50}/CI_{50}$) were determined by the Alamar Blue assay. Macrophages infected with *L. braziliensis* were evaluated after treatment with 5 and 10 µM of the chalcones. The cytokines TNF-α, IL-6, IL-1β, and IL-10 were quantified by ELISA, and nitric oxide (NO) was quantified by the Griess method. **Results and discussion:** FER13 and FER38 showed low cytotoxicity (CC_{50} = 28.65 ± 10.53 µM and 35.53 ± 6.24 µM) compared to amphotericin B (2.08 ± 1.55 µM). FER13 was more potent for promastigotes (IC_{50} = 3.40 ± 1.2 µM) than FER38 (IC_{50} = 7.83 ± 2.37 µM), both with IS values higher (8.3 and 4.5, respectively) than amphotericin B (1.4). Both reduced intracellular infection and the amount of amastigotes per macrophage. In the immunological profile, FER13 and FER38 reduced TNF-α (after 4 hours), IL-6, IL-10, and NO (after 24 hours), but induced the production of IL-1β, evidencing selective modulation of the inflammatory response capable of containing excess inflammation while maintaining antiparasitic activity. **Final considerations:** The compounds FER13 and FER38 show promising antileishmania activity, and their action may be correlated with their immunomodulatory effect.

Keywords: Immunomodulation; Chalcone; *Leishmania braziliensis*; Macrophage

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CC_{50}: Concentração tóxica para 50% das células (do inglês *Cytotoxic Concentration 50%*)

UNEB: Universidade do Estado da Bahia

AMB: Anfotericina B (do inglês *Amphotericin B)*

IC_{50}: Concentração inibitória de 50% (do inglês *50% inhibitory concentration*)

ELISA: Ensaio imunoenzimático (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

DMEM: Eagle modificado por Dulbecco (do inglês *Dulbecco's modified Eagle's medium*)

ANOVA: Análise de Variância (do inglês *Analysis of Variance*)

LPKD: Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar

NF-kB: Fator de transcrição (do inglês *Nuclear kappa B Fator***)**

PI3K: Fosfoinositídeo 3-quinase

Akt: Proteína cinase B (do inglês *Protein kinase B*)

TNF-α: Fator de necrose tumoral (do inglês *tumor necrosis factor*)

TLRs: Receptores do tipo Toll (do inglês *Receptor Toll-Like*)

IFN-γ: Interferon gama (do inglês *Receptor Toll-Like*)

IL-1: Interleucina 1 (do inglês *Interleukin 1*)

IL-4: Interleucina 4(do inglês *Interleukin 4*)

IL-10: Interleucina 10(do inglês *Interleukin 10*)

IM: Intramuscular

IV: Intravenosa

IL: Interleucinas

LC: Leishmaniose Cutânea

LCD: Leishmaniose Cutânea Difusa

LD: Leishmaniose Disseminada

LMC: Leishmaniose Mucocutânea

LPS: Lipopolissacarídeos

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana

LV: Leishmaniose Visceral

LPG: Lipofosfoglicano (do inglês *LipoPhosphoGlycan)*

GP63: Glicoproteína 63 (do inglês *Glycoprotein 63*)

PAMPs: Padrões Moleculares Associados a Patógenos

RNS: Espécies reativas de nitrogênio (do inglês *Reactive Nitrogen Species*)

NO: Óxido Nítrico (do inglês *Nitric Oxide)*

OMS: Organização Mundial da Saúde

OPAS: Organização Pan-Americana de Saúde

ROS: Espécies reativas de oxigênio (do inglês *Reactive Oxygen Species*)

SBF: Soro bovino fetal (do inglês *Fetal Bovine Serum*)

Th: Células T auxiliadoras **(**do inglês *T helper cells*)

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1: Avaliação da citotoxicidade, atividade antileishmania e índice de seletividade dos compostos.

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1: Mapa da endemicidade da leishmaniose cutânea (LC) no mundo (2023-2024).

Figura 2: Mapa da endemicidade da leishmaniose visceral (LV) no mundo (2023-2024).

Figura 3: Ciclo de vida da *Leishmania*.

Figura 4: Manifestações clínicas da leishmaniose.

Figura 5: Representação esquemática da chalcona como estrutura privilegiada na química medicinal.

Figura 6: Representação esquemática das vias de ativação dos macrófagos.

Figura 7: Imunomodulação da *Leishmania*).

Figura 8: Estrutura Química da FER13 (E)-1-(benzo[d] [1,3] dioxol-5-il) -3-(3-bromo-4-etoxi-5-metoxifenil) prop-2-en-1- ona

Figura 9: Estrutura Química da FER38 molécula (E)-1-(benzo[d] [1,3] dioxol-5-il) -3-(tiofen-2-il) prop-2-en-1-ona

Figura 10: O percentual de infecção e o número de amastigotas por 100 macrófagos infectados e tratados ou não com a FER13 (A) e FER38 (B).

Figura 11: FER13 e FER38 reduziram a produção de TNF-α (A) e NO (B).

Figura 12: FER13 e FER38 induziram a produção de IL-1β (A), mas reduziram a produção da citocina IL-6 (B).

Figura 13: FER13 e FER38 suprimiram a produção de IL-10 (A).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 7
2. OBJETIVOS 9
2.1 GERAL 9
2.2 ESPECÍFICOS 9
3. REFERENCIAL TEÓRICO 10
3.1 EPIDEMIOLOGIA E RELEVÂNCIA GLOBAL 10
3.2 CICLO PARASITÁRIO 12
3.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS 13
3.4 TRATAMENTO 14
3.5 CHALCONAS 16
3.6 IMUNOMODULAÇÃO 18
4. MATERIAIS E MÉTODOS 21
4.1 MOLÉCULAS 21
4.2 CULTURA DE CÉLULAS 22
4.3 CULTURA DE PARASITOS 22
4.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE 22
4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA 50% (CI_{50}) PARA PROMASTIGOTAS. 23
4.6 ÍNDICE DE SELETIVIDADE 23
4.7 INFECÇÃO *IN VITRO* 23
4.8 ESTÍMULO DE MACRÓFAGOS *IN VITRO* POR *L. Braziliensis* E LIPOPOLISSACARÍDEO PARA DOSAGEM DE CITOCINAS 24
4.8 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO E CITOCINAS 24
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA 24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 25

5.1 CITOTOXICIDADE, VIABILIDADE CELULAR E ÍNDICE DE SELETIVIDADE DA FER13 E FER38 EM MACRÓFAGOS MURINOS E PROMOASTIGOTAS DE *L. braziliensis*..... 25

5.2 FER13 e FER38 REDUZ A INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS J774 E O NÚMERO DE AMASTIGOTAS DE *L. BRAZILIENSIS*..... 26

5.3 REDUÇÃO DE TNF-α E ÓXIDO NÍTRICO APÓS TRATAMENTO COM FER13 E FER38 28

5.4 PRODUÇÃO DE IL-1β E REDUÇÃO DE IL-6 APÓS TRATAMENTO COM FER13 E FER38 29

5.4 PRODUÇÃO DE IL-10 APÓS TRATAMENTO 30

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS 32

REFERÊNCIA 33

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma infecção causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida por vetores flebotomíneos fêmeas (Phlebotomus e Lutzomyia), durante o repasto sanguíneo (hematofagia). O vetor inocula na derme do hospedeiro promastigotas metacíclicas, as quais são fagocitadas e diferenciam-se em amastigotas, no ambiente intracelular (Makarani *et al*., 2025).

As manifestações clínicas da leishmaniose são diversas e refletem tanto a espécie envolvida quanto a resposta imune do hospedeiro. Em termos gerais, há duas manifestações principais: a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e a Visceral (LV). Na LT ocorrem diferentes apresentações: cutânea (LC), caracterizada por úlceras localizadas, mucocutânea (LMC), que compromete mucosas da cavidade oral, nasal e faringe, sendo considerada a apresentação mais severa dentro deste espectro; além da Cutânea Difusa (LCD) e da Cutânea Disseminada (LD). Essas formas, no Brasil, estão frequentemente associadas às espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis, L. amazonensis e L. (V.) guyanensis*. A LV, por sua vez, corresponde à apresentação sistêmica mais crítica e potencialmente letal, com acometimento de fígado, baço, linfonodos e medula óssea, sendo comumente relacionada às espécies *L. infantum chagasi e L. donovani* (Cordeiro-da-Silva, 2022). A distribuição geográfica de parasitos e vetores é não uniforme, pois depende de nichos ecológicos específicos que sustentam a transmissão (Labbé *et al*., 2023).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica a leishmaniose como uma doença tropical negligenciada (DTN), ressaltando seu impacto expressivo não apenas na saúde, como também aspectos sociais e econômicos. Estimativas da OMS e da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) indicam a ocorrência anual de 700 mil a 1 milhão de novos casos no mundo (OMS, 2020). No Brasil, o cenário é agravado devido à ampla disseminação do vetor e à existência de reservatórios naturais, como cães e roedores (De Vriess; Schallig Hd, 2022). Conforme a OPAS (2024), estima-se que essa doença esteja presente de forma endêmica em mais de 98 países e territórios, afetando, de maneira desproporcional, populações em situação de vulnerabilidade social, especialmente na África, Ásia e em grande parte da América Latina.

Apesar da relevância em saúde pública, o conjunto terapêutico disponível para o tratamento da leishmaniose permanece limitado. Esquemas clássicos, como os antimoniais pentavalentes seguem sendo o tratamento de primeira linha em diversos países, embora apresentem elevada toxicidade e baixa adesão ao tratamento devido à via de administração parenteral, dolorosa ao paciente (Revista Brasileira da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2019; Castro et al, 2023;). Outras opções como a anfotericina B, miltefosina, paromomicina e pentamidina apresentam efeitos adversos graves, nefrotoxicidade, teratogenicidade, cardiotoxicidade, exigência de hospitalização e ônus financeiro ao sistema público, que pode variar de R$290 a R$27.000, a depender do esquema utilizado (Zhang *et al.,* 2025). Diante desse conjunto de fatores torna-se estratégica a busca por novas alternativas terapêuticas.

Compostos bioativos sintéticos e derivados naturais, como as chalconas, pertencentes à classe dos flavonoides, têm despertado interesse devido a sua heterogeneidade estrutural e capacidade de atuação em diversos alvos farmacológicos. Além da sua possibilidade de produção sintética e biossintética, esses compostos apresentam atividades anticâncer, anti-inflamatórias, antidiabéticas, quimiopreventivas do câncer, antioxidantes, antimicrobianas e antiparasitárias. Estudos recentes relatam que chalconas sintéticas apresentam ação antileishmania, além de modularem a resposta imunológica do hospedeiro, o que as torna candidatas promissoras na busca por alternativas terapêuticas inovadoras (Mahapatra *et al.,* 2017; De Mello *et al.,* 2018; Lin, Y *et al.,* 2019; Gao, F *et al.,* 2020; Rocha, S *et al.,* 2020; Xu, S *et al.,* 2020; Henry, EJ *et al.,* 2020; Cheng, *P et al.,* 2020).

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que chalconas bromadas desempenham atividade antileishmania e imunomoduladora promissora, sustentando a continuidade da investigação com outros derivados de chalconas (Santos *et al.,* 2025). Neste trabalho, o efeito parasiticida de duas chalconas (FER13 e FER38) e a sua capacidade em modular a resposta imune de macrófagos murinos infectados por *Leishmania braziliensis* e/ou estimulados por LPS foi avaliado.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Determinar ação antileishmania e o perfil de resposta imune em macrófagos infectados por *L. braziliensis* e estimulados e/ou não com LPS e tratados com FER13 e FER38 *in vitro*.

