

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e
Bioprospecção



Dissertação

**Análogos monocarbonílicos sintéticos da
curcumina: obtenção e avaliação antiparasitária
contra *Trichomonas vaginalis***

Caroline Carapina Da Silva

Pelotas, Julho de 2018.

Caroline Carapina Da Silva

**Análogos monocarbonílicos sintéticos da curcumina: obtenção e avaliação
antiparasitária contra *Trichomonas vaginalis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do Conhecimento: Bioquímica e Bioprospecção).

Orientador: Claudio Martin Pereira de Pereira

Co-orientador: Sibele Borsuk

Pelotas, Julho de 2018.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S586a Silva, Caroline Carapina da

Análogos monocarbonílicos sintéticos da curcumina: obtenção e avaliação antiparasitária contra *Trichomonas vaginalis* / Caroline Carapina da Silva ; Claudio Martin Pereira de Pereira, orientador ; Sibeles Borsuk, coorientadora. — Pelotas, 2018.

145 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. C5-curcuminóides. 2. Anti-trichomonas vaginalis. 3. Metronidazol. 4. Curcumina. 5. Dibenzalacetona. I. Pereira, Claudio Martin Pereira de, orient. II. Borsuk, Sibeles, coorient. III. Título.

CDD : 574.192

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**Análogos monocarbonílicos sintéticos da curcumina: obtenção e avaliação
antiparasitária contra *Trichomonas vaginalis***

elaborada por
Caroline Carapina Da Silva

Como requisito à obtenção do título de **Mestre em Ciências**
(Área do conhecimento: **Bioquímica e Bioprospecção**)

Banca Examinadora



Prof. Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira (PPGBBio/CCQFA) – PRESIDENTE



Profª. Drª. Daiane Drawanz Hartwig (PPGP/UFPel)



Prof. Dr. Wilson Cunico (PPGBBio/CCQFA)

Agradecimentos

Expresso a minha gratidão a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

Aos meus pais, Nara Carapina e Edson da Silva, e ao meu irmão, Andinson Carapina da Silva, agradeço por terem acreditado nos meus esforços e apoiado as minhas decisões.

Ao professor Claudio Pereira, meu “pai científico”, por me orientar desde a iniciação científica, por me guiar na minha jornada acadêmica e ao mesmo tempo confiar, me proporcionando liberdade de decisão e independência no trabalho.

À professora Sibele Borsuk, minha co-orientadora, por aceitar a parceria com o nosso laboratório, e às gurias da biotecnologia Raquel Neves e Mirna Dié por guiar os experimentos biológicos, pela agilidade, imenso trabalho, boa disposição e novos aprendizados.

À Marina Ritter, minha “eterna mestranda”, por me co-orientar durante os seus experimentos de mestrado, e confiar no meu auxílio. Por me entusiasmar a praticar experimentos voltados à síntese orgânica. Pela atenção, carisma e simpatia com todos, ótima companhia e por todos os conselhos científicos e da vida!

À Bruna Pacheco, minha dupla de laboratório, pelo apoio na execução e relato dos experimentos, pelos ensinamentos, por ser uma inspiração de pesquisadora. Pelo companheirismo, conversas sobre tudo, pelos mil litros de chimarrão que já devemos ter tomado juntas, por ser a melhor colega de quarto. Enfim, por todos os momentos que compartilhamos!

À professora Massako por todos os ensinamentos de bioquímica, por sempre buscar me incluir nos eventos “forenses”, e por “bater o ponto” no nosso laboratório para um café com novos aprendizados.

Ao Lucas Moraes, uma das pessoas mais inteligentes e impacientes que eu conheço, a tua forma de pensar me incentiva a tentar ser mais produtiva. *Thank you* pelas conversas diárias sobre ciência e cinema, e pela parceria e contribuições nos experimentos.

Aos parceiros de laboratório Bruno Nunes, Taís Poletti, e Caroline Nicolodi por serem companhia constante no laboratório, pelo ânimo, organização de eventos, e por tornar o nosso ambiente de trabalho mais inteligente e divertido.

Aos colegas de laboratório Kathleen Winkel, Samantha Freitas, Marco Ziemann, Letícia Ferreira, Allison Assunção, Gabriela Guerra, e Thais Figueiredo

pela colaboração, troca de experiências, bom convívio e bons cafés. Aos colegas de laboratório “vizinhos” pela cooperação e conversas proveitosas.

Ao professor Sidnei Moura por compartilhar a infraestrutura para identificação das moléculas. Ao Carlos Suárez por estar por estar sempre disposto a efetuar as análises espectroscópicas numa velocidade incrível!

Aos professores e funcionários do Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção por colaborar para um ambiente de ensino multidisciplinar e empreendedor. Aos colegas de mestrado pelo companheirismo e cooperação nos estudos das disciplinas. Aos funcionários e técnicos, sem os quais a faculdade não progrediria, especialmente ao Seu Gilmar pela presteza e momentos descontraídos.

Aos professores Dr^a. Daiane Hartwig, Dr. Wilson Cunico, Dr. Rafael Lund, e Dr. Claudio Pereira por aceitarem compor a banca e dispor do seu tempo para avaliar esse estudo. Realmente, agradeço pela atenção!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro que nos permite dar continuidade aos estudos e pesquisas.

Muito obrigada!

“Science makes people reach selflessly for truth and objectivity; it teaches people to accept reality, with wonder and admiration, not to mention the deep awe and joy that the natural order of things brings to the true scientist.”

Lise Meitner

“We have not succeeded in answering all our problems. The answers we have found only serve to raise a whole set of new questions. In some ways we feel we are as confused as ever, but we believe we are confused on a higher level and about more important things.”

Earl C. Kelley

PARTE I

Resumo

DA SILVA, Caroline Carapina. **Análogos monocarbonílicos sintéticos da curcumina: obtenção e avaliação antiparasitária contra *Trichomonas vaginalis***. 2018. 145f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O protozoário *Trichomonas vaginalis* é o agente etiológico da tricomoníase, a qual é considerada pela Organização Mundial da Saúde a infecção sexualmente transmissível não-viral mais comum no mundo. Desde os anos 1960, o metronidazol é o fármaco padrão escolhido para o tratamento da tricomoníase, porém muitos efeitos adversos, como reações alérgicas podem resultar do seu uso. Relatos de cepas resistentes ao metronidazol também enfatizam a importância de se pesquisar por novos agentes anti-*T. vaginalis*. Considerando-se isso, um total de 21 análogos monocarbonílicos da curcumina foram sintetizados e avaliados quanto a atividade anti-*T. vaginalis*, já que a própria curcumina natural exibe potencial antiparasitário. Os produtos foram sintetizados a partir de aldeídos aromáticos e cetonas através de reação de condensação aldólica em rendimentos de até 83%. Através da análise *in vitro* das moléculas sintéticas, dos trofozoítos não tratados, e do metronidazol, observou-se que dois derivados da propanona (**3a** e **3e**), e um derivado da ciclohexanona (**5e**) exibiram atividade anti-*T. vaginalis* comparável ao metronidazol. As concentrações antiparasitárias efetivas foram determinadas como sendo 80 µM, 90 µM, e 200 µM para os análogos **3a**, **3e**, e **5e**, respectivamente. As análises das curvas do tempo de morte mostraram que em 24 horas os trofozoítos foram completamente inibidos. Nas concentrações testadas, a curcumina natural não inibiu significativamente o crescimento dos trofozoítos, demonstrando desta forma que as moléculas sintéticas planejadas não só possuem melhor estabilidade química, mas também maior potencial anti-*T. vaginalis*. O presente estudo sugere que esses análogos devem ser explorados como agentes alternativos para o tratamento da tricomoníase, e indica alguns aspectos químicos estruturais que são protótipos promissores para a atividade parasitária relatada.

Palavras-chave: C5-curcuminóides; anti-*Trichomonas vaginalis*; Metronidazol; Análogos monocarbonílicos da curcumina; Dibenzalacetona.

Abstract

DA SILVA, Caroline Carapina. **Análogos monocarbonílicos sintéticos da curcumina: obtenção e avaliação antiparasitária contra *Trichomonas vaginalis***. 2018. 145f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Trichomonas vaginalis is the etiologic agent of trichomoniasis, a parasitic infection considered to be the most common non-viral sexually transmitted infection by the World Health Organization. Since the 1960s, metronidazole is the standard drug chosen for the treatment of trichomoniasis but many adverse effects, such as allergic reactions, may result from its use. Reports of metronidazole-resistant strains also highlight the importance for the search of new anti-*T. vaginalis* agents. Considering this, a total of 21 monocarbonyl analogues of curcumin were synthesized and assessed for anti-*T. vaginalis* activity, as natural curcumin itself has been reported to possess antiparasitic potential. The synthetic products were obtained by aldol condensation of aromatic aldehydes with ketones in yields up to 83%. From the *in vitro* analysis of the synthetic molecules, untreated trophozoites, and metronidazole, it was observed that two propanone derivatives (**3a** and **3e**), and one derivative of cyclohexanone (**5e**) exhibited anti-*T. vaginalis* activity comparable to metronidazole. Optimal antiparasitic concentrations were determined to be 80 μ M, 90 μ M, and 200 μ M for analogues **3a**, **3e**, and **5e**, respectively. Time-kill curves showed that, after 24 hours, the trophozoites were completely inhibited. At the tested concentrations, natural curcumin did not significantly inhibit growth of the trophozoites, therefore demonstrating that the designed synthetic molecules not only have better chemical stability, but also higher anti-*T. vaginalis* potential. This study suggests that these analogues should be further explored as alternative agents for the treatment of trichomoniasis, and indicates some of the chemical features that apparently enhance antiparasitic activity.

Keywords: C5-Curcuminoids; anti-*Trichomonas vaginalis*; Metronidazole; Monocarbonyl curcumin analogues; Dibenzylideneacetone.

Lista de Figuras

Figura 1. Morfologia de <i>Trichomonas tenax</i> e <i>Trichomonas vaginalis</i>	22
Figura 2. Morfologia do <i>Trichomonas vaginalis</i> em diferentes condições físico-químicas.	23
Figura 3. Metabolismo energético nos hidrogenossomos de <i>T. vaginalis</i>	24
Figura 4. Estrutura química de 5-nitroimidazóis utilizados no tratamento da tricomoníase	25
Figura 5. Mecanismo de ação do metronidazol: (a) via de ativação redutiva; (b) via de inativação redutiva.....	26
Figura 6. Estrutura química da curcumina, demetoxicurcumina, e bisdemetoxicurcumina.....	28
Figura 7. Vias de biossíntese da curcumina	29
Figura 8. Esquema de síntese da curcumina conforme Pabon (1964).	30
Figura 9. Principais metabólitos formados pelas diferentes vias de administração da curcumina.....	32
Figura 10. Subunidades da curcumina passíveis de modificação estrutural e estrutura geral de seus análogos monocarbonílicos.....	34
Figura 11. Mecanismo da reação de condensação aldólica entre benzaldeído e propanona	35
Figura 12. Análogos monocarbonílicos da curcumina com atividade antiparasitária. O código de identificação dos análogos (em negrito) é o original da referência indicada	37
Figura 13. Análogos monocarbonílicos da curcumina com maior potencial anti- <i>Trichomonas vaginalis</i>	135

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação taxonômica do protozoário <i>Trichomonas vaginalis</i>	21
---	----

Lista de Abreviaturas

ATP	Adenosina trifosfato
CIT	Coordenação de Inovação Tecnológica
IST	Infecção Sexualmente Transmissível
EC ₅₀	Concentração efetiva média letal
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50% dos organismos
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
PFOR	<i>Pyruvate:ferredoxin oxido-reductase</i> (Piruvato-ferrodoxina oxidoreductase)

Sumário

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
Objetivo Geral	18
Objetivos Específicos	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
Tricomoníase	19
Considerações Gerais	19
<i>Trichomonas vaginalis</i>	20
Tratamento da Tricomoníase	25
Curcumina.....	27
Atividade antiparasitária da curcumina	30
Análogos monocarbonílicos da curcumina.....	33
ARTIGO CIENTÍFICO	39
SUPPLEMENTAL FILES.....	66
PATENTE.....	123
4 Considerações gerais sobre a patente	124
5 CONCLUSÃO.....	135
6 TRABALHOS CORRELATOS	136
7 REFERÊNCIAS	138

PARTE II

1 INTRODUÇÃO

A tricomoníase é uma infecção sexualmente transmissível (IST) causada pelo protozoário *Trichomonas vaginalis* que afeta o trato urogenital de homens e mulheres. Essa é uma infecção de grande prevalência mundial, da qual em 2012 foram estimados em média 143 milhões de casos, o maior número dentre os quatro tipos de ISTs curáveis (em ordem de prevalência: tricomoníase, clamídia, gonorreia, e sífilis) (NEWMAN et al., 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). Apesar do número significativo de casos reportados, a tricomoníase é na maioria das vezes assintomática e, quando sintomas são relatados, os mesmos são parecidos com o quadro clínico de muitas das outras ISTs. Isso dificulta o diagnóstico e causa outros impactos negativos na saúde humana, como o aumento do número de parceiros infectados e associação a outras ISTs e agravantes como oligospermia, doença inflamatória pélvica, parto prematuro e até mesmo à maiores índices de transmissão do vírus da imunodeficiência humana (HIV do inglês *Human Immunodeficiency Virus*) (MACIEL; TASCA; DE CARLI, 2004; VIEIRA et al., 2015).

Os fármacos para o tratamento da tricomoníase pertencem à classe do nitroimidazóis, tal como o metronidazol (nome comercial Flagyl), que foi aprovado na década de 60 pela *Food and Drug Administration* (FDA) e até hoje é o fármaco mais indicado em regimes sistêmicos de dose única, em aplicação tópica, ou combinação de ambos (DINGSBAG; HUNTER, 2018). Porém, existem sérias desvantagens em relação ao uso do metronidazol como, por exemplo, a não adesão ao tratamento devido aos efeitos adversos, como reações de hipersensibilidade, náusea, vômito, etc., e o surgimento de cepas de *T. vaginalis* resistentes. Além disso, o metronidazol não é um fármaco específico para o tratamento de tricomoníase, e o seu mecanismo de ação de geração de radicais pode ser tanto o responsável por sua atividade biológica quanto pela sua toxicidade (CUDMORE et al., 2004; MORETH et al., 2010).

Neste contexto, diferentes moléculas naturais e sintéticas vêm sendo exploradas como possíveis alternativas para o tratamento da tricomoníase, das quais vale a pena ressaltar a molécula de origem natural denominada curcumina. A curcumina é um dos componentes majoritários encontrados nos rizomas da planta *Curcuma longa* e que há muitos anos é utilizada no tratamento de diversas enfermidades. Desde então, a curcumina também vem sendo associada à inúmeras atividades biológicas, inclusive à atividade antiparasitária contra *T. vaginalis* (MOGHADAMTOUSI et al., 2014; WACHTER et al., 2014; ZHOU; BEEVERS;

HUANG, 2011). Ela também serve como protótipo no planejamento de moléculas sintéticas de estrutura estável e que possam da mesma forma apresentar atividade biológica, preferencialmente similar ou melhor do que a própria curcumina (LEE et al., 2009; MARDIANIS; ANWAR; HARYADI, 2017). Assim, o objetivo neste trabalho foi de sintetizar análogos monocarbonílicos da curcumina e avaliar seu potencial antiparasitário contra *T. vaginalis*.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi de sintetizar e avaliar a potencial atividade antiparasitária de análogos monocarbonílicos sintéticos da curcumina contra *Trichomonas vaginalis*.

Objetivos Específicos

- 1) Sintetizar análogos monocarbonílicos da curcumina derivados de diferentes aldeídos aromáticos e das cetonas propanona, ciclohexanona, e ciclopentanona através de metodologias convencionais;
- 2) Identificar os análogos monocarbonílicos da curcumina através de ferramentas espectroscópicas, espectrometria de massas, e ressonância magnética nuclear;
- 3) Avaliar o efeito dos análogos sintéticos da curcumina em linhagem de *T. vaginalis* sensível ao metronidazol (ATCC 30236);
- 4) Determinar a concentração efetiva e curva do tempo de morte dos análogos de maior potencial antiparasitário;
- 5) Comparar os resultados de atividade antiparasitária dos análogos monocarbonílicos sintéticos com a curcumina natural.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Tricomoniase

Considerações Gerais

A tricomoniase é uma das ISTs mais comuns globalmente, apresentando a maior prevalência dentre as ISTs não virais (3.1%) (NEWMAN et al., 2015). Nos Estados Unidos, a última estimativa foi de que há 3,7 milhões de pessoas infectadas, dessas 2,3 milhões são mulheres entre 14 - 49 anos (HOOTS et al., 2013; MEITES et al., 2015). No Brasil não há dados nacionais concretos sobre a prevalência da tricomoniase, apenas estudos regionais que indicam porcentagens de prevalência entre 9.6 – 12.4% em mulheres atendidas por demanda espontânea (BENZAKEN et al., 2002; PEDROSA et al., 2011). A prevalência da tricomoniase depende também de variáveis socioeconômicas, sendo que a região da África e das Américas apresentam os maiores índices em comparação com outras regiões mundiais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Apesar dos altos índices, uma das grandes preocupações em relação à tricomoniase é que a maioria dos pacientes é assintomático (NEWMAN et al., 2015; PEDROSA et al., 2011). Quando perceptíveis, os sintomas em mulheres são similares a vaginites bacterianas e fúngicas (ex.: candidíase): corrimento vaginal com odor e/ou com coloração, prurido e irritação local, dispareunia e dor ao urinar (disúria). Em homens, pode haver vontade frequente de urinar, com ou sem disúria e prurido (ANDERSON; KLINK; COHRSEN, 2004; REICHMAN et al., 2014). Os métodos iniciais para diagnóstico do tipo de vaginite não são específicos nem de alta sensibilidade a um tipo de microrganismo, onde são considerados basicamente a história clínica e sintomatologia do paciente. Então, podem ser realizados testes de citologia laboratoriais; utilização de cultura de *T. vaginalis* em meio seletivo seguido de visualização sob microscópio de tricomonádídeos móveis (em tempo máximo de 10 minutos da amostragem); ou testes moleculares por reação em cadeia da polimerase (PCR do inglês *Polymerase Chain Reaction*) (BACHMANN et al., 2011; MACIEL; TASCA; DE CARLI, 2004).

O tempo de diagnóstico demorado ou falta de sintomas facilita a disseminação do parasito, aumentando o número de parceiros infectados. O estudo de Seña e colaboradores demonstrou que 71.7% dos homens com parceiras diagnosticadas com tricomoníase também estavam infectados, dos quais 77.3% eram assintomáticos (SEÑA et al., 2007). Dessa forma, a tricomoníase tem sido associada a consequências sérias, como infertilidade, complicações na gravidez pela ruptura prematura da membrana (parto prematuro, morte neonatal), e a outras enfermidades como a doença inflamatória pélvica, maior predisposição ao câncer cervical e de próstata (MACIEL; TASCA; DE CARLI, 2004; PETRIN et al., 1998; VIEIRA et al., 2015). Além disso, devido ao recrutamento de células inflamatórias nos locais infectados, os riscos de aquisição e transmissão do HIV são aumentados de duas a três vezes (MCCLELLAND et al., 2007).

O mecanismo de patogênese da tricomoníase depende da interação do *T. vaginalis* com as células do hospedeiro em um processo complexo e com vários componentes. De forma geral, o *T. vaginalis* precisa se aderir às células hospedeiras, mediado através de quatro proteínas de citoaderência (adesinas) identificadas: AP23, AP33, AP51, e AP65, em que AP refere-se à *protein adhesin* (proteína de adesão). Paralelo a isso, há a expressão da glicoproteína de membrana altamente imunogênica P270. O parasito também é capaz de secretar cisteína-proteases que degradam os anticorpos do hospedeiro (IgG, IgM, e IgA) (ALDERETE; SUPRUN-BROWN; KASMALA, 1986; PETRIN et al., 1998). Uma vez aderidos ao epitélio vaginal, os parasitos podem fagocitar bactérias da microbiota normal vaginal que mantém o ambiente ácido (*Lactobacillus acidophilus*), e induzir uma faixa de pH mais propícia para o seu estabelecimento e reprodução (pH: 5 – 6) (MACIEL; TASCA; DE CARLI, 2004).

Trichomonas vaginalis

A tricomoníase tem como agente etiológico o parasito unicelular flagelado *T. vaginalis*. Esse parasito foi identificado em 1836 por Alfred Donné na secreção vaginal de uma paciente. Diversas espécies do gênero *Trichomonas* já foram descritas, porém somente duas, *T. hominis* no tubo digestivo e *T. vaginalis* no trato gênito urinário, são consideradas patogênicas em humanos. Outras espécies identificadas são a *T. tenax* e *T. elongata* na cavidade oral, e em bovinos e felinos

existe o parasito correlato *Tritrichomonas foetus*. A classificação taxonômica do *T. vaginalis* está disposta na **Tabela 1** (NEVES et al., 2004; YAO; KOSTER, 2015).

Tabela 1. Classificação taxonômica do protozoário *Trichomonas vaginalis*.

Classificação	
Reino	Protista
Sub-reino	Protozoa
Filo	Sarcomastigophora
Sub-filo	Mastigophora
Ordem	Trichomonadida
Classe	Zoomastigophorea
Família	Trichomonadidae
Gênero	Trichomonas
Espécie	<i>Trichomonas vaginalis</i>

Fonte: baseado em NEVES et al., 2004.

O *T. vaginalis* é o único protozoário conhecido que infecta o trato urogenital, sendo que nas mulheres infectadas o mesmo fica situado na vagina e nos homens na uretra, ductos epididimários e próstata. Ele se distingue morfológicamente dos outros parasitos pelo seu tamanho maior (7-32 mm de comprimento por 5-12 mm de largura) e menor membrana ondulante, que se estende em torno de um terço da célula. A **Figura 1** mostra a diferença morfológica entre *T. vaginalis* e *T. tenax*. Os flagelos anteriores e a membrana ondulante são responsáveis pela mobilidade desses organismos que pode ser visualizada em microscópio óptico (BOGITSH; CARTER; OELTMANN, 2013).

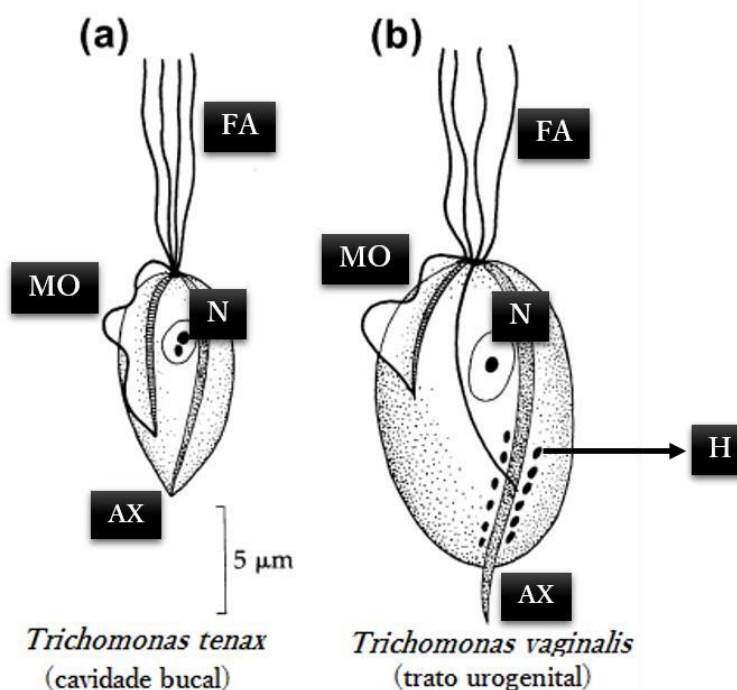


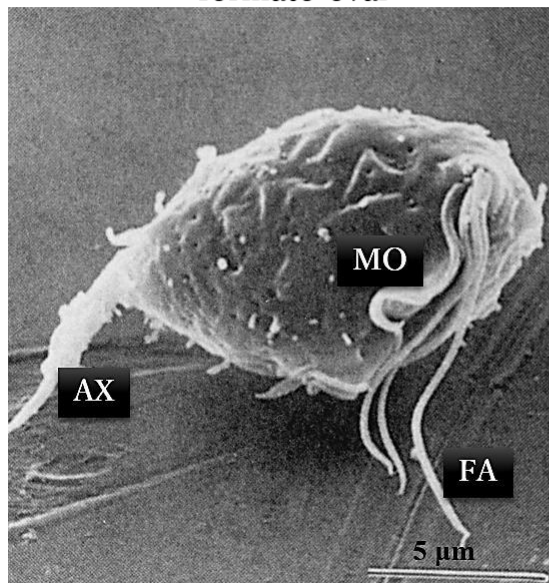
Figura 1. Morfologia de *Trichomonas tenax* e *Trichomonas vaginalis*.

MO = membrana ondulante; N= núcleo; AX = axóstilo; H = hidrogenossomos.

Fonte: modificado de BOGITSH; CARTER; OELTMANN, 2013.

Ao contrário de alguns protozoários, o *T. vaginalis* não forma cistos, então a transmissão sexual só ocorre no estágio de trofozoítos (forma ativa de alimentação e reprodução do protozoário). Casos não comuns de transmissão não-venérea podem ocorrer em mulheres virgens e recém-nascidos (NEVES et al., 2004; PETRIN et al., 1998). A reprodução ocorre por divisão binária longitudinal em uma faixa ideal de pH entre 5 - 6, o qual é atingido quando o *T. vaginalis* inibe bactérias produtoras de ácido láctico que mantém o pH vaginal entre 4 - 4,5 (BOGITSH; CARTER; OELTMANN, 2013). A alta capacidade adaptativa de *T. vaginalis* o permite adquirir diferentes formas de acordo com as condições físico-químicas em que se encontra. Conforme demonstrado na **Figura 2**, em meio de cultura axênico, o parasito tende a manter um formato uniforme ovalado similar a uma pera, enquanto que quando aderido à células epiteliais vaginais, o formato passa a ser ameboide.

T. vaginalis em meio de cultura:
formato oval



T. vaginalis em células epiteliais:
formato ameboide

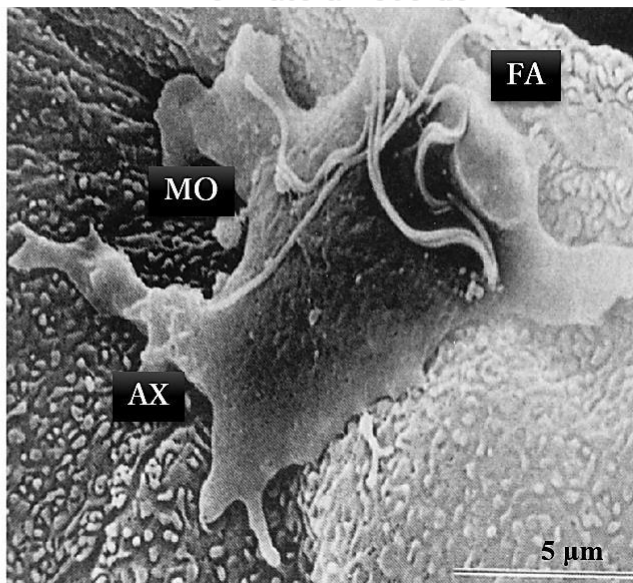


Figura 2. Morfologia do *Trichomonas vaginalis* em diferentes condições físico-químicas.

MO = membrana ondulante; FA = flagelos anteriores; AX = axóstilo.

Fonte: modificado de PETRIN et al., 1998.

As características morfológicas do *T. vaginalis* são importantes para a sua sobrevivência no ambiente inóspito do hospedeiro de constantes modificações, acidez, anóxia, períodos menstruais, atuação de hormônios, e fornecimento de nutrientes. Pode-se ver na **Figura 1** que o parasito cresce bem na ausência de oxigênio porque exerce metabolismo energético de forma anaeróbia através de hidrogenossomos (indicados como “H” na **Figura 1**). Os hidrogenossomos são análogos das mitocôndrias de células eucarióticas, onde ocorre a conversão de piruvato à acetato por oxidação fermentativa. A **Figura 3** mostra o esquema geral de produção de adenosina trifosfato (ATP) nos hidrogenossomos presentes em *T. vaginalis* (MACIEL; TASCA; DE CARLI, 2004; YARLETT; HACKSTEIN, 2005).

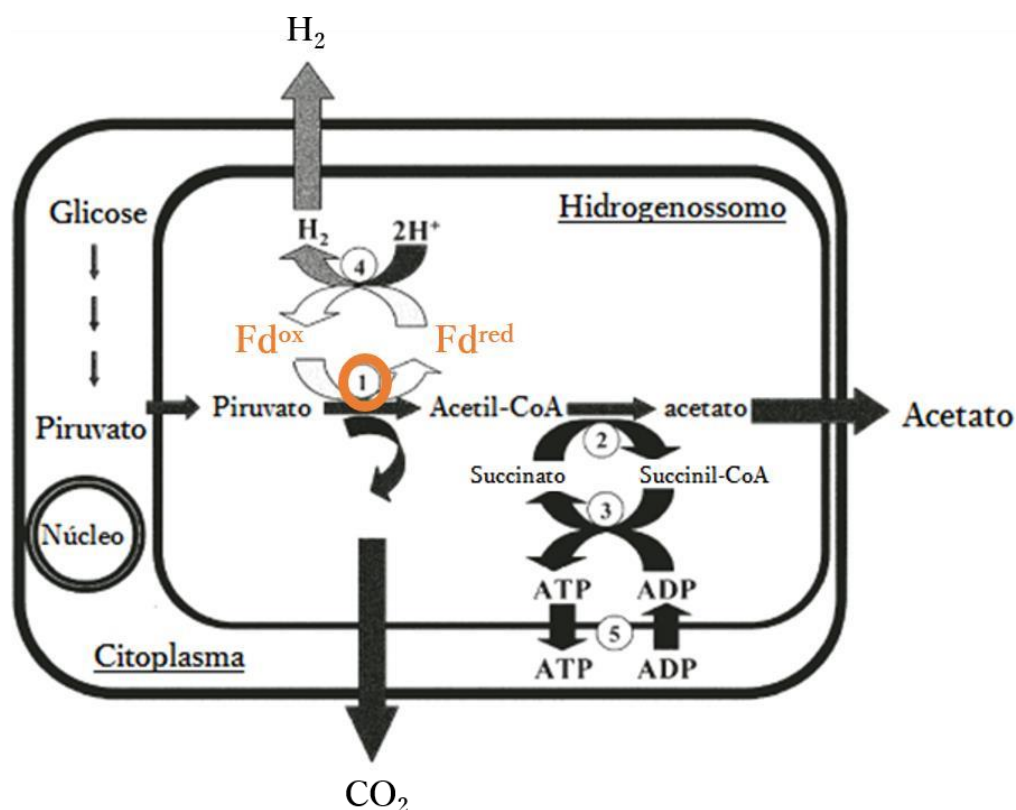


Figura 3. Metabolismo energético nos hidrogenossomos de *T. vaginalis*.

(1) piruvato-ferrodoxina oxidoreductase - PFOR; (2) succinil-CoA transferase; (3) succinato tioquinase; (4) [Fe]-hidrogenase; (5) ADP/ATP translocase.

Fonte: modificado de YARLETT; HACKSTEIN, 2005.

O piruvato é derivado de fontes energéticas como glicose, maltose e galactose e é transportado do citoplasma para dentro do hidrogenossomo, onde é metabolizado a acetato, liberando dióxido de carbono (CO_2) e hidrogênio molecular (H_2). O ATP é formado a nível de substrato com a participação das enzimas succinil-CoA transferase e succinato tioquinase, e a energia pode ser reservada na forma de glicogênio. Em organismos anaeróbicos como o *T. vaginalis*, a enzima enfatizada na **Figura 3**, piruvato-ferrodoxina oxidoreductase (PFOR do inglês *pyruvate:ferredoxin oxido-reductase*), é importante para a descarboxilação do piruvato e atua como aceptora dos elétrons gerados nessa etapa. Da mesma forma, a enzima PFOR é importante na suscetibilidade de *T. vaginalis* ao tratamento com quimioterápicos da classe dos nitroimidazóis, pois ela é a responsável pela ativação dos mesmos (EMBLEY et al., 2003; RAGSDALE, 2003; YARLETT; HACKSTEIN, 2005).

Tratamento da Tricomoniase

Desde a sua descoberta no final da década de 1960, o metronidazol (nome comercial Flagyl) é o medicamento de escolha para o tratamento da tricomoniase. O metronidazol [1-(2-hidroxietil)-metil-5-nitroimidazol] é um composto sintético modificado do antibiótico azomicina (2-nitroimidazol) de *Streptomyces* spp. As estruturas do metronidazol e de outros fármacos nitroimidazólicos estão demonstradas na **Figura 4** (NEVES et al., 2004).

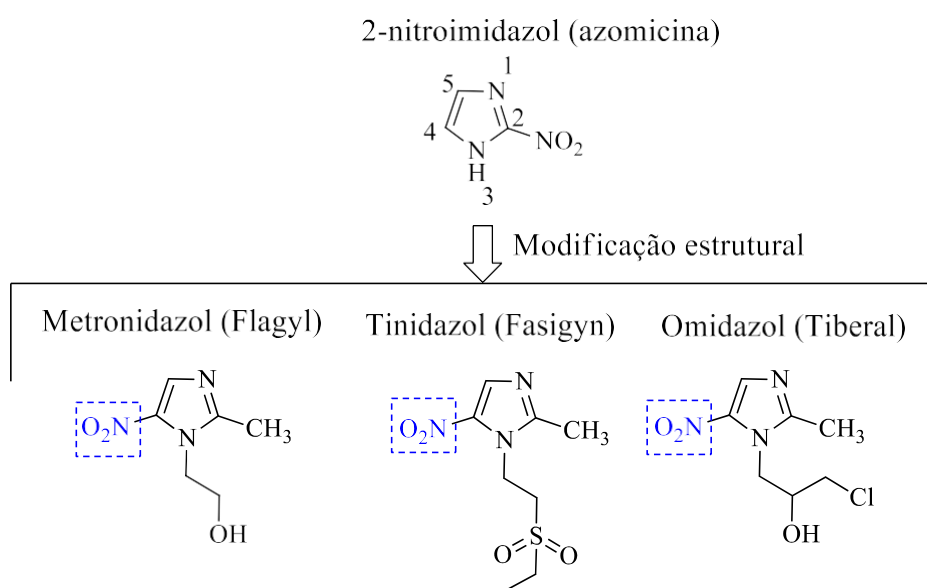


Figura 4. Estrutura química de 5-nitroimidazóis utilizados no tratamento da tricomoniase.

Fonte: baseado em MORETH et al., 2010.

Todos os compostos apresentam o mesmo mecanismo de ação, porém o metronidazol é o de menor custo e outros fármacos como o tinidazol devem ser evitados em mulheres grávidas devido a limitadas avaliações de risco fetal (MACIEL; TASCA; DE CARLI, 2004; MORETH et al., 2010). Os nitroimidazóis atuam como pró-fármacos, pois precisam ser ativados nos hidrogenossomos do *T. vaginalis* pela enzima PFOR, a qual reduz os grupos nitro realçados na **Figura 4**. A **Figura 5** mostra o mecanismo aceito na literatura para a ativação e atividade antiparasitária do metronidazol.

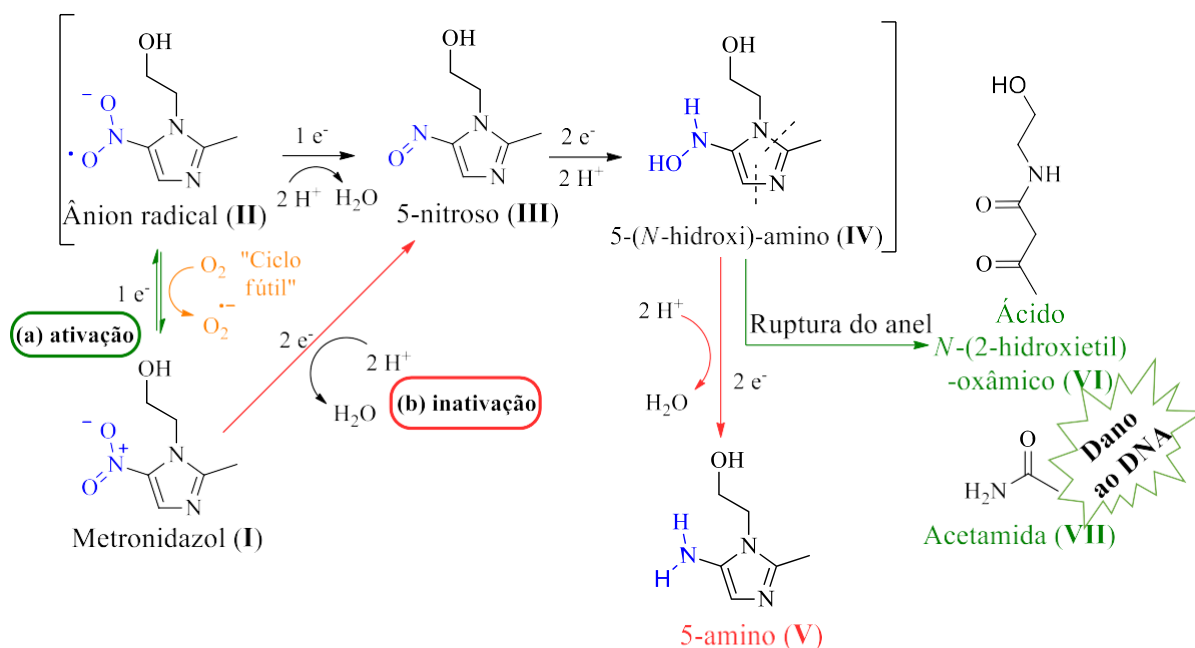


Figura 5. Mecanismo de ação do metronidazol: (a) via de ativação redutiva; (b) via de inativação redutiva.

Fonte: modificado de DINGSDAG; HUNTER, 2018.

A enzima PFOR juntamente com outros efetores (ferrodoxina, flavodoxina, etc.) pode doar elétrons ao metronidazol, causando a ativação redutiva (**via a** indicada em verde) do grupo nitro pela formação de compostos intermediários (II – IV), os quais posteriormente sofrem fissão heterocíclica (compostos VI – VII). Acredita-se que as espécies reativas geradas interagem e causam danos ao DNA do parasito, dessa forma inibindo-o. Em meio de cultura, observa-se uma resposta rápida, com decaimento da motilidade de *T. vaginalis* em 1 hora e morte celular dentro de 8 horas (PETRIN et al., 1998). Foi proposto que microrganismos resistentes ao metronidazol possuem nitroredutases que reduzem o grupo nitro a um derivado 5-amino (V) não-tóxico (**via b** indicada em vermelho). Em meio onde há oxigênio, o metronidazol pode ser regenerado (“ciclo fútil”), por isso esse pró-fármaco é utilizado apenas contra organismos anaeróbicos (DINGSDAG; HUNTER, 2018; MORETH et al., 2010).

As diretrizes para o tratamento da tricomoníase recomendam um regime de dose oral única de 2 g de metronidazol por dia, ou de 500 mg duas vezes ao dia, por 7 dias. Ensaio clínicos randomizados desses regimes de tratamento demonstraram altas taxas de cura (84 – 98%). Por outro lado, existe uma boa porcentagem de reincidência da doença, principalmente em mulheres como HIV, nas quais o regime

de dose única também é menos efetivo (KISSINGER et al., 2010). Recomenda-se que o(a) parceiro(a) da pessoa infectada, sintomático ou não, também faça o tratamento, e que sejam testados novamente após três meses. Muitos pacientes não cumprem o tratamento até o final devido aos efeitos adversos observados em relação ao metronidazol, como desconforto gástrico, e possibilidade de reações adversas em pacientes que utilizam dissulfiram no tratamento do alcoolismo (MEITES et al., 2015; WORKOWSKI; BOLAN, 2015). Alguns pacientes apresentam reações alérgicas (urticária, edema facial) ao metronidazol, e tratamentos alternativos devem ser utilizados. Há poucas alternativas ao metronidazol, a exemplo, o tinidazol, tratamento com cremes à base de paromomicina ou furazolidona, ou protocolos de dessensibilização (HELMS et al., 2008; PEARLMAN et al., 1996).

Aliado as desvantagens citadas anteriormente, não há dúvida da existência de isolados de *T. vaginalis* resistentes ao metronidazol, e possivelmente aos outros nitroimidazóis de mesmo modo de ação (**Figura 5**). Atualmente, as taxas de resistência ao metronidazol e tinidazol são de 10% e 1%, respectivamente (KIRKCALDY et al., 2012; SCHWEBKE; BARRIENTES, 2006; VÁZQUEZ et al., 2001). Esses fatores claramente indicam a necessidade de se explorar novos agentes anti-*T. vaginalis* que possam ser utilizados alternativamente ao tratamento como nitroimidazóis.

Curcumina

No contexto da necessidade de desenvolver novos agentes antiparasitários, está inserida a curcumina [1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona], que é o componente majoritário (~77%) presente nos rizomas da planta cúrcuma (*Curcuma longa* L.) (PRIYADARSINI, 2014). Na cúrcuma também são encontradas em menores porcentagens a demetoxicurcumina (~17%) e a bisdemetoxicurcumina (3%), que diferem da curcumina pela ausência dos grupos metóxi (OCH₃) nos anéis aromáticos. As características em comum entre esses componentes incluem a presença de duas carbonilas (C=O), e um esqueleto central de carbono-hidrogênio que “conecta” dois anéis aromáticos, os quais estão substituídos na posição *para* por grupos hidroxila (OH). As estruturas destes

curcuminóides estão representadas na **Figura 6**, destacando-se as características estruturais mencionadas (ANAND et al., 2008).

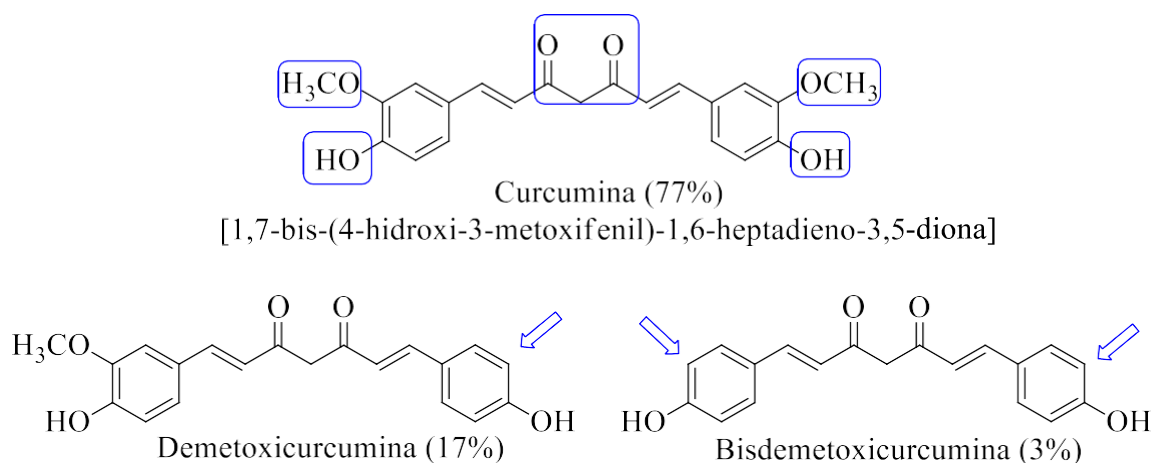


Figura 6. Estrutura química da curcumina, demetoxicurcumina, e bisdemetoxicurcumina.

Fonte: baseado em PRIYADARSINI, 2004.

A cúrcuma é extensamente utilizada com base no conhecimento popular empírico para o tratamento de doenças do trato digestivo e respiratório, e é até hoje representante importante do sistema oriental medicinal conhecido como *Ayurveda* (“Ciência da Vida”). Adicionalmente, a cúrcuma é utilizada como corante alimentar no mundo e no Brasil, onde é conhecida como açafrão-da-terra, *curry*, ou gengibre dourado (ANAND et al., 2008; JOSHI; JOSHI; DHIMAN, 2016).

Após avanços científicos, em 1815 a curcumina foi isolada pela primeira vez da cúrcuma e, então, em Milobedzka e Lampe determinaram a sua fórmula e estrutura química (LAMPE; MILOBEDZKA, 1913). Os trabalhos de Roughley e Whiting (1973), e de Kita e colaboradores (2008) utilizando biomarcação com deutério e carbono-14 auxiliaram na elucidação das possíveis rotas de biossíntese da curcumina. Conforme ilustrado na **Figura 7**, a biossíntese poderia ter início a partir da desaminação da fenilalanina para formar os derivados ácido cinâmico, ácido *p*-cumárico, e ácido ferúlico. Esses ácidos podem ser condensados ao malonil-CoA e serem convertidos em bisdemetoxicurcumina e demetoxicurcumina pela ação da enzima curcumina sintase e, então, pela ação de hidroxilases e *o*-metiltransferases os curcuminóides são convertidos em curcumina. A união de dois fragmentos de ácido ferúlico a um carbono central gera o padrão estrutural

denominado diferuloilmetano, o qual também pode ser utilizado para fazer referência à curcumina. Um outro intermediário-chave que pode ser formado é o dicinamoilmetano, que tem os grupos metoxi e hidroxila inseridos *a posteriori*. Desta forma, pode-se inferir que os curcuminóides são, em verdade, intermediários biossintéticos da própria curcumina, e não produtos finais de uma via biossintética alternativa (ESATBEYOGLU et al., 2012; SUETH-SANTIAGO et al., 2015). Os compostos fenólicos podem ser acumulados na planta de forma a oferecer proteção antioxidante (KITA et al., 2008; SOARES, 2002).

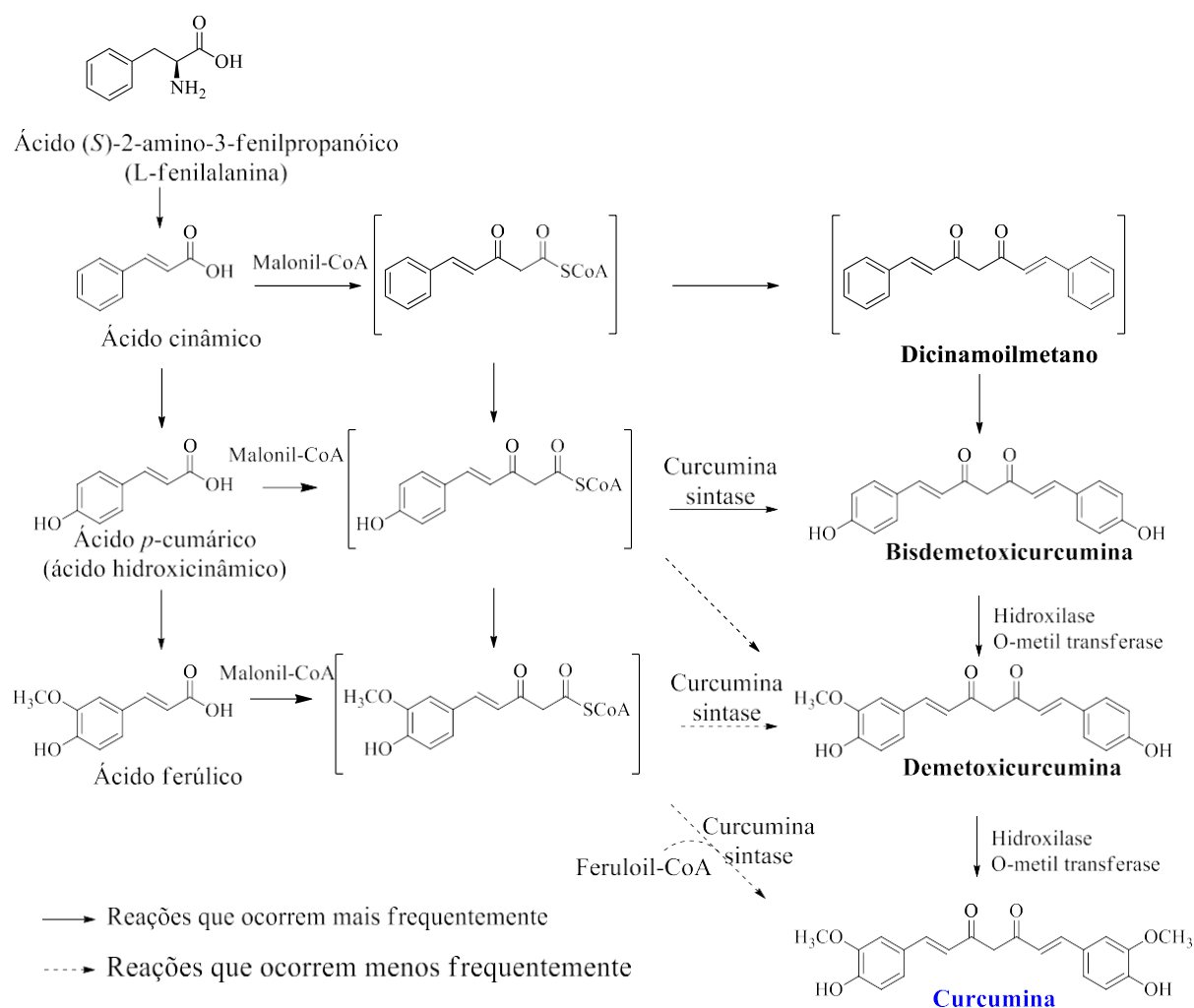


Figura 7. Vias de biossíntese da curcumina.

Fonte: modificado de SUETH-SANTIAGO et al., 2015 e ESATBEYOGLU et al., 2012.

A curcumina pode ser extraída dos rizomas da cúrcuma utilizando-se solventes orgânicos, à exemplo hexano, acetona, etanol ou metanol. Porém, outros processos químicos de purificação devem ser aplicados para isolar a curcumina já que ela estará em mistura com a bisdemetoxicurcumina e demetoxicurcumina, e

outros componentes como carboidratos, proteínas, e minerais. Os procedimentos de isolamento e purificação incluem processos de filtração, lavagem consecutivas com solventes, e purificação por coluna cromatográfica (AMALRAJ et al., 2017; SANDUR et al., 2007). Alguns trabalhos da literatura relatam o uso da curcumina obtida de forma sintética, seguindo a metodologia de Pabon ou pequenas modificações dessa (PABON, 1964). O procedimento experimental conforme Pabon (**Figura 8**) tornou a síntese da curcumina viável, reduzindo diversas etapas descritas em metodologias pioneiras (LAMPE; MILOBEDZKA, 1913; MIIOBEDZKA; KOSTANECKI; LAMPE, 1910) e possibilitando rendimentos de até 80%.

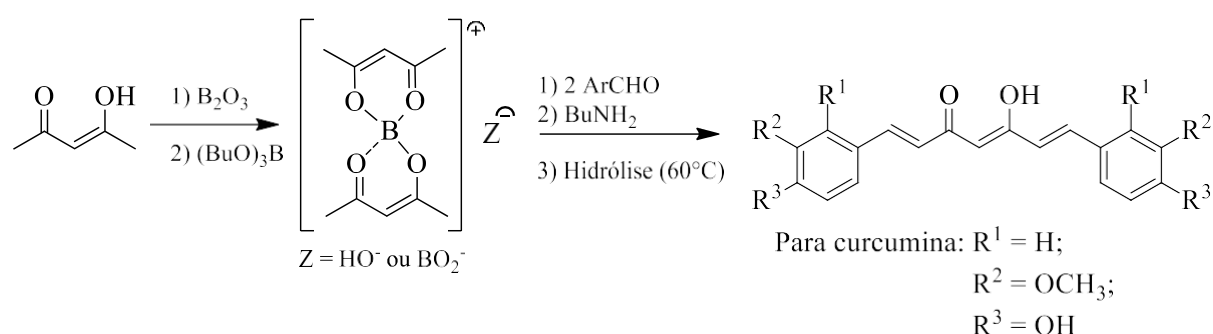


Figura 8. Esquema de síntese da curcumina conforme Pabon (1964).

Fonte: modificado de SUETH-SANTIAGO et al., 2015.

A síntese da curcumina é iniciada com um composto dicarbonílico que forma um complexo de boro (enolato), sobre o qual são adicionados vanilina, *n*-butilamina (BuNH_2) e tributilborato $[(\text{BuO})_3\text{B}]$. A formação prévia do enolato de boro é efetuada para evitar a condensação de Knoevenagel no carbono 3 do composto dicarbonílico (acetilacetona) pela redução da acidez do hidrogênio central em relação às metilas terminais. O enolato de boro pode ser desfeito em um segundo momento através de hidrólise ácida (60 °C). Outros aldeídos podem ser utilizados no lugar da vanilina para gerar o mesmo modelo estrutural com diferentes substituintes nos anéis aromáticos.

Atividade antiparasitária da curcumina

Diversos estudos já reportaram atividades biológicas relacionadas à curcumina natural (ANAND et al., 2008; GUPTA; KISMALI; AGGARWAL, 2013; PAGANO et al., 2018), inclusive a sua atividade antimicrobiana contra diferentes bactérias, vírus, fungos, e parasitos (MOGHADAMTOUSI et al., 2014; MORAIS et al., 2013). A curcumina é uma das moléculas naturais que têm sido testadas como

alternativas no tratamento de *T. vaginalis*, dentre outras infecções parasitárias (VIEIRA et al., 2015; WINK, 2012).

