

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia



Tese

**Novas abordagens no tratamento da tricomoniase humana e tricomonose
animal**

Marjorie de Giacometi

Pelotas, 2024

Marjorie de Giacometi

Novas abordagens no tratamento da tricomoniase humana e tricomonose animal

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dr^a. Camila B. Oliveira

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Sibeles Borsuk

Pelotas, 2024

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

G429n Giacometi, Marjorie de

Novas abordagens no tratamento da tricomoníase humana e tricomonose animal [recurso eletrônico] / Marjorie de Giacometi ; Camila Belmonte Oliveira, orientadora ; Sibele Borsuk, coorientadora. — Pelotas, 2024.

193 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2024.

1. Trichomonas. 2. Compostos sintéticos. 3. Benzofuroxanos. 4. Tricomonicidas. 5. Reposicionamento. I. Oliveira, Camila Belmonte, orient. II. Borsuk, Sibele, coorient. III. Título.

CDD 616.951016

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Marjorie de Giacometi

Novas abordagens no tratamento da tricomoniase humana e tricomonose animal

Tese aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 05 de março de 2024.

Banca examinadora:

Prof(a). Dra. Camila Belmonte de Oliveira (Orientadora)

Doutor(a) em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof(a). Dr. Rodrigo Casquero Cunha

Doutor(a) em Ciência Animal pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof(a). Dra. Leda Castano Barrios Doutora em Ciências: Imunologia e Patogenia de doenças infecciosas e parasitárias pelo Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz

Prof(a). Dra. Nathieli Bianchin Bottari Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria

Dr. Kauê Rodriguez Martins Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas/ Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Mato grosso do Sul- Suplente

Aos meus amados pais, cujo amor e incentivo foram
a força propulsora por trás de cada passo que dei.

Agradecimentos

À Deus e a todas as forças espirituais que têm me acompanhado, obrigada por guiar meus passos e iluminar meu caminho durante esta jornada acadêmica.

À minha mãe Dirlei e meu pai Airton, pelo apoio incondicional e obrigada por investirem tempo, energia e recursos para me encorajar, vocês são minha inspiração, amo vocês!

À meu marido Eduardo, por sempre acreditar em mim quando eu duvidava de mim mesmo, obrigada por tudo. Sua constante confiança e apoio tornam cada desafio mais fácil de superar. Te amo!

Aos meus sogros Angela e José Eduardo, pelo acolhimento, afeto e o apoio constante, sou verdadeiramente grata por ter sogros tão incríveis.

À minha orientadora Camila, por sempre estar disposta a me ajudar, desde a graduação, se estou aqui hoje foi porque você mostrou o mundo mágico da pesquisa! És o meu exemplo de pesquisadora e professora, meu eterno agradecimento!

À minha equipe de laboratório, Yan, Alexia e Filipe, por sempre estarem dispostos a tudo, seu comprometimento, dedicação e colaboração foram fundamentais para o nosso sucesso. Sentirei saudades das risadas e dos surtos coletivos!

À UFPel, sou grata ao aprendizado prático, eventos acadêmicos e a qualidade do corpo docente foram fundamentais para minha trajetória

Aos meus animais, meus queridos companheiros de jornada, agradeço por cada ronronar, latido e brincadeira, vocês trouxeram uma luz única aos meus dias!

À Dona Jussara e o Seu Benedito, agradeço por sempre me ouvirem e por todo incentivo. Vocês não são apenas padrinhos, mas verdadeiros guias e apoios fundamentais em minha jornada.

À todas as Marias da minha vida, muito obrigada por tudo!

Elementar, meu caro Watson

-Sherlock Holmes

Resumo

GIACOMETI, Marjorie de. **Novas abordagens no tratamento da tricomoniase humana e tricomonose animal.** Orientadora: Camila Belmonte Oliveira. 2024. 185 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2024.

Trichomonas sp. é um protozoário flagelado que infecta humanos e aves. *Trichomonas vaginalis* é a IST (infecção sexualmente transmitida) não viral mais comum globalmente, com mulheres geralmente manifestando sintomas mais do que homens, que frequentemente são assintomáticos e contribuem para a disseminação da doença. *Trichomonas gallinae* infecta o trato digestivo superior de aves, especialmente pombos. Os sintomas variam conforme a imunidade e a virulência da cepa. Nitroimidazóis são usados para tratamento, mas há casos de reinfecção e resistência parasitária. Os compostos derivados dos benzofuroxanos (BZX) são amplamente empregados na síntese de substâncias bioativas. Este estudo busca investigar a eficácia antiparasitária e o potencial antioxidante de novos compostos BZX, bem como sua influência na expressão gênica de trofozoítos de *T. vaginalis*, tanto *in vitro* quanto *in silico*, visando alternativas terapêuticas para tricomonose. Além disso, neste estudo, foram exploradas estratégias de tratamento, através do redirecionamento de fármacos antibióticos de duas classes (nitrofuranos e fluoroquinolonas), em testes *in vitro* para *T. gallinae* para avaliar a eficácia. Para determinar a atividade antiparasitária em trofozoítos de *T. vaginalis* foi utilizado compostos benzofuroxanos denominados: EH1, EH2, EH3 e EA2, testados em várias concentrações: 55 à 100 μ M (EH1, EH2, EH3 e EA2). Na análise *in silico*, a interação do composto EH3 com as proteínas tipo catepsina (TvCPC) e desidrogenase de *T. vaginalis* (TvLDH) foi estudada via ancoragem molecular. Pode-se observar que todos os compostos foram eficazes *in vitro* com 95% de inibição após 12 horas de experimento e 100% em 24 horas, assim como foi possível observar interações do composto com as proteínas lactato desidrogenase e catepsina (TvCPC e TvLDH), sugerindo que a interação possa ser um provável mecanismo de ação. Para maior entendimento deste mecanismo entre os compostos BZX e trofozoítos, análises de

peroxidação lipídica, ensaio de espécies reativas de oxigênio e potencial antioxidante foram realizados utilizando concentrações as 55 μ M, 75 μ M, 100 μ M. Na análise da expressão de genes utilizando proteínas importantes para sobrevivência do *T. vaginalis*, como a hidrogenase, enzima málica, piruvato ferredoxina-oxido redutase A e B na concentração de 55 μ M avaliadas em 5 horas de tratamento. Sugere-se que os compostos causaram danos na membrana dos trofozoítos, possivelmente pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e por conseguinte também demonstraram potencial antioxidante, principalmente nas maiores concentrações (100 μ M). Houve a modulação de proteínas sugerindo assim uma possível interação entre os compostos e as proteínas testadas. Nos testes com *T. gallinae*, a avaliação da atividade antiparasitária *in vitro* dos antibióticos a Nitrofurantoína (NT), Norfloxacino (NOR) e Ciprofloxacina (CP) foram testadas frente ao *T. gallinae* em diversas concentrações: 5 mg/mL a 0.1 mg/mL (CP); 10 mg/mL a 0.25mg/mL (NOR) e 5 mg/mL a 0.03 mg/mL (NF). A eficácia máxima foi alcançada nas maiores concentrações em 24 horas, resultando em cerca de 100% de inibição dos trofozoítos. Através dos resultados obtidos, conclui-se que os compostos BZX e antibióticos mostraram-se promissores em testes *in vitro* para *T. vaginalis* e *T. gallinae*, mostrando-se promissores para o tratamento de tricomoníase e tricomonose aviária.

Palavras-chave: *Trichomonas*, compostos sintéticos, benzofuroxanos, tricomonicidas, antibióticos, reposicionamento

Abstract

GIACOMETI, Marjorie de. **New Approaches in the Treatment of Human Trichomoniasis and Animal Trichomonosis**. Advisor: Camila Belmonte Oliveira. 2024. 185 f. Tesis (PhD in Biological Sciences) - Institute of Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2024.

Trichomonas sp. is a flagellated protozoan that infects humans and birds. *Trichomonas vaginalis* is the most common non-viral STI (sexually transmitted infection) globally, with women generally exhibiting symptoms more than men, who are often asymptomatic and contribute to the spread of the disease. *Trichomonas gallinae* infects the upper digestive tract of birds, especially pigeons. Symptoms vary depending on the immunity and virulence of the strain. Nitroimidazoles are used for treatment, but there are cases of reinfection and parasite resistance. Compounds derived from benzofuroxanes (BZX) are widely used in the synthesis of bioactive substances. This study seeks to investigate the antiparasitic efficacy and antioxidant potential of new BZX compounds, as well as their influence on the gene expression of *T. vaginalis* trophozoites, both *in vitro* and *in silico*, aiming at therapeutic alternatives for trichomoniasis. Furthermore, in this study, treatment strategies were explored, through the repurposing of antibiotic drugs from two classes (nitrofurans and fluoroquinolones), in *in vitro* tests for *T. gallinae* to evaluate efficacy. To determine the antiparasitic activity in *T. vaginalis* trophozoites, benzofuroxane compounds called: EH1, EH2, EH3 and EA2 were used, tested at various concentrations: 55 to 100 μM (EH1, EH2, EH3 and EA2). In *in silico* analysis, the interaction of the compound EH3 with cathepsin-like proteins (TvCPC) and *T. vaginalis* dehydrogenase (TvLDH) was studied via molecular anchoring. It can be observed that all compounds were effective *in vitro* with 95% inhibition after 12 hours of experiment and 100% in 24 hours, as well as it was possible to observe interactions of the compound with the proteins lactate dehydrogenase and cathepsin (TvCPC and TvLDH), suggesting that the interaction may be a likely mechanism of action. To better understand this mechanism between BZX compounds and trophozoites, lipid peroxidation analyses, reactive oxygen species assay and antioxidant potential were carried out using concentrations of 55 μM , 75 μM , 100 μM .

In the analysis of gene expression using important proteins for the survival of *T. vaginalis*, such as hydrogenase, malic enzyme, pyruvate ferredoxin-oxide reductase A and B at a concentration of 55 μ M evaluated in 5 hours of treatment. It is suggested that the compounds caused damage to the trophozoite membrane, possibly through the production of reactive oxygen species (ROS) and therefore also demonstrated antioxidant potential, especially at higher concentrations (100 μ M). There was protein modulation, thus suggesting a possible interaction between the compounds and the tested proteins. In tests with *T. gallinae*, the evaluation of the *in vitro* antiparasitic activity of the antibiotics Nitrofurantoin (NT), Norfloxacin (NOR) and Ciprofloxacin (CP) were tested against *T. gallinae* at different concentrations: 5 mg/mL to 0.1 mg/mL (CP); 10 mg/mL to 0.25mg/mL (NOR) and 5 mg/mL to 0.03 mg/mL (NF). Maximum efficacy was achieved at the highest concentrations within 24 hours, resulting in approximately 100% inhibition of trophozoites. Through the results obtained, it is concluded that the BZX compounds and antibiotics showed promise in *in vitro* tests for *T. vaginalis* and *T. gallinae*, showing promise for the treatment of trichomoniasis and avian trichomoniasis.

Keywords: *Trichomonas*, synthetic compounds, benzofuroxanes, trichomonicides, antibiotics, repositioning

Sumário

1	Introdução	11
1.1	Objetivos	13
1.1.1	Objetivo geral	13
1.1.2	Objetivos específicos	13
2	Revisão bibliográfica	15
2.1	Características morfológicas e taxonômicas dos Tricomonadídeos	15
2.2	<i>Trichomonas vaginalis</i>	17
2.2.1	História	17
2.2.2	Epidemiologia	17
2.2.3	Transmissão e Mecanismo de Patogênese	20
2.2.4	Manifestações clínicas	23
2.2.5	Diagnóstico	26
2.2.6	Tratamento e Profilaxia	29
2.3	<i>Trichomonas gallinae</i>	33
2.3.1	História	33
2.3.2	Epidemiologia	34
2.3.3	Transmissão e Mecanismo de Patogênese	36
2.3.4	Manifestações clínicas	39
2.3.5	Diagnóstico	41
2.3.6	Tratamento e Profilaxia	43
2.4	Derivados Benzofuroxanos	45
2.5	Antibióticos	47
2.5.1	Fluoroquinolonas	48
2.5.2	Nitrofurantoína	52
3	Manuscrito 1	55
4	Manuscrito 2	82
5	Manuscrito 3	117
6	Considerações finais	140
7	Referências bibliográficas	141
	ANEXOS	164
	APÊNDICE	181

1 Introdução

As tricomoníases em geral apresentam uma distribuição cosmopolita, podendo ser encontrada em diversos países. Enquanto o *Trichomonas vaginalis* infecta o trato urogenital de seres humanos e é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma infecção sexualmente transmissível (IST), o *Trichomonas gallinae* é o agente da tricomoníase aviária, afetando principalmente o trato digestivo superior das aves (Forrester; Foster, 2009), sendo seus principais hospedeiros a ordem Columbiformes e Falconiformes (Sansano-Maestre *et al.*, 2009).

A infecção por *T. vaginalis* acomete principalmente as células escamosas do trato genital, expressa uma grande variabilidade de manifestações patológicas, desde casos assintomáticos até vaginite severa. Em homens, a maioria dos casos são assintomático, entretanto dentre os sintomas descritos destacam-se: secreção genital, desconforto ao urinar, prurido, lesão na região genital e sensação de desconforto ou ardor após atividade sexual. Embora complicações sejam pouco frequentes, elas podem envolver problemas como epididimite, infertilidade e prostatite (Petrin *et al.*, 1998; Leherker; Alderete, 2000; Barrio *et al.*, 2002).

As manifestações clínicas causadas pelo *T. gallinae* variam de subclínicas, até inflamação grave com necrose de múltiplos tecidos resultando na mortalidade desses animais por falta de alimento, insuficiência respiratória e sepse (Niedringhaus *et al.*, 2019).

Dentre os fármacos mais utilizados para tratamento das tricomoníases, o metronidazol (MTZ) é recomendado pela FDA (*Food drug administration*). Entretanto já são descritos isolados resistentes de ambas as espécies (Petrin *et al.*, 1998; Sobel *et al.*, 2001). Além disso, por mais que seja um fármaco bem tolerado, o MTZ pode causar neurotoxicidade quando utilizado em altas doses, pois a união do MTZ e seus metabólitos ao RNA (ácido ribonucleico) provoca a inibição da síntese de proteínas e degeneração axonal das fibras nervosas. Quanto aos efeitos genotóxicos, observou-se que o Metronidazol pode causar um incremento nas anomalias cromossômicas,

bem como rupturas cromatídicas e isocromáticas em células de indivíduos submetidos a doses terapêuticas deste medicamento (Ceruelos et al., 2019).

Os compostos derivados de benzofuroxanos (BZX) são heterociclos que possuem diversas atividades biológicas relevantes (BARREIRO, 1991; MELO, *et al.*, 2006; DEWANGAN, *et al.*, 2010). BZX N-óxidos geram espécies reativas de oxigênio (EROs) ou nitrogênio (ERNs) e esses contribuem para desestabilização da membrana celular dos protozoários, pois quanto maior a quantidade de radical livre produzido, maior será o dano causado pelo estresse oxidativo no parasito.

Os antibióticos são fármacos indispensáveis, sem eles provavelmente tanto a saúde pública como a veterinária estariam comprometidas e assim a expectativa de vida de seres humanos e animais seria reduzida (Brito e Cordeiro 2012). As fluoroquinolonas (ciprofloxacina e norfloxacino) são medicamentos antimicrobianos derivados do ácido nalidíxico. Elas são classificadas como quinolonas de segunda geração devido à presença, em sua estrutura química, da combinação de um átomo de flúor e um grupo piperazinil. Essa combinação é responsável pelo amplo espectro de ação desses medicamentos contra diversos agentes biológicos (Silva; Hollenbach, 2010). Assim como a Nitrofurantoína, um antibiótico da classe dos nitrofuranos, que demonstra amplo espectro de ação, especialmente em infecções do trato urinário não complicadas. Sua estrutura química combina um furano com um grupo nitro, além de apresentar um substituto contendo hidantoína. Essas características conferem a esta uma baixa resistência, uma vez que sua concentração sérica não afeta a flora intestinal (Squadrito e Del Portal, 2023).

O desenvolvimento contínuo de novos fármacos desempenha um papel necessário na melhoria da saúde humana e animal, com intuito de buscar novas alternativas de tratamento para a tricomoníase, o objetivo principal desse trabalho é avaliar a atividade antiparasitária *in vitro* de compostos inéditos derivados BZX em trofozoítos de *T. vaginalis* e de antibióticos comercialmente disponíveis em *T. gallinae*.

1.1 Objetivos

1.1.1 *Objetivo geral*

Avaliar a eficácia *in vitro* dos compostos derivados de benzofuroxanos N-óxido em *T. vaginalis* e a atividade antiparasitária dos antibióticos fluoroquinolonas e nitrofuranos em *T. gallinae*.

1.1.2 *Objetivos específicos*

- Avaliar a eficácia de diferentes concentrações dos compostos derivados de benzofuroxanos N-óxidos através da quantificação dos parasitos vivos e mortos, no teste *in vitro* de *T. vaginalis*;
- Determinar a concentração letal de 50% (IC₅₀) e a concentração inibitória mínima e a curva de mortalidade *in vitro* das concentrações testadas nos bioensaios de *T. vaginalis*;
- Avaliar a citotoxicidade dos derivados benzofuroxanos das concentrações testadas em células VERO;
- Avaliar *in silico* se há ligações entre os compostos e proteínas específicas do *T. vaginalis*;
- Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) das concentrações testadas nos bioensaios de *T. vaginalis*;
- Analisar a atividade antioxidante, através dos ensaios de FRAP, ABTS e DPPH das concentrações testadas nos bioensaios de *T. vaginalis*;
- Avaliar a peroxidação lipídica através do TBARS das concentrações testadas nos bioensaios de *T. vaginalis*;
- Avaliar a expressão de proteínas específicas (PFUR A e B, enzima málica e hidrogenase) do *T. vaginalis* após tratamento com concentrações utilizadas nos bioensaios;
- Avaliar a eficácia de diferentes concentrações dos antibióticos Norfloxacino, ciprofloxacina e nitrofurantoína através da quantificação dos parasitos vivos e mortos, no teste *in vitro* em isolados de *T. gallinae*;

- Determinar a concentração letal de 50% (IC₅₀) e a concentração inibitória mínima e a curva de mortalidade *in vitro* das concentrações testadas nos bioensaios de *T. gallinae*.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Características morfológicas e taxonômicas

O gênero *Trichomonas* pertence ao reino Protista, filo Parabasalia subfilo Sarcomastigophora, à classe Trichomonadea da ordem Trichomonadida, família Trichomonadidae (Neves, 2016; Monteiro, 2017). São parasitos extracelulares e se localizam em diferentes tecidos do corpo de animais e seres humanos. A espécie *Trichomonas vaginalis* afeta o trato urogenital tanto de homens quanto de mulheres, enquanto a espécie *Trichomonas gallinae* é a responsável pela tricomonose aviária, afetando o trato digestivo superior de diversas espécies de aves (Barratt *et al.*, 2016).

Trichomonas sp. exibe dimensões variando de 10 a 30 µm de comprimento por 5 a 12 µm de largura (Rey, 2002). Durante a fase aguda da inflamação ou em cultivos axênicos, observa-se que os tricomonas geralmente apresentam tamanhos reduzidos. São protozoários flagelados e caracterizados pela presença de um corpo parabasal onde há a presença de flagelos e uma membrana ondulante responsáveis pela movimentação do parasito. Apresenta como características a reprodução assexuada, ausência de mitocôndrias e peroxissomos, presença de hidrogenossomos, organelas responsáveis pela produção de hidrogênio e energia (Figura 1) (Kulda; 1999, Neves; 2016).

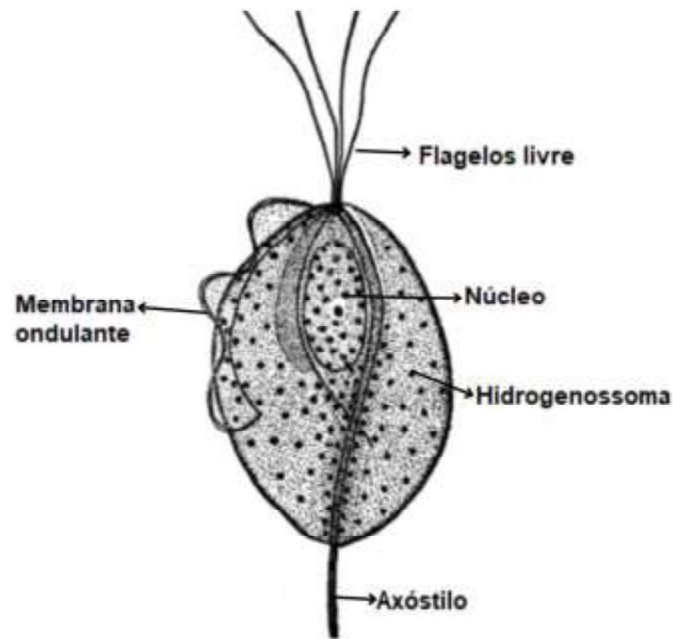
Em situações de alta taxa de multiplicação, é possível identificar quantidades significativas do parasito, sendo que nestas circunstâncias protozoários binucleados e polinucleados podem ser encontrados (Fernandez; 1986). Esse protozoário, assume uma forma tipicamente piriforme, elipsóide ou oval. Além disso, estudos relatam que os trofozoítos sofrem uma reorganização do seu citoesqueleto, resultando na forma amebóide durante a fase de ligação às células do hospedeiro (Mercer; Johnson, 2018). Notavelmente, os flagelados que se desenvolvem em meio de cultura tendem a exibir uma uniformidade maior em comparação com aqueles presentes em secreções vaginais (De Carli, 2007).

Condições físico-químicas como pH, temperatura, força iônica e tensão de oxigênio afetam a aparência dos organismos que só apresentam a forma trofozoíta (Petrin *et al.*, 1998; De Carli, 2000; Feittosa; Consolaro, 2005). Em circunstâncias de crescimento desfavoráveis, o *Trichomonas* sp. pode assumir uma forma arredondada e retraindo os flagelos, e assim denomina-se pseudocistos ou formas endoflagelares,

essas ocorrências têm sido frequentemente observadas nestes parasitos (Pereira-Neves *et al.*, 2011; Pereira-Neves *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2015; Castro *et al.*, 2016). O conceito de pseudocisto é empregado para descrever uma forma arredondada, sem motilidade, na qual todos os flagelos estão internalizados. No início do século XX, houve controvérsias na classificação dessas formas "aflageladas". Algumas interpretações as consideravam artefatos, enquanto outras não as reconheciam como uma forma válida dos tricomonadídeos; algumas ainda as descreviam como espécimes em degeneração (Pereira; Almeida 1940; Pereira-Neves *et al.*, 2012). Atualmente, o termo "formas endoflagelares", é aceitável, uma vez que seus flagelos permanecem dentro da célula, e essa estrutura é ativa, exercendo um papel importante no ciclo de vida do protozoário (Pereira-Neves *et al.*, 2012). Sabe-se que em algumas espécies de *Trichomonas spp.*, como *Tritrichomonas foetus* que acomete ruminantes, estas formas endoflagelares, foram encontradas aderidas ao epitélio vaginal em maior quantidade do que trofozoítos, sugerindo seu envolvimento na infecção das células do hospedeiro final (Mariante; Lopes; Benchimol, 2004; Forrester; Foster, 2009). Em cultivos axênicos mantidos por períodos prolongados, os trofozoítos tendem a diminuir características intrínsecas como adesão às células epiteliais, citotoxicidade, fagocitose e diversas transformações morfológicas (Cuervo *et al.*, 2008).

Como é um organismo anaeróbico facultativo, *Trichomonas sp.* se desenvolve eficientemente na ausência de oxigênio, em um intervalo de pH entre 5,0 e 7,5, e a uma temperatura variando de 20 °C a 40 °C. Sua fonte de energia compreende glicose, maltose e galactose, sendo capaz ainda de armazenar glicogênio como reserva energética (De Carli, 2000). Sua relevância no ambiente vaginal é significativa, uma vez que é frequentemente afetado por alterações no pH, flutuações hormonais, disponibilidade de nutrientes e até mesmo o ciclo menstrual. Os carboidratos desempenham um papel fundamental como fonte principal de nutrientes, e em situações de limitação, a utilização de aminoácidos essenciais, como arginina, treonina e leucina, torna-se vital para o consumo. A reprodução ocorre por fissão binária longitudinal a cada 4 à 6 horas, e a divisão nuclear segue o tipo criptopleuromitótico (Maciel *et al.*, 2004; Meites; Workowski, 2018).

Figura 1- Morfologia do trofozoíto de *Trichomonas sp.*



Fonte: adaptado de Brunzel, 1994, p. 159

2.2 *Trichomonas vaginalis*

2.2.1 História

Em 1836, o médico francês Alfred Donné descreveu pela primeira vez *Trichomonas vaginalis*, onde isolou o protozoário a partir da secreção vaginal de uma mulher com vaginite (Schmidt, 1996). Em 1837 as características microscópicas do protozoário foram publicadas (Campbell, 2001). Anos após foi observado a presença do parasito em um homem com uretrite (De Carli; Tasca, 2005; Rojas *et al.*, 2004). Hoehne em 1916, comprovou que esse parasito era o patógeno responsável de uma infecção vaginal específica (Machado *et al.*, 2005). Atualmente é considerada uma infecção sexualmente transmitida (IST's) não viral de maior prevalência mundial. De acordo com Organização mundial da Saúde (WHO) estima-se 110 milhões de casos em todo mundo (Rowley *et al.*, 2019). Em 2008, estimou-se que 187 milhões de pessoas estavam infectadas, com incidência de aproximadamente 276,4 milhões de novos casos (WHO, 2012; Feittosa; Consolaro, 2005).

2.2.2 Epidemiologia

A espécie *T. vaginalis* é cosmopolita, pode ser encontrada em diversos países e culturas, infecta todas as etnias e camadas sociais. Há uma estimativa mundial de 276,4 milhões de casos de tricomoníase. A prevalência dessa infecção apresenta

variações significativas em distintas regiões, conforme apontado pela Organização Mundial da Saúde (OMS). A OMS indicou que as taxas mais elevadas de prevalência da tricomoníase em mulheres foram registradas predominantemente na região africana (11,7%), seguida pelas regiões das Américas (7,7%), Pacífico Ocidental (5,6%), Mediterrâneo Oriental (4,7%), Sudeste Asiático (2,5%) e, por último, na região europeia (1,6%). No mesmo ano, a OMS calculou que a prevalência global de tricomoníase era de 5,3% entre as mulheres e de 0,6% entre os homens (Rowley, *et al.*, 2019).