2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a citotoxicidade dos compostos;
- Investigar a atividade das chalconas frente às suas formas promastigotas e amastigotas;
- Determinar a capacidade das chalconas de inibir a infecção e reduzir o número de amastigotas por célula;
- Quantificar a produção de citocinas e de óxido nítrico em macrófagos submetidos ao tratamento com chalconas.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 EPIDEMIOLOGIA E RELEVÂNCIA GLOBAL

A leishmaniose continua sendo um grande problema de saúde em quatro regiões eco-epidemiológicas do mundo: África Oriental, Norte da África, Américas e Oeste e Sudeste Asiático (OMS, 2024). Com 1,5 a 2 milhões de casos adicionais anualmente, prevê-se que haverá 12 milhões de ocorrências em todo o mundo (Costa-da-Silva *et al*., 2022). Em 2023, dos 200 países e territórios que relataram dados à Organização Mundial de Saúde (OMS), 99 (49%) foram considerados países endêmicos e 6 haviam relatado casos de leishmaniose anteriormente. Já em 2023, 272.098 novos casos de LC (271.705 indígenas e 393 importados) e 11.922 novos casos de LV (11.762 indígenas e 160 importados) foram notificados à OMS. Dos novos casos de LC notificados, 94% eram da Região do Mediterrâneo Oriental (81%) e da Região das Américas (13%). (OMS, 2024).

Figura 1. Mapa da endemicidade da leishmaniose cutânea (LC) no mundo, 2023-2024 (OMS,2024).

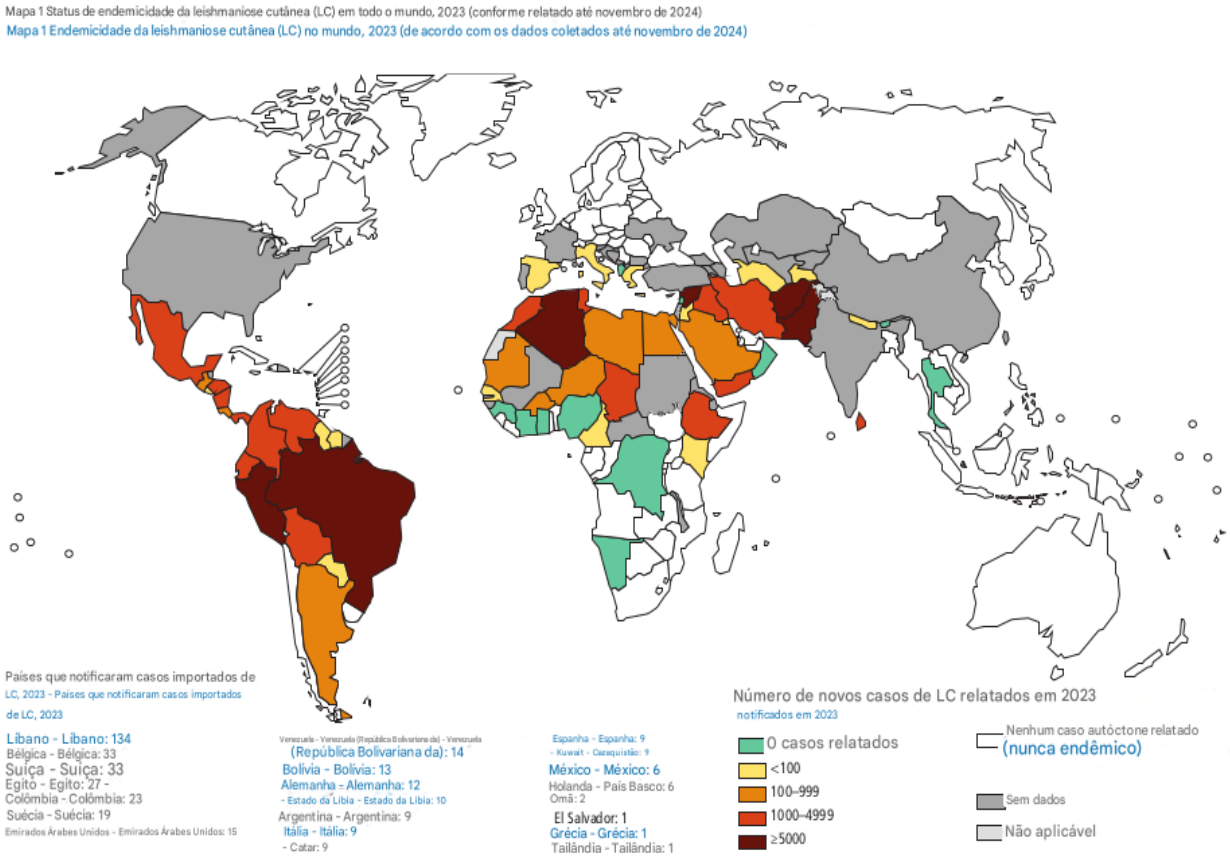
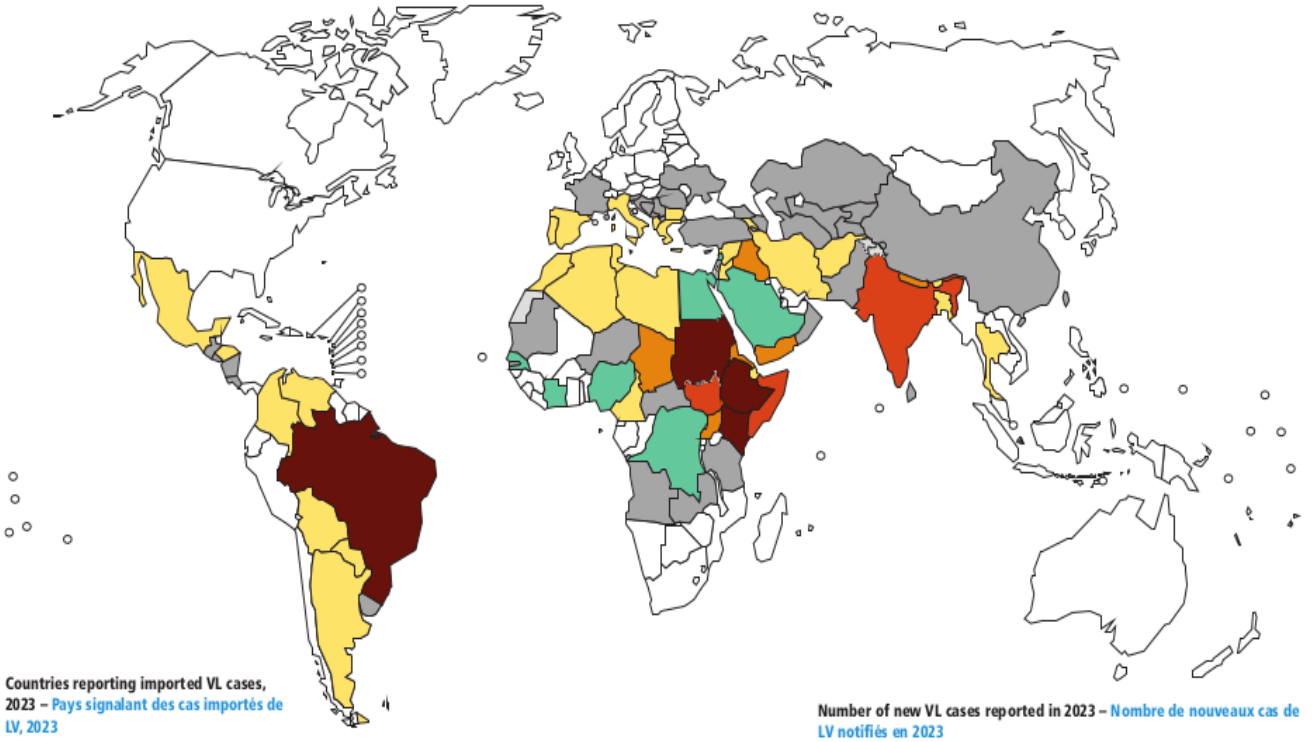


Figura 2. Mapa da endemicidade da leishmaniose visceral (LV) no mundo, 2023-2024 (OMS,2024).

Map 2 **Status of endemicity of visceral leishmaniasis (VL) worldwide, 2023 (as reported by November 2024)**
Carte 2 **Endémicité de la leishmaniose viscérale (LV) dans le monde, 2023 (selon les données collectées jusqu'en novembre 2024)**



Countries reporting imported VL cases, 2023 – Pays signalant des cas importés de LV, 2023

Sudan – Soudan: 108
Uganda – Ouganda: 22
Netherlands – Pays-Bas: 6
Switzerland – Suisse: 6
Belgium – Belgique: 3
Columbia – Colombie: 3
Egypte – Égypte: 2
Sweden – Suède: 2
Argentina – Argentine: 1
Djibouti: 1
State of Libya – État de Libye: 1
Oman: 1
South Sudan – Soudan du Sud: 1
Spain – Espagne: 1
Syrian Arab Republic – République arabe syrienne: 1
Thailand – Thaïlande: 1

Number of new VL cases reported in 2023 – Nombre de nouveaux cas de LV notifiés en 2023

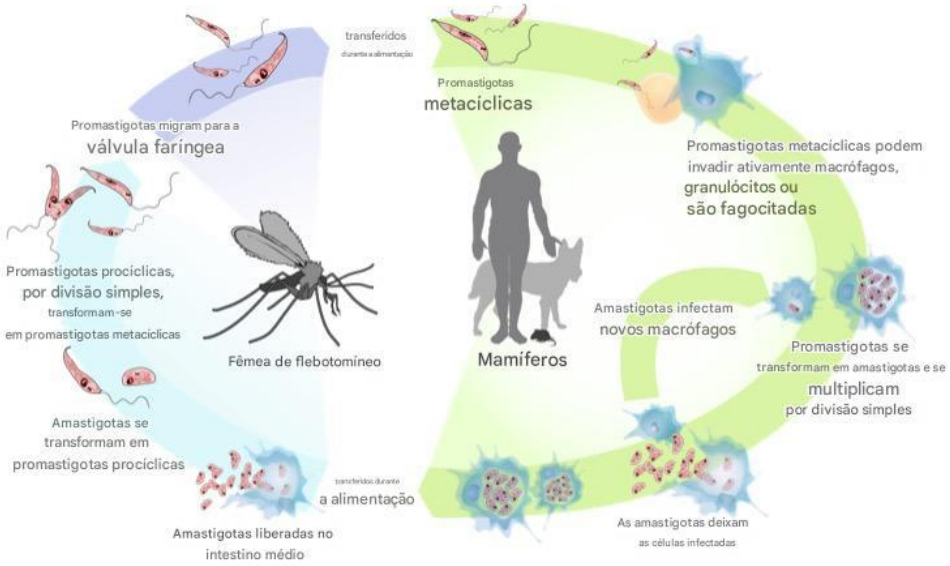
0 cases reported – 0 cas notifiés
<100
100–499
500–999
≥1000
No autochtonous cases reported – Pas de cas autochtone notifié
No data – Aucune donnée
Not applicable – Sans objet

3.2 CICLO PARASITÁRIO

O parasito *Leishmania* é disseminado para humanos e outros reservatórios animais pela picada da fêmea do mosquito flebotomíneo, que pertence à ordem *Diptera*, família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotomine* dos gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo). Sendo essa espécie, mais ativa no período da noite. Promastigota e amastigota são as duas formas evolutivas presentes e que agem de formas distintas no ciclo de vida de *Leishmania spp* (Makarani *et al*., 2025; Saha *et al*., 2023; Costa-da-Silva *et al*., 2022). O seu ciclo inicia-se no sistema digestivo do flebotomíneo, no qual o parasito se apresenta pela forma promastigota (extracelular). Essa forma pode seguir dois caminhos: o promastigota procíclico, que se desenvolve e se replica de forma assexuada no vetor, ou o promastigota metacíclico, que é a sua forma infectante para o hospedeiro, que migra para a probóscide do inseto tornando-se capaz de ser transmitido através do repasto sanguíneo.