No estudo de Wachter e colaboradores (2014) foi relatado a atividade anti-*T. vaginalis* da curcumina natural comercial contra três cepas de diferente susceptibilidade ao metronidazol (ATCC 30001, ATCC 30236 e ATCC 50138). Depois de 24 horas, as concentrações efetivas para redução de 90% dos trofozoítos variaram entre 216.3 e 164.9 µg/mL, sendo que todas as células de *Trichomonas* foram eliminadas na concentração de 400 µg/mL. Apesar das concentrações efetivas serem relativamente altas (400 µg/mL de curcumina $\approx$ 1,08 mmol/L), diversos ensaios clínicos apontam que a curcumina possui um bom perfil de segurança, sem apresentar efeitos adversos relatados em doses de até 6 g/dia (GUPTA; KISMALI; AGGARWAL, 2013; PAGANO et al., 2018; WACHTER et al., 2014). Desde o primeiro ensaio clínico relacionado à curcumina em 1937, já foram feitos em média outros 1200, sendo que no momento existem três ensaios clínicos de origem brasileira submetidos na base “ClinicalTrials.gov”, investigando o uso de extratos de curcumina no tratamento da osteoartrite, doença hepática crônica, e no metabolismo energético de pacientes com HIV (CLINICAL TRIAL, 2018; PAGANO et al., 2018).

Outros exemplos recentes da atividade antiparasitária da curcumina são os reportados por Liu e colaboradores (2017), nos quais a curcumina causou 100% de mortalidade em *Ichthyophthirius multifiliis* *in vitro* e *in vivo* na concentração de 4 mg/L. O *I. multifiliis* é um protozoário ciliado que comumente infecta peixes de água doce (ex.: carpa capim: *Ctenopharyngodon idellus*) causando a “doença dos pontos brancos”, podendo levar à morte de peixes de criação e grandes perdas econômicas. Nesses estudos, a concentração efetiva média letal (EC₅₀) nos peixes carpa capim foi de 56.8 mg/L, o que sugere que a curcumina poderia ser utilizada em substituição ao antimicrobiano “verde malaquita”, o qual foi banido pela sua toxicidade (LIU et al., 2017a, 2017b). Ullah e colaboradores demonstraram que a curcumina na concentração de 60 µM reduziu significativamente a motilidade de vermes de *Fasciola gigantica*, causador da fasciolíase em ruminantes e que pode infectar humanos após ingestão de água ou plantas aquáticas contaminadas (agrião cru). Alguns desses parasitos também têm mostrado resistência emergente ao tratamento padrão com triclabendazol (OLIVEIRA et al., 2002; ULLAH et al., 2017). A curcumina também pode atuar através de efeitos biológicos combinados, como

demonstrado contra o parasito protozoário *Philasterides dicentrarchi*, causador da scuticociliatose em pisciculturas de “peixe pregado” (*Psetta máxima*). Na concentração de 100 μM , a curcumina inibiu o crescimento do parasito e a expressão de citocinas pró-inflamatórias produzidas e associadas à sua virulência (fator de necrose tumoral alfa e interleucina 1 β) (MALLO et al., 2017).

Apesar das atividades biológicas relatadas, a curcumina possui algumas desvantagens que limitam a sua aplicação clínica, como a sua baixa biodisponibilidade, instabilidade em pH fisiológico, baixa solubilidade em água e baixa absorção. Parte da curcumina ingerida de forma oral é eliminada na sua forma não-metabolizada, ou é convertida a metabólitos mais hidrofílicos através de metabolismo hepático de primeira passagem. Os principais metabólitos formados pela administração da curcumina estão demonstrados na **Figura 9**.

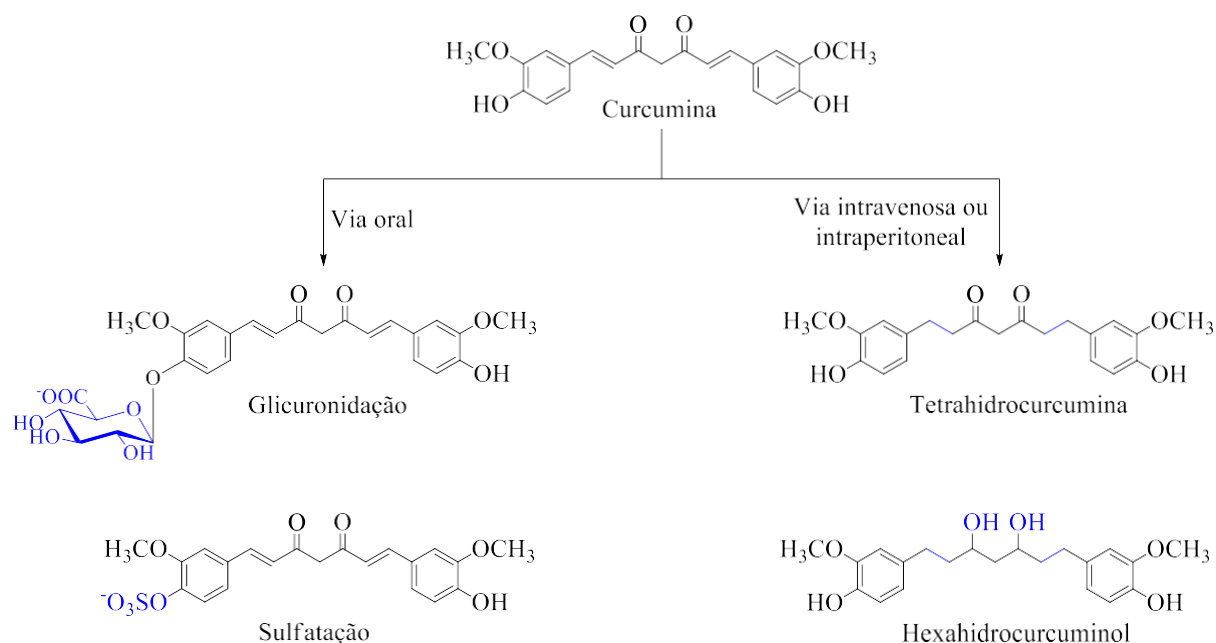


Figura 9. Principais metabólitos formados pelas diferentes vias de administração da curcumina.

Fonte: modificado de SUETH-SANTIAGO et al., 2015.

Pode-se ver pela **Figura 9** que a curcumina apresenta sítios de reação em sua estrutura que permitem reações de conjugação com o ácido glicurônico e com o sulfato, ou reações de redução que levam a formação da tetraidrocurcumina e hexahidrocurcuminol (PRASAD et al., 2014; SIVIERO et al., 2015). Dessa forma, alguns estudos demonstraram que a administração oral de curcumina na faixa de três gramas resultou em níveis detectados apenas na faixa nanomolar ($3.6 \text{ g} \rightarrow 11.1$

nM) no plasma e órgãos alvo (SHARMA et al., 2001; SHARMA; STEWARD; GESCHER, 2007). Ainda, a exposição da curcumina a condições atmosféricas pode gerar produtos de degradação como a vanilina e o ácido ferúlico (METZLER et al., 2013). Uma das formas de contornar tais limitações é planejar e obter de forma sintética moléculas de estrutura similar (análogos) utilizando a curcumina como protótipo natural. Dessa maneira, pode-se obter uma série de moléculas de maior estabilidade e que provavelmente mantenham ou melhorem o potencial biológico observado para a curcumina (LIANG et al., 2009).

Análogos monocarbonílicos da curcumina

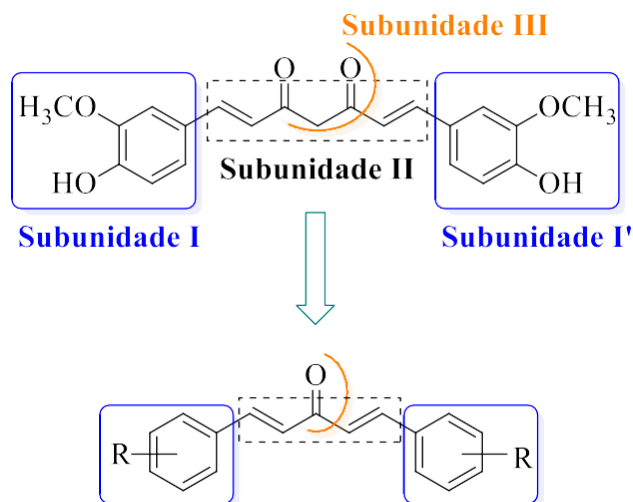
Como mencionado anteriormente, uma das limitações relacionadas a estrutura da curcumina é a sua instabilidade em pH fisiológico. Isso pode ser devido à acidez dos hidrogênios do metileno ($pK_a = 8,38$) situado entre as duas carbonilas de sua estrutura, os quais podem ser abstraídos em meio básico, que é exatamente o caso em pH fisiológico ($pH \approx 7,4$). Conforme ilustrado na **Figura 10**, a curcumina pode ser vista como tendo três subunidades passíveis de modificação estrutural sintética. O foco desse estudo, como o de outros autores (ALKHALDI et al., 2015; SHETTY et al., 2015), é a omissão do metileno central da estrutura da curcumina pela obtenção de análogos contendo apenas uma carbonila (análogos monocarbonílicos da curcumina).

Modificações possíveis:

Subunidade I: diferentes substituintes (ex.: Cl, Br, OCH₃, CH₃);

Subunidade II: tamanho da cadeia carbônica/inserção de ciclo;

Subunidade III: análogos monocarbonílicos, derivados heterocíclicos.



Análogos monocarbonílicos da curcumina

Subunidade I: sem ou diferentes substituintes;

Subunidade II: 5 carbonos ao invés de 7;

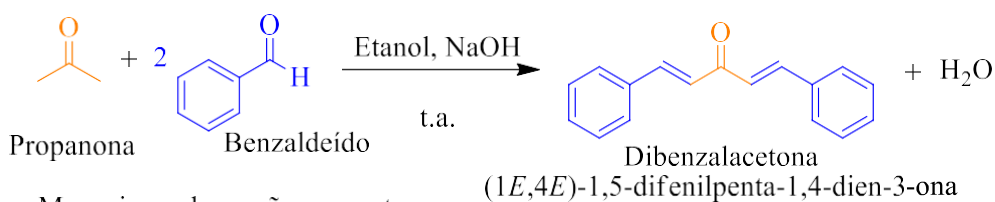
Subunidade III: 1 carbonila ao invés de 2.

Figura 10. Subunidades da curcumina passíveis de modificação estrutural e estrutura geral de seus análogos monocarbonílicos.

Fonte: baseado em SUETH-SANTIAGO et al., 2015.

A possibilidade de se obter moléculas com diferentes substituintes nos anéis aromáticos aumenta a variedade de moléculas que podem ser sintetizadas. Além disso, utilizando-se diferentes reagentes carbonílicos de partida, pode-se obter análogos alifáticos ou cíclicos variados. O tipo de reação classicamente utilizado para a obtenção de análogos monocarbonílicos da curcumina é a condensação aldólica, onde utiliza-se diferentes aldeídos e cetonas como reagentes de partida (proporção 2:1), e um catalisador básico ou ácido para acelerar a reação. Geralmente, os reagentes são homogeneizados em solvente prótico (ex.: etanol) e mantidos sob agitação à temperatura ambiente até que a reação se complete. A **Figura 11** mostra a equação geral e o mecanismo proposto na literatura para a formação dos análogos, considerando-se a reação entre benzaldeído e propanona (LEE et al., 2009; LIQIN; WEI; AIQING, 2007; MARDIANIS; ANWAR; HARYADI, 2017).

Esquema para condensação aldólica:



Mecanismo de reação proposto:

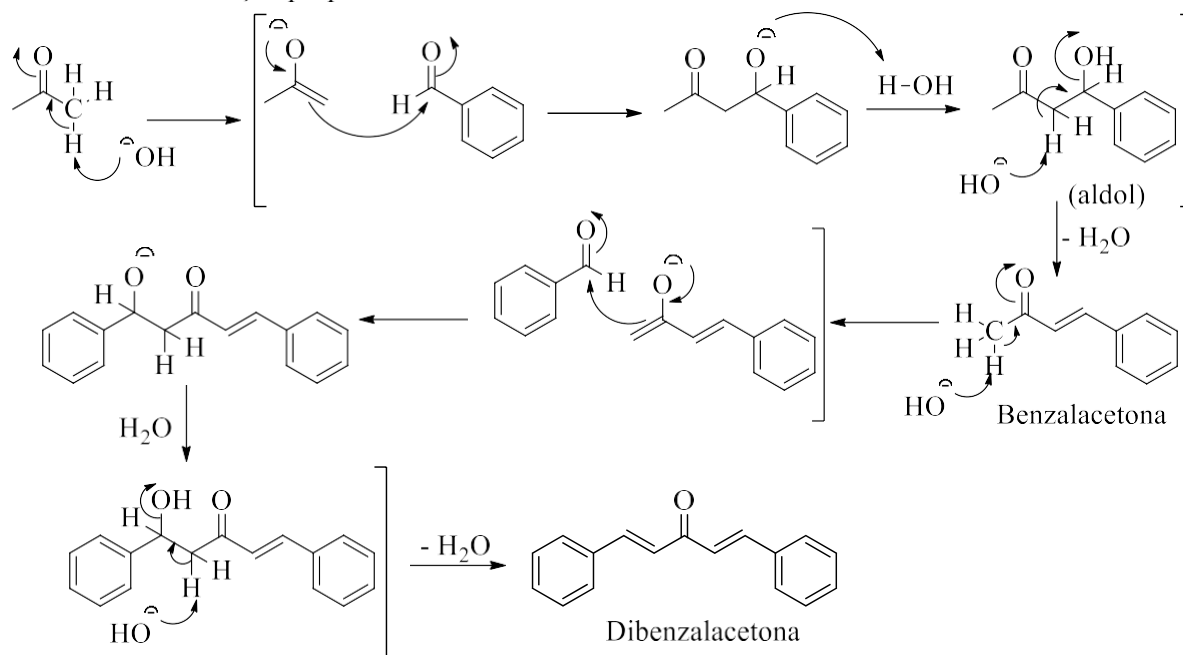


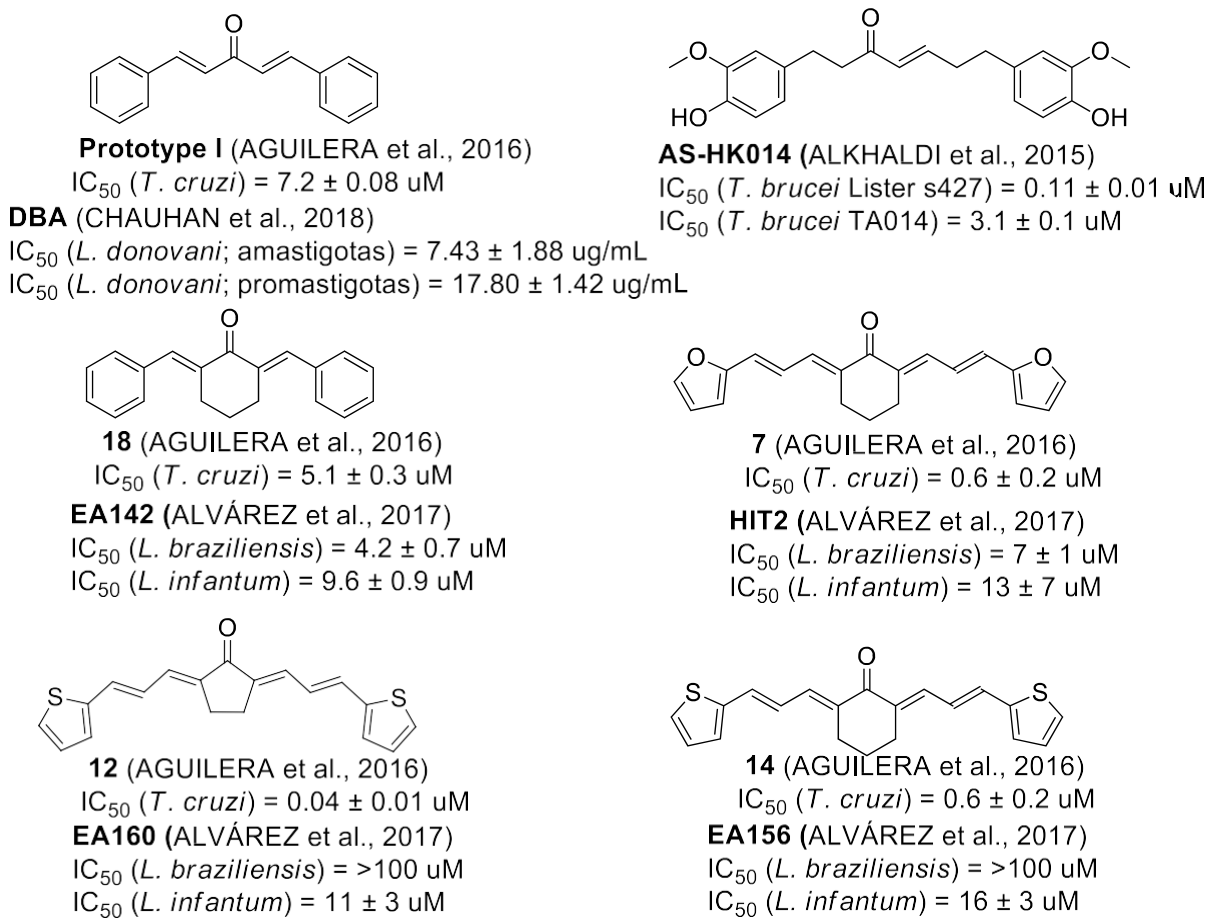
Figura 11. Mecanismo da reação de condensação aldólica entre benzaldeído e propanona.

Fonte: baseado em LIQIN; WEI; AIQING, 2007.

Através do ilustrado na **Figura 11**, pode-se ver que a reação envolve a geração de um enolato originado da remoção de um dos hidrogênios- α da propanona por uma base (ex.: NaOH, KOH), o qual atua como nucleófilo atacando o centro eletrofílico do aldeído. O benzaldeído é uma boa escolha como reagente de partida para se evitar a formação de misturas de produtos já que o mesmo não possui hidrogênio ácido e, portanto, não pode formar enolato. O mecanismo segue com a geração de um composto β -hidroxi-carbonílico (aldol), o qual pode sofrer desidratação ($-H_2O$) e formar um composto α,β -insaturado (nesse caso a benzalacetona). Como a propanona possui hidrogênio- α em ambos os lados, a reação procede da mesma forma descrita anteriormente, resultando na condensação com outra molécula de benzaldeído e formando o composto conhecido comumente como dibenzalacetona (1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona).

Para se obter análogos diferentes, pode-se utilizar aldeídos aromáticos substituídos (ex.: 4-metoxibenzaldeído) e/ou cetonas cíclicas (ex.: ciclopentanona, ciclohexanona) (MARTINS, 2009).

Da mesma forma como descrito para a curcumina, os seus análogos monocarbonílicos têm sido avaliados quanto a uma variedade de atividades biológicas, muitas vezes apresentando maior potencial do que seu composto parental (LEE et al., 2009; LIANG et al., 2008, 2009; SHETTY et al., 2015). A pesquisa de Chauhan e colaboradores (2018) evidenciou que a dibenzalacetona apresenta atividade leishmanicida *in vitro* contra parasitos de *Leishmania donovani* expressa como concentração inibitória de 50% dos organismos ($IC_{50} = 7.43 \pm 1.88 \mu\text{g/mL}$) comparável com o fármaco utilizado atualmente miltefosina ($IC_{50} = 0.01 \pm 10.9 \mu\text{g/mL}$). Esse parasito é responsável pela leishmaniose visceral canina e está entre as três maiores causas de infecções parasitárias causadas por tripanossomatídeos juntamente com *Trypanosoma brucei* (tripanossomíase Africana; “doença do sono”) e *T. cruzi* (doença de Chagas). O valor de IC_{50} do análogo dibenzalacetona foi menor do que os valores de citotoxicidade em linhagem tumoral murina J774A (CHAUHAN et al., 2018). Outros autores também mostraram o potencial de análogos monocarbonílicos contra os tripanossomatídeos de *T. brucei* e *T. cruzi*. Alguns exemplos dos análogos de maior potencial estão representados na **Figura 12** (AGUILERA et al., 2016; ALKHALDI et al., 2015; ÁLVAREZ et al., 2017; CHAUHAN et al., 2018). Os análogos de código original das referências “**Prototype I**” e “**18/EA142**” também fizeram parte do nosso estudo na avaliação anti-*T. vaginalis*, representados nos resultados com os códigos **3a** e **5a**, respectivamente. Os outros análogos demonstrados na **Figura 12** possuem uma cadeia carbônica central de 9 carbonos, similares também aos derivados do cinamaldeído do presente estudo (**9a**, **9b**, **9c** nos resultados).



Parasitas testados:

L. braziliensis = *Leishmania braziliensis* *T. brucei* Lister s427 = cepa monomórfica de *Trypanosoma brucei*
L. donovani = *Leishmania donovani* *T. brucei* TA014 = *Trypanosoma brucei* adaptadas ao **AS-HK014**
L. infantum = *Leishmania infantum* *T. cruzi* = *Trypanosoma cruzi*

Figura 12. Análogos monocarbonílicos da curcumina com atividade antiparasitária. O código de identificação dos análogos (em negrito) é o original da referência indicada.

A **Figura 12** mostra valores de IC_{50} contra múltiplos parasitos na faixa de concentração micromolar, enfatizando o potencial dessa classe de moléculas. Até o presente momento, pesquisas em bancos de dados (ex.: Scifinder, Science Direct, PubMed, etc.) resultaram em estudos relativos a atividade antiparasitária da curcumina, porém não foram encontrados resultados prévios dos análogos avaliados no presente trabalho contra *T. vaginalis*.

PARTE III

Capítulo 1

ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados dessa dissertação serão apresentados na forma de manuscrito submetido ao periódico internacional *Biomedicine & Pharmacotherapy*.

Antiparasitic activity of synthetic curcumin monocarbonyl analogues against *Trichomonas vaginalis*

Caroline Carapina da Silva^{a, *}, Bruna Silveira Pacheco^a, Raquel Nascimento das Neves^b, Mirna Samara Dié Alves^b, Sidnei Moura^c, Sibeles Borsuk^b, Claudio Martin Pereira de Pereira^a

^a Laboratory of Lipidomics and Bioorganic, Bioforensics Research Group, Federal University of Pelotas, RS, zip code 96010-900, Brazil

^b Laboratory of Infecto-parasitic Biotechnology, Federal University of Pelotas, RS, zip code 96010-900, Brazil

^c Laboratory of Biotechnology of Natural and Synthetic Products, Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, RS, zip code 95020260, Brazil

* Corresponding author. E-mail address: carapina7@hotmail.com; lahbbiufpel@gmail.com (C. Carapina da Silva)

ABSTRACT

Trichomoniasis is a parasitic infection caused by *Trichomonas vaginalis* considered to be the most common non-viral sexually transmitted infection in the world. Since the 1960s, nitroimidazoles such as metronidazole are the drugs of choice for the treatment of trichomoniasis, but many adverse effects, such as allergic reactions may result from their use. Reports of metronidazole-resistant infections also highlight the importance for the search of new anti-*T. vaginalis* agents. Considering this, herein we report the anti-*T. vaginalis* evaluation of 21 synthetic monocarbonyl analogues of curcumin, which itself has been reported to possess antiparasitic potential. From the *in vitro* analysis of the synthetic molecules, untreated trophozoites, and metronidazole at 100 μ M, it was observed that three curcumin analogues (**3a**, **3e**, and **5e**) exhibited anti-*T. vaginalis* activity comparable to metronidazole (no significant statistical difference). Optimal antiparasitic concentrations were determined to be 80 μ M and 90 μ M for propanone derivatives **3a** and **3e**, respectively, and 200 μ M for cyclohexanone derivative **5e**. Time-kill assay showed that trophozoites were killed within 24 hours. At the tested concentrations, natural curcumin did not significantly inhibit growth of the trophozoites, therefore demonstrating that the designed synthetic molecules not only have better chemical stability, but also higher anti-*T. vaginalis* potential. This study suggests that these analogues should be further explored as alternative agents for the treatment of trichomoniasis, and indicates some of the chemical features that apparently are important for the reported antiparasitic activity.

Keywords: C5-Curcuminoids; anti-*Trichomonas vaginalis*; metronidazole; arylideneketones; dibenzylideneacetone.

1. Introduction

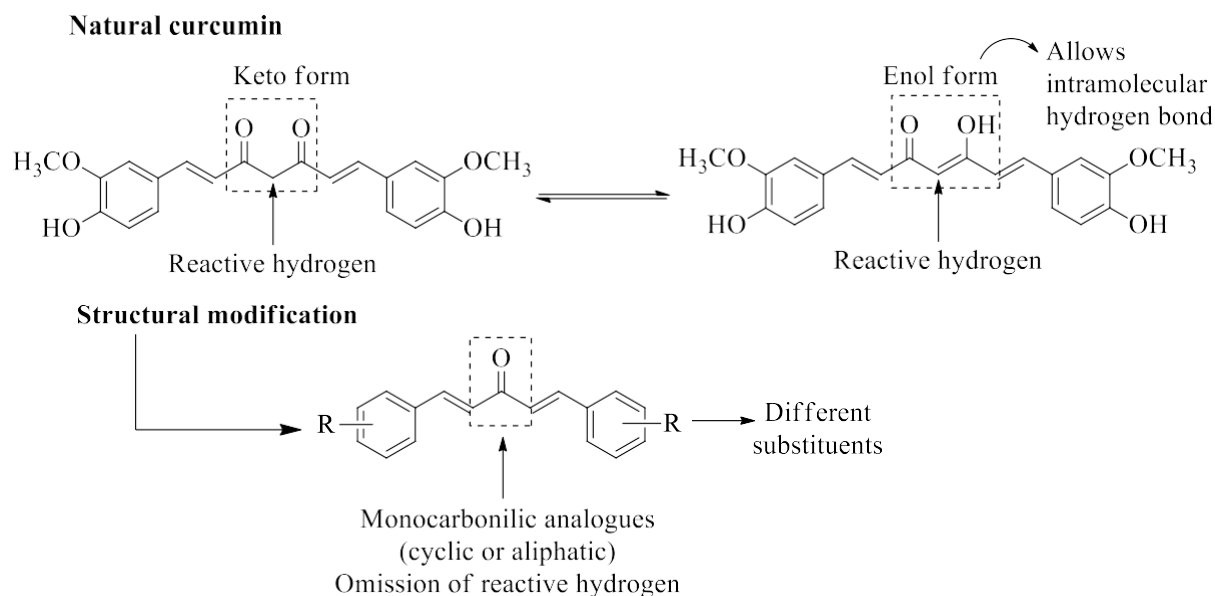
Trichomonas vaginalis is the causative agent of trichomoniasis, the most common non-viral sexually transmitted infection (STI) worldwide. According to the World Health Organization last report on global sexually transmitted infections, the estimates of new cases caused by the protozoan *T. vaginalis* were of 142.6 million, followed by *Chlamydia*

trachomatis (130.9 million), *Neisseria gonorrhoeae* (78.3 million), and *Treponema pallidum* (5.6 million) [1,2]. Since it is considered to be a curable infection, not much attention has been drawn to it compared to other STIs, but nevertheless it can cause great impact on human health because the majority of trichomoniasis cases are asymptomatic.

This fact makes it a disease difficult to diagnose, increases the number of infected sexual partners and is associated with other afflictions, such as infertility, pelvic inflammatory disease, AIDS and prostate cancer [3,4]. If patients infected by *T. vaginalis* report symptoms, they are not specifically characteristic but rather similar to the symptoms experienced with other STIs. The main symptoms in women and men are discharge from the vagina or urethra (with an unpleasant odor), genital burning, itching, redness, warts, and frequent urge to urinate (painful or not) [4,5].

The standard drug primarily chosen for the treatment of trichomoniasis is the nitroimidazole derivative metronidazole (brand name Flagyl), which acts as a pro-drug in anaerobic microorganisms where it suffers reduction and produces nitro radicals which, in turn, inhibit DNA synthesis of the microorganism. Metronidazole was approved by the Food and Drug Administration since the early 1960s and is generally administered orally as a single-dose regimen or as a topical gel, with significant cure rates [6,7]. On the other hand, there are some delimitations associated with the use of metronidazole, including many reported side effects (convulsive seizures, epigastric distress, abdominal cramping), and disulfiram-like reaction in alcoholic patients, which lead to non-compliance to the full period of treatment [8,9]. Several patients are allergic to metronidazole and require alternative treatment such as treatment with paromomycin [10], and there has been an increase on the reports of metronidazole-resistant infections along with a resistance mechanism of reductive inactivation proposed recently [11,12].

In this way, it is crucial to explore the discovery or development of new anti-*T. vaginalis* molecules that can be used as safe alternatives to metronidazole [4,9,13–15]. In this sense, this research was focused on the antiparasitic evaluation of synthetic analogues of curcumin due to its relatively easy obtainment and reproducibility. Curcumin was chosen as a natural prototype because it is the major constituent of the plant *Curcuma longa* L. and has been associated with countless biological activities [16–21], including anti-*T. vaginalis* activity [22]. However, curcumin's chemical structure also present some disadvantages due to highly reactive sites that favor degradation reactions and lower its bioavailability (**Scheme 1**), so it is important to develop compounds equally bioactive, but more stable [23,24].



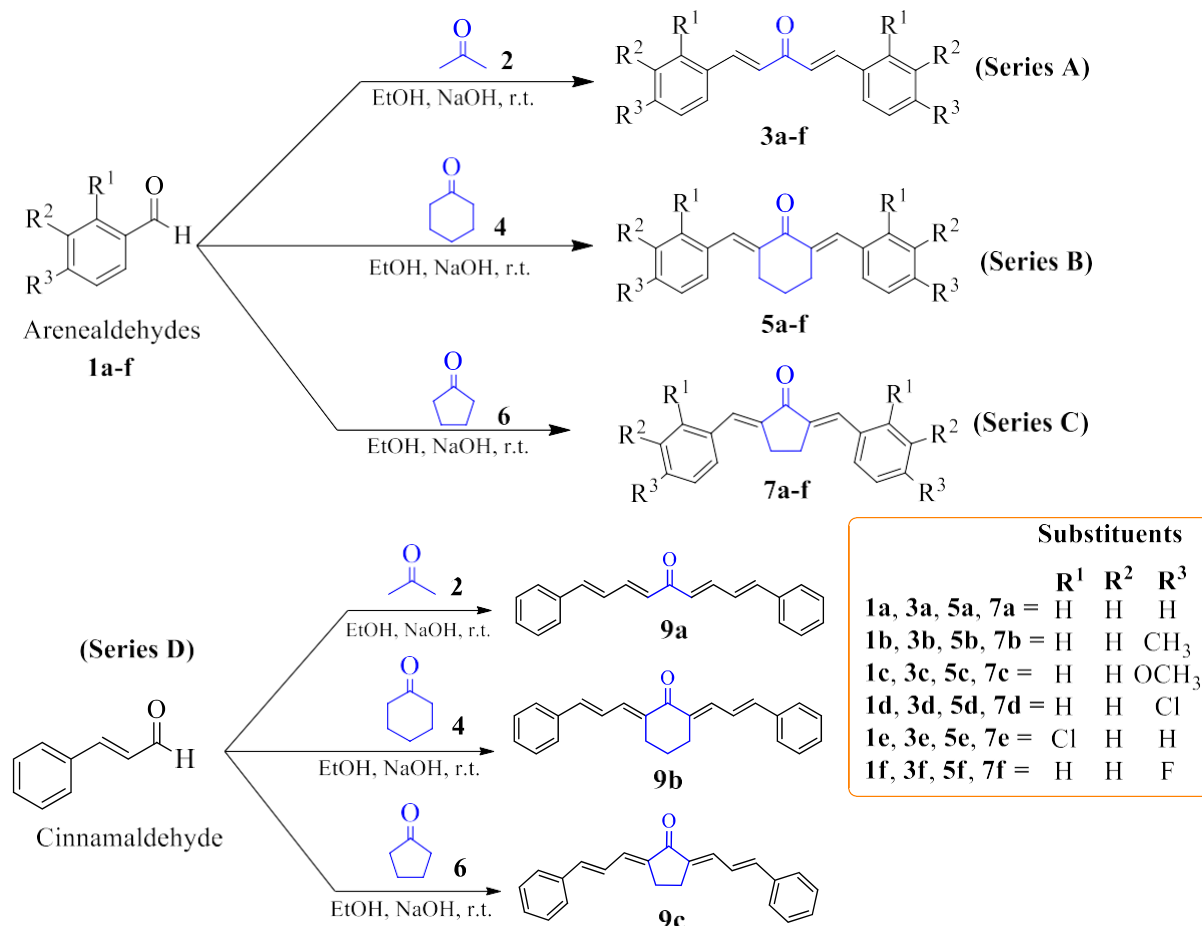
Scheme 1. Chemical structure of naturally occurring curcumin and the design of synthetic analogues.

With this in mind, the aim of this work was to evaluate the anti-*T. vaginalis in vitro* activity of a series of synthetic curcumin analogues as possible alternative antiparasitic agents.

2. Materials and Methods

Chemistry: synthesis of monocarbonyl analogues of curcumin

All reagents and solvents employed in the synthesis were of analytical grade and were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) using hexane/ethyl acetate 7:3, viewed under ultraviolet light. The curcumin analogues were synthesized based on a previously described procedure [25]. A series of 21 molecules was obtained, which were subdivided into three series according to the ketone used for condensation with different substituted aldehydes: propanone (series A), cyclohexanone (series B) or cyclopentanone (series C) and a fourth series was obtained by condensing cinnamaldehyde with the ketones mentioned (Series D) (**Scheme 2**). Briefly, to a mixture of the respective aldehyde (20 mmol) and ketone (10 mmol; ratio of 2:1), in cold ethanol (15 mL), an aqueous solution of sodium hydroxide (40%; 10 mL) was added and kept under magnetic stirring until reaction was completed (monitored by TLC; around 2 h for most of the products). Then, the catalyst was neutralized with a diluted hydrochloric acid solution, vacuum-filtered, and dried at ambient temperature. The solid was purified by recrystallization with hexane/ethyl acetate, ethanol, or ethanol/acetonitrile (for series C).



Scheme 2. Synthesis of monocarbonyl analogues of curcumin **3a-f**, **5a-f**, **7a-f** and **9a-c**.

Chemical Identification

The synthesis of monocarbonyl analogues of curcumin has been reported for many years as alternatives to the use of natural curcumin, so the chemical structures and complete characterization of products are well established and confirmed [23,26–30]. In this way, the purified crystals of synthetic curcumin analogues were identified and checked for agreement with the literature by their melting points (MP), infrared spectra (IR), mass spectra (MS), and nuclear magnetic resonance (NMR). Structural information such as molecular weight and CLog P were calculated in ChemDraw software version 8.0. Melting points were recorded with a Fisatom 430 apparatus and mercury thermometer. Chromatographic analysis was performed with a Shimadzu GC-MS-QP 2010 SE Standard Gas Chromatograph-Mass Spectrometer equipped with an AOC-20 automatic injector and a RTx-5MS column with the dimensions of 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm, using helium as carrier gas. Mass spectra were acquired using a hybrid high-resolution and high accuracy (5 μL L⁻¹) microToF (Q-TOF) mass spectrometer (Bruker® Scientific) by atmospheric pressure chemical ionization (MS APCI) and tandem APCI(+)-MS/MS. Data were collected in the m/z range of 70 – 1000 at the speed of two scans per second. Infrared spectra was recorded directly from the crystal on a Shimadzu Infrared Spectrophotometer with Fourier Transformer (FTIR-Prestige 21) using attenuated total reflectance (ATR) at a 4.0 cm⁻¹ resolution of 12 scans, and reported in wave

numbers (ν). NMR spectra of ^1H and ^{13}C were recorded on a Bruker DPX 300 (^1H at 300.13 MHz and ^{13}C at 75.48 MHz) in 5 mm sample tubes at 298 K (digital resolution ± 0.01 ppm). Molecules were solubilized in deuterated chloroform (CDCl_3), and chemical shifts were recorded in ppm. Identification data is displayed below and detailed spectral information is given as supplemental files.

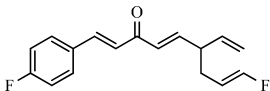
Data of monocarbonyl analogues of curcumin

The main data related to the identification of synthetic curcumin analogues are displayed in **Tables 1, 2, 3** and **4**. Detailed information and selected spectra can be found as supplemental files.

Table 1. Data of Series A products (monocarbonyl analogues with propanone **3a-f**)

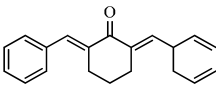
Structure	IUPAC Name (article code)
	Exact Mass (EM); Molecular Weight (MW); Yield; aspect; Melting Point (mp) (Literature: [ref]); CLog P^a ; IR ν_{max} / cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm); MS (APCI) m/z : (M+1) $^{+1}$.
	(1<i>E</i>,4<i>E</i>)-1,5-diphenylpenta-1,4-dien-3-one (3a) $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}$. EM: 234.10; MW: 234.29; Yield: 60%; yellow solid; mp ($^{\circ}\text{C}$): 113 – 115 (Lit.: 113/110 – 112 [31,32]); CLog P^a: 4.278; IR ν_{max} / cm^{-1} 3052, 3025 (C-H), 1654 (C=O), 1626, 1589 (C=C), 1571 (C=C); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.73 (d, 2H, J = 15.9 Hz; 2x =C-H); 7.58 – 7.61 (m, 10 H, 2x Ph); 7.07 (d, 2H, J = 15.9 Hz, 2x =C-H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 189.01; 143.4; 134.8; 130.6; 129.0; 128.5; 125.4; MS (APCI) m/z: 235.11 (M+1)$^{+1}$.
	(1<i>E</i>,4<i>E</i>)-1,5-di-<i>p</i>-tolylpenta-1,4-dien-3-one (3b) $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}$. EM: 262.14; MW: 262.35; Yield: 56%; yellow needle crystals; mp ($^{\circ}\text{C}$): 175-177 (Lit.: 174 – 176 [32]); CLog P^a: 5.276; IR ν_{max} / cm^{-1} 3026, 2917 (C-H), 1646 (C=O), 1617, 1582, 1565 (C=C), 1183 (C-C). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): same pattern as 3c; MS (APCI) m/z: 263.14 (M+1)$^{+1}$.

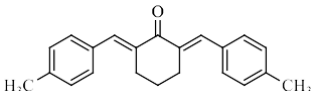
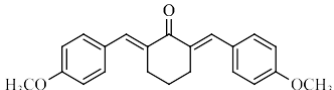
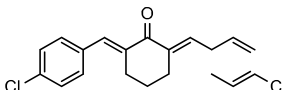
Structure	IUPAC Name (article code)
	Exact Mass (EM); Molecular Weight (MW); Yield; aspect; Melting Point (mp) (Literature: [ref]); CLog P ^a ; IR ν_{max} / cm^{-1} ; ¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ (ppm); ¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ (ppm); MS (APCI) m/z : (M+1) ⁺¹ .
	(1<i>E</i>,4<i>E</i>)-1,5-bis(4-methoxyphenyl)penta-1,4-dien-3-one (3c) C₁₉H₁₈O₃. EM: 294.13; MW: 294.34; Yield: 63%; pale yellow crystals; mp (°C): 129 – 132 (Lit.: 128 - 130 [32]); CLog P^a: 4.116; IR ν_{max} / cm^{-1} 3048, 2920, 2906 (C-H), 1687 (C=O), 1626, 1591, 1584 (C=C), 1228 (C-O), 1180, 988 (C-C); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.69 (d, 2H, <i>J</i> = 15.6 Hz, 2x =CH); 7.55 (d, 4H, <i>J</i> = 8.7 Hz, 2x Ar); 6.94 (d, 2H, <i>J</i> = 15.9 Hz, 2x =C-H); 6.91 (d, 4H, <i>J</i> = 8.7 Hz, 2x Ar); 3.83 (s, 6H, 2x OCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 188.9; 161.15; 142.7; 130.2; 127.6; 123.5; 114.4; 55.4; MS (APCI) m/z: 295.13 (M+1)⁺¹.
	(1<i>E</i>,4<i>E</i>)-1,5-bis(4-chlorophenyl)penta-1,4-dien-3-one (3d) C₁₇H₁₂Cl₂O. EM: 302.03; MW: 303.18; Yield: 40%; yellow crystals; mp (°C): 184 – 186 (Lit.: 184 – 186 [32]); CLog P^a: 5.704; IR ν_{max} / cm^{-1} 3052, 3017 (C-H), 1646 (C=O), 1628, 1587, 1563 (C=C), 1187, 1086 (C-C), 809, 706 (C-Cl); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.67 (d, 2H, <i>J</i> = 15.9 Hz, 2x =CH); 7.55 (d, 4H, <i>J</i> = 9.0 Hz, 2x Ar); 7.39 (d, 4H, <i>J</i> = 9.0 Hz, 2x Ar); 7.02 (d, 2H, <i>J</i> = 15.9 Hz, 2x =CH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 188.4; 142.2; 136.6; 133.2; 129.7; 129.4; 125.7; MS (APCI) m/z: 303.03 (M+1)⁺¹.
	(1<i>E</i>,4<i>E</i>)-1,5-bis(2-chlorophenyl)penta-1,4-dien-3-one (3e) C₁₇H₁₂Cl₂O. EM: 302.03; MW: 303.18; Yield: 73%; yellow crystals; mp (°C): 118 – 120 (Lit.: 114 – 116 [32]); CLog P^a: 5.704; IR ν_{max} / cm^{-1} 3052, 3026 (C-H), 1646 (C=O), 1624, 1587, 1563 (C=C), 1082 (C-C), 763, 730 (C-Cl); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.13 (d, 2H, <i>J</i> = 15.9 Hz; 2x =C-H); 7.7 – 7.2 (m, 8H, 2x Ar); 7.07 (d, 2H, <i>J</i> = 15.9 Hz; 2x =C-H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 188.8; 139.4; 135.5; 133.0; 131.3; 130.3; 127.8; 127.5; 127.2; MS (APCI) m/z: 303.03 (M+1)⁺¹.

Structure	IUPAC Name (article code)
	Exact Mass (EM); Molecular Weight (MW); Yield; aspect; Melting Point (mp) (Literature: [ref]); CLog P ^a ; IR ν_{max} / cm^{-1} ; ¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ (ppm); ¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ (ppm); MS (APCI) m/z: (M+1) ⁺ .
	(1E,4E)-1,5-bis(4-fluorophenyl)penta-1,4-dien-3-one (3f)
	C ₁₇ H ₁₂ F ₂ O. EM: 270.09; MW: 270.27; Yield: 74%; orange crystals; mp (°C): 150 – 154 (Lit.: 150 – 152 [33]); CLog P ^a : 4.564; IR ν_{max} / cm^{-1} 3074, 3052 (C-H), 1650 (C=O), 1626, 1582 (C=C), 1226, 1154 (C-F); 1187 (C-C); ¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ (ppm): 7.70 (d, 2H, <i>J</i> = 15.9 Hz, 2x =C-H); 7.61 (d, 4H, <i>J</i> = 9.0 Hz, 2x Ar); 7.12 (d, 4H, <i>J</i> = 9.0 Hz, 2 x Ar); 6.99 (d, 2H, <i>J</i> = 15.9 Hz; 2x =C-H); ¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ (ppm): 188.5; 164.10 (d, 1C, <i>J</i> _{CF} ¹ = 255.5 Hz, Ar-F); 142.2; 131.03 (d, 1C, <i>J</i> _{CF} ⁴ = 3.76 Hz, Ar-F); 130.38 (d, 2C, <i>J</i> _{CF} ³ = 8.77 Hz, Ar-F); 125.11; 125.08; 116.2; (d, 2C, <i>J</i> _{CF} ² = 21.3 Hz, Ar-F); MS (APCI) m/z: 271.09 (M+1) ⁺ .

^a: theoretical value of CLog P determined by Chemdraw software 8.0, CambridgeSoft, Cambridge, MA.

Table 2. Data of Series B products (monocarbonyl analogues with cyclohexanone **5a-f**)

Structure	IUPAC Name (article code)
	Exact Mass (EM); Molecular Weight (MW); Yield; aspect; Melting Point (mp) (Literature: [ref]); CLog P ^a ; IR ν_{max} / cm^{-1} ; ¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ (ppm); ¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ (ppm); MS (APCI) m/z: (M+1) ⁺ .
	(2E,6E)-2,6-dibenzylidenecyclohexanone (5a)
	C ₂₀ H ₁₈ O. EM: 274.14; MW: 274.36; Yield: 64%; yellow hexagonal crystals; mp (°C): 116 – 118 (Lit.:116 – 120 [31]); CLog P ^a : 5.331; IR ν_{max} / cm^{-1} 3022, 2932, 2919 (C-H), 1659 (C=O), 1604 (C=C), 1272 (C-C); ¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ (ppm): 7.80 (s, 2H, 2x =C-H), 7.78 – 7.47 (m, 10 H, 2x Ph), 2.90 (t, 4H, 2x CH ₂), 1.76 (quint., 2H, CH ₂); ¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ (ppm): 190.3; 137.0; 136.2; 135.9; 130.4; 128.6; 128.4; 28.5; 23.0. MS (APCI) m/z: 275.14 (M+1) ⁺ .

Structure	IUPAC Name (article code)
	Exact Mass (EM); Molecular Weight (MW); Yield; aspect; Melting Point (mp) (Literature: [ref]); CLog P ^a ; IR $\nu_{\max}$ / cm^{-1} ; ¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ (ppm); ¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ (ppm); MS (APCI) m/z : (M+1) ⁺¹ .
	(2<i>E</i>,6<i>E</i>)-2,6-bis(4-methylbenzylidene)cyclohexanone (5b) C₂₂H₂₂O. EM: 302.17; MW: 302.41; Yield: 24%; yellow crystals; mp (°C): 171-174 (Lit.: 170 – 171 [34]); CLog P^a: 5.61; IR $\nu_{\max}$ / cm^{-1} 2938, 2914, 2858, 2834(C-H), 1661 (C=O), 1595, 1565 (C=C), 818 (C-C); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.78 (s, 2x =C-H); 7.40 (d, 2H, <i>J</i> = 8.7 Hz, 2x Ar); 7.2 (d, 4H, <i>J</i> = 8.7 Hz, 2x Ar); 2.90 (t, 4H, 2x CH₂) 2.37 (s, 6H, 2x CH₃); 1.77 (quint., 2H, CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 190.5; 138.9; 136.9; 135.5; 133.2; 130.6; 129. 2; 28.6; 23.1; 21.5. MS (APCI) m/z: 303.17 (M+1)⁺¹.
	(2<i>E</i>,6<i>E</i>)-2,6-bis(4-methoxybenzylidene)cyclohexanone (5c) C₂₂H₂₂O₃. EM: 334.16; MW: 334.41; Yield: 80%; yellow solid; mp (°C): 201 – 203 (Lit.: 202 - 203 [35]); CLog P^a: 5.169; IR $\nu_{\max}$ / cm^{-1} 2938, 2827 (C-H), 1657 (C=O), 1589, 1554 (C=C), 1248 (C-O), 1021, 831 (C-C); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.76 (s, 2x =C-H); 7.42 (d, 2H, <i>J</i> = 8.7 Hz, 2x Ar); 6.91 (d, 4H, <i>J</i> = 8.7 Hz, 2x Ar); 3.82 (s, 6H, 2x OCH₃); 2.90 (t, 4H, 2x CH₂); 1.78 (quint., 2H, CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 190.2; 159.9; 136.5; 134.3; 132.2; 128.7; 113.9; 55.3; 28.5; 23.0. MS (APCI) m/z: 335.16 (M+1)⁺¹.
	(2<i>E</i>,6<i>E</i>)-2,6-bis(4-chlorobenzylidene)cyclohexanone (5d) C₂₀H₁₆Cl₂O. EM: 342.06; MW: 343.25; Yield: 62%; yellow crystals; mp (°C): 147 – 148 (Lit.: 147 - 148 [34]); CLog P^a: 6.757; IR $\nu_{\max}$ / cm^{-1} 2967, 2942 2928 (C-H), 1665 (C=O), 1604 (C=C), 1161, 1145 (C-C), 798 (C-Cl); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.72 (d, 2H, 2x Ar); 7.37 (s, 2x =C-H); 7.3 – 7.41 (m, 8H, 2x Ar); 2.8 (t, 4H, 2 x CH₂); 1.78 (quint., 2H, CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 189.7; 136.3; 135.7; 134.5; 134.2; 131.5; 128.6; 28.3; 22.7. MS (APCI) m/z: 343.05 (M+1)⁺¹.

Structure	IUPAC Name (article code)
	Exact Mass (EM); Molecular Weight (MW); Yield; aspect; Melting Point (mp) (Literature: [ref]); CLog P ^a ; IR ν_{max} / cm^{-1} ; ¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ (ppm); ¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ (ppm); MS (APCI) m/z : (M+1) ⁺¹ .
	(<i>2E,6E</i>)-2,6-bis(2-chlorobenzylidene)cyclohexanone (5e) C₂₀H₁₆Cl₂O. EM: 342.06; MW: 343.25; Yield: 83%; yellow crystals; mp (°C): 111 – 114 (Lit.: 103 – 105 [36]); CLog P^a: 6.757; IR ν_{max} / cm^{-1} 3063, 2972, 2917 (C-H), 1663 (C=O), 1587, 1576 (C=C), 1143 (C-C), 765, 733 (C-Cl); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.91 (s, 2x =C-H); 7.2 – 7.46 (m, 8H, 2x Ar); 2.7 (t, 4H, 2x CH₂); 1.74 (quint., 2H, CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 189.8; 137.8; 135.1; 134.4; 134.1; 130.6; 129.8; 129.7; 126.3; 28.5; 23.2. MS (APCI) m/z: 343.06 (M+1)⁺¹.
	(<i>2E,6E</i>)-2,6-bis(4-fluorobenzylidene)cyclohexanone (5f) C₂₀H₁₆F₂O. EM: 310.12; MW: 310.34; Yield: 36%; pale yellow solid; mp (°C): 154 – 157 (Lit.: 156 [37]); CLog P^a: 5.167; IR ν_{max} / cm^{-1} 2954, 2932, 2872 (C-H), 1661 (C=O), 1609, 1598 (C=C), 1143 (C-C), 1220, 1268 (C-F); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.74 (s, 2x =C-H); 7.45 (d, 4H, J = 8.7 Hz, 2x Ar); (7.08 d, 4H, J = 8.7 Hz, 2x Ar); 2.8 (t, 4H, 2x CH₂); 1.78 (quint., 2H, CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 190.6; 162.7 (d, 1C, J^1_{CF} = 246.7 Hz, Ar-F); 135.96; 135.7 (d, 1C, J^4_{CF} = 3.76 Hz, Ar-F); 132.3 (d, 2C, J^3_{CF} = 8.24 Hz, Ar-F); 132.1; 132.06; 115.6 (d, 2C, J^2_{CF} = 25.3 Hz, Ar-F); 28.4; 22.9. MS (APCI) m/z: 311.12 (M+1)⁺¹.

^a: theoretical value of CLog P determined by Chemdraw software 8.0, CambridgeSoft, Cambridge, MA.

Table 3. Data of Series C products (monocarbonyl analogues with cyclopentanone **7a-f**)

Structure	IUPAC Name (article code)
	Exact Mass (EM); Molecular Weight (MW); Yield; aspect; Melting Point (mp) (Literature: [ref]); CLog P ^a ; IR ν_{max} / cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm); MS (APCI) m/z : $(\text{M}+1)^{+1}$.
	(2 <i>E</i> ,5 <i>E</i>)-2,5-dibenzylidenecyclopentanone (7a) $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}$. EM: 260.12; MW: 260.33; Yield: 74%; yellow solid; mp ($^{\circ}\text{C}$): 189 – 193 (Lit.: 194 - 195 [31]); CLog P ^a : 4.772; IR ν_{max} / cm^{-1} 3054, 3019, 2910 (C-H), 1685 (C=O), 1622, 1598 (C=C), 1178 (C-C); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.60 (d, 4H, J = 6.7 Hz, 2x Ar); 7.43 (s, 2H, 2x =CH); 7.33 – 7.47 (m, 8 H, 2x Ph); 3.08 (s, 4H, 2x CH_2); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 196.42; 137.3; 135.8; 133.9; 130.8; 129.4; 128.8; 26.6. MS (APCI) m/z : 261.12 $(\text{M}+1)^{+1}$.
	(2 <i>E</i> ,5 <i>E</i>)-2,5-bis(4-methylbenzylidene)cyclopentanone (7b) $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}$. EM: 288.15; MW: 288.38; Yield: 60%; yellow solid; mp ($^{\circ}\text{C}$): 243 – 244 (Lit.: 243 - 245 [36]); CLog P ^a : 5.77; IR ν_{max} / cm^{-1} 2909, 2850 (C-H), 1687 (C=O), 1615, 1584 (C=C), 1169, 809 (C-C); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.57 (s, 2H, 2x =CH); 7.50 (d, 4H, J = 8 Hz, 2x Ar); 7.24 (d, 4H, J = 8 Hz, 2x Ar); 3.08 (s, 4H, 2x CH_2); 2.4 (s, 6H, CH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 196.62; 139.89; 136.62; 133.84; 130.23; 130.12; 130.06; 133.81; 133.20; 130.91; 129.65; 26.55; 21.65. MS (APCI) m/z : 289.15 $(\text{M}+1)^{+1}$.
	(2 <i>E</i> ,5 <i>E</i>)-2,5-bis(4-methoxybenzylidene)cyclopentanone (7c) $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_3$. EM: 320.14; MW: 320.38; Yield: 75%; yellow solid; mp ($^{\circ}\text{C}$): 215 – 217 (Lit.: 210 – 211 [38]); CLog P ^a : 4.61; IR ν_{max} / cm^{-1} 2966, 2842 (C-H), 1694 (C=O), 1630, 1595 (C=C), 1246, 1032 (C-O), 1167 (C-C); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.56 (d, 4H, J = 9.0 Hz, 2x Ar); 7.37 (s, 2H, 2x =CH); 6.95 (d, 4H, J = 9.0 Hz, 2x Ar); 3.8 (s, 6H, 2x OCH_3); 3.07 (s, 4H, 2x CH_2); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 196.4; 160.5; 135.3; 133.3; 132.6; 128.8; 114.3; 55.4; 26.5. MS (APCI) m/z : 321.14 $(\text{M}+1)^{+1}$.