Nas Américas a infecção no sexo feminino demonstrou uma prevalência de 22% e incidência de 177,7% a cada 1000 mulheres (WHO, 2012). Em homens a doença pode ser autolimitada, devido a eliminação mecânica do *T. vaginalis* durante a micção ou secreções prostáticas, consequentemente apresenta uma prevalência menor quando comparado com mulheres (Maciel, Tasca; De Carli, 2004). A presença de zinco (Zn) no líquido prostático também é considerada como uma possível explicação para a menor prevalência da infecção em homens. Isso se deve ao fato de que já foi documentado que este elemento possui efeito inibitório sobre o crescimento dos trofozoítos em condições *in vitro* (Krieger; Rein, 1982; Figueroa-Angulo, *et al.*, 2012).

No Brasil as taxas de prevalência variam entre 3,7% a 30%, isso é devido a fatores como condições socioeconômicas e situações de vulnerabilidade (Hobbs; Seña, 2013, De Waaij *et al.*, 2017, Gatti *et al.*, 2017). Estudos realizados em unidades básicas de saúde nas regiões do Nordeste e Norte, conforme mencionado por Rocha *et al.* (2014), Lira *et al.* (2017), Lima *et al.* (2019) e Belfort *et al.* (2021), evidenciaram os maiores índices de casos positivos de tricomoníase variando de 12% à 19%. Na região sul do Brasil, os índices de tricomoníase variam entre 1,5% a 9% (Bruni *et al.*, 2015; Ambrozio *et al.*, 2016; Mosca *et al.*, 2016; Tabile *et al.*, 2016; Santos 2017; Michelatti *et al.*, 2021). O último relatório do Ministério da Saúde faz referência a uma frequência que oscila entre 10% e 35%, dependendo da amostra estudada e da abordagem diagnóstica (Brasil, 2015).

Dentre a faixa etária das pacientes acometidas, são de mulheres entre 15 à 49 anos. Isso pode ser explicado pelo fato de que esse grupo etário engloba a fase reprodutiva, e as mulheres tendem a ser mais ativas sexualmente além de diversos fatores de risco (Maciel; Tasca; De Carli, 2004; Bruni *et al.*, 2015). Em mulheres examinadas, observa-se uma prevalência de *T. vaginalis* entre 20% e 40%, tanto no

cenário global quanto no Brasil. Destaca-se que cerca de 70% dessas mulheres apresentam corrimento vaginal (Petrin *et al.*, 1998). Casos assintomáticos também apresentam considerável prevalência, podendo chegar até 50% (Riley; Roberts; Takayama, 1992). Uma pesquisa realizada nos Estados Unidos, avaliando a prevalência da infecção assintomática em mulheres sexualmente ativas, observou-se a presença da infecção de 2 à 3 milhões de mulheres por ano (Sutton *et al.*, 2007).

A infecção associada ao *T. vaginalis* está vinculada a fatores de risco, como o número de parceiros sexuais e a idade avançada. Diante disso, é fundamental promover a utilização de preservativos, realizar diagnóstico precoce e aplicar tratamento adequado, sendo medidas que devem ser enfatizadas durante consultas ginecológicas (Verteramo *et al.*, 2008). A prevalência é maior em grupos de níveis socioeconômicos baixos, assim como, nível educacional e higiene pessoal, os quais influenciam na incidência da infecção (Maciel; Tasca; De Carli, 2004).

A infecção por *T. vaginalis* geralmente está correlacionada com outras ISTs e manifesta-se predominantemente em populações consideradas de risco, como profissionais do sexo, usuários de substâncias entorpecentes e portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), principalmente entre as mulheres (Alves *et al.*, 2011).

Aproximadamente 6,2% de infecções causadas pelo HIV são relacionadas ao *T. Vaginalis* (Chesson; Blandford; Pinkerton, 2004), sendo considerado um co-fator na intensificação da transmissão e aquisição do HIV. Segundo Van Der Pol e colaboradores (2008), a tricomoníase é caracterizada como uma condição de bidirecionalidade. Isso implica não apenas em aumentar a transmissão do HIV, mas também em tornar um indivíduo mais propenso à infecção por *T. vaginalis*, especialmente quando já acometido pelo HIV.

A falta de programas voltados para a prevenção, controle e monitoramento da tricomoníase, somada ao fato de que, em vários países, incluindo o Brasil, a notificação da doença não é obrigatória, resulta em uma subnotificação dos casos e na complexidade de estabelecer um cenário real nos níveis regional, estadual e nacional. A compreensão sobre o cenário epidemiológico da tricomoníase no Brasil reflete essa negligência, pois os dados de incidência e prevalência são limitados e dificilmente podem ser obtidos diretamente do Ministério da Saúde (ou de seus órgãos regionais) (Soliman; Dalzochio, 2023).

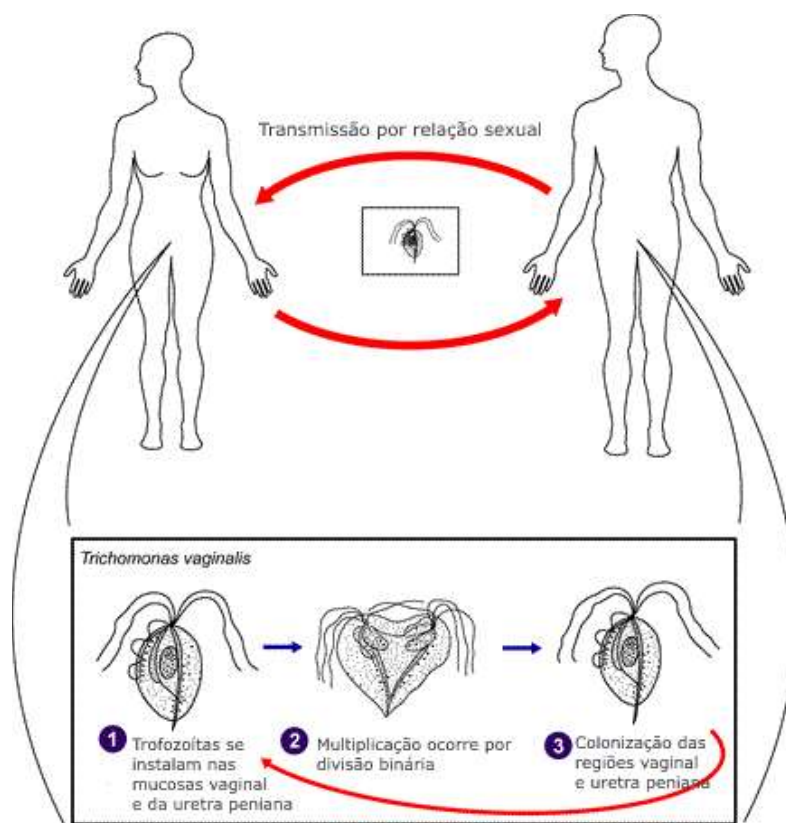
2.2.3 Transmissão e Mecanismo de Patogênese

A tricomoníase é transmitida durante do coito (Figura 2) e vários fatores como, idade, atividade sexual, quantidade de parceiros sexuais, doenças crônicas, presença de outras ISTs, ciclo menstrual, gestação e condição socioeconômica influenciam na incidência da doença. Pelo fato de ser transmitida sexualmente, o protozoário pode sobreviver por mais de uma semana no prepúcio de um homem saudável que teve relação sexual com um parceiro (a) infectado, tornando-se assim um vetor da doença (De Carli; Tasca, 2008; Rowley, *et al.*, 2019).

Outras formas de infecção são relatadas, como por exemplo, neonatos que adquirem a infecção verticalmente. Em recém-nascidos do sexo feminino a infecção ocorre devido à influência dos estrogênios maternos sobre o epitélio escamoso da vagina da recém-nascida, favorecendo a colonização pelo parasito. Contudo, uma vez que esse efeito hormonal se dissipa, aproximadamente algumas semanas após a exposição, o trato genital adquire resistência à ação do *T. vaginalis*, possibilitando a eliminação espontânea do parasito, tornando a infecção autolimitada nessas situações (Maciel; Tasca; De Carli, 2004).

Durante a infância é raro desenvolver os sintomas de tricomoníase, devido a acidez vaginal que impossibilita a sobrevivência do parasito (De Carli; Tasca, 2008; Peters *et al.*, 2021). De acordo com Rey (2009), na adolescência ocorrem várias oscilações fisiológicas das quais permitem o desenvolvimento do protozoário. Em torno de 80% de adolescentes sem atividade sexual ativa, apresentam-se infectados, quando as mães são positivas, sugerindo uma transmissão não-sexual por fômites ou água. Crucitti *et al.* (2011), ao identificarem a presença de *T. vaginalis* em adolescentes sem atividade sexual ativa na África, observaram que o protozoário pode manter-se viável por mais de três horas fora do organismo humano, especialmente em ambientes úmidos. Machado e colaboradores (2005), relatam que o protozoário pode sobreviver em até dois dias na urina, várias horas em secreções genitais, instrumentos ginecológicos e roupas íntimas.

Figura 2- Ciclo biológico do *Trichomonas vaginalis*



Fonte: Adaptado CDC, 2017

A interação entre o hospedeiro e *T. vaginalis* é complexa envolvendo diversos fatores, incluindo a superfície celular do protozoário, células epiteliais do hospedeiro e outros componentes presentes nas secreções vaginais e uretrais. Acredita-se, que mais de um mecanismo patogênico está envolvido no estabelecimento da infecção, e que tais processos abrangem tanto mecanismos dependentes do contato quanto independentes do contato (Figuerola-Angulo, *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2014; Menezes *et al.*, 2016).

A camada mucosa, considerada a primeira linha de interação entre o parasito e o hospedeiro, é composta principalmente por mucinas, formando uma barreira física. *T. vaginalis* sendo capaz de se ligar a essas proteínas e, por meio da ação de mucinases promover a degradação delas, resultando em danos físicos ao tecido e facilitando assim o acesso às camadas mais profundas do epitélio (Hernández *et al.*, 2014; Kalia *et al.*, 2020).

O aumento do pH vaginal propicia a instalação do protozoário, visto que o pH normal varia de 3,5 a 4,5, e *T. vaginalis* se desenvolve em pHs superiores a 5. Outro fator relevante é a relação entre o protozoário com a microbiota do hospedeiro, composta por bactérias anaeróbias como *Gardnerella* spp., *Atopobium* spp. e

Prevotella spp., além de *Lactobacillus* spp. (Mercer; Johnson, 2018; Aquino *et al.*, 2020). *Lactobacillus acidophilus* é uma bactéria apatogênica produtora de ácido láctico e responsável por manter a acidez vaginal, evitando assim o crescimento de bactérias patogênicas. Em casos de tricomoníase há uma redução na população de *L. acidophilus* e consequentemente proliferação de bactérias anaeróbicas patogênicas (Petrin *et al.*, 1998; López *et al.*, 2000).

Para que *T. vaginalis* torne-se patogênico ao hospedeiro, primeiramente é necessário aderências nas células epiteliais, juntamente com outros fatores de virulência como: adesinas, cisteína-proteinase integrinas, *cell-detaching factor* (CDF) e glicosidases (López *et al.*, 2000). Algumas adesinas relacionadas a citoaderência foram identificadas, como: AP120, AP65, AP51, AP33 e AP23 (Arroyo *et al.*, 1992; Moreno-Brito *et al.*, 2005; Figueroa-Angulo, *et al.*, 2012). Quatro dessas proteínas, são enzimas metabólicas: piruvato:ferredoxina oxidoreductase (AP120), enzima málica (AP65) e subunidades α e β da succinil-CoA sintetase, (AP51 e AP33, respectivamente) e são suspeitas de possuírem dupla localização dentro *T. vaginalis*, tanto nos hidrogenossomos quanto na superfície do parasito. A adesina AP23 ainda não foi identificada, podendo assim, corresponder a outra enzima metabólica, como a trifosfato isomerase (Figueroa-Angulo, *et al.*, 2012).

As adesinas são proteínas multifuncionais que desempenham diversas funções, dependendo de sua localização, regulada pela presença de ferro. Elas atuam como enzimas metabólicas nos hidrogenossomos e no citoplasma, além de exercerem a função de adesinas na superfície do parasita. Além do mais, essas adesinas estão envolvidas nos processos de mimetismo molecular, que desempenham um papel na evasão do sistema imunológico, além de atuarem como receptores para hemoglobina e heme (Lehker; Alderete, 2000; Alderete, *et al.*, 2001; Figueroa-Angulo, *et al.*, 2012; Dos Santos *et al.*, 2017). Após o contato com as células epiteliais do trato genital, os trofozoítos aumentam a produção de adesinas e passam de forma elipsóide para amebóide, modificando sua morfologia. Quando a concentração de ferro é baixa o protozoário é incapaz de sintetizar novas adesinas, e para fixação e então, utiliza adesinas já existentes (Kucknoor; Mundodi; Alderete, 2005).

A tricomoníase é uma doença multifatorial e por esse motivo várias moléculas estão relacionadas a sua patogênese. O ferro, por exemplo, modula o funcionamento das proteinases (López *et al.*, 2000). As cisteínas proteases presentes na superfície do parasito, como TvCP30 e TvCP62, o lipofosfoglicano de superfície (TvLPG) e diversos

receptores da matriz extracelular desempenham um papel importante na citoadesão tricomonal (Mendoza- Lopez *et al.*, 2000; Hernandez, *et al.*, 2004; Bastida-Corcuera *et al.*, 2005; Figueroa-Angulo, *et al.*, 2012). É possível encontrar TvCP30, nas secreções vaginais de pacientes com tricomoníase, além de estar envolvido na citoadesão e permanece ativo nas condições de pH e temperatura presentes na vagina durante a infecção. A cisteína protease têm a capacidade de degradar proteínas do ambiente vaginal, como colágeno IV, fibronectina e hemoglobina.

A glicoproteína conhecida como fator de desprendimento celular (CDF, do inglês, *cell-detaching factor*), liberada pelo protozoário, demonstra certa citotoxicidade em culturas celulares. Essa citotoxicidade está associada à gravidade dos sintomas de vaginite, pois a produção de fatores citolíticos ocasiona danos celulares no tecido do hospedeiro. Além da CDF, outros fatores citolíticos como: fator produzido por *T. vaginalis* (TvF) e as proteínas citotóxicas e hemolíticas, CP39 e CP65, também são responsáveis pela produção e secreção de moléculas citotóxicas (Petrin *et al.*, 1998; Hernández *et al.*, 2014; Menezes; Tasca, 2016). A capacidade hemolítica de *T. vaginalis*, ao realizar a lise dos eritrócitos, desempenha um papel importante na obtenção de lactoferrina, lipídios e proteínas ricas em ferro, nutrientes essenciais para o protozoário. A hemólise mediada pelo protozoário contribui significativamente para a sua nutrição (Hernández *et al.*, 2014; Menezes; Tasca, 2016).

Outro mecanismo de evadir o sistema imunológico está relacionado com o sistema complemento, pois no período menstrual, este, é citotóxico e leva a uma redução no número de protozoários, porém a infecção permanece pois as cisteína proteases são capazes de degradar a porção C3 complemento presente na superfície do microrganismo (Alderete *et al.*, 1995).

No contexto dos mecanismos de resistência do hospedeiro, foram documentados mecanismos específicos e não específicos da resposta imune inata, além de mecanismos da resposta imune adaptativa envolvendo anticorpos, e processos não imunológicos. Os níveis de ferro, zinco e poliaminas, podem estar relacionados aos mecanismos de defesa, uma vez que, regulam diretamente os genes dos fatores de virulência de *T. vaginalis* (Schwebke; Burgess, 2004; Figueroa-Angulo, *et al.*, 2012).

2.2.4 Manifestações clínicas

Trichomonas vaginalis acomete principalmente as células escamosas do trato genital, expressando uma grande variabilidade de manifestações patológicas, desde

casos assintomáticos até severa vaginite. A tricomoníase seja uma infecção predominantemente assintomática, em torno de 85% das mulheres apresentam-se assintomáticas com pH (3,8 a 4,2) e flora vaginal normais. Um terço dessas pacientes se tornam sintomáticas dentro de seis meses. Raramente a doença se manifesta antes do período menstrual ou após a menopausa. Casos assintomáticos podem impactar significativamente a transmissão e a reincidência da tricomoníase, uma vez que, na ausência de sintomas, esses indivíduos podem não buscar tratamento (Petrin *et al.*, 1998; Barrio *et al.*, 2002; Maciel; Tasca; De Carli, 2004; Meites; Workowski, 2018).

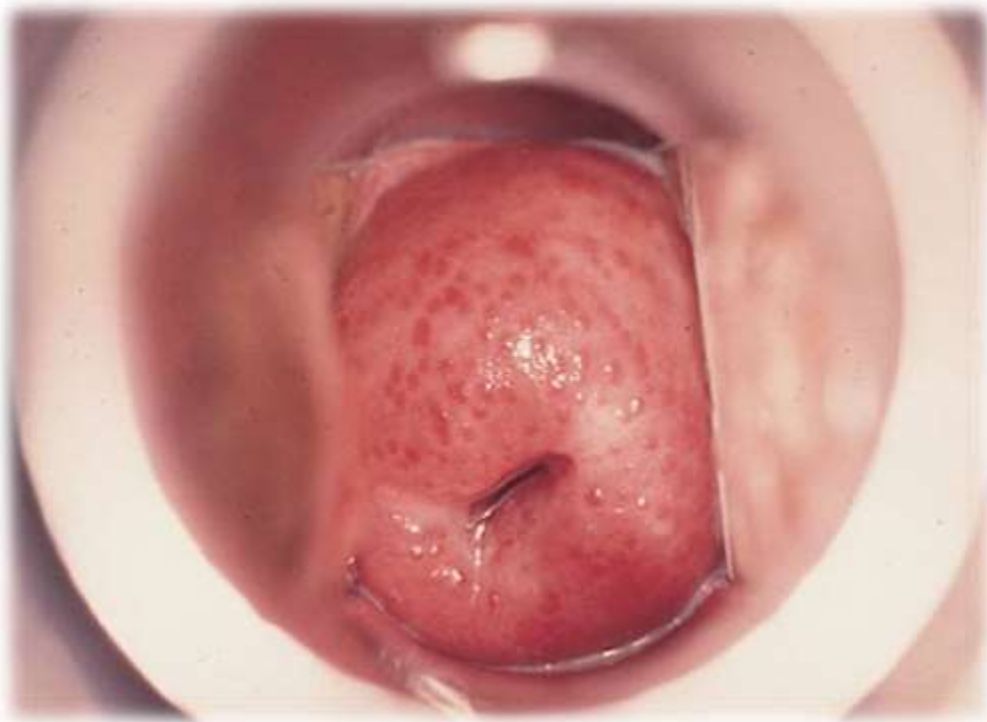
Em casos sintomáticos, estes envolvem secreção uretral e disúria. (Maciel; Tasca; De Carli, 2004). Nas mulheres, as áreas frequentemente afetadas incluem a vagina, uretra e endocérvice. A secreção ocorre em mulheres com vaginite aguda causada pelo *T. vaginalis*, isso é devido a infiltração de leucócitos. A consistência desse corrimento varia de fino e escasso a espesso e abundante. Comumente apresenta-se como corrimento amarelado, abundante, espumoso, mucopurulento com odor anormal e prurido vulvar. Há presença de edema e eritema na vagina e na cérvice com aparecimento do *colpitis macularis* ou cérvice com aspecto de morango (Figura 3) que são erosões e pontos hemorrágicos na parede cervical. Por mais que essa aparência seja patognomônica para tricomoníase, é observada em somente 2% a 5% das mulheres. Entretanto, ao realizar colposcopia, essa porcentagem alcance quase a 50% (Maciel; Tasca; De Carli, 2004).

A presença de dores abdominais em mulheres infectadas pode indicar uma possível infecção no trato urogenital superior (Wolner-Hanssen, *et al.*, 1989; Lehker; Alderete, 2000; Kissinger, 2015). A infertilidade também pode ser a causa de infecções por *T. vaginalis*, uma vez que a estrutura tubária é destruída, impedindo a passagem de espermatozoide ou óvulos na tuba uterina. Mulheres com repetidas infecções são mais predispostas a infertilidade (Grostein; Goldman; Cramer, 1993). Complicações adicionais abrangem infecções no endométrio e nas glândulas de Skene e Bartholin (Kissinger, 2015).

Conforme a gravidade da infecção, observa-se a ocorrência de casos citopatológicos relacionados à displasia/metaplasia, sendo que 39% das mulheres com resultado positivo apresentaram neoplasia intraepitelial cervical (Gram *et al.*, 1992; Kharsany *et al.*, 1993). Acredita-se que este protozoário é capaz de atuar como vetor de outros patógenos, como micoplasmas e *Neisseria gonorrhoeae*, os quais são

fagocitados pelo parasito. Fragmentos do RNA viral já foram encontrados em linhagens do protozoário (Cotch *et al.*, 1997; Maciel; Tasca; De Carli, 2004). Nas mulheres sintomáticas, os sintomas apresentam um padrão cíclico, tornando-se mais intensos próximo ao período menstrual. Este fenômeno está relacionado aos efeitos do ferro sobre o metabolismo e a patogênese do parasito. Entre esses efeitos, destacam-se a regulação da síntese de cisteínas proteases e moléculas de citoaderência, além da modulação da expressão de outros fatores de virulência (Hernández *et al.*, 2014; Menezes *et al.*, 2016).

Figura 3- Cérvix com aspecto de morango ou *colpitis macularis*



Fonte: Jaladi; Salih, 2022 p.1

Nos homens, a tricomoníase é conhecida por ser autolimitante e se caracteriza de forma assintomática; sintomática aguda, onde a uretrite é purulenta abundante e assintomática leve, da qual é indistinguível clinicamente de outras causas de uretrites (Petrin *et al.*, 1998; Van Gerwen; Muzny, 2019; Van Gerwen *et al.*, 2021). O zinco pode estar relacionado na manifestação dos sinais clínicos, já que é tóxico para o parasito e muitos homens apresentam quantidades consideráveis desse elemento no líquido prostático (Lopes *et al.*, 2000). Em casos sintomáticos: corrimento escasso,

disúria, prurido, ulceração peniana, sensação de queimação após o ato sexual. As complicações são raras e se manifestam como epididimite, prostatite e infertilidade (Petrin *et al.*, 1998; Bowden; Garnett, 1999; Kissinger, 2015).

A tricomoníase representa uma séria questão de saúde pública, um dos elementos que contribui para piorar IST é o seu papel como coadjuvante ou facilitador no surgimento de outras doenças e/ou complicações e sequelas. A infecção está associada a ocorrência de parto prematuro e baixo peso ao nascer. Além disso, está ligada a um aumento de 4,7 vezes no risco de desenvolvimento de doença inflamatória pélvica (Hosny *et al.*, 2017; Poole; McClelland, 2013; Mann *et al.*, 2010; Silver *et al.*, 2014).

As pessoas infectadas com *T. vaginalis* apresentam um maior risco de contrair o HIV. Além disso, algumas pesquisas sugeriram que a coinfeção por *T. vaginalis* e HIV intensifica a propagação genital do vírus (Masha *et al.*, 2019). De acordo com Miller *et al.* (2008) mais da metade das mulheres portadoras do HIV podem estar igualmente contaminadas com o protozoário. Esta maior propensão é biologicamente justificada por três razões: a resposta inflamatória à infecção por *T. vaginalis* leva ao aumento da presença de células vulneráveis ao HIV; a infecção por *T. vaginalis* pode comprometer a barreira mecânica ao HIV por meio de pequenas hemorragias na mucosas; e a infecção por *T. vaginalis* pode modificar a flora vaginal normal, tornando-a mais receptiva à vaginose bacteriana, o que, conseqüentemente, pode elevar o risco de adquirir o HIV (Guenther; Secor; Dezzutti, 2005; Moodley; Connolly; Sturm, 2002; Van De Wijgert, *et al.*, 2009; Kissinger, 2015). Assim como ocorre nos homens HIV+, os dados indicam incidências mais baixas de tricomoníase em comparação com as mulheres HIV positivo (HUGHES *et al.*, 2012; MUZNY *et al.*, 2016). No entanto, é essencial destacar que a escassez de dados não diminui a relevância da tricomoníase e a necessidade de atenção a essa infecção sexualmente transmissível (IST).

2.2.5 Diagnóstico

Para o diagnóstico definitivo da tricomoníase, somente o diagnóstico clínico não é suficiente. Nos casos de infecção por *T. vaginalis*, apenas 5% das mulheres apresentam os sinais clássicos de *colpitis macularis* e 20% manifestam corrimento espumoso e pode haver dificuldade no diagnóstico diferencial com outras ISTs. Entretanto, informações como, histórico, anamnese, exame físico, presença dos

sintomas, são importantes para investigação da doença (Petrin *et al.*, 1998, Maciel; Tasca; De Carli, 2004; Silvia, 2017).

Na última década, houve avanços na precisão do diagnóstico da tricomoníase, com o surgimento de mais opções de testes. A microscopia direta em meio úmido, é uma alternativa bastante utilizada para diagnosticar a tricomoníase. Esse método é acessível, com tecnologia simples e pode ser realizado no ponto de atendimento, entretanto, é menos sensível, especialmente em homens. A sensibilidade varia entre 50% e 70%, dependendo da habilidade do examinador, e a leitura deve ocorrer até 10 minutos após a coleta (Kingston; Bansal; Carlin, 2003; Kissinger, 2015).

O método de cultivo, apresenta uma sensibilidade maior que o exame direto em meio úmido, onde 300 a 500 tricomonas/ml são inoculadas em células e para dar início ao crescimento. A identificação dos trofozoítos demanda um período de três a sete dias, durante os quais o paciente pode permanecer transmitindo a doença. O meio de cultura Diamond, 1957 (TYM) (Heine *et al.*, 1997) é o mais utilizado e capaz de identificar 95% das infecções apresentando uma sensibilidade de 85% a 95% e especificidade de 95% (De Carli; Tasca, 2005). Embora a cultura apresente uma sensibilidade superior ao exame direto em meio úmido, seu custo elevado, a demora no resultado e a baixa sensibilidade em homens são desafios evidentes.

A limitação de sensibilidade da cultura foi evidenciada em estudos longitudinais sobre o tratamento da tricomoníase. Uma pesquisa envolvendo mulheres soropositivas para o HIV e mulheres soronegativas para o HIV indicaram que, mesmo após o tratamento com uma única dose de metronidazol, a presença do *T. vaginalis* não foi detectada por meses através da cultura. Posteriormente, a infecção ressurgiu na ausência de relatos de exposição sexual (Peterman *et al.*, 2009; Gatski *et al.*, 2010; Kissinger, 2015).