Ao ser inoculado na pele do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo, os promastigotas são rapidamente fagocitados por células do sistema imunológico, como: macrófagos, neutrófilos, monócitos e células dendríticas. No ambiente intracelular, eles se diferenciam em amastigotas (forma replicante e de interesse clínico) por divisão binária simples dentro dos macrófagos, até romper sua parede celular proliferando para os tecidos e estando disponíveis para serem novamente fagocitada por outros macrófagos ou serem ingeridas através de um novo repasto sanguíneo com o mosquito-palha fêmea. A evolução da infecção, por sua vez, vai depender de diversos fatores, como a resposta imune do hospedeiro e a espécie da leishmania envolvida. O resultado pode variar desde formas assintomáticas da doença até manifestações clínicas mais severas (Makarani *et al*., 2025; Serafim *et al*., 2021).

Figura 3. Ciclo de vida da *Leishmania* (Adaptado de Villareal, 2008).



3.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A leishmaniose apresenta formas clínicas diferentes: Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), onde as lesões são dérmicas e afetam a mucosa; e a Leishmaniose Visceral (LV), sua forma mais agressiva, fatal e sistêmica. A Leishmaniose Tegumentar está dividida em Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Mucocutânea (LMC) e Leishmaniose Difusa (LCD) e Disseminada (LD), causadas no Brasil, por *Leishmania (Viannia) braziliensis, L. amazonensis e L. (V.) guyanensis*. A LC é a forma mais comum, caracterizada como uma doença benigna e que pode apresentar lesões ulceradas únicas ou múltiplas, geralmente autolimitadas, com caráter expansivo e tendência de disseminação para áreas distantes do ponto de penetração, cursando com o aparecimento de novas lesões.

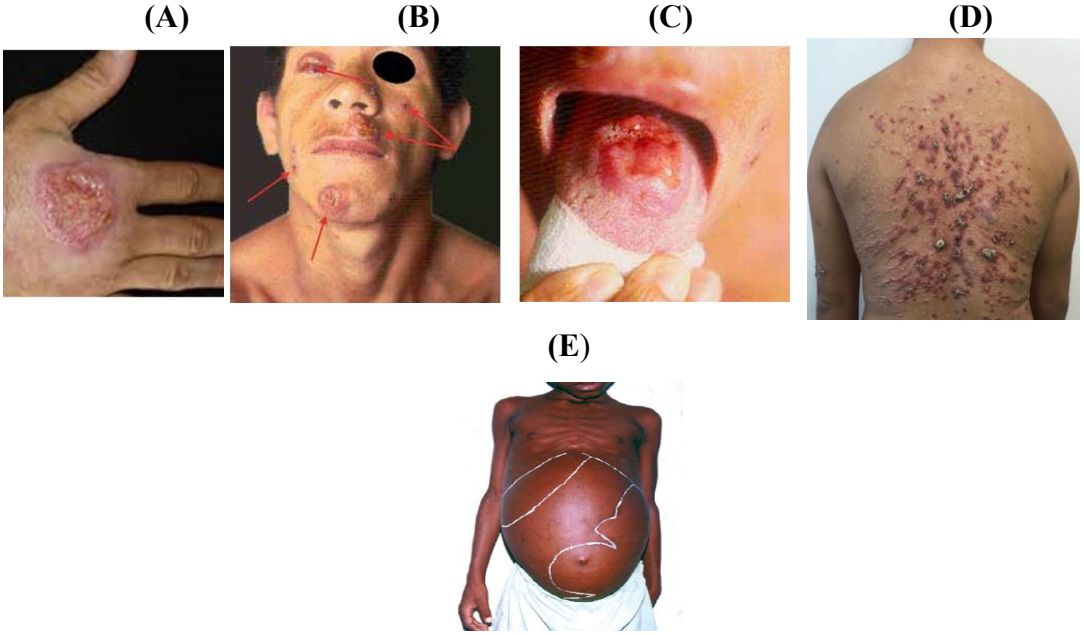
A LMC pode surgir como uma doença progressiva e sistêmica, até mesmo como uma complicação da LC, podendo surgir após meses ou anos, posteriormente, a infecção inicial da LC. Caracteriza-se pela presença de lesões nas membranas mucosas das cavidades do nariz, boca e garganta, levando à destruição parcial ou completa da área afetada, além do mais as lesões ulceradas, que podem ser desfigurantes e potencialmente mortais, acometendo a qualidade de vida do paciente devido as múltiplas mutilações que causam dificuldades para respirar, falar e se alimentar.

A LCD, geralmente associada à infecção por *L. amazonensis*, apresenta forte relação com falhas na resposta imune celular, o que favorece o desenvolvimento de lesões extensas, não ulceradas e de aspecto nodular, semelhantes a queloides, podendo acometer amplas áreas corporais. Já a LD, caracteriza-se por um curso clínico mais agressivo, marcado pela presença de múltiplas e variadas lesões cutâneas distribuídas em duas ou mais regiões do corpo, incluindo pápulas, nódulos superficiais e ulcerações (Abadías-Granado *et al*., 2021; Brasil, 2022).

A leishmaniose visceral ou popularmente citada como febre negra é a condição mais letal, até mesmo em casos de diagnóstico e tratamentos incorretos. Comumente relacionada a *L. infantum chagasi e L. donovani,* acomete diretamente órgãos viscerais, baço, fígado e medula óssea. Após infectados pelo parasito, levam à febre, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia, pancitopenia, escurecimento da pele, perda de peso, anemia progressiva e hipergamaglobulinemia. Muitos casos de leishmaniose visceral, durante ou após a conclusão do tratamento, desenvolvem

diferentes formas de lesões cutâneas, como lesões maculares, papulares e nodulares, conhecidas como a LPKD. Vale ressaltar que as manifestações clínicas vão depender de condições multifatoriais, sendo destacadas através do hospedeiro, principalmente, o comportamento do seu sistema imunológico, espécie do parasito e o próprio ambiente (Chappuis *et al*., 2007; Bharati., 2022).

Figura 4. Manifestações clínicas da leishmaniose. (A) Forma cutânea, (B) a forma Cutânea Disseminada, (C) Mucocutânea, (D) Cutânea Difusa e (E) a forma Visceral (Adaptado de Brasil, 2010).



3.4 TRATAMENTO

Apesar dos avanços na terapêutica contra a leishmaniose, os fármacos disponíveis ainda apresentam importantes limitações relacionadas à toxicidade, à eficácia variável e aos altos custos envolvidos, o que evidencia a urgência por alternativas mais seguras e acessíveis. Entre os principais medicamentos utilizados estão os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B (em suas diferentes formulações), a miltefosina, a paromomicina e a pentamidina. Cada um desses fármacos carrega desafios específicos: os antimoniais sofrem com a crescente resistência parasitária e toxicidade significativa; a anfotericina B exige internação e está associada a efeitos adversos graves; a eficácia da

miltefosina varia conforme a região geográfica; a paromomicina apresenta respostas clínicas inconsistentes; e a pentamidina pode causar eventos adversos severos. Ainda assim, essas opções continuam sendo amplamente utilizadas no manejo da doença, mesmo diante de suas limitações. (Zhang *et al*., 2025).

No caso da LC, os tratamentos disponíveis são a injeção intralesional de antimoniais pentavalentes como o estiboglucanato de sódio (Pentostam) e o antimoniato de meglumina (Glucantime). Estes fármacos de primeira linha atuam na inibição da glicólise, da β-oxidação de ácidos graxos e da fosforilação do ADP, afetando o metabolismo energético do parasito. A aplicação dos antimoniais também já foi demonstrada em outras formas clínicas da doença como na LMC, administrada por via intramuscular (IM) e intravenosa (IV). Apesar da sua eficácia, a resistência por parte do parasito em algumas regiões, o seu elevado custo e o uso prolongado de doses mais altas têm sido associadas a toxicidade grave, como insuficiência hepática e renal, com alguns casos de cardiotoxicidade significativa (Zhang *et al*., 2025).

A anfotericina B, fármaco de segunda linha no tratamento das leishmanioses, a entrar em contato com o parasito, ligar-se preferencialmente ao ergosterol na membrana celular, formando canais iônicos ou agregados lipídicos nas membranas, levando à morte celular por meio de desequilíbrio osmótico e interrupção da homeostase iônica (ZHANG *et al*., 2025). Com o advento da atual formulação lipossomal (anfotericina B lipossomal), observou-se uma melhora significativa na segurança do tratamento. No entanto, apesar da resistência do parasito à AmB ter sido historicamente considerada rara, cepas emergentes de leishmania resistentes vêm sendo identificadas, levantando preocupações quanto à eficácia terapêutica e aos riscos clínicos envolvidos (Zhang *et al*., 2025; PASQUALOTTO, 2015).

A miltefosina, pertencente à classe das alquilfosforilcolinas, destaca-se por sua ação de amplo espectro, com propriedades antitumorais, antiparasitárias e antifúngicas. Atualmente, é o único fármaco administrado por via oral aprovado para o tratamento da leishmaniose, o que representa um avanço relevante em relação às terapias injetáveis disponíveis, especialmente no que diz respeito à comodidade do tratamento e à adesão do paciente. Seu efeito antileishmania está associado, principalmente, à capacidade de interferir no metabolismo lipídico do parasito, comprometendo processos essenciais à sua

sobrevivência. Além disso, a miltefosina atua sobre as vias de sinalização lipídica da célula hospedeira, inibindo mecanismos que são explorados pela *Leishmania* para facilitar sua entrada e permanência intracelular. Dentre essas vias, destaca-se a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), cuja inibição prejudica a formação de um ambiente celular antiapoptótico favorável ao parasito (ZHANG *et al*., 2025).

A pentamidina é um agente antiprotozoário utilizado no tratamento da leishmaniose, especialmente em casos refratários aos tratamentos convencionais. Seu mecanismo de ação não é completamente compreendido, mas acredita-se que a pentamidina interfira em diversos processos celulares do parasito. Estudos sugerem que ela pode inibir a síntese de DNA, RNA, fosfolipídios e proteínas, afetando a viabilidade do parasito. Além disso, a pentamidina pode induzir a perda do potencial de membrana mitocondrial no parasito, resultando em diminuição da produção de ATP e morte celular. Essa ação contribui para sua eficácia no tratamento da leishmaniose. No entanto, o uso da pentamidina está associado a efeitos adversos significativos, como hipoglicemia, nefrotoxicidade e distúrbios cardiovasculares, o que limita sua aplicação clínica (Drugbank., 2025).