Structure	IUPAC Name (article code)
	Exact Mass (EM); Molecular Weight (MW); Yield; aspect; Melting Point (mp) (Literature: [ref]); CLog P ^a ; IR ν_{max} / cm^{-1} ; ¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ (ppm); ¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ (ppm); MS (APCI) m/z : (M+1) ⁺¹ .
	(2E,5E)-2,5-bis(4-chlorobenzylidene)cyclopentanone (7d) C ₁₉ H ₁₄ Cl ₂ O. EM: 328.04; MW: 329.22; Yield: 82%; yellow crystals; mp (°C): 225 – 228 (Lit.: 227 – 229 [36]); CLog P ^a : 6.198; IR ν_{max} / cm^{-1} 2933, 2914 (C-H), 1694 (C=O), 1606, 1580 (C=C), 927 (C-C), 816, 682 (C-Cl); ¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ (ppm): ¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ (ppm): same pattern as 7f . MS (APCI) m/z : 329.04 (M+1) ⁺¹ .
	(2E,5E)-2,5-bis(2-chlorobenzylidene)cyclopentanone (7e) C ₁₉ H ₁₄ Cl ₂ O. EM: 328.04; MW: 329.22; Yield: 69%; yellow crystals; mp (°C): 158 – 160 (Lit.: 155 – 158 [28]); CLog P ^a : 6.198; IR ν_{max} / cm^{-1} 3067, 3049, 2926, 2911 (C-H), 1685 (C=O), 1600, 1587 (C=C), 1180, 1036 (C-C), 750 (C-Cl); ¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ (ppm): 7.92 (s, 2H, 2x =CH); 7.30 – 7.56 (m, 8H, 2x Ar); 2.9 (s, 4H, 2x CH ₂); ¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ (ppm): 195.5; 139.3; 136.0; 133.8; 130.12; 130.1; 126.6; 26.5. MS (APCI) m/z : 329.05 (M+1) ⁺¹ .
	(2E,5E)-2,5-bis(4-fluorobenzylidene)cyclopentanone (7f) C ₁₉ H ₁₄ F ₂ O. EM: 296.10; MW: 296.31; Yield: 80%; pale yellow solid; mp (°C): 237 – 239 (Lit.: 239 – 240 [37]); CLog P ^a : 5.058; IR ν_{max} / cm^{-1} n; 2921, 2907 (C-H), 1689 (C=O), 1587 (C=C), 1226 (C-F), 1183, 827 (C-C); ¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ (ppm): 7.6 (d, 4H, J = 8.9 Hz, 2x Ar); 7.57 (s, 2H, 2x =CH); 7.14 (d, 4H, J = 9.0 Hz, 2x Ar); 3.09 (s, 4H, 2x CH ₂); ¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ (ppm): 196.25; 163.2 (d, 1C, J^1_{CF} = 249.6 Hz, Ar-F); 136.8; 132.84 (d, 1C, J^4_{CF} = 3.10 Hz, Ar-F); 132.7 (d, 2C, J^3_{CF} = 8.17 Hz, Ar-F); 132.13; 132.08; 116.15 (d, 2C, J^2_{CF} = 24.0 Hz, Ar-F); MS (APCI) m/z : 297.10 (M+1) ⁺¹ .

^a: theoretical value of CLog P determined by Chemdraw software 8.0, CambridgeSoft, Cambridge, MA.

Table 4. Data of Series D products (derivatives of cinnamaldehyde **9a-c**)

Structure	IUPAC Name (article code)
	Exact Mass (EM); Molecular Weight (MW); Yield; aspect; Melting Point (mp) (Literature: [ref]); CLog P ^a ; IR ν_{max} / cm^{-1} ; ¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ (ppm); ¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ (ppm); MS (APCI) m/z: (M+1) ⁺ .
	(<i>1E,3E,6E,8E</i>)-1,9-diphenylnona-1,3,6,8-tetraen-5-one (9a) C₂₁H₁₈O. EM: 286.14; MW: 286.37; Yield: 42%; orange crystals; mp (°C): 141 – 142 (Lit.: 142 [37]); CLog P^a: 5.336; IR ν_{max} / cm^{-1} 3029, 3019 (C-H), 1654 (C=O), 1589, 1563 (C=C), 1067, 995 (C-C); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.60 (d, 4H, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2x Ar); 7.52 (q, 2 H, <i>J</i> = 15 Hz, 2x =C-Hβ); 7.40 (t, 4H, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2x Ar); 7.33 (t, 2H, <i>J</i> = 7.2 Hz; 2x Ar); 7.02 (d, 2H, <i>J</i> = 16.5 Hz, 2x =C-H-Ar); 6.71 (d, 2H, <i>J</i> = 16.5 Hz, 2x =CH); 6.69 (d, 2H, <i>J</i> = 15 Hz, 2x =C-Hα); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 188.9; 142.9; 141.4; 136.1; 129.1; 128.9; 128.8; 127.2; 126.9. MS (APCI) m/z: 287.13 (M+1)⁺.
	(<i>2E,6E</i>)-2,6-bis((<i>E</i>)-3-phenylallylidene)cyclohexanone (9b) C₂₂H₂₂O. EM: 326.17; MW: 326.43; Yield: 44%; orange solid; mp (°C): 177 – 179 (Lit.: 178 - 179 [39]); CLog P^a: 6.389; IR ν_{max} / cm^{-1} 3007, 2935, 2869 (C-H), 1652 (C=O), 1580 (C=C), 1150, 975, 744 (C-C); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.51 (d, 4H, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2x Ar); 7.46 (t, 4H, 2x Ar); 7.34 (t, 2H, 2x Ar); 7.29 (d, 2H, 2x =C-Hβ); 7.10 (d, 2H, <i>J</i> = 15 Hz, 2x =CH-Ar), 7.06 (d, 2H, <i>J</i> = 15 Hz, 2x =CH); 2.9 (t, 4H, 2x CH₂), 1.9 (quint., 2H, CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 188.8; 140.7; 136.7; 136.2; 135.3; 128.75; 128.7; 127.1; 123.6; 26.5. 21.9. MS (APCI) m/z: 327.16 (M+1)⁺.
	(<i>2E,5E</i>)-2,5-bis((<i>E</i>)-3-phenylallylidene)cyclopentanone (9c) C₂₃H₂₀O. EM: 312.15; MW: 312.40; Yield: 61%; orange solid; mp (°C): 228 – 229 (Lit.: 229 [37]); CLog P^a: 5.83; IR ν_{max} / cm^{-1} 3025(C-H), 1670 (C=O), 1611, 1580 (C=C), 966, 748 (C-C); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.51 (d, 4H, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2x Ar); 7.4 (t, 4H, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2x Ar), 7.34 (t, 2H, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2x Ar), 7.26 (d, 2H, 2x =CHβ); 7.2 (d, 2H, <i>J</i> = 7 Hz, 2x =CH-Ar), 6.94 (d, 2H, <i>J</i> = 7 Hz, 2x =CH); 2.88 (s, 4H, 2x CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 194.9; 141.2; 139.7; 136.5; 132.6; 128.9; 128.7; 127.2; 124.7; 23.8. MS (APCI) m/z: 313.14 (M+1)⁺.

^a: theoretical value of CLog P determined by Chemdraw software 8.0, CambridgeSoft, Cambridge, MA.

Parasite culture conditions

T. vaginalis 30236 isolates from American Type Culture Collection (ATCC) were axenically cultured in tubes filled with pre-warmed trypticase-yeast extract-maltose (TYM) broth (pH 6.0), supplemented with 10% sterile bovine serum, previously inactivated at 56 °C, and 5 mg/mL streptomycin and incubated at 37 °C [40]. Cultures were analyzed through observation of motility, morphology, and trypan blue (0.4%) dye exclusion assay under optical microscope at 400x magnification and those with viability equal or higher than 95% were used for the anti-*T. vaginalis* assay.

Antiparasitic assay

Anti- *T. vaginalis* evaluation of curcumin analogues, minimum inhibitory concentration (MIC), inhibitory concentration of 50% of growth (IC₅₀) and time-kill assay were performed following the methodology of Sena-Lopes et al. [9]. Briefly, the anti- *T. vaginalis* activity was evaluated in 96-well microtiter plates, where 2.6×10^5 trophozoites/mL were treated with the curcumin analogues, initially at 100 µM previously diluted in 0.6% of DMSO. Three controls were applied: a negative control containing only trophozoites, a 0.6% DMSO control (vehicle for solubilization) and a positive control containing 100 µM of metronidazole (MTZ) (Sigma-Aldrich). The microtiter plates were incubated at 37 °C with 5% CO₂ for 24 h, and after statistical analysis, only the analogues that did not show significant statistical difference from the positive control were evaluated in the next experiments.

The MIC and IC₅₀ value against *T. vaginalis* was established in the same conditions as described above, with variations on different concentrations of the curcumin analogues, which ranged from 6.25 µM to 300 µM. After the MIC was determined, the culture solution from MIC wells and from the concentrations directly below and above, as well as controls, were inoculated in fresh TYM medium and re-incubated at 37 °C with 5% CO₂. Trophozoites were counted in a Neubauer chamber every 24 h during 96 h to confirm MIC.

A time-kill assay curve was established to obtain a more accurate activity profile for the curcumin compounds against *T. vaginalis*. Trophozoites viability was observed by optical microscopy for 96 h after incubation at respective MIC, and growth analysis was performed at 1, 6, 12, 24, 48, 72, and 96 h. After all assays, a preparation containing trophozoites and trypan blue (0.4%) dye at a ratio of 1:1, was analyzed under optic microscope (400x), where the viable trophozoites, with negative staining, were counted in Neubauer chamber, and the motility and morphology of trophozoites were analyzed. All assays were performed independently at least three times in triplicate and results were expressed as the percentage of viable trophozoites in comparison with the negative control.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out by one-way analysis of variance (ANOVA) using a probability value of $p < 0.05$ using the GraphPad Prism 5.0 software. Tukey's test was also conducted to identify significant differences between the means of different treatments.

3. Results and Discussion

Chemistry

Firstly, in relation to the synthesis of monocarbonyl analogues of curcumin, it can be seen from the **Tables 1-4** that a total of 21 products was obtained with a good variety of substituents and in moderate to good yields. Also, chromatographic monitoring of reactions development indicated that most of them took less than two hours to be completed, while others required an average of four hours though there was no degradation observed if stirring was kept overnight. Analogues derived from condensation of aromatic aldehydes with acetone within the Series A were obtained in yields ranging from 40% (**3d**; -4-Cl) to 74% (**3f**; -4-F). Series B analogues derived from cyclohexanone were obtained in 24% (**5b**; -4-CH₃) to 83% (**5e**; -2-Cl) yields; Series C from cyclopentanone presented the highest reaction yields [60% for **7b** (4-CH₃) to 82% (**7d**; -4-Cl)], and derivatives of cinnamaldehyde (Series D) had an overall 49% yield. The aldol condensation is an interesting tool in organic chemistry because it combines two carbonyl compounds to give rather stable α - β -unsaturated products, especially condensations between ketones and aromatic aldehydes such as benzaldehyde, which avoid crossed aldol condensations since benzaldehyde does not have any α -hydrogen. The synthetic methodology is relatively easier than others as it does not require many work up steps nor does it involve the use of reagents and solvents of high toxicity since the solvent of choice for the reaction is ethanol [41]. Molecules obtained by synthetic methodologies also surpass some of the barriers often related to the use of natural products, such as mixture of compounds and seasonal quantity variation, low yield and commercial availability [30,42–44]. In fact, many of the molecules described here are commercially available (e.g. analogues **3a**, **3d**, **5a**), can be obtained in macroscale under mild conditions [45], and some of them are already present in commercial products, such as analogue **3a** which is used in sunscreen formulations [46–48].

Antiparasitic assay

Data analysis obtained from the anti- *T. vaginalis* assay showed that curcumin analogues **3a**, **3e** and **5e** were the most effective against *T. vaginalis* after 24 h of exposure. Compounds **3a** and **3e** reduced parasite viability by 98.8%, and compound **5e** reduced 70% when compared with the negative control (untreated trophozoites), showing absence of significant statistical difference when compared with the positive control (MTZ). As expected, the positive control completely reduced parasite viability, stopped motility and caused positive staining with trypan blue (0.4%), whereas the negative control and 0.6% DMSO control exhibited motility and were not stained with trypan blue (0.4%) dye, and did not present a significant statistical difference when compared with each other. Therefore, this assures that the vehicle for solubilization did not interfere in the trophozoites viability (**Fig. 1**).

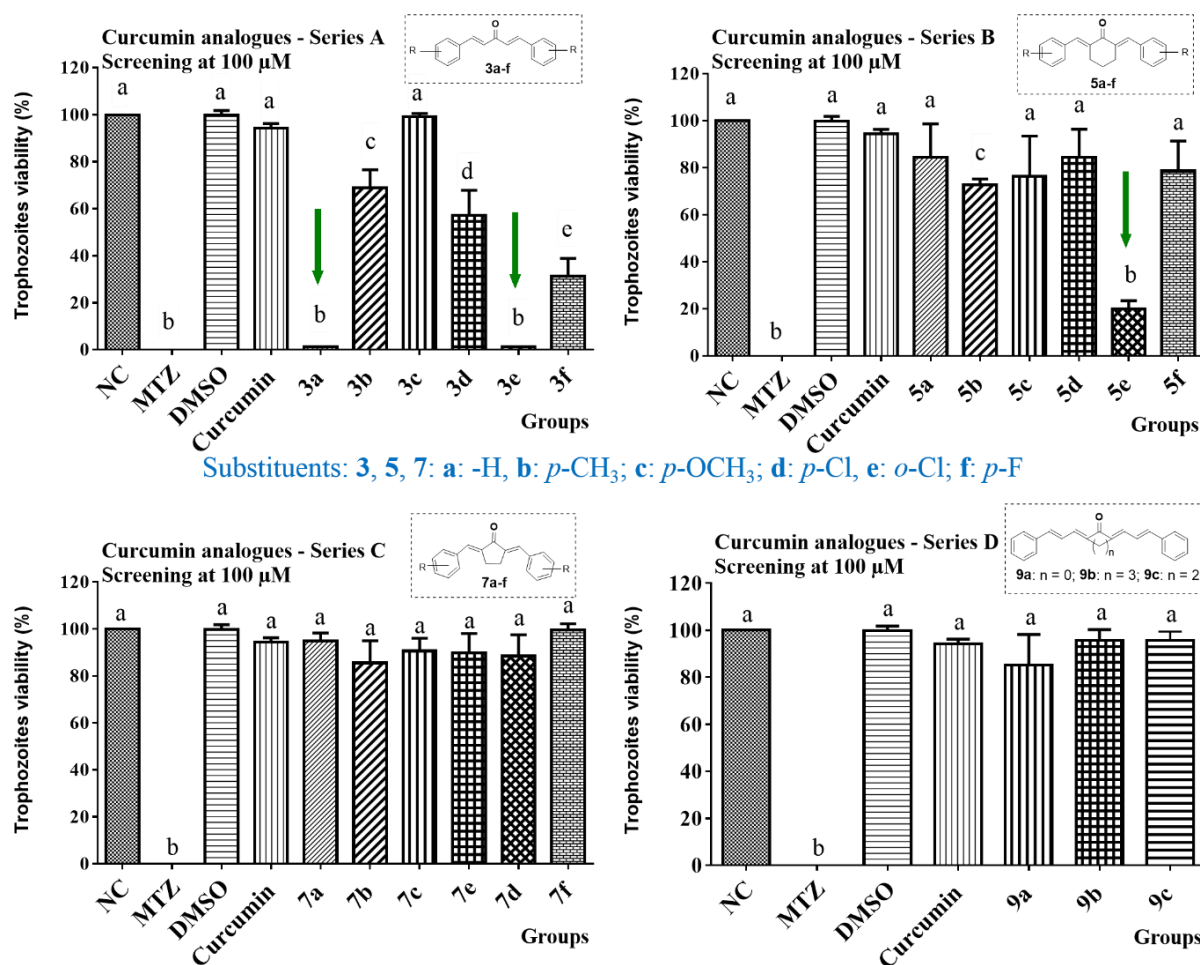


Fig. 1. Trichomonacidal activity of monocarbonyl curcumin analogues at 100 µM against *Trichomonas vaginalis* 30236 isolate confirmed by trypan blue dye exclusion assay (0.4%) after 24 h of exposure. Vehicle for solubilization at 0.6% (DMSO), metronidazole at 100 µM (MTZ), untreated trophozoites (NC). Data is represented as mean ± standard deviation of at least three independent experiments in triplicate. Different letters indicate significant statistical difference considering $p < 0.05$.

Considering the absence of significant statistical difference of curcumin analogues **3a**, **3e** and **5e** in the anti-*T. vaginalis* activity assay, the consecutive experimental procedures were performed using these compounds. The assay to determinate the MIC and IC₅₀ value against *T. vaginalis* established that compounds **3a**, **3e** and **5e** showed optimal anti-*T. vaginalis* activity at a concentration of 80 µM, 90 µM and 200 µM, respectively. Both analogues **3a** and **3e** presented an IC₅₀ value of 50 µM while **5e** presented an IC₅₀ value of 70 µM (Fig. 2, 3 and 4).

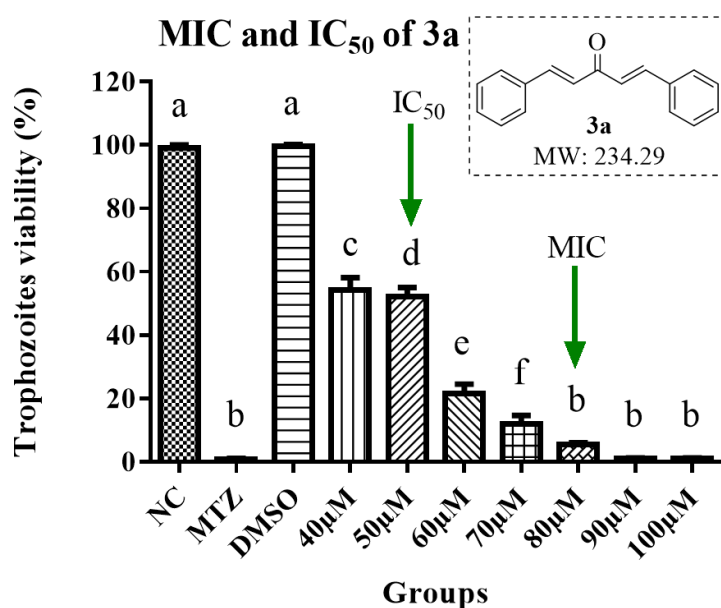


Fig. 2. Determination of MIC and IC₅₀ of curcumin analogue **3a** at 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µM for treatment of *Trichomonas vaginalis* 30236 isolate in a 24 h exposure period. Vehicle for solubilization at 0.6% (DMSO), metronidazole at 100 µM (MTZ), untreated trophozoites (NC). Data is represented as mean ± standard deviation of at least three independent experiments in triplicate. Different letters indicate significant statistical difference considering $p < 0.05$.

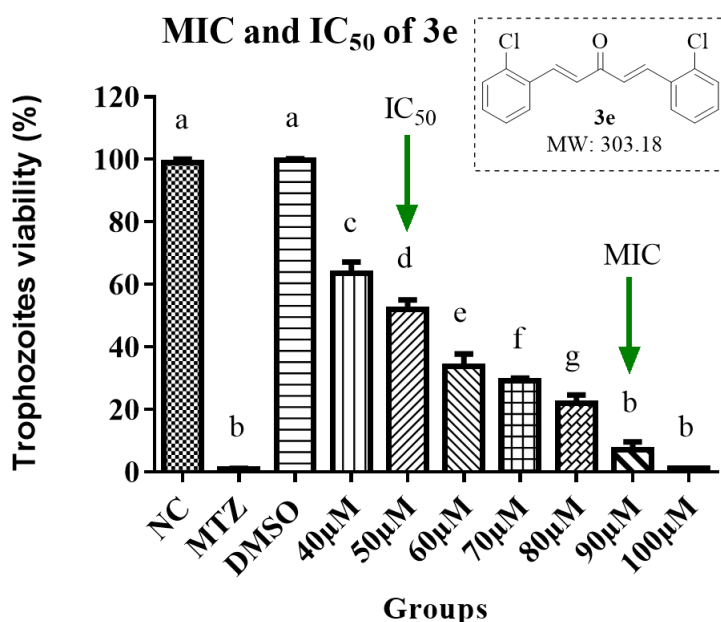


Fig. 3. Determination of MIC and IC₅₀ of curcumin analogue **3e** at 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µM for treatment of *Trichomonas vaginalis* 30236 isolate in a 24 h exposure period. Vehicle for solubilization at 0.6% (DMSO), metronidazole at 100 µM (MTZ), untreated trophozoites (NC). Data is represented as mean ± standard deviation of at least three independent experiments in triplicate. Different letters indicate significant statistical difference considering $p < 0.05$.

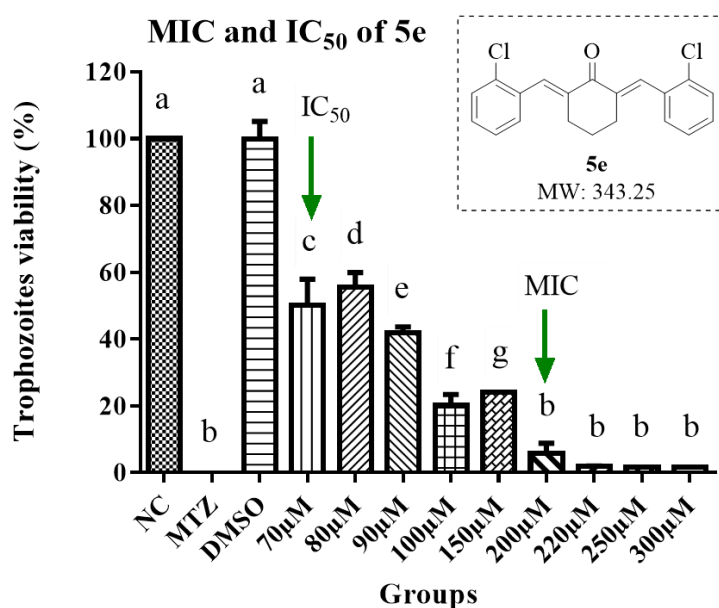


Fig. 4. Determination of MIC and IC₅₀ of curcumin analogue **5e** at 70, 80, 90, 100, 150, 200, 220, 250 and 300 µM for treatment of *Trichomonas vaginalis* 30236 isolate in a 24 h exposure period. Vehicle for solubilization at 0.6% (DMSO), metronidazole at 100 µM (MTZ), untreated trophozoites (NC). Data is represented as mean ± standard deviation of at least three independent experiments in triplicate. Different letters indicate significant statistical difference considering $p < 0.05$.

From the time-kill assay it could be determined that analogues **3a** and **3e** prevented proliferation at the first 12 h of incubation, displaying a trophozoite's viability reduction of 95% and 99%, respectively. Curcumin analogue **5e** reduced trophozoite's viability in 70% after 12 hours and reached 100% of reduction 12 hours later (**Fig. 5**).

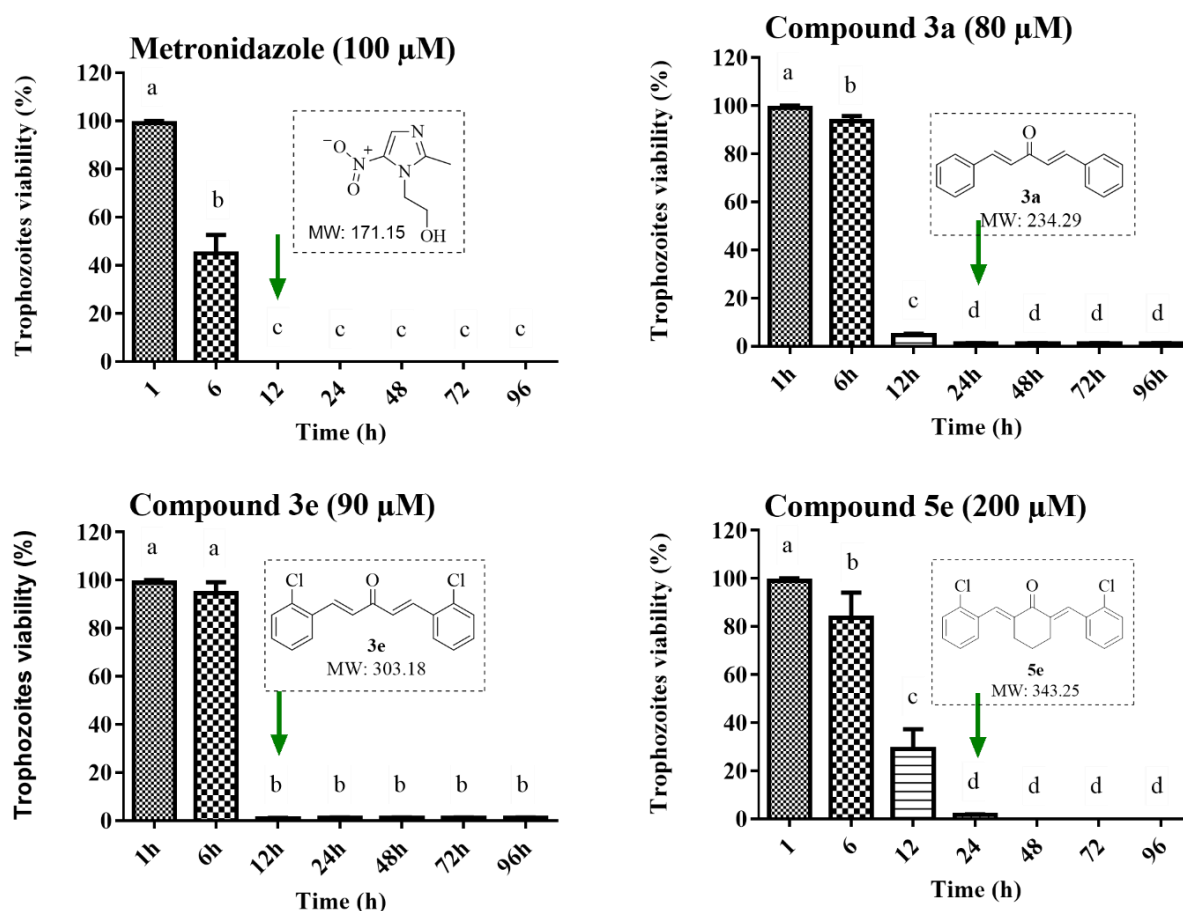


Fig. 5. Time-kill assay of *Trichomonas vaginalis* 30236 isolate after treatment with curcumin analogues **3a** at 80 μ M (MIC), **3e** at 90 μ M, **5e** at 200 μ M and metronidazole at 100 μ M during 1, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h. Data is represented as mean $\pm$ standard deviation of at least three independent experiments in triplicate. Different letters indicate significant statistical difference considering $p < 0.05$.

Taking all synthesized molecules into consideration, it could be seen that monocarbonyl analogues derived from propanone (Series A) were the most prominent because all of them exhibited/induced some percentage of inhibition of the trophozoites at 100 μ M (**Fig. 1**). The influence of ring substituent in Series A could be ranked in the sequence (from most to least active): -H (no substituent) (**3a**) $\approx$ -2-Cl (**3e**) > -4-F (**3f**) > -4-Cl (**3d**) > -4-CH₃ (**3b**) > -4-OCH₃ (**3c**). From Series B (cyclohexanone derivatives), analogues **5e** (-2-Cl) and **5b** (-4-CH₃) inhibited trophozoites growth. Analogues from Series C (cyclopentanone) and Series D (derived from cinnamaldehyde) did not show statistical difference from negative control, that is, they did not reduce trophozoites viability.

From these results, it could be inferred that every aspect of the curcumin analogues structures influences in its antiparasitic potential. First, it is worth citing the length of the hydrocarbon linker between aromatic rings, in which analogue **3a** (5-carbon linker) was the most potent inhibitor of the assessed molecules, while analogue **9a** (9-carbon linker) similarly lacking substituents in the aromatic rings did not inhibit trophozoites growth.

Aguilera et al. reported similar results, in which these both analogues (**3a** and **9a**) were tested against the parasite *Trypanosoma cruzi* and the lower the length of the hydrocarbon linker, the higher the antiparasitic activity [39].

Nevertheless, the α - β -unsaturated system plays an important role for the biological activity of curcumin and its analogues, in which other authors have reported that curcuminoids carrying a conjugated ketone motif (enone) particularly contribute for a higher antiparasitic activity (against protozoa of the *Trypanosoma* and *Leishmania* species) [49,50]. The type and position of the aryl substituents indicated that the presence of electron-withdrawing groups such as halogens may enhance antiparasitic activity (**3e**, **5e**), probably at the *ortho* position of the rings (**3e** with chlorine at the *ortho* position presented higher inhibition than **3d** with chlorine at the *para* position). Another point worth mentioning is the central structure of the carbonyl group derived from the ketone reagent: comparing analogues **3e**, **5e**, and **7e**, all containing chlorine as substituent, it could be seen that analogue **3e** with a central open-chain presented the highest anti-*T. vaginalis* activity, followed by analogue **5e** with cyclohexanone and **7e** with cyclopentanone (no significant activity). The presence of the cycle can relatively increase molecular stiffness and lipophilicity (higher values of Clog P), and so reduce its ability to reduce parasite growth. These results are in agreement with the recent reports from Aguilera et al. and Álvarez et al. who tested some of the same molecules (**3a**, **5a**, **7a**, **9a**, **9b**, **9c**) reported here and some with higher ring sizes (e.g. cycloheptanone). It was observed that these molecules not only were more difficult to synthesize but also were less biologically active [51]. On the other hand, similar analogues containing heterocycles derived from furylaldehyde (O) or thienylaldehyde (S) presented high percentages of parasite inhibition [39,52]. Finally, it can be seen from **Fig. 1** that natural curcumin (acquired commercially) did not significantly inhibit *T. vaginalis* growth at the concentration tested (100 μ M). As mentioned before, natural curcumin is reported to present a wide range of biological activities, including antiparasitic activity [18–20,29], despite its low water solubility and stability, as it can be degraded when exposed to light and mild room temperature for long periods of time. Wachter et al. reported the antiparasitic activity of natural curcumin against three strains of strains of *T. vaginalis* with different metronidazole susceptibilities (ATCC 30001, ATCC 30236 and ATCC 50138), in which the effective concentrations (EC₅₀) ranged from 73.0 to 105.8 μ g/mL ($\approx$ 198 μ M – 287 μ M considering the molecular weight of curcumin 368.38 g/mol) [22]. The results are thus in agreement because in our assessment the maximum tested concentration was 100 μ M in order to compare it to metronidazole. Regardless of the high concentrations of natural curcumin required to be effective, it was not affected by metronidazole-resistant strains, and it is currently being tested in some clinical trials in high doses with good tolerance and no toxicity related observations [16,53].

Our research group has been successfully designing synthetic molecules based on naturally occurring bioactive molecules [54–58] which demonstrates that the search for optimized molecules through structural changes is an important approach. Future perspectives include evaluation of the most prominent curcumin analogues (**3a**, **3e**, **5e**) cytotoxicity against mammalian cells to determine their selectivity index against *T. vaginalis*.

In a study conducted by Aguilera et al., analogue **3a** exhibited an IC₅₀ of 22 ± 5 μ M against J774.1 mouse macrophages, and a selectivity index of 3 (selectivity index = IC₅₀ against mammalian cells/IC₅₀ against *T. cruzi*) [39].

Additionally, it would be interesting to determine a possible mechanism of action of the anti-*T. vaginalis* activity of these curcumin analogues. *In silico* studies have demonstrated that natural curcumin along with other phytochemicals show low-energy docked poses with *T. vaginalis* protein purine nucleoside phosphorylase (TvPNP) over the human homologous isozymes [59,60]. Alkhaldi et al. established that monocarbonyl analogues of curcumin act differently from their parent compound and from metronidazole by forming an adduct with trypanothione and depleting thiol levels in trypanosomes from *Trypanosoma brucei* [50]. The alternative modes of action from these molecules suggests a promising anti-*T. vaginalis* activity, even against metronidazole-resistant strains.

4. Conclusions

From the aforementioned results, it could be concluded that a range of monocarbonyl curcumin analogues was obtained by reproductive protocols, in moderate to good yields, with high purity and better structural stability. From the twenty-one synthetic analogues, two derivatives of propanone (**3a**, **3e**) and one from cyclohexanone (**5e**) presented anti-*T. vaginalis* activity comparable to the standard drug metronidazole and in lower effective concentrations than natural parent compound curcumin. Therefore, these analogues should be further explored as possible alternatives to the treatment of trichomoniasis and other parasitic infections.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgement

The authors are grateful to the Federal University of Pelotas and its post-graduate programs in Biochemistry and Bioprospection and in Biotechnology for the opportunity to develop studies and scientific research. Also, we thank CAPES, FAPERGS (17/2551-0000) and CNPq (310415/2015-2) for financial support, and all laboratories involved in the synthesis, identification and biological evaluation of the molecules.

5. References

- [1] L. Newman, J. Rowley, S. Vander Hoorn, N.S. Wijesooriya, M. Unemo, N. Low, G. Stevens, S. Gottlieb, J. Kiarie, M. Temmerman, Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting, PLoS One. 10 (2015) 1–17. doi:10.1371/journal.pone.0143304.

- [2] World Health Organization, Report on global sexually transmitted infection surveillance 2015, 2015. doi:ISBN 978 92 4 150740 0.
- [3] V. Mundodi, A.S. Kucknoor, D.J. Klumpp, T.H. Chang, J.F. Alderete, Silencing the ap65 gene reduces adherence to vaginal epithelial cells by *Trichomonas vaginalis*, Mol. Microbiol. 53 (2004) 1099–1108. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04192.x.
- [4] P. de B. Vieira, R.B. Giordani, A.J. Macedo, T. Tasca, Natural and synthetic compound anti-*Trichomonas vaginalis*: an update review, Parasitol. Res. 114 (2015) 1249–1261. doi:10.1007/s00436-015-4340-3.
- [5] A. Shahesmaeili, M. Karamouzian, M. Shokoohi, K. Kamali, N. Fahimfar, S.A. Nadji, H. Sharifi, A.A. Haghdooost, A. Mirzazadeh, Symptom-Based Versus Laboratory-Based Diagnosis of Five Sexually Transmitted Infections in Female Sex Workers in Iran, AIDS Behav. (2018) 1–7. doi:10.1007/s10461-018-2130-5.
- [6] G. Schmid, E. Narcisi, D. Mosure, W.E. Secor, J. Higgins, H. Moreno, Prevalence of Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis* in a Gynecology Clinic, Obstet. Gynecol. Surv. 56 (2001) 693–694.
- [7] S.L. Cudmore, K.L. Delgaty, F. Shannon, D.P. Petrin, G.E. Garber, S.F. Hayward-McClelland, Treatment of Infections Caused by Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis*, Clin. Microbiol. Rev. 17 (2004) 783–793. doi:10.1128/CMR.17.4.783.
- [8] M.D. Pearlman, C. Yashar, S. Ernst, W. Solomon, An incremental dosing protocol for women with severe vaginal trichomoniasis and adverse reactions to metronidazole, Am. J. Obstet. Gynecol. 174 (1996) 934–936. doi:10.1016/S0002-9378(96)70329-0.
- [9] Â. Sena-Lopes, R.N. das Neves, F.S.B. Bezerra, M.T. de Oliveira Silva, P.C. Nobre, G. Perin, D. Alves, L. Savegnago, K.R. Begnini, F.K. Seixas, T. Collares, S. Borsuk, Antiparasitic activity of 1,3-dioxolanes containing tellurium in *Trichomonas vaginalis*, Biomed. Pharmacother. 89 (2017) 284–287. doi:10.1016/j.biopha.2017.01.173.
- [10] P. Nyirjesy, J.D. Sobel, M. V Weitz, D.J. Leaman, S.P. Gelone, Difficult-to-treat trichomoniasis: results with paromomycin cream., Clin. Infect. Dis. 26 (1998) 986–8. doi:10.1086/513951.
- [11] S.A. Dingsdag, N. Hunter, Metronidazole: an update on metabolism, structure–cytotoxicity and resistance mechanisms, J. Antimicrob. Chemother. 73 (2018) 265–279. doi:10.1093/jac/dkx351.
- [12] R.D. Kirkcaldy, P. Augostini, L.E. Asbel, K.T. Bernstein, R.P. Kerani, C.J. Mettenbrink, P. Pathela, J.R. Schwebke, W. Evan Secor, K.A. Workowski, D. Davis, J. Braxton, H.S. Weinstock, *Trichomonas vaginalis* antimicrobial drug resistance in 6 US cities, STD surveillance network, 2009–2010, Emerg. Infect. Dis. 18 (2012) 939–943. doi:10.3201/eid1806.111590.

- [13] D.P.G. Hübner, P. de Brum Vieira, A.P. Frasson, C.B. Menezes, F.R. Senger, G.N. Santos da Silva, S.C. Baggio Gnoatto, T. Tasca, Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of betulinic acid derivatives, *Biomed. Pharmacother.* 84 (2016) 476–484. doi:10.1016/j.biopha.2016.09.064.
- [14] M. Mehriardestani, A. Aliahmadi, T. Toliat, R. Rahimi, Medicinal plants and their isolated compounds showing anti-*Trichomonas vaginalis*- activity, *Biomed. Pharmacother.* 88 (2017) 885–893. doi:10.1016/j.biopha.2017.01.149.
- [15] G.V. Rigo, M.R. Trein, D. da Silva Trentin, A.J. Macedo, B.A. de Oliveira, A.M. de Almeida, R.B. Giordani, M.V. de Almeida, T. Tasca, Diamine derivative anti-*Trichomonas vaginalis* and anti-*Tritrichomonas foetus* activities by effect on polyamine metabolism, *Biomed. Pharmacother.* 95 (2017) 847–855. doi:10.1016/j.biopha.2017.09.007.
- [16] H. Zhou, C.S. Beevers, S. Huang, The targets of curcumin, *Curr. Drug Targets.* 12 (2011) 332–47. doi:https://doi.org/10.2174/138945011794815356.
- [17] S. Prakobwong, S.C. Gupta, J.H. Kim, B. Sung, P. Pinlaor, Y. Hiraku, B. Sripa, S. Pinlaor, B.B. Aggarwal, Curcumin suppresses proliferation and induces apoptosis in human biliary cancer cells through modulation of multiple cell signaling pathways, 32 (2011) 1372–1380. doi:10.1093/carcin/bgr032.
- [18] S.Z. Moghadamtousi, H.A. Kadir, P. Hassandarvish, H. Tajik, S. Abubakar, K. Zandi, A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin, *Biomed Res. Int.* 2014 (2014) 1–12. doi:10.1155/2014/186864.
- [19] Y.M. Liu, Q.Z. Zhang, D.H. Xu, Y.W. Fu, D.J. Lin, S.Y. Zhou, Antiparasitic efficacy of commercial curcumin against *Ichthyophthirius multifiliis* in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*), *Aquaculture.* 480 (2017) 65–70. doi:10.1016/j.aquaculture.2017.07.041.
- [20] E.R. Morais, K.C. Oliveira, L.G. Magalhães, É.B.C. Moreira, S. Verjovski-Almeida, V. Rodrigues, Effects of curcumin on the parasite *Schistosoma mansoni*: A transcriptomic approach, *Mol. Biochem. Parasitol.* 187 (2013) 91–97. doi:10.1016/j.molbiopara.2012.11.006.
- [21] T. Arablou, R. Kolahdouz-Mohammadi, Curcumin and endometriosis: Review on potential roles and molecular mechanisms, *Biomed. Pharmacother.* 97 (2018) 91–97. doi:10.1016/j.biopha.2017.10.119.
- [22] B. Wachter, M. Syrowatka, A. Obwaller, J. Walochnik, In vitro efficacy of curcumin on *Trichomonas vaginalis*, *Wien. Klin. Wochenschr.* 126 (2014) 32–36. doi:10.1007/s00508-014-0522-8.
- [23] D. Shetty, Y.J. Kim, H. Shim, J.P. Snyder, Eliminating the heart from the curcumin

- molecule: Monocarbonyl curcumin mimics (MACs), *Molecules*. 20 (2015) 249–292. doi:10.3390/molecules20010249.
- [24] K.M. Nelson, J.L. Dahlin, J. Bisson, J. Graham, G.F. Pauli, M.A. Walters, The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin, *J. Med. Chem.* (2017) acs.jmedchem.6b00975. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00975.
- [25] K.H. Lee, F.H. Farida, A. Syahida, F. Abas, K. Shaari, D.A. Israf, N.H. Lajis, Synthesis and biological evaluation of curcumin-like diarylpentanoid analogues for anti-inflammatory, antioxidant and anti-tyrosinase activities, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 3195–3200. doi:10.1016/j.ejmech.2009.03.020.
- [26] S. Sudha, N. Sundaraganesan, K. Vanchinathan, K. Muthu, S. Meenakshisundaram, Spectroscopic (FTIR, FT-Raman, NMR and UV) and molecular structure investigations of 1,5-diphenylpenta-1,4-dien-3-one: A combined experimental and theoretical study, *J. Mol. Struct.* 1030 (2012) 191–203. doi:10.1016/j.molstruc.2012.04.030.
- [27] K. Vanchinathan, G. Bhagavannarayana, K. Muthu, S.P. Meenakshisundaram, Synthesis, crystal growth and characterization of 1,5-diphenylpenta-1,4- dien-3-one: An organic crystal, *Phys. B Condens. Matter.* 406 (2011) 4195–4199. doi:10.1016/j.physb.2011.07.055.
- [28] G. Liang, L. Shao, Y. Wang, C. Zhao, Y. Chu, J. Xiao, Y. Zhao, X. Li, S. Yang, Exploration and synthesis of curcumin analogues with improved structural stability both *in vitro* and *in vivo* as cytotoxic agents, *Bioorganic Med. Chem.* 17 (2009) 2623–2631. doi:10.1016/j.bmc.2008.10.044.
- [29] P. Anand, S.G. Thomas, A.B. Kunnumakkara, C. Sundaram, K.B. Harikumar, B. Sung, S.T. Tharakan, K. Misra, I.K. Priyadarsini, K.N. Rajasekharan, B.B. Aggarwal, Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature, *Biochem. Pharmacol.* 76 (2008) 1590–1611. doi:10.1016/j.bcp.2008.08.008.
- [30] A. Amalraj, A. Pius, S. Gopi, S. Gopi, Biological activities of curcuminoids, other biomolecules from turmeric and their derivatives – A review, *J. Tradit. Complement. Med.* 7 (2017) 205–233. doi:10.1016/j.jtcme.2016.05.005.
- [31] P.C. Leow, P. Bahety, C.P. Boon, C.Y. Lee, K.L. Tan, T. Yang, P.L.R. Ee, Functionalized curcumin analogs as potent modulators of the Wnt-catenin signaling pathway, *Eur. J. Med. Chem.* 71 (2014) 67–80. doi:10.1016/j.ejmech.2013.10.073.
- [32] W.M. Weber, L.A. Hunsaker, S.F. Abcouwer, L.M. Deck, D.L. Vander Jagt, Anti-oxidant activities of curcumin and related enones, *Bioorganic Med. Chem.* 13 (2005) 3811–3820. doi:10.1016/j.bmc.2005.03.035.

- [33] W.M. Weber, L.A. Hunsaker, C.N. Roybal, E. V. Bobrovnikova-Marjon, S.F. Abcouwer, R.E. Royer, L.M. Deck, D.L. Vander Jagt, Activation of NFkB is inhibited by curcumin and related enones, *Bioorganic Med. Chem.* 14 (2006) 2450–2461. doi:10.1016/j.bmc.2005.11.035.
- [34] M.A. Bigdeli, G.H. Mahdavinia, S. Jafari, H. Hazarkhani, Wet 2,4,6-trichloro[1,3,5]triazine (TCT) an efficient catalyst for synthesis of α , α' -bis(substituted-benzylidene) cycloalkanones under solvent-free conditions, *Catal. Commun.* 8 (2007) 2229–2231. doi:10.1016/j.catcom.2007.05.010.
- [35] Y.W. Zhu, W. Bin Yi, C. Cai, A recyclable fluoroalkylated 1,4-disubstituted [1,2,3]-triazole organocatalyst for aldol condensation of aldehydes and ketones, *J. Fluor. Chem.* 132 (2011) 71–74. doi:10.1016/j.jfluchem.2010.11.004.
- [36] A. Hasaninejad, A. Zare, L. Balooty, H. Mehregan, M. Shekouhy, Solvent-free, cross-aldol condensation reaction using silica-supported, phosphorus-containing reagents leading to α , α' -Bis(arylidene) cycloalkanones, *Synth. Commun.* 40 (2010) 3488–3495. doi:10.1080/00397910903457282.
- [37] G. Liang, S. Yang, L. Jiang, Y. Zhao, L. Shao, J. Xiao, F. Ye, Y. Li, X. Li, Synthesis and anti-bacterial properties of mono-carbonyl analogues of curcumin., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 56 (2008) 162–167. doi:10.1248/cpb.56.162.
- [38] M. Zheng, L. Wang, J. Shao, Q. Zhong, A facile synthesis of α , α' -bis(substituted benzylidene)cycloalkanones catalyzed by bis(p-ethoxyphenyl)telluroxide(BMPTO) under microwave irradiation, *Synth. Commun.* 27 (1997) 351–354. doi:10.1080/00397919708005039.
- [39] E. Aguilera, J. Varela, E. Birriel, E. Serna, S. Torres, G. Yaluff, N.V. de Bilbao, B. Aguirre-López, N. Cabrera, S. Díaz Mazariegos, M.T. de Gómez-Puyou, A. Gómez-Puyou, R. Pérez-Montfort, L. Minini, A. Merlino, H. Cerecetto, M. González, G. Alvarez, Potent and Selective Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Triosephosphate Isomerase with Concomitant Inhibition of Cruzipain: Inhibition of Parasite Growth through Multitarget Activity, *ChemMedChem.* 11 (2016) 1328–1338. doi:10.1002/cmdc.201500385.
- [40] L.S. Diamond, The Establishment of Various Trichomonads of Animals and Man in Axenic Cultures, *J. Parasitol.* 43 (1957) 488–490. doi:10.2307/3274682.
- [41] G.B. Hill, J.B. Sweeney, Reaction Workup Planning: A Structured Flowchart Approach, Exemplified in Difficult Aqueous Workup of Hydrophilic Products, *J. Chem. Educ.* 92 (2015) 488–496. doi:10.1021/ed500580p.
- [42] D. Angelopoulou, C. Demetzos, D. Perdetzoglou, Diurnal and seasonal variation of the essential oil labdanes and clerodanes from *Cistus monspeliensis* L. leaves, *Biochem. Syst. Ecol.* 30 (2002) 189–203. doi:10.1016/S0305-1978(01)00074-6.

- [43] T. Siatka, M. Kašparová, Seasonal variation in total phenolic and flavonoid contents and DPPH scavenging activity of *Bellis perennis* L. flowers, *Molecules*. 15 (2010) 9450–9461. doi:10.3390/molecules15129450.
- [44] C. Monton, L. Charoenchai, J. Suksaeree, L. Sueree, Quantitation of curcuminoid contents, dissolution profile, and volatile oil content of turmeric capsules produced at some secondary government hospitals, *J. Food Drug Anal.* 24 (2016) 493–499. doi:10.1016/j.jfda.2016.01.007.
- [45] R.C.C. Duarte, M.G.T.C. Ribeiro, A.A.S.C. Machado, Reaction Scale and Green Chemistry: Microscale or Macroscale, Which Is Greener?, *J. Chem. Educ.* 94 (2017) 1255–1264. doi:10.1021/acs.jchemed.7b00056.
- [46] P. Aline, E. Dias, E. Vinícius, V. Varejão, V.B. Martins, A. Lúcia, T. Gois, M.A. De Resende-stoianoff, J.E. De Carvalho, Â. De Fátima, S.A. Fernandes, Antiproliferative and Antifungal Activities of 1, 3-diarylpropane-1, 3-diones Commonly used as Sunscreen Agents, 1789 (2013) 661–665.
- [47] S. Handayani, Synthesis and Activity Test of Two Asymmetric Dibenzalacetone as Potential Sunscreen Material, in: K. Li (Ed.), *Chem. Biol. Environ. Eng. Proc. Int. Conf. CBEE 2009*, 2009: pp. 119–122. doi:https://doi.org/10.1142/9789814295048_0024.
- [48] L.A. Huck, W.J. Leigh, A Better Sunscreen: Structural Effects on Spectral Properties, *J. Chem. Educ.* 87 (2010) 10–13.
- [49] C. Changtam, H.P. de Koning, H. Ibrahim, M.S. Sajid, M.K. Gould, A. Suksamrarn, Curcuminoid analogs with potent activity against *Trypanosoma* and *Leishmania* species, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 941–956. doi:10.1016/j.ejmech.2009.11.035.
- [50] A.A.M. Alkhaldi, D.J. Creek, H. Ibrahim, D.-H. Kim, N.B. Quashie, K.E. Burgess, C. Changtam, M.P. Barrett, A. Suksamrarn, H.P. de Koning, Potent trypanocidal curcumin analogs bearing a monoenone linker motif act on *Trypanosoma brucei* by forming an adduct with trypanothione, *Mol. Pharmacol.* 87 (2015) 451–464. doi:10.1124/mol.114.096016.
- [51] R.J. Cremllyn, M.J. Frearson, S. Graham, The synthesis and chlorosulfonation of some diarylidene and heteroarylidenes with varying alicyclic ring size, *Phosphorus. Sulfur. Silicon Relat. Elem.* 107 (1995) 205–217. doi:10.1080/10426509508027936.
- [52] G. Álvarez, C. Perdomo, C. Coronel, E. Aguilera, J. Varela, G. Aparicio, F.R. Zolessi, N. Cabrera, C. Vega, M. Rolón, A.R. De Arias, R. Pérez-Montfort, H. Cerecetto, M. González, Multi-anti-parasitic activity of arylidene ketones and thiazolidene hydrazines against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp.*, *Molecules*. 22 (2017) 1–26. doi:10.3390/molecules22050709.

- [53] E. Pagano, B. Romano, A.A. Izzo, F. Borrelli, The clinical efficacy of curcumin-containing nutraceuticals: An overview of systematic reviews, *Pharmacol. Res.* 134 (2018) 79–91. doi:10.1016/j.phrs.2018.06.007.
- [54] M. Ritter, R.M. Martins, S.A. Rosa, J.L. Malavolta, R.G. Lund, A.F.C. Flores, C.M.P. Pereira, Green Synthesis of Chalcones and Microbiological Evaluation, *J. Braz. Chem. Soc.* 26 (2015) 1201–1210.
- [55] R.M. Martins, M.D.A. Farias, F. Nedel, C.M.P. de Pereira, C. Lencina, R.G. Lund, Antimicrobial and cytotoxic evaluation of eugenol derivatives, *Med. Chem. Res.* 25 (2016) 2360–2367. doi:10.1007/s00044-016-1682-z.
- [56] T.B. Fogaça, R.M. Martins, K.R. Begnini, C. Carapina, M. Ritter, C.M.P. de Pereira, F.K. Seixas, T. Collares, Apoptotic effect of chalcone derivatives of 2-acetylthiophene in human breast cancer cells, *Pharmacol. Reports.* 69 (2017) 156–161. doi:10.1016/j.pharep.2016.10.003.
- [57] S. Saueressig, J. Tessmann, R. Mastelari, L.P. da Silva, J. Buss, N.V. Segatto, K.R. Begnini, B. Pacheco, C.M.P. de Pereira, T. Collares, F.K. Seixas, Synergistic effect of pyrazoles derivatives and doxorubicin in claudin-low breast cancer subtype, *Biomed. Pharmacother.* 98 (2018) 390–398. doi:10.1016/j.biopha.2017.12.062.
- [58] J.W. Tessmann, J. Buss, K.R. Begnini, L.M. Berneira, F.R. Paula, C.M.P. de Pereira, T. Collares, F.K. Seixas, Antitumor potential of 1-thiocarbamoyl-3,5-diaryl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles in human bladder cancer cells, *Biomed. Pharmacother.* 94 (2017) 37–46. doi:10.1016/j.biopha.2017.07.060.
- [59] M.S. Setzer, K.G. Byler, I.V. Ogungbe, W.N. Setzer, Natural products as new treatment options for trichomoniasis: A molecular docking investigation, *Sci. Pharm.* 85 (2017). doi:10.3390/scipharm85010005.
- [60] V. Zannis, D. Doyle, D.W.J. Martin, Purification and characterization of human erythrocyte purine nucleoside phosphorylase and its subunits, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 504–510.