O exame de colo uterino apresenta uma baixa sensibilidade (61%) quando comparado a cultura de trofozoítos (Schee *et al.*, 1999; Swygard *et al.*, 2004; Kissinger *et al.*, 2005). Outro teste amplamente empregado na prática ginecológica é, o citopatológico, que envolve a coleta de células do endo e exocervicais, as quais são fixadas e coradas posteriormente através da coloração de Papanicolaou. Além de ser essencial para a detecção precoce do câncer cervical, este exame permite a identificação de condições não cancerosas, como infecções ou inflamações. Entretanto, quando utilizado para identificar *T. vaginalis*, mostra baixa sensibilidade, não sendo apropriado para a triagem dessa infecção (APHL, 2013).

Uma alternativa eficiente e de baixo custo é o teste comercial de cultura *InPouch TV*™, o qual é sensível e específico (Stary et al. 2002; Maciel; Tasca; De Carli, 2004). Esse teste utiliza um meio de cultura de Diamond previamente acondicionado em bolsas plásticas, nas quais o material é inoculado diretamente. As bolsas podem ser avaliadas diariamente diretamente sob o microscópio durante o processo de incubação, proporcionando, dessa forma, o desenvolvimento do protozoário em amostras de secreções vaginais, seminais e urinárias. Essa técnica necessita a coleta por meio de swabs, sendo essencial a inoculação no meio de cultura em até uma hora após a coleta (Hobbs; Seña, 2013; Wendel; Workowski, 2007).

Os métodos de imunodiagnóstico, principalmente para *T. vaginalis*, têm sido amplamente empregados, incluindo técnicas como reações de aglutinação, imunofluorescência (direta ou indireta), ensaio imunoenzimático (ELISA- *enzyme-linked immunosorbent assay*), hibridização e análise da distribuição dos microtúbulos dos trofozoítos. A resposta de anticorpos está intrinsecamente vinculada à natureza do antígeno, se está em forma livre ou inativa, à concentração no local e à duração da estimulação do sistema imunológico. Por esse motivo, métodos imunológicos não substituem métodos parasitológicos e cultura celular, podem ser acrescentados quando negativos, possibilitando uma triagem adequada e tratamento antecipado (Petrin et al., 1998; De Carli, 2001; Maciel, Tasca, De Carli, 2004)

Alguns testes são autorizados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para diagnóstico de *T. vaginalis*, como por exemplo o teste imunocromático *OSOM® Trichomonas rapid test* (Genzyme Diagnostics, Massachusetts, New Jersey, EUA) um teste de rápida execução utilizado na detecção qualitativa de antígenos de *T. vaginalis* em secreções vaginais. O teste *Affirm VP III* (BD Diagnostic Systems) que contém um sistema molecular para detectar as causas de vaginite, incluindo infecções causadas por *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* e *T. vaginalis*. Ambos os testes, demonstraram maior sensibilidade do que a microscopia, contudo, estão restritos a amostras vaginais (Nye; Schwebke; Body, 2009).

As técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), que amplifica o DNA do parasita, também podem ser utilizadas para diagnosticar a tricomoníase (Liebhart et al., 2006; Mostegl et al., 2010). Dentro desse contexto, os Testes de Amplificação de Ácidos Nucléicos (NAAT) se destacam como técnicas altamente sensível e específica, desempenhando um papel significativo no

diagnóstico de diversas infecções sexualmente transmissíveis, incluindo a tricomoníase. Os NAAT baseiam-se na amplificação por PCR e na transcrição mediada por amplificação (TMA). Estas variações da técnica são caracterizadas pela replicação e amplificação de bilhões de cópias de DNA específico de um indivíduo ou sequências-alvo de RNA. Estas características conferem aos NAAT uma sensibilidade analítica superior à de métodos como a microscopia, cultura e detecção de antígenos. Além disso, esses testes podem ser realizados tanto em mulheres quanto em homens (Hobbs; Seña, 2013).

2.2.6 Tratamento e Profilaxia

A tricomoníase é transmitida através de relações sexuais, portanto, as medidas preventivas adotadas para o controle dessa doença são semelhantes às aplicadas para outras ISTs. Na anamnese do paciente, é imprescindível obter informações sobre a data da última atividade sexual, o número de parceiros(as), hábitos sexuais, uso de antibióticos, utilização de contraceptivos e histórico prévio da doença (Maciel; Tasca; De Carli, 2004).

Os fármacos 5-nitroimidazólicos constituem a principal abordagem terapêutica para a tricomoníase, visto que representam a única categoria de agentes antimicrobianos com comprovada atividade antitricomonacida (Van Gerwen *et al.*, 2023). Conforme as diretrizes terapêuticas das Infecções Sexualmente Transmissíveis (2015) do Ministério da Saúde (Brasil, 2015), preconiza a realização de um tratamento sistêmico e de forma conjunta com o parceiro sexual. O grupo de fármacos supracitado, abrange medicamentos como metronidazol (MTZ), tinidazol (TDZ) e secnidazol (SEC). De acordo com as orientações de tratamento IST do Centers for Disease Control and Prevention (CDC) de 2021, a terapia é recomendada para a tricomoníase urogenital não complicada, tanto em homens quanto em mulheres, é o MTZ. Dois compostos dessa categoria receberam aprovação para utilização clínica pela FDA, sendo eles o MTZ e o TNZ (Meites *et al.*, 2015; Graves *et al.*, 2020). O MTZ recebeu aprovação para uso em 1963, e até 2004, quando o TNZ foi liberado, nenhum outro fármaco era utilizado para o tratamento. Dessa forma, por quase seis décadas, apenas o MTZ era recomendado (Meites *et al.*, 2015). Outros fármacos tricomonicida como secnidazol e ornidazol já foram aprovados em outros países (Meites *et al.*, 2015; Graves *et al.*, 2020).

A dosagem e a duração do tratamento com MTZ apresentem variações entre os gêneros. No caso das mulheres, a recomendação atual é o MTZ oral, 500 mg duas vezes ao dia, ao longo de 7 dias (Workowski et al., 2021; Van Gerwen et al., 2023). Essa alteração advém de evidências oriundas de ensaios clínicos que indicam que o tratamento oral único com 2 g de MTZ não atinge a eficácia desejada. Em estudo realizado nos Estados Unidos, comparou diretamente o tratamento oral de MTZ em doses múltiplas com o tratamento oral único de MTZ, onde, as participantes submetidas ao protocolo oral de MTZ em doses múltiplas apresentaram uma redução significativa na probabilidade de resultados positivos para *T. vaginalis* durante o reteste em comparação com as mulheres que foram submetidas à terapia oral única (Kissinger et al., 2018). Howe e colaboradores (2017) e Kissinger et al (2010) demonstraram que o tratamento oral de MTZ em doses múltiplas também demonstrou ser mais eficaz entre mulheres soropositivas para HIV. Uma alternativa é associar a formulação gel de MTZ com as formulações orais, pois o uso exclusivo do gel é 50% menos eficaz. Este, não atinge níveis terapêuticos na uretra e glândulas perivaginais ou vestibulares. No entanto, outras organizações de saúde global recomendam protocolos de tratamento distintos (Meites et al., 2015; Workowski; Bolan, 2015; Menezes et al., 2016).

No contexto brasileiro, o Ministério da Saúde recomenda o uso do MTZ por via oral, seja na dose única de 2 g ou na administração de 400 a 500 mg a cada 12 horas ao longo de 7 dias. Em gestantes (após primeiro trimestre) e lactantes, recomenda-se a utilização do mesmo medicamento, por via oral, dose única de 2 g ou múltipla sendo 400mg de 12 em 12 horas ou 250 mg de 8 em 8 horas por 7 dias. No tratamento com secnidazol ou tinidazol preconiza-se para ambos 2 g em dose única (Brasil, 2006a). Os efeitos colaterais são: cefaleia, náuseas, vômitos, diarreia, desconforto abdominal, gosto metálico na boca, baixa produção de saliva. Preconiza-se o interrompimento do fármaco em casos de tontura, vertigem, encefalopatia, convulsões, ataxia, incoordenações. Sinais de hipersensibilidade ao fármaco como urticária, rubores e pruridos são comuns aparecer (Raether; Hanel, 2003).

Quanto ao mecanismo de ação, a classe dos 5-nitroimidazóis são considerados como pró-fármacos bio-redutores, ou seja, precisam ser reduzidos para se tornarem ativos (Müller, 1986; Graves et al., 2020). Ao penetrar na célula através da difusão passiva, o MTZ inicia seu processo de ativação nos hidrogenossomos do *T. vaginalis*. Essa ativação redutiva é essencial, pois o MTZ demanda a presença de

microrganismos suscetíveis, os quais são anaeróbicos e desempenham papéis fundamentais no transporte de elétrons, envolvendo ferredoxinas e proteínas pequenas de ferro-enzofre. Este ambiente anaeróbico propicia a redução do grupo nitro do MTZ, resultando na formação de metabólitos tóxicos que interferem nos processos metabólicos do protozoário, levando, eventualmente, à sua destruição. Estas substâncias possuem capacidade redox suficientemente negativa para fornecer elétrons ao MTZ para sua ativação (Petrin *et al.*, 1998; Mendz; Mégraud, 2002; Phillips; Stanley, 2006). A redução que ocorre nos hidrogenossomos dos protozoários é catalisada pela colaboração de enzimas, como a piruvato:ferredoxina oxidoredutase (PFOR), ferredoxina (Fdx), TrxR e nitrorredutase (NTR) (Kulda, 1999; Leitsch, 2016; Graves *et al.*, 2020).

Graves e colaboradores (2020), relataram que após entrada na célula por difusão simples, o MTZ alcança os hidrogenossomos, atuando como um aceptor de elétrons e competindo diretamente com a enzima hidrogenase. Assim, os elétrons da enzima PFOR são transferidos para a ferredoxina, que os repassa para o MTZ, em vez da hidrogenase, seu aceptor natural, resultando na redução de seu grupo nitro. Como consequência desse processo, a geração de hidrogênio, dependente da hidrogenase, é interrompida, e o grupo nitro do MTZ passa por redução, resultando na produção de intermediários citotóxicos nitro (R-NO-2). O MTZ ativo se une de forma covalente ao DNA, causando danos, enquanto os radicais formados interagem com o DNA e outros componentes celulares, provocando danos cumulativos que levam à morte celular do parasito. Outro mecanismo de ação relatado por Pal e Bandyopadhyay, (2012), é que o medicamento também bloqueia o processo respiratório do parasito, agindo como um concorrente do oxigênio (O₂). Isso resulta na redução da ativação e no aumento da reciclagem catalítica dos fármacos ativados, interrompendo assim sua ação.

O índice de cura é satisfatório, mas muitas vezes ocorrem falhas no tratamento devido a reinfecção, erros na terapia e não ativação do fármaco por bactérias que estão presentes na flora vaginal (Van Gerwen; Muzny, 2019). Há pouco tempo foram descritas 20 linhagens de *T. vaginalis* resistentes ao MTZ na Europa. As linhagens resistentes, representam um problema, uma vez que altas concentrações do fármaco aumentam a toxicidade. Quando o MTZ não apresenta efeitos desejados outros nitroimidazólicos são empregados, como o TNZ que demonstrou eficácia em doses mais altas (Petrin *et al.*, 1998; Sobel *et al.*, 2001; Marques-Silva *et al.*, 2021).

Apesar das recentes investigações, há uma certa escassez de informações sobre a prevalência de resistência em isolados clínicos de *T. vaginalis* persiste, tanto em âmbito nacional quanto global. Este fato é, em grande parte, resultado da negligência com os dados relacionados à tricomoníase. A resistência ao MTZ surge como uma explicação bem documentada e aceita para as falhas no tratamento em mulheres. No entanto, é importante ressaltar que a ausência de dados para homens representa uma significativa deficiência no entendimento abrangente desse fenômeno (Van Gerwen; Muzny, 2019; Graves *et al.*, 2020) para exemplificar taxas de resistência acima da média, pode-se mencionar um estudo conduzido na Papua Nova Guiné, que avaliou a resistência aeróbica ao MTZ em 82 amostras de mulheres, relatando uma taxa de resistência de 17,4% (Upcroft *et al.*, 2009).

No período de 1983 a 2019 a maioria dos casos de resistência ao MTZ foi descrito em mulheres (Marques-Silva *et al.*, 2021, apenas em um estudo de Szarmach *et al.*, (1985), que abordaram a prevalência de tricomoníase em mulheres e homens no período, além de realizar testes *in vitro* para avaliar a suscetibilidade ao MTZ em 54 isolados de *T. vaginalis*. Um estudo recente conduzido na África do Sul examinou a taxa de resistência em 94 isolados clínicos de *T. vaginalis*, revelando uma taxa de resistência de 11% ao MTZ (Mtshali *et al.*, 2022). Em um estudo conduzido por Bosserman e colaboradores (2011) conduziram um estudo no EUA, 175 mulheres foram examinadas após enfrentar infecções persistentes e falhas em pelo menos duas tentativas de tratamento, foram submetidas a análises de resistência *in vitro* tanto ao MTZ quanto ao TNZ. Os resultados revelaram que 66% das amostras demonstraram resistência ao MTZ, enquanto 34% apresentaram resistência ao TNZ. Essa resistência variou desde moderada (MLC de 50 a 100 µg/ml) até altamente resistente.

O mecanismo de resistência ainda não está totalmente esclarecido. Estudos analisando duas cepas resistentes de *T. vaginalis* demonstraram dois tipos de anormalidades, dentre eles: pouca capacidade de remover oxigênio, resultando em alta quantidade de oxigênio implicando na ativação do metronidazol e relação com o baixo nível enzimático da PFUR e de Fdx que são responsáveis no transporte de elétrons que ativam o MTZ (Yarlett *et al.*, 1986; Quon *et al.*, 1992). Além disso, a presença de endossimbiontes (*Mycoplasma* sp.) e as alterações genéticas, incluindo polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) podem ser considerados mecanismos importantes para a resistência dos 5-nitroimidazóis (Graves *et al.*, 2020; Rigo; Tasca, 2020).

A resistência aeróbia surge devido aos altos níveis de oxigênio (O₂) intracelular, decorrentes de falhas nos mecanismos de eliminação de oxigênio nas vias metabólicas do sistema antioxidante. Este oxigênio, sendo um eficiente acceptor de elétrons, em concentração elevada no hidrogenossomo, ocasiona a redução dos radicais nitro livres, resultantes da redução do MTZ. Estes radicais são transformados em ânions de superóxido, causando danos celulares menos severos em comparação aos radicais nitro livres. Adicionalmente, a concentração elevada de O₂ prejudica a redução e ativação do MTZ. A competição entre o O₂ e o MTZ pelos elétrons da Fdx também resulta na inibição da acumulação da forma inativa do MTZ em isolados resistentes. Este fato ocorre porque, na ausência de redução do MTZ, suas concentrações intracelular e extracelular se igualam, interrompendo a difusão do MTZ para o interior dos trofozoítos e hidrogenossomos (Yarlett *et al.*, 1986; KULDA, 1999; Cudmore *et al.*, 2004).

Como controle da tricomoniase em humanos recomenda-se formas de prevenção às ISTs, como: exercer o sexo seguro, ou seja, aconselhamentos a sociedade sobre suas escolhas sexuais, para que o risco de contaminação por agentes patológicos seja reduzido; uso de preservativos; privação de contato sexual com pessoas infectadas e tratamento do casal positivo, mesmo que a doença tenha sido diagnosticada em apenas um dos cônjuges (Robert, 1993; Lima *et al.*, 1996; Brasil, 2006b).

2.3 *Trichomonas gallinae*

2.3.1 História

Trichomonas gallinae foi descrito pela primeira vez em 1878 por Rivolta, em que isolou o microrganismo primeiramente do trato digestivo de um pombo- das-rochas (*Columba livia*), o qual nomeou *Cercomonas gallinae* (Stabler, 1954). Essa doença que acomete aves de vida selvagem é possivelmente a enfermidade mais antiga já documentada (Forrester; Foster, 2009). Após a descoberta do *T. gallinae* surgiram muitos estudos entre os anos de 1930 a 1970, sobre a nomenclatura, morfologia, hospedeiros, distribuição e principalmente sobre o cultivo e nutrição desse parasito, o qual foi de extrema importância para pesquisa científica, melhorando métodos de diagnóstico, tratamento e controle. Além disso, entre os anos de 1980 a 2000, muitos relatos sobre a virulência, patogenicidade e imunidade, morfologia

ultraestrutural do protozoário. A utilização de técnicas moleculares, ajudam na melhoria do diagnóstico e auxiliam na filogenia do *T. gallinae* (Forrester; Foster, 2009).

2.3.2 Epidemiologia

A tricomonose aviária é globalmente difundida e tem registros em vários países, com exceção da Antártida e Groelândia. A infecção pode se manifestar em qualquer período do ano, mas surtos são mais frequentemente observados no final da primavera, verão e outono. Afeta principalmente aves em cativeiro e na natureza, como pombos, pardais, codornas, papagaios, cardeais, aves domésticas, galinhas e perus, sendo o *Columba livia* um dos hospedeiros mais relevantes e associados à disseminação da doença (Bondurant; Honigberg, 1994; Bunbury *et al.*, 2007; Forrester; Foster, 2008; Amin *et al.*, 2014).

É uma infecção comum em aves da ordem Columbiformes e rapinantes, especialmente as aves de rapina da família Falconiformes e outras aves carnívoras. Há indicações de que o pombo-das-rochas (*C. livia*), seja o principal portador da doença, no entanto, foram registrados casos em 18 espécies de Columbiformes, 26 de Falconiformes e 9 de Stringiformes. Aves de outras ordens, como Psitaciformes, Passeriformes, Galiformes, Gruiformes e Anseriformes, também são consideradas hospedeiras significativas. (Sansano *et al.*, 2005; Sansano *et al.*, 2007; Bunbury *et al.*, 2007; Forrester; Foster, 2009). Em aves de rapina, como falcões, águias e gaviões a tricomonose é conhecida como “garganta inchada” (Krone *et al.*, 2005; Mcdougald, 2008). Enquanto em pombos a tricomonose pode ser chamada de “cancro” (Amin *et al.*, 2014).

As aves portadoras, disseminam a infecção diretamente nos comedouros e bebedouros, resultando na circulação subclínica do parasito nas colônias de pombos. Assim, a manutenção de condições sanitárias adequadas também desempenha um papel importante na propagação da doença. No entanto, há indícios de que o *C. livia* apresente uma elevada prevalência de tricomonose de forma assintomática. Considerando que essa ave atue como reservatório de *T. gallinae*, responsável por afetar principalmente aves jovens, a infecção pode se tornar fatal entre 4 a 18 dias após o contágio (Cole, 1999; Forrester; Foster, 2009; Sansano *et al.*, 2007; Silva 2017).

De maneira intencional, entre 1950 e 1960, introduziu-se na Península Ibérica a mixomatose, uma doença viral exclusiva de lagomorfos, como medida de controle

da população de coelhos. A águia-de-bonelli (*Hieraaetus fasciatus*), cuja presa natural é o coelho, foi impactada pelo mixomatose, levando-a a reestruturar sua dieta, incluindo *C. livia* como presa. Como resultado, o aumento do contato com o *T. gallinae* em aves jovens alimentadas com pombos infectados resultou em falhas reprodutivas nas águias-de-bonelli. (Saggese *et al.*, 2007; Forrester; Foster, 2008). Sugere-se que a extinção do pombo-passageiro (*Ectopistes migratorius*) possa ter sido associada à tricomonose, embora não haja dados conclusivos que confirmem essa hipótese. Contudo, a introdução dos pombos-das-rochas (*C. livia*) na América do Norte pelos primeiros colonizadores levanta a possibilidade de que essas aves pudessem transportar cepas virulentas do *T. gallinae*, infectando, assim, espécies nativas, como os Pombos-passageiros. (Forrester; Foster, 2008).

Um estudo realizado em Cuba, demonstrou a incidência de 85,04% (91/107) em pombos com sinais clínicos e 67,16% (180/268) em pombos assintomáticos (Acosta Guevara *et al.*, 2009). Em outra pesquisa, na Espanha, ao avaliar a prevalência de *T. gallinae* em *C. livia*, observaram que 36% (166/357) das aves eram positivas e assintomáticas (Sánchez E Sansano, 2006). Em 2001, na Flórida (Estados Unidos) ocorreu um surto envolvendo mil Rolas-turcas (*Streptopelia decaocto*). Na necropsia, encontrou-se lesões típicas de tricomonose, especialmente no fígado, apesar de algumas aves apresentarem o sinal de “Canker” na cavidade oral (esôfago e papo). Por outro lado, a presença de *Paramyxovirus* dificultou o esclarecimento da causa da morte (Forrester; Foster, 2008). No mesmo ano, no sudoeste da Espanha e sul da Inglaterra foram relatados casos de tricomonose, com a morte de cerca de 2600 pombos (Höfle *et al.*, 2004; Forrester; Foster, 2008).

A presença crescente de aves de rapina em ambientes urbanos revela uma adaptação significativa dessas espécies à perda de habitat natural. Este fenômeno é especialmente notável nas aves de rapina que nidificam próximas a áreas urbanas, onde a escassez de habitat natural impulsiona a reprodução mais próxima das cidades. Um exemplo elucidativo desse ajuste é observado em gaviões-de-coopers (*Accipiter cooperi*) no Arizona, conforme destacado por Boal *et al.* (1998). O estudo revela uma marcante variação na prevalência da infecção por *T. gallinae*, associada à tricomonose, entre filhotes de casais que se reproduzem em áreas urbanas (85%) e aqueles que o fazem em locais mais afastados (9%). Essa disparidade é atribuída à mudança na dieta dessas aves, com gaviões-de-coopers urbanos consumindo uma proporção significativamente maior de pombos urbanos. Estas descobertas

corroboram com pesquisas adicionais que indicam uma mudança substancial na composição da dieta das aves de rapina em ambientes urbanos em comparação com áreas rurais (Estes; Mannan, 2003). O aumento da prevalência da tricomonose em gaviões-de-coopers e gaviões próximos a áreas urbanas destaca a complexa interação entre a urbanização, a perda de habitat e a saúde dessas aves de rapina (Amin *et al.*, 2014).

No Brasil, estudos recentes de nosso grupo de pesquisa relatam a infecção do complexo morfológico do protozoário *T. gallinae* em um filhote de tucano de peito vermelho (*Ramphastos dicolorus*). Macroscopicamente, foi possível observar lesões nodulares no palato mole e edema na cavidade oral típicos de tricomonose, além disso, o diagnóstico foi positivo através de testes moleculares parasitológicos (Martínez *et al.*, 2024). Em um relato do sul do Brasil, o falconídeo jovem, Chimango Caracara (*Milvago chimango*) foi considerado um novo hospedeiro natural para *T. gallinae* (Bruni *et al.*, 2019). Echenique e colaboradores (2019) realizaram um estudo retrospectivo dos casos de tricomoníase oral em aves de rapina recebidas no Laboratório Regional de Diagnóstico da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (LRD-UFPel) no período de 2014 a 2017. Foram analisados os procedimentos de necropsia, identificando sete casos. Todos os animais pertenciam às ordens Falconiformes (3/7) e Strigiformes (4/7) e diferentemente dos outros casos relatados, 4 dos 7 animais eram adultos e apresentavam lesões características de tricomonose.

Há um incremento no número de animais positivos nas últimas décadas, envolvendo Columbiformes, Fringílídeos e Aves de Rapina. Este fato demonstra a necessidade de investigações a fim de compreender a ecologia de *T. gallinae*, se está se adaptando a espécies ou se há novas estirpes específicas de hospedeiros (Sansano *et al.*, 2007).

2.3.3 Transmissão e Mecanismo de Patogênese

Trichomonas gallinae apresenta o ciclo direto, não necessitando de hospedeiros intermediários ou paratênicos, ou seja, a transmissão ocorre de um hospedeiro para o outro. A transmissão se dá por diferentes maneiras, sendo elas: contato direto entre indivíduos, entre adultos e filhotes durante a alimentação, regurgitação (leite de pombo), comportamento de corte, fômites, alimento ou água contaminada, ingestão

de aves mortas infectadas, no caso de aves onitófagas (Cole, 1999; Cooper; Petty, 1988; Forrester; Foster, 2008).

A ocorrência e gravidade da infecção não estão apenas relacionadas à presença e cepa do protozoário, mas também ao estado imunológico do animal. Animais imunodeprimidos são mais susceptíveis, assim como os animais jovens devido à sua idade (Forrester; Foster, 2008). O período de incubação varia de 4 a 14 dias, e o parasita pode permanecer viável por pelo menos cinco dias em alimentos, principalmente em grãos e carcaças de aves. Além disso, ele pode sobreviver por períodos que variam de 20 minutos a várias horas na água. Vale ressaltar que o parasito demonstra extrema sensibilidade ao calor e à desidratação (Cole, 1999; Forrester; Foster, 2008; Zadavec *et al.*, 2017).

Da mesma forma, a infecção não está exclusivamente vinculada ao sistema imunológico da ave. Variações na patogenicidade entre cepas avirulentas e virulentas resultam em diferenças antigênicas significativas, podendo desencadear uma resposta imunológica intensa do hospedeiro, manifestando-se por meio de sinais clínicos ou permanecendo assintomática (Forrester; Foster, 2008). A persistência da infecção em aves infectadas pode estender-se por até 2 anos. As lesões provocadas por esse protozoário são mais frequentes na boca, faringe, esôfago e papo, sendo menos comum a invasão do trato digestivo superior (Bondurant; Honigberg, 1994).

Ao longo do processo infeccioso causado por *T. gallinae*, os trofozoítos aderem ao epitélio superficial da mucosa do trato gastrointestinal superior. Através do movimento amebóide e da ação de enzimas hidrolíticas, esses organismos promovem a separação das junções intercelulares, facilitando assim a invasão e progressão através da mucosa. Durante a colonização do trato gastrointestinal superior, os trofozoítos frequentemente instigam uma resposta granulomatosa, resultando na necrose dos tecidos circundantes. A mucosa comprometida torna-se suscetível à invasão bacteriana, culminando em quadros de septicemia (Kietzmann, 1993; Cole, 1999; Forrester E Foster, 2008; Neimanis *et al.* 2010; Martínez-Herrero *et al.* 2020). *T. gallinae*, ocasiona úlceras úmidas de coloração branca, com aparecimento de exsudato na mucosa (Forrester; Foster, 2008).