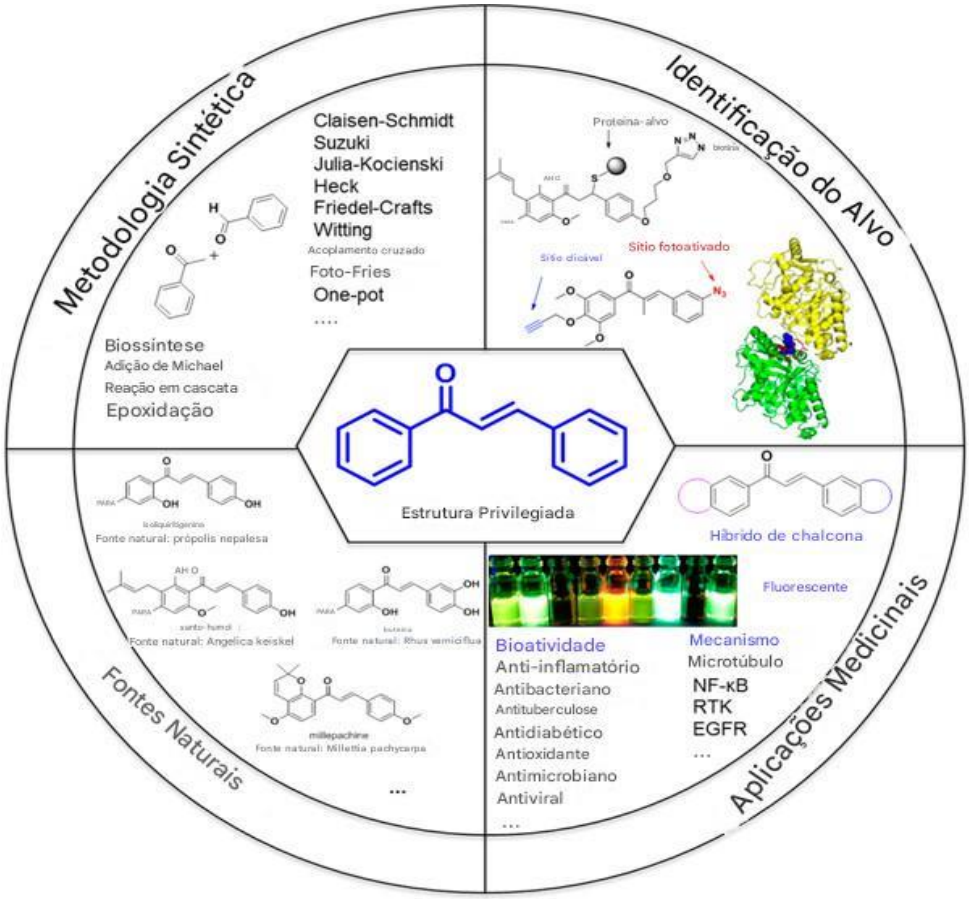
A paromomicina é um aminoglicosídeo utilizado no tratamento da leishmaniose cutânea e visceral. Seu mecanismo de ação envolve a ligação à subunidade 30S do ribossomo do parasito, especificamente ao RNA ribossômico 16S. Essa interação resulta em leitura incorreta do mRNA durante a síntese proteica, levando à incorporação de aminoácidos errôneos e à produção de proteínas defeituosas, comprometendo a viabilidade do parasito. Além disso, a paromomicina inibe a translocação do ribossomo, interrompendo a síntese proteica e afetando a função celular do parasito (Pokharael *et al*., 2021; Zhang *et al*., 2025).

3.5 CHALCONAS

As chalconas são moléculas de aplicabilidade no setor farmacêutico, alimentício e cosmético. Essas moléculas vêm sendo estudadas por diversas redes de amparo à pesquisa, com o objetivo de conduzir para o mundo novas alternativas de tratamento e produtos inovadores. As chalconas podem ser encontradas em diversas classes de frutas e vegetais presentes na natureza e, pelas suas atividades biológicas já reconhecidas, se tornaram um marco no avanço científico e biológico. As chalconas têm como molécula

base a 1,3-difenil-2-propen-1-ona, sendo caracterizada pelo seu anel fenil ligado ao grupo carbonila e a outro anel benzênico. Identificada através do seu conhecido sistema de cetona α, β-insaturada, que gera em sua molécula uma alta reatividade eletrofílica que o torna um grande alvo de ataque nucleofílico, permitindo que a molécula atue com enzimas, proteínas e contribua para a adição de grupos funcionais em seus anéis aromáticos, formando novos análogos da chalcona e diversificando a sua bioatividade. Além disso, as chalconas são precursoras de diversos flavonoides, pois podem ser facilmente ciclizadas em flavononas (croman-4-onas) em um ambiente ácido, assim como, por outras técnicas e rotas de reação. Estes compostos apresentam uma série de atividades biológicas de interesse mundial, possuindo propriedades anticancerígenas, antioxidantes, antimicrobianas, antivirais, antimaláricas, antileishmania, anti-inflamatórias, anti-hiperglicêmicas e inibitórias da tirosina quinase (Doraghi *et al.*, 2025; Zhuang *et al.*, 2017).

Figura 5. Representação esquemática da chalcona como estrutura privilegiada na química medicinal (Adaptado de Zhuang *et al.*, 2017).



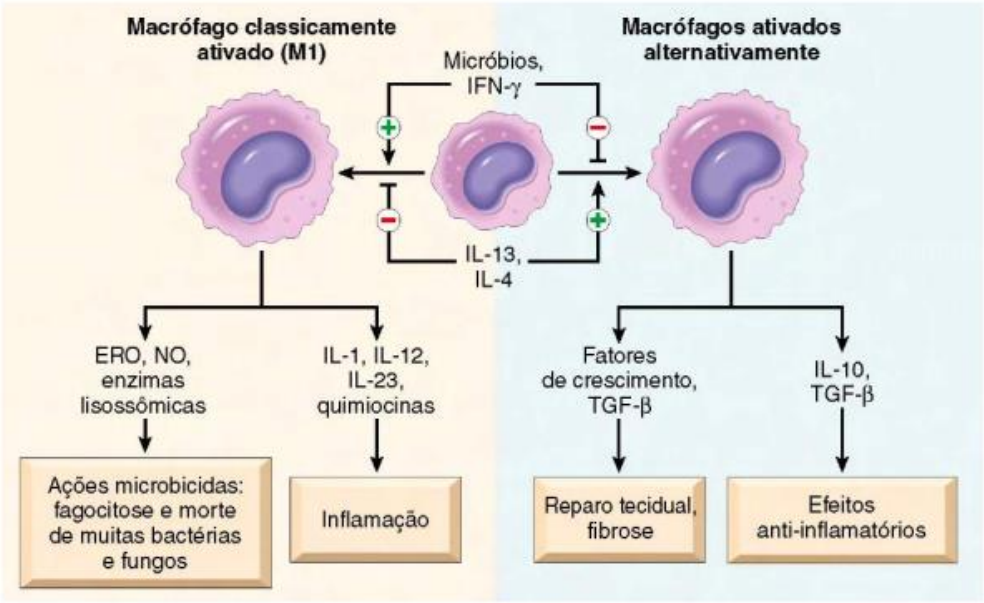
3.6 IMUNOMODULAÇÃO

Os macrófagos desempenham um papel central no controle ou progressão da leishmaniose, pois representam as principais células hospedeiras do parasito, independentemente da espécie infectante. No cenário da imunidade inata, estas células atuam como fagócitos altamente especializados e, por isso, a *Leishmania* evoluiu mecanismos refinados para modular a resposta macrofágica e evitar sua eliminação dentro do fagolisossomos. Para estabelecer uma infecção bem-sucedida, o parasito adota estratégias que incluem: modulação direta da ativação macrofágica, uso de neutrófilos para uma infecção silenciosa, indução de um perfil Th2 em detrimento de Th1 e hiperativação de células B com consequente produção de IL-10, favorecendo um microambiente anti-inflamatório, favorável para a progressão da infecção e permanência do parasito (Almeida *et al.*, 2023).

Nessa dinâmica, a polarização macrofágica desempenha papel decisivo no desfecho da infecção. Macrófagos M1 (clássicos) são induzidos principalmente por IFN-γ e TNF-α, promovendo uma resposta inflamatória com alta produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (ROS), favorecendo o controle da *Leishmania* e o perfil Th1. Já os macrófagos M2 (alternativamente ativados) são estimulados por IL-4, IL-13 e IL-10, resultando em uma resposta regulatória/anti-inflamatória que diminui a microbicida e facilita a permanência e replicação do parasito no interior do fagossoma, favorecendo uma resposta Th2 (Almeida *et al.*, 2023). Assim, a progressão clínica da doença está diretamente associada ao predomínio funcional do perfil M2.

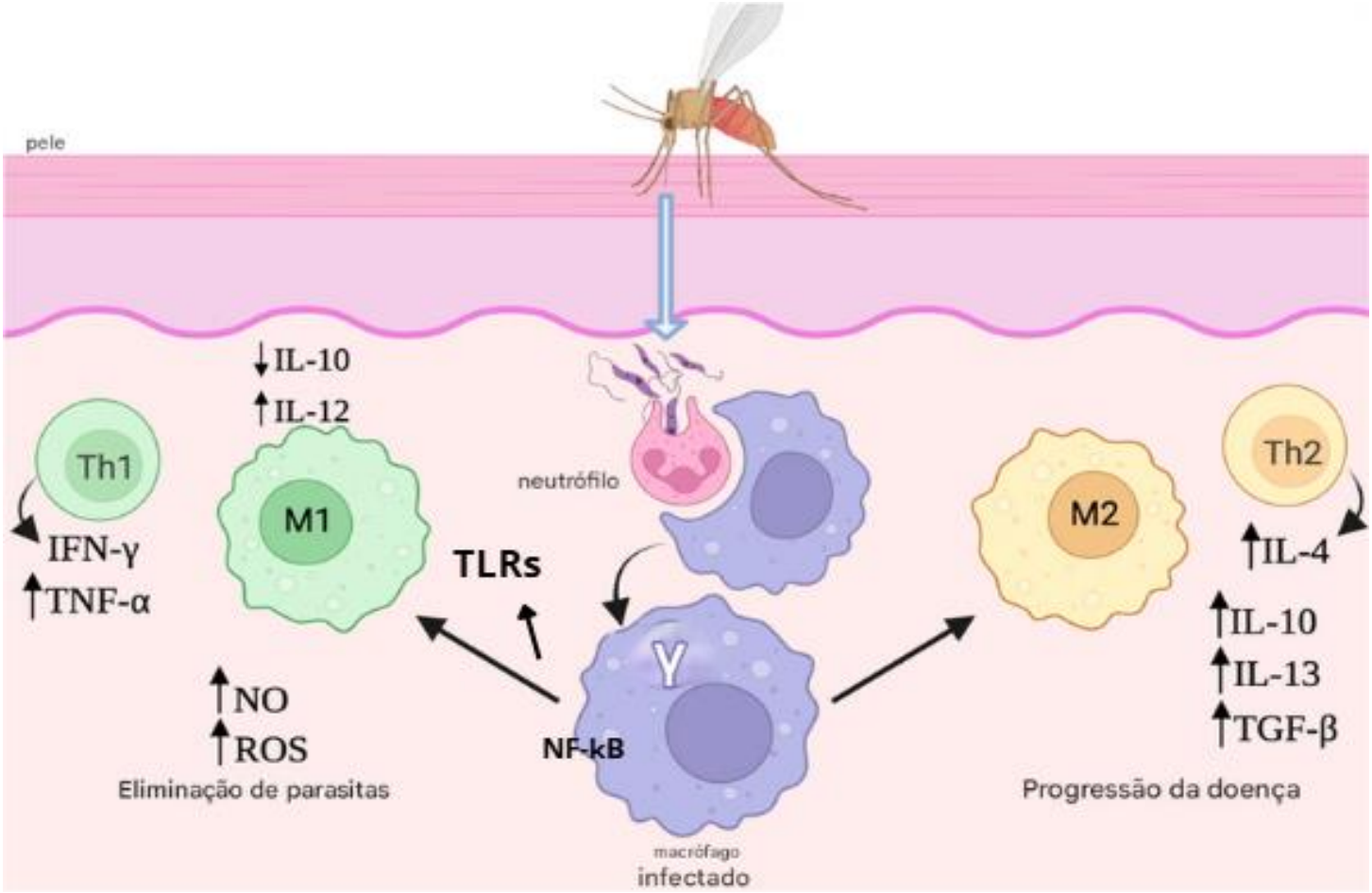
Recentemente, estudos têm mostrado que a manipulação terapêutica do eixo M1/M2 pode alterar o prognóstico da infecção. Estratégias imunomoduladoras que favorecem a conversão de M2 em M1 aumentam a capacidade do hospedeiro de controlar a carga parasitária. Exemplo disso é o estudo experimental conduzido por Keyhani *et al.,* (2025), que demonstrou que a leptina potencializa o efeito do antimonial ao promover uma reprogramação macrofágica em direção ao fenótipo M1, evidenciando que terapias combinadas com imunomoduladores podem reforçar o microambiente inflamatório necessário para a eliminação do parasito.

Figura 6. Representação esquemática das vias de ativação dos macrófagos (Robbins, 2013).