SUPPLEMENTAL FILES

Antiparasitic activity of synthetic curcumin monocarbonyl analogues against *Trichomonas vaginalis*

Caroline Carapina da Silva^{a, *}, Bruna Silveira Pacheco^a, Raquel Nascimento das Neves^b, Mirna Samara Dié Alves^b, Sidnei Moura^c, Sibeles Borsuk^b, Claudio Martin Pereira de Pereira^a

^a Laboratory of Lipidomics and Bioorganic, Bioforensics Research Group, Federal University of Pelotas, RS, zip code 96010-900, Brazil

^b Laboratory of Infecto-parasitic Biotechnology, Federal University of Pelotas, RS, zip code 96010-900, Brazil

^c Laboratory of Biotechnology of Natural and Synthetic Products, Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, RS, zip code 95020260, Brazil

* Corresponding author. E-mail address: carapina7@hotmail.com; lahbbiufpel@gmail.com (C. Carapina da Silva)

Chemistry: synthesis of monocarbonyl analogues of curcumin: all reagents and solvents employed in the synthesis were of analytical grade and were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) using hexane/ethyl acetate 7:3, viewed under ultraviolet light. The curcumin analogues were synthesized based on a previously described procedure [25]. A series of 21 molecules was obtained, which were subdivided into three series according to the ketone used for condensation with different substituted aldehydes: propanone (series A), cyclohexanone (series B) or cyclopentanone (series C) and a fourth series was obtained by condensing cinnamaldehyde with the ketones mentioned (Series D) (Scheme 2). Briefly, to a mixture of the respective aldehyde (20 mmol) and ketone (10 mmol; ratio of 2:1), in cold ethanol (15 mL), an aqueous solution of sodium hydroxide (40%; 10 mL) was added and kept under magnetic stirring until reaction was completed (monitored by TLC; around 2 h for most of the products). Then, the catalyst was neutralized with a diluted hydrochloric acid solution, vacuum-filtered, and dried at ambient temperature. The solid was purified by recrystallization with hexane/ethyl acetate, ethanol, or ethanol/acetonitrile (for series C).

2.1.2. Chemical Identification: Synthetic curcumin analogues were identified and checked for agreement with the literature by their melting points (MP), infrared spectra (IR), mass spectra (MS), and nuclear magnetic resonance (NMR). Structural information such as molecular weight and CLog P were calculated in ChemDraw software version 8.0. Melting points were recorded with a Fisatom 430 apparatus and mercury thermometer. Chromatographic analysis was performed with a Shimadzu GC-MS-QP 2010 SE Standard Gas Chromatograph-Mass Spectrometer equipped with an AOC-20 automatic injector and a RTx-5MS column with the dimensions of 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm, using helium as carrier gas. Mass spectra were acquired using a hybrid high-resolution and high accuracy (5 µL L⁻¹) microTof (Q-TOF) mass spectrometer (Bruker® Scientific) by atmospheric pressure chemical ionization (MS APCI) and tandem APCI(+)-MS/MS.

Data were collected in the m/z range of 70 – 1000 at the speed of two scans per second. Infrared spectra was recorded directly from the crystal on a Shimadzu Infrared Spectrophotometer with Fourier Transformer (FTIR-Prestige 21) using attenuated total reflectance (ATR) at a 4.0 cm^{-1} resolution of 12 scans, and reported in wave numbers (ν). NMR spectra of ^1H and ^{13}C were recorded on a Bruker DPX 300 (^1H at 300.13 MHz and ^{13}C at 75.48 MHz) in 5 mm sample tubes at 298 K (digital resolution ± 0.01 ppm). Molecules were solubilized in deuterated chloroform (CDCl_3), and chemical shifts were recorded in ppm. Spectral data of curcumin analogues is given below.

(1*E*,4*E*)-1,5-diphenylpenta-1,4-dien-3-one (**3a**)

$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}$. EM: 234.10; MW: 234.29; Yield: 60%; yellow solid; mp ($^{\circ}\text{C}$): 113 – 115 (Lit.: 113/110 – 112 [31,32]); CLog P^a : 4.278; IR $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$: 3052, 3025 (C-H), 1654 (C=O), 1626, 1589 (C=C), 1571 (C=C); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.73 (d, 2H, $J = 15.9$ Hz, 2x =C-H); 7.58 – 7.61 (m, 10H, 2x Ph); 7.07 (d, 2H, $J = 15.9$ Hz, 2x =C-H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 189.01; 143.4; 134.8; 130.6; 129.0; 128.5; 125.4.; MS (APCI) m/z : 235.11 ($\text{M}+1$) $^{+1}$.

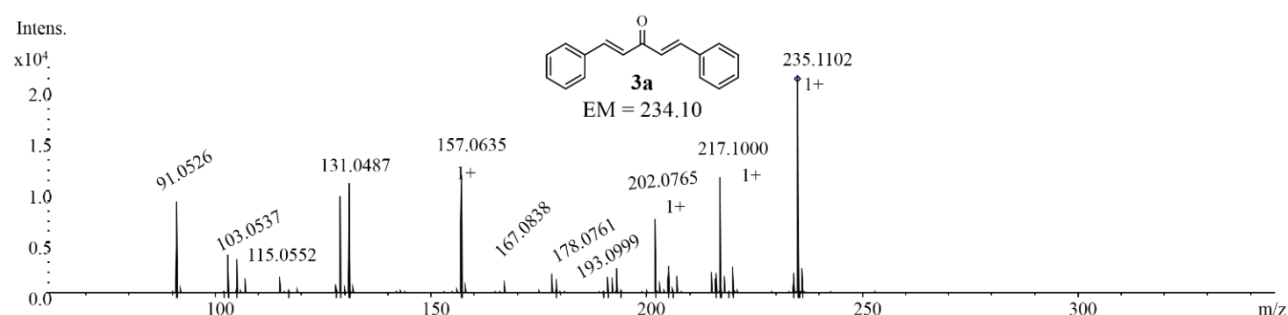


Fig. S1. Mass spectrum of analogue **3a**.

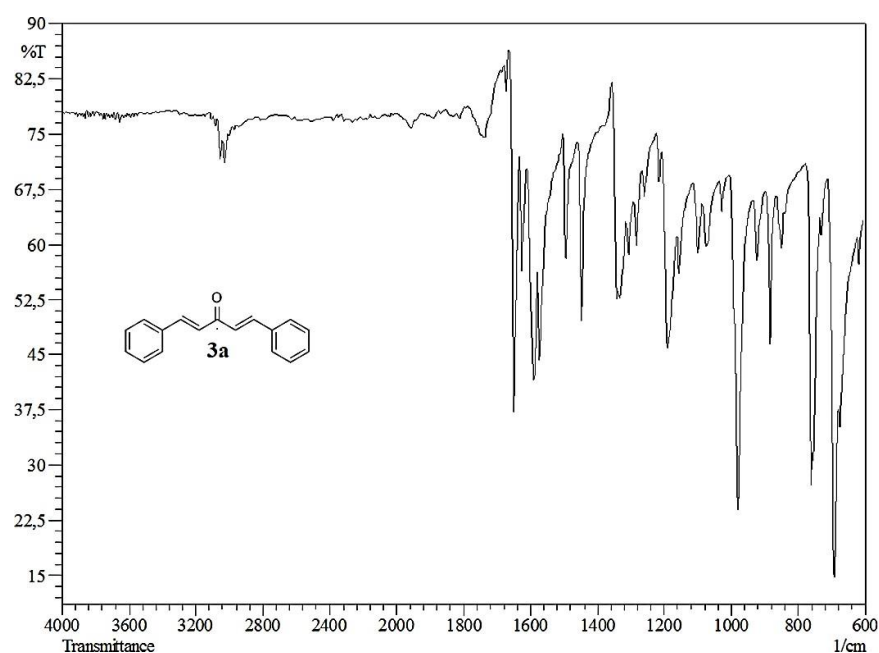


Fig. S2. Infrared spectrum of analogue **3a**.

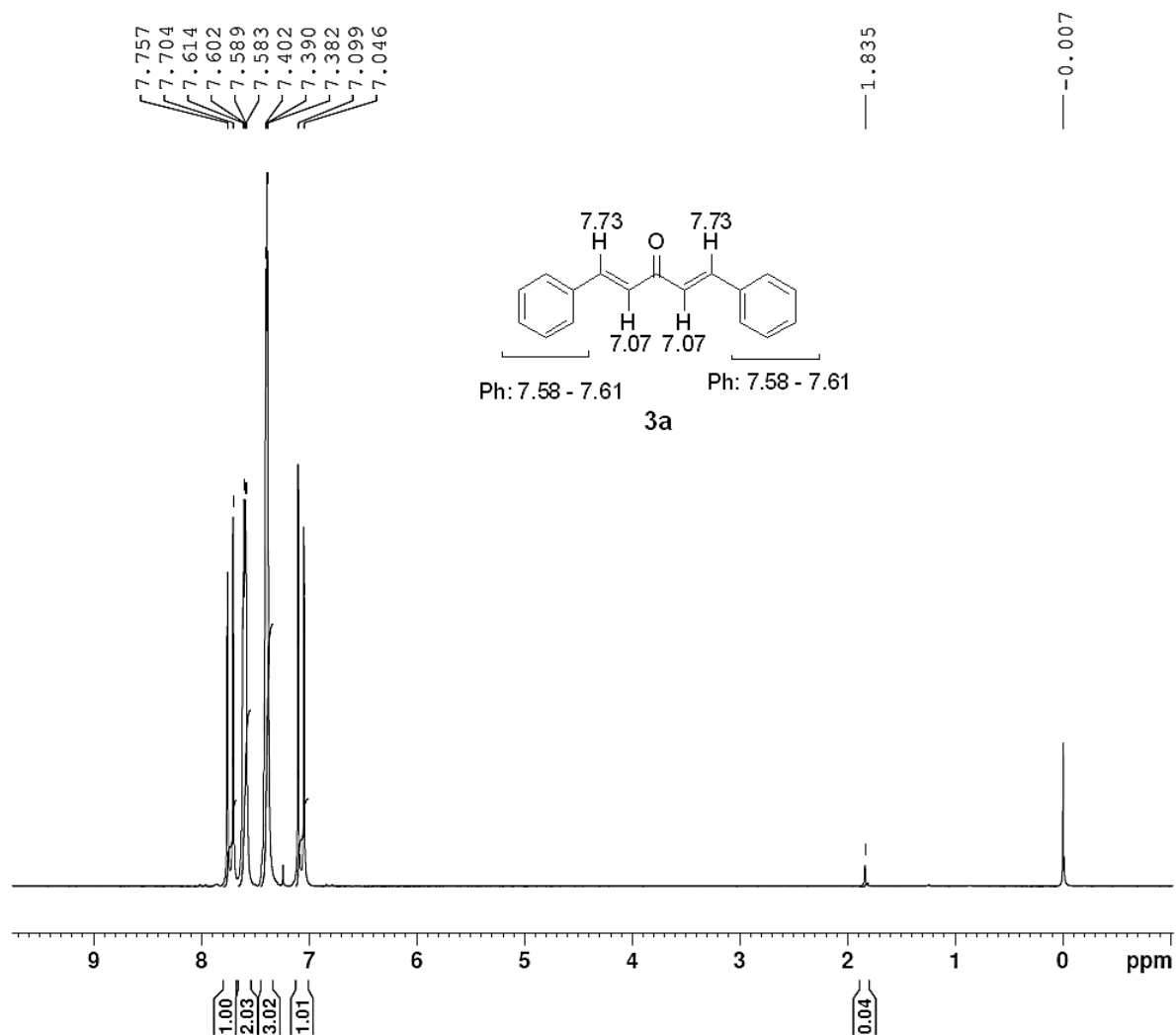


Fig. S3. ^1H NMR spectrum of analogue **3a**.

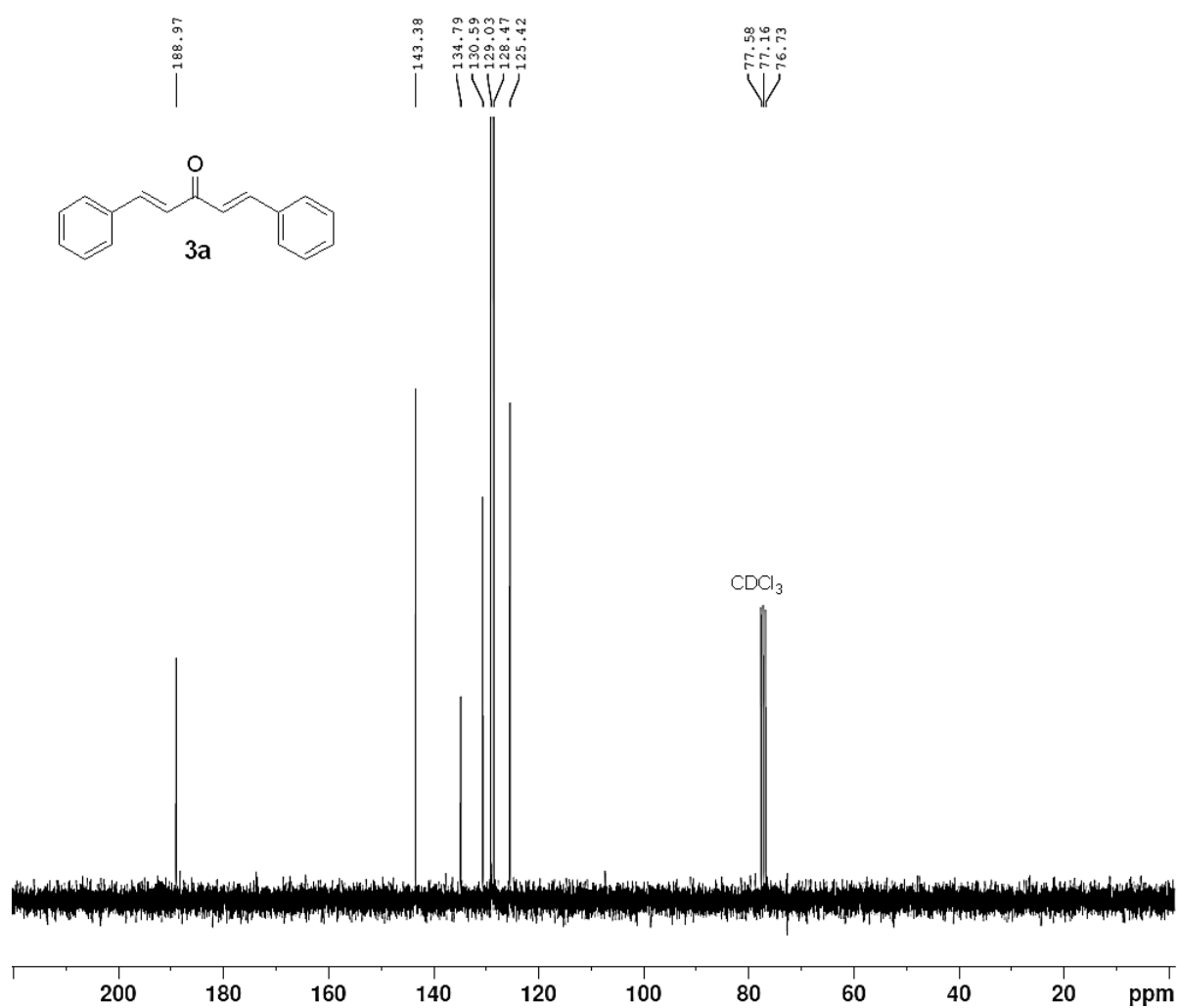
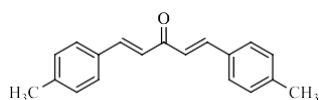


Fig. S4. ^{13}C NMR spectrum of analogue **3a**.

(1*E*,4*E*)-1,5-di-*p*-tolylpenta-1,4-dien-3-one (**3b**)

$C_{19}H_{18}O$. EM: 262.14; MW: 262.35; Yield: 56%; yellow needle crystals; mp ($^{\circ}C$): 175-177 (Lit.: 174 – 176 [32]); CLog P^a : 5.276; IR ν_{max} / cm^{-1} 3026, 2917 (C-H), 1646 (C=O), 1617, 1582, 1565 (C=C), 1183 (C-C). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): same pattern as **3c**; MS (APCI) m/z : 263.14 ($M+1$) $^{+1}$.

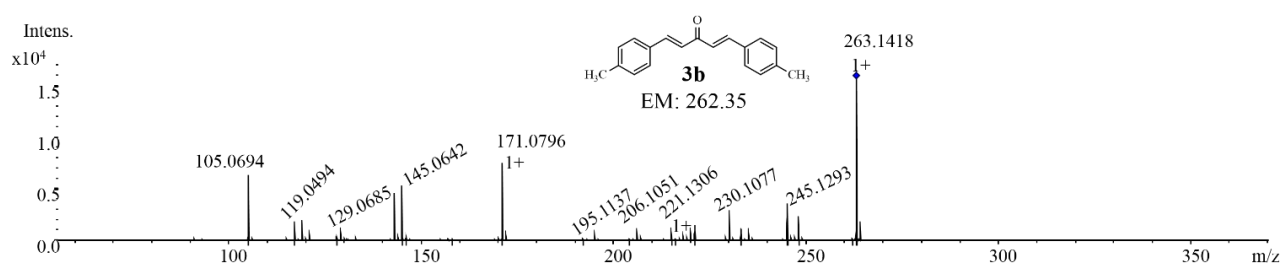


Fig. S5. Mass spectrum of analogue **3b**.

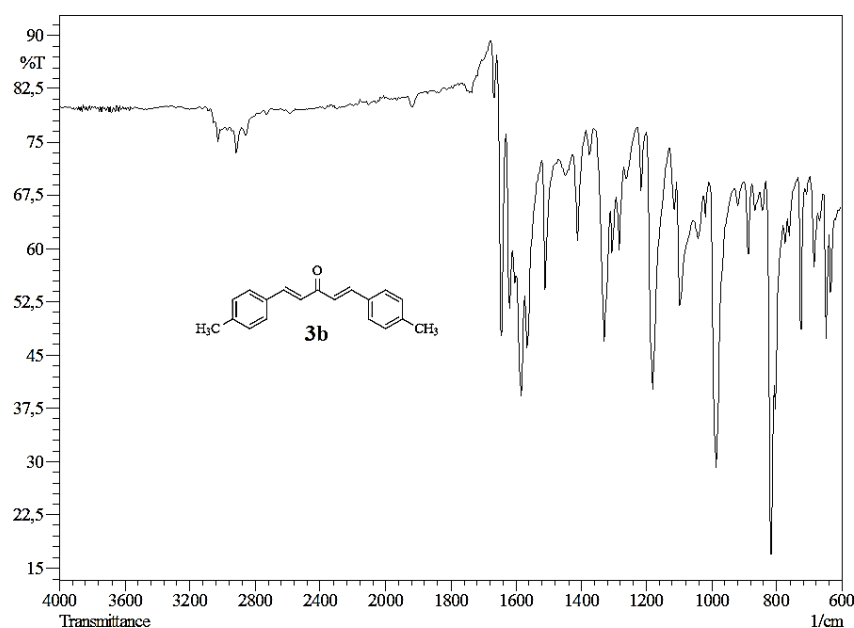
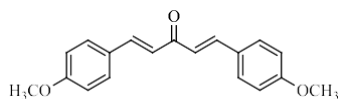


Fig. S6. Infrared spectrum of analogue **3b**.

(1*E*,4*E*)-1,5-bis(4-methoxyphenyl)penta-1,4-dien-3-one (**3c**)

$C_{19}H_{18}O_3$. EM: 294.13; MW: 294.34; Yield: 63%; pale yellow crystals; mp ($^{\circ}C$): 129 – 132 (Lit.: 128 - 130 [32]); CLog P^a : 4.116; IR ν_{max} / cm^{-1} 3048, 2920, 2906 (C-H), 1687 (C=O), 1626, 1591, 1584 (C=C), 1228 (C-O), 1180, 988 (C-C); 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.69 (d, 2H, J = 15.6 Hz, 2x =CH); 7.55 (d, 4H, J = 8.7 Hz, 2x Ar); 6.94 (d, 2H, J = 15.9 Hz, 2x =C-H); 6.91 (d, 4H, J = 8.7 Hz, 2x Ar); 3.83 (s, 6H, 2x OCH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 188.9; 161.15; 142.7; 130.2; 127.6; 123.5; 114.4; 55.4. MS (APCI) m/z : 295.13 ($M+1$) $^{+1}$.

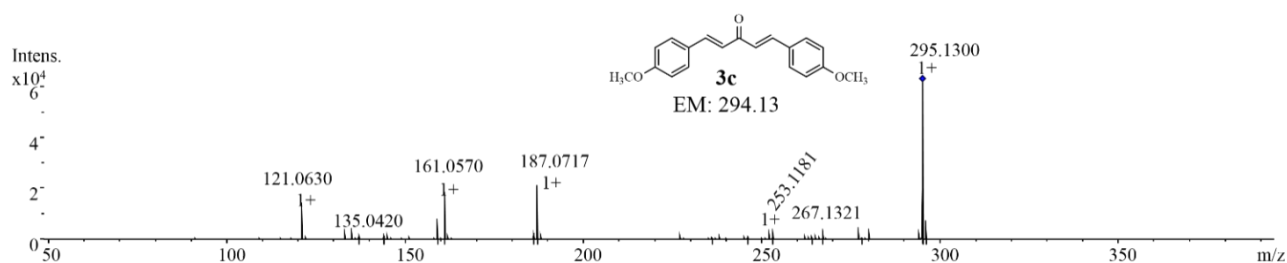


Fig. S7. Mass spectrum of analogue **3c**.

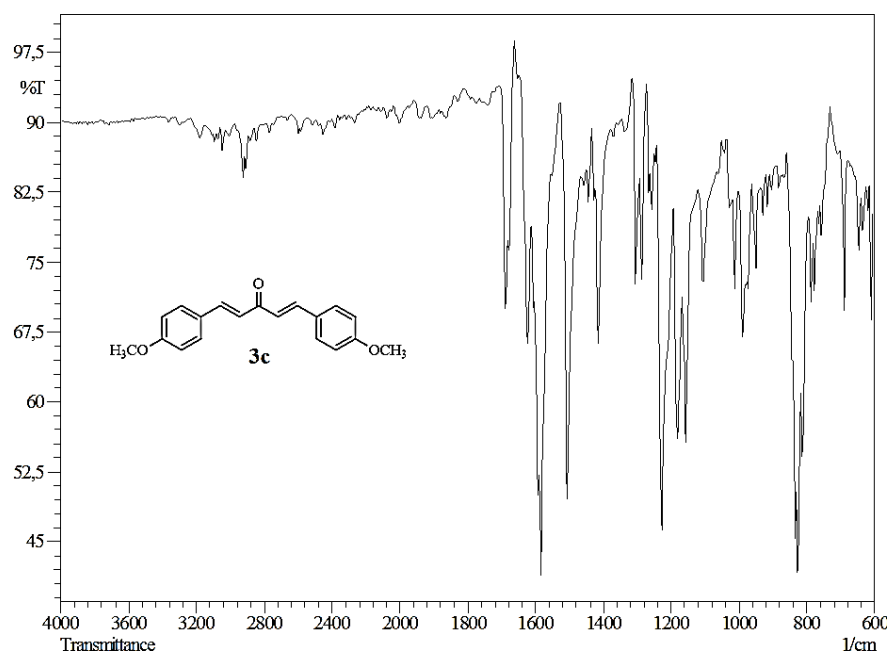


Fig. S8. Infrared spectrum of analogue **3c**.

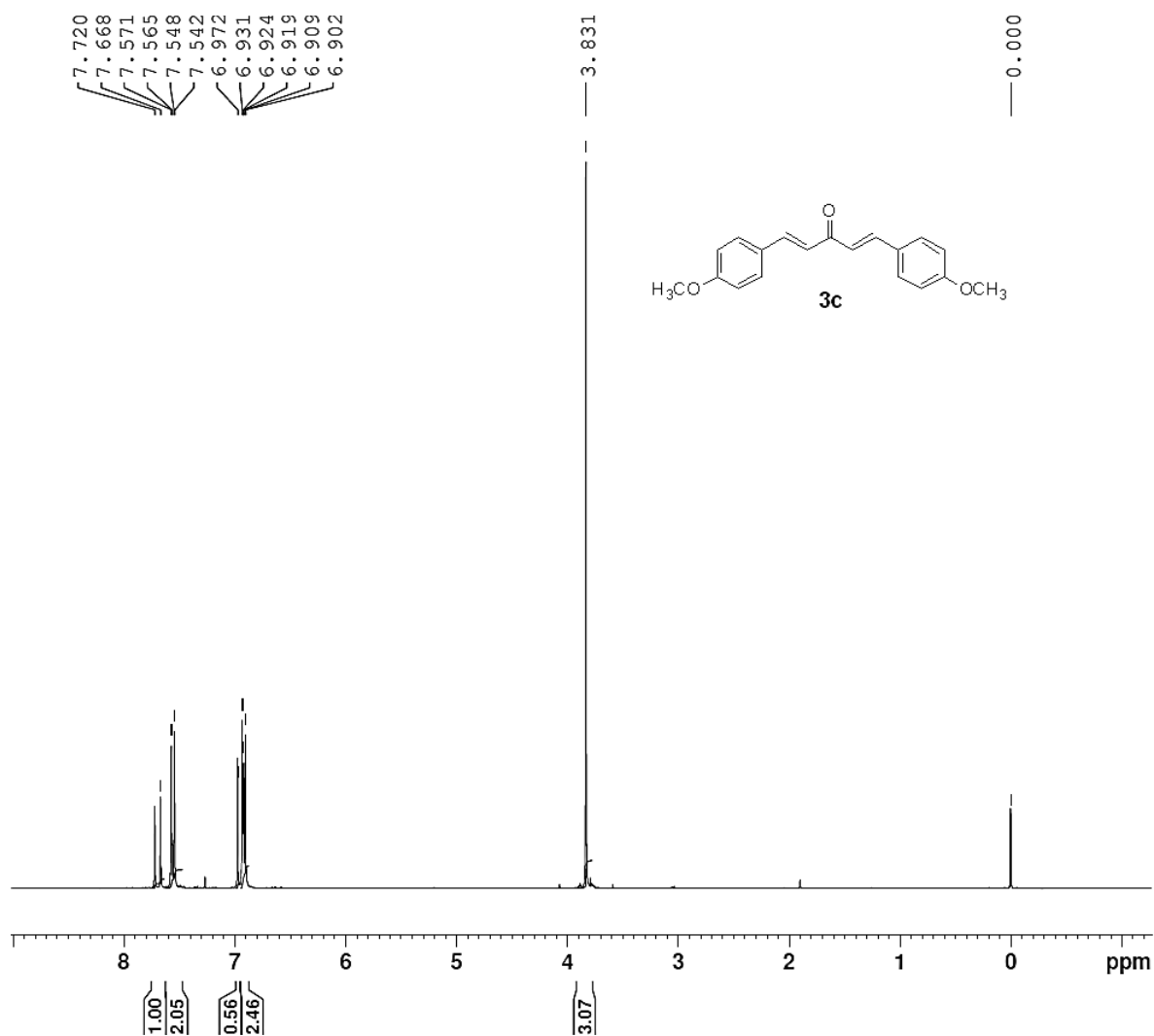


Fig. S9. ^1H NMR spectrum of analogue **3c**.

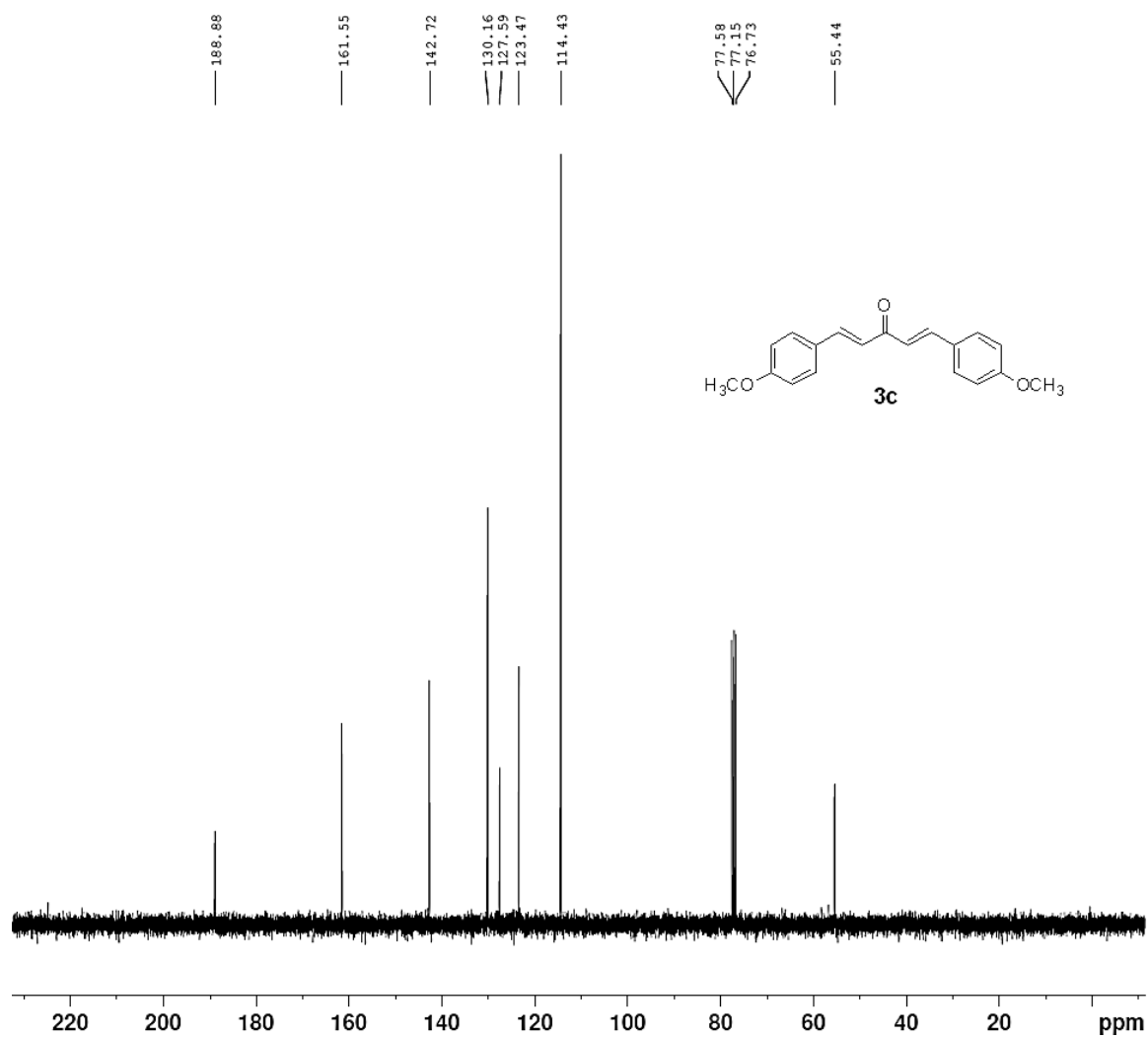


Fig. S10. ^{13}C NMR spectrum of analogue **3c**.

(1*E*,4*E*)-1,5-bis(4-chlorophenyl)penta-1,4-dien-3-one (**3d**)

C₁₇H₁₂Cl₂O. EM: 302.03; MW: 303.18; Yield: 40%; yellow crystals; mp (°C): 184 – 186 (Lit.: 184 – 186 [32]); CLog P^a: 5.704; IR ν_{max} / cm⁻¹ 3052, 3017 (C-H), 1646 (C=O), 1628, 1587, 1563 (C=C), 1187, 1086 (C-C), 809, 706 (C-Cl); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.67 (d, 2H, *J* = 15.9 Hz, 2x =CH); 7.55 (d, 4H, *J* = 9.0 Hz, 2x Ar); 7.39 (d, 4H, *J* = 9.0 Hz, 2x Ar); 7.02 (d, 2H, *J* = 15.9 Hz, 2x =CH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 188.4; 142.2; 136.6; 133.2; 129.7; 129.4; 125.7.; MS (APCI) *m/z*: 303.03 (M+1)⁺.

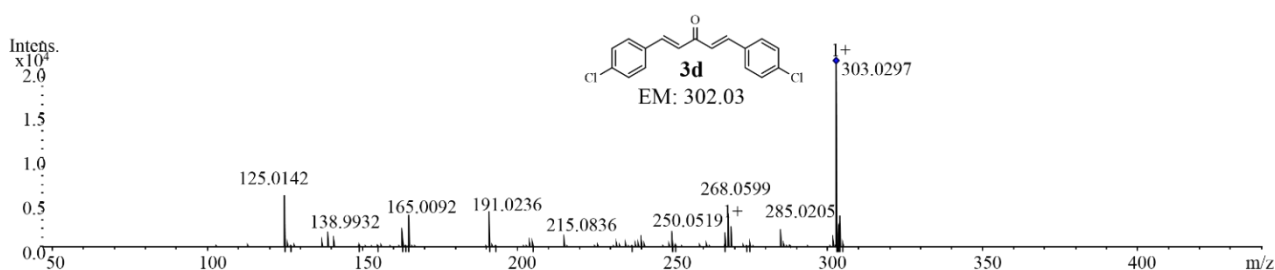


Fig. S11. Mass spectrum of analogue **3d**.

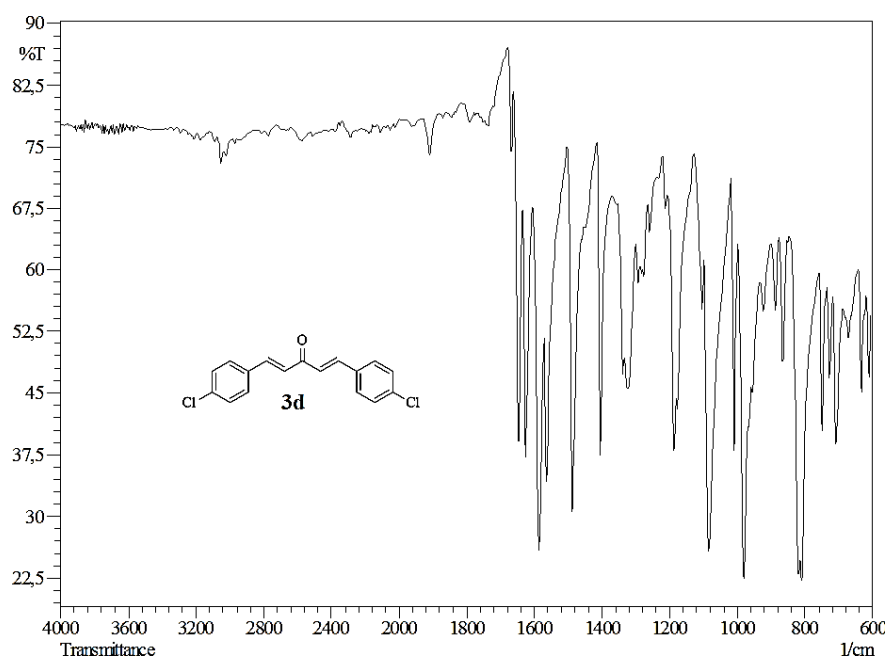


Fig. S12. Infrared spectrum of analogue **3d**.

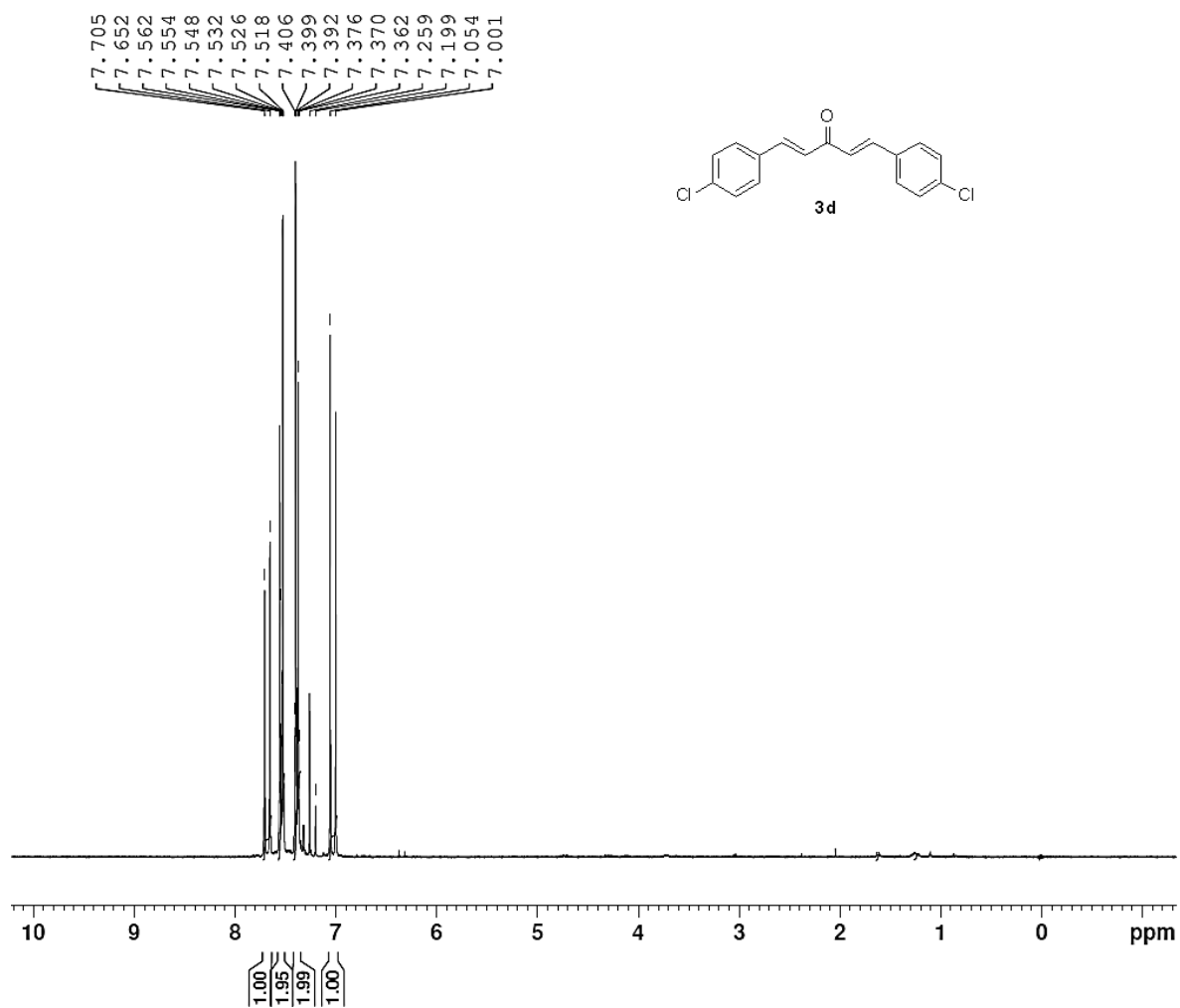


Fig. S13. ^1H NMR spectrum of analogue **3d**.

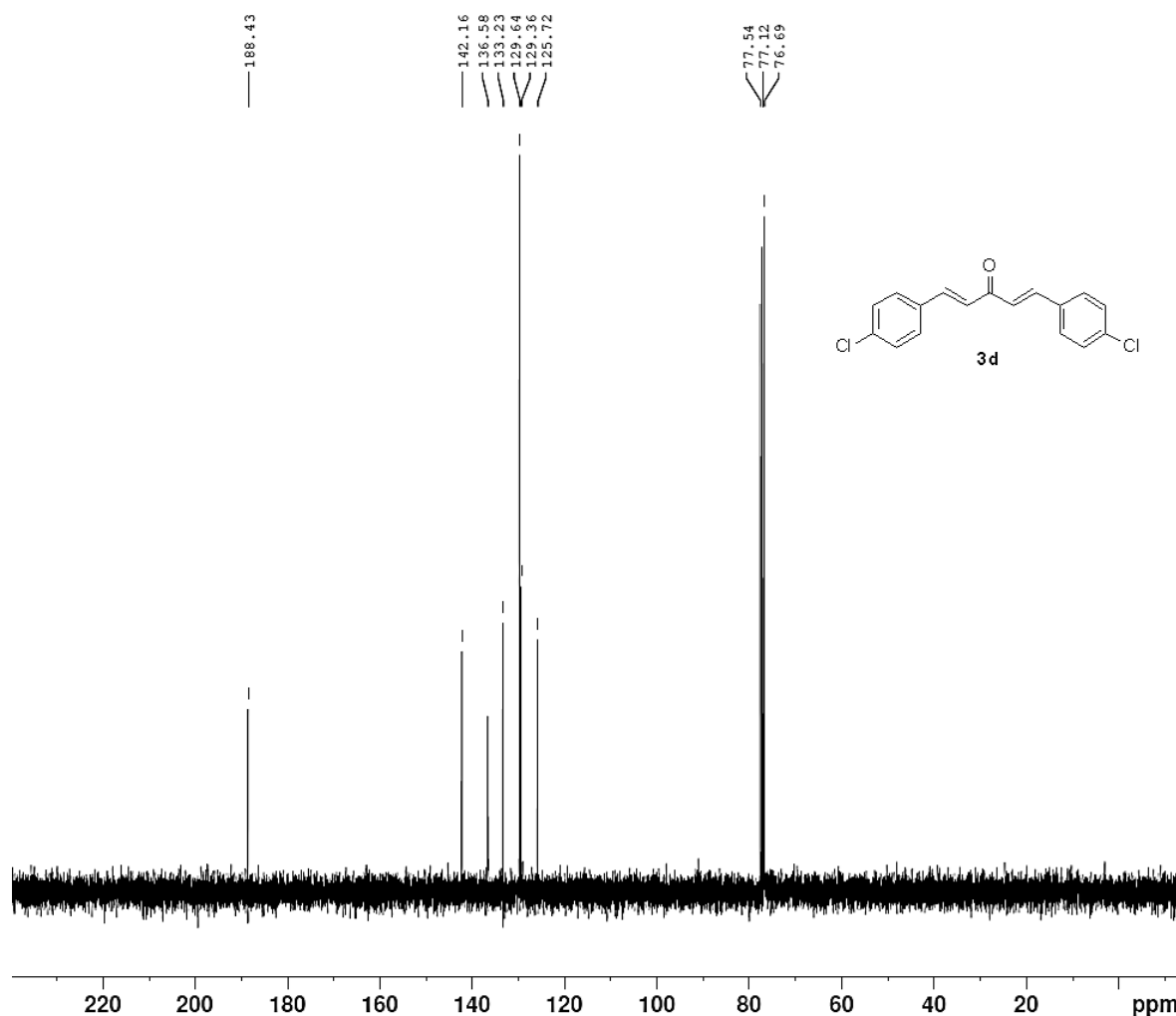


Fig. S14. ^{13}C NMR spectrum of analogue **3d**.

(1E,4E)-1,5-bis(2-chlorophenyl)penta-1,4-dien-3-one (3e**)**

$\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{O}$. EM: 302.03; MW: 303.18; Yield: 73%; yellow crystals; mp ($^{\circ}\text{C}$): 118 – 120 (Lit.: 114 – 116 [32]); CLog P^a : 5.704; IR ν_{max} / cm^{-1} 3052, 3026 (C-H), 1646 (C=O), 1624, 1587, 1563 (C=C), 1082 (C-C), 763, 730 (C-Cl); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.13 (d, 2H, J = 15.9 Hz, 2x =C-H); 7.7 – 7.2 (m, 8H, 2x Ar); 7.07 (d, 2H, J = 15.9 Hz, 2x =C-H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 188.8; 139.4; 135.5; 133.0; 131.3; 130.3; 127.8; 127.5; 127.2. MS (APCI) m/z : 303.03 ($\text{M}+1$) $^{+1}$.

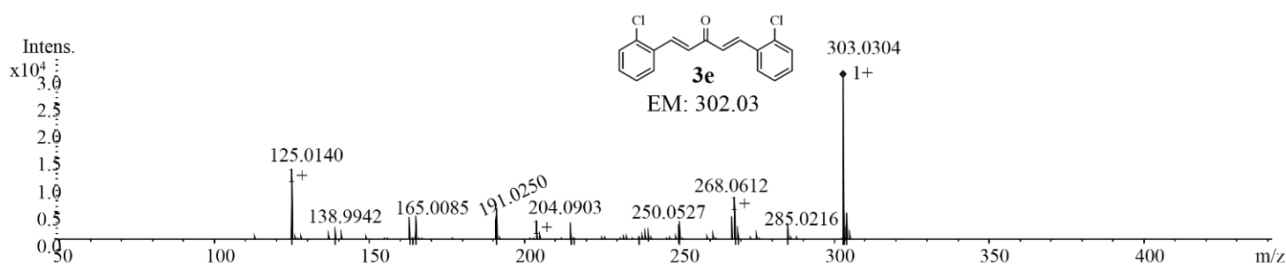


Fig. S15. Mass spectrum of analogue **3e**.

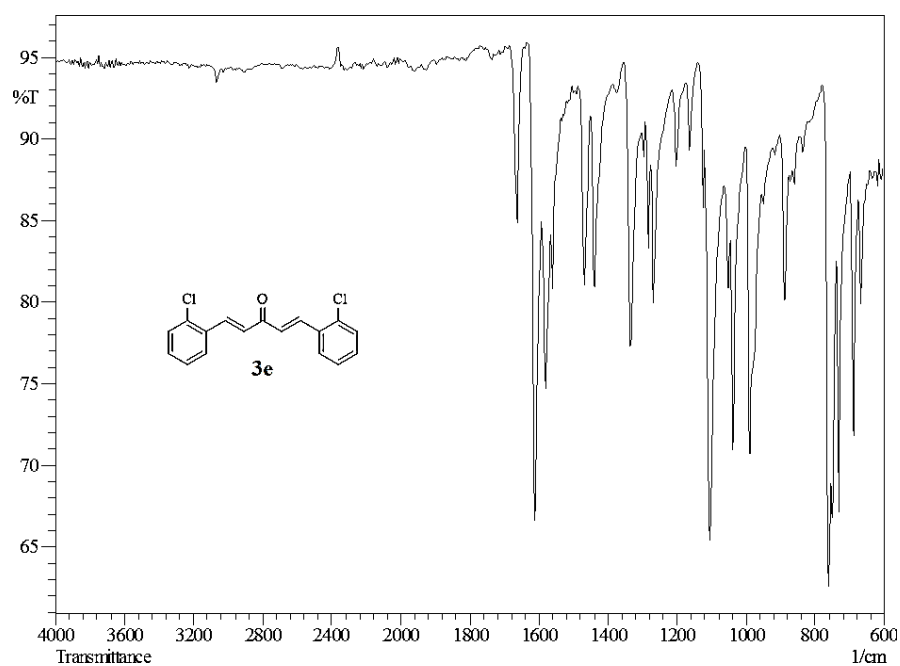


Fig. S16. Infrared spectrum of analogue **3e**.

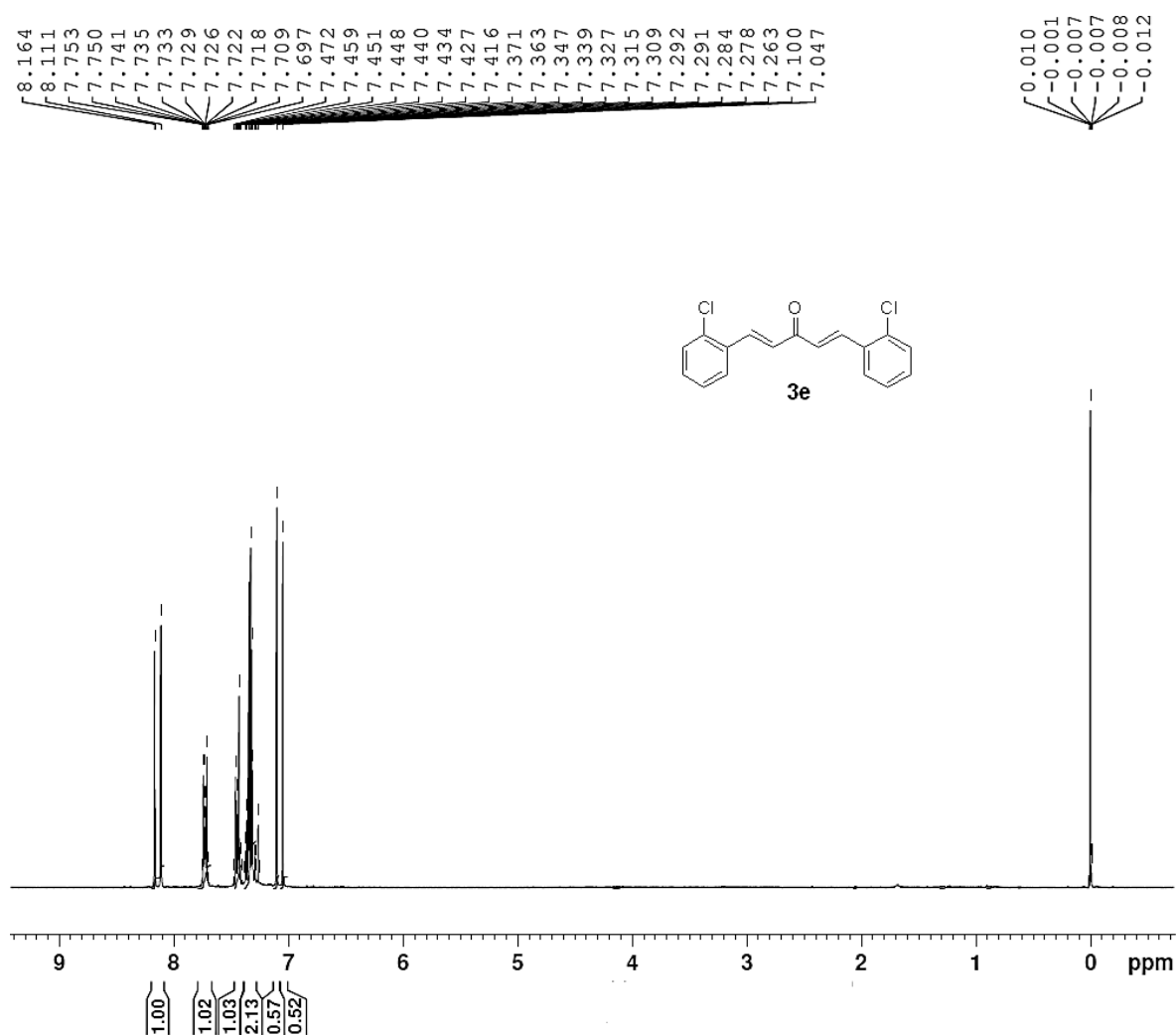


Fig. S17. ^1H NMR spectrum of analogue **3e**.

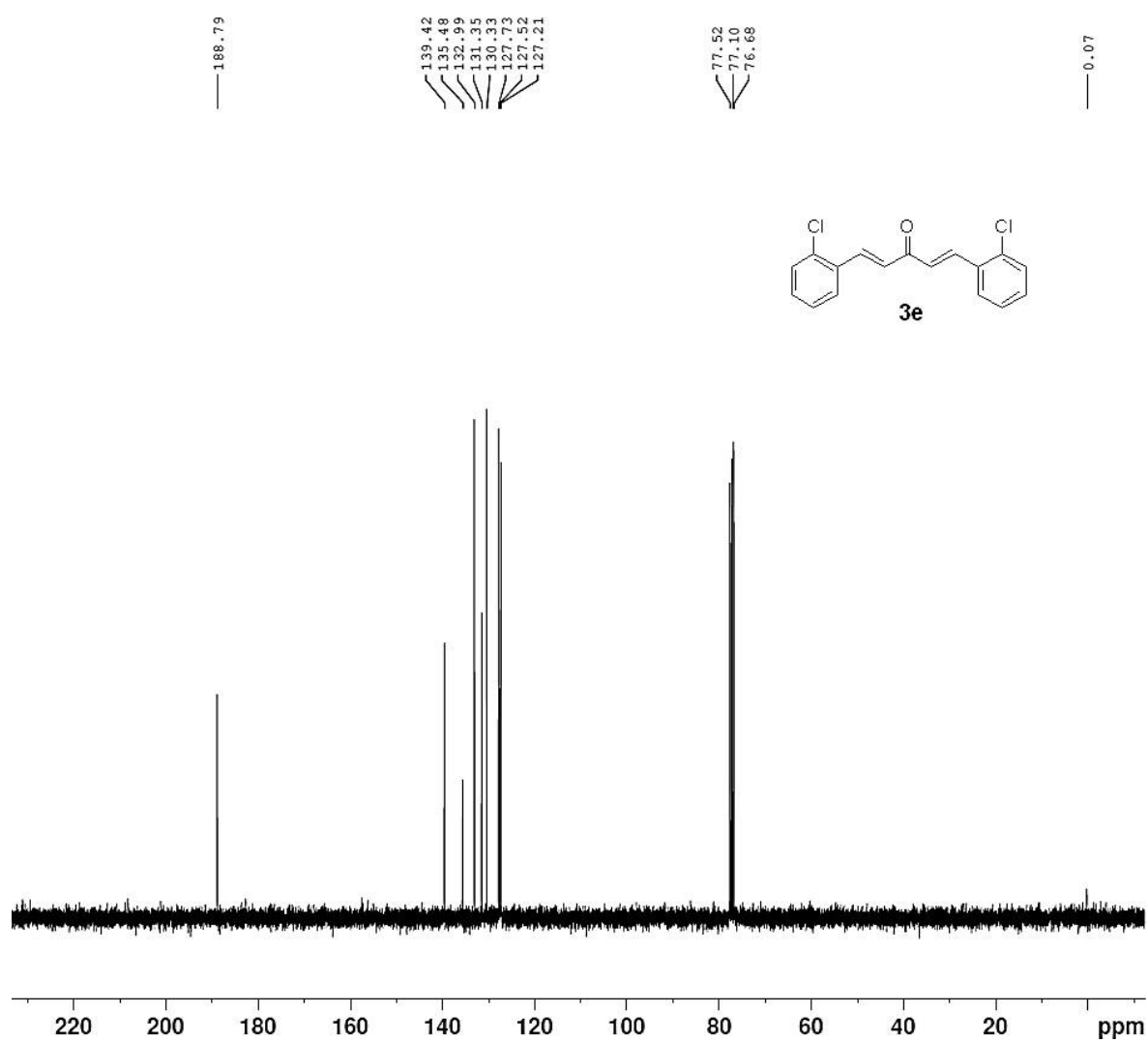
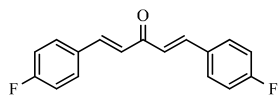


Fig. S18. ^{13}C NMR spectrum of analogue **3e**.