Na fase crônica da doença, essas úlceras se tornam amareladas, aumentam de tamanho, podendo penetrar nos olhos, crânio até chegar à circulação, provocado necrose hepática, esplênica, pulmonar e os sacos aéreos também são afetados. A virulência das cepas de *T. gallinae* variam, sendo que, as mais virulentas são as

denominadas Jones' Barn (JB) e Eiberg (IBERG). A patogenicidade do isolado JB é capaz de levar a óbito em média 8 dias pombos não imunes, sua patogenicidade diminui quando cultivada *in vitro* com meios de culturas, porém é restabelecida quando o isolado é inoculado em animais não imune (Bondurant; Honigberg, 1994; Forrester; Foster, 2008). Em isolados com baixa patogenicidade podem causar sinais clínicos leves ao hospedeiro ou pode ser assintomático, porém é portador do protozoário. Em infecções leves observa-se hipersíntia e alguma inflamação da cavidade oral, laringe e faringe. O isolado é considerado patogênico quando provoca lesões caseosas ou fibroncroticas no trato digestivo superior podendo infiltrar-se no crânio e ossos nasais. Em infecções severas, o animal vem a óbito em apenas 4 dias (Cole, 1999; Forrester; Foster, 2009; Herdt; Pasmans 2009).

As alterações histopatológicas foram avaliadas em infecções causadas pelas estirpes JB e a Eiberg em pombos-das-rochas, e foi observado que os protozoários atingiram o fígado e levaram ao óbito as aves entre 3 a 10 dias, para a estirpe JB e 7 a 17 dias, para estirpe Eiberg. A resposta patológica foi relatada como inflamação purulenta atribuindo a morte dos animais pela destruição massiva do fígado (Forrester; Foster, 2008).

Durante pelo menos três anos, Kocan e Amend (1972) conduziram um estudo de infecção em populações de rola-carpideira em áreas epizoóticas e não epizoóticas. Em termos gerais, constataram que 85% das rolas-carpideiras (*Zenaidura macroura*) na área epizoótica e 69% na área não epizoótica eram imunes à doença. Com o objetivo de avaliar a taxa de resistência à tricomoníase em populações *C. livia* e rolas-carpideiras (*Z. macroura*), que foram previamente não infectadas por *T. gallinae*, utilizando a linhagem JB, os resultados indicaram que, embora todas as aves tenham sido infectadas, 88% dos pombos-das-rochas e 82% das rolas-carpideiras demonstraram resistência à doença.

As cepas de *T. gallinae*, caracterizadas por sua virulência moderada, demonstram uma notável associação com a formação de abscessos caseosos no trato digestivo superior e na região orofaríngea das aves afetadas, conforme identificado por Cole e Friend em 1999. Em contraste, cepas avirulentas do parasito não provocam lesões visíveis. Essa distinção sugere que diferentes linhagens do parasito têm níveis variados de patogenicidade, sendo que as cepas de virulência moderada podem causar impactos significativos na saúde das aves hospedeiras. Curiosamente, Stabler em 1948 relata que uma proporção substancial, entre 80-90%,

de pombos adultos estavam infectadas por *T. gallinae*, mas sem apresentar sinais clínicos discerníveis da doença. Essa aparente discrepância entre a alta prevalência da infecção e a ausência de sintomas evidentes destaca a complexidade da interação entre as cepas do parasito e as aves hospedeiras, indicando a necessidade de uma compreensão mais aprofundada da epidemiologia e dinâmica dessa infecção em populações aviárias (Amin *et al.*, 2014).

Aves que já foram infectadas por cepas virulentas e avirulenta de *T. gallinae*, demonstram uma proteção imunológica contra efeitos patológicos de uma próxima infecção por uma cepa virulenta. Tanto a imunidade e humoral como a celular estão envolvidas nesse processo. Contudo, a extensão da resistência permanece desconhecida, e a imunidade diminui gradualmente após o desaparecimento da infecção (Herdt; Pasmans 2009). A fagocitose do protozoário, mostra-se suficiente para combater a doença em infecções primárias causadas por cepas avirulentas ou de moderadamente virulentas, o mesmo não acontece em cepas altamente virulentas, entretanto, a função da fagocitose em aves imunes ainda não é esclarecida. Sendo assim, os anticorpos são os mais importantes para proteção. Um exemplo desse processo é a imunoglobulina IgA, presente no leite de pombo. Os progenitores utilizam um líquido composto por células epiteliais descamadas, rico em proteínas, gorduras e imunoglobulinas, para alimentar e proteger as crias. Nesse fluido, ocorre a transferência desta imunoglobulina para a circulação sanguínea dos filhotes por meio de pinocitose. Acredita-se que a IgA esteja associada à transferência de imunidade para *T. gallinae*, no entanto, ainda não foi comprovada. (Forrester; Foster, 2008; Crespo *et al.* 2018).

Acredita-se que aves que sobrevivem à infecção pelo protozoário possam desempenhar papel de portadoras latentes assintomáticas por vários anos, contribuindo, dessa forma, para a disseminação do parasito. De forma geral, a resposta imunológica varia de ave para ave (Amin *et al.* 2014; Gómez *et al.* 2018; Martínez-Herrero *et al.* 2020).

2.3.4 Manifestações clínicas

As aves infectadas por *T. gallinae* exibem uma variedade de sinais clínicos, sendo as principais manifestações relacionadas a lesões orais que bloqueiam a passagem de ar e alimento na traqueia. Isso pode levar à morte por sufocação. Além

disso, outras manifestações clínicas incluem perda de peso, indiferença a estímulos externos, plumagem com mal aspecto, apatia, hipersalivação, dificuldade em fechar o bico, taquipneia, odor desagradável no bico e edema de papo. Algumas aves podem apresentar sinais inespecíficos como diarreia, anorexia, depressão, dispneia, dificuldade de deglutição e regurgitação (presença de placas no trato digestivo superior), bem como inflamações no papo (Forrester; Foster, 2008; Forzán *et al.*, 2010).

Em casos agudo da doença, é possível perceber o desenvolvimento de lesões do tipo proliferativa, podendo ser caseosas e/ou fibronecróticas, localizadas no trato digestivo superior e orofaringe das aves afetadas. Essas lesões também podem ser encontradas no papo, esôfago, ao redor do bico, atribuindo à face um aspecto edemadecido. As lesões caseosas são pequenas e definidas com aspecto cremoso amarelado. Lesões proliferativas caseosas ou fibronecróticas, aumentam de tamanho, impedindo a passagem de alimento, água e ar, podendo levar a morte devido a obstrução na glote (Cole, 1999; Forrester; Foster, 2008).

Na fase crônica da doença, as lesões podem se infiltrar no crânio e ossos do bico, atingindo o sistema nervoso e a circulação sanguínea, chegando até órgãos como, fígado, baço, coração, pâncreas, pulmões e sacos aéreos, levando a necrose desses órgãos (Forrester; Foster, 2008).

Inicialmente, as lesões são pequenas e ruborizadas (*flush*), mais tarde podem coalescer e formar massas grandes e caseosas na cavidade oral (Figura 5) ou região da faringe. Pelo fato de as lesões atrapalharem a passagem do ar e alimento, a ave geralmente morre por inanição, ou falência respiratória, a disfunção hepática também pode levar ao óbito. Fatores do hospedeiro podem ser determinantes para estabelecer quais órgãos são afetados, por exemplo, a cepa JB invade o fígado de *C. livia*, entretanto quando a mesma cepa infecta espécies de rola-carpideira (*Z. macroura*) invade preferivelmente os pulmões (Forrester; Foster, 2008; Gómez-Muñoz *et al.*, 2022).

Figura 5- Lesão causada por *Trihomonas gallinae* (seta) no trato digestivo superior de um pombo doméstico (*Columba livia*)



Fonte: Elaborado pelo autor

2.3.5 Diagnóstico

Assim como para *T. vaginalis* para *T. gallinae* a montagem úmida é muito utilizada, na qual depende da observação microscópica do trofozoítos, onde esse são móveis e sua forma pode variar de alongada ou oval. O material da amostra pode ser obtido através de swabs da cavidade oral das aves (Amin et al., 2014). Após a obtenção da amostra, a montagem úmida envolve a dispersão sobre uma lâmina de vidro e várias colorações podem ser utilizadas (Giemsa, prata, hematoxilina-ferro, verde malaquita ou azul de metileno, Papanicolaou, laranja acridina) para facilitar a visualização do protozoário (Kaufman et al., 2004; Borji et al., 2011). No entanto, destaca-se a limitação dessa técnica devido à sua baixa sensibilidade decorrente do número reduzido de parasitos detectados e assim a possibilidade de obter resultados falso-negativos (Kaufman et al., 2004).

Para contornar a limitação da montagem úmida, propõe-se a inoculação dos swabs em um meio de crescimento apropriado TYM (trypticase-yeast extract-maltose Diamond 1957), seguida pela incubação à temperatura ideal (37 ° C). Essa estratégia tem se mostrado útil para aumentar significativamente o número de trofozoítos, melhorando assim a eficácia e confiabilidade do diagnóstico. Para observação de flagelados nos tecidos as técnicas histopatológicas são empregadas, entretanto,

aplicação das colorações hematoxilina e eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS) revelou-se limitada na identificação dos flagelados, especialmente em órgãos com apenas alguns trofozoítos (Amin *et al.*, 2011).

Técnicas moleculares como a PCR também são empregadas para diagnóstico da tricomonose. DNA (ácido desoxirribonucleico) de *T. gallinae* pode ser detectado em secreções orais, tecidos retirados do papo e faringe. Uma variedade de *primers* são descritos, dentre eles os direcionados ao 18S rDNA (Grabensteiner; Hess, 2006) ou à Fe-hidrogenase (Lawson *et al.*, 2011). Os *primers* da Fe-hidrogenase foram desenvolvidos para amplificar de maneira específica o gene correspondente em *T. gallinae*, contribuindo assim para a diferenciação entre as cepas. Essa abordagem revelou ser capaz de identificar sutis variações entre as diferentes cepas de *T. gallinae* (Chi *et al.*, 2013).

A técnica de hibridização *in situ* (ISH) utilizada para identificar DNA e RNA (ácido ribonucleico) de amostras como tecidos também pode ser empregada no diagnóstico da tricomonose (Liebhart *et al.*, 2006). De modo geral, a ISH demonstrou uma sensibilidade superior quando comparada à coloração histoquímica, tais como PAS e HE, especialmente em tecidos onde a presença do parasito é observada de forma marginal (Amin *et al.* 2011). Após a aplicação da ISH os protozoários foram identificadas distintamente, apresentando-se como células marcadas em um tom azul escuro. Foi possível visualizar células íntegras de tricomonas em diversos órgãos, permitindo uma precisa determinação de sua localização nos tecidos (Amin *et al.* 2011). Além disso, a técnica ISH oferece a oportunidade de estabelecer correlações entre as alterações histológicas e a presença do protozoário, proporcionando possibilidades para investigações sobre a virulência de *T. gallinae* em um contexto celular (Amin *et al.* 2011; Amin *et al.* 2014).

Técnicas imunológicas geralmente são empregas em experimentos laboratoriais, por exemplo, o teste de ELISA foi utilizado por Amin e colaboradores. (2011) para detectar anticorpos contra *Trichomonas gallinarum* e *T. gallinae*. Porém, ainda não está claro se a aplicação dessa técnica é adequada para obter uma compreensão mais aprofundada da presença de *T. gallinae* em aves. Uma abordagem interessante seria empregar a sorologia para realizar a triagem de aves que podem ser potenciais portadoras. Isso se torna especialmente relevante, considerando que aves que sobreviveram a uma infecção pelo parasito são reconhecidas como portadoras latentes por um longo período. Portanto, é uma possibilidade que essas

aves portadoras desempenhem um papel na disseminação persistente da tricomonose (Amin *et al.* 2014).

A realização de exames *post-mortem* pode desempenhar um papel vital na identificação de *Trichomonas* spp., particularmente *T. gallinae*, devido às lesões que se manifestam como material caseoso amarelado na orofaringe de aves infectadas. No entanto, é importante ressaltar que as infecções pelo protozoário podem ser facilmente confundidas com outras condições patológicas que resultam em lesões similares. Por exemplo, infecções por poxvírus aviários, fungos como *Candida* sp. e *Aspergillus* spp., nematoides como *Capillaria* spp., juntamente com a presença de sialólitos (cálculos salivares), faringoesofagite inespecífica ou deficiência de vitamina A, podem conduzir a lesões orais semelhantes (Levine, 1985). Adicionalmente, confusões podem surgir com herpesvírus de pombo, paramixovírus aviário ou adenovírus aviário, especialmente quando os trofozoítos afetam órgãos internos. Além disso, infecções bacterianas do umbigo podem ser erroneamente associadas ao cancro do umbigo (pombos) causado por *T. gallinae*, como evidenciado por (Vogel; 1992; Amin *et al.*, 2014). Outras doenças em que o diagnóstico diferencial é necessário são a tuberculose, micoplasmose, salmonelose e coligranulomatose pois são doenças infecciosas que compartilham características de formação de granulomas (Friedhoff, 1982; Park; 2011).

2.3.6 Tratamento e Profilaxia

A terapia para tricomonose animal foi instituída a mais de 50 anos, inicialmente preconizou-se o uso de medicamentos como acriflavina, ácido clorídrico fraco e sulfato de cobre administrados topicamente ou na água potável dos animais (Rosenwald, 1944; Jaquette, 1948). O uso de alguns antibióticos já foi relatado, porém não é de uso típico, uma vez que, a terapia com antibiótico de amplo espectro como Aureomicina por exemplo, podem predispor a infecção fúngica latente e possivelmente, a tricomonose latente, portanto, certos antibióticos podem ser desfavoráveis ao tratamento (Hamilton; Stabler, 1953; Amin *et al.*, 2014). Assim como no tratamento de *T. vaginalis*, a classe dos 5-nitroimidazóis é rotineiramente utilizada para *T. gallinae*, principalmente o MTZ (Amin *et al.*, 2014)

Em animais, o MTZ é utilizado na concentração de 0,5%, onde 25 mg/pombo é administrado pela via subcutânea, uma vez durante 5 dias. O dimetridazol, é usado na concentração de 40% com dosagem de 1 g/L na água durante 5 dias

posteriormente mais 0,5 g/L na água por mais 10 dias. O ronidazol é administrado na concentração de 1% na dose de 4 g/L na água por 12 dias. O carnidazol é administrado na dose 10 mg/pombo, via oral, dose única. Falhas nos tratamentos podem acontecer devido à resistência desse grupo de fármacos devido ao uso indiscriminado para prevenção da doença vez. Não se recomenda tratar animais que apresentam baixa carga parasitária, pois acredita-se que cepas de baixa virulência proporcionam devida defesa imunitária contra cepas mais virulentas (Kulda; Tachezy; Cerkasovova, 1993; Forrester; Foster, 2008). Em animais é viável o tratamento apenas de aves de cativeiro, pois os fármacos utilizados necessitam de administração forçada via oral ou pela água e alimentação (Forrester; Foster, 2008). Nas aves selvagens, a terapia geralmente não é realizada, devido à dificuldade de aplicação dos medicamentos, exceto, quando há captura bem-sucedida do animal (Cole; Friend, 1999). Swinnerton *et al.* (2005) utilizaram derivados de metronidazol, dimetridazol e ronidazol para tratar uma pequena população de pomba-rosada selvagem (*Columba mayeri*). Entretanto, obtiveram resultados limitados na eficácia do tratamento.

Para *T. gallinae* caso o tratamento não esteja funcionando, novas medidas deverão ser tomadas, como o aumento da dose do fármaco ou prolongação da duração do tratamento. Outro fato importante, é que a tricomonose pode não causar a doença por si só, porém é capaz de deprimir o sistema imune e predispor o animal a outras enfermidades (Forrester; Foster, 2008). Por esse motivo, o tratamento administrado em alimentadores de pássaros é de certa forma controverso, pois, é necessário a ingestão do alimento, e naturalmente, os pássaros podem não utilizar um único alimentador e assim a absorção do medicamento é subestimada e dessa forma pode predispor o desenvolvimento de cepas resistentes. Além disso, os medicamentos presentes nos alimentos podem causar efeitos adversos em pássaros não infectados, por exemplo, o dimetridazol encontrado em alguns alimentos pode causar toxicidade em aves (Munoz *et al.* 1998; Reece *et al.* 1985; Amin *et al.*, 2014). Corroborando com esse fato, Höfle *et al.* (2004), observaram uma redução na população de perdizes (*Alectoris rufa*) em uma área de surto de tricomonose em pombos-torcaz (*Columbia palumbus*). Estes animais foram tratados com dimetridazol por meio dos alimentadores. Visto isso, é preciso de novas medidas para reduzir as fontes de infecção e consequentemente prevenir os casos de *T. gallinae* em aves no geral.

A resistência aos nitroimidazóis já foi relatada em estudos antigos em diversos isolados do parasito (Lumeij; Zwiijnenberg, 1990; Franssen; Lumeij, 1992; Munoz *et al.*

1998). Diferentes culturas de *T. gallinae* obtidas de periquitos e pombos de corridas foram analisadas quanto a resistência de quatro tipos de 5-nitroimidazóis e observou-se diferenças nas concentrações letais mínimas (CLMs) (ZIMRE-GRABENSTEINER *et al.*, 2011). Isolados geneticamente distintos de *T. gallinae* foram observados parasitando o mesmo animal e mostraram certas diferenças quanto a sensibilidade de tratamentos *in vitro*, sugerindo dessa forma uma relação entre a resposta aos medicamentos e variação genética entre isolados (Grabensteiner *et al.*, 2010; Zimre-Grabensteiner *et al.*, 2011)

Para que a tricomonose seja controlada é preciso monitorar o habitat das aves de cativeiro, sendo necessário saber qual o estado das aves infectadas, impor a quarentena e evitar a entrada de animais de vida livre, principalmente pombos. Além da implementação de boas práticas de higiene, como desinfecção de comedouros e bebedouros, renovação diária da alimentação e fonte de água. Aves gravemente infectadas que não respondem ao tratamento, devem ser submetidas a eutanásia para que não ocorra a disseminação da infecção (Lumeij; Zwijnenberg, 1990; Forrester; Foster, 2008).

2.4 Derivados Benzofuroxanos

Os compostos heterociclos, são muito utilizados na química orgânica, utilizados como blocos construtores para a síntese de novas substâncias e, representam uma importante classe de compostos, pois possuem diversas atividades biológicas. Os derivados benzofuroxanos, são oxadiazóis que apresentam de cinco membros e possuem dois átomos de nitrogênio (*N*-heterociclos) e um átomo de oxigênio no anel aromático. Esses compostos são capazes de interagir com receptores e enzimas de organismos vivos, seja pela ligação ao hidrogênio, coordenação e dipolo, quanto por interações hidrofóbicas (Barreiro, 1991; Dewangan, *et al.*, 2010; Melo, *et al.*, 2006; Peng, 2013; Taylor, 2016).

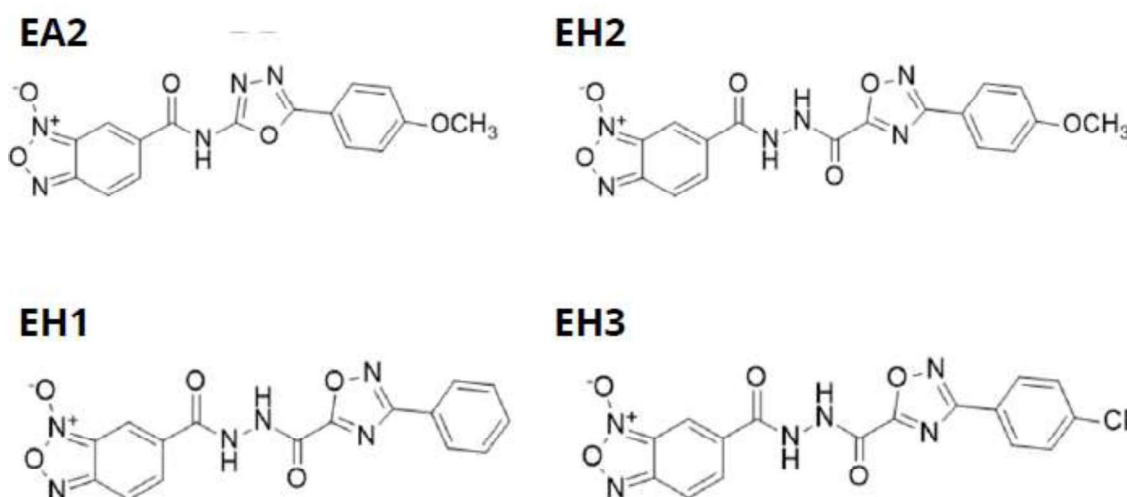
Outra classe de *N*-heterociclos é o 1,2,5-oxadiazóis, especialmente 1,2,5 oxadiazóis-*N*-óxidos, também conhecido como furoxanos que são capazes de doar oxigênio e nitrogênio, responsável pelas propriedades bioquímicas dessas substâncias (Gasco *et al.*, 2004). Os derivados benzofundidos dos furoxanos são chamados de benzofuroxanos e são descritos desde o século XIX. Essas estruturas contém um núcleo benzênico e passam por um processo de tautomerismo, onde a molécula de oxigênio exocíclico altera sua posição com base nas condições físico-químicas em

que o composto está presente, assim como os substituintes presentes na molécula (Todres, 2012; Fedik *et al.*, 2019).

Atualmente os derivados benzofuroxanos são utilizados no combate a várias doenças, como HIV, sua ação ocorre ao bloquear a enzima HIV integrase no ciclo da replicação do vírus; no tratamento de arritmia cardíaca, ao bloquear os canais de cálcio; além de possuírem atividade antibacteriana, anti-inflamatória, anticonvulsivante, antitumoral, antioxidante, antiprotozoária e antimalarial (Aanandhi *et al.*, 2010; Amir *et al.*, 2004; El-Eman *et al.*, Giliani *et al.*, 2009; Singh; Singh, 2010; 2004; Zareef *et al.*, 2007).

Devido a presença da subunidade =N($\rightarrow$ O)O nesses derivados é possível perceber propriedades aceptoras de elétrons semelhantes ao nitrocompostos aromáticos (N-óxidos), dos quais são aplicados como agentes antitumorais e/ou citotóxicos ativados biorredutivamente (Fang, 2004; Paula, 2009; Dharmaraja *et al.*, 2012) (Figura 6).

Figura 6- Estrutura dos compostos derivados benzofuroxanos (utilizados no manuscrito 1 e 2) (EA2, EH1, EH2, EH3).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os compostos derivados benzofuroxanos oxadiazóis são moléculas capazes de liberar óxido nítrico (ON), no entanto, o mecanismo pelo qual o ON é liberado ainda não é bem conhecido, apesar de ser proposto que essa doação seja mecanismo cisteína-dependente. O ON é uma espécie reativa de nitrogênio e uma das menores

moléculas sinalizadoras com atividade biológica, apresentando propriedades que facilitam a difusão através das membranas celulares sem o auxílio de transportadores específicos (Mayer; Hemmens, 1997).

O ON é uma molécula reativa que modula reações inflamatórias ou anti-inflamatórias, dependendo do tipo celular e do estímulo, possuindo importante papel no sistema imunológico, envolvido na patogenia e controle de diversas enfermidades (Cerqueira; Yoshida, 2002). Sendo que, em determinadas doenças o aumento do ON traz diversos benefícios, como, por exemplo, a destruição de células cancerosas e microbianas. Além disso, desempenha funções fisiológicas como a regulação da pressão arterial basal, relaxamento do endotélio e neurotransmissão (Queiróz; Batista, 1999).

Além disso também atua também como cardioprotetor e neuroprotetor, além de possuir atividade parasiticida, apresentando efeitos sobre *Schistosoma mansoni* (Sayed *et al.*, 2008), *Plasmodium falciparum* (Galli *et al.*, 2005) e *Trypanosoma cruzi* (Boiani *et al.*, 2008; Vieira, 2007). O mecanismo pelo qual o NO atua sobre o *T. cruzi* ainda não está completamente elucidado, mas acredita-se que o NO seja capaz de interferir no metabolismo do parasito, atuando na atividade da enzima cruzipaina, uma glicoproteína abundante de *T. cruzi*. A cisteína que também pode ser um alvo do NO, é uma das enzimas mais importantes de *T. vaginalis*, pois é capaz de degradar IgG, IgM e IgA presentes na vagina (Maciel; Tasca; De Carli 2004; Duschak; Couto, 2009; Cazorla *et al.*, 2010).

Os derivados benzofuroxanos são estáveis em meio ácido e frente aos eletrófilos, além de apresentarem estabilidade térmica, contudo são poucos estáveis frente aos nucleófilos (Sayed, *et al.*, 2008; Boiani, *et al.*, 2008). Ainda, devido sua capacidade de liberar NO, muitos estudos têm sido realizados a fim de se obter um composto estável e que seja capaz de controlar diversas doenças (Bogdan, 2001; Albuquerque *et al.*, 2016; Mayer, *et al.*, 2017).

2.5 Antibióticos

Os antibióticos são substâncias químicas produzidas por microrganismos utilizadas no tratamento de infecções causadas por outros microrganismos, ou seja, o uso desses fármacos inibe o crescimento de microrganismos evitando assim a propagação da doença (Englert, 1998; Linzmeier *et al.*, 2009). Os antibacterianos, são

derivados de microrganismos ou compostos sintéticos equivalentes com função bacteriostática e bactericida. Estes fármacos, são derivados de várias fontes seja ela microrganismos, plantas, animais, sintéticos ou semissintéticos e atuam contra diferentes tipos de microrganismos, incluindo os parasitos (Brasil, 2022). Em aves, além do seu uso curativo, os antibióticos podem ser utilizados em doses subterapêuticas como promotores de crescimento, principalmente em aves de produção (Lafigliola *et al.*, 2000; Linzmeier *et al.*, 2009).

Esses medicamentos são agrupados em classes, as quais, são semelhantes quimicamente, por isso, fármacos pertencentes a mesma classe geralmente atuam contra os mesmos microrganismos, além disso, apresentam mecanismos similares de resistência. Atualmente existem mais de 30 classes de antibióticos disponíveis tanto para uso humano quanto para animal ou ambos (Brasil, 2022).

A administração de antibióticos em aves geralmente ocorre através da água de beber, pois as aves enfermas interrompem a ingestão de comida, mas frequentemente continuam a consumir água. Essa questão depende da apresentação dos fármacos e as recomendações de uso (Singer; Hofacre, 2006; Santana *et al.*, 2011).