O reconhecimento inicial do parasito ocorre principalmente por receptores do tipo Toll (TLRs), sobretudo TLR2 e TLR4, que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como o lipofosfoglicano (LPG), presente na superfície da *Leishmania*. A ativação dos TLRs desencadeia vias intracelulares que culminam na ativação do NF-κB e na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1β, TNF-α e IFN-γ, essenciais para a indução da produção de óxido nítrico via NOS2, molécula chave para eliminar o parasito (resposta Th1). No entanto, o LPG consegue modular negativamente esse processo ao inibir TLR2 e desviar a sinalização para a via PI3K/Akt, favorecendo um perfil anti-inflamatório (resposta Th2) que culmina com maior expressão de IL-4 e IL-10. Além disso, a metaloprotease GP63 cliva componentes intracelulares necessários à ativação de NF-κB, reduzindo drasticamente o potencial microbicida (Goto *et al.*, 2023; Yasuyuki., 2025; MacMicking *et al.*,).

Figura 7. Imunomodulação da *Leishmania* (Adaptado de Goto., 2025).



4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MOLÉCULAS

A síntese de chalconas FER13 e FER38 foi realizada pelo grupo do Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães no Laboratório de Química Orgânica do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e cedidas ao nosso grupo de pesquisa para fins de avaliação de atividade biológica. A síntese da chalcona (E)-1-(benzo[d][1,3] dioxol-5-il)-3-(3-bromo-4-etoxi-5-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (FER13) envolveu a bromação da vanilina, seguida pela eterificação e, por fim, a condensação de Claisen-Schmidt. Enquanto, a síntese da (E)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-3-(tiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (FER38) foi realizada diretamente pela condensação de Claisen-Schmidt entre 1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)etanona e tiofeno-2-carbaldeído. Vale ressaltar, que todas as duas moléculas são derivadas da acetofenona 1-(benzo[d][1,3] dioxol-5-il)etanona com diferentes benzaldeídos (Leite, 2024).

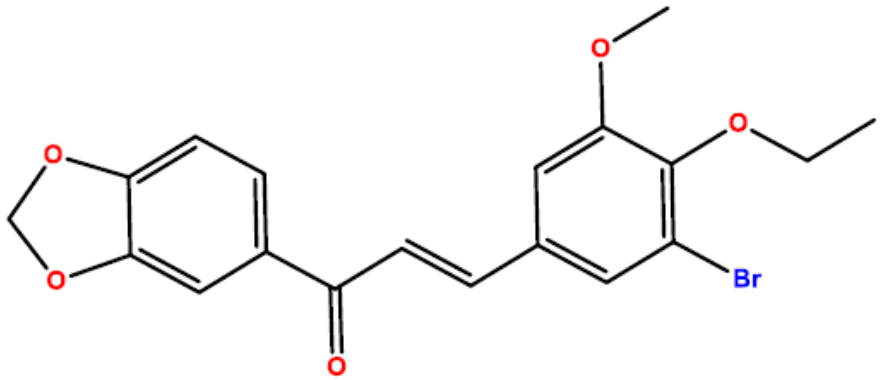


Figura 8. Estrutura Química da FER13 (E)-1-(benzo[d] [1,3] dioxol-5-il) -3-(3-bromo-4-etoxi-5-metoxifenil) prop-2-en-1- ona.

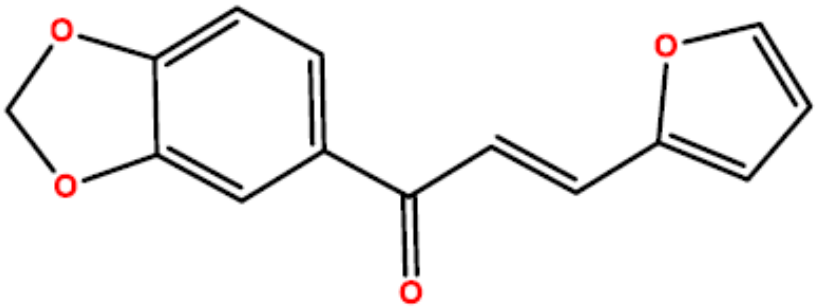


Figura 9. Estrutura Química da FER38 molécula (E)-1-(benzo[d] [1,3] dioxol-5-il) -3-(tiofen-2-il) prop-2-en-1-ona

4.2 CULTURA DE CÉLULAS

Os macrófagos murinos da linhagem J774 foram cultivados em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium - DMEM; Life Technologies, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) e suplementados com 10% de soro bovino fetal (FBS, GIBCO, Thermofisher cientific, Waltham, MA EUA), e 50 µg/ml de gentamicina (Life, Carlsbad, CA). As células J774 foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO_2.

4.3 CULTURA DE PARASITOS

As formas promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/BR88/BA-3456) foram cultivadas em meio Schneider (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) contendo 10% de soro bovino fetal (SBF, Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 50 µg/ml de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, Brasil), pH 7,2 e mantidos na incubadora a 26°C. Os parasitos foram contados diariamente em câmara de Neubauer, durante cinco dias. Ao atingirem a fase estacionária de crescimento, novas passagens *in vitro* dos parasitos foram realizadas.

4.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Para os ensaios de citotoxicidade, foram utilizados macrófagos murinos da linhagem J774, plaqueados e tratados com diferentes concentrações das moléculas em estudo. A anfotericina B (Cristália, Itapira, SP, Brasil) e a violeta genciana (Synth, São Paulo, Brasil) são os controles positivos e negativos desta avaliação, respectivamente. Os macrófagos foram incubados em placas de 96 poços ($1x10^5$ células/poço) e mantidos por 24 h em estufa a 37°C e 5% de CO_2. As moléculas utilizadas em concentrações variadas (50 µM a 1,56 µM), em triplicata, foram incubadas por 72 h e, logo em seguida, foi

adicionado 20 µL/poço de AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA). Após o período de 4 horas, foi realizada a leitura da placa em espectrofotômetro (Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA), a 450 e 492 nm, gerando o valor do Índice de Concentração Citotóxica para 50% dos macrófagos (CC_{50}) (Santos, 2023).

4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA 50% (CI_{50}) PARA PROMASTIGOTAS.

Promastigotas de *L. braziliensis* foram plaqueados em placas de 96 poços ($1x10^6$ por poço) e tratados com diferentes concentrações das moléculas em estudo (50 µM a 1,56 µM), em triplicatas, e incubados por 72 h a 26ºC. A anfotericina B foi o controle positivo desta avaliação. Posteriormente, foi adicionado 20 µL/poço de AlamarBlue (Invitrogen) durante 4 horas. A leitura foi realizada no espectrofotômetro (Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA), nos comprimentos de onda de 450 e 500 nm. O valor de IC_{50} foi calculado com base no percentual de inibição do crescimento das células comparado aos controles negativos. O cálculo foi obtido através dos valores do logaritmo da concentração, seguidos pelo ajuste da curva de regressão não linear (Adaptado de Santos *et al*, 2023).

4.6 ÍNDICE DE SELETIVIDADE

O índice de seletividade (IS) foi calculado pela razão entre o valor de CC_{50} obtido em macrófagos e o valor de IC_{50} obtido em promastigotas e amastigotas tratados com o FER13 e 38 (CC_{50}/IC_{50}) (Santos *et al*, 2023).

4.7 INFECÇÃO *IN VITRO*

Macrófagos murinos da linhagem J774 ($5x10^5$ células/poço) foram cultivados em placa de 24 poços com lamínulas redondas adicionadas previamente em cada poço e infectados por *L. braziliensis,* na razão de 10 parasitos por macrófagos ($5x10^6$). Concentrações de 10 e 5 µM da FER13 e FER38 foram adicionados aos poços após lavagem com meio DMEM (Life Technologies, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD). A anfotericina B (5 µM) foi utilizada como controle positivo. Após 24 horas, as células foram fixadas em metanol e coradas por Giemsa (Dinâmica, Química Contemporânea Ltda, SP, Brasil) (Santos *et al*, 2023).

4.8 ESTÍMULO DE MACRÓFAGOS *IN VITRO* POR *L. BRAZILIENSIS* E LIPOPOLISSACARÍDEO PARA DOSAGEM DE CITOCINAS

Os macrófagos foram plaqueados em placa de 24 poços ($1x10^5$), infectados com promastigotas de *L. braziliensis* ($1x10^6$) e estimulados ou não com lipopolissacarídeo (LPS) (500 ng/mL, Escherichia coli sorotipo 0111:B4, Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos). Após 24 horas, diferentes concentrações da FER13 e FER38 (10 µM, 5 µM, 2,5 µM e 1,25 µM) foram adicionadas aos poços para o tratamento. Para os controles negativos, foram utilizadas células sem estímulo ou estimuladas com LPS e *L. braziliensis*, isoladamente. Nos controles positivos (C+) foram utilizadas células estimuladas com LPS e tratadas com dexametasona (5 µM) e células estimuladas com LPS e *L. braziliensis* e tratadas com anfotericina B (5 µM). Foi coletado o sobrenadante de 4 horas (para quantificação de TNF-α) e 24h (para quantificação de IL-1β, IL-6 e IL-10) e mantidos a -80 °C até o uso.

4.8 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO E CITOCINAS

A produção de NO em sobrenadante de macrófagos infectados e não infectados foi determinada através de seu produto oxidativo, o nitrito, pelo método de Griess (Green, 1982). As dosagens das citocinas foram realizadas a partir do sobrenadante de 4 (TNF-α) e 24 horas (IL-6, IL-1ß e IL10) das culturas de macrófagos estimulados com LPS e infectados por *L. braziliensis*, pela técnica de ELISA de captura, utilizando o protocolo, anticorpos e citocina recombinante do ELISA Kit Uncoated Mouse (Elabscience) (Adaptado de Santos *et al*, 2023). A absorbância foi determinada em leitor de ELISA (Spectramax), com filtro de 450 nm. As análises foram então realizadas no Software Softmax 4.3.1.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância das diferenças entre os grupos foi avaliada utilizando o teste one-way ANOVA e o pós-teste de comparação múltipla Bonferroni. O limite crítico de significância será estabelecido para $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 9 (Graph Pad Software, San Diego, CA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CITOTOXICIDADE, VIABILIDADE PARASITÁRIA E ÍNDICE DE SELETIVIDADE DA FER13 E FER38 EM MACRÓFAGOS MURINOS E PROMOASTIGOTAS DE *L. braziliensis.*

As chalconas FER13 e FER38 apresentaram CC_{50} de 28,35 ± 10,53 µM e 35,53 ± 6,24 µM, respectivamente (Tabela 1) indicando baixa citotoxicidade relativa para macrófagos da linhagem J774. Em contraste, os controles anfotericina B (2,08 ± 1,55 µM) e violeta genciana (1,44 ± 0,88 µM) exibiram CC_{50} substancialmente menores no mesmo ensaio, refletindo maior citotoxicidade.

Os ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade *in vitro* com células cultivadas são amplamente utilizados para testes de citotoxicidade de produtos químicos e para triagem de medicamentos. A aplicação desses ensaios tem despertado um interesse crescente nos últimos anos (Özlem., 2024). Ressalta-se que a anfotericina B é um dos fármacos de referência utilizados no tratamento das leishmanioses, contudo, seu perfil de toxicidade para macrófagos murinos torna-se evidentes (Espuelas *et al*., 2003) o que reforça a necessidade por novas moléculas com baixa citotoxicidade, como as chalconas que já demonstram uma baixa citotoxicidade

Na avaliação antiparasitária frente às formas promastigotas de *L. braziliensis*, FER13 demonstrou maior atividade (IC_{50} = 3,40 ± 1,2 µM) e FER38 (IC_{50} de 7,83 ± 2,37 µM). Apesar da anfotericina B manter valores baixos de IC_{50} (1,47 ± 1,79 µM), evidenciando sua potência, seu índice de seletividade é inferior às das chalconas testadas (IS = 1,4), com FER13 apresentando IS de 8,3 e FER38 de 4,5.