(1*E*,4*E*)-1,5-bis(4-fluorophenyl)penta-1,4-dien-3-one (**3f**)

$C_{17}H_{12}F_2O$. EM: 270.09; MW: 270.27; Yield: 74%; orange crystals; mp ($^{\circ}C$): 150 – 154 (Lit.: 150 – 152 [33]); CLog P^a : 4.564; IR ν_{max} / cm^{-1} 3074, 3052 (C-H), 1650 (C=O), 1626, 1582 (C=C), 1226, 1154 (C-F); ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.70 (d, 2H, J = 15.9 Hz, 2x =C-H); 7.61 (d, 4H, J = 9.0 Hz, 2x Ar); 7.12 (d, 4H, J = 9.0 Hz, 2 x Ar); 6.99 (d, 2H, J = 15.9 Hz; 2x =C-H); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 188.5; 164.10 (d, 1C, J^1_{CF} = 255.5 Hz, Ar-F); 142.2; 131.03 (d, 1C, J^4_{CF} = 3.76 Hz, Ar-F); 130.38 (d, 2C, J^3_{CF} = 8.77 Hz, Ar-F); 125.11; 125.08; 116.2; (d, 2C, J^2_{CF} = 21.3 Hz, Ar-F); MS (APCI) m/z : 271.09 ($M+1$) $^{+1}$.

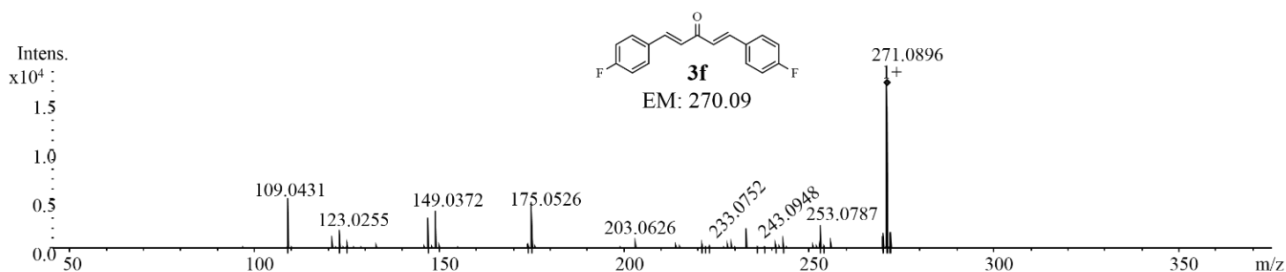


Fig. S19. Mass spectrum of analogue **3f**.

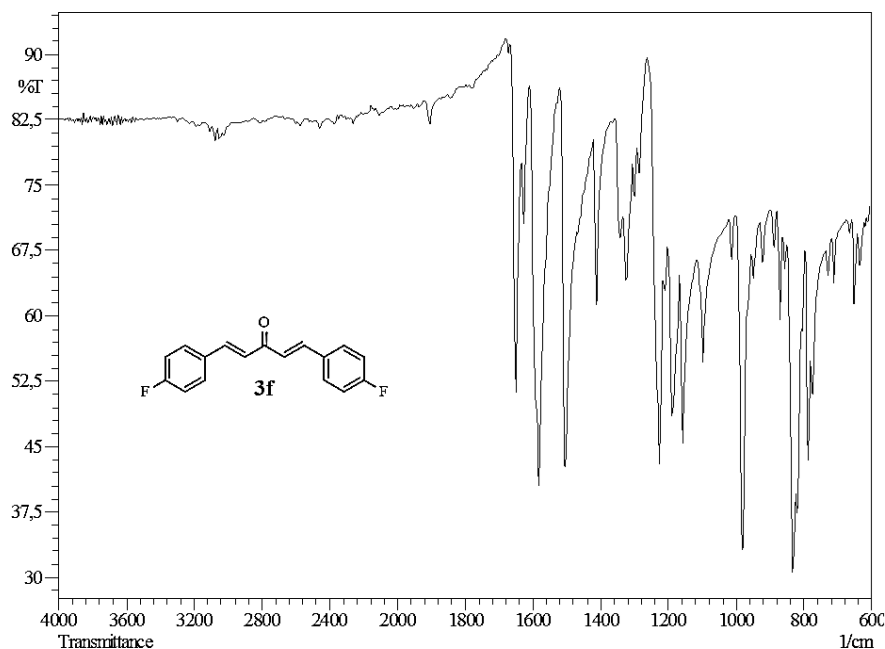


Fig. S20. Infrared spectrum of analogue **3f**.

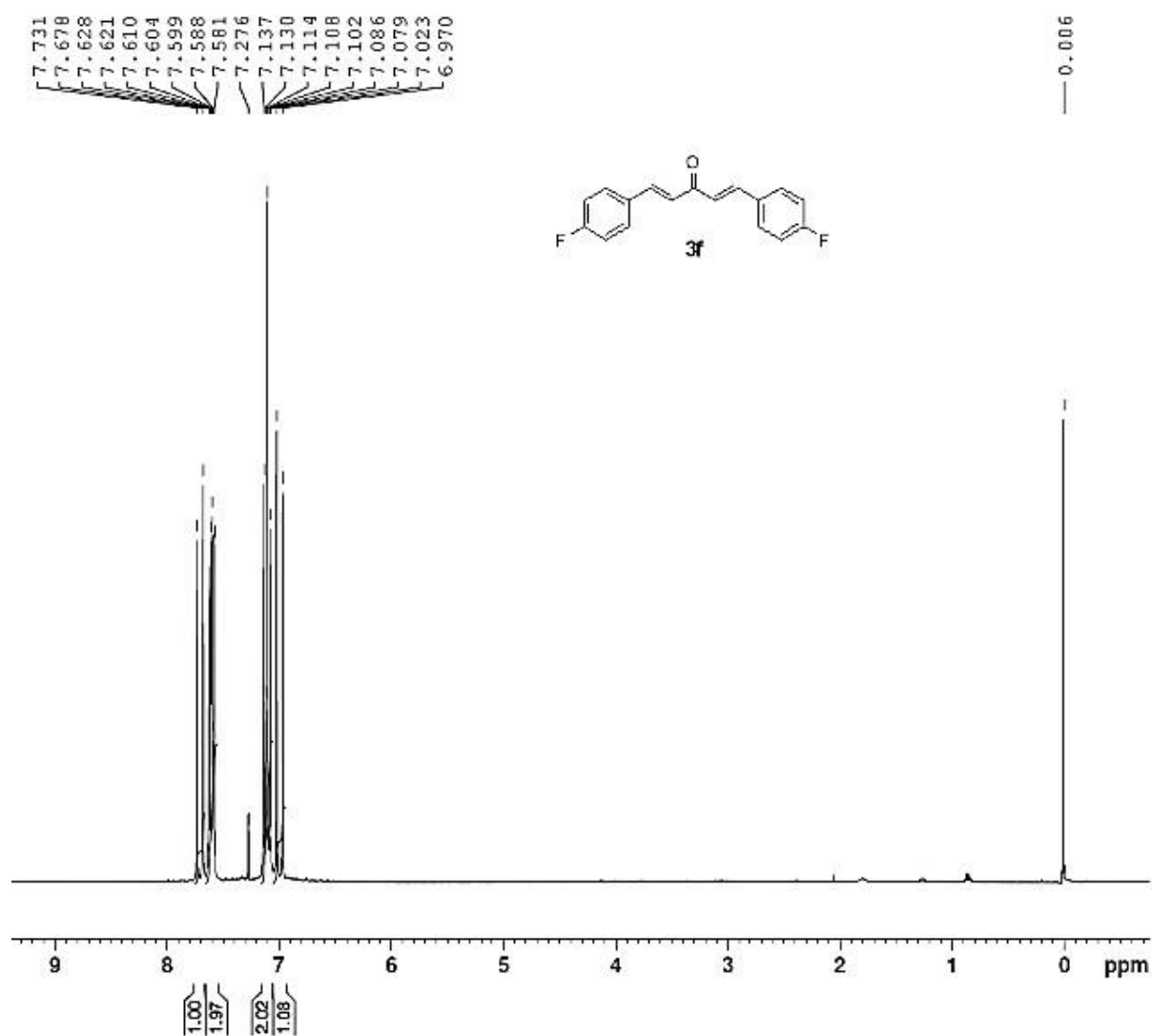


Fig. S21. ^1H NMR spectrum of analogue **3f**.

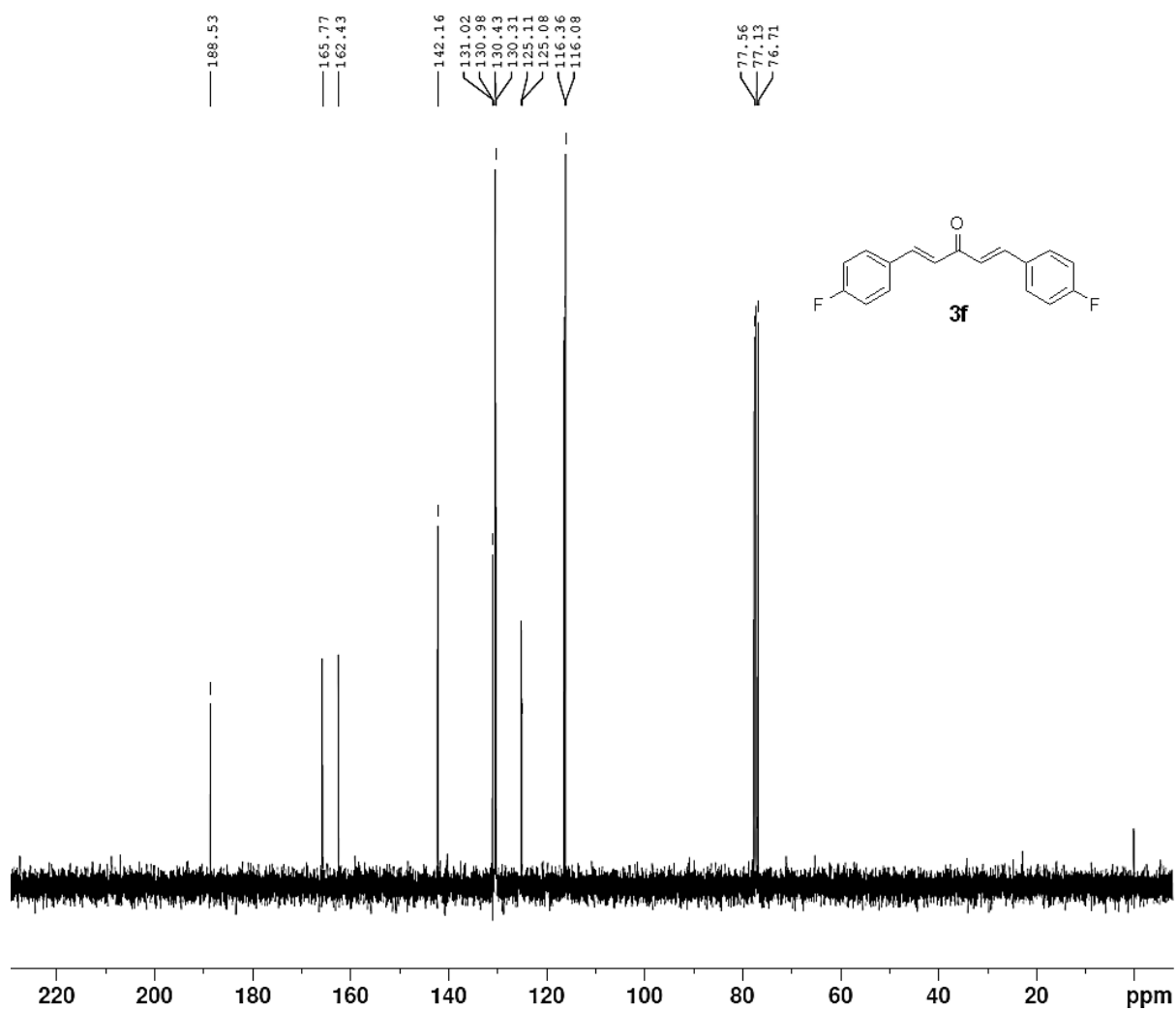
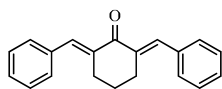


Fig. S22. ^{13}C NMR spectrum of analogue **3f**.

(2*E*,6*E*)-2,6-dibenzylidenecyclohexanone (**5a**)

$C_{20}H_{18}O$. EM: 274.14; MW: 274.36; Yield: 64%; yellow hexagonal crystals; mp ($^{\circ}C$): 116 – 118 (Lit.: 116 – 120 [31]); CLog P^a : 5.331; IR ν_{max} / cm^{-1} 3022, 2932, 2919 (C-H), 1659 (C=O), 1604 (C=C), 1272 (C-C); 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.80 (s, 2H, 2x =C-H); 7.78 – 7.47 (m, 10H, 2x Ph); 2.90 (t, 4H, 2x CH_2); 1.76 (quint., 2H, CH_2); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 190.3; 137.0; 136.2; 135.9; 130.4; 128.6; 128.4; 28.5; 23.0. MS (APCI) m/z : 275.14 ($M+1$) $^{+1}$.

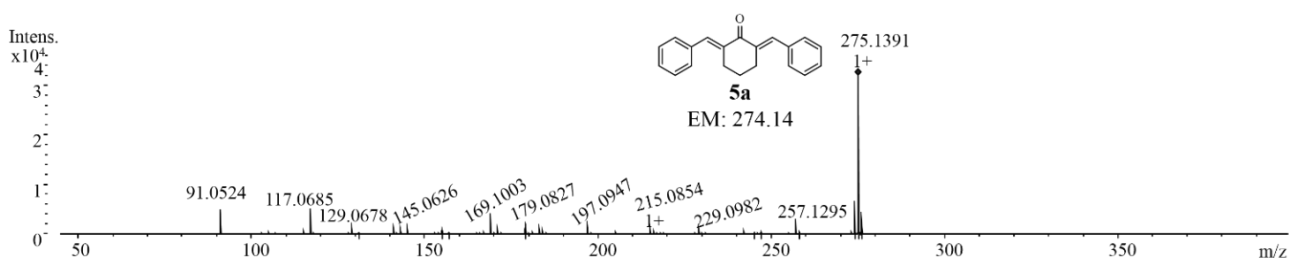


Fig. S23. Mass spectrum of analogue **5a**.

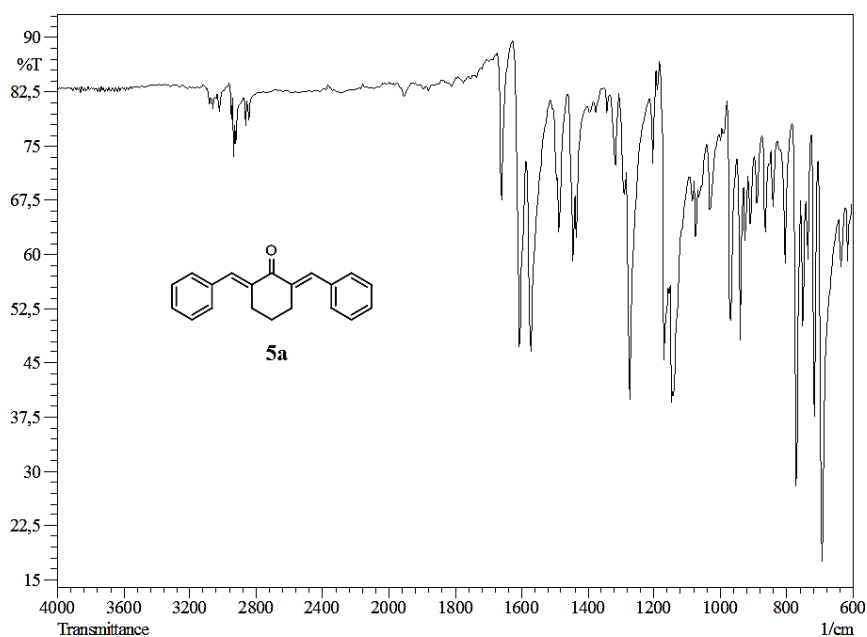


Fig. S24. Infrared spectrum of analogue **5a**.

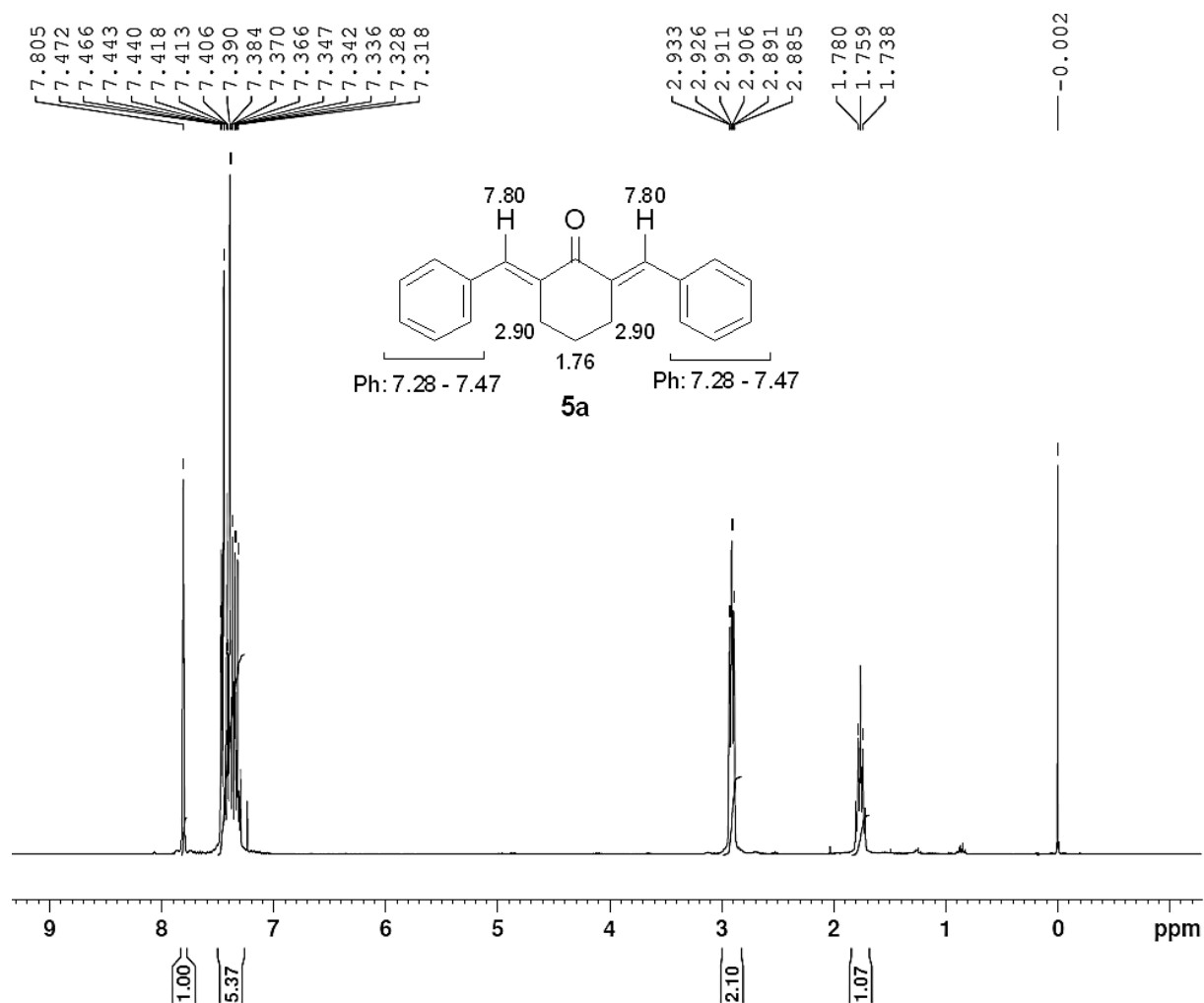


Fig. S25. ^1H NMR spectrum of analogue **5a**.

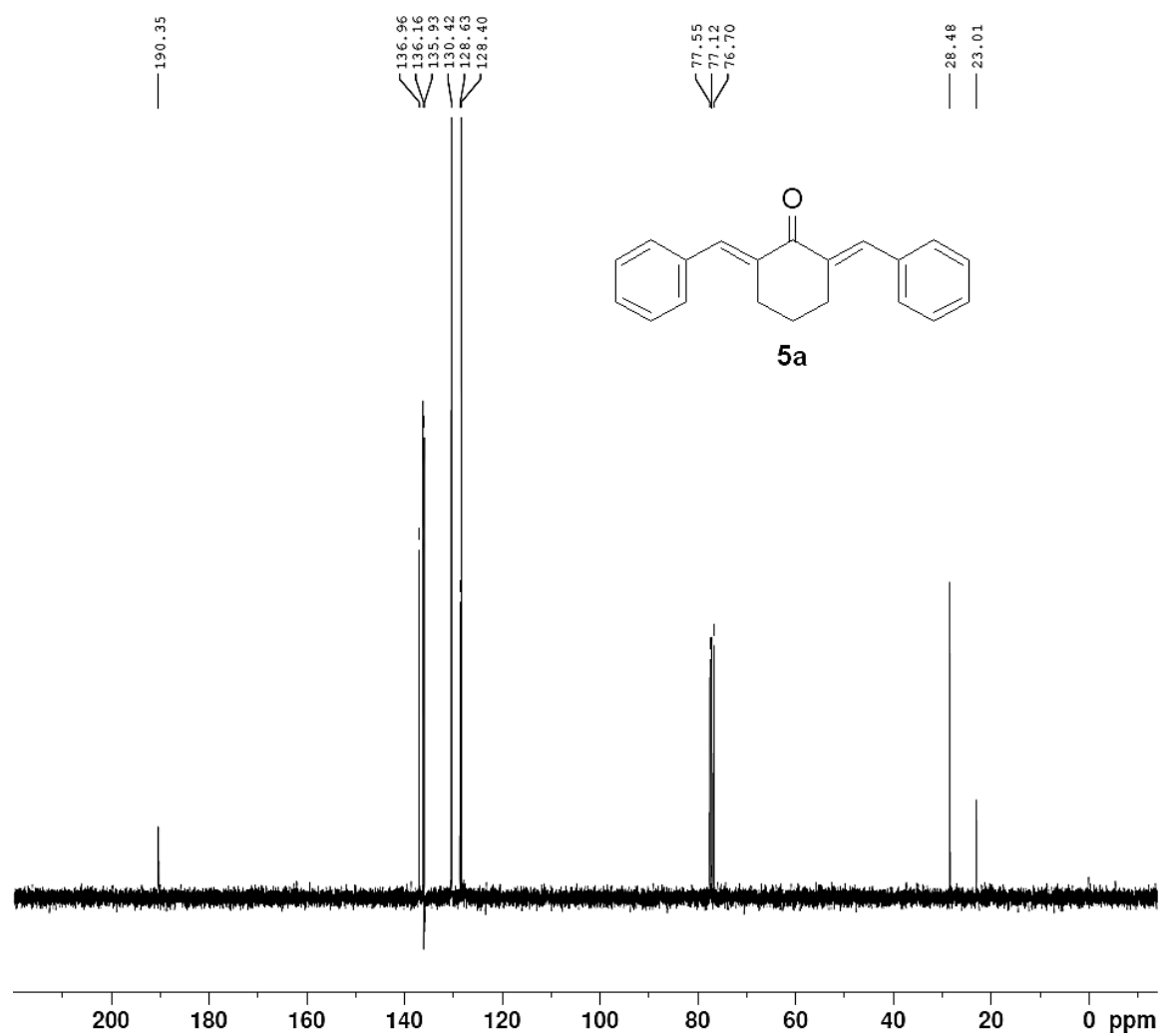


Fig. S26. ^{13}C NMR spectrum of analogue 5a.

(2E,6E)-2,6-bis(4-methylbenzylidene)cyclohexanone (5b)

C₂₂H₂₂O. EM: 302.17; MW: 302.41; Yield: 24%; yellow crystals; mp (°C): 171-174 (Lit.: 170 – 171 [34]); CLog P^a: 5.61; IR ν_{max} / cm⁻¹ 2938, 2914, 2858, 2834(C-H), 1661 (C=O), 1595, 1565 (C=C), 818 (C-C); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.78 (s, 2x =C-H); 7.40 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, 2x Ar); 7.2 (d, 4H, *J* = 8.7 Hz, 2x Ar); 2.90 (t, 4H, 2x CH₂) 2.37 (s, 6H, 2x CH₃); 1.77 (quint., 2H, CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 190.5; 138.9; 136.9; 135.5; 133.2; 130.6; 129.2; 28.6; 23.1; 21.5. MS (APCI) *m/z*: 303.17 (M+1)⁺.

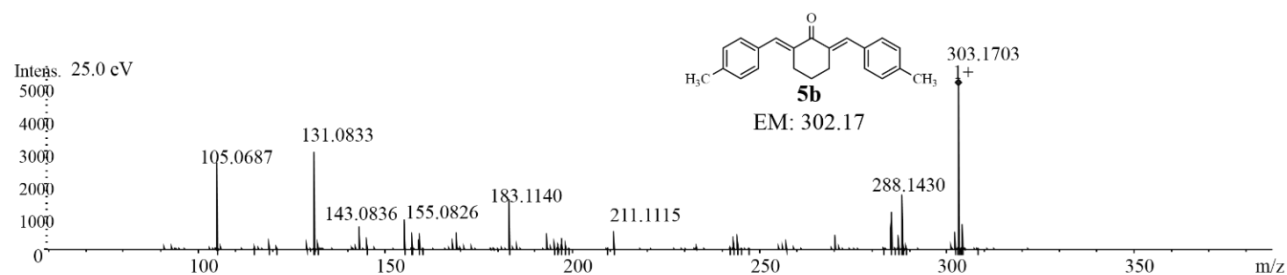


Fig. S27. Mass spectrum of analogue **5b**.

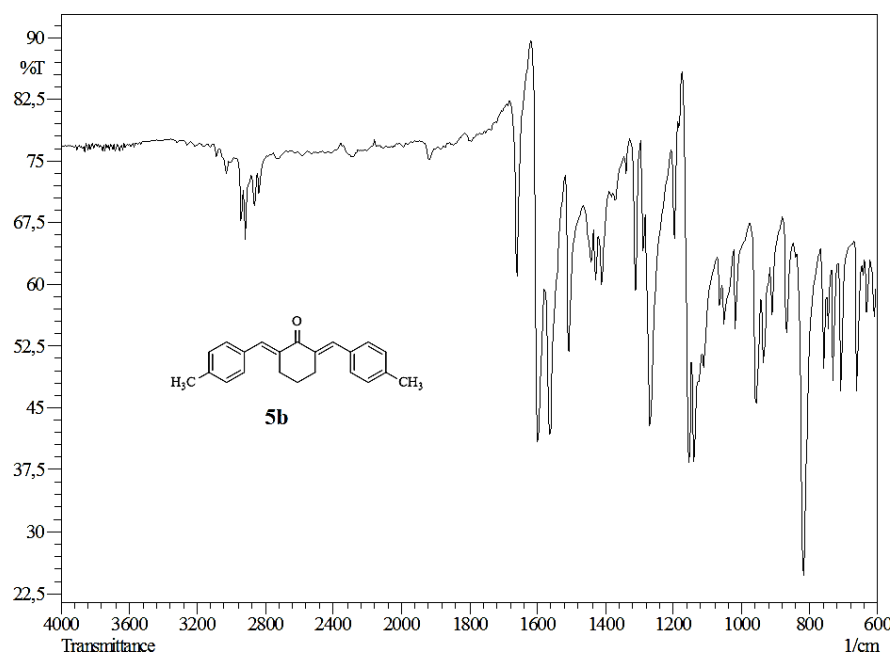


Fig. S28. Infrared spectrum of analogue **5b**.

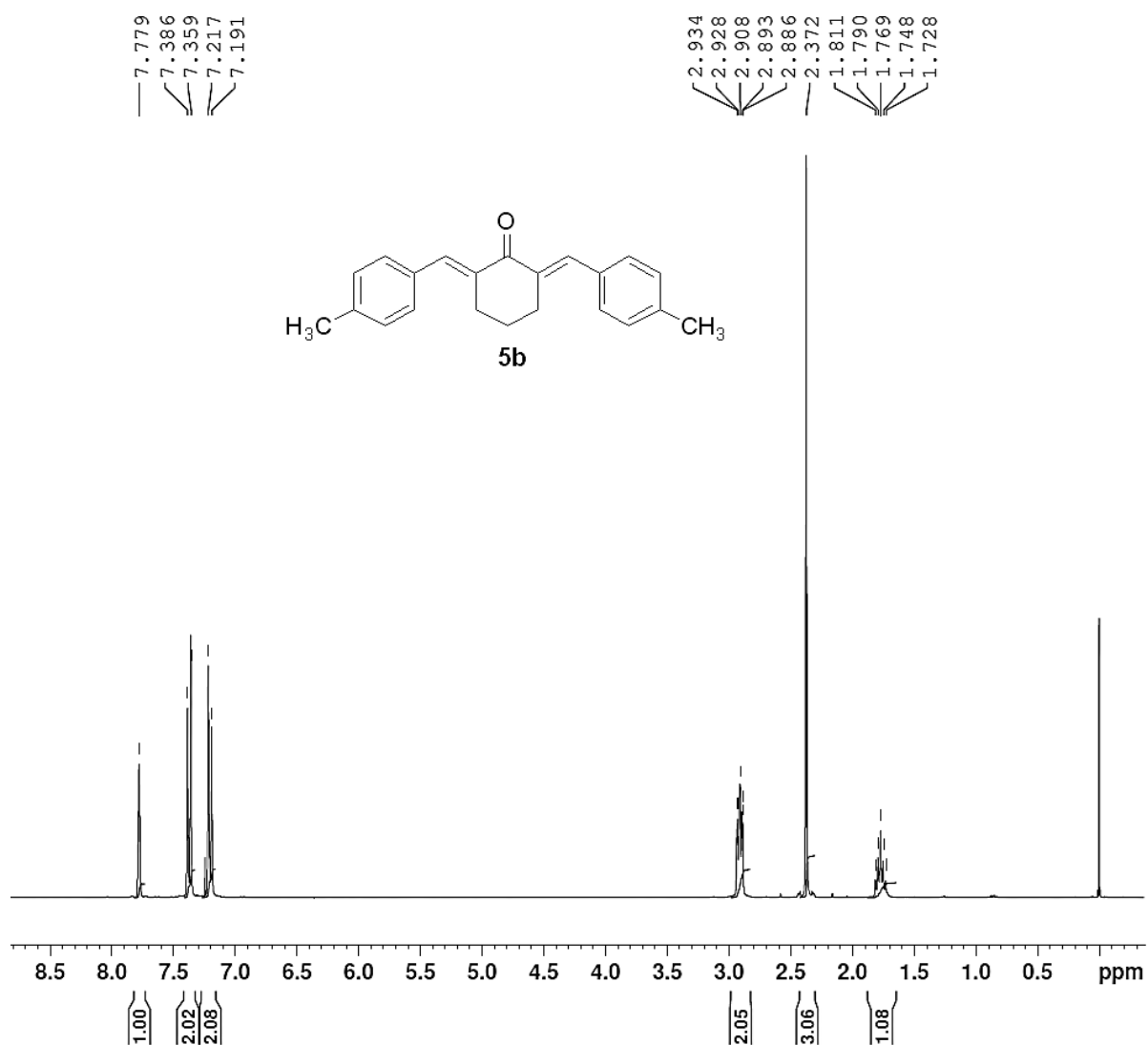


Fig. S29. ¹H NMR spectrum of analogue 5b.

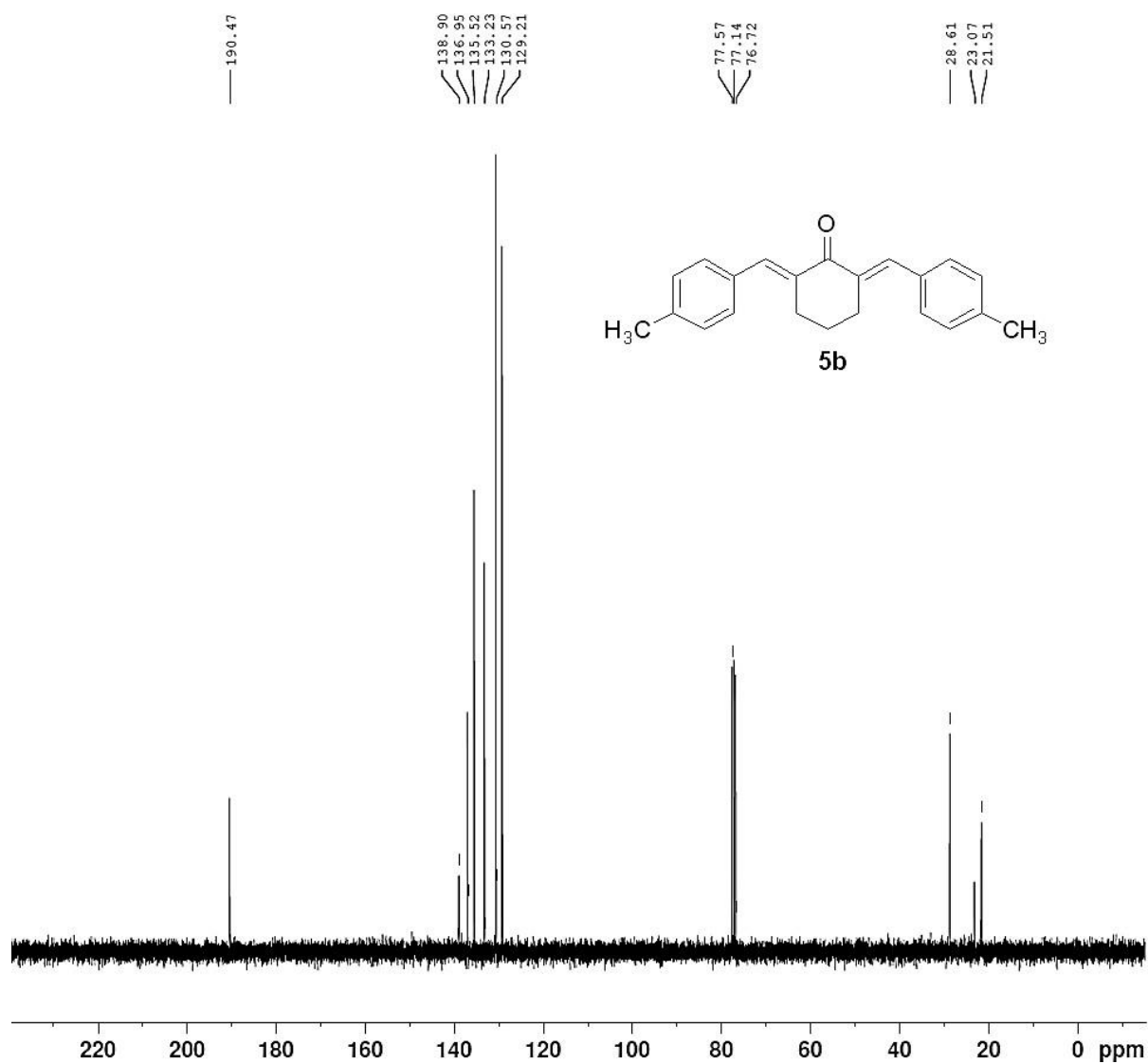


Fig. S30. ^{13}C NMR spectrum of analogue **5b**.

(2*E*,6*E*)-2,6-bis(4-methoxybenzylidene)cyclohexanone (**5c**)

C₂₂H₂₂O₃. EM: 334.16; MW: 334.41; Yield: 80%; yellow solid; mp (°C): 201 – 203 (Lit.: 202 - 203 [35]); CLog P^a: 5.169; IR ν_{max} / cm⁻¹ 2938, 2827 (C-H), 1657 (C=O), 1589, 1554 (C=C), 1248 (C-O), 1021, 831 (C-C); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.76 (s, 2x =C-H); 7.42 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, 2x Ar); 6.91 (d, 4H, *J* = 8.7 Hz, 2x Ar); 3.82 (s, 6H, 2x OCH₃); 2.90 (t, 4H, 2x CH₂); 1.78 (quint., 2H, CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 190.2; 159.9; 136.5; 134.3; 132.2; 128.7; 113.9; 55.3; 28.5; 23.0. MS (APCI) *m/z*: 335.16 (M+)⁺.

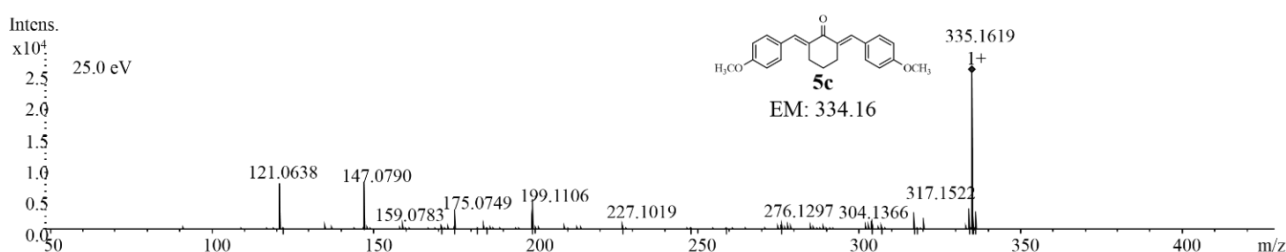
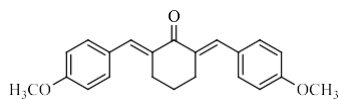


Fig. S31. Mass spectrum of analogue **5c**.

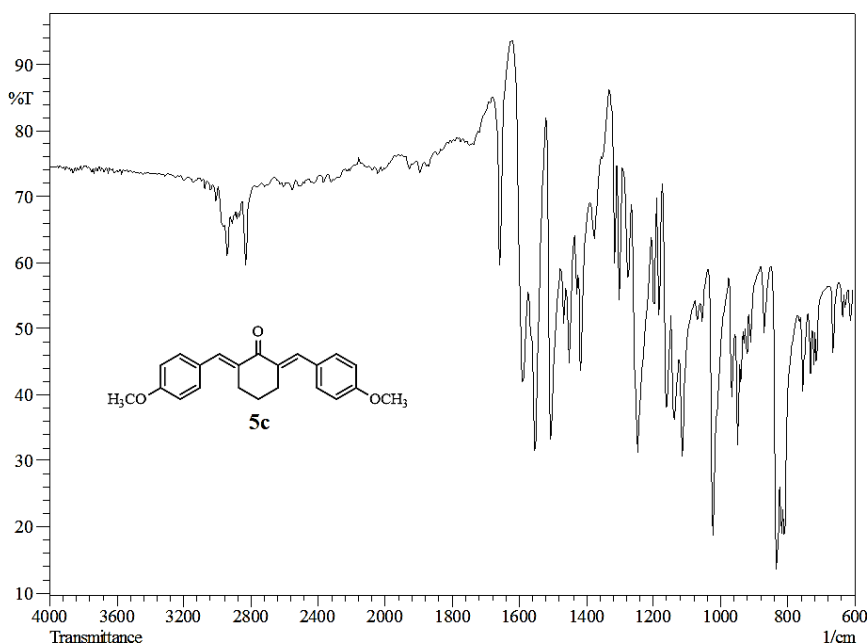


Fig. S32. Infrared spectrum of analogue **5c**.

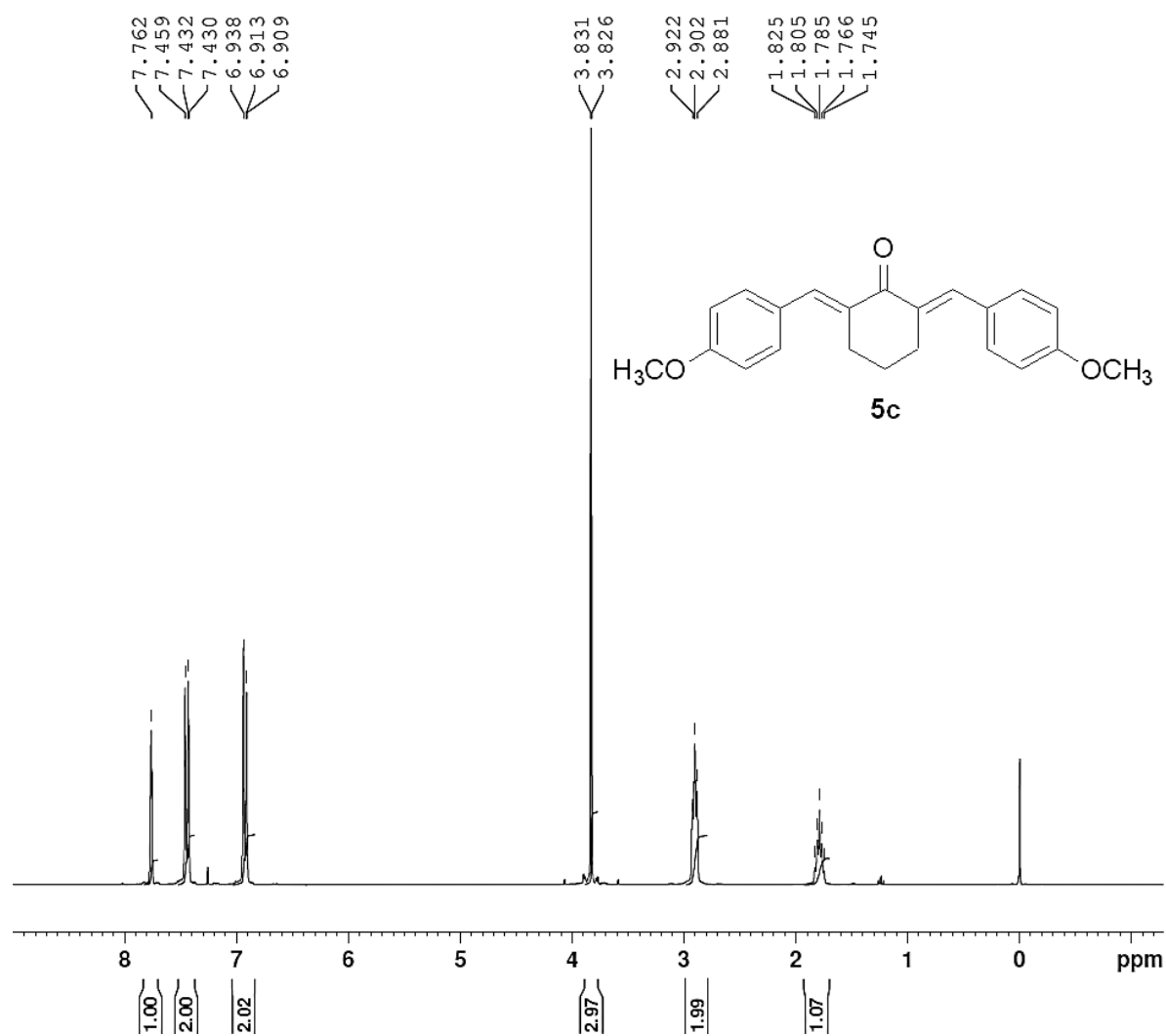


Fig. S33. ¹H NMR spectrum of analogue 5c.

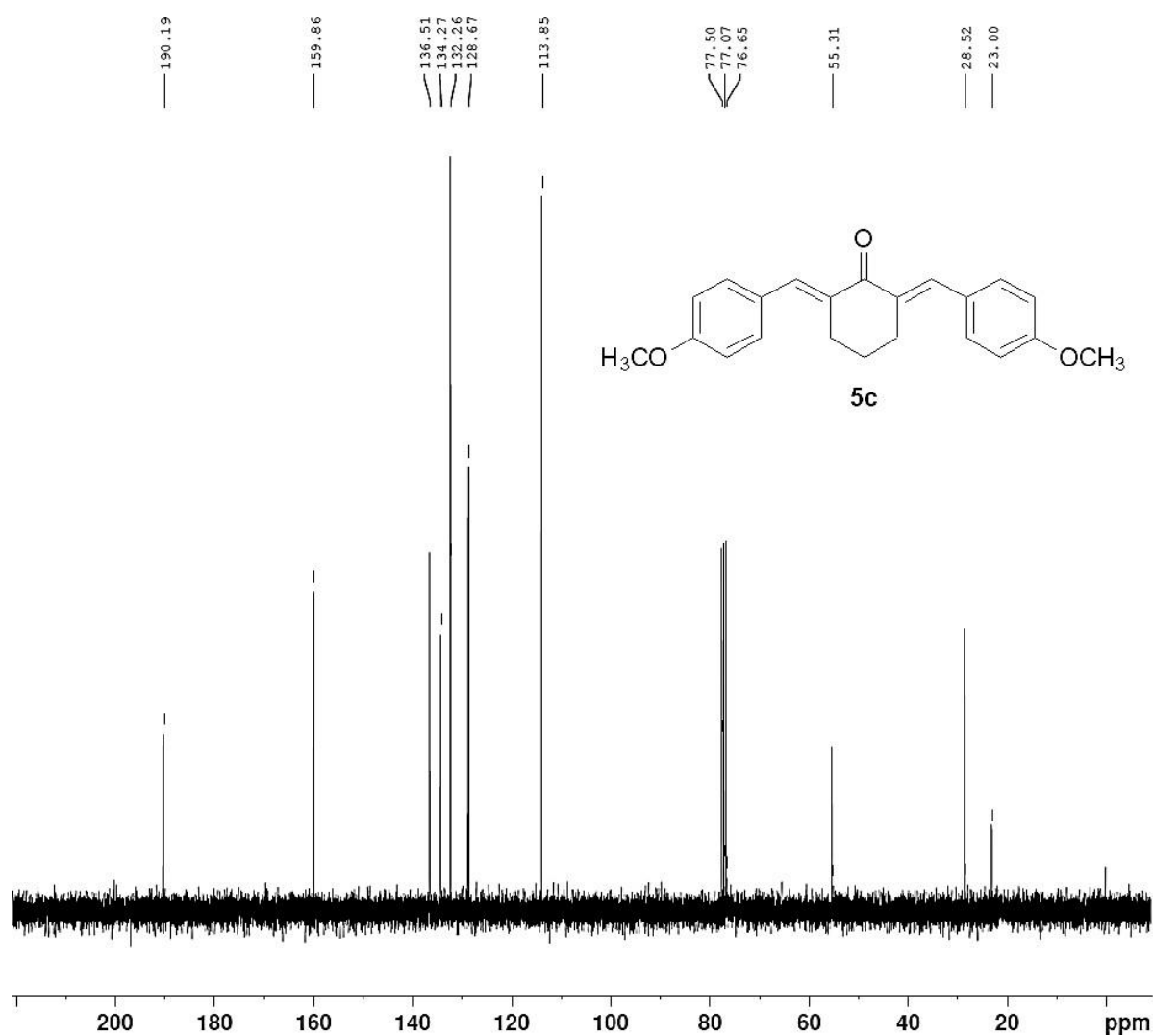


Fig. S34. ^{13}C NMR spectrum of analogue 5c.

(2*E*,6*E*)-2,6-bis(4-chlorobenzylidene)cyclohexanone (**5d**)

C₂₀H₁₆Cl₂O. EM: 342.06; MW: 343.25; Yield: 62%; yellow crystals; mp (°C): 147 – 148 (Lit.: 147 - 148 [34]); CLog P^a: 6.757; IR v_{max} / cm⁻¹ 2967, 2942 2928 (C-H), 1665 (C=O), 1604 (C=C), 1161, 1145 (C-C), 798 (C-Cl); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.72 (d, 2H, 2x Ar); 7.37 (s, 2x =C-H); 7.3 – 7.41 (m, 8H, 2x Ar); 2.8 (t, 4H, 2 x CH₂); 1.78 (quint., 2H, CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 189.7; 136.3; 135.7; 134.5; 134.2; 131.5; 128.6; 28.3; 22.7. MS (APCI) m/z: 343.05 (M+1)⁺.

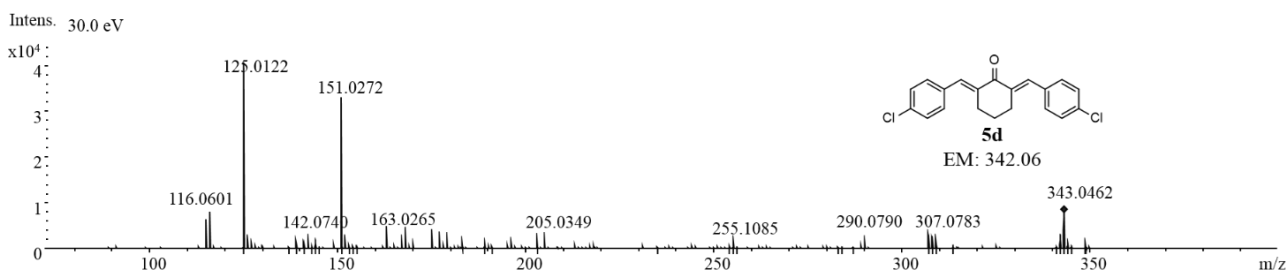
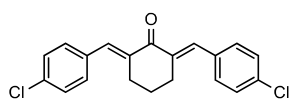


Fig. S35. Mass spectrum of analogue **5d**.

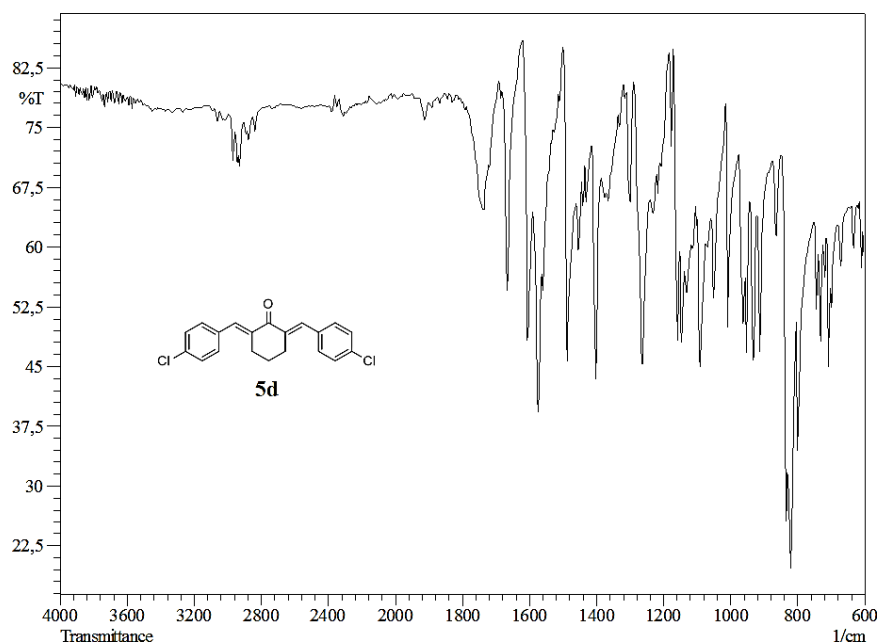


Fig. S36. Infrared spectrum of analogue **5d**.

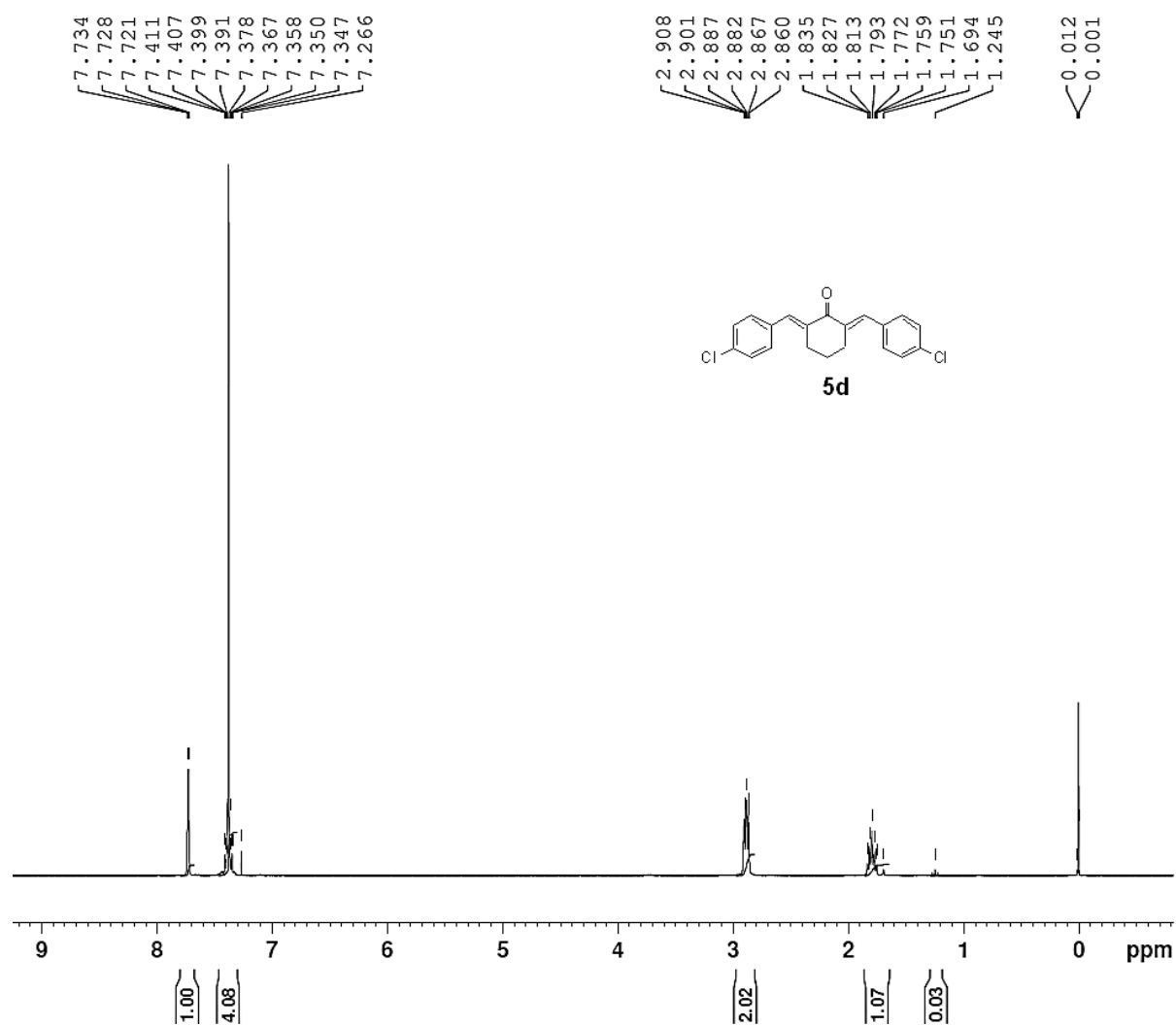


Fig. S37. ¹H NMR spectrum of analogue 5d.