2.5.1 Fluoroquinolonas

O surgimento das quinolonas em 1962 por George Lesher e colaboradores de forma acidental, como um produto secundário da síntese da cloroquina, um agente antimalárico. Entretanto, esse produto secundário apresentava atividade antimicrobiana, e dessa forma surgiu o Ácido Nalidíxico, a primeira quinolona (Lescher *et al.*, 1962; Andriole, 2000; Higgins *et al.*, 2003; Da Silva; Hollenbach, 2010). Posteriormente ao ácido nalidíxico a flumequina e o ácido oxonílico foram introduzidos e denominados quinolonas de primeira geração. Até os dias de hoje, essa classe é recomendada para tratamento de infecções das vias urinárias por apresentarem uma eficácia contra bactérias Gram-negativas da família Enterobacteriaceae. Todavia, até a década de 1980 não havia compostos capaz de inibir o crescimento de bactérias como *Pseudomonas spp.*, alguns anaeróbicos e bactérias Gram-positivas, por isso, após diversas pesquisas envolvendo as quinolonas de primeira geração, originaram-se as quinolonas de segunda geração ou fluoroquinolonas (Appelbaum; Hunter, 2000; Silva; Hollenbach, 2010). A principal diferença entre as quinolonas de primeira e

segunda geração é a presença de uma cadeia lateral piperazinila na posição 7 da estrutura das quinolonas, resultando no ácido pipemídico. Essa alteração aumentou a atividade dos compostos frente a bactérias Gram-negativas e mostrou certa ação contra bactérias Gram-positivas. Essa eficácia demonstrada se dá pela capacidade da modificação (ácido pipemídico) penetrar na parede celular da bactéria, visto que, para que se tenha uma atividade antimicrobiana é necessário que os antibióticos adentrem a célula bacteriana (Appelbaum; Hunter, 2000).

As fluoroquinolonas evoluíram significativamente nos últimos anos. Desde 1973, quando a flumequina (primeiro composto com um grupo fluoro na posição 6) foi patenteada, percebeu-se o potencial de aprimoramento da atividade antimicrobiana em bactérias Gram-positivas nesta classe. A principal inovação foi a combinação do anel de piperazina na posição 7 e um composto fluorado na posição 6 do anel aromático, originando dessa forma uma nova fluoroquinolonas, o norfloxacino (NOR). O NOR foi patenteado em 1978 e por mais promissora que seja sua atividade frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas, sua farmacocinética e atividade ainda não eram adequadas para uso sistêmico. Após o NOR muitas outras fluoroquinolonas foram desenvolvidas e são utilizadas atualmente, como por exemplo: ciprofloxacino, ofloxacino, lomefloxacino e perfloxacino (Appelbaum; Hunter, 2000; Alós, 2003; Rissardo; Caprara, 2023).

As fluoroquinolonas são agrupadas em cinco gerações com base em sua ação antibacteriana e farmacocinética (Fan *et al.*, 2018; Jones *et al.*, 2016) são fármacos com propriedades antimicrobianas de amplo espectro contra organismos Gram-positivos e Gram-negativos e microrganismos anaeróbicos, principalmente quando outros fármacos não são eficazes devido a resistência antimicrobiana (Souza, 2005; Rissardo; Caprara, 2023). Quanto as propriedades físico-químicas dessa classe podem influenciar em sua atividade, como seu caráter hidro/ lipofílico, sobretudo o pH, onde sua ação depende do pH do meio em que se encontram. Para que possam interagir com a DNA girase (topoisomerase II) e topoisomerase IV, enzimas envolvidas na replicação, transcrição, reparo e recombinação do DNA bacteriano e enzima alvo dessa classe, esses fármacos necessitam estar em pH ácido (Sárközy, 2001; Park, 2002).

NOR foi a primeira fluoroquinolona a receber a aprovação para uso pela FDA. É recomendada para uso humano no tratamento da gonorreia, infecções da próstata, urinárias, biliares e do trato respiratório (Holmes; Brogden; Richards, 1995; Ovando *et*

o NOR em clones de *P. falciparum*, onde foi observado uma CL₅₀ de 55.3 µM, dessa forma, o NOR também demonstrou ter atividade antimalárica

Outra fluoroquinolona de segunda geração, é o ciprofloxacino. Este fármaco foi patenteado em 1983 pela Bayer A.G. e posteriormente seu uso foi aprovado pela FDA. São mais de 300 marcas registradas e é um antimicrobiano amplamente utilizado (De Almeida, 2007), com notáveis propriedades farmacocinéticas como por exemplo, boa biodisponibilidade e penetrabilidade, além de efeitos colaterais reduzidos (Sharma *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2018). É recomendado para o tratamento de infecções que acometem o sistema urinário, respiratório, digestório, infecções de pele, ossos, tecidos moles, ISTs e profilaxia em hospedeiros neutropênicos imunocomprometidos. Ademais, é recomendado pela OMS para tratamento da tuberculose humana, principalmente em casos de resistência ou intolerância ao tratamento antituberculose de primeira linha (Crofton, 1997; Abraham; Burger's, 2003; Guneyssel *et al.*, 2009; Verderosa *et al.*, 2017).

Assim como as demais quinolonas, as principais bactérias alvo são as Gram-negativas, as enzimas DNA girase e topoisomerase IV são necessárias para duplicação do DNA bacteriano, elas separam a fita dupla de DNA, permitindo assim, sua replicação. O mecanismo de ação do ciprofloxacino está relacionado com a inibição dessas enzimas evitando a ocorrência de duplicação do DNA da bactéria, além disso, o fármaco pode inibir a síntese de RNA, e dessa forma agrava o processo de replicação e compromete o crescimento bacteriano (Hooper, 2001; Collin; Karkare; Maxwell, 2011).

O uso do ciprofloxacino já foi descrito em casos de tricomoníase humana devido a seu efeito promissor dentre todas as fluoroquinolonas. De acordo com Inceboz, Inceboz e Ozturk (2004), este fármaco atingiu a total inibição de trofozoítos de *T. vaginalis* em 72 horas nas concentrações de 750 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL e 125 µg/mL, ao contrário do relato de Pastel (1989), no qual foi mencionada a ineficácia do ciprofloxacino em relação a espécies de *Trichomonas* spp.. O ciprofloxacino já foi utilizado frente a outros protozoários, como, *Giardia lamblia*, *T. gondii* e *P. falciparum*. Em *G. lamblia*, o fármaco causou a redução da viabilidade através de alterações morfológicas como perda de integridade de membrana dos trofozoítos e ainda inibiu *in vitro* a aderência, crescimento e captação de O₂ do parasito (Sousa; Poiars-Da-Silva, 2001). A atividade do ciprofloxacino e seus derivados também é promissora frente aos protozoários *T. gondii* e *P. falciparum*,

onde sugere-se que o medicamento atue na enzima girase dos parasitos, entretanto, mais estudos devem ser conduzidos a fim de comprovar essa hipótese (Dubar *et al.*, 2011).

Como mencionado, as fluoroquinolonas atuam inibindo a DNA girase mitocondrial importante para replicação dos organismos. Petmitr e colaboradores (2000), descrevem que as fluoroquinolonas podem não ter um alvo adequado em *T. vaginalis*, uma vez que, os tricomonadídeos não apresentam mitocôndrias e sim hidrogenossomos, onde o DNA mitocondrial não está presente. Esse fato difere-se em protozoários como *P. falciparum* que são sensíveis as fluoroquinolonas e a topoisomerase II do DNA mitocondrial são um alvo válido para ação do medicamento.

2.5.2 Nitrofurantoína

Na década de 40, a introdução de grupos nitro (-NO₂) em moléculas heterocíclicas levou ao desenvolvimento de diversos nitrofuranos, o mais conhecido e amplamente utilizado é a nitrofurantoína (NF) (Shan; Wade, 1989; Huttner *et al.*, 2015). É um antibiótico sintético originado a partir de um furano juntamente com um grupo nitro, além disso, a NF contém um substituto contendo hidantoína (Calderaro *et al.*, 2021; Squadrito; Del Portal, 2023).

Seu uso foi liberado pela FDA em 1953 e recomendado para tratamento de infecções do trato urinário em humanos e desde então, esse medicamento passou a ser prescrito com maior regularidade. Na década de 70 a NF perdeu um pouco de sua popularidade devido a introdução trimetoprim/sulfametoxazol e antibióticos beta-lactâmicos. Entretanto, a partir dos anos 2000, renovou-se o interesse a esse fármaco devido as causas de resistência a sulfas e as fluoroquinolonas em conjunto com a falta de novos antibióticos orais. Com o aumento de bactérias produtoras de ESBL (beta-lactamases de espectro estendido) e resistentes a carbapenêmicos novos desafios surgiram, e então, diversas diretrizes foram revisadas a fim de instituir a NF como terapia de primeira linha em infecções do trato urinário inferior não complicadas (Afssaps, 2008; Huttner *et al.*, 2015; Ghazvini *et al.*, 2019).

Anualmente 150 milhões de infecções do trato urinário são relatadas no mundo (Khoshbayan *et al.*, 2022). Um dos principais motivos, é a colonização periuretral, ou seja, bactérias presentes no ânus podem colonizar a área ao redor da uretra e,

posteriormente, ascender em direção ao trato urinário, causando as infecções. A NF apresenta benefícios pois direciona-se ao trato urinário inferior, ademais, mantém uma concentração sérica reduzida e assim, não afeta a flora intestinal. Acredita-se que o efeito contínuo da NF e a baixa resistência a microrganismos sejam justamente por não afetar a flora intestinal (Squadrito; Del Portal, 2023).

Já são relatados efeitos bactericidas em altas concentrações e efeitos bacteriostáticos em concentrações menores (5-10 pg/mL) da NF e (Andriole, 1985; Komp *et al.*, 2015; Fransen *et al.*, 2016; Ari *et al.*, 2023). Sua atividade é relatada em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas do trato urinário, como por exemplo: *E. coli*; *Enterococci*; *Klebsiella*; *Staphylococcus saprophyticus* e *Enterobacter*. Sua suscetibilidade também inclui *Shigella*; *Salmonella*; *Citrobacter*; *Neisseria*; *Bacteroides*; estreptococos do grupo B; *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Além disso, a NF é eficaz contra cepas de *E. coli* produtoras e não produtoras de ESBL. (Tulara, 2018; Gardiner *et al.*, 2019; Squadrito; Del Portal, 2023). A resistência desse fármaco é rara, ainda que usado de forma generalizada por várias décadas. Em um estudo populacional realizado com cepas de *E. coli* e NF demonstrou taxa de resistência de 1,6% (Sanchez *et al.*, 2012).

Além da sua atividade biológica em bactérias, a utilização NF foi relatada no tratamento de algumas parasitoses. Yeo e colaboradores (2016) ao utilizarem A NF em experimentos *in vivo* (camundongos) e *in vitro* frente a *T. gondii*, observaram uma redução de 44,7% (100 mg/mL) dos parasitos na cavidade peritonial no ensaio *in vivo*. Em outra pesquisa *in vivo* também foi utilizado uma cepa de *T. gondii* e a NF como tratamento, resultando em uma diminuição significativa e expressiva na contagem cistos cerebrais em camundongos, dessa forma, os autores sugerem a NF como possível opção anti-*T. gondii* para uso clínico na toxoplasmose (Abdallah *et al.*, 2022). Shafi *et al.*, (2023) avaliaram o potencial antimalárico da NF, a qual, exibiu efeito inibitório do *Plasmodium* sp. em concentrações baixas, e assim inviabilizou o desenvolvimento do trofozoíto, além disso, evidenciaram através do teste de sobrevivência *in vitro* que houve um sinergismo entre a NF e o tratamento com antirretroviral. Nos testes *in vivo* realizados, a NF bloqueou a multiplicação do protozoário e aumentou o tempo médio de sobrevivência dos camundongos infectados.

Ao avaliar a atividade *in vivo* da NF em *Trypanosoma congolense*, observou-se uma baixa parasitemia em camundongos infectados após 6 dias de tratamento em

concentrações de 10 mg/kg, ademais, quando submetidos a uma dose superior a 30mg/kg os animais atingiram 100% de cura e sobrevivência. Sendo assim, a NF apresenta é promissora no tratamento da tripanossomose animal africana (Suganuma *et al.*, 2022). Este antimicrobiano possui certas limitações, como o uso em animais de criação, como por exemplo riscos de carcinogenicidade associados ao consumo de produtos de origem animal comestíveis (Mccracken; Kennedy, 2007)

A NF já foi relatada no tratamento *in vitro* em diferentes cepas de *T.vaginalis*, onde observou-se uma CIM de 0,8 a 10 mcg/mL. Entretanto, efeitos sinérgicos do MTZ e NF e TDZ e NF foram constatados, visto que, o TDZ não apresenta uma boa absorção intestinal e a combinação com outros fármacos também não foi promissora, exceto com a NF, onde tal combinação pode ser válida na clínica (Kawamura, 1979). No relato de Buchner e Edwards (1975), a NF apresentou uma CIM de 2 a 3 µg/mL em trofozoítos de *T. vaginalis*, causando extensa vacuolização citoplasmática nos trofozoítos e possíveis efeitos no núcleo. Estes efeitos citoplasmáticos foram relacionados devido a alterações nos grânulos cromáticos ou nos hidrogenossomos, estas alterações correlacionadas no sistema fosforoclástico de piruvato de *T. vaginalis*.

O mecanismo de ação da NF é mais estudado em bactérias, e permaneceu pouco esclarecido desde 1940, sabe-se que a NF utiliza diversos mecanismos para alcançar o efeito antimicrobiano (Squadrito; Del Portal, 2023). A NF é reduzida a intermediários reativos assim que é absorvida por flavoproteínas das bactérias. Esses intermediários resultantes ligam-se aos ribossomos e inibem enzimas bacterianas relacionadas na produção de DNA e RNA, assim como inibição de proteínas da parede celular e outras enzimas metabólicas (Giedraitiene *et al.*, 2022). A ausência de resistência a NF pode estar relacionada aos diferentes mecanismos de ação (Wan *et al.*, 2021), porém, sabe-se que mutações no gene que codifica a nitrofurantoína (*nfsA*) uma enzima insensível ao oxigênio da *E. coli* podem ser potenciais de resistência a NF. Além disso, amutação não reduz a NF e assim impede a produção de compostos tóxicos (Race *et al.*, 2005). Isolados resistentes a NF mediados por plasmídeos também apresentam CIM elevadas, dos quais acometem os genes *nfsA* e *nfsB* (Sastry; Jayaraman, 1984; Ho *et al.*, 2016; Ari *et al.*, 2023)

3 Artigo 1

Artigo publicado na revista *Experimental Parasitology* (DOI: 10.1016/j.exppara.2023.108601) (Anexo 1)

Activity of compounds derived from benzofuroxan in *Trichomonas vaginalis*

Marjorie Giacometi¹, João Cândido Pilar Mayer ², Alexia Brauner de Mello¹, Yan Wahast Islabão¹, Adriane Leites Strothmann³, Renata Nobre Fonseca⁴, Ângela Sena-Lopes ³, Luciano Dornelles², Sibeles Borsuk³, Silvia de Oliveira Hübner⁴, Camila Belmonte Oliveira ^{1*}

¹ Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil; ² Department of Chemistry, LabSelen-NanoBio, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil; ³ Center for Technological Development, Biotechnology, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil; ⁴ Department of Preventive Veterinary, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil

* **Author for correspondence:** Camila Belmonte Oliveira, E-mail: camilabelmontevet@yahoo.com.br

al., 2004; Santos *et al.* 2014) . A utilização em animais é preconizada no tratamento de várias enfermidades (Chierentin, 2013). Esse fármaco apresenta um amplo espectro e já foi testado frente a diversas bactérias como; *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*; *Proteus mirabilis*; *Proteus spp.*; *Serratia spp.*; *Citrobacter spp.*; *Enterobacter spp.*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus saprophyticus*; e enterococos (Norrby; Jonsson, 1983; Alós, 2009; Haq, *et al.*, 2009).

Em animais a NOR é recomendado para tratamento de infecções sistêmicas do sistema respiratório e digestório (Brasil, 2022). Tanto a farmacocinética como a farmacodinâmica são importantes na determinação de uma dose eficaz garantindo a inibição de bactérias, reduzindo os efeitos colaterais e a resistência antibacteriana (Levison; Levison 2009). Haq e colaboradores (2009) avaliaram a atividade biológica do NOR comercial no tratamento da colibacilose aviária em pombos experimentalmente infectados na concentração de 10mg/kg de peso corporal, sendo assim, concluíram que a que o NOR foi altamente eficaz contra *E. coli*, não alterando os níveis sanguíneos. Em outro relato, o qual foi avaliado o perfil farmacocinético do NOR em pombos, apresentou resultados interessantes quanto a baixa ligação com proteínas plasmáticas (albumina), sugerindo uma disponibilidade maior do NOR para exercer seu efeito terapêutico (Alabbas; Al-Jumaili; Ibrahim, 2023). Além disso, sabe-se que o volume de distribuição para administração oral do NOR é grande em diferentes espécies de aves (Haritova; Lashev 2009; Alabbas; Al-Jumaili; Ibrahim, 2023), sendo assim, com um alto volume de distribuição, garantirá uma maior acessibilidade em diferentes espaços anatômicos, englobando o compartimento intracelular (Chifiriuc *et al.* 2016).

Algumas pesquisas foram realizadas sobre a utilização do NOR em parasitos. Lat e Thein (2001), avaliaram o efeito *in vivo* do NOR em galos infectados com *Ascaridia galli* na concentração de 40mg/kg e constataram que o fármaco reduziu em 53,3% a contagem dos helmintos, por mais que o antihelmínticos apresentem uma eficácia maior para esse parasito (100%), o NOR parece ser um fator positivo no ganho de peso destes galináceos infectados e tratados comparados com os antihelmínticos convencionais. Em outro estudo, avaliaram a eficácia do NOR em *Babesia spp.* onde sua melhor atividade *in vitro* foi na concentração de 400µM com concentração letal de 50% (CL₅₀) de 59,52 µM (RIZK *et al.*, 2018). Pradines e colaboradores (2001) avaliaram a atividade *in vitro* de diversas quinolonas, incluindo

Abbreviation: Metronidazole (MTZ); Benzofuroxan-derived (BZX); Half maximal inhibitory concentration (IC₅₀); Minimum inhibitory concentration (MIC); standard deviation (SD); Nitric oxide (NO); Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR); Dimethylsulfoxide (DMSO); *T. vaginalis* lactate dehydrogenase (TvLDH); Cathepsin-like cysteine protease (TvCPC); American Type Culture Collection (ATCC); Trypticase-yeast extract-maltose (TYM); bovine serum (SBS); Chlorine molecule (Cl); Methoxy group (OCH₃); Amino group (NH); Lactate dehydrogenase (LDH).

Abstract

Trichomoniasis is a sexually transmitted infection caused by the protozoan *Trichomonas vaginalis*. Currently, trichomoniasis is treated with the class of nitroimidazoles, namely, metronidazole; however, resistant isolates and strains have been reported. The compounds derived from benzofuroxan are biologically active heterocycles. This study evaluated the *in vitro* antiparasitic activity of these compounds in trophozoites of *T. vaginalis* and determined the mean inhibitory concentration (IC₅₀), minimum inhibitory concentration (MIC), mortality curve, and cytotoxicity. The compounds were named EH1, EH2, EH3, and EA2 and tested in various concentrations: 100 to 15 μ M (EH1 and EH2); 100 to 5 μ M (EH3); and 100 to 25 μ M (EA2), respectively. The greatest efficacy was observed in the highest concentrations in 24 h, with inhibition of approximately 100% of trophozoites. Compounds EH2 and EH3 had the lowest MIC: EH2 (35 μ M) and EH3 (45 μ M), with IC₅₀ of 11.33 μ M and 6.83 μ M, respectively. Compound EA2 was effective at the highest concentrations. The activity of the compounds in *T. vaginalis* started in the first hour of incubation with 90% inhibition; after 12 h, inhibition > 95% was observed. Compound EH1 showed the lowest activity, with the highest activity between 12 and 24 h after incubation. These results demonstrate that benzofuroxan derivatives are promising compounds for the *in vitro* treatment of *T. vaginalis*.

Key words: Trichomonadidae, flagellated protozoa, synthetic compounds, heterocycles, human trichomoniasis.

59 1. Introduction

60 *Trichomonas vaginalis* is a flagellate protozoan responsible for trichomoniasis [1].
61 Currently, this non-viral sexually transmitted infection has the highest prevalence.
62 According to estimates from the World Health Organization, there are 156 million cases
63 globally [2,3]. This disease affects the urogenital system of men and women and mainly
64 causes vaginitis, urethritis, cervicitis, and genital ulceration [4,3]. Trichomoniasis is
65 related to several risk factors, including personal hygiene, unprotected sex, phase of
66 the estrous cycle, bacterial vaginosis, and socioeconomic conditions [5,6]. Patients
67 infected with *T. vaginalis* are at an increased risk of acquiring the human
68 immunodeficiency virus (HIV), which may enhance genital dissemination of the virus.
69 [7,8]. Furthermore, HIV may interfere with the diagnosis of trichomoniasis or reduce
70 the effectiveness of trichomoniasis treatment, increasing susceptibility to infection
71 [9,10].

72 The recommended drug class for treating trichomoniasis is 5-nitroimidazoles.
73 According to the United States Food and Drug Administration, only metronidazole
74 (MTZ) and tinidazole are approved for treating trichomoniasis, and the standard
75 treatment has not changed since 1960 [11,12]. MTZ is the standard drug used to
76 control trichomoniasis, and although the cure rate is satisfactory, treatment failures and
77 the development of drug-resistant strains have been reported. The estimated
78 resistance to MTZ is 2%–10% [13,14]. Their mechanism of action is not fully
79 understood. MTZ penetrates by passive diffusion and is activated in the
80 hydrogenosomes of *T. vaginalis*. After the reductive activation of its nitro group and the
81 reduction of the parasite's ferredoxin, MTZ generates a toxic nitro radical that leads to
82 the death of the protozoan [15].

83 Benzofuroxan compounds (BZX) are heterocycles that exhibit biological activity
84 relevant to trichomoniasis [16,17,18]. Benzofuroxan compounds can generate reactive
85 oxygen/nitrogen species, including nitric oxide (NO) [19]. The antiparasitic activity of
86 NO has been reported against protozoa of the genera *Plasmodium* sp., *Leishmania*
87 sp., and *Trypanosoma cruzi* [20,21,19]. Due to the presence of the subunit =N(→O)O
88 in BZX, perceiving electron acceptor characteristics similar to those of aromatic nitro
89 compounds (N-oxides) used with bio-reductively activated antitumor and cytotoxic
90 properties is possible [22]. Similarly, BZX derivatives have similarities with N-oxides,
91 such as reactions with electron-transferring flavoenzymes. Thus, the BZX system is a

promising alternative for treating trichomoniasis. Therefore, this study aimed to evaluate the *in vitro* activity of four BZX: EA2, EH1, EH2, and EH3.

2. Materials and Methods

2.1 General considerations

Synthetic reactants were commercially purchased from Sigma-Aldrich®, Merck®, TCI®, and Alfa-Aesar®. Solvents were treated according to standard procedures. ¹H and ¹³C Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) analyses were performed at the Chemistry Department of the Federal University of Santa Maria (Rio Grande do Sul, Brazil) by using a Bruker Avance III HD NMR spectrometer. All NMR spectra were recorded in deuterated solvents (CDCl₃ and dimethylsulfoxide(DMSO)-d₆) by using tetramethylsilane (TMS) as a reference (singlet, 0.00 ppm). The results are shown in ppm. Elemental Analysis % (CHN) analysis was obtained at the University of São Paulo (São Paulo, Brazil) using a Perking-Elmer CHN% 2400e. Melting points were recorded in an Fusometer type MQAPF Melting Point apparatus (Micro-química®). Thin-layer chromatography was performed on 0.25 mm Merck® GF₂₅₄ silica plates, employing 254 nm ultraviolet light and iodine vapor or acidic hydromethanolic vanillin solution for visualization.

2.2 Compounds derived from benzofuroxans

The compounds used in this study were synthesized at the LabSelen-NanoBio laboratory (Federal University of Santa Maria). They were named according to the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) nomenclature (Fig. 1) (unpublished data).

EA2: "6-((5-(4-methoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)carbamoyl)benzo[c][1,2,5]oxadiazole 1-oxide;

EH1: "6-(2-(3-(4-phenyl)-1,2,4-oxadiazole-5-carbonyl)benzo[c][1,2,5]oxadiazole 1-oxide"

EH2: "6-(2-(3-(4-Methoxyphenyl)-1,2,4-oxadiazole-5-carbonyl)hydrazine-1-carbonyl)benzo[c][1,2,5]oxadiazole 1-oxide";

EH3: "6-(2-(3-(4-Chlorophenyl)-1,2,4-oxadiazole-5-carbonyl)hydrazine-1-carbonyl)benzo[c][1,2,5]oxadiazole 1-oxide

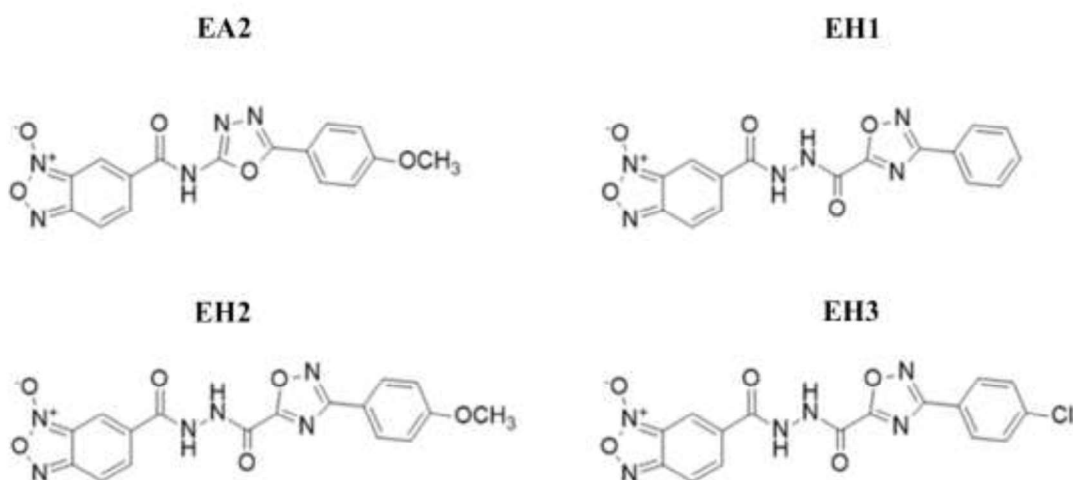


Fig. 1. Chemical structure of compounds used against *T. vaginalis*: EA2, EH1, EH2, EH3.