Esses achados evidenciam maior seletividade das chalconas para o parasito em relação às células do hospedeiro, resultando em melhor margem de segurança e corroboram com diversos estudos que avaliaram o potencial de chalconas sintéticas (Leite, 2024; Cerqueira, 2024; Santos, 2023). Em particular, a FER13 alia maior potência a menor citotoxicidade, exibindo seletividade oito vezes superior para o parasito em relação aos macrófagos, ao passo que a FER38 foi cerca de quatro vezes mais seletiva. Esse conjunto de dados reforça o potencial terapêutico das chalconas sintéticas, como candidatas promissoras ao desenvolvimento de novos agentes para o tratamento da leishmaniose, superando as limitações de toxicidade observadas nos fármacos de referência.

Tabela 1. Avaliação da citotoxicidade, atividade antileishmania e índice de seletividade dos compostos.

COMPOSTOS	MØ J774 CC_{50} ± DP(µM)	PROMASTIGOTAS *L. braziliensis* CI_{50} ± DP(µM)	ÍNDICE DE SELETIVIDADE
FER13	28,35 ± 10,53	3,40 ± 1,2	8,3
FER38	35,53 ± 6,24	7,83 ± 2,37	4,5
ANFOTERICINA B	2,08 ± 1,55	1,47 ± 1,79	1,4
VIOLETA GENCIANA	1,44 ± 0,88	ND	ND

CC_{50}: concentração citotóxica de 50%; CI_{50}: concentração inibitória de 50% DP: desvio padrão; MØ: macrófagos; IS: índice de seletividade;

5.2 FER13 e FER38 REDUZEM A INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS J774 E O NÚMERO DE AMASTIGOTAS DE *L. Braziliensis*.

Nos ensaios de infecção *in vitro*, ambas as chalconas demonstraram atividade significativa contra amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*. O tratamento com FER13 (Figura 10A) reduziu tanto a porcentagem de macrófagos infectados quanto o número de parasitos por célula, de forma semelhante ao efeito observado com anfotericina B. De modo equivalente, FER38 (Figura 10B) também promoveu diminuição significativa da taxa de infecção e da carga parasitária por macrófago, indicando que ambas as moléculas apresentam atividade para a forma clinicamente relevante.

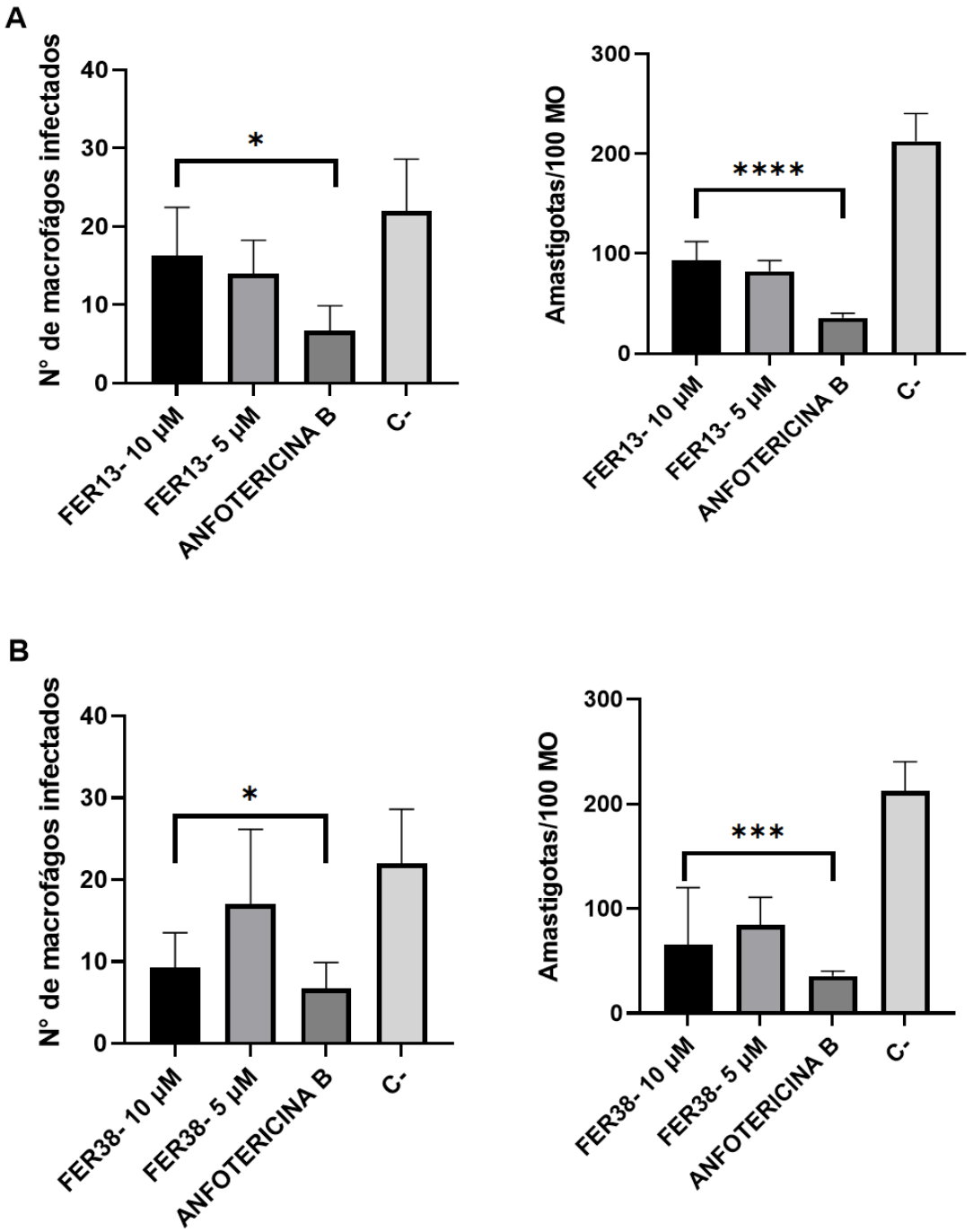
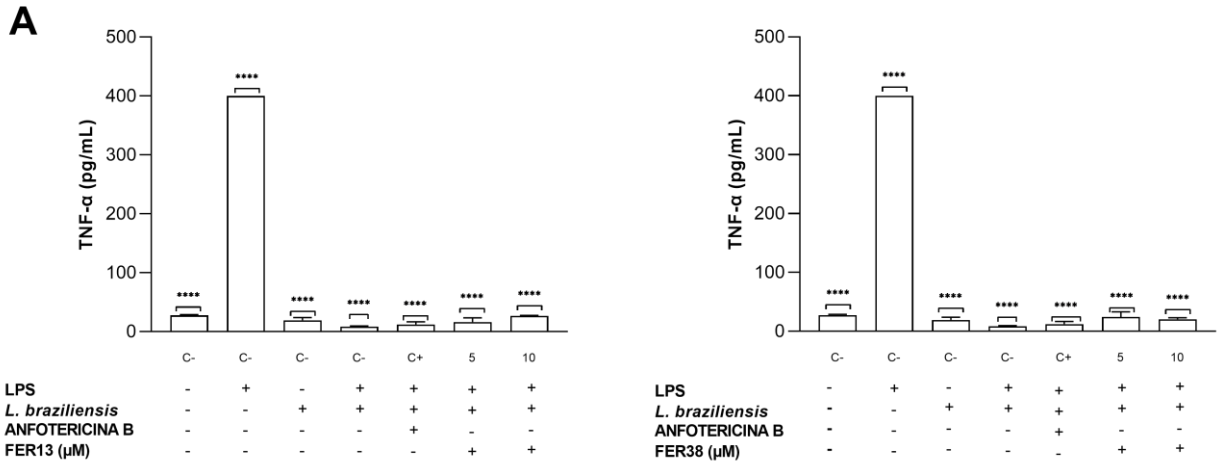


Figura 10. O percentual de infecção e o número de amastigotas por 100 macrófagos infectados e tratados ou não com a FER13 (A) e FER38 (B). O teste estatístico realizado foi o one-way ANOVA, seguido pelo teste de múltipla comparação de Bonferroni. Valor de *$P < 0,05$; ***$P < 0,001$; ****$P < 0,0001$.

5.3 REDUÇÃO DE TNF-α E ÓXIDO NÍTRICO APÓS TRATAMENTO COM FER13 E FER38

No perfil imunomodulador, observou-se que ambas as chalconas reduziram significativamente a produção de TNF-α (Figura 11A) e óxido nítrico (NO) (Figura 11B), indicando supressão de mediadores inflamatórios clássicos associados ao dano tecidual. Embora TNF-α seja fundamental para o controle inicial da infecção, participando da ativação de vias microbicidas e sinergizando com IFN-γ para indução de NO, sua produção exacerbada contribui para necrose tecidual e piora clínica (semelhante ao que se observa em perfis Th1 exacerbados), especialmente em *L. braziliensis*, onde a imunopatologia é determinante para a gravidade das lesões (Moreno-García *et al., 2019*; Neves *et al., 2020;* Rossi *et al., 2022;* Carneiro *et al., 2022*). A redução simultânea de TNF-α e NO observada após o tratamento com ambas as chalconas pode, portanto, representar um efeito imunomodulador de proteção tecidual, evitando exacerbação da resposta inflamatória local sem necessariamente comprometer o controle do parasito. Esse padrão é compatível com uma resposta equilibrada, imunomoduladora, frequentemente associada a melhor prognóstico clínico.



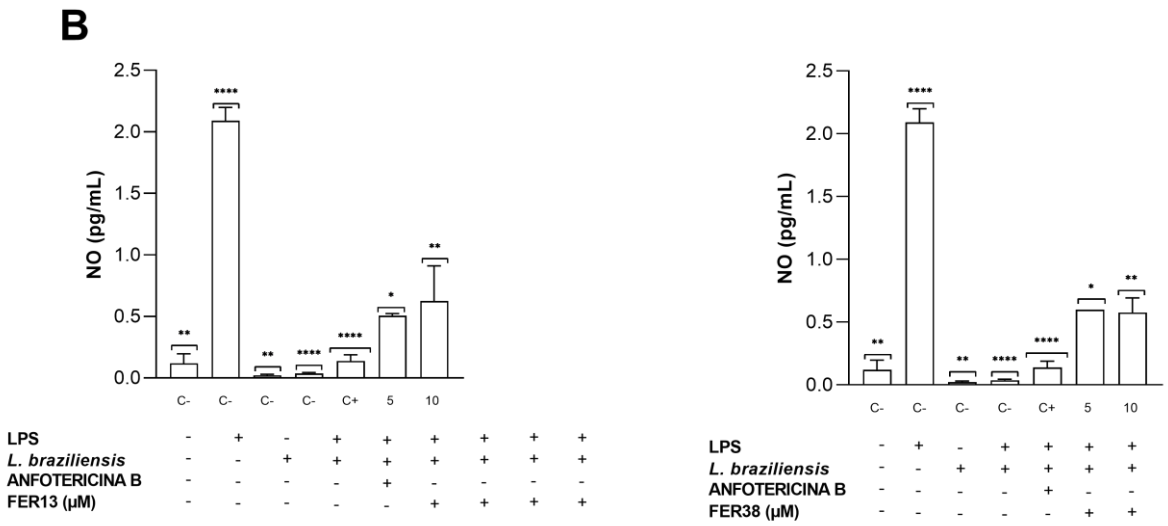


Figura 11. FER13 e FER38 reduziram a produção de TNF-α (A) e NO (B). Dosagem de TNF realizada após 4 horas e 24 horas para dosagem de NO. O teste estatístico realizado foi o one-way ANOVA, seguido pelo teste de múltipla comparação de Bonferroni. Valor de **P <0,05; **P <0,01; ***P <0,001; ****P <0,0001*.