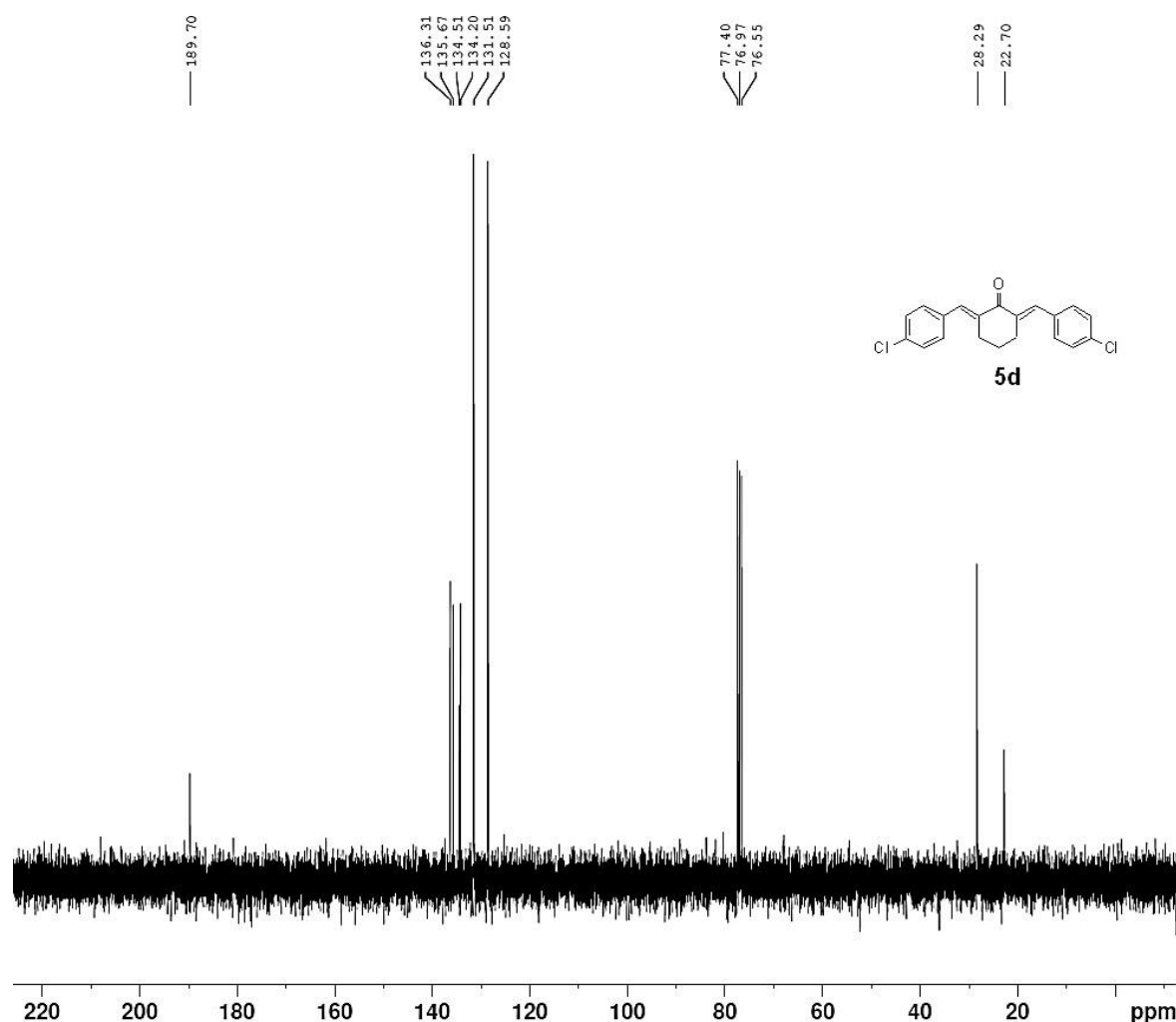
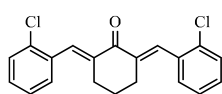


Fig. S38. ¹³C NMR spectrum of analogue **5d**.

(2*E*,6*E*)-2,6-bis(2-chlorobenzylidene)cyclohexanone (**5e**)



C₂₀H₁₆Cl₂O. EM: 342.06; MW: 343.25; Yield: 83%; yellow crystals; mp (°C): 111 – 114 (Lit.: 103 – 105 [36]); CLog P^a: 6.757; IR ν_{max} / cm⁻¹: 3063, 2972, 2917 (C-H), 1663 (C=O), 1587, 1576 (C=C), 1143 (C-C), 765, 733 (C-Cl); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.91 (s, 2x =C-H); 7.2 – 7.46 (m, 8H, 2x Ar); 2.7 (t, 4H, 2x CH₂); 1.74 (quint., 2H, CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 189.8; 137.8; 135.1; 134.4; 134.1; 130.6; 129.8; 129.7; 126.3; 28.5; 23.2. MS (APCI) m/z: 343.06 (M+)⁺.

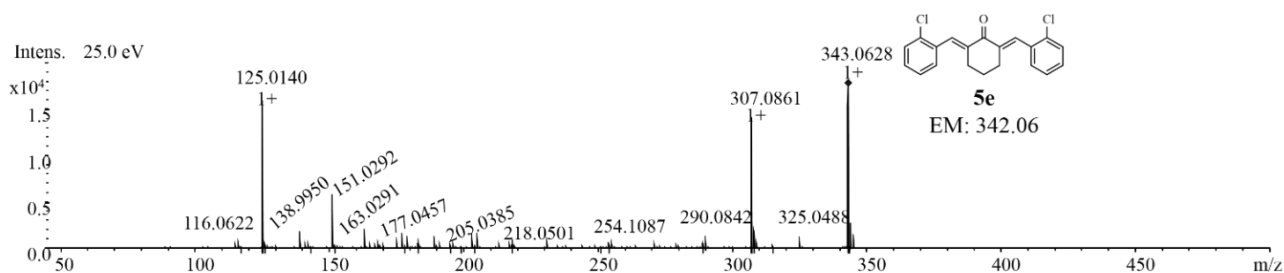


Fig. S39. Mass spectrum of analogue **5e**.

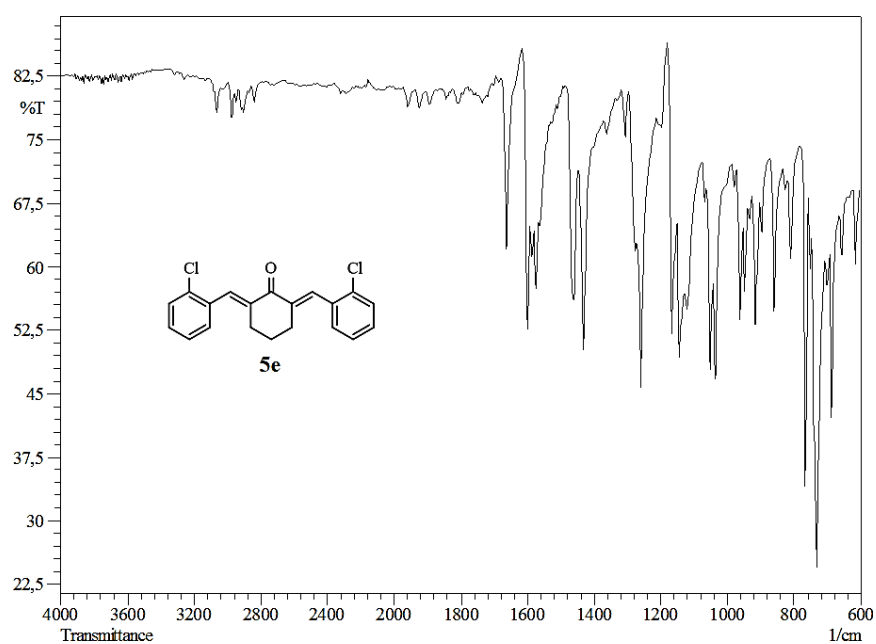


Fig. S40. Infrared spectrum of analogue **5e**.

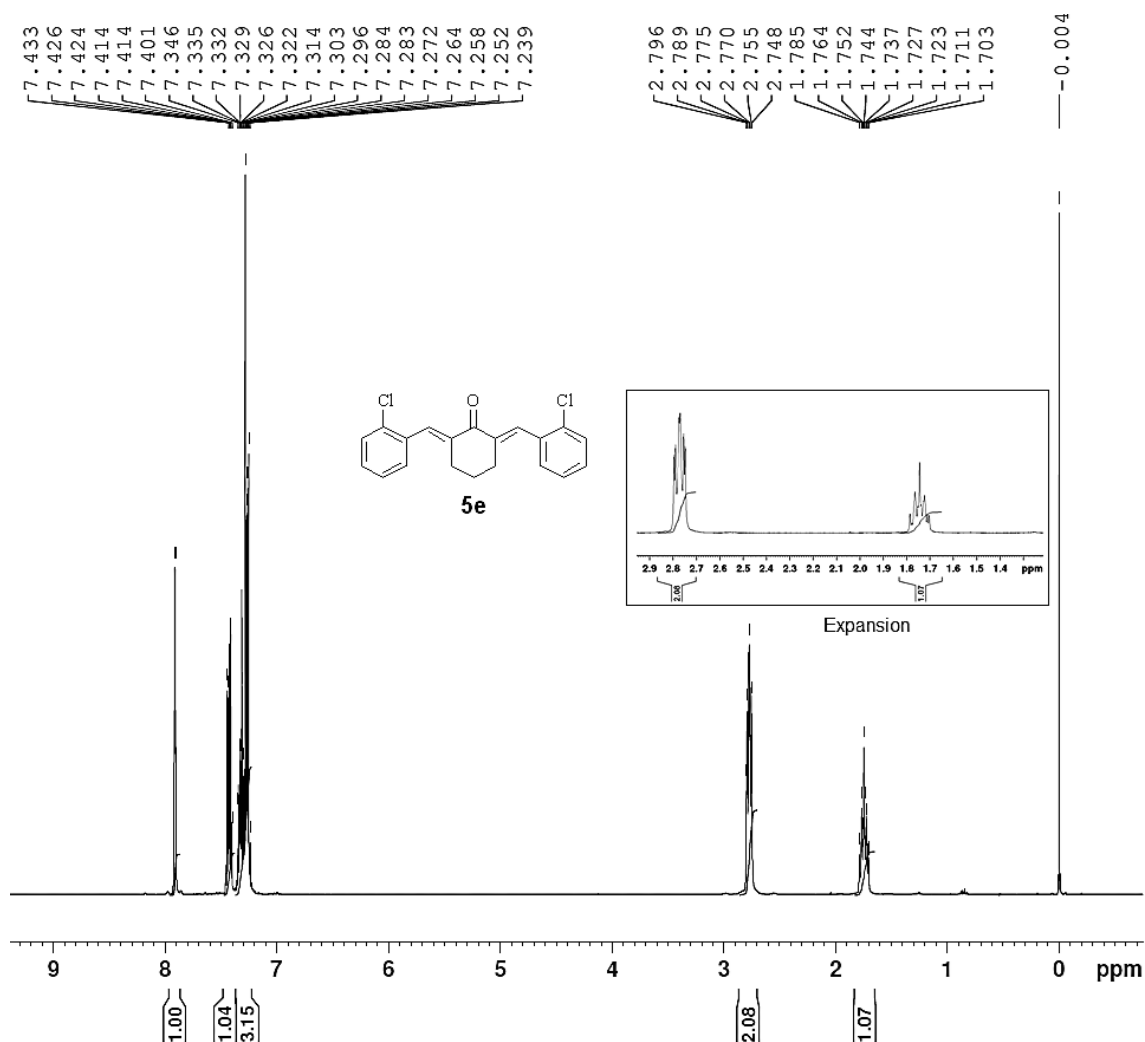


Fig. S41. ^1H NMR spectrum of analogue **5e**.

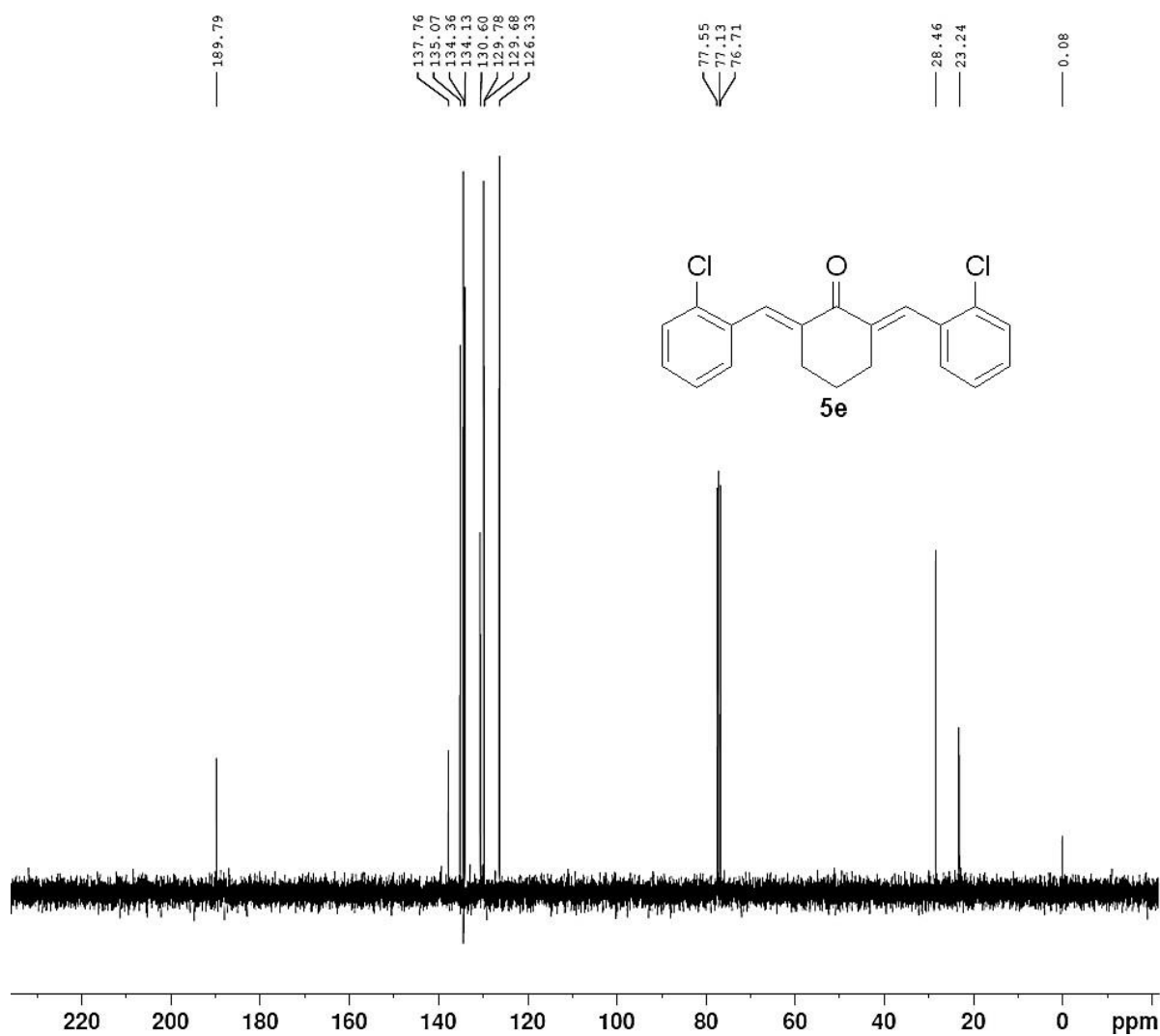


Fig. S42. ^{13}C NMR spectrum of analogue 5e.

(2*E*,6*E*)-2,6-bis(4-fluorobenzylidene)cyclohexanone (**5f**)

C₂₀H₁₆F₂O. EM: 310.12; MW: 310.34; Yield: 36%; pale yellow solid; mp (°C): 154 – 157 (Lit.: 156 [37]); CLog P^a: 5.167; IR ν_{max} / cm⁻¹: 2954, 2932, 2872 (C-H), 1661 (C=O), 1609, 1598 (C=C), 1143 (C-C), 1220, 1268 (C-F); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.74 (s, 2x =C-H); 7.45 (d, 4H, *J* = 8.7 Hz, 2x Ar); (7.08 d, 4H, *J* = 8.7 Hz, 2x Ar); 2.8 (t, 4H, 2x CH₂); 1.78 (quint., 2H, CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 190.6; 162.7 (d, 1C, *J*_{CF}¹ = 246.7 Hz, Ar-F); 135.96; 135.7 (d, 1C, *J*_{CF}⁴ = 3.76 Hz, Ar-F); 132.3 (d, 2C, *J*_{CF}³ = 8.24 Hz, Ar-F); 132.1; 132.06; 115.6 (d, 2C, *J*_{CF}² = 25.3 Hz, Ar-F); 28.4; 22.9. MS (APCI) *m/z*: 311.12 (M+1)⁺.

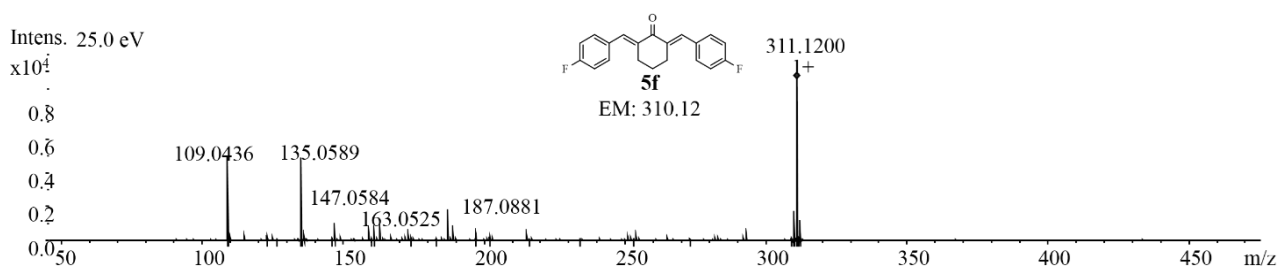
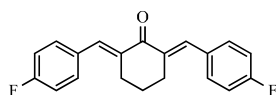


Fig. S43. Mass spectrum of analogue **5f**.

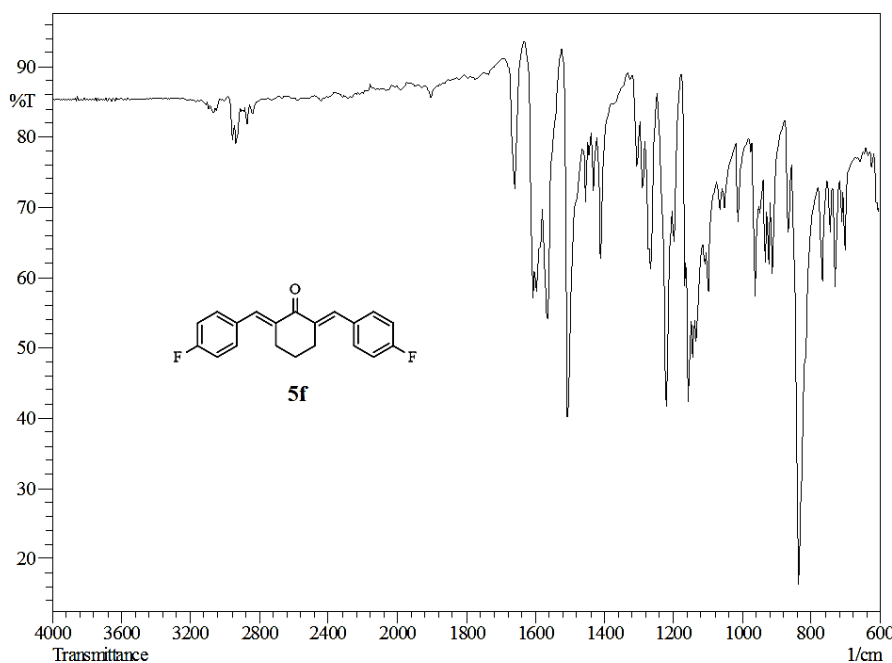


Fig. S44. Infrared spectrum of analogue **5f**.

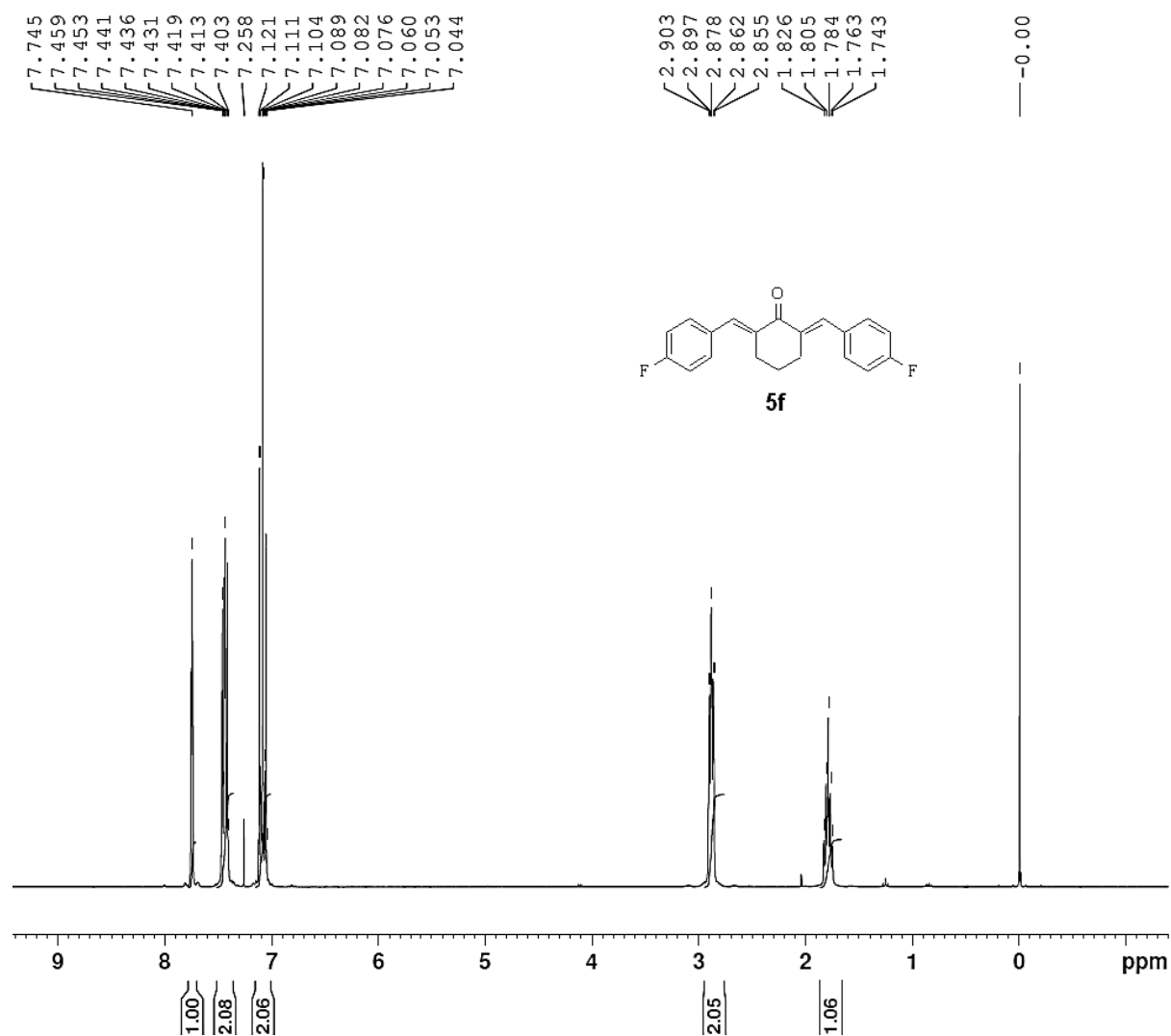


Fig. S45. ^1H NMR spectrum of analogue **5f**.

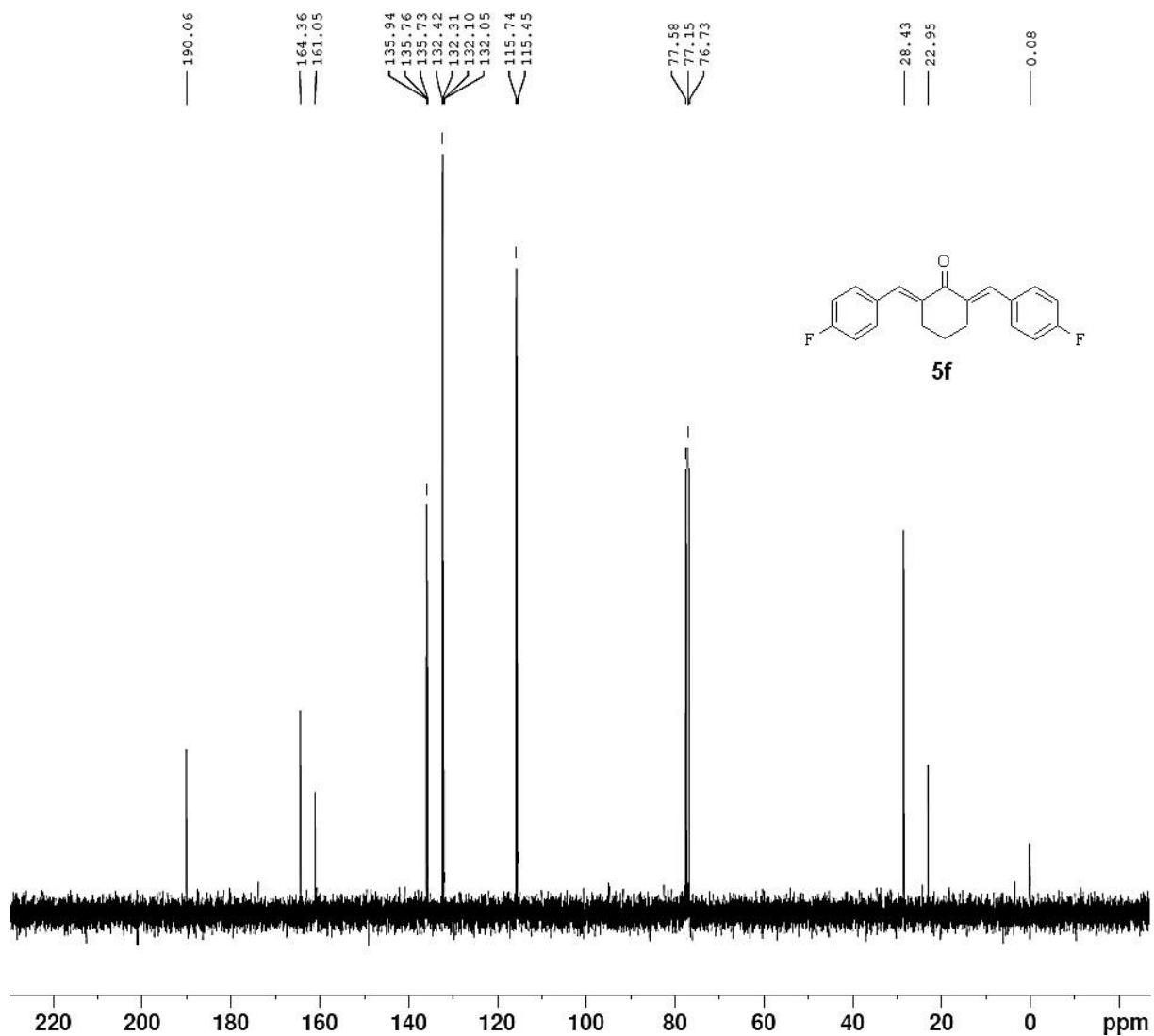
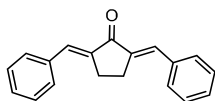


Fig. S46. ^{13}C NMR spectrum of analogue **5f**.

(2E,5E)-2,5-dibenzylidenecyclopentanone (7a)

$C_{19}H_{16}O$. EM: 260.12; MW: 260.33; Yield: 74%; yellow solid; mp ($^{\circ}C$): 189 –193 (Lit.: 194 - 195 [31]); CLog P^a : 4.772; IR ν_{max} / cm^{-1} 3054, 3019, 2910 (C-H), 1685 (C=O), 1622, 1598 (C=C), 1178 (C-C); 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.60 (d, 4H, J = 6.7 Hz, 2x Ar); 7.43 (s, 2H, 2x =CH); 7.33 – 7.47 (m, 8 H, 2x Ph); 3.08 (s, 4H, 2x CH_2); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 196.42; 137.3; 135.8; 133.9; 130.8; 129.4; 128.8; 26.6. MS (APCI) m/z : 261.12 ($M+1$) $^{+1}$.

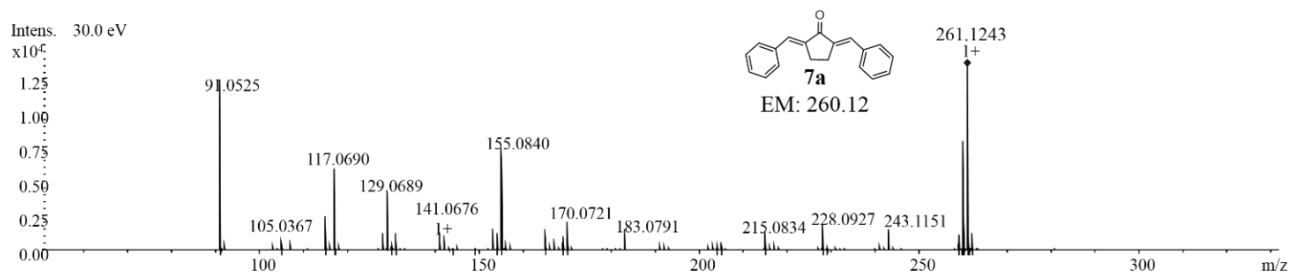


Fig. S47. Mass spectrum of analogue **7a**.

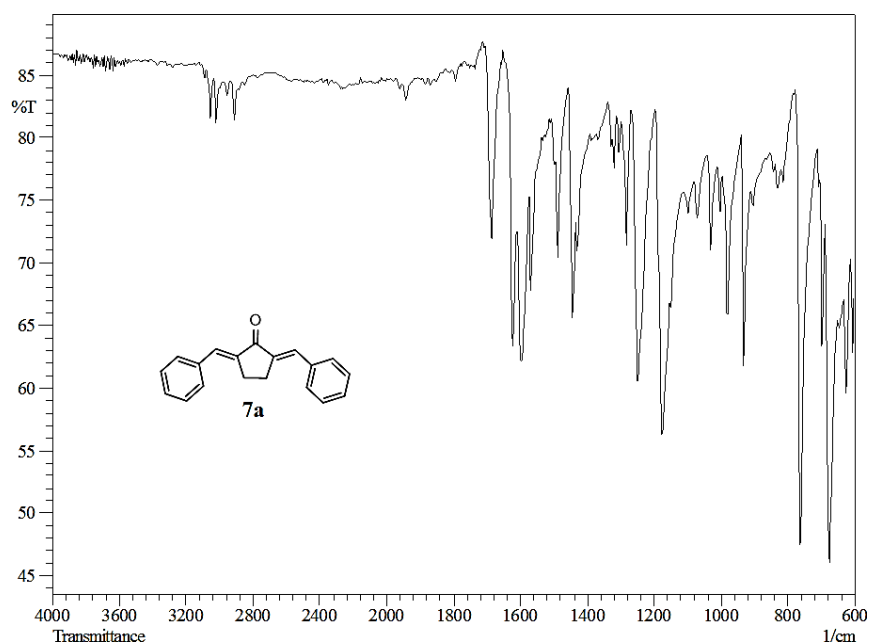


Fig. S48. Infrared spectrum of analogue **7a**.

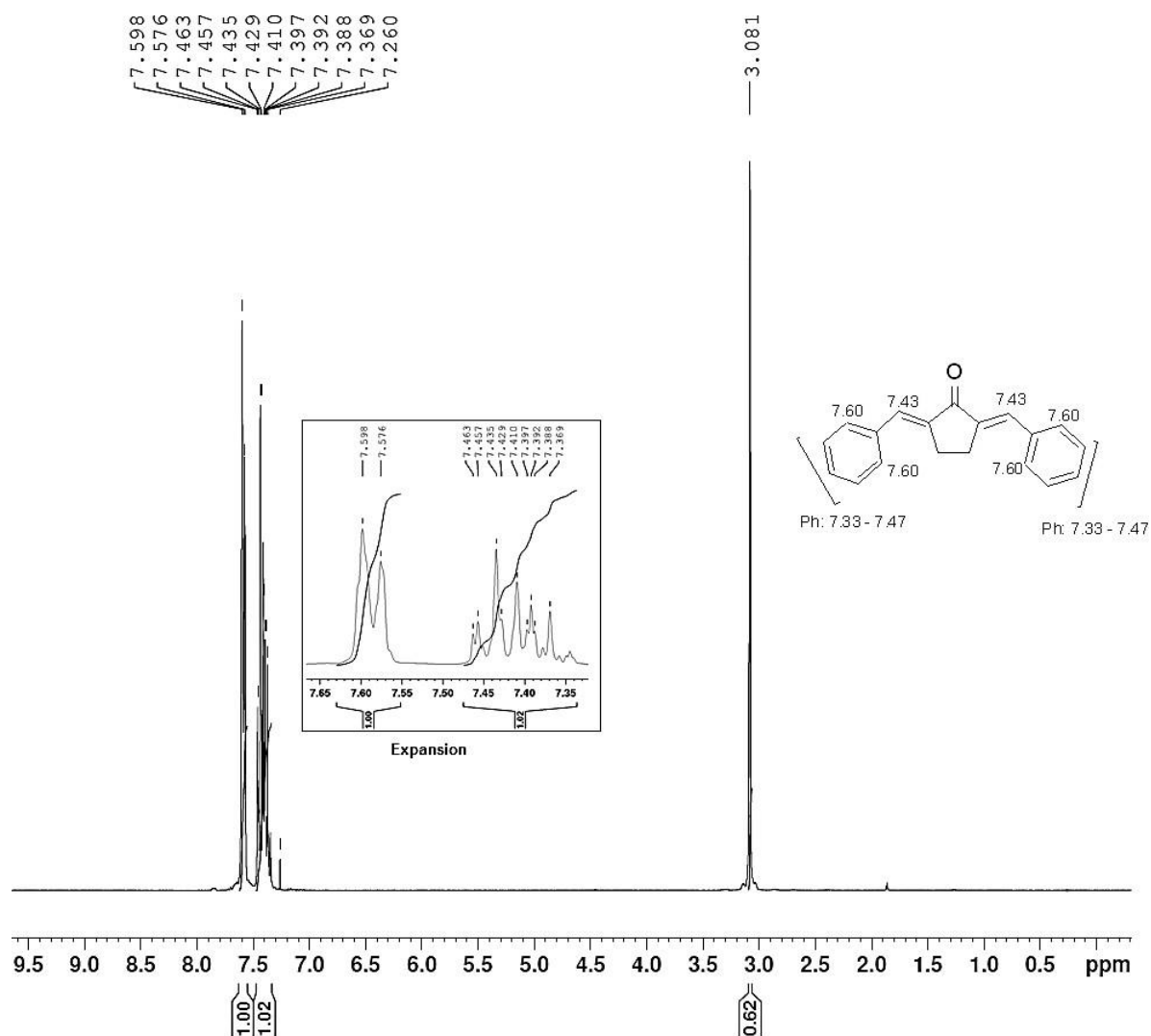


Fig. S49. ¹H NMR spectrum of analogue 7a.

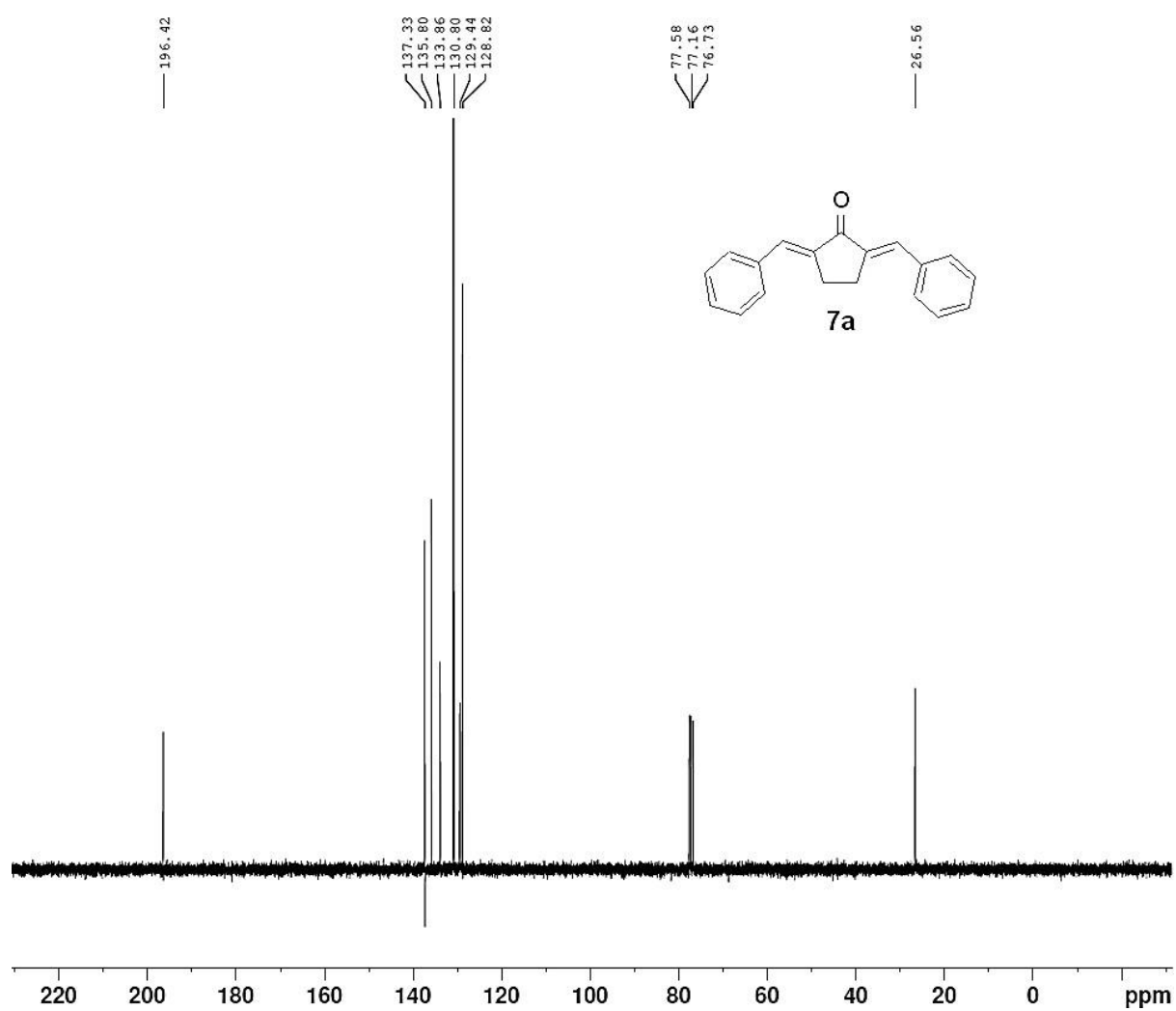
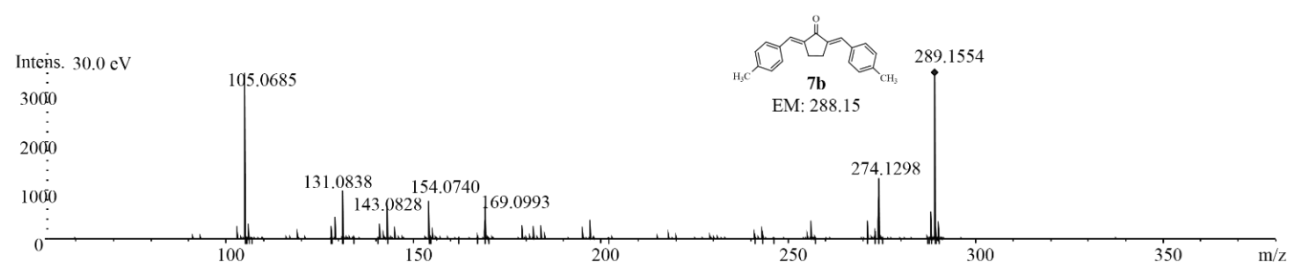
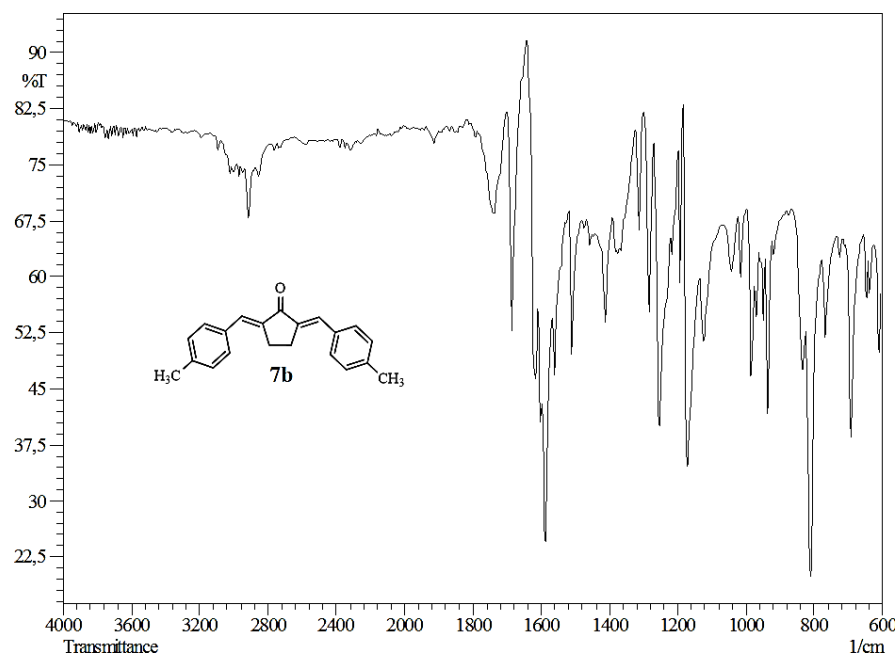


Fig. S50. ^{13}C NMR spectrum of analogue 7a.

(2E,5E)-2,5-bis(4-methylbenzylidene)cyclopentanone (7b)

C₂₁H₂₀O. EM: 288.15; MW: 288.38; Yield: 60%; yellow solid; mp (°C): 243 – 244 (Lit.: 243 - 245 [36]); CLog P^a: 5.77; IR ν_{max} / cm⁻¹ 2909, 2850 (C-H), 1687 (C=O), 1615, 1584 (C=C), 1169, 809 (C-C); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.57 (s, 2H, 2x =CH); 7.50 (d, 4H, *J* = 8 Hz, 2x Ar); 7.24 (d, 4H, *J* = 8 Hz, 2x Ar); 3.08 (s, 4H, 2x CH₂); 2.4 (s, 6H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 196.62; 139.89; 136.62; 133.84; 130.23; 130.12; 130.06; 133.81; 133.20; 130.91; 129.65; 26.55; 21.65. MS (APCI) *m/z*: 289.15 (M+1)⁺.

**Fig. S51.** Mass spectrum of analogue **7b**.**Fig. S52.** Infrared spectrum of analogue **7b**.

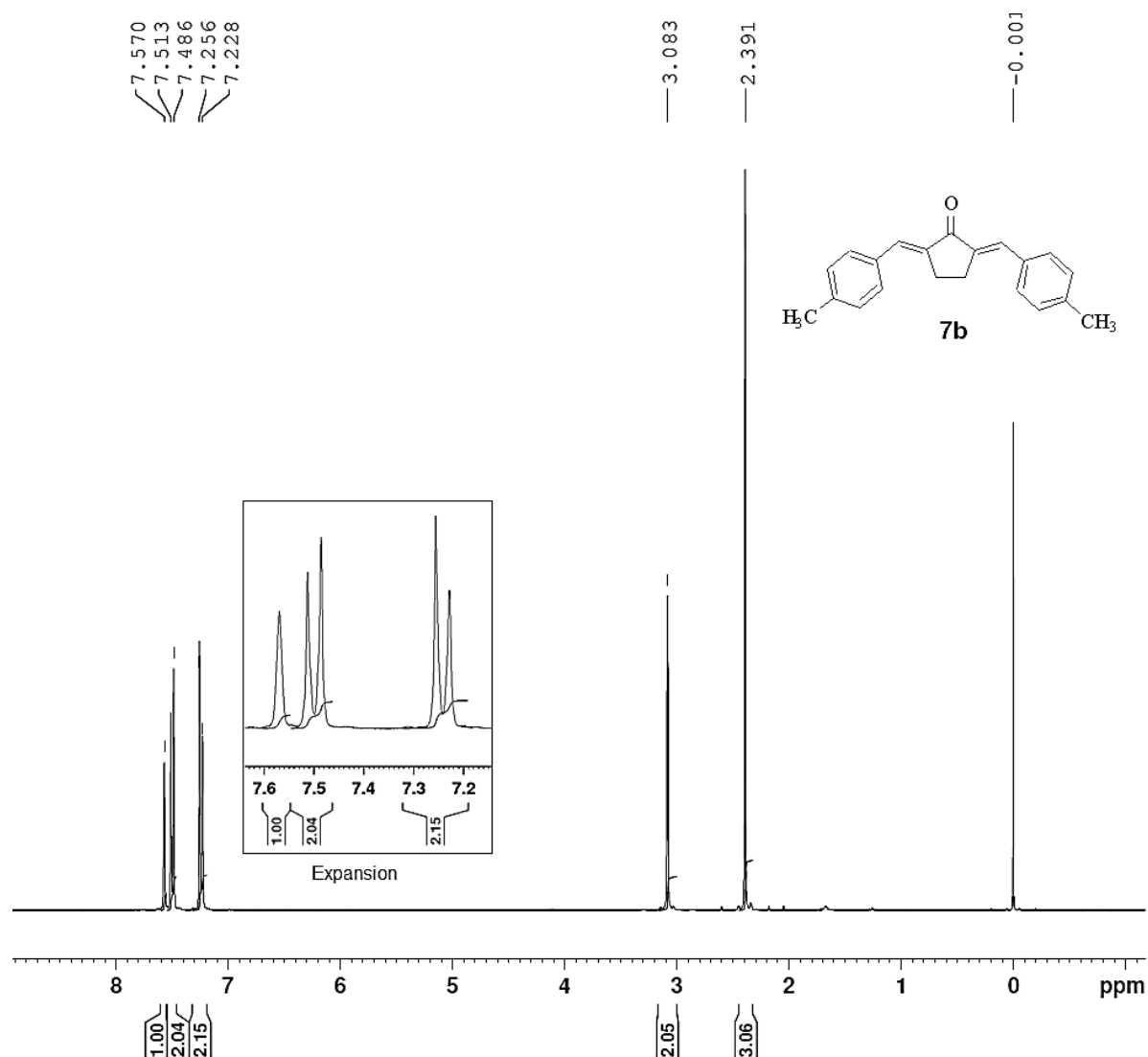


Fig. S53. ¹H NMR spectrum of analogue **7b**.

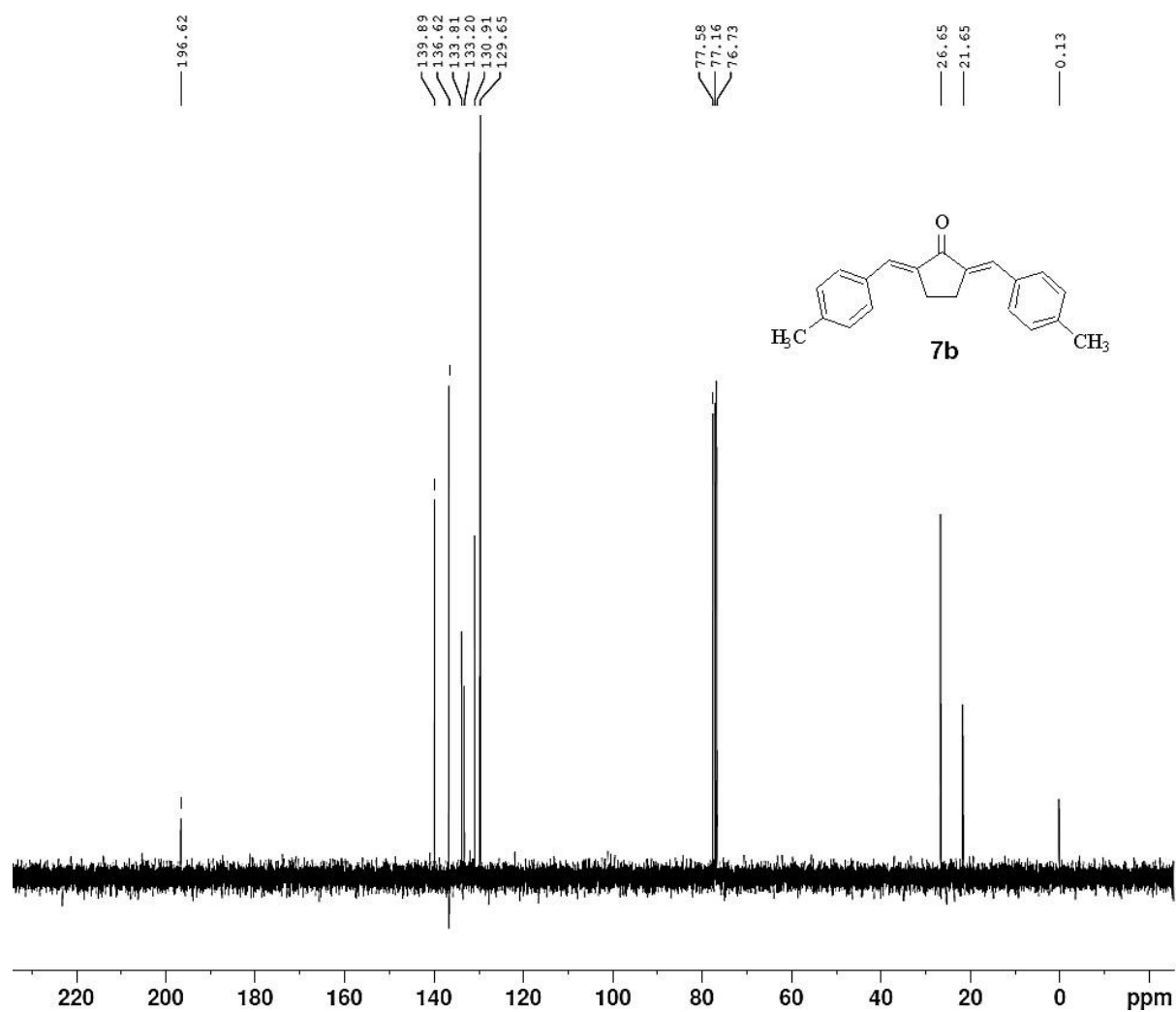
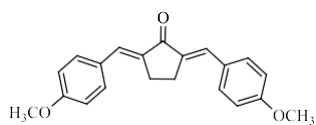


Fig. S54. ^{13}C NMR spectrum of analogue **7b**.

(2*E*,5*E*)-2,5-bis(4-methoxybenzylidene)cyclopentanone (**7c**)

$C_{21}H_{20}O_3$. EM: 320.14; MW: 320.38; Yield: 75%; yellow solid; mp ($^{\circ}C$): 215 – 217 (Lit.: 210 – 211 [38]); CLog P^a : 4.61; IR ν_{max} / cm^{-1} 2966, 2842 (C-H), 1694 (C=O), 1630, 1595 (C=C), 1246, 1032 (C-O), 1167 (C-C); 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.56 (d, 4H, J = 9.0 Hz, 2x Ar); 7.37 (s, 2H, 2x =CH); 6.95 (d, 4H, J = 9.0 Hz, 2x Ar); 3.8 (s, 6H, 2x OCH_3); 3.07 (s, 4H, 2x CH_2); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 196.4; 160.5; 135.3; 133.3; 132.6; 128.8; 114.3; 55.4; 26.5. MS (APCI) m/z : 321.14 ($M+1$) $^{+1}$.