2.2 Synthetic procedures

Compounds EH1 (Fig 2. **7a**), EH2 (Fig 2. **7b**), and EH3 (Fig 2. **7c**) were obtained using condensation between hydrazides **6a-c** and benzofuroxan-6-carboxylic acid, **2** [23,24]. Benzofuroxan-6-carboxylic acid (Fig 2. 2) was prepared using sodium hypochlorite-promoted oxidation of 4-amino-3-nitrobenzoic acid (Fig 2. 1), according to the literature [25].

The three-step route to obtaining hydrazides (Fig 2. **6a-c**) was previously published by our group, along with spectroscopic data and other characterization results [24]. Nitriles were converted into amidoximes [26], which were condensed with ethyl oxalyl chloride, originating the ethyl 1,2,4-oxadiazole-5-carboxylates **5a-c** [27]. Hydrazinolysis of the intermediate esters resulted in the production of hydrazides **6a-c** [28].

2.2 Synthesis of compounds EH1, EH2, EH3, and EA2

2.2.1 General procedure for the synthesis of diacylhydrazines

The synthesis of diacylhydrazines was performed as follows (Fig 2. **7a-c**) [25,26,27,28]: Triethylamine (2.5 mmol) and TBTU (0.55 mmol) were added to a 25 mL round-bottom flask containing a suspension of benzofuroxan-6-carboxylic acid (0.5 mmol) and the appropriate hydrazide **6a-c** (0.5 mmol) in dichloromethane (5 mL). The mixture was stirred for 2 h at room temperature until the starting materials were

consumed, as verified by Thin-layer chromatography (TLC). Next, 5 mL of aqueous HCl (2 mol . L⁻¹) was added, and the mixture was stirred for 5 min. The content was transferred to a separatory funnel containing dichloromethane (50 mL), and the organic phase was washed with aqueous 2 mol.L⁻¹ HCl (3 x 50 mL). The organic phase was dried over anhydrous magnesium sulfate and filtered; next, the solvent was removed under reduced pressure, resulting in diacylhydrazines (Fig 2. **7a-c**).

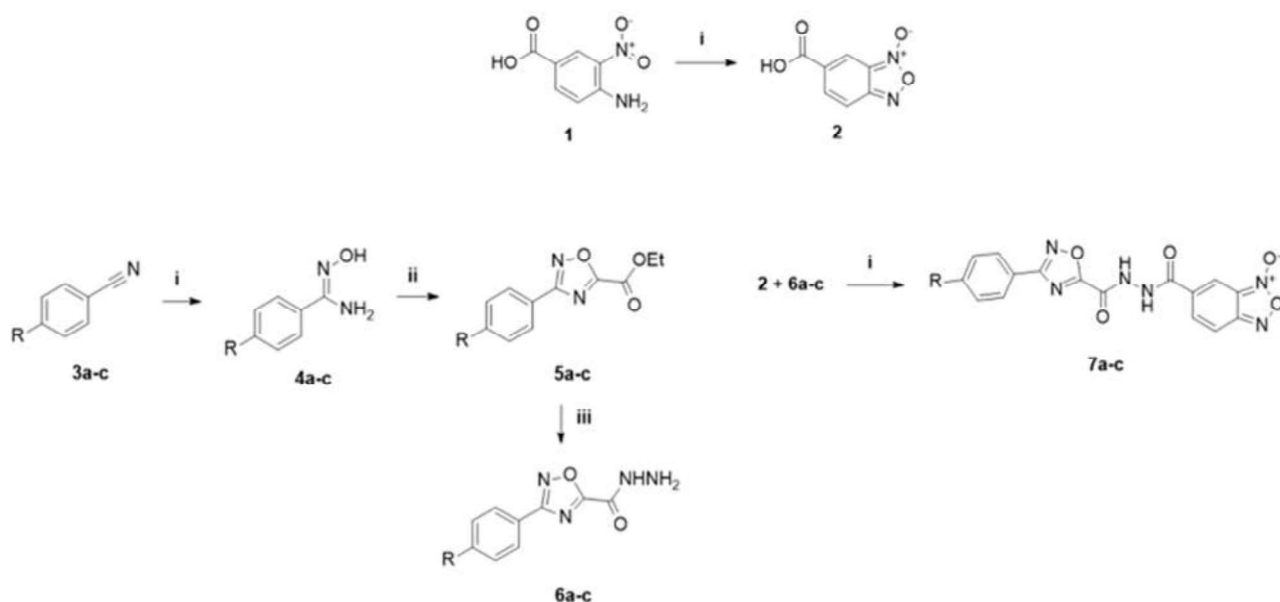


Fig. 2. Obtention of benzofuroxan-6-carboxylic acid. Conditions: i) a) potassium hydroxide (KOH), EtOH, 70 °C, 15 min. b) NaClO_(aq), 0 – 5 °C, 1 h. c) HCl_(aq), pH < 2 .Yield: 75% (1 and 2). Route for obtention of hydrazides (6a-c). Conditions: i) NH₂OH.HCl, NaOH, EtOH/ H₂O; rt, 15 a 20 h ii) EtO₂CC(O)Cl, DIPEA, THF; reflux, 2 h iii) N₂H₄.H₂O, EtOH; rt, 1 h R = H (a), OCH₃ (b), Cl (c). Conditions for acquisition of diacylhydrazines (7a-c. i) 2 (0.5 mmol), 6a-c (0.5 mmol), Et₃N (5 eq.), TBTU (1.1 eq.), dichloromethane (5 mL), rt, 2 h.

2.2.2 Synthesis of amide EA2

EA2 (Fig 3. 10) was obtained through EDC-promoted amide coupling between

carboxylic acid **2** and 5-(4-methoxyphenyl)-2-amino-1,3,4-oxadiazole, **9** [29,30]. Amino-1,3,4-oxadiazole **9** was prepared using the method of Niu et al. [31]. In a round-bottom flask containing benzofuroxan-6-carboxylic acid **2** (0.5 mmol) and 2-amino-5-(4-methoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazole **9** (0.5 mmol) in a mixture of dichloromethane (5 mL) and acetonitrile (5 mL) under magnetic stirring, this study added EDC (0.6 mmol). After 2 h, the solvent was removed by rotary evaporation. Next, the crude solid was triturated in 5 mL water and then vacuum-filtered and washed with an additional 10 mL water. The resulting solid was transferred to a round-bottom flask, and ethyl acetate (30 mL) was added. The solvent was removed under reduced pressure, producing the amide (Fig 3. **10**) (EA2).

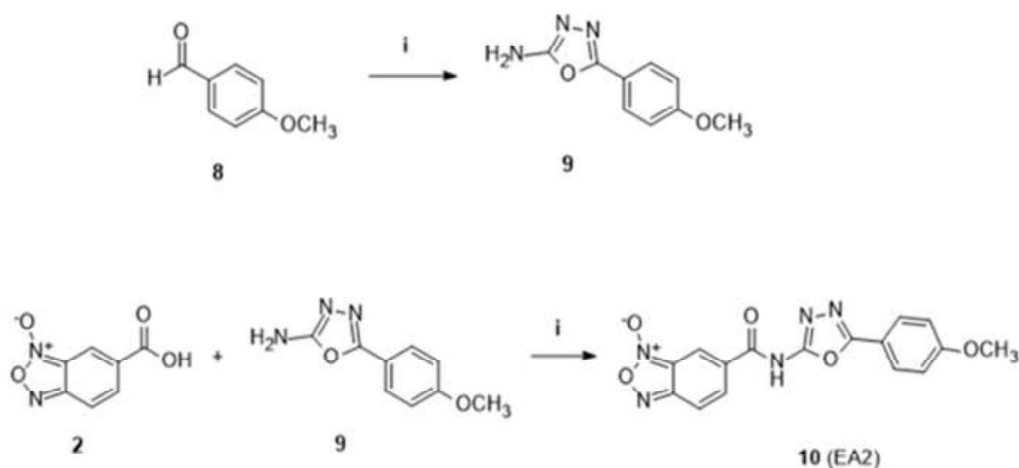


Fig. 3. Conditions for obtention of amino-1,3,4-oxadiazole (**9**): i) **8** (5 mmol), $\text{NH}_2\text{NHC(O)NH}_2\cdot\text{HCl}$ (5 mmol), AcONa (5.5 mmol), MeOH , rt, 15 min., solvent removal. Then, I_2 (5.5 mmol), K_2CO_3 (10 mmol), dioxane (15 mL), 101°C , 15 h. Yield: 78 %. Conditions for obtention of amide EA2: i) **2** (0.5 mmol), (**9**) (0.5 mmol), EDC (0.6 mmol), DCM (5 mL), MeCN (5 mL), rt, 1 h.

2.3 Molecular docking

The EH3 compound was used for molecular docking because it has a lower half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) than the other compounds. The crystal structure of *T. vaginalis* lactate dehydrogenase (TvLDH; PDB 5A1T) from the RCSB protein database (<http://www.rcsb.org/>) was used. The structure of cathepsin-like cysteine protease (TvCPC) was generated using the SWISS-MODEL server [32] based on the UniProt entry A2DSU2 (TVAG_348010) [33]. Before executing the aforementioned

step protein structures were prepared by removing other ligands and water molecules using CHIMERA 1.5.3 software [34]. Non-polar hydrogen atoms and Gasteiger charges [35] were added with blind docking [36]. Ligands were prepared according to Trott e Olson [37] and Alves et al. [35]. Autodock Vina 1.1.2 software was used for the simulation. The EH3 composite was built and optimized using Avogadro 1.11 software [38]. The poses resulting from the anchoring of the study compound were observed using Accelrys Discovery Studio 3.5. TvLDH and TvCPC were utilized because they bind to the EH3 compound. In addition, according to the literature, lactate dehydrogenase is an essential enzyme for the parasite's survival because it interferes with its glycolysis. [33,35]. Cathepsin-like cysteine protease was used because of its catabolic (catalytic) and immunogenic functions. The literature reported the interaction of benzofuroxanes with the thiol group, in which the former modulated the catalytic activity of cysteine-containing enzymes, inhibiting the protease. [57] [39]

2.4 Culture of *Trichomonas vaginalis*

The isolates of *T. vaginalis* 30236 were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC), sensitive to MTZ, and cultured axenically in trypticase-yeast extract-maltose (TYM) medium without agar (pH 6.0) supplemented with 5 mg/mL streptomycin and 10% sterile inactivated (56°C for 30 min) bovine serum (SBS). The tubes were incubated at 37°C under aerobic conditions [40]. Motility and morphology were examined under a light microscope at 400× magnification. Before proceeding with the antiparasitic assay, a trypan blue exclusion test (0.4%) was performed to ensure a minimum viability of 95%, and a logarithmic growth phase was achieved.

2.5 Anti-*Trichomonas vaginalis* in vitro assay

BZX-derived compounds (EH1, EH2, EH3, and EA2) were synthesized and diluted in DMSO to evaluate their antiparasitic potential *in vitro* against *T. vaginalis*. The assay was performed on 96-well microtiter plates. Next, 150 µl of the culture at an initial density of 2×10^6 trophozoites/mL in TYM medium was added to each plate and incubated with 50 µl of the solution containing each compound. The plates were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 24 h. Subsequently, the motility, morphology, and viability of the trophozoites were evaluated using an aliquot (1:1, v/v) containing trophozoites and trypan blue (0.4%), which was counted in a Neubauer chamber. Controls were used for each assay: a negative control containing only the trophozoites; a control with 0.6% DMSO; and a positive control with 100 µM MTZ (Sigma-Aldrich,

St. Louis, Missouri, USA). The concentration of positive control (MTZ) was in accordance with that of Sena-Lopel et al. [41].

Subsequently, the minimum inhibitory concentration (MIC) and IC₅₀ assays were performed under the aforementioned conditions. Before determining the concentrations used in the manuscript (graphs), a screening of all compounds at concentrations from 5 to 100 µM was performed. Next, concentrations were selected for each compound according to their effectiveness. The concentrations used for each compound were 100, 75, 65, 55, 45, 35, 25, and 15 µM (EH1 e EH2); 100, 75, 55, 45, 35, 25, 15, and 5 µM (EH3); and 100, 95, 85, 75, 65, 55, 45, and 25 µM (EA2). The MIC of each compound was confirmed by pouring the retained culture solutions in the 96-well plates into Eppendorf microtubes containing 1.5 mL TYM medium supplemented with SBS and streptomycin. The MIC was used in these solutions, one concentration above and one below, along with the controls. The microtubes were again incubated at 37°C in 5% CO₂ for 96 h. Trophozoites were counted every 24 h in a Neubauer chamber to confirm the MIC. IC₅₀ was calculated using GraphPad Prism 8.0.1 software.

To understand the time required for the antiparasitic activity of the compounds against *T. vaginalis*, this study determined the kinetic growth curve of the trophozoites. Again, 96-well plates were prepared according to the aforementioned methodology. MIC was added to each plate and incubated at 37°C in 5% CO₂ for 96 h, as were the controls. Trophozoite viability was assessed under a light microscope, and growth was monitored at 1, 6, 12, 24, 48, 72, and 96 h using the trypan blue dye exclusion assay (0.4%). The assays were independently performed in triplicate and exposed to the percentage of trophozoite viability compared with the negative control [41].

2.6 Cytotoxicity assay

Monkey renal epithelial cells (VERO) procured from the Cell Bank of the Laboratory of Virology and Immunology of the Faculty of Veterinary Medicine of the Federal University of Pelotas were used to evaluate the cytotoxic effect of the compounds; the method used was that of Picoli et al. [42]. Cells were cultured in Minimal Essential Medium (MEM) (E-MEM, Sigma-Aldrich®) supplemented with fetal bovine serum (SFB, Gibco®, USA).

Cells were seeded in 96-well microagglutination plates (Kasvi®) at a density of 3 x 10⁴ in a volume of 100 µl per well. Plates were incubated in an oven at 37°C in an atmosphere of 95% humidified air and 5% CO₂ for 24 h to form the monolayer. When

the cells reached 80% confluence, they were treated with compounds EH1, EH2, EH3, and EA2, previously diluted in DMSO at various concentrations: EH1 (75, 55, 35, and 28.71 μ M); EH2 (55, 70, 15, and 11.33 μ M); EH3 (45, 25, and 6.83 μ M) and EA2 (100, 85, 55, 25, and 12.09 μ M). The medium, MEM, was used as a negative control. The plate was incubated in a CO₂ oven with humidified air (5% CO₂ at 37°C) for 24 h. Cell viability was analyzed using the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) method. Next, 50 μ L MTT was added to each well. The plates were incubated for an additional 4 h under the aforementioned conditions. After removing the cell supernatant, crystals were solubilized by adding 100 μ L DMSO (Sigma-Aldrich®) to each well; next, they were manually shaken and incubated at 37°C for 15 min. The changes in viability after treatment were measured spectrophotometrically using a plate reader (Thermo plate®) with a wavelength of 540 nm. All assays were performed independently in triplicate. Results were expressed as viability (%) of cell growth compared with that of the negative control. The viability of MTZ in VERO is described by Alves et al. and Sena-Lopes et al. [33, 41].

2.7 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using a one-way analysis of variance followed by Tukey's test for multiple comparisons among groups. The probability value used was $P \leq 0.05$. The results of MIC are expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD). The IC₅₀ values were calculated using nonlinear regression. All analyses were performed using GraphPad Prism 8.0.1 software.

3 Results

3.1 Characterization data of compound of EH1

Yield: 76%. Yellow solid, mp > 184.2 °C (dec.). Anal. Calcd. For C₁₆H₁₀N₆O₅.H₂O: C, 50.01; H, 3.15; N, 21.87. Found: C, 48.60; H, 3.04; N, 20.58. ¹H NMR (DMSO-d₆, 600 MHz), δ (ppm): 11.71 – 11.28 (br, 2 H), 8.23 (br, 1 H), 8.10 (d, 2 H, J = 6.8 Hz), 7.91 (br, 1 H), 7.68 – 7.62 (m, 3 H). ¹³C NMR (DMSO-d₆, 150 MHz) δ (ppm): 168.3, 168.0, 152.4, 132.2, 129.5, 127.3, 125.3 (some signals were not visible owing to tautomerism at the BZX moiety) (Fig 2. 7a)

3.2 Characterization data of compound of EH2

Yield = 70%. Yellow solid, mp > 163.2 °C (dec.). Anal. Calcd. For C₁₆H₁₀N₆O₅.H₂O: C, 49.28; H, 3.41; N, 20.28. Found: C, 47.12; H, 3.84; N, 18.85. ¹H NMR (DMSO-d₆, 600

284 MHz), δ (ppm): 8.17 (br, 1 H), 8.02 (d, 2 H, J = 8.7 Hz), 7.89 (br, 2 H), 7.16 (d, 2 H, J
285 = 8.7 Hz), 3.85 (s, 3 H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ (ppm): 168.3, 168.0, 152.4,
286 132.2, 129.5, 127.3, 125.3 (some signals were not visible owing to tautomerism at the
287 BZX moiety) (Fig. 2 **7b**).

288 **3.3 Characterization data of compound of EH3**

289 Yield = 88%. Yellow solid, mp > 157.7 °C (dec.). Anal. Calcd. For $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_6\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$: C,
290 45.89; H, 2.65; N, 20.07. Found: C, 44.82; H, 2.86; N, 19.13. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600
291 MHz), δ (ppm): 11.75 (br, 1 H), 11.27 (br, 1 H), 8.23 (br, 1 H), 8.10 (d, 2 H, J = 8.5 Hz),
292 7.88 (br, 2 H), 7.71 (d, 2 H, J = 8.5 Hz). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ (ppm): 168.1,
293 167.5, 152.3, 136.9, 129.7, 129.1, 124.2 (some signals were not visible owing to
294 tautomerism at the BZX moiety) (Fig 2. **7c**)

295 **3.4 Characterization data of compound of EA2**

296 Yield = 46%. Yellow solid, mp = 130.7 – 132.4 °C. Anal. Calcd. For $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_6\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$:
297 C, 51.76; H, 3.53; N, 18.86. Found: C, 51.46; H, 3.47; N, 18.19. ^1H NMR (CDCl_3 , δ 400
298 MHz): 8.48 (s, 1 H), 8.35 (br, 1 H), 7.87 (d, 2 H, J = 8.8 Hz), 7.71 (br, 1 H), 7.01 (d, 2
299 H, J = 8.8 Hz), 3.90 (s, 3 H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , δ 100 MHz): 163.5, 154.6, 151.2, 128.9,
300 127.6, 114.7, 114.0, 55.6 (some signals were not visible owing to tautomerism at the
301 BZX moiety).

302 **3.5 Molecular docking**

303 The estimated free energy of binding (ΔG_{bind}) was determined upon molecular
304 docking, and the interaction with an active site of TvLDH with ΔG_{bind} of -10.03
305 kcal/mol was observed. Interaction of the carboxylate with electron-deficient atoms of the
306 BZX compound, a hydrogen interaction between diacyl hydrazine and the oxygen of
307 the aspartate carboxylate, another interaction between the carbonyl oxygen of diacyl
308 hydrazine and the hydrogen of serine, a hydrogen interaction between the nitrogen of
309 the 1,2,4-oxadiazole position and the hydrogen of the threonine alcohol, and a π - π
310 stacking interaction and a favorable van der Waals bond between the benzene ring
311 and phenylalanine were observed (Fig. 4. a)

312 Another protein used, TvCPC, showed an interaction with ΔG_{bind} of -8.3 kcal/mol. The
313 interactions observed were between the carbonyl hydrogen of diacyl hydrazine and the
314 guanidinic hydrogens of arginine; the interaction between the π cation of guanidine
315 and the electron cloud of BZX, the interaction between hydrogen π between the

hydrogen of the starch of the peptide chain and the electron cloud of furoxans, the interaction between the sulfur of methionine and the furoxan ring, and the interaction of the alkyl-carbon-hydrogen bond with the oxygen of BZX (Fig. 4. b).

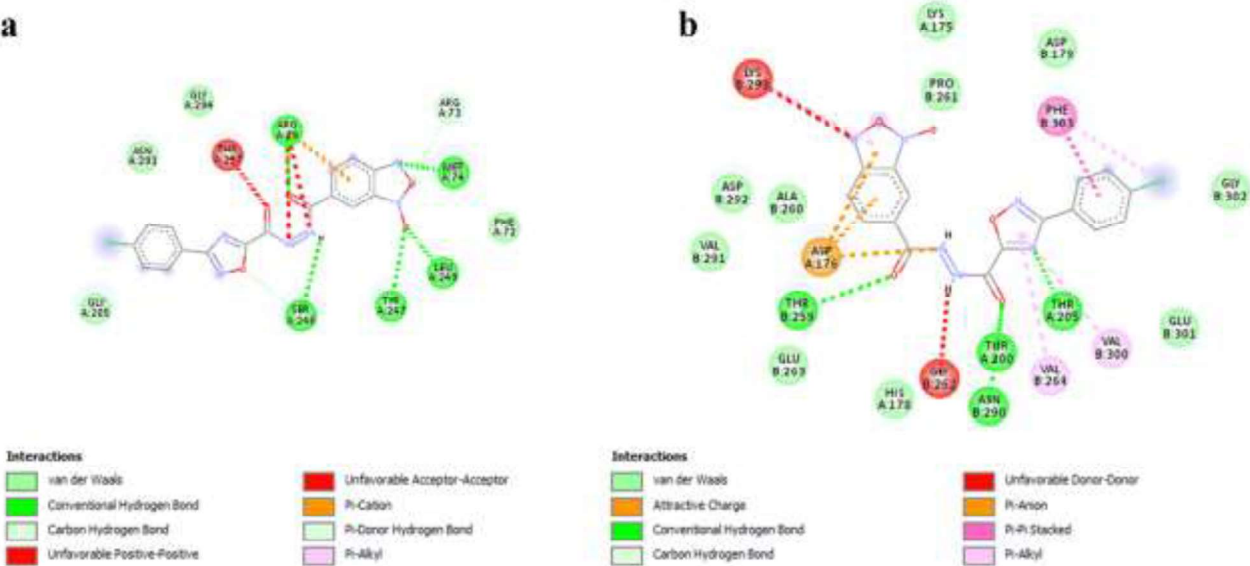


Figure 4. Representation of 2D projection and predicted binding mode of EH3 with *T. vaginalis* proteins TvCPC (a) and TvLDH (b). Distance (Å) of hydrogen bonds between specific residues and EH3 is shown in green. Van der Waals bonds are shown in light green. Pi-Alkyl bonds are shown in light pink. Pi Cation (a) and Pi Anion (b) bonds are shown in yellow. Unfavorable links are shown in red.

3.6 *In vitro* assay (MIC)

In this study, compounds that reduced trophozoite viability from 95% to 100% were considered to have trichomonacidal activity. All compounds used showed activity against *T. vaginalis* at a concentration of 100 μ M, the negative control and DMSO did not affect the viability of trophozoites, and the positive control with MTZ reduced the viability of protozoa by 100%. (Fig. 5).

Regarding the MIC, the concentrations that inhibited 95% or more of the trophozoites, compound EH1 had a MIC of 75 μ M (Fig. 5. b), reducing trophozoite viability. Compound EH2 exhibited the lowest MIC (35 μ M; mean $3.22 \pm$ SD 1.13) (Fig. 5. c)

and inhibited up to 95.47%. For compound EH3, we considered the MIC of 45 μ M (Fig. 5. d), where it reduced the viability in 95% of trophozoites, and EA2 with a MIC of 95 μ M (mean $1.44 \pm$ SD 0.62) (Fig. 5. a) inhibited 98.17% of trophozoites. Additionally, the IC_{50} was statistically determined for each compound, and EH3 had a lower IC_{50} (6.83 μ M; $LogIC_{50}=0,8347\mu M$; $R^2=0,9642$) (Fig. 5. d) than that with compound EH1, which had an IC_{50} of 28.71 μ M ($LogIC_{50}=1,458\mu M$; $R^2=0,8481$) (Fig. 5. B). Compound EH2 presented an IC_{50} of 11.33 μ M ($LogIC_{50}=1,054\mu M$; $R^2=0,9876$), and that of EA2 IC_{50} was 12.09 μ M ($LogIC_{50}=1,082\mu M$; $R^2=0,9766$). Owing to the total inhibition of the trophozoites, compounds EH1 (75 μ M) and EH3 (35 μ M) did not show a mean and SD.

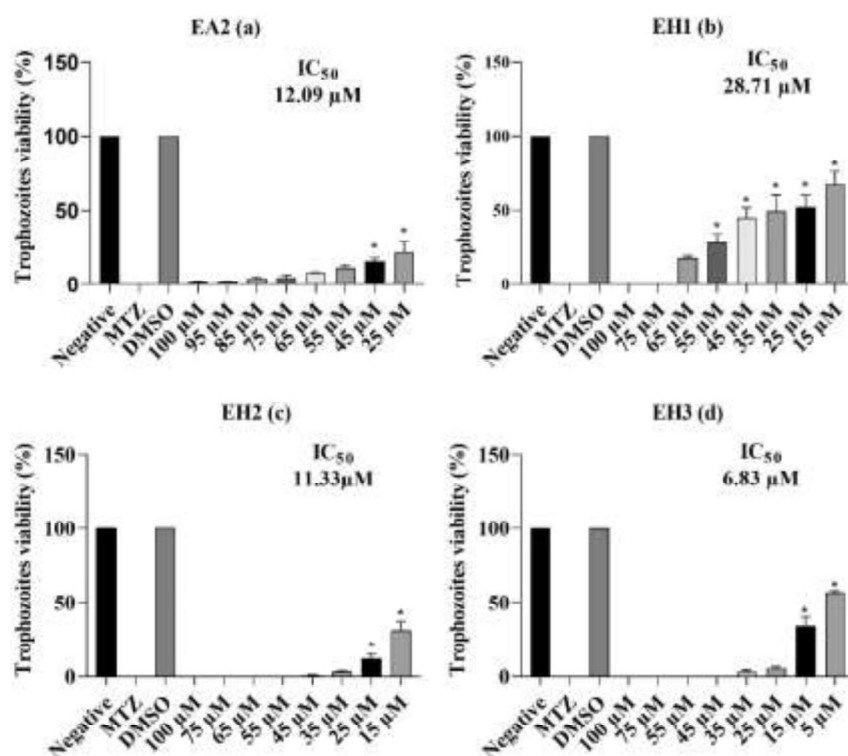


Figure 5. *In vitro* anti-*T. vaginalis* assay. MIC and IC_{50} for the antiparasitic activity of EA2 (a), EH1 (b), EH2 (c), and EH3 (d). Negative (untreated trophozoites), MTZ (100 μ M), DMSO (0.6% solubilization vehicle). Asterisks represent a significant difference at $P < 0.05$ to MTZ.