5.4 PRODUÇÃO DE IL-1β E REDUÇÃO DE IL-6 APÓS TRATAMENTO COM FER13 E FER38

As chalconas FER13 e FER38 apresentaram perfis moduladores distintos sobre citocinas associadas ao eixo inflamatório. Em ambas as moléculas, observou-se indução de IL-1β (Figura 12A) nas maiores concentrações, o que é consistente com um estímulo inflamatório inicial benéfico no contexto da leishmaniose cutânea. A IL-1β atua como citocina sentinela, promovendo ativação de macrófagos e recrutamento celular ao sítio de infecção, favorecendo um controle inicial do parasito (Novais *et al.* 2017; Rossi *et al.* 2023). Esse padrão é compatível com um perfil pró-inflamatório precoce, essencial para conter a replicação intracelular da leishmania durante as primeiras fases da resposta imune.

Em contrapartida, ambas as chalconas reduziram os níveis de IL-6 (Figura 12B), e esse achado é particularmente relevante no contexto temporal da resposta inflamatória. Embora IL-6 possa participar do controle inicial da infecção, sua elevação sustentada em *L. braziliensis* está associada ao desenvolvimento de inflamação crônica, maior destruição tecidual e persistência do parasito, uma vez que favorece um microambiente permissivo por exaustão celular (Gillespie *et al. 2022*; Costa-Silva *et al. 2024*). Assim, a redução de IL-6 observada sugere que as chalconas limitam a progressão da resposta inflamatória para um estado disfuncional e patológico.

O padrão temporal observado — IL-1β aumentada nas altas concentrações (estímulo inflamatório inicial) e IL-6 reduzida (bloqueio da evolução para inflamação crônica) — indica que FER13 e FER38 promovem uma modulação seletiva da resposta imune: favorecem sinais iniciais necessários ao controle do parasito (via inflamassoma/IL-1β) enquanto limitam mediadores que sustentam inflamação persistente (IL-6), reduzindo o risco de imunopatologia associada à infecção por *L. braziliensis*.

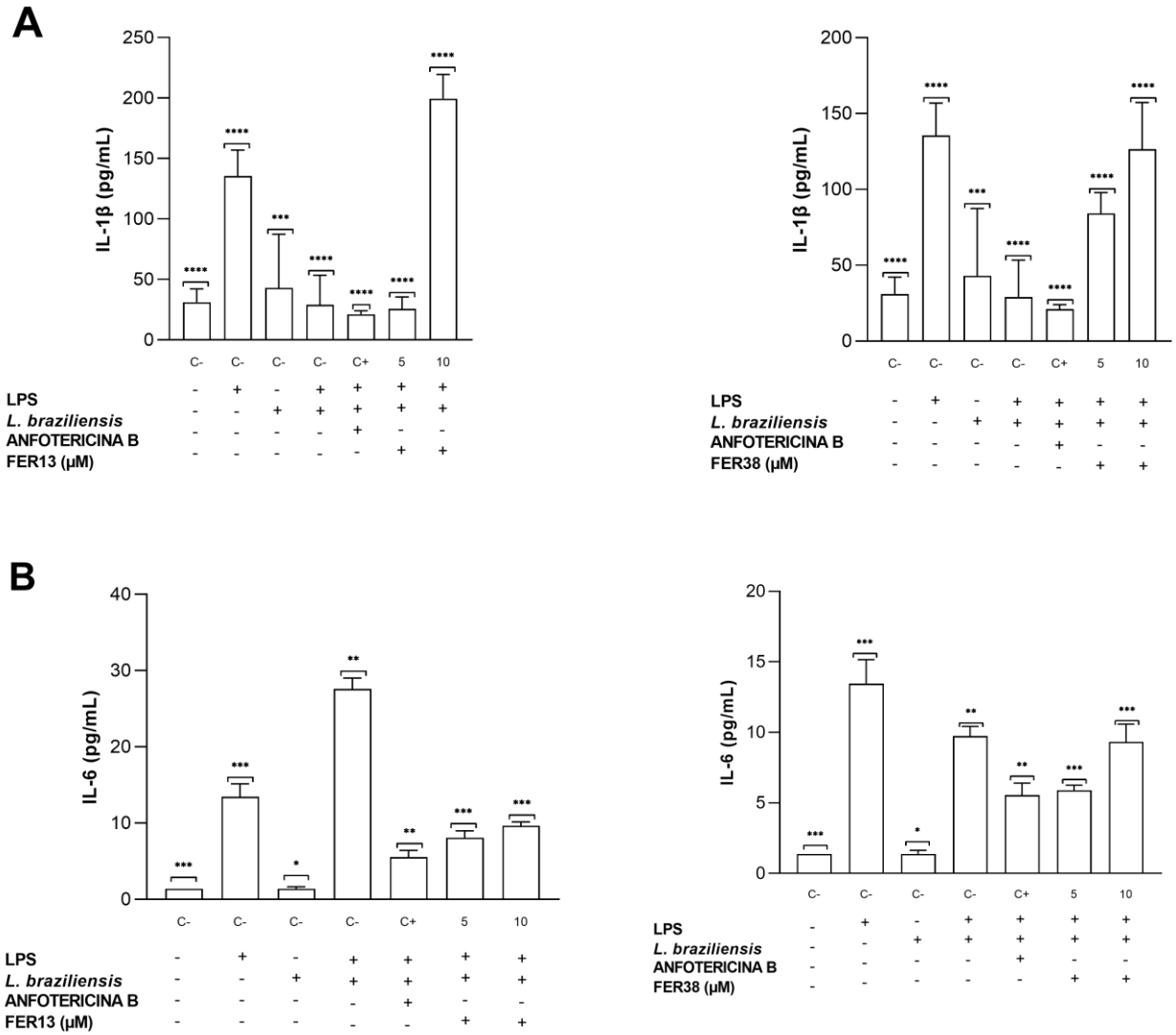


Figura 12. FER13 e FER38 induziram a produção de IL-1β (A), mas reduziram a produção da citocina IL-6 (B). O teste estatístico realizado foi o one-way ANOVA, seguido pelo teste de múltipla comparação de Bonferroni. Valor de **P <0,05; ** P <0,01; ***P <0,001; ****P <0,0001*.

5.4 PRODUÇÃO DE IL-10 APÓS TRATAMENTO

Além disso, verificou-se que FER13 e FER38 também reduziriam IL-10 (Figura 13A), uma citocina reguladora que atua como repressora da resposta efetora contra *Leishmania*. IL-10 inibe a ativação de macrófagos e a produção de mediadores microbicidas, favorecendo a persistência do parasito dentro da célula hospedeira (Okwor & Uzonna *2016*; Anderson *et al. 2023*). Assim, sua redução modula o sistema imunológico favorecendo a eliminação do protozoário, indicando que as chalconas aliviam o efeito regulatório imposto pelo eixo IL-10.

Portanto, o perfil integrado sugere que ambas as chalconas exercem efeito de modulação positiva, reduzindo mediadores inflamatórios protetores, mas que em alta produção se tornam responsáveis por destruição tecidual (TNF-α/NO), mas ao mesmo tempo diminuindo IL-10, o que pode favorecer a ativação microbicida de forma mais controlada e por outras vias. Esse comportamento é compatível com compostos imunomoduladores candidatos a terapia adjunta, sobretudo em infecções por *L. braziliensis*, nas quais a patogênese é fortemente dependente do desequilíbrio entre as respostas imunomoduladoras das citocinas.

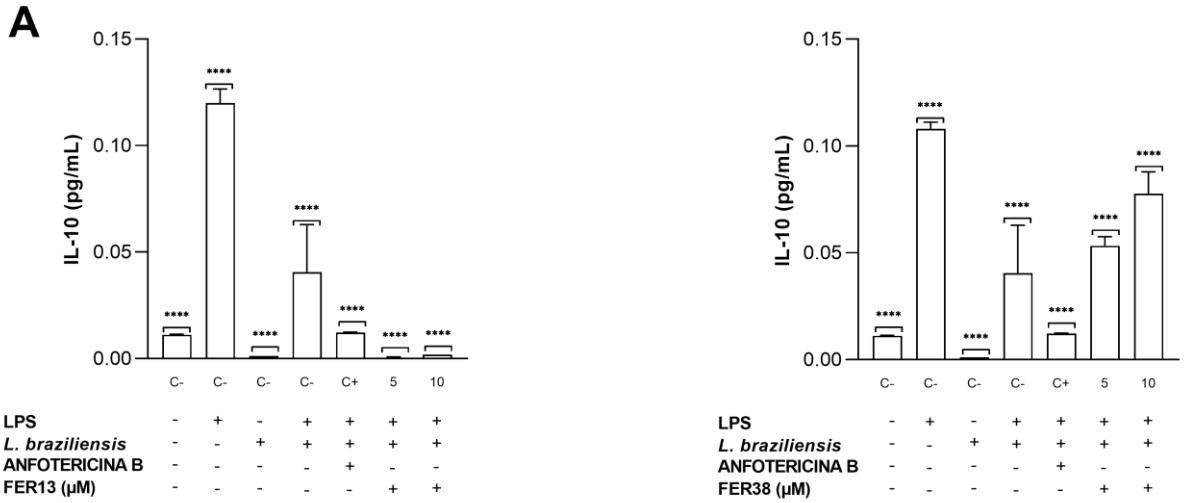


Figura 13. FER13 e FER38 suprimiram a produção de IL-10 (A). A análise estatística foi realizada pelo one-way ANOVA, seguido pelo teste de múltipla comparação de Bonferroni. Valor de ****$P < 0,0001$.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As chalconas sintéticas FER13 e FER38 apresentaram baixa citotoxicidade em macrófagos e atividade antiparasitária significativa contra *Leishmania braziliensis*, com índices de seletividade superiores aos fármacos de referência. FER13 destacou-se por combinar maior potência antileishmania com elevada seletividade.

No perfil imunomodulador, ambas reduziram TNF-α e NO, minimizando risco de dano tecidual, enquanto estimularam IL-1β em altas concentrações, favorecendo ativação inicial de macrófagos. A diminuição de IL-6 e IL-10 sugere modulação seletiva da inflamação, limitando respostas crônicas e removendo bloqueios à atividade antileishmania. Esses resultados indicam que FER13 e FER38 equilibram efeitos antiparasitários e imunomodulação, destacando-se como candidatos promissores para desenvolvimento de terapias adjuntas seguras e eficazes contra a leishmaniose cutânea.

REFERÊNCIA

ABADÍAS-ROMÃ, I.; DIAGO, A.; CERRO, P. A.; PALMA-RUIZ, A. M.; GILABERT, Y**.** Leishmaniasis: Leishmaniasis cutánea y mucocutánea / Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 112, p. 601–618, jul./ago. 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ad.2021.02.008. Acesso em: 6 jul. 2025.

ALMEIDA, F. S. et al. Leishmaniasis: Immune Cells Crosstalk in Macrophage Polarization. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, n. 5, p. 276, 2023. Disponível em: https://www.mdpi.com/2414-6366/8/5/276. Acesso em: 19 out. 2025.
ARONSON, N.; HERWALDT, B. L.; LIBMAN, M. et al. Diagnóstico e tratamento da leishmaniose: diretrizes de prática clínica da Infectious Diseases Society of America (IDSA) e da American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). **Doenças Infecciosas Clínicas**, v. 63, p. 1539–1557, 2016.

ASLANTÜRK, Ö. *In Vitro* Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. **Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World.** 2017 https://doi.org/10.5772/intechopen.71923.

BENNIS, I.; BELAID, L.; DE BROUWERE, V.; FILALI, H.; SAHIBI, H.; BOELAERT, M. "The mosquitoes that destroy your face": social impact of cutaneous leishmaniasis in South eastern Morocco, a qualitative study. **Plos One**, v. 12, n. 12, p. e0189906, dez. 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189906. Acesso em: 20 jul. 2025.

BHARATI, K. Human genetic polymorphism and Leishmaniasis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 98, p. 105–203, mar. 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105203. Acesso em: 6 jul. 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnóstico clínico e diferencial**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/atlas_lta.pdf. Acesso em: 19 out. 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde**. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. atual. – 1. reimp. Brasília, DF: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 180 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). ISBN 978-85-334-1270-5. Disponível em: http://www.saude.gov.br/bvs. Acesso em: 18 jul. 2025.