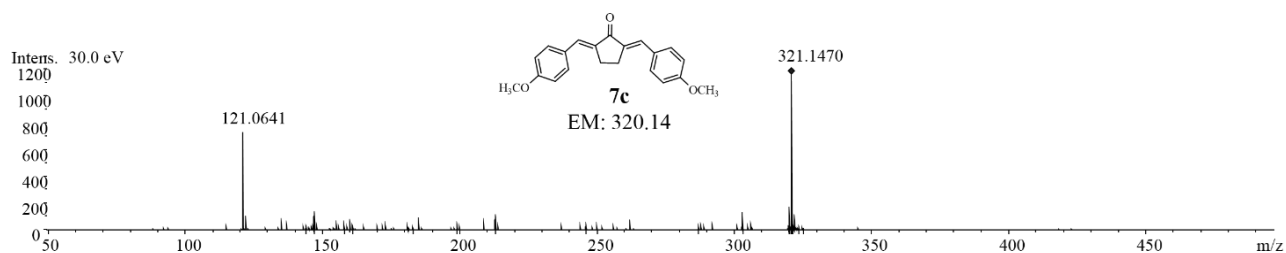


Fig. S55. Mass spectrum of analogue **7c**.

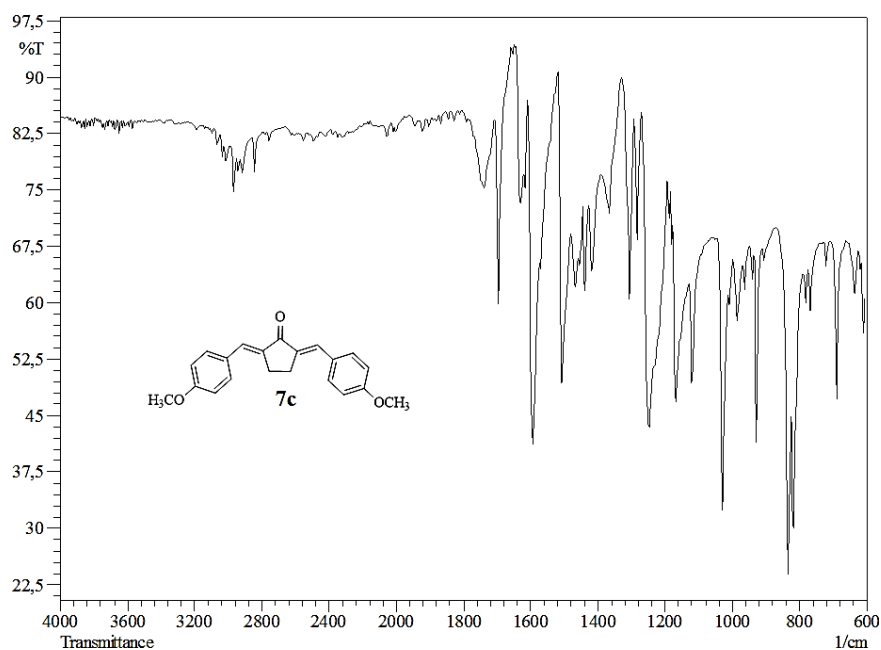


Fig. S56. Infrared spectrum of analogue **7c**.

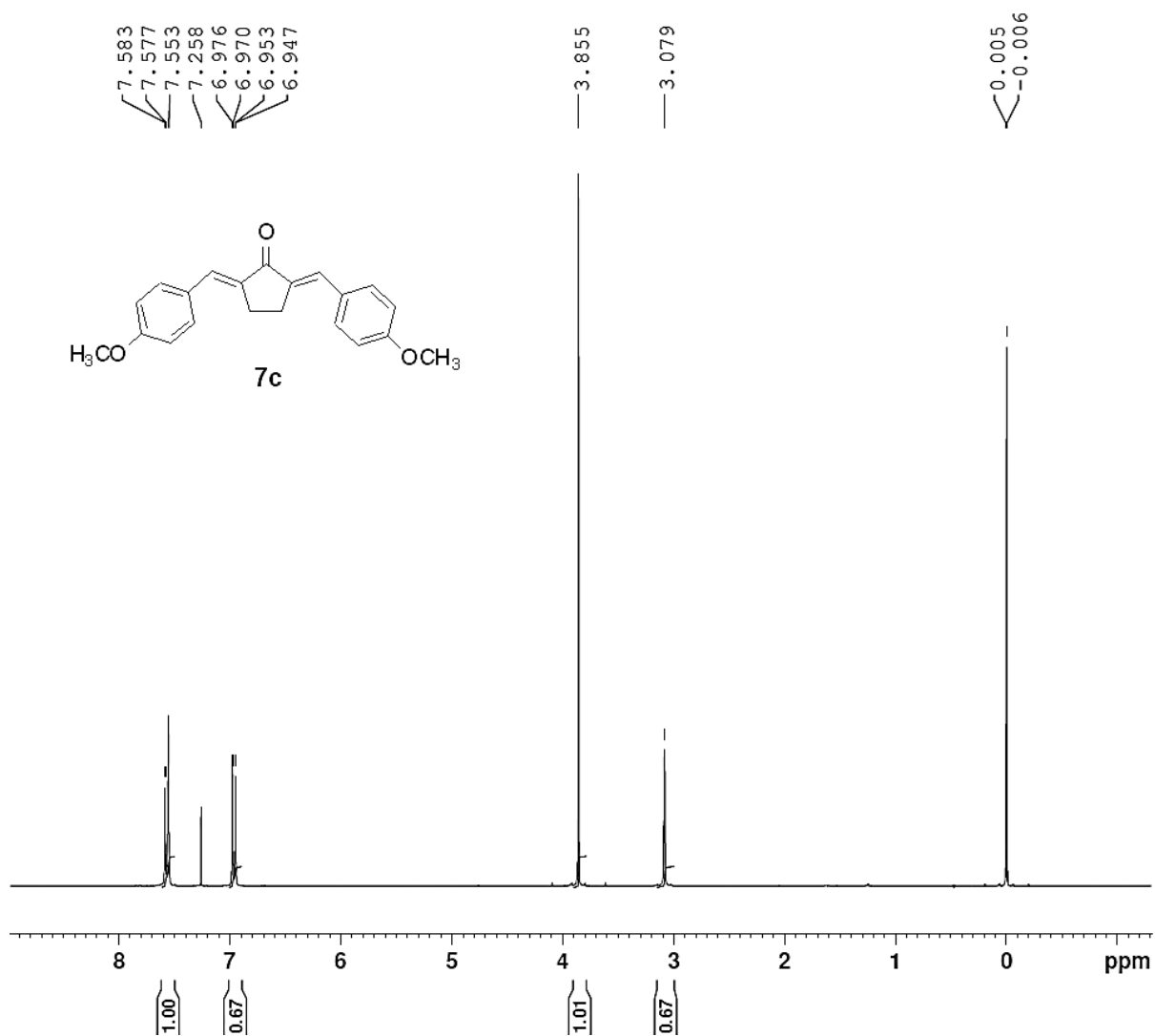


Fig. S57. ¹H NMR spectrum of analogue 7c.

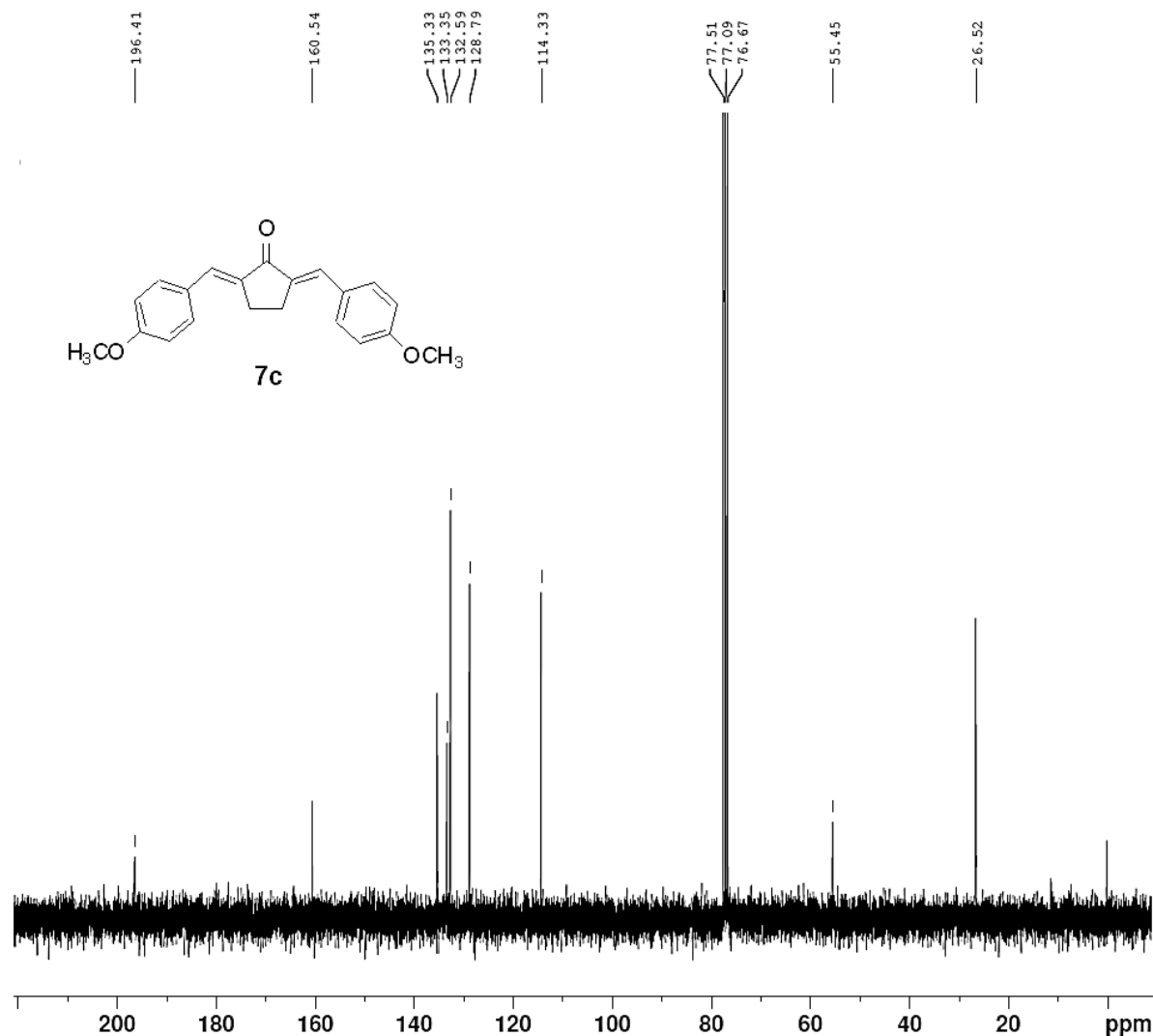
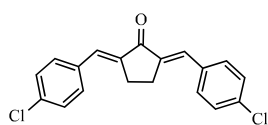


Fig. S58. ¹³C NMR spectrum of analogue **7c**.

(2*E*,5*E*)-2,5-bis(4-chlorobenzylidene)cyclopentanone (**7d**)



C₁₉H₁₄Cl₂O. EM: 328.04; MW: 329.22; Yield: 82%; yellow crystals; mp (°C): 225 – 228 (Lit.:227 – 229 [36]); CLog P^a: 6.198; IR ν_{max} / cm⁻¹ 2933, 2914 (C-H), 1694 (C=O), 1606, 1580 (C=C), 927 (C-C), 816, 682 (C-Cl); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): same pattern as **7f**. MS (APCI) m/z: 329.04 (M+1)⁺.

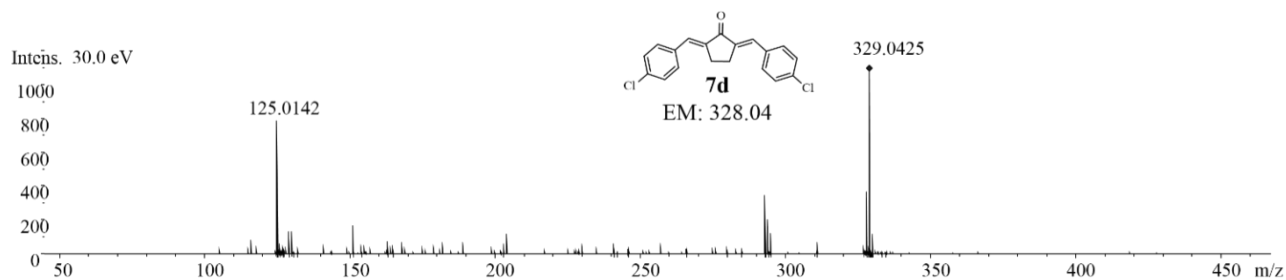


Fig. S59. Mass spectrum of analogue **7d**.

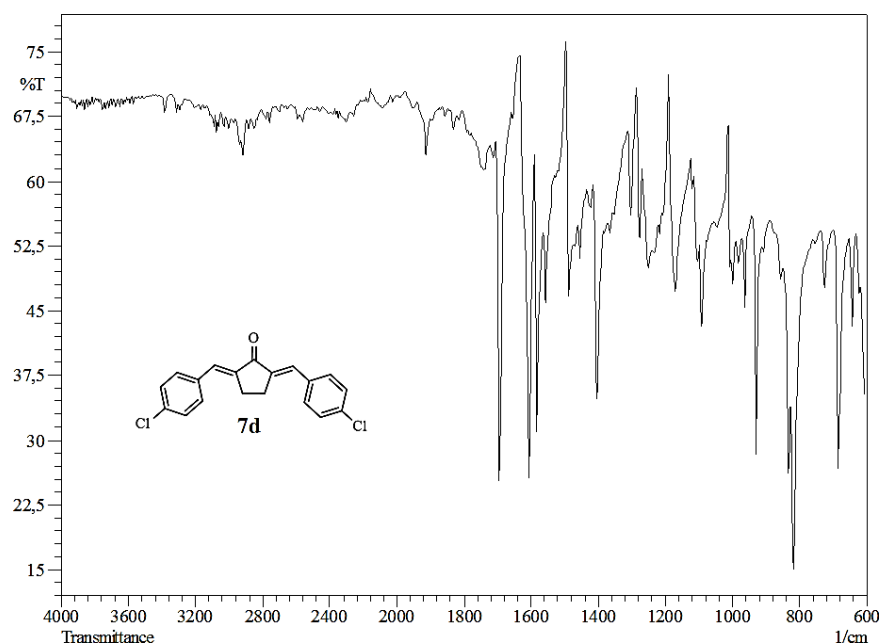
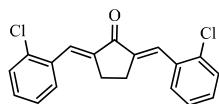


Fig. S60. Infrared spectrum of analogue **7d**.

(2E,5E)-2,5-bis(2-chlorobenzylidene)cyclopentanone (7e**)**



$C_{19}H_{14}Cl_2O$. EM: 328.04; MW: 329.22; Yield: 69%; yellow crystals; mp ($^{\circ}C$): 158 – 160 (Lit.: 155 – 158 [28]); CLog P^a : 6.198; IR ν_{max} / cm^{-1} : 3067, 3049, 2926, 2911 (C-H), 1685 (C=O), 1600, 1587 (C=C), 1180, 1036 (C-C), 750 (C-Cl); 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.92 (s, 2H, 2x =CH); 7.30 – 7.56 (m, 8H, 2x Ar); 2.9 (s, 4H, 2x CH_2); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 195.5; 139.3; 136.0; 133.8; 130.12; 130.1; 126.6; 26.5. MS (APCI) m/z : 329.05 ($M+1$) $^{+1}$.

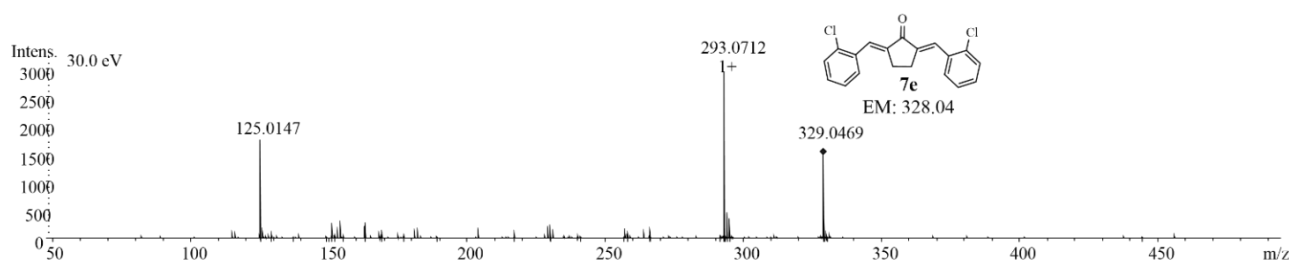


Fig. S61. Mass spectrum of analogue **7e**.

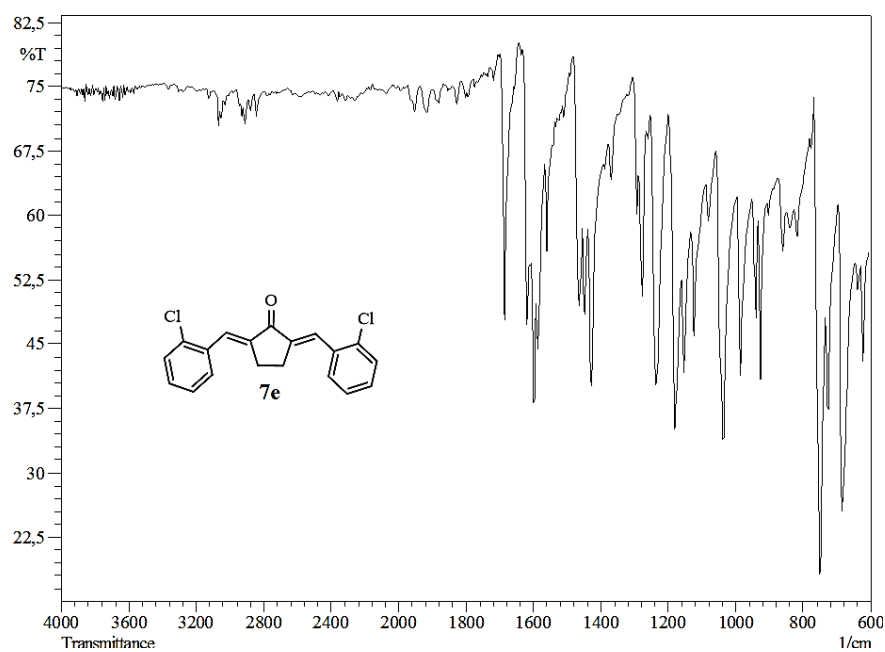


Fig. S62. Infrared spectrum of analogue **7e**.

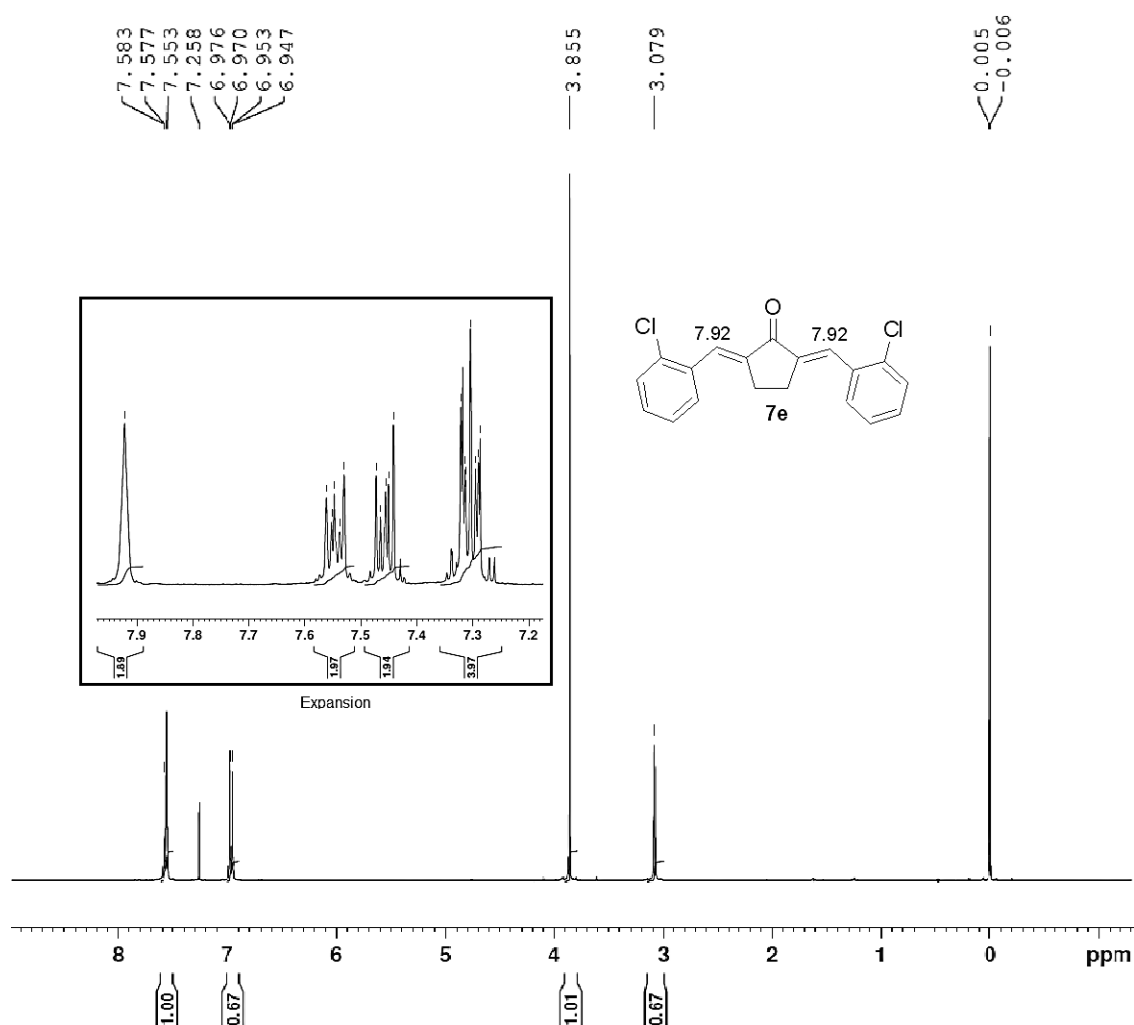


Fig. S63. ^1H NMR spectrum of analogue **7e**.

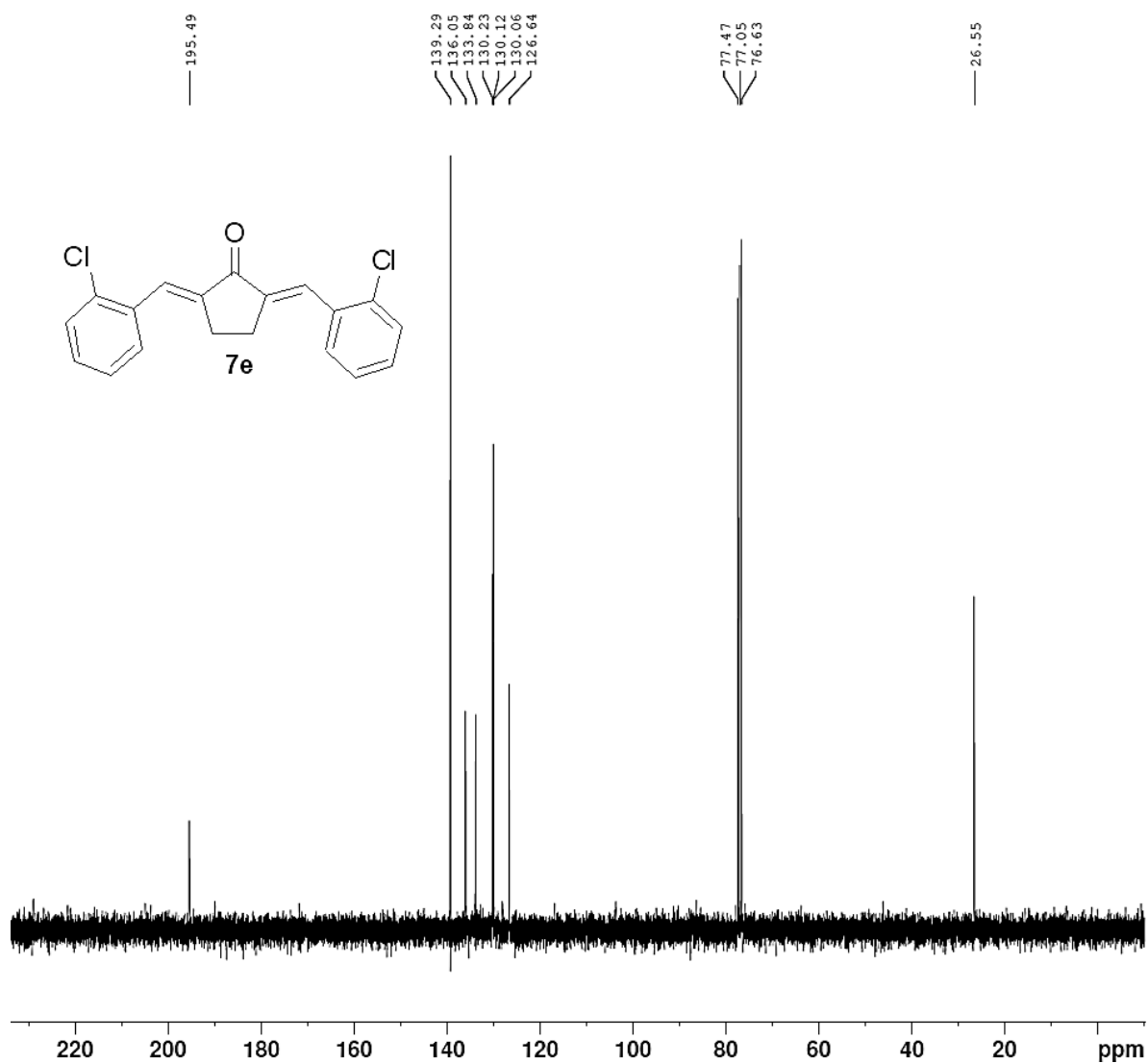
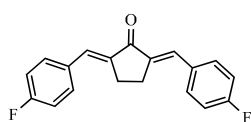


Fig. S64. ^{13}C NMR spectrum of analogue **7e**.

(2*E*,5*E*)-2,5-bis(4-fluorobenzylidene)cyclopentanone (**7f**)

$C_{19}H_{14}F_2O$. EM: 296.10; MW: 296.31; Yield: 80%; pale yellow solid; mp ($^{\circ}C$): 237 – 239 (Lit.: 239 – 240 [37]); CLog P^a : 5.058; IR ν_{max} / cm^{-1} n; 2921, 2907 (C-H), 1689 (C=O), 1587 (C=C), 1226 (C-F), 1183, 827 (C-C); 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.6 (d, 4H, $J = 8.9$ Hz, 2x Ar); 7.57 (s, 2H, 2x =CH); 7.14 (d, 4H, $J = 9.0$ Hz, 2x Ar); 3.09 (s, 4H, 2x CH_2); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 196.25; 163.2 (d, 1C, $J_{CF}^1 = 249.6$ Hz, Ar-F); 136.8; 132.84 (d, 1C, $J_{CF}^4 = 3.10$ Hz, Ar-F); 132.7 (d, 2C, $J_{CF}^3 = 8.17$ Hz, Ar-F); 132.13; 132.08; 116.15 (d, 2C, $J_{CF}^2 = 24.0$ Hz, Ar-F); MS (APCI) m/z : 297.10 ($M+1$) $^{+1}$.

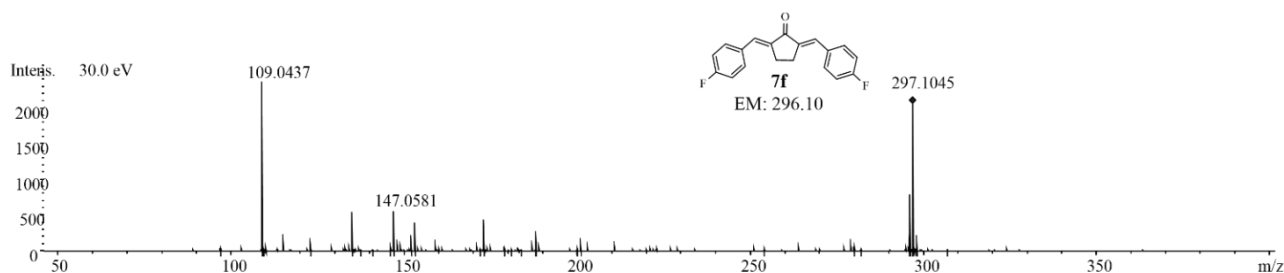


Fig. S65. Mass spectrum of analogue **7f**.

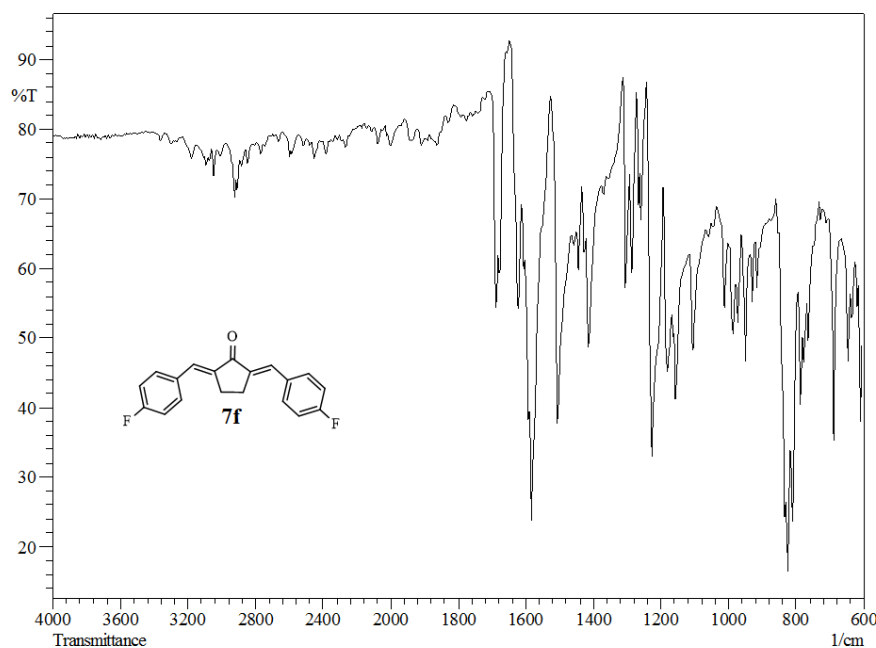


Fig. S66. Infrared spectrum of analogue **7f**.

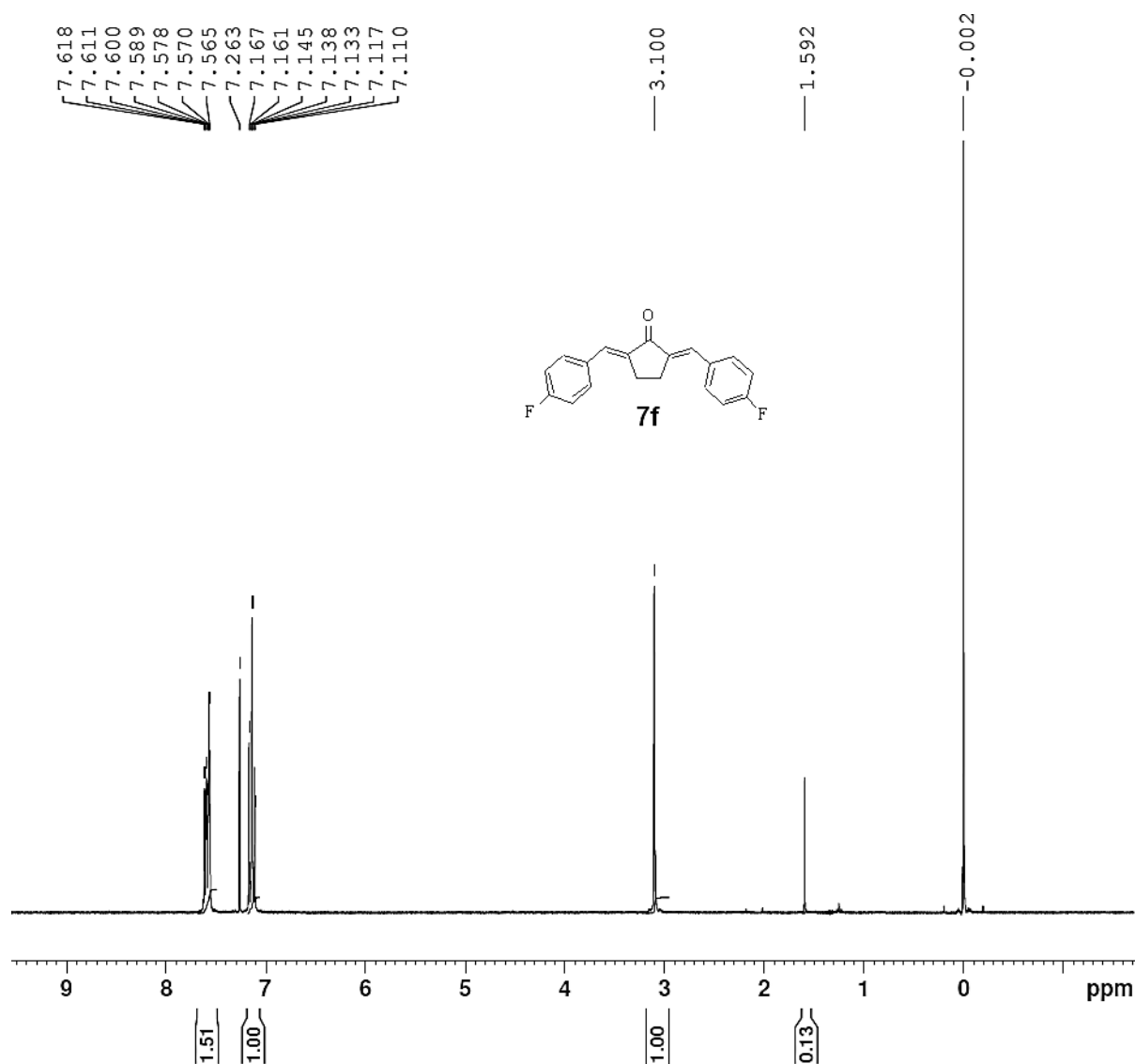


Fig. S67. ^1H NMR spectrum of analogue **7f**.

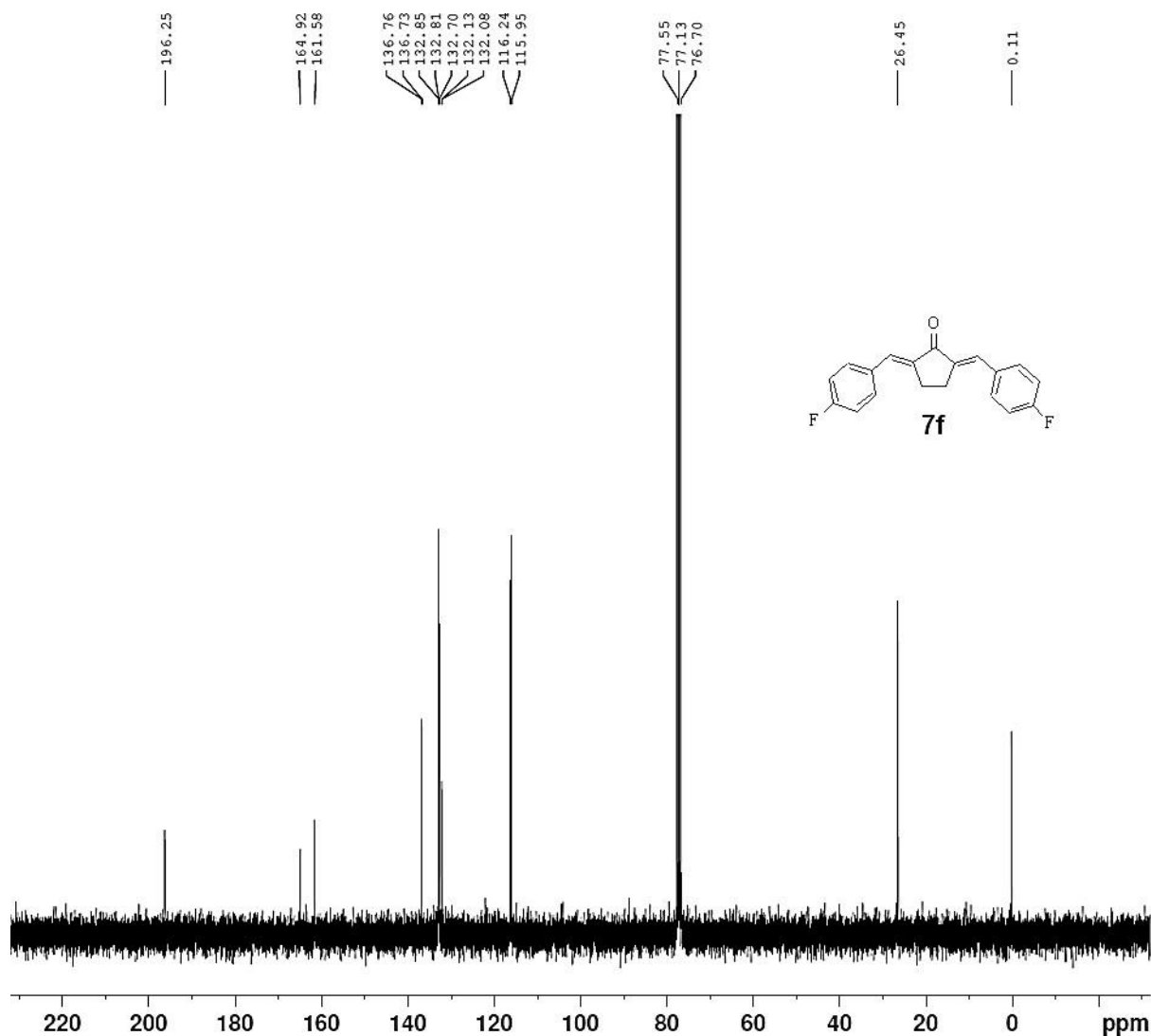


Fig. S68. ¹³C NMR spectrum of analogue **7f**.

(1*E*,3*E*,6*E*,8*E*)-1,9-diphenylnona-1,3,6,8-tetraen-5-one (**9a**)

C₂₁H₁₈O. EM: 286.14; MW: 286.37; Yield: 42%; orange crystals; mp (°C): 141 – 142 (Lit.: 142 [37]); CLog P^a: 5.336; IR ν_{max} / cm⁻¹: 3029, 3019 (C-H), 1654 (C=O), 1589, 1563 (C=C), 1067, 995 (C-C); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.60 (d, 4H, *J* = 7.2 Hz, 2x Ph); 7.52 (q, 2 H, *J* = 15 Hz, 2x =C-H β); 7.40 (t, 4H, *J* = 7.2 Hz, 2x Ph); 7.33 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, 2x Ph); 7.02 (d, 2H, *J* = 16.5 Hz, 2x =C-H-Ph); 6.71 (d, 2H, *J* = 16.5 Hz, 2x =CH); 6.69 (d, 2H, *J* = 15 Hz, 2x =C-H α); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 188.9; 142.9; 141.4; 136.1; 129.1; 128.9; 128.8; 127.2; 126.9. MS (APCI) *m/z*: 287.13 (M+1)⁺.

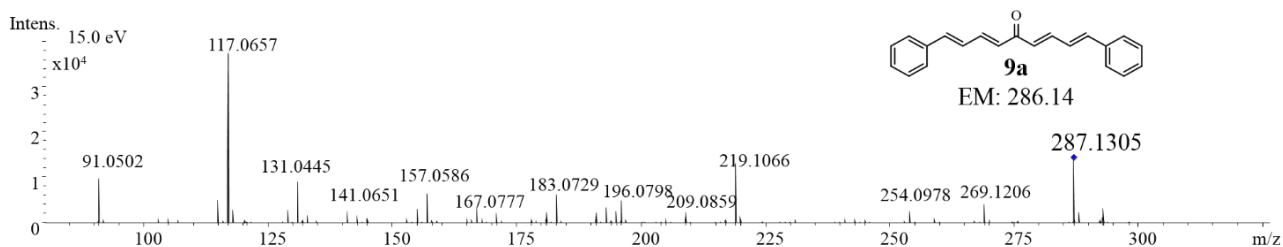
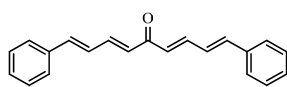


Fig. S69. Mass spectrum of analogue **9a**.

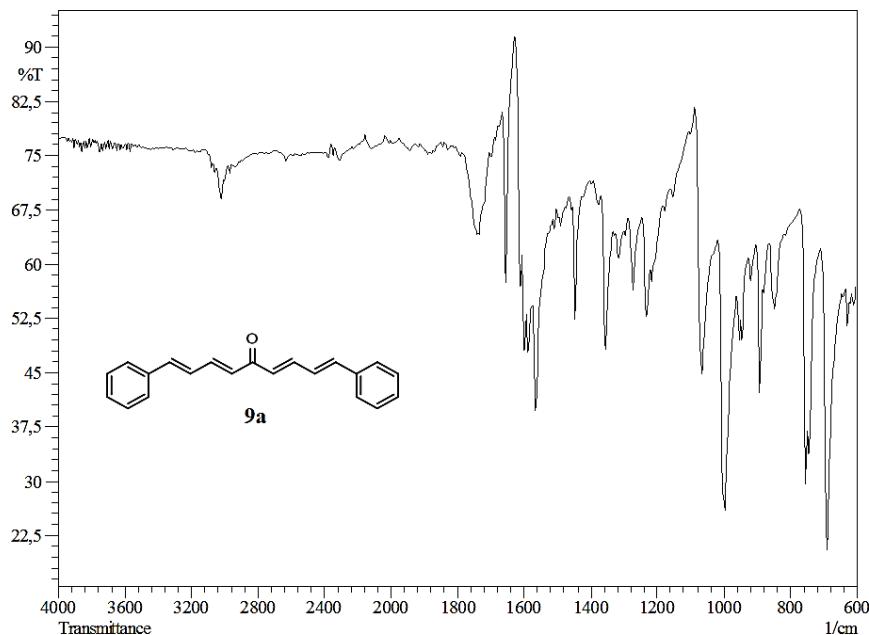


Fig. S70. Infrared spectrum of analogue **9a**.

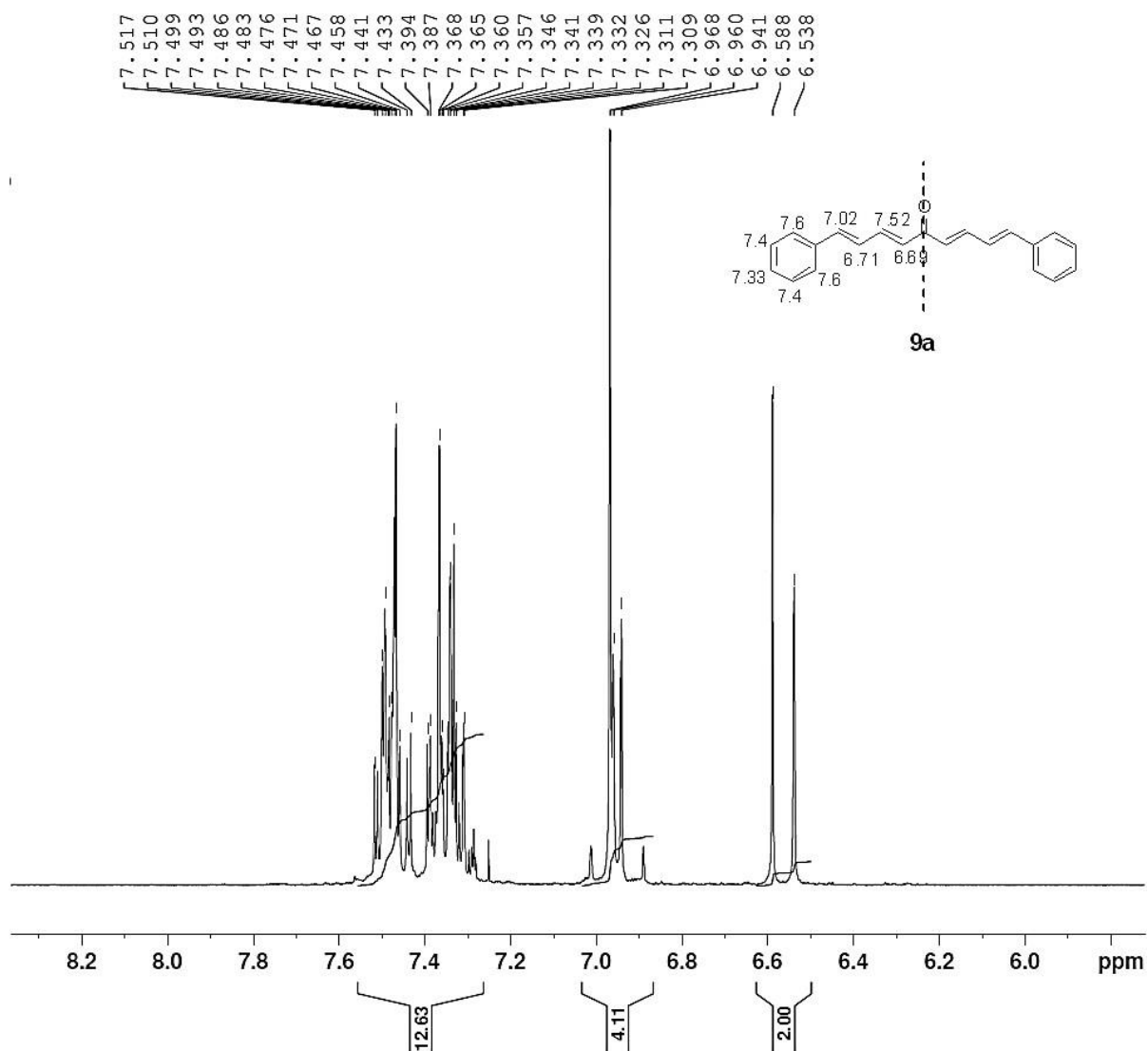


Fig. S71. ^1H NMR spectrum of analogue **9a**.

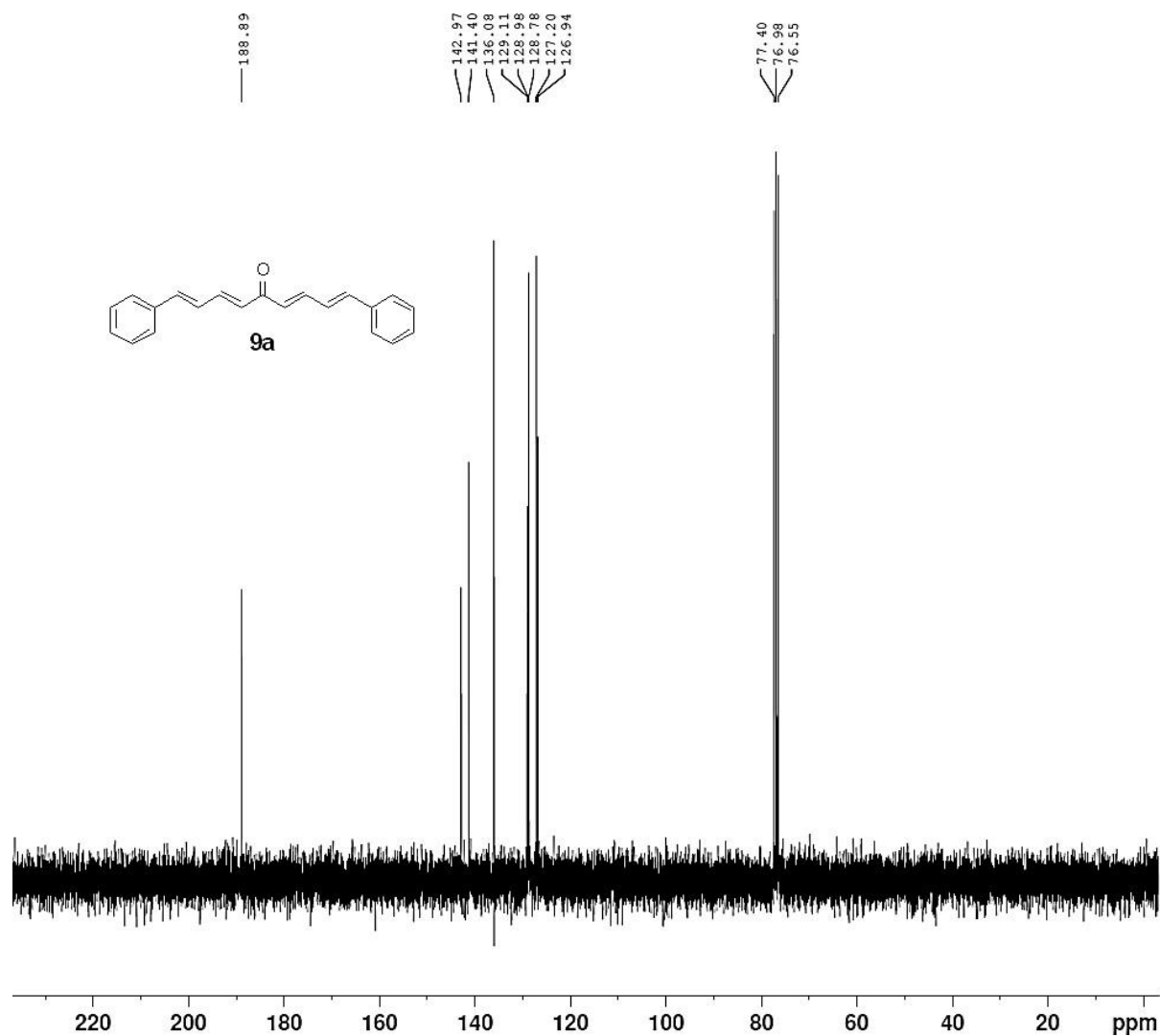
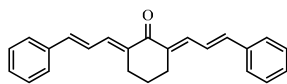


Fig. S72. ^{13}C NMR spectrum of analogue **9a**.

(2*E*,6*E*)-2,6-bis((*E*)-3-phenylallylidene)cyclohexanone (**9b**)



C₂₂H₂₂O. EM: 326.17; MW: 326.43; Yield: 44%; orange solid; mp (°C): 177 – 179 (Lit.: 178 - 179 [39]); CLog P^a: 6.389; IR ν_{max} / cm⁻¹ 3007, 2935, 2869 (C-H), 1652 (C=O), 1580 (C=C), 1150, 975, 744 (C-C); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.51 (d, 4H, *J* = 7.2 Hz, 2x Ph); 7.46 (t, 4H, 2x Ph); 7.34 (t, 2H, 2x Ph) 7.29 (d, 2H, 2x =C-Hβ); 7.10 (d, 2H, *J* = 15 Hz, 2x =CH-Ph); 7.06 (d, 2H, *J* = 15 Hz, 2x =CH); 2.9 (t, 4H, 2x CH₂); 1.9 (quint., 2H, CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 188.8; 140.7; 136.7; 136.2; 135.3; 128.75; 128.7; 127.1; 123.6; 26.5. 21.9. MS (APCI) *m/z*: 327.16 (M+1)⁺.

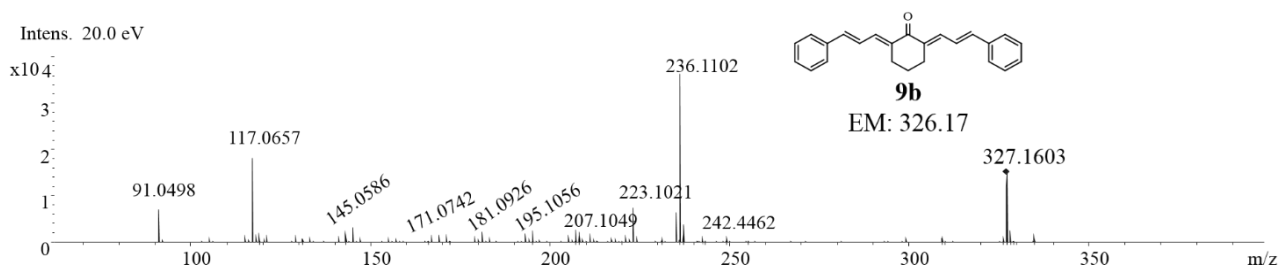


Fig. S73. Mass spectrum of analogue **9b**.