3.7 Assay *in vitro* (kinetic curve)

The data obtained from the kinetic growth curve showed that all tested compounds reduced trophozoite viability by $> 90\%$ in the first hour of incubation, compared with that of the negative control and MTZ (Fig. 6). When read after 6 h, the compounds with

the lowest MICs, EH2 (35 μ M) and EH3 (45 μ M) (Fig. 6. c and d, respectively), inhibited *T. vaginalis* the most. However, after 12 h of incubation, compound EA2 inhibited 100% of trophozoites and persisted for up to 96 h (Fig. 6. a). Compounds EH2 and EH3 completely reduced trophozoite viability within 48 h (Fig. 6. c and d, respectively). For compound EH1, the greatest inhibition (99.67%) was also achieved after 48 h, but trophozoites proliferated again in the subsequent hours (Fig. 6. b).

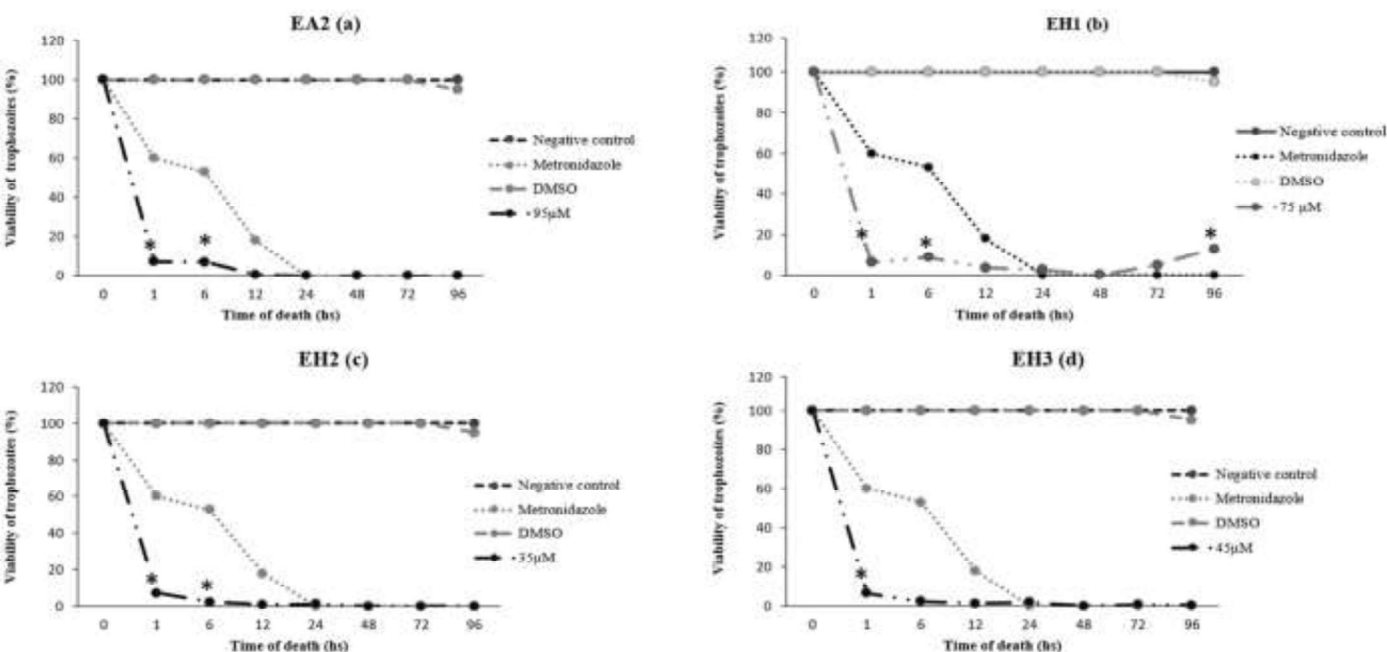


Figure 6. Kinetic growth curve of *T. vaginalis* about the concentration of the MIC of compounds EA2 (a), EH1 (b), EH2 (c), and EH3 (d). Negative control (untreated trophozoites), MTZ (100 μ M), DMSO (0.6% solubilization vehicle). Asterisks represent a significant difference at $P < 0.05$ to MTZ.

3.8 Cytotoxicity assay

The viability of VERO ranged from ~55% to ~90%. For the IC_{50} of the EH2 compound, the viability was 93.51%. For the IC_{50} of the EA2 compound, the viability was 90%; furthermore, this compound showed significant viability at concentrations of 55 μ M and 25 μ M (~82% and ~91%, respectively).

4. Discussion

The compounds EH1, EH2, and EH3 used in this study are new, and their biological activity has never been tested. However, the antiparasitic activity of compound EA2 in

Trypanosoma cruzi [43] has been reported. All these N-oxide-derived heterocycles showed promising activity against *T. vaginalis* in our results. This phenomenon was demonstrated in the results of the kinetic growth curve, in which compounds EA2, EH1, and EH2 showed no statistical difference in the reduction of trophozoite viability compared with that with MTZ after 12 h, which was similar to that of compound EH3, which showed no significant difference after 6 h of the experiment.

The positive control (MTZ) had its highest activity at 24 h (100% inhibition). Our results differ from those of Das Neves et al. and Alves et al. [44, 35]. Both of those studies observed the total effectiveness of MTZ after 12 h by using the concentration of 100 µM and against the same ATCC of *T. vaginalis* used in our study (Fig. 5). In the kinetic growth curve, the compounds EH2 and EH3 are presented similarly, at concentrations of 35 µM and 45 µM, respectively (Fig. 5 d and c).

Use of BZX has been described against flagellated protozoa, *T. cruzi* [45,46,43], *Leishmania amazonenses* [47], and *Plasmodium* sp. [48,49], in addition to its antitumor, antibacterial, and antifungal activity [50,51]. A few reports of N-oxide derivatives against *T. vaginalis* are available. Aguirre et al. [52] evaluated compounds derived from imidazole and benzimidazole N-oxides in *T. vaginalis* and *T. cruzi*. They obtained promising results with compounds against *T. vaginalis* at a concentration of 100 µg/mL and linked the parasitic activity to the lipophilicity of these derivatives, owing to the carbon portion of the protozoan nucleus being hydrolyzed and then converted to N-oxides. Three mechanisms of action of these compounds may be related to the antiparasitic activity: release of NO, physicochemical properties of the compounds, and interaction with thiol group enzymes (-SH) [53, 54, 55, 19].

One study suggested that the NO moiety of these compounds can release toxic radicals such as NO, which generate reactive oxygen and nitrogen species and are responsible for destabilizing the Trypanosoma cell membrane [54]. A similar mechanism can be applied to *T. vaginalis* because the activity of these compounds is associated with their ability to inhibit the cellular respiration of the parasites [45]. Compound EA2 was used *in vitro* against *T. cruzi*, and although at different concentrations than those in our study, it was effective, inhibiting 100% of epimastigotes within 48 h (1%, 0.5%, and 0.25%) [43]. Notably, the MIC of EA2 (95 µM) inhibited trophozoite viability (99.45%) in the first 12 h, and trophozoites did not

multiply after 24 h at the end of the experiment. There was no statistical difference between the groups after 12 h. Even at the highest MIC of the other compounds tested, EA2 was promising against *T. vaginalis*, with an IC₅₀ of 12.09 µM. Moreover, this did not exhibit cytotoxicity at IC₅₀, 55 µM, and 25 µM concentrations, and significant results were observed regarding inhibiting the protozoan.

The substituents present in the chemical structure of each compound are probably related to their antiparasitic activity because there is a chlorine molecule (Cl) in EH3 and a methoxy group (OCH₃) in EH2, a methoxy group (OCH₃) in EA2, and an amino group (NH) one less than that in the other compounds. Boiani et al. [19] tested the derivative BZX 1.3-dioxides using a methoxy substituent (OCH₃) against three strains of *T. cruzi* and three species of *Leishmania* sp. and reported low activity in both parasites. This finding differs from that of our study, where EH2 and EA2 have the same substituent and were effective at different concentrations against *T. vaginalis*. Although they are neither the same protozoa nor the same compound, this difference in the substituent in our study may be related to their biological activity.

Jorge et al. [55] tested BZX derivatives against three strains of *Staphylococcus aureus*. They reported the bactericidal activity of hydrophobic substituents (Cl, CF₃, Br) attached to the benzene fraction, as well as compounds with an electron character in the substituent (e.g., NH₂ and OCH₃). This result agrees with our results: we observed an antiparasitic activity with the lowest IC₅₀ (6.83 µM) in the EH3 compound, relating the best antiparasitic activity to the hydrophobic Cl molecule of the benzene ring. Furthermore, both studies positively correlated a methoxy group with anti-trichomonas and antimicrobial activities. Therefore, the physicochemical properties of the compounds may influence their biological activity.

Thiol groups (-SH) are relevant agents in oxidation/reduction processes [56,57]. We posit that the activity of BZX may also be related to surface proteins, especially in the thiol groups (-SH) in the thiolate form, because the interaction of BZX with-SH has been reported [39, 58, 53]. Furthermore, thiol groups are possible targets for NO and can modulate the catalytic activity of cysteine-containing enzymes [59]. This activity may be related to the inhibition of cysteine-type proteinases, abundant on the surface of *T. vaginalis* [60,61], providing for the maintenance/protection of -SH on the surface of the parasites; thus, cysteine-type proteinases are notable surface protein for the survival of the protozoan [62,63].

These results indicate that BZX derivatives are concentration-dependent; the higher

the concentration, the stronger the inhibition of trophozoites. All compounds tested at the highest concentration (100 μ M) were effective within 24 h. This result suggests that NO inhibits the dose-dependent enzymatic action of BZX [59]. Therefore, Cerecetto and Porcal [64] stated that trypanocidal activity is reduced when the N-oxide fraction is removed from the compound. We suspect that this finding case also applies to *T. vaginalis* and that NO release is the main culprit for parasitic activity.

The ATCC 30236 strain is sensitive to MTZ and exhibits heterogeneity due to the presence of high molecular weight proteins. Additionally, this strain possesses chaperones, such as HSP70, which are responsible for properly folding other proteins, ensuring that they achieve the correct three-dimensional structure [65,66].

Proteases are known to perform important biological processes in protozoa [67] (e.g., cytoadherence, cytotoxicity, and homolysis) relevant to the pathogenesis of trichomoniasis [68,61]. Lactate dehydrogenase (LDH) is an enzyme found in most living cells and plays a notable, role in catalyzing the interconversion of lactate to pyruvate and converting nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) into NAD⁺ [69,65]. Energy production depends on the catalytic routes of LDH and malate dehydrogenase because the protozoan depends on glycolysis. As such, they are ideal targets for interaction with compounds. Thus, any attempt to negatively regulate or interrupt the activities of these enzymes would be self-destructive for the parasite. *T. vaginalis* energy is generated through substrate-level glycolytic phosphorylation, which converts pyruvate to molecular hydrogen and acetate. In the crystal structure of TvLDH, Leu9 (leucine) has been observed [70,71,72]. According to Westrop et al. (2017) [73], LDH has broad specificity for leucine-derived hydroxy acids. This finding suggests that the parasite produces a significant amount of 2-hydroxyisocaproate acid, indicating that leucine catabolism is important for the viability of trophozoites. Since 1960, a drug other than 5-nitroimidazoles has not been available that inhibits TvLDH other than 5-nitroimidazoles [74]. In this study, *in silico* analysis by molecular docking showed that the binding site of EH3 interacted with the binding sites of TvCPC and TvLDH, suggesting that these proteins are related to the action of these compounds against *T. vaginalis*. Therefore, the BZX system is promising for developing new drugs that target the protozoa associated with public health.

Based on the findings of this study and those of the literature, our conclusion is that the BZX compounds can reduce the number of trophozoites within a few hours after the experiment at a concentration of MIC and inhibit their proliferation again over time.

Compounds EH2 and EH3 had the lowest IC₅₀ and were the most promising. Further research should be conducted *in vivo* to explore a new form of treatments for trichomoniasis and attempt to determine the mechanism of action of these compounds in *T.vaginalis*.

Acknowledgments

The authors thank the Federal University of Pelotas, Federal University of Santa Maria, Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel Brazil (Finance Code 001) to the National Council for Scientific and Technological Development.

Conflicts of Interest

The authors declare there are no conflicts of interest.

- 497 [1] P. Kissinger, *Trichomonas vaginalis*: a review of epidemiologic, clinical and
498 treatment issues, *BMC Infect Dis.*, 15 (2015), 2-8. Aug.
499 <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1055-0>.
- 500 [2] World Health Organization. Global incidence and prevalence of selected
501 curable sexually transmitted infections-2008. Geneva, Switzerland: World
502 Health Organization. 2012.
- 503 [3] J. Rowley, S. Vander Hoorn, E. Korenromp, N. Low, M. Unemo, LJ. Abu-
504 Raddad, RM. Chico, A. Smolak, L. Newman, S. Gottlieb, SS. Thwin, N. Broutet,
505 MM. Taylor, Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global
506 prevalence and incidence estimates, 2016, *Bull World Health Organ.*, 97
507 (2019), 548–562. Aug. <https://doi.org/10.2471/BLT.18.228486>.
- 508 [4] KK. Holmes, P. Sparling, W. Stamm, P. Piot, J. Wasserheit, L. Corey, M.
509 Cohen, *Sexually transmitted diseases* fourth ed, New York: McGraw-Hill
510 Medical, 2008.
- 511 [5] E. Mielczarek, J. Blaszkowska. *Trichomonas vaginalis*: pathogenicity and
512 potential role in human reproductive failure, *Infection*. 44 (2016), 447-458.
513 <https://doi:10.1007/s15010-015-0860-0>.
- 514 [6] M. Mirzadeh, M. Olfatifar, AV. Eslahi, A. Abdoli, E. Houshmand, H.Majidiani,
515 MG. Johkool, S. Askari, S. Hashemipour, M. Badri, M. Global prevalence of
516 *Trichomonas vaginalis* among female sex workers: a systematic review and
517 meta-analysis. *Parasitol Res*, 120 (2021), 2311–2322.
518 <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07216-6>.
- 519 [7] RS. McClelland, L. Sangare, WM. Hassan, L. Lavreys, K. Mandaliya, J. Kiarie,
520 J. Ndinya-Achola, W. Jaoko, JM. Baeten, Infection with *Trichomonas vaginalis*
521 increases the risk of HIV-1 acquisition. *J Infect Dis*. 195(2007),698-702.
522 <https://doi: 10.1086/511278>.
- 523 [8] CP. Bhunu, S. Mushayabasa, Transmission dynamics of *Trichomonas*
524 *vaginalis* and HIV/AIDS coinfection, *HIV AIDS Rev*. 14 (2015), 126-132.
525 <https://doi.org/10.1016/j.hivar.2015.05.005>.
- 526 [9] SC. Masha, P. Cools, EJ.Sanders, M. Vaneechoutte, T. Crucitti, *Trichomonas*
527 *vaginalis* and HIV infection acquisition: a systematic review and meta-analysis.

528 Sex Transm Infect. 95(2019),36-42. [https://doi: 10.1136/sextrans-2018-](https://doi.org/10.1136/sextrans-2018-053713)
529 053713.

530 [10] QO. Lawrence, ANC. Amadi, C.Okosa, PO. Ikpi, BC. Chukwuemeka,
531 *Trichomonas vaginalis* and Associated Health Risk Factors among Prison
532 Inmates in Umuahia, Abia State, Southeastern Nigeria. JoBAZ, 7 (2021), 70-75.
533 <https://doi.org/10.1186/s41936-021-00232-z>.

534 [11] P. Durel, V. Roiron, A. Siboulet, LJ. Borel, Systemic treatment of human
535 trichomoniasis with a derivative of nitro-imidazole, 8823 RP, Br J Vener Dis, 36
536 (1960), 21- 26. <https://doi.org/10.1136/sti.36.1.21>.

537 [12] L. Sylvestre, M. Belanger, Z. Gallai, Urogenital trichomoniasis in the
538 male:review of the literature and report on treatment of 37 patients by a new
539 nitroimidazole derivative (flagyl), Canad.med.Ass.J, 83 (1960), 1195-1199.

540 [13] JR. Schwebke, FJ. Barrientes, Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates
541 with resistance to metronidazole and tinidazole, Antimicrob Agents Chemother,
542 50 (2006), 4209-4210. <https://doi.org/10.1128/AAC.00814-06>.

543 [14] RD. Kirkcaldy, P. Augostini, LE. Asbel, KT. Bernstein, RP. Kerani, CJ.
544 Mettenbrink, P. Pathela, JR. Schwebke, WE. Secor, KA. Workowski, D. Davis, J.
545 Braxton, HS. Weinstock, *Trichomonas vaginalis* antimicrobial drug resistance in
546 6 US cities, STD Surveillance Network, 2009-2010, Emerg Infect Dis., 18 (2012),
547 939–943. <https://doi.org/10.3201/eid1806.111590>.

548 [15] S. Löfmark, C. Edlund, CE. Nord, Metronidazole is still the drug of choice for
549 treatment of anaerobic infections, Clin Infect Dis., 50 (2010), 16–23.
550 <https://doi.org/10.1086/647939>.

551 [16] EJ. Barreiro, A Importância da Síntese de Fármacos na Produção de
552 Medicamentos, Quím. Nova 14 (1991), 179-188.

553 [17] JOF. Melo, CL. Donnici, R. Augusti, VF. Ferreira, MCBV. De Souza, MLG.
554 Ferreira, AC. Cunha, Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de
555 preparação, aplicações e atividades farmacológicas, Quím. Nova, 29 (2006),
556 569-579. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000300028>.

557 [18] D. Dewangan, A. Pandey, T. Sivakumar, R. Rajavel, RD. Dubey, Synthesis of
558 some Novel 2, 5- Disubstituted 1, 3, 4-Oxadiazole and its Analgesic, Anti-
559 Inflammatory, Anti-Bacterial and Anti-Tubercular Activity, Int. J. Chemtech Res,
560 2, (2010), 1397-1412. [https://doi.org/ 10.1016/j.bmcl.2020.127136](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127136).

- [19] M. Boiani, L. Boiani, A. Denicola, S. Torres de Ortiz, E. Serna, N. Vera de Bilbao, L. Sanabria, G. Yaluff, H. Nakayama, A. Rojas de Arias, C. Vega, M. Rolan, A. Gómez-Barrio, H. Cerecetto, M. Gonzalez, 2H-Benzimidazole 1,3-Dioxide Derivatives: A New Family of Water-Soluble Anti-Trypanosomatid Agents, *J. Med. Chem.* 49 (2006), 3215-3224. April. <https://doi.org/10.1021/jm0600343>.
- [20] U. Galli, L. Lazzarato, M. Bertinaria, G. Sorba, A. Gasco, S. Parapini, D. Taramelli, Synthesis and antimalarial activities of some furoxan sulfones and related furazans. *Eur J Med Chem*, 40 (2005), 1335–1340. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2005.05.001>.
- [21] C. Olea-Azar, C., Rigol, F. Mendizabal, H. Cerecetto, DR. Maio, M. Gonzalez, W. Porcal, A. Morello, Y. Repetto, DJ Maya, Novel Benzo[1,2-c]1,2,5-Oxadiazole N-Oxide Derivatives as Antichagasic Agents: Chemical and Biological Studies, *Lett. Drug Des. Discov*, 2 (2005), 294-301. <https://dx.doi.org/10.2174/1570180054038341>.
- [22] SD. Jorge, F. Palace-Berl, KF. Mesquita Pasqualoto, M. Ishii, AK. Ferreira, CM. Berra, RV. Bosch, DA. Maria, LC. Tavares, Ligand-based design, synthesis, and experimental evaluation of novel benzofuroxan derivatives as anti-Trypanosoma cruzi agents, *Eur J Med Chem*, 64 (2013), 200–214. Jun, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.03.053>.
- [23] P. Stabile, A., Lamonica, A. Ribecai, D. Castoldi, G. Guercio, O. Curcuruto, Mild and convenient one-pot synthesis of 1,3,4-oxadiazoles, *Tetrahedron Lett.*, 51 (2010), 4801-4805. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2010.06.139>.
- [24] JCP. Mayer, AC. Sauer, BA. Iglesias, TV. Acunha, DF. Back, OED. Rodrigues, L. Dornelles, Ferrocenylethenyl-substituted 1,3,4-oxadiazolyl-1,2,4-oxadiazoles: Synthesis, characterization and DNA-binding assays, *J. Organomet. Chem.*, 841 (2017), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2017.04.014>.
- [25] M. Haroun, P. Helissey, S. Giorgi-Renault, New synthesis of 5,10-dioxyphenazine-2-carboxylic acid, *Synth. Commun.*, 31 (2001), 2329-2334. <https://doi.org/10.1081/SCC-100104833>.
- [26] RM. Srivastava, MC. Pereira, WWM. Faustino, K. Coutinho, JV. Dos Anjos, SJ. De Melo, Synthesis, mechanism of formation, and molecular orbital calculations of arylamidoximes, *Monatsh. Chem.*, 140 (2009), 1319-1324. <https://doi.org/10.1007/s00706-009-0186-7>.

- [27] F. Huguet, A. Melet, RA. Sousa, A. Lieutaud, J. Chevalier, L. Maigre, P. Deschamps, A. Tomas, N. Leulliot, JM. Pages, I. Artaud, Hydroxamic Acids as Potent Inhibitors of FcII and MnII *E.coli* Methionine Aminopeptidase: Biological Activities and X-ray Structures of Oxazole Hydroxamate–EcMetAP-Mn Complexes, *ChemMedChem*, 7 (2012), 1020-1030. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201200076>.
- [28] T. Huhtiniemi, T. Suuronen, VM. Rinne, C. Wittekindt, M. Lahtela-Kakkonen, E. Jarho, EAA. Wallén, A. Salminen, A. Poso, J. Leppänen, J., Oxadiazole-carbonylaminothioureas as SIRT1 and SIRT2 Inhibitors, *J. Med. Chem.*, 51 (2008), 4377-4380. <https://doi.org/10.1021/jm800639h>.
- [29] GI. Elliot, JR. Fuchs, BSJ. Blagg, H. Ishikawa, H. Tao, ZQ. Yuan, DL. Boger, Intramolecular Diels–Alder/1,3-Dipolar Cycloaddition Cascade of 1,3,4-Oxadiazoles, *J. Am. Chem. Soc.*, 128 (2006), 10589-10595. <https://doi.org/10.1021/ja0612549>
- [30] BY. Oquare, JS. Taylor, Synthesis of peptide nucleic acid FRET probes via an orthogonally protected building block for post-synthetic labeling of peptide nucleic acids at the 5-position of uracil, *Bioconjug. Chem.*, 19 (2008), 2196-2104. <https://doi.org/10.1021/bc800284x>.
- [31] P. Niu, J. Kang, X. Tian, L. Song, H. Liu, J. Wu, W. Yu, J. Chang, Synthesis of 2-Amino-1,3,4-oxadiazoles and 2-Amino-1,3,4-thiadiazoles via Sequential Condensation and I₂-Mediated Oxidative C–O/C–S Bond Formation, *J. Org. Chem.*, 80 (2015), 1018-1024. <https://doi.org/10.1021/jo502518c>.
- [32] A. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert, G. Studer, G. Tauriello, R. Gumieny, FT. Heer, TAP. de Beer, C. Rempfer, L. Bordoli, R. Lepore, T. Schwede, SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes, *Nucleic Acids Res.*, 46 (2018), 296–303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>.
- [33] MSD. Alves, Â. Sena-Lopes, RN. das Neves, AM. Casaril, M. Domingues, PT. Birmann, ET. da Silva, MVN. de Souza, L. Savegnago, S. Borsuk, In vitro and in silico trichomonacidal activity of 2,8-bis(trifluoromethyl) quinoline analogs against *Trichomonas vaginalis*, *Parasitol. Res.* 121 (2022), 2697–2711. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07598-1>.
- [34] EF. Pettersen, TD. Goddard, CC. Huang, GS. Couch, DM, Greenblatt, EC, Meng, TE, Ferrin, UCSF Chimera--a visualization system for exploratory

- research and analysis, *J Comput Chem.*, 25 (2004), 1605–1612. Oct.
<https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
- [35] MSD. Alves, RN. das Neves, Â. Sena-Lopes, M. Domingues, AM. Casaril, NV. Segatto, TCM. Nogueira, MVN. Souza, L. Savegnago, FK. Seixas, T. Collares, S. Borsuk, Antiparasitic activity of furanyl N-acylhydrazone derivatives against *Trichomonas vaginalis*: in vitro and in silico analyses, *Parasites Vectors* 13 (2020), 2-13. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3923-8>.
- [36] F. Stanzione, I. Giangreco, JC. Cole, Use of molecular docking computational tools in drug discovery, *Prog Med Chem*, 60 (2021), 273–343. <https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2021.01.004>.
- [37] O. Trott, AJ. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *J Comput Chem.*, 31 (2010), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- [38] MD. Hanwell, DE. Curtis, DC. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek, GR. Hutchison, Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform, *J. Cheminformatics*, 4 (2012), 2-17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>.
- [39] M. Shipton, K. Brocklehurst, Benzofuroxan as a thiol-specific reactivity probe. Kinetics of its reactions with papain, ficin, bromelain and low-molecular-weight thiols, *Biochem J.*, 167 (1977), 799–810. Dec. <https://doi.org/10.1042/bj1670799>.
- [40] LS. Diamond, The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures, *J. Parasitol*, 43 (1957), 488-490. <https://doi.org/10.2307/3274682>.
- [41] Â. Sena-Lopes, RN. das Neves, FSB. Bezerra, MT. de Oliveira Silva, PC. Nobre, G. Perin, D. Alves, L. Savegnago, KR. Begnini, FK. Seixas, T. Collares, S. Borsuk, Antiparasitic activity of 1,3-dioxolanes containing tellurium in *Trichomonas vaginalis*, *Biomed Pharmacother* 89 (2017), 284–287. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.173>.
- [42] T. Picoli, JS. Barbosa, GD. Vargas, SDO. Hübner, G. Fischer, Toxicity and efficiency of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the freezing of Madin-Darby Bovine Kidney cells (mdbk), *Sci. Anim. Health*, 3 (215), 159-168. <https://doi.org/10.15210/sah.v3i2.6585>.
- [43] DSL. Petry, JCP Mayer, M. De Giacommeti, DT. Oliveira, LR. Garzon, AM. Engelmann, AFIM. Matos, MD. Baldissera, L. Dornelles, CM. Andrade, SG.