CARVALHO, J.; ASSIS, T.; SIMÕES, R.; COTA, G. Cutaneous leishmaniasis in Brazil: a neglected disease and a challenge for therapy management. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 56, p. 0221-2023, 2023. Disponível em: https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/Cg7gZcdFhyWRwL8YCNSnGDb/?lang=en. Acesso em: 29 jul. 2025.

CASTAÑO, L.; CUARTAS, V.; BERNAL, A.; INSUASTY, A.; GUZMAN, J.; VIDAL, O.; RUBIO, V.; PUERTO, G.; HUANG, G.; XIAO, J. Chalcone hybrids as

potential anticancer agents: Current development, mechanism of action, and structure-activity relationship. **Medicinal Research Review**, v. 40, n. 5, 2020.

CASTRO, M.; RODE, J.; MACHADO, P.; LLANOS-CUENTAS, A.; HUEB, M.; COTA, G. et al. Cutaneous leishmaniasis treatment and therapeutic outcomes in special populations: a collaborative retrospective study. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 1, p. e0011029, jan. 2023. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011029. Acesso em: 19 jul. 2025.

CECÍLIO, P.; CORDEIRO DA SILVA, A.; OLIVEIRA, F. Sand flies: basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with *Leishmania* parasites. **Communications Biology**, v. 5, art. 305, abr. 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s42003-022-03240-z. Acesso em: 19 jul. 2025.

CHENG, P.; YANG, L.; HUANG, X.; WANG, X.; GONG, M. Híbridos de chalcona e sua atividade antimalárica. **Arch. Pharm**., v. 353, p. 190–350, 2020.
DE MELLO, M. V. P.; ABRAHIM-VIEIRA, B. A.; DOMINGOS, T. F. S.; DE JESUS, J. B.; DE SOUSA, A. C. C.; RODRIGUES, C. R.; SOUZA, A. M. T. Uma revisão abrangente de derivados de chalcona como agentes antileishmania. **Eur. J. Med. Chem**., v. 150, p. 920–929, 2018.

DE VRIES, H. J. C.; SCHALLIG, H. D. Cutaneous Leishmaniasis: A 2022 Updated Narrative Review into Diagnosis and Management Developments. **Am J Clin Dermatol**, v. 23, n. 6, p. 823–840, nov. 2022. DOI: 10.1007/s40257-022-00726-8.

DORAGHI, F.; KALOOEI, M.; YASIN; GHASEMI, M.; LARIJANI, B.; MAHDAVI, M.; AL-HARRASI, A. Synthetic approaches to chalcone synthesis. **Asian Journal of Organic Chemistry**, p. e00099, 2025. Disponível em: https://doi.org/10.1002/ajoc.202500099. Acesso em: 16 jul. 2025.

FALCI, D.; PASQUALOTTO, A. Amphotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. **Clinical & Biomedical Research**, v. 35, n. 2, p. 65–82, 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.4322/2357-9730.56021. Acesso em: 19 jul. 2025.

GAO, F.; HUANG, G.; XIAO, J. Híbridos de chalcona como potenciais agentes anticâncer: desenvolvimento atual, mecanismo de ação e relação estrutura-atividade. **Med. Rev**., v. 40, p. 2049–2084, 2020.

GOTO, Y. et al. Pathological roles of macrophages in *Leishmania* infections. **International Immunopharmacology**, v. 117, p. 109–515, 2023. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383576923000156. Acesso em: 19 out. 2025.

GOTO, Y. Immunomodulation by *Leishmania* parasites: potential for controlling other diseases. **Parasitology International**, v. 104, p. 102987, fev. 2025. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.parint.2024.102987. Acesso em: 18 jul. 2025.

GRIGALUNAS, M.; BRAKMANN, S.; WALDMANN, H. Chemical evolution of natural product structure. **Journal Of The American Chemical Society**, v. 144, n. 8, p. 3314–3329, mar. 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1021/jacs.1c11270. Acesso em: 20 jul. 2025.
HENRY, E. J.; BIRD, S. J.; GOWLAND, P.; COLLINS, M.; CASSELLA, J. P. Derivados de ferrocenil chalcona como possíveis agentes antimicrobianos. **J. Antibiot**., v. 73, p. 299–308, 2020.

KAUFER, A.; ELLIS, J.; STARK, D.; BARRATT, J. A evolução da taxonomia dos tripanossomatídeos. **Parasit Vetores**, v. 10, n. 1, p. 287, 2017. DOI: 10.1186/s13071-017-2204-7. Acesso em: 15 nov. 2024.

KEYHANI, A. et al. Leptin enhances the efficacy of glucantime to modulate macrophage polarization toward the M1 phenotype in *Leishmania tropica*-infected macrophages. **Parasites & Vectors**, v. 18, n. 1, p. 1–12, 2025. Disponível em: https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-025-07004-6. Acesso em: 19 out. 2025.

LABBÉ, F.; ABDELEADHIM, M.; ABRUDAN, J.; ARAKI, A.; ARAUJO, R.; ARENSBURGER, P. et al. Genomic analysis of two phlebotomine sand fly vectors of *Leishmania* from the New and Old World. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 4, p. 0010862, abr. 2023. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010862. Acesso em: 19 jul. 2025.

LEITE, F. F. **Síntese de derivados Chalconas e Bichalconas com avaliação da atividade Leishmanicida e antitumoral**. 2024. 210 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2024. Disponível em: [nome do repositório/link caso estivesse online]. Acesso em: 3 out. 2025.

LIN, Y.; ZHANG, M.; LU, Q.; XIE, J.; WU, J.; CHEN, C. Um novo derivado de chalcona exerce efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes após lesão pulmonar aguda. **Aging**, v. 11, p. 7805–7816, 2019.

LUKAC, P.; VIMBERG, V.; BALÍKOVÁ-NOVTONÁ, G.; VANUCCI, L.; JANATA, J.; QUIROGA, J.; ABONIA, R.; NOGUERAS, M.; COBO, J.; INSUASTY, B. New chalcone-sulfonamide hybrids exhibiting anticancer and antituberculosis activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 176, p. 50–60, 2019.

MACMICKING, J. O.; XIE, Q.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review of Immunology**, v. 15, n. 1, p. 323–350, mar. 1997. Disponível em: https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.323. Acesso em: 18 jul. 2025.

MAHAPATRA, D. K.; BHARTI, S. K.; ASATI, V. Derivados de chalcona: potencial antiinflamatório e perspectivas de alvos moleculares. **Topo Atual. Med. Química**, v. 17, p. 3146–3169, 2017.

MAKARANI, N.; BHARADAVA, K.; KAUSHIK, A.; DAVE, A.; GANGAWANE, A.; KAUSHAL, R. Leishmaniasis: A multifaceted approach to diagnosis, maladies, drug repurposing and way forward. **The Microbe**, v. 6, p. 100–239, mar. 2025. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.microb.2025.100239. Acesso em: 6 jul. 2025.

MAKARANI, N.; BHARADAVA, K.; KAUSHIK, A.; DAVE, A.; GANGAWANE, A.; KAUSHAL, R. Molecular scaffold recognition of drug molecules against essential genes of *Leishmania donovani* using biocomputing approach. **South African Journal of Botany**, v. 162, p. 52–63, nov. 2023. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.08.067. Acesso em: 6 jul. 2025.

M. S. ESPUELAS, P. LEGRAND, M. A. CAMPANERO, M. APPEL, M. CHÉRON, C. GAMAZO, G. BARRATT, J. M. IRACHE, Polymeric carriers for amphotericin B: *in vitro* activity, toxicity and therapeutic efficacy against systemic candidiasis in neutropenic mice, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Volume 52, Issue 3, September 2003, p.419–427, https://doi.org/10.1093/jac/dkg351

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU). **Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 3: Saúde e bem-estar [ilustração].** Nações Unidas Brasil, 2024. Disponível em: https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/3. Acesso em: 29 jul. 2025.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Atualizações globais de vigilância da Leishmaniose 2023: 3 anos do roteiro para DTN, Nº 45, 8 de novembro de 2024.** Disponível em: https://www.who.int/publications/i/item/who-wer-9945-653-669. Acesso em: 6 jul. 2025.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS**). Leishmaniose: dados das DTNs. Genebra: OMS, [2023].** Disponível em: https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html. Acesso em: 29 jul. 2025.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS); ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (OPAS). **Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas, 2018.** Disponível em: http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34857/LeishReport6_por.pdf. Acesso em: 2 jul. 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS); ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (OPAS). **Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas, Nº 13, dezembro de 2024**. Disponível em: https://iris.paho.org/handle/10665.2/63166. Acesso em: 11 dez. 2024.

REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil glucamina 20mgSbV/kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose. 4 jul. 2019. Disponível em: https://rsbmt.org.br/2019/07/04/estudo-comparativo-da-eficacia-de-isotionato-de-pentamidina-administrada-em-tres-doses-durante-uma-semana-e-de-n-metil-glucamina-20mgsbv-kg-dia-durante-20-dias-para-o-tratamento-da-forma-cutanea-da-le/. Acesso em: 29 jul. 2025.

ROATT, B. M. O.; DE BRITO, R. C. F.; COURA-VITAL, W.; DE OLIVEIRA AGUIAR-SOARES, R. D.; REIS, A. B. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 104, n. 21, p. 8965–8977, nov. 2020. DOI: 10.1007/s00253-020-10856-w.

ROCHA, S.; RIBEIRO, D.; FERNANDES, E.; FREITAS, M. Uma revisão sistemática sobre propriedades antidiabéticas de chalconas. **Curr. Med. Chem.,** v. 27, p. 2257–2321, 2020.

SANTOS, B. C. **Efeito imunomodulador da chalcona (E)-1-BENZO[D][1,3]DIOXOL-5- IL)-3-(3-BROMO-4-ETOXI-5-METOXIFENIL)PROP-2-EN-1-ONA em macrófagos infectados por *Leishmania braziliensis*.** Orientadora: Elisalva Teixeira Guimarães. 2024. 45f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia). Departamento de Ciências da Vida, Universidade do Estado da Bahia, Salvador-Bahia, 2024.

SANTOS, S. F. **Avaliação da atividade e do mecanismo de ação da chalcona E1-benzo [d][1,3] dioxol-5-il-3-(3-bromo-4-etoxi-5-metoxifenil) prop-2-en-1-ona contra *Leishmania braziliensis* (dissertação).** Salvador: Departamento de Ciências da Vida (DCV), Universidade do Estado da Bahia, 2023. 58 p.

TAJUDDEEN, N.; SULEIMAN, M.; VAN H.; IBRAHIM, M. A. O potencial quimioterápico das chalconas contra leishmanioses: uma revisão. **Int J Antimicrob Agents,** v. 51, n. 3, p. 311–318, 2018. Epub 2017/07/03. PMID: 28668673.

VILLARREAL, M.; ARIANA RUIZ (LadyofHats**). Life cycle of the parasites from the genus *Leishmania*, the cause of the disease Leishmaniasis [ilustração].** 9 nov. 2008. Disponível em: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leishmania_Life_Cycle_2008.svg. Acesso em: 6 jul. 2025.

XU, S.; CHEN, M.; CHEN, W.; HUI, J.; JI, J.; HU, S.; ZHOU, J.; WANG, Y.; LIANG, G. Efeito quimiopreventivo do derivado de chalcona, L2H17, no desenvolvimento do câncer de cólon. **BMC Cancer**, v. 15, p. 870, 2015.

ZHANG, H.; YAN, R.; LIU, Y.; YU, M.; HE, Z.; XIAO, J. et al. Progress in antileishmanial drugs: mechanisms, challenges, and prospects. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 19, n. 1, p. e0012735, jan. 2025. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012735. Acesso em: 20 jul. 2025.

ZHUANG, C.; ZHANG, W.; SHENG, C.; ZHANG, W.; XING, C.; MIAO, Z. Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 12, p. 7762–7810, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00020. Acesso em: 16 jul. 2025.