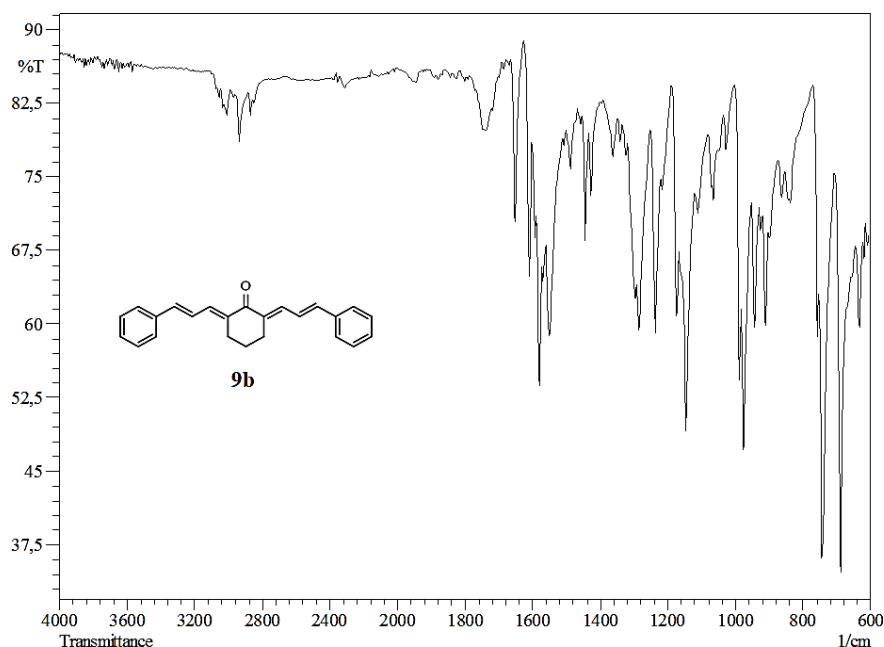


Fig. S74. Infrared spectrum of analogue **9b**.

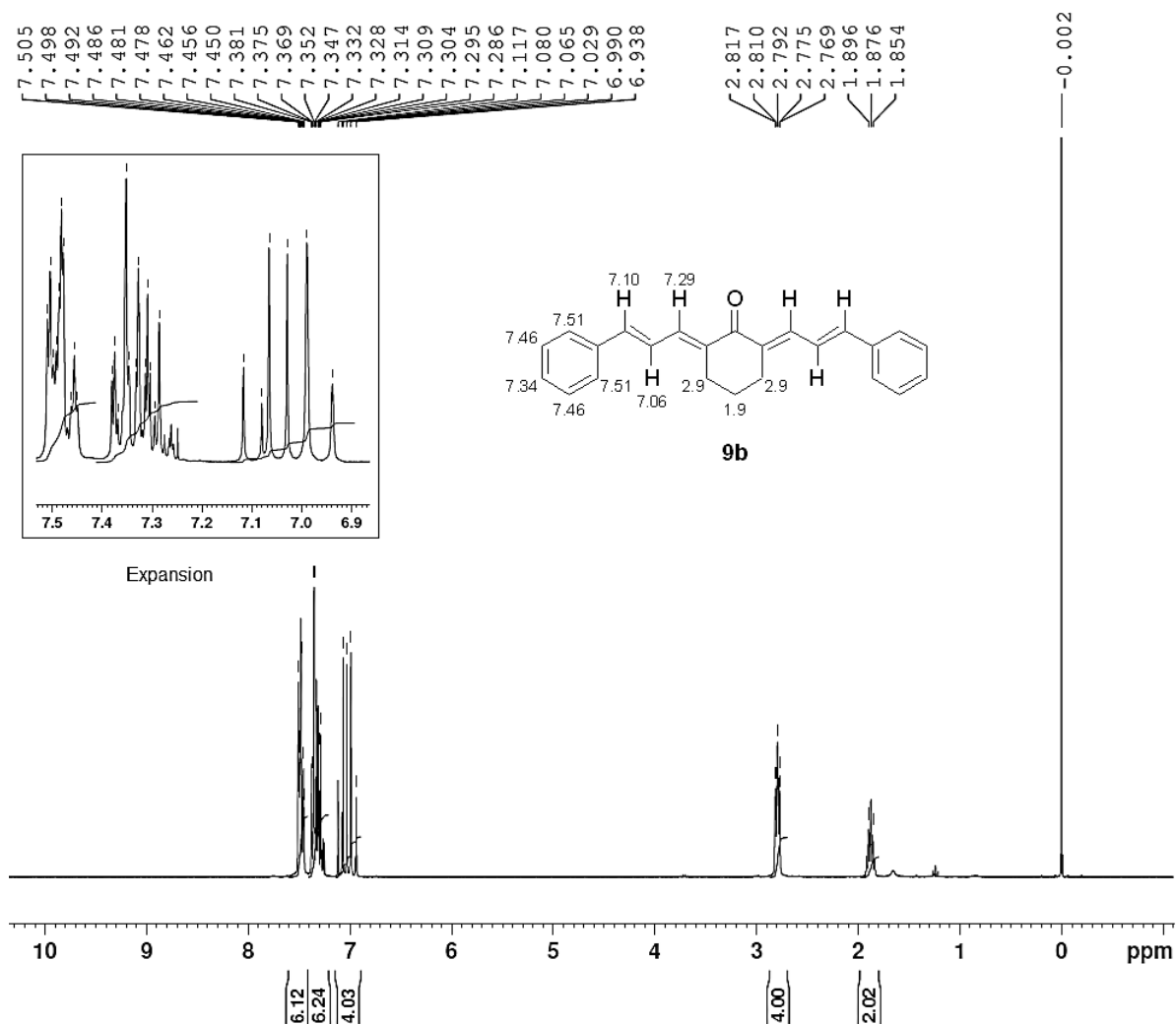


Fig. S75. ^1H NMR spectrum of analogue **9b**.

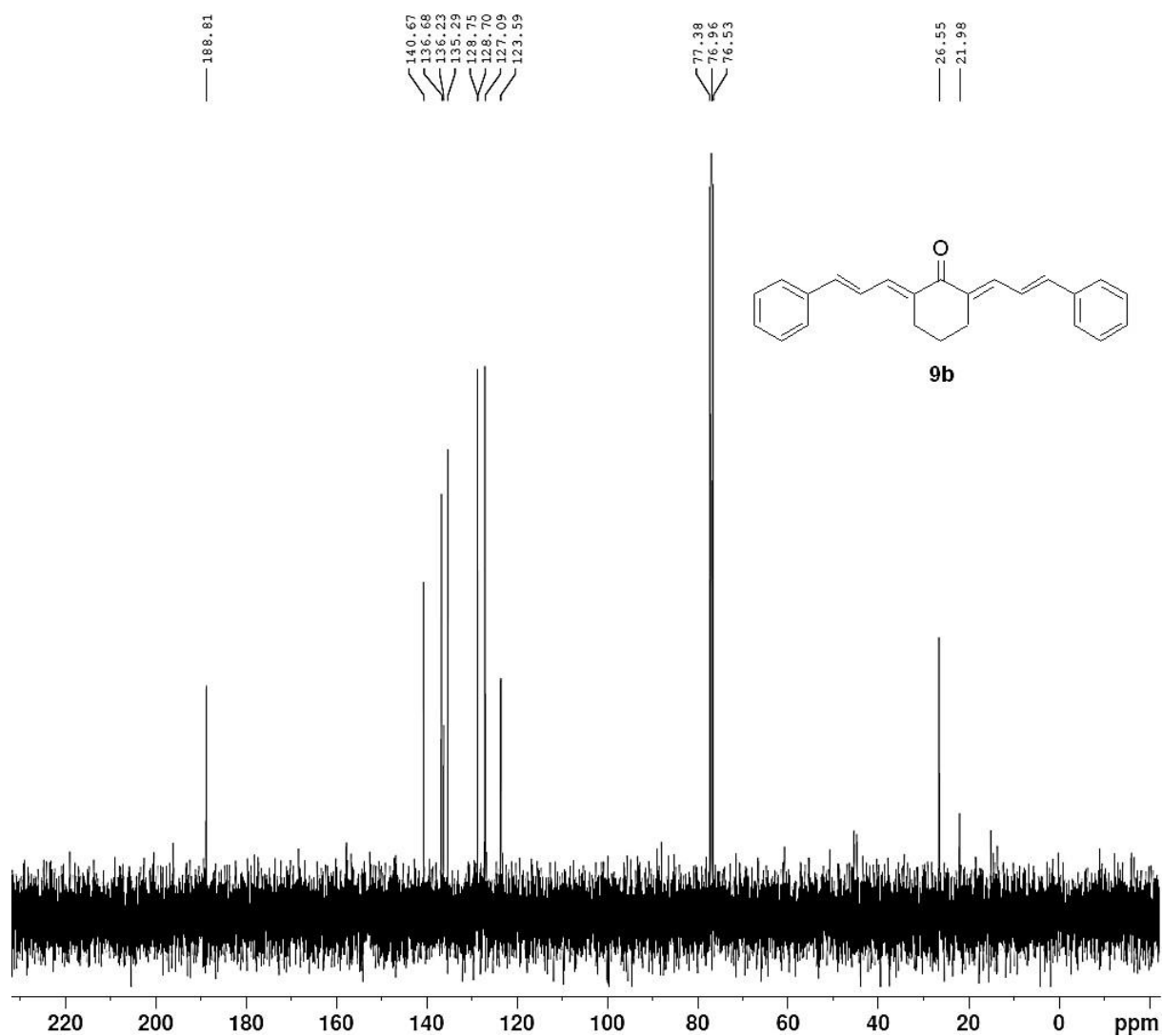
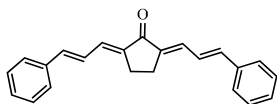


Fig. S76. ¹³C NMR spectrum of analogue **9b**.

(2E,5E)-2,5-bis((E)-3-phenylallylidene)cyclopentanone (9c)

$C_{23}H_{20}O$. EM: 312.15; MW: 312.40; Yield: 61%; orange solid; mp ($^{\circ}C$): 228 – 229 (Lit.: 229 [37]); CLog P^a : 5.83; IR ν_{max} / cm^{-1} : 3025(C-H), 1670 (C=O), 1611, 1580 (C=C), 966, 748 (C-C); 1H NMR (MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.51 (d, 4H, $J = 7.2$ Hz, 2x Ph); 7.4 (t, 4H, $J = 7.2$ Hz, 2x Ph), 7.34 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, 2x Ph), 7.26 (d, 2H, 2x =CH β); 7.2 (d, 2H, $J = 7$ Hz, 2x =CH-Ph), 6.94 (d, 2H, $J = 7$ Hz, 2x =CH); 2.88 (s, 4H, 2x CH_2); ^{13}C NMR (75 $CDCl_3$, MHz) δ (ppm): 194.9; 141.2; 139.7; 136.5; 132.6; 128.9; 128.7; 127.2; 124.7; 23.8. MS (APCI) m/z : 313.14 ($M+1$) $^{+1}$.

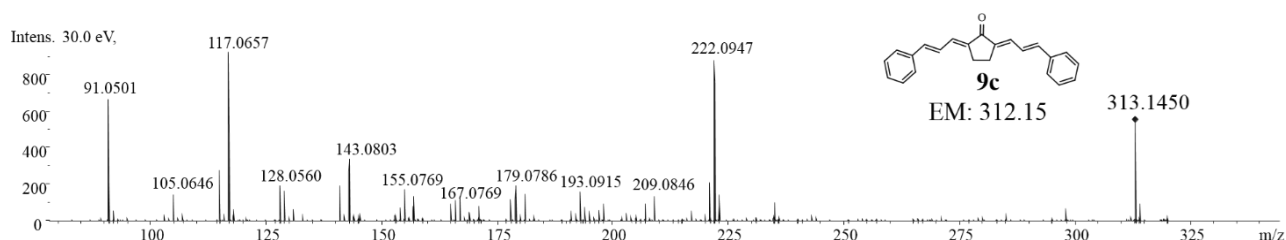


Fig. S77. Mass spectrum of analogue **9c**.

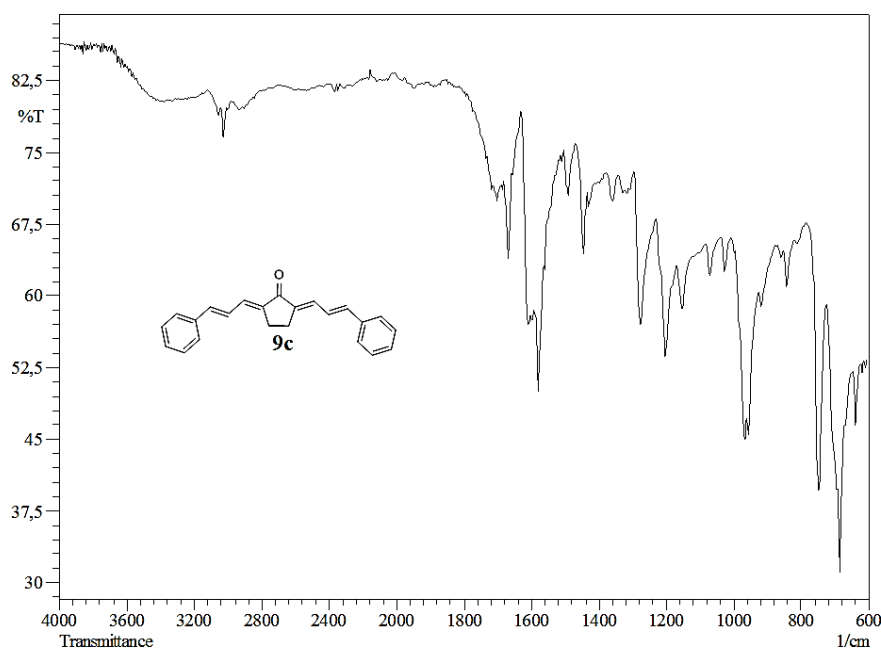


Fig. S78. Infrared spectrum of analogue **9c**.

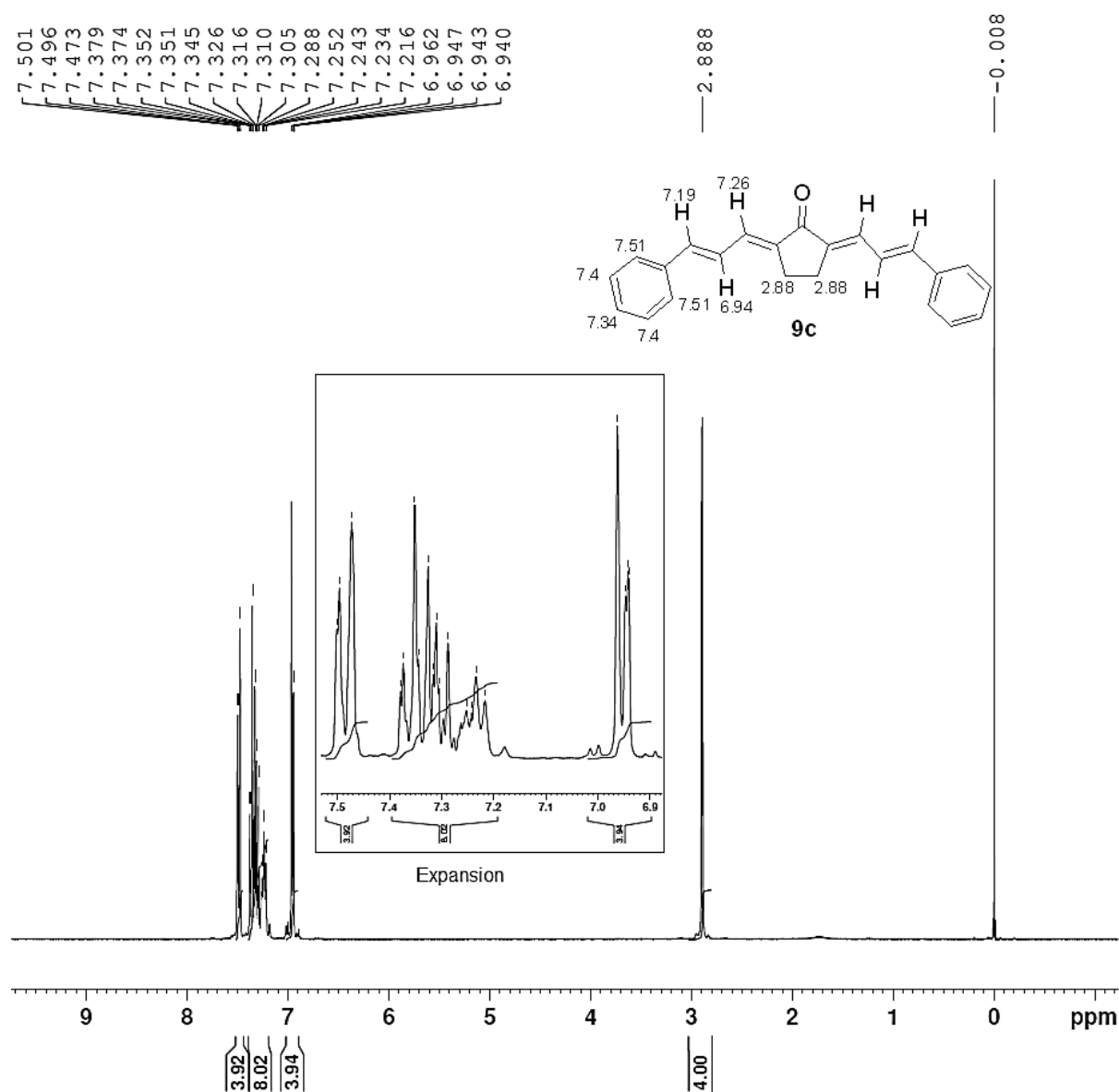


Fig. S79. ¹H NMR spectrum of analogue **9c**.

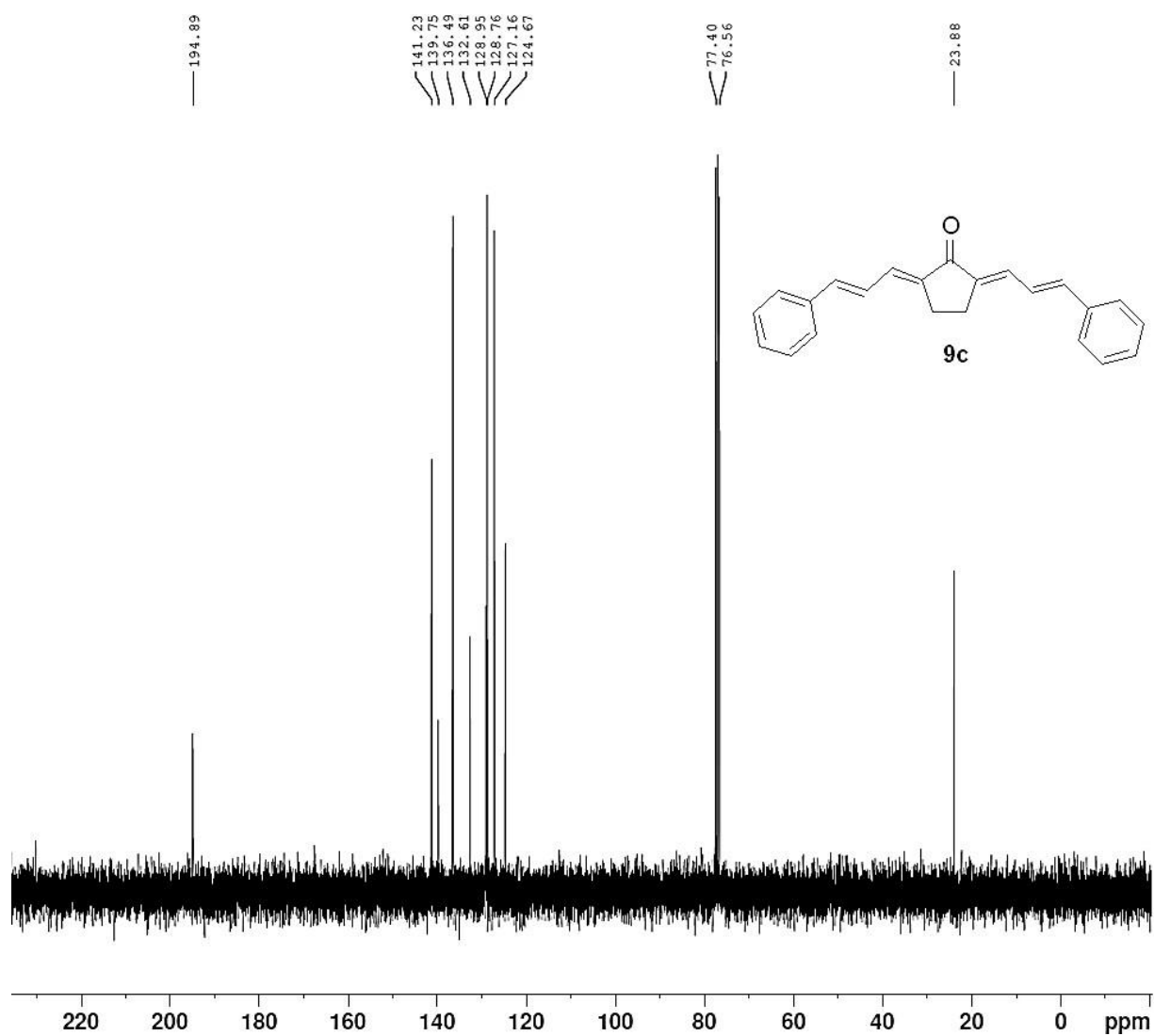


Fig. S80. ^{13}C NMR spectrum of analogue **9c**.

Capítulo 2

PATENTE

Os resultados dessa dissertação constituem parte de patente depositada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

4 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A PATENTE

Os resultados promissores desse estudo em relação ao potencial antiparasitário dos análogos sintéticos da curcumina foram reivindicados pelo nosso grupo de pesquisa na forma de patente depositada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), através da Coordenação de Inovação Tecnológica (CIT) da UFPel. Os grupos envolvidos são do Laboratório de Lipidômica e Bio-orgânica em conjunto com o Laboratório de Biotecnologia Infecto-parasitária coordenados pelo Prof. Dr. Claudio Pereira e Profa. Sibele Borsuk, respectivamente. A seguir estão dispostos o comprovante de depósito de patente intitulada: “FORMULAÇÃO ANTIPARASITÁRIA A PARTIR DE DERIVADOS MONOCARBONÍLICOS DE CURCUMINA” sob o número de processo BR102017011715-4, bem como o resumo da invenção e reivindicações.



02/06/2017

870170037281

11:31



00.000.2.2.17.0427757.9

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2017 011715 4

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 92242080000100

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Gomes Carneiro, 01 - Ed. Delfim Mendes Silveira - Campus
Porto/Reitoria - 4º Andar - PRPPG

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96010-610

País: Brasil

Telefone: (53) 3284 4086

Fax:

Email: cit@ufpel.edu.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 02/06/2017 às
11:31, Petição 870170037281

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de **FORMULAÇÃO ANTIPARASITÁRIA A PARTIR DE DERIVADOS**

Utilidade (54): **MONOCARBONÍLICOS DE CURCUMINA**

Resumo: A presente invenção se refere ao uso de derivados monocarbonílicos de curcumina com o objetivo de obter formulações farmacêuticas com atividades antiparasitária. A ação antiparasitária foi observada quando os compostos sintéticos foram testado em *Trichomonas vaginalis*, onde o parasito demonstrou alterações morfológicas indicando morte parasitária com utilização de baixas concentrações dos compostos em questão.

Figura a publicar: 8

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 02/06/2017 às 11:31, Petição 870170037281

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 9

Nome: BRUNA SILVEIRA PACHECO

CPF: [REDACTED]

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: [REDACTED]

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: [REDACTED]

País: BRASIL

Telefone: [REDACTED]

Fax:

Email: pacheco.sbruna@gmail.com

Inventor 2 de 9

Nome: CAROLINE CARAPINA DA SILVA

CPF: 02456039050

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Mestrando

Endereço: [REDACTED]

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: [REDACTED]

País: BRASIL

Telefone: [REDACTED]

Fax:

Email: carapina7@hotmail.com

Inventor 3 de 9

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 02/06/2017 às 11:31, Petição 870170037281

Nome: SIBELE BORSUK

CPF: [REDACTED]

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: [REDACTED]

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: [REDACTED]

País: BRASIL

Telefone: [REDACTED]

Fax:

Email: sibleborsuk@gmail.com

Inventor 4 de 9

Nome: ÂNGELA SENA LOPES

CPF: [REDACTED]

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: [REDACTED]

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: [REDACTED]

País: BRASIL

Telefone: [REDACTED]

Fax:

Email: angelasena@ymail.com

Inventor 5 de 9

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 02/06/2017 às 11:31, Petição 870170037281

Nome: RAQUEL NASCIMENTO DAS NEVES

CPF: [REDACTED]

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Graduação

Endereço: [REDACTED]

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: [REDACTED]

País: BRASIL

Telefone: [REDACTED]

Fax:

Email: raquelineeves@hotmail.com

Inventor 6 de 9

Nome: TIAGO VEIRAS COLLARES

CPF: [REDACTED]

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: [REDACTED]

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: [REDACTED]

País: BRASIL

Telefone: [REDACTED]

Fax:

Email: collares.t@gmail.com

Inventor 7 de 9

Nome: FABIANA KÖMMLING SEIXAS

CPF: [REDACTED]

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: [REDACTED]

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: [REDACTED]

País: BRASIL

Telefone: [REDACTED]

Fax:

Email: seixas.fk@gmail.com

Inventor 8 de 9

Nome: CLAUDIO MARTIN PEREIRA DE PEREIRA

CPF: [REDACTED]

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: [REDACTED]

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: [REDACTED]

País: BRASIL

Telefone: [REDACTED]

Fax:

Email: claudiochemistry@gmail.com

Inventor 9 de 9

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 02/06/2017 às 11:31, Petição 870170037281

Nome: BRUNO NUNES DA ROSA
 CPF: [REDACTED]
 Nacionalidade: Brasileira
 Qualificação Física: Estudante de Graduação
 Endereço: [REDACTED]
 Cidade: Pelotas
 Estado: RS
 CEP: [REDACTED]
 País: BRASIL
 Telefone: [REDACTED]
 Fax:
 Email: brunondrosa@gmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante pgmto - taxa de depósito 1704277579.pdf
Desenho	DOC DESENHOS_Curcuminas_Trichomonas.pdf
Portaria	DOU_DECRETO_REITOR_2017_2020.pdf
Procuração	PROCURACAO_2017_2020.pdf
Reivindicação	DOC REIVINDICAÇÕES_Curcuminas_Trichomonas 10.05.17.pdf
Relatório Descritivo	DOC RELATÓRIO DESCRITIVO_Curcuminas_Trichomonas.pdf
Resumo	DOC RESUMO_Curcuminas_Trichomonas.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 02/06/2017 às 11:31, Petição 870170037281

1/2

REIVINDICAÇÕES

1. Derivados monocarbonílicos de curcumina com esqueleto estrutural (1*E*,4*E*)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona, (2*E*,6*E*)-2,6-dibenzilidenociclohexanona e (2*E*,5*E*)-2,5-dibenzilidenociclopentanona, caracterizados por apresentarem os substituintes: 4-OCH₃; 3-OCH₃; 3-OCH₃, 4-OH; 4-CH₃; 2-OH; 4-OH; 2-Cl; 4-Cl; 2-F; 4-F; 2-NO₂; 3-NO₂; 4-NO₂; 4-(CH₃)₂N.

2. Formulação farmacêutica de uso oral, contendo os derivados de curcumina reivindicados em 1 e excipientes, tais como polivinilpirrolidona, celulose microcristalina e estearato de magnésio, caracterizado por possuir atividade antiparasitária.

3. Formulação farmacêutica de uso tópico, contendo os derivados de curcumina reivindicados em 1 e veículo em quantidade suficiente, tais como carbomer 934, hidróxido de sódio, propilenoglicol, cloreto de benzalcônio, edetato de sódio, metilparabeno, propilparabeno, álcool etílico, caracterizado por possuir atividade antiparasitária.

4. Formulação farmacêutica reivindicada em 2 e 3, contendo derivados de curcumina reivindicados em 1, caracterizado por compreender atividade anti-*Trichomonas vaginalis* de 6.25µM/mL a 200µM/mL.

5. Formulação farmacêutica reivindicada em 2 e 3, contendo derivados de curcumina reivindicados em 1 associados à fármacos de uso padrão com atividade antiparasitária, tais como Metronidazol e Tiabendazol, caracterizado por compreender atividade anti-*Trichomonas vaginalis* de 6.25µM/mL a 200µM/mL.

6. A utilização da formulação farmacêutica antiparasitária reivindicada em 2 e 3 contendo derivados de curcumina reivindicados em 1 associados ou não à fármacos de uso padrão, caracterizado por possuir as seguintes vias de administração:

2/2

via oral, sublingual, parenteral, cutânea, nasal, oftálmica, auricular, pulmonar, vaginal e retal.

7. A utilização da formulação farmacêutica antiparasitária reivindicada em 2 e 3, contendo derivados de curcumina reivindicados em 1, caracterizado por possuir as seguintes formas farmacêuticas: comprimido, cápsula, pastilhas, drágeas, pós para reconstituição, gotas, xarope, solução oral, suspensão, comprimidos sublinguais, soluções e suspensões injetáveis, soluções tópicas, pomadas, cremes, loção, gel, adesivos, spray e gotas nasais, colírios e pomadas oftálmicas, gotas auriculares ou otológicas e pomadas auriculares, aerossol, comprimidos vaginais, cremes, pomadas, óvulos, supositórios e enemas.

PARTE IV

5 CONCLUSÃO

Esse estudo foi o primeiro a reportar a avaliação da atividade anti-*T. vaginalis* da série de 21 de análogos da curcumina sintetizados. Os análogos foram obtidos a partir de metodologias relativamente simples e reproduzíveis, com rendimentos moderados a bons (24 – 83%), e cujas estruturas foram confirmadas com pureza aceitável. No presente estudo, três moléculas sintéticas, [1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona] (**3a**), [1,5-bis(2-clorofenil) penta-1,4-dien-3-ona] (**3e**) e [2,6-bis(2-clorobenzilideno) ciclohexanona] (**5e**) (**Figura 13**), mostraram valores inibitórios contra *T. vaginalis* comparáveis ao do metronidazol e mais efetivos do que o da curcumina natural. Com base nisto, pode-se concluir que os análogos monocarbonílicos da curcumina apresentam potencial atividade antiparasitária, e mais estudos estão sendo planejados no sentido de elucidar outros parâmetros farmacológicos da atividade reportada.

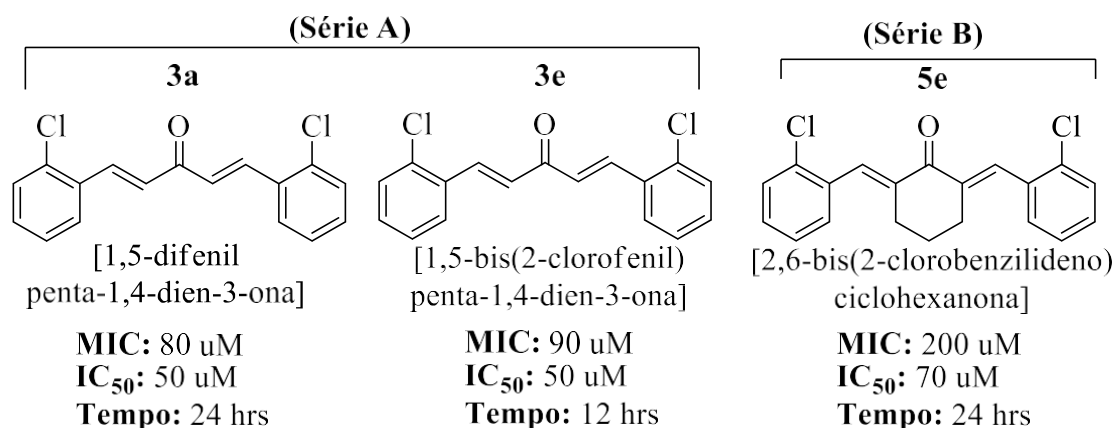


Figura 13. Análogos monocarbonílicos da curcumina com maior potencial anti-*Trichomonas vaginalis*.

6 TRABALHOS CORRELATOS

Durante o período de pós-graduação, os seguintes trabalhos correlatos foram divulgados à comunidade científica:

- Livro publicado na editora Lambert Academic Publishing: PACHECO, B. S.; CARAPINA DA SILVA, C.; PEREIRA, C. M. P. DE. **Curcumin and analogues: chemical and biological aspects**. Lambert Academic Publishing, Saarbrücken, Alemanha, ISBN-13: 978-3-330-03641-3, 64 p., 2017;
- Patente depositada no INPI sob o número BR 10 2017 011715 4: Formulação Antiparasitária a Partir de Derivados Monocarbonílicos de Curcumina; data do depósito: 02/06/2017.
- Capítulo de livro: DA SILVA, C. C.; PACHECO, B. S.; DE FREITAS, S. C.; BERNEIRA, L. M.; DOS SANTOS, M. A. Z.; PIZZUTI, L.; DE PEREIRA, C. M. P. Hydroxychalcones: Synthetic Alternatives to Enhance Oxidative Stability of Biodiesel. In: TRINDADE, M. (Ed.). **Increased Biodiesel Efficiency: Alternatives for Production, Stabilization, Characterization and Use of Coproduct**. Springer International Publishing, 2018. p. 81-110.
- Capítulo de livro: PACHECO, B. S.; DA SILVA, C. C.; DE FREITAS, S. C.; BERNEIRA, L. M.; DA SILVA, V. L.; WINKEL, K.; FERREIRA, L. B.; DE PEREIRA, C. M. P. Employment of Alternative Raw Materials for Biodiesel Synthesis. In: TRINDADE, M. (Ed.). **Increased Biodiesel Efficiency: Alternatives for Production, Stabilization, Characterization and Use of Coproduct**. Springer International Publishing, 2018. p. 33-55.

Trabalhos feitos em colaboração com laboratórios parceiros:

- FOGAÇA, T. B.; MARTINS, R. M.; BEGNINI, K. R.; CARAPINA, C.; RITTER, M.; DE PEREIRA, C. M. P.; SEIXAS, F. K.; COLLARES, T. Apoptotic effect of chalcone derivatives of 2-acetylthiophene in human breast cancer cells. **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 1, p. 156-161, 2017;
- Patente depositada no INPI sob o número **BR 10 2017 027807 7**: Utilização de Análogos de Curcumina como Reveladores de Impressões Digitais Latentes; data do depósito: 21/12/2017;
- Patente depositada no INPI sob o número **BR 10 2016 023358 5**: Agentes Antitumorais à base de Chalconas para Terapêutica do Câncer De Mama; data do depósito: 06/10/2016.

- Patente depositada no INPI sob o número **BR102016018411-8**: Agentes Antitumorais à base de Chalconas para Terapêutica dos Cânceres de Bexiga e do Trato Urinário; data do depósito: 10/08/2016;

7 REFERÊNCIAS

AGUILERA, E.; VARELA, J.; BIRRIEL, E.; SERNA, E.; TORRES, S.; YALUFF, G.; DE BILBAO, N. V.; AGUIRRE-LÓPEZ, B.; CABRERA, N.; DÍAZ MAZARIEGOS, S.; DE GÓMEZ-PUYOU, M. T.; GÓMEZ-PUYOU, A.; PÉREZ-MONTFORT, R.; MININI, L.; MERLINO, A.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; ALVAREZ, G. Potent and Selective Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Triosephosphate Isomerase with Concomitant Inhibition of Cruzipain: Inhibition of Parasite Growth through Multitarget Activity. **ChemMedChem**, v. 11, n. 12, p. 1328-1338, 2016.

ALDERETE, J. F.; SUPRUN-BROWN, L.; KASMALA, L. Monoclonal antibody to a major surface glycoprotein immunogen differentiates isolates and subpopulations of *Trichomonas vaginalis*. **Infection and Immunity**, v. 52, n. 1, p. 70-75, 1986.

ALKHALDI, A. A. M.; CREEK, D. J.; IBRAHIM, H.; KIM, D.-H.; QUASHIE, N. B.; BURGESS, K. E.; CHANGTAM, C.; BARRETT, M. P.; SUKSAMRARN, A.; DE KONING, H. P. Potent trypanocidal curcumin analogs bearing a monoenone linker motif act on *trypanosoma brucei* by forming an adduct with trypanothione. **Molecular pharmacology**, v. 87, n. 3, p. 451-464, 2015.

ÁLVAREZ, G.; PERDOMO, C.; CORONEL, C.; AGUILERA, E.; VARELA, J.; APARICIO, G.; ZOLESSI, F. R.; CABRERA, N.; VEGA, C.; ROLÓN, M.; DE ARIAS, A. R.; PÉREZ-MONTFORT, R.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M. Multi-anti-parasitic activity of arylidene ketones and thiazolidene hydrazines against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. **Molecules**, v. 22, n. 5, p. 1-26, 2017.

AMALRAJ, A.; PIUS, A.; GOPI, S.; GOPI, S. Biological activities of curcuminoids, other biomolecules from turmeric and their derivatives – A review. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 7, n. 2, p. 205-233, 2017.

ANAND, P.; THOMAS, S. G.; KUNNUMAKKARA, A. B.; SUNDARAM, C.; HARIKUMAR, K. B.; SUNG, B.; THARAKAN, S. T.; MISRA, K.; PRIYADARSINI, I. K.; RAJASEKHARAN, K. N.; AGGARWAL, B. B. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, n. 11, p. 1590-1611, 2008.

ANDERSON, M. R.; KLINK, K.; COHRSEN, A. Evaluation of Vaginal Complaints. **Jama**, v. 291, n. 11, p. 1368-79, 2004.

BACHMANN, L. H.; HOBBS, M. M.; SEÑA, A. C.; SOBEL, J. D.; SCHWEBKE, J. R.; KRIEGER, J. N.; MCCLELLAND, R. S.; WORKOWSKI, K. A. *Trichomonas*

vaginalis genital infections: Progress and challenges. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. SUPPL. 3, p. S160-S172, 2011.

BENZAKEN, A. S.; GARCIA, E. G.; SARDINHA, J. C. G.; PEDROSA, V. L.; LOBLEIN, O. Baixa prevalência de DST em profissionais do sexo no município de Manacapuru-interior do Estado do Amazonas, Brasil. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 14, n. 4, p. 9-12, 2002.

BOGITSH, B. J.; CARTER, C. E.; OELTMANN, T. N. Visceral Protozoa II: Flagellates. In: **Human Parasitology**. Fourth ed. Amsterdam: Elsevier, 2013. p. 73-84.

CHAUHAN, I. S.; SUBBARAO, G.; SHANKAR, J.; CHAUHAN, L. K. S.; KAPADIA, G. J.; SINGH, N. Chemoprevention of Leishmaniasis: In vitro antiparasitic activity of dibenzalacetone, a synthetic curcumin analog leads to apoptotic cell death in *Leishmania donovani*. **Parasitology International**, v. 67, n. 5, p. 627-636, 2018.

CLINICAL TRIAL. **Clinical Trials**. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/home>>. Acesso em: 6 jul. 2018.

CUDMORE, S. L.; DELGATY, K. L.; SHANNON, F.; PETRIN, D. P.; GARBER, G. E.; HAYWARD-MCCLELLAND, S. F. Treatment of Infections Caused by Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 783-793, 2004.

DINGSDAG, S. A.; HUNTER, N. Metronidazole: an update on metabolism, structure-cytotoxicity and resistance mechanisms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 2, p. 265-279, 2018.

EMBLEY, T. M.; VAN DER GIEZEN, M.; HORNER, D. S.; DYAL, P. L.; FOSTER, P.; TIELENS, A. G. M.; MARTIN, W.; TOVAR, J.; DOUGLAS, A. E.; CAVALIER-SMITH, T.; BARBROOK, A.; ALLEN, J. F.; LANE, N. Mitochondria and hydrogenosomes are two forms of the same fundamental organelle. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 358, n. 1429, p. 191-203, 2003.

ESATBEYOGLU, T.; HUEBBE, P.; ERNST, I. M. A.; CHIN, D.; WAGNER, A. E.; RIMBACH, G. Curcumin-from molecule to biological function. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 51, n. 22, p. 5308-5332, 2012.

GUPTA, S. C.; KISMALI, G.; AGGARWAL, B. B. Curcumin, a component of turmeric: From farm to pharmacy. **BioFactors**, v. 39, n. 1, p. 2-13, 2013.

HELMS, D. J.; MOSURE, D. J.; SECOR, W. E.; WORKOWSKI, K. A.

Management of *Trichomonas vaginalis* in women with suspected metronidazole hypersensitivity. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 198, n. 4, p. 1-7, 2008.

HOOTS, B. E.; PETERMAN, T. A.; TORRONE, E. A.; WEINSTOCK, H.; MEITES, E.; BOLAN, G. A.; HEPATITIS, V.; SERVICE, E. I.; EDUCATION, S.; DEVELOPMENT, P.; OFFICE, P. A Trich-y Question: Should *Trichomonas vaginalis* Infection be Reportable? **Sexually Transmitted Diseases**, v. 40, n. 2, p. 113-116, 2013.

JOSHI, V. K.; JOSHI, A.; DHIMAN, K. S. The Ayurvedic Pharmacopoeia of India, De. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 197, p. 32-38, 2016.

KIRKCALDY, R. D.; AUGOSTINI, P.; ASBEL, L. E.; BERNSTEIN, K. T.; KERANI, R. P.; METTENBRINK, C. J.; PATHELA, P.; SCHWEBKE, J. R.; EVAN SECOR, W.; WORKOWSKI, K. A.; DAVIS, D.; BRAXTON, J.; WEINSTOCK, H. S. *Trichomonas vaginalis* antimicrobial drug resistance in 6 US cities, STD surveillance network, 2009-2010. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 6, p. 939-943, 2012.

KISSINGER, P.; PH, D.; MENA, L.; LEVISON, J.; REBECCA, A.; PH, D.; GATSKI, M.; PH, D.; HENDERSON, H.; SCHMIDT, N.; ROSENTHAL, S.; PH, D.; MYERS, L.; PH, D.; MARTIN, D. H. A Randomized Treatment Trial: Single Versus 7 Day Dose of Metronidazole for The Treatment of *Trichomonas Vaginalis* Among HIV-Infected Women. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 55, n. 5, p. 565-571, 2010.

KITA, T.; IMAI, S.; SAWADA, H.; KUMAGAI, H.; SETO, H. The Biosynthetic Pathway of Curcuminoid in Turmeric (*Curcuma longa*) as Revealed by ¹³C-Labeled Precursors. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 72, n. 7, p. 1789-1798, 2008.

LAMPE, V.; MILOBEDZKA, J. Studien über Curcumin. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 46, n. 2, p. 2235-2240, 1913.

LEE, K. H.; FARIDA, F. H.; SYAHIDA, A.; ABAS, F.; SHAARI, K.; ISRAF, D. A.; LAJIS, N. H. Synthesis and biological evaluation of curcumin-like diarylpentanoid analogues for anti-inflammatory, antioxidant and anti-tyrosinase activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 3195-3200, 2009.

LIANG, G.; YANG, S.; JIANG, L.; ZHAO, Y.; SHAO, L.; XIAO, J.; YE, F.; LI, Y.; LI, X. Synthesis and anti-bacterial properties of mono-carbonyl analogues of curcumin. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 56, n. 2, p. 162-167, 2008.

LIANG, G.; SHAO, L.; WANG, Y.; ZHAO, C.; CHU, Y.; XIAO, J.; ZHAO, Y.; LI, X.; YANG, S. Exploration and synthesis of curcumin analogues with improved structural stability both in vitro and in vivo as cytotoxic agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 2623-2631, 2009.

LIQIN, D.; WEI, W.; AIQING, Z. Synthesis of 1,5-dinitroaryl-1,4-pentadien-3-ones under ultrasound irradiation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 14, n. 5, p. 563-567, 2007.

LIU, Y. M.; ZHANG, Q. Z.; XU, D. H.; FU, Y. W.; LIN, D. J.; ZHOU, S. Y.; LI, J. P. Antiparasitic efficacy of curcumin from *Curcuma longa* against *Ichthyophthirius multifiliis* in grass carp. **Veterinary Parasitology**, v. 236, p. 128-136, 2017a.

LIU, Y. M.; ZHANG, Q. Z.; XU, D. H.; FU, Y. W.; LIN, D. J.; ZHOU, S. Y. Antiparasitic efficacy of commercial curcumin against *Ichthyophthirius multifiliis* in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). **Aquaculture**, v. 480, p. 65-70, 2017b.

MACIEL, G. DE P.; TASCA, T.; DE CARLI, G. A. Aspectos clínicos, patogênese e diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 3, p. 152-160, 2004.

MALLO, N.; DEFELIPE, A. P.; FOLGUEIRA, I.; SUEIRO, R. A.; LAMAS, J.; LEIRO, J. M. Combined antiparasitic and anti-inflammatory effects of the natural polyphenol curcumin on turbot scuticociliatosis. **Journal of Fish Diseases**, v. 40, n. 2, p. 205-217, 2017.

MARDIANIS, Y.; ANWAR, C.; HARYADI, W. Synthesis of curcumin analogues monoketone from cinnamaldehyde and their inhibition assay against alpha-glucosidase enzyme. **Materials Science Forum**, v. 901, p. 110-117, 2017.

MARTINS, D. DE L. Aldol reactions. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 186-211, 2009.

MCCLELLAND, R. S.; SANGARÉ, L.; HASSAN, W. M.; LAVREYS, L.; MANDALIYA, K.; KIARIE, J.; NDINYA-ACHOLA, J.; JAOKO, W.; BAETEN, J. M. Infection with *Trichomonas vaginalis* Increases the Risk of HIV-1 Acquisition. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 5, p. 698-702, 2007.

MEITES, E.; GAYDOS, C. A.; HOBBS, M. M.; KISSINGER, P.; NYIRJESY, P.; SCHWEBKE, J. R.; SECOR, W. E.; SOBEL, J. D.; WORKOWSKI, K. A. A Review of Evidence-Based Care of Symptomatic Trichomoniasis and Asymptomatic *Trichomonas vaginalis* Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. Suppl 8, p. S837-S848, 2015.

METZLER, M.; PFEIFFER, E.; SCHULZ, S. I.; DEMPE, J. S. Curcumin uptake and metabolism. **BioFactors**, v. 39, n. 1, p. 14-20, 2013.

MIIOBEDZKA, J.; KOSTANECKI, V.; LAMPE, V. Zur Kenntnis des Curcumins. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 43, n. 2, p. 2163-2170, 1910.

MOGHADAMTOUSI, S. Z.; KADIR, H. A.; HASSANDARVISH, P.; TAJIK, H.; ABUBAKAR, S.; ZANDI, K. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. **BioMed Research International**, v. 2014, n. ID 186864, p. 1-12, 2014.

MORAIS, E. R.; OLIVEIRA, K. C.; MAGALHÃES, L. G.; MOREIRA, É. B. C.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; RODRIGUES, V. Effects of curcumin on the parasite *Schistosoma mansoni*: A transcriptomic approach. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 187, n. 2, p. 91-97, 2013.

MORETH, M.; ORNELAS, D.; GOMES, C. R. B.; SOUZA, M. V. N. DE. Nitroimidazoles - a promising class of compounds for the treatment of Tuberculosis. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 2, p. 105-117, 2010.

NEVES, D. P.; MELO, A. L. DE; LINARDI, P. M.; ALMEIDA VITOR, R. W. **Parasitologia Humana**. 11a. ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

NEWMAN, L.; ROWLEY, J.; HOORN, S. VANDER; WIJESOORIYA, N. S.; UNEMO, M.; LOW, N.; STEVENS, G.; GOTTLIEB, S.; KIARIE, J.; TEMMERMAN, M. Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1-17, 2015.

OLIVEIRA, L.; CORREDOURA, A. S.; BEATO, V.; MORAES, F.; SOUSA, S.; PINHEIRO, N.; PIMENTA, J.; ABECASIS, P. Fasciolíase hepática humana tratada com triclabendazol. **Medicina Interna**, v. 9, n. 1, p. 39-42, 2002.

PABON, H. J. J. A synthesis of curcumin and related compounds. **Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas**, v. 83, n. 4, p. 379-386, 1964.

PAGANO, E.; ROMANO, B.; IZZO, A. A.; BORRELLI, F. The clinical efficacy of curcumin-containing nutraceuticals: An overview of systematic reviews. **Pharmacological Research**, v. 134, p. 79-91, 2018.

PEARLMAN, M. D.; YASHAR, C.; ERNST, S.; SOLOMON, W. An incremental dosing protocol for women with severe vaginal trichomoniasis and adverse reactions to metronidazole. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 174, n. 3, p. 934-936, 1996.

PEDROSA, V.; GALBAN, E.; BENZAKEN, A. S.; VASQUEZ, F. G.; IZAN JR, J. L. DST e suas Determinantes: Quatro Anos de Vigilância em um Centro Sentinela no Estado do Amazonas – Brasil. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 23, n. 2, p. 57-65, 2011.

PETRIN, D.; DELGATY, K.; BHATT, R.; GARBER, G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 2, p. 300-17, 1998.

PRASAD, S.; GUPTA, S. C.; TYAGI, A. K.; AGGARWAL, B. B. Curcumin , a component of golden spice : From bedside to bench and back. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 1053-1064, 2014.

PRIYADARSINI, K. I. The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20091-20112, 2014.

RAGSDALE, S. W. Pyruvate ferredoxin oxidoreductase and its radical intermediate. **Chemical Reviews**, v. 103, n. 6, p. 2333-2346, 2003.

REICHMAN, O.; GAL, M.; LEIBOVICI, V.; SAMUELOFF, A. Evaluation of Vaginal Complaints During Pregnancy: the Approach to Diagnosis. **Current Dermatology Reports**, v. 3, n. 3, p. 159-164, 2014.

SANDUR, S. K.; PANDEY, M. K.; SUNG, B.; AHN, K. S.; MURAKAMI, A.; SETHI, G.; LIMTRAKUL, P.; BADMAEV, V.; AGGARWAL, B. B. Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 8, p. 1765-1773, 2007.

SCHWEBKE, J. R.; BARRIENTES, F. J. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 12, p. 4209-4210, 2006.

SEÑA, A. C.; MILLER, W. C.; HOBBS, M. M.; SCHWEBKE, J. R.; LEONE, P. A.; SWYGARD, H.; ATASHILI, J.; COHEN, M. S. *Trichomonas vaginalis* infection in male sexual partners: implications for diagnosis, treatment, and prevention. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 1, p. 13-22, 2007.

SHARMA, R. A.; MCLELLAND, H. R.; HILL, K. A.; IRESON, C. R.; EUDEN, S. A.; MANSON, M. M.; PIRMOHAMED, M.; MARNETT, L. J.; GESCHER, A. J.; STEWARD, W. P. Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Study of Oral Curcuma Extract in Patients with Colorectal Cancer 1. **Clinical Cancer Research**, v. 7, p. 1894-1900, 2001.

SHARMA, R. A.; STEWARD, W. P.; GESCHER, A. J. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Curcumin. In: AGGARWAL, B. B.; SURH, Y.-J.; SHISHODIA, S. (Eds.). **The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease**. Boston, MA: Springer US, 2007. p. 453-470.

SHETTY, D.; KIM, Y. J.; SHIM, H.; SNYDER, J. P. Eliminating the heart from the curcumin molecule: Monocarbonyl curcumin mimics (MACs). **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 249-292, 2015.

SIVIERO, A.; GALLO, E.; MAGGINI, V.; GORI, L.; MUGELLI, A.; FIRENZUOLI, F.; VANNACCI, A. Curcumin, a golden spice with a low bioavailability. **Journal of Herbal Medicine**, v. 5, n. 2, p. 57-70, 2015.

SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SUETH-SANTIAGO, V.; PERON MENDES-SILVA, G.; DECOTÉ-RICARDO, D.; EDILSON FREIRE DE LIMA, M. Curcumina, O Pó Dourado Do Açafrão-Da-Terra: Introspecções Sobre Química E Atividades Biológicas. **Química Nova**, v. 38, n. 4, p. 538-552, 2015.

ULLAH, R.; REHMAN, A.; ZAFEER, M. F.; REHMAN, L.; KHAN, Y. A.; KHAN, M. A. H.; KHAN, S. N.; KHAN, A. U.; ABIDI, S. M. A. Anthelmintic Potential of Thymoquinone and Curcumin on *Fasciola gigantica*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1-19, 2017.

VÁZQUEZ, F.; JOSÉ GARCÍA, M.; PÉREZ, F.; PALACIO, V. *Trichomonas vaginalis*: tratamiento y resistencia a nitroimidazoles. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 19, p. 114-124, 2001.

VIEIRA, P. DE B.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J.; TASCA, T. Natural and synthetic compound anti-*Trichomonas vaginalis*: an update review. **Parasitology Research**, v. 114, n. 4, p. 1249-1261, 2015.

WACHTER, B.; SYROWATKA, M.; OBWALLER, A.; WALOCHNIK, J. In vitro efficacy of curcumin on *Trichomonas vaginalis*. **Wiener Klinische Wochenschrift**, v. 126, n. SUPPL.1, p. 32-36, 2014.

WINK, M. Medicinal plants: A source of anti-parasitic secondary metabolites. **Molecules**, v. 17, n. 11, p. 12771-12791, 2012.

WORKOWSKI, K. A.; BOLAN, G. A. **Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines: diseases characterized by vaginal discharge: Trichomoniasis**. Disponível em:

<<https://www.cdc.gov/std/tg2015/trichomoniasis.htm>>. Acesso em: 2 jul. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report on global sexually transmitted infection surveillance 2015.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/stis-surveillance-2015/en/>>.

YAO, C.; KOSTER, L. S. Tritrichomonas foetus infection, a cause of chronic diarrhea in the domestic cat. **Veterinary Research**, v. 46, n. 35, p. 1-16, 2015.

YARLETT, N.; HACKSTEIN, J. H. P. Hydrogenosomes: One Organelle, Multiple Origins. **BioScience**, v. 55, n. 8, p. 657-668, 2005.

ZHOU, H.; BEEVERS, C. S.; HUANG, S. The targets of curcumin. **Current drug targets**, v. 12, n. 3, p. 332-47, 2011.