- Monteiro, S.G., 2021. In vitro and in vivo trypanocidal activity of a benzofuroxan derivative against *Trypanosoma cruzi*, *Exp Parasitol.*, 226-227 (2021), 108-125. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2021.108125>.
- [44] RN. Das Neves, Â Sena-Lopes, MSD. Alves, B. da Rocha Fonseca, CC. da Silva, AM. Casaril, L. Savegnago, CMP. Pereira, DF. Ramos, S. Borsuk, 2'-Hydroxychalcones as an alternative treatment for trichomoniasis in association with metronidazole, *Parasitol Res*, 119, (2020), 725-736. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06568-4>.
- [45] G. Aguirre, M. Boiani, H. Cerecetto, R. Di Maio, M. González, W. Porcal, A. Denicola, M. Möller, L. Thomson, V. Tórtora, Benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazole N-oxide derivatives as potential antitrypanosomal drugs. Part 3: Substituents-clustering methodology in the search for new active compounds, *Bioorg. Med. Chem.* 13 (2005), 6324–6335. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.05.020>.
- [46] D. Castro, L. Boiani, D. Benitez, P. Hernández, A. Merlino, C. Gil, C. Olea-Azar, M. González, H. Cerecetto, W. Porcal, Anti-trypanosomatid benzofuroxans and deoxygenated analogues: synthesis using polymer-supported triphenylphosphine, biological evaluation and mechanism of action studies, *Eur. J. Med. Chem*, 44 (2009), 5055–5065. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.09.009>.
- [47] LA. Dutra, L. de Almeida, TG. Passalacqua, JS. Reis, FA Torres, I. Martinez, JL. dos Santos, Leishmanicidal Activities of Novel Synthetic Furoxan and Benzofuroxan Derivatives, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 58 (2014), 4837. <https://doi.org/10.1128/AAC.00052-14>.
- [48] B. Zarranz, A. Jaso, LM. Lima, I. Aldana, A. Monge, S. Maurel, M. Sauvain, Antiplasmodial activity of 3-trifluoromethyl-2-carbonylquinoxaline di-N-oxide derivatives, *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, 42 (2006), 357-361. Sep. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322006000300005>.
- [49] L. Bonilla-Ramírez, S. Galiano, M. Quiliano, I. Aldana, A. Pabón, Primaquine-quinoxaline 1,4-di-N-oxide hybrids with action on the exo-erythrocytic forms of *Plasmodium* induce their effect by the production of reactive oxygen species, *Malar. J*, 18 (2019), 201. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2825-8>.
- [50] EA. Chugunova, AD. Voloshina, RE. Mukhamatdinova, IV. Serkov, AN. Proshin, EM. Gibadullina, AR. Burilov, NV. Kulik, VV. Zobov, DB. Krivolapov, AB. Dobrynin, R Goumont, The Study of the Biological Activity of Amino-Substituted

- Benzofuroxans, *Lett. Drug Des. Discov.* 11 (2014), 502-512.
<https://doi.org/10.2174/1570180810666131122010403>.
- [51] CF.Farias, MH. Massaoka, N. Girola, RA. Azevedo, AK. Ferreira, SD. Jorge, LC.Tavares, CR. Figueiredo, LR. Travassos, Benzofuroxan derivatives N-Br and N-I induce intrinsic apoptosis in melanoma cells by regulating AKT/BIM signaling and display anti metastatic activity in vivo, *BMC Cancer*, 15 (2015), 2-11.
<https://doi.org/10.1186/s12885-015-1835-3>.
- [52] G. Aguirre, M. Boiani, H. Cerecetto, A. Gerpea, M. González, YF. Sainz, A. Denicola, COD. Ocariz, JJ. Nogal, D. Montero, JÁ. Escario, Novel Antiprotozoal Products: Imidazole and Benzimidazole N-Oxide Derivatives and Related Compounds, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem*, 337 (2004) 259–270.
<https://doi.org/0.1002/ardp.200300840>
- [53] IS. Severina, LN. Axenova, AV. Veselovsky, NV. Pyatakova, OA., Buneeva, AS., Ivanov, AE. Medvedev, Nonselective inhibition of monoamine oxidases A and B by activators of soluble guanylate cyclase, *Biochemistry (Mosc)*., 68 (2003), 1048–1054. <https://doi.org/10.1023/a:1026029000085>.
- [54] FR. Gutierrez, TW. Mineo, WR. Pavanelli, PM. Guedes, JS. Silva, The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104 (2009), 236-245. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000900030>.
- [55] SD. Jorge, A. Masunari, CO. Rangel-Yagui, KF. Pasqualoto, LC. Tavares, Design, synthesis, antimicrobial activity and molecular modeling studies of novel benzofuroxan derivatives against *Staphylococcus aureus*, *Bioorg Med Chem*, 17 (2009), 3028–3036. Apr. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.03.011>.
- [56] CV. Coulter, GF. Kelso, TK. Lin, RA. Smith, MP. Murphy, M. P, Mitochondrially targeted antioxidants and thiol reagents, *Free Radic. Biol. Med.*, 28 (2000), 1547–1554. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00255-0](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00255-0).
- [57] Y. Li, Y. Yang, X. Guan, Benzofurazan sulfides for thiol imaging and quantification in live cells through fluorescence microscopy, *Anal Chem.*, 84 (2012), 6877–6883. <https://doi.org/10.1021/ac301306s>.
- [58] AY. Kots, MA. Grafov, YV. Khropov, VL. Betin, NN. Belushkina, OG. Busygina, MY. Yazykova, IV. Ovchinnikov, AS. Kulikov, NN. Makhova, NA. Medvedeva, TV. Bulargina, IS. Severina, Vasorelaxant and antiplatelet activity of 4,7-dimethyl-1,2,5-oxadiazolo[3,4-d] pyridazine 1,5,6-trioxide: role of soluble guanylate cyclase,

729 nitric oxide and thiols, Br J Pharmacol, 129 (2000), 1163–1177.
 730 <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703156>.

731 [59] T. Persichini, M. Colasanti, M. Fraziano, V. Colizzi, C. Medana, F. Polticelli, G.
 732 Venturini, P. Ascenzi, Nitric oxide inhibits the HIV-1 reverse transcriptase activity,
 733 Biochem Biophys Res Commun, 258 (1999), 624–627.
 734 <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0581>.

735 [60] LDLA. Ramón-Luing, FJ. Rendón-Gandarilla, J. Puente-Rivera, L. Ávila-
 736 González, R. Arroyo, Identification and characterization of the immunogenic
 737 cytotoxic TvCP39 proteinase gene of *Trichomonas vaginalis*, Int J Biochem Cell
 738 Biol., 43 (2011), 1500–1511. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.07.001>.

739 [61] HM. Hernández, R. Marcet, J. Sarracent, Biological roles of cysteine
 740 proteinases in the pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*, Parasite, 21 (2014) 2-
 741 10. <https://doi.org/10.1051/parasite/2014054>.

742 [62] FD. Gillin, DS. Reiner, RB. Levy, PA. Henkart, Thiol groups on the surface of
 743 anaerobic parasitic protozoa, Mol. Biochem. Parasitol, 13 (1994), 1-12.
 744 [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(84\)90096-3](https://doi.org/10.1016/0166-6851(84)90096-3).

745 [63] GH. Coombs, GD. Westrop, P. Suchan, G. Puzova, RP. Hirt, TM. Embley, JC.
 746 Mottram, S. Müller, The amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*
 747 contains a divergent thioredoxin-linked peroxiredoxin antioxidant system, JBC,
 748 279 (2004), 5249–5256. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304359200>.

749 [64] H. Cerecetto, W. Porcal, Pharmacological Properties of Furoxans and
 750 Benzofuroxans: Recent Developments, Mini-Rev. Med. Chem. 5 (2005), 57-71.
 751 <https://doi.org/10.2174/1389557053402864>.

752 [65] JF. Alderete, L. Suprun-Brown, L. Kasmala, J. Smith, M. Spence. Heterogeneity
 753 of *Trichomonas vaginalis* and discrimination among trichomonal isolates and
 754 subpopulations with sera of patients and experimentally infected mice, Infect
 755 Immun, 49 (1985), 463-468. <https://doi.org/10.1128/iai.49.3.463-468.1985>.

756 [66] SR. Davis-Hayman, PH. Shah, RW. Finley, WB. Lushbaugh, JC. Meade.
 757 *Trichomonas vaginalis*: analysis of a heat-inducible member of the cytosolic heat-
 758 shock-protein 70 multigene Family, Parasitol Res, 86 (2000), 608-612.
 759 <https://doi.org/10.1007/pl00008538>.

760 [67] M. Setzer, K. Byler, I. Ogungbe, W. Setzer. Natural products as new treatment
 761 options for trichomoniasis: a molecular docking investigation. Sci Pharm 85
 762 (2017), 1-5. <https://doi.org/10.3390/scipharm85010005>.

- [68] CR. León-Sicairos, J. León-Félix, R. Arroyo, tvcp12: a novel *Trichomonas vaginalis* cathepsin L-like cysteine proteinase-encoding gene, *Microbiology (Reading)*, 150 (2004), 1131–1138. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26927-0>.
- [69] G. Wu, A. Fiser, B. Ter Kuile, A. Sali, M. Müller. Convergent evolution of *Trichomonas vaginalis* lactate dehydrogenase from malate dehydrogenase, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 96 (1999), 6285–6290. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6285>.
- [70] D. Burstein, SB. Gould, V. Zimorski, T. Kloesges, F.Kiosse, P. Major, WF. Martin, T. Pupko, T. Daga. A machine learning approach to identify hydrogenosomal proteins in *trichomonas vaginalis*, *Eukaryot Cell*, 11 (2012), 217-228. <https://doi.org/10.1128/EC.05225-11>.
- [71] V. Jeffers, Z. Tampaki, K. Kim, WJ. Sullivan. A latent ability to persist: differentiation in *Toxoplasma gondii*, *Cellular Mol Life Sci*, 75(2018), 2355–2373. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2808-x>.A.
- [72] F. Kayambaa, M. Faya, OJ. Poee, B. Kushwaha, ND. Kushwaha, VA. Obakachia, VO. Nyamori, R. Karpoormath. Lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase: Potential antiparasitic targets for drug development studies, *Bioorg. Med. Chem*, 50 (2021), 116458. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116458>
- [73] GD. Westrop, L. Wang, GJ. Blackburn, T. Zhang, L. Zhang, DG. Watson, GH. Coombs. Metabolomic profiling and stable isotope labelling of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus* reveal major differences in amino acid metabolism including the production of 2-hydroxyisocaproic acid, cystathionine and S methylcysteine, *PloS one*, 12 (2017), 1-34. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189072>
- [74] Leitsch D. Recent advances in the *Trichomonas vaginalis* field. *FI000Research*, 5 (2016), 1-7. <http://dx.doi.org/10.12688/f1000research.7594.1>

4 Manuscrito 2

Manuscrito será submetido a revista Biotechnology Research and Innovation.

Efeito duplo de derivados de benzofuroxanos em *Trichomonas vaginalis*

Marjorie de Giacometi^a, João Cândido Pilar Mayer^b, Yan Wahast Islabão^a, Alexia
Brauner de Mello^a, Paloma Taborda Birmann^c, Tallyson Nogueira Barbosa^c,
Fernanda Severo Sabedra Sousa^c, Luciano Dornelles^b, Lucielli Savegnago^c, Fabiana
Kommling Seixas^c, Tiago Veiras Collares^c, Sibele Borsuk^c, Camila Belmonte Oliveira^a

^a Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

^b Department of Chemistry, LabSelen-NanoBio, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS,
Brazil

^c Center for Technological Development, Biotechnology, Universidade Federal de Pelotas (UFPel),
Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil"

815 **Resumo**

816 *Trichomonas vaginalis* é o agente etiológico da tricomoníase humana, uma Infecção
817 Sexualmente Transmissível (IST) de distribuição global. Este protozoário infecta
818 ambos os sexos, porém clinicamente manifesta-se com maior frequência em
819 mulheres. Atualmente, o tratamento comercialmente disponível para tricomoníase
820 baseia-se no uso de fármacos da classe dos 5-nitroimidazóis, com destaque para o
821 metronidazol (MTZ). A busca por novos compostos com atividade tricomonicida é
822 essencial e neste cenário, os derivados de benzofuroxanos (BZX), compostos
823 heterocíclicos amplamente empregados como estruturas base para diversos
824 fármacos, despertam interesse devido à sua vasta atividade biológica. Deste modo, o
825 objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade antiparasitária, e o status
826 antioxidante/oxidante bem como a expressão gênica de compostos derivados de
827 benzofuroxanos N-óxidos contra *T. vaginalis*. Nossos resultados revelaram que os
828 compostos EH1, EH2, EH3 e EA2 exibiram uma eficácia notável contra o protozoário
829 nas maiores concentrações (75 e 100 μ M). Além disso, esses compostos
830 demonstraram atividade oxidante nas mesmas concentrações e em diferentes
831 intervalos de tempo. Sua capacidade antioxidante mostrou-se promissora em diversos
832 testes e tempos, assim como sua habilidade em causar a peroxidação lipídica. Ao
833 analisar a interação desses compostos com enzimas específicas do *T. vaginalis*
834 (PFUR A e B, málica, hidrogenase) na concentração de 55 μ M após 5 horas de
835 tratamento, observamos que EH1, EH2 e EH3 potencializam a expressão gênica das
836 proteínas PFUR e hidrogenase. Por outro lado, a molécula EA2 super expressou
837 apenas a enzima málica. Conclui-se que o mecanismo de ação desses compostos
838 pode estar relacionado à modulação na produção de espécies reativas ao oxigênio
839 (ROS), que danificam a membrana dos protozoários e interagem com enzimas vitais
840 para a sobrevivência do parasito.

841 Palavras-chave: *Trichomonas vaginalis*; antioxidante; oxidante; expressão gênica.

842

843 **Abstract**

844 *Trichomonas vaginalis* is the etiological agent of human trichomoniasis, a globally
845 distributed Sexually Transmitted Infection (STI). This protozoan infects both sexes but

clinically manifests mainly in women. Currently, the available treatment is carried out with drugs of the 5-nitroimidazole class, primarily metronidazole (MTZ). The search for new compounds with trichomonacidal activity is essential, and in this scenario, benzofuroxane derivatives (BZX), heterocyclic compounds widely employed as structural bases for various drugs, are of interest due to their vast biological activity. Thus, the aim of this study was to evaluate the antiparasitic, antioxidant/oxidant, and gene expression capabilities of benzofuroxane N-oxide compounds in the protozoan *T. vaginalis* at concentrations of 55 μ M, 75 μ M, and 100 μ M. Our results revealed that the compounds EH1, EH2, EH3, and EA2 exhibited remarkable efficacy against the protozoan at concentrations of 75 μ M. Additionally, these compounds demonstrated oxidant activity at the same concentrations and different time intervals. Their antioxidant capacity proved promising in various tests and times, as well as their ability to cause lipid peroxidation. Analyzing the interaction of these compounds with specific enzymes of *T. vaginalis* (PFUR A and B, malic, hydrogenase) at a concentration of 55 μ M after 5 hours of treatment, we observed that EH1, EH2, and EH3 expressed both PFUR and hydrogenase. On the other hand, EA2 expressed only the malic enzyme. It is concluded that the mechanism of action of these compounds may be related to the production of reactive oxygen species (ROS), which damage the protozoa's membrane and interact with vital enzymes for the parasite's survival. Promising antioxidant activity was also observed.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*; antioxidant; oxidant; gene expression; *in vitro*

Introdução

As Infecções Sexualmente Transmissíveis (ISTs) causam um impacto significativo na saúde humana a curto e longo prazo (Torrone et al., 2021), dentre as quais destaca-se a tricomoníase. A tricomoníase é causada pelo protozoário *Trichomonas vaginalis* considerada a IST não viral de maior prevalência mundial cuja incidência mundial é de 156 milhões de casos (Rowley, 2019), sendo 4,3 milhões de novos casos no Brasil (Rey, 2002, Almeida et al., 2010; Lima et al., 2019).

Trichomonas vaginalis acomete na maioria dos casos o sistema gênito-urinário de homens e mulheres de forma assintomática. Em mulheres, os sintomas se manifestam por corrimento vaginal, disúria, dor abdominal e prurido. Os homens podem apresentar sintomas que incluem o surgimento de corrimento branco, uretrite, disúria e prostatite (Van Gerwen; Muzny, 2019; Van Gerwen et al., 2021).

O tratamento recomendado para o gênero *Trichomonas* spp. consiste na administração de 5-nitroimidazóis, particularmente o metronidazol, devido à sua segurança terapêutica e à utilização de doses baixas. Porém, atualmente, a taxa de resistência a esse medicamento varia entre 11% e 28%, o que representa um grave problema de saúde pública (Robinson, 1962; Mtshali et al., 2022; National Center for Health Statistics 2021). Acredita-se que a capacidade da resistência ao MTZ está relacionada com o genoma do parasito (Conrad et al., 2012; Graves et al., 2023).

Os benzofuroxanos (BZX) são moléculas de oxigênio importantes por possuírem compostos bioativos sintéticos e naturais (De Simone et al., 2004; Khanam, Shamsuzzaman 2015), sendo assim, utilizados como base construtora para diversos medicamentos com propriedades farmacológicas, incluindo antiparasitária (Thévenin et al., 2013), oxidantes (Karatas et al., 2006) e antioxidantes (Chand et al., 2017). Atualmente, é significativamente importante a busca de novos compostos bioativos tanto na indústria agroquímica quanto na farmacêutica, onde mais de 60% dos principais medicamentos disponíveis no mercado possuem pelo menos um núcleo heterocíclico como parte integrante da estrutura geral do composto (McGrath; Brichacek; Njardarson, 2010; Khanam, Shamsuzzaman, 2015).

O oxigênio é essencial para os seres vivos, desempenhando um papel crucial em uma diversidade de processos biológicos. No entanto, durante o desequilíbrio oxidativo/antioxidante, o oxigênio pode gerar a formação de radicais livres tais como o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$), radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Essas espécies reativas de oxigênio (ROS) têm a capacidade de danificar células e

Portanto, surge a necessidade de substâncias antioxidantes, as quais têm a capacidade de reduzir ou inibir a oxidação provocada pelos radicais. Assim, essas substâncias desempenham um papel relevante na prevenção de enfermidades (Morais et al., 2009).

Destaca-se que a busca por novos alvos terapêuticos para o tratamento de doenças parasitárias é desafiador devido ao fato de que os protozoários compartilham muitas características com seus hospedeiros, dificultando a criação de medicamentos eficazes e seletivos. (González, 2007). Este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade antioxidante/oxidante e antiparasitária de compostos derivados benzofuroxanos N-óxidos denominados EH1, EH2, EH3 e EA2 assim como o efeito sobre a expressão gênica de enzimas do *T. vaginalis in vitro*

Material e métodos

Compostos derivados dos benzofuroxanos

Os compostos utilizados nesta pesquisa foram sintetizados no laboratório LabSelen-NanoBio, localizado na Universidade Federal de Santa Maria e estão denominados de acordo com a nomenclatura IUPAC (disponível para consulta completa em De Giacometi et al., 2023). Na tabela 1 estão listados os compostos juntamente com suas respectivas nomenclaturas:

Cultivo de *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis (ATCC 30236), empregado neste estudo, demonstra sensibilidade ao MTZ. Foi cultivado em condições axênicas em meio de tripticase-extrato de levedura-maltose (TYM) (pH 6,0), adicionado de 5 mg/mL de estreptomicina e 10% de soro bovino inativado (aquecido a 56 °C por 30 min) (SBS) estéril. Os tubos foram incubados a 37 °C em ambiente aeróbico (Diamond, 1957). A viabilidade e a morfologia foram examinadas por microscopia de luz com aumento de 100x e 400x. Antes de prosseguir com o ensaio antioxidante, realizou-se um teste de exclusão utilizando azul de tripano (0,4%) para garantir uma viabilidade mínima de 95% e a obtenção da fase de crescimento logarítmico (Sena-Lopes et al., 2017).

940 **Ensaio *in vitro* Anti- *Trichomonas vaginalis***

941 A fim de avaliar a capacidade antiparasitária dos compostos foi realizado um
942 ensaio *in vitro*, onde os compostos EH1, EH2, EH3 e EA2 foram sintetizados e
943 dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO 0.6%). O teste foi realizado em placas de
944 microtitulação de 96 poços. Em cada placa, foram adicionados 150 µl de cultura com
945 densidade inicial de 2×10^6 trofozoítos/ mL em meio TYM, seguido da incubação com
946 50 µl da solução contendo cada composto (Sena-Lopes et al., 2017). As placas foram
947 incubadas a 37 °C em 5% de CO₂, por 24 horas. Em seguida, a motilidade, morfologia
948 e viabilidade dos trofozoítos foram analisadas utilizando uma alíquota (1:1, v/v)
949 contendo trofozoítos e azul de tripan (0,4%), que foi contada em câmara de Neubauer.
950 Os controles utilizados para cada ensaio foram: um controle negativo contendo
951 apenas os trofozoítos; um controle com DMSO a 0,6%; e um controle positivo com
952 MTZ a 100 µM (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). As concentrações
953 empregadas para cada composto foram as seguintes: 100 µM, 75 µM, 65 µM, 55 µM,
954 25 µM. A IC₅₀ foi calculada utilizando o software GraphPad Prism 8.0.1 (Sena-Lopes
955 et al., 2017).

956 **Ensaio de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)**

957 Os grupos tratados e controle negativo (meio TYM e trofozoítos) foram
958 avaliados quanto à geração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)
959 em uma reação ácido-aquecimento, sendo o malondialdeído (MDA) selecionado como
960 indicador para a peroxidação lipídica de acordo com Ohkawa e colaboradores (1979).
961 Para tanto, em placas de 96 poços foram inoculadas com *T. vaginalis* (150 µL) e os
962 diferentes compostos (50 µL- 55 µM, 75 µM e 100 µM) juntamente com os controles
963 (meio TYM). As placas foram pré incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ por 24 h, 48 h,
964 72 h, 96 h. A concentração de 55 µM também foi analisada em 5h (tempo da primeira
965 fissão binária). Após o tempo de incubação de cada placa, alíquotas do tratamento e
966 controle de *T. vaginalis* foram novamente incubadas com 500 µL de 0,8% de ácido
967 tiobarbitúrico, 500 µL de ácido acético/HCl (pH 3,4) e 200 µL de SDS (dodecil sulfato
968 de sódio) a 8,1% a 95 °C por 60 minutos. A absorbância das amostras foi medida a
969 532 nm e os resultados foram expressos em nmol/mL.

970 **Ensaio de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)**

971 A avaliação da produção de ROS pelo *T. vaginalis* após o tratamento com os
972 compostos EH1, EH2, EH3 e EA2 foi realizada através da oxidação do 2'-7'-
973 diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA) para diclorofluoresceína (DCF), como
974 indicador de ROS intracelular (adaptado de Cheng et al., 2015; Casaril et al., 2020).
975 Os trofozoítos (2×10^6) foram incubados juntamente com as concentrações dos
976 compostos (55 μ M, 75 μ M e 100 μ M) e avaliados por -24 h 48 h, 72 h e 96 h
977 separadamente. A concentração de 55 μ M também foi analisada em 5h. O grupo
978 controle incluiu trofozoítos não tratados (meio TYM), enquanto para controle positivo
979 os trofozoítos foram tratados com peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 5 mM). Após o tempo
980 de incubação, o DCF-DA (10 μ M) foi adicionado em cada poço por 1 hora a 37°C.
981 Posteriormente, as amostras foram transferidas para um tampão Tris-HCl com pH 7,4
982 a uma concentração de 10 mM, e a fluorescência de DCF foi imediatamente registrada
983 por meio de um espectrofotômetro de fluorescência (excitação/emissão 480/520 nm).
984 Os níveis de ROS foram quantificados em termos de unidades (U) de fluorescência.

985 **Ensaio de Neutralização do Radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH)**

986 O DPPH é um radical estável empregado como substrato para avaliação da
987 atividade antioxidante *in vitro* de compostos, utilizando um ensaio desprovido de
988 células. Esse método baseia-se numa reação de transferência de elétron único (SET)
989 e remoção de átomo de hidrogênio (Choi et al. 2002). Os compostos (55 μ M, 75 μ M e
990 100 μ M) foram incubados em uma solução etanólica de DPPH (50 μ L). Para controle
991 positivo utilizou-se o ácido ascórbico, como controle negativo o radical DPPH e como
992 controle veículo, utilizou-se o DMSO 0.6%. Os tubos foram mantidos por 30 minutos
993 em ambiente escuro, e a absorbância foi registrada a 517 nm. Como controle negativo,
994 empregou-se uma solução de DPPH com água destilada, enquanto para o controle
995 positivo, utilizou-se 100 μ M de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-
996 carboxílico, Sigma Aldrich). Os resultados foram expressos como a porcentagem de
997 neutralização do radical DPPH em comparação com o controle negativo.

998 **Ensaio de Neutralização do Radical Azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfônico**
999 **(ABTS^{•+})**

1000 Para determinação da atividade antioxidante através do radical ABTS, foi
1001 utilizado o método descrito por Re e colaboradores (1999). As diferentes
1002 concentrações (55µM, 75µM e 100µM) dos compostos (EH1, EH2, EH3 e EA2) foram
1003 adicionadas a 2mL de solução de ABTS^{•+}. Para controle positivo utilizou-se o ácido
1004 ascórbico, como controle negativo o radical DPPH e como controle veículo, utilizou-
1005 se o DMSO 0.6%. Cada tubo foi incubado por 6 minutos à temperatura ambiente, no
1006 escuro. Posteriormente, a redução na absorbância foi medida a 734 nm, refletindo a
1007 atividade de neutralização dos compostos contra o radical ABTS. Os resultados foram
1008 expressos em porcentagem (%).

1009 **Ensaio Poder Antioxidante Redutor de Íons Férricos (FRAP)**

1010 O ensaio FRAP avalia a habilidade dos compostos em reduzir íons férricos
1011 (Stratil et al., 2006). A solução FRAP foi preparada misturando tampão acetato (38
1012 mM, pH 3,6), 2,4,6-tripiridil s-triazina (TPTZ) (10 mM em HCl 40 mM) e solução de
1013 FeCl₃ (20 mM) na proporção 10:1:1 (v/v/v). Em seguida, os compostos (10 µL) com
1014 diferentes concentrações (55, 75 e 100 µM) foram adicionados a 990 µL da solução
1015 FRAP, misturados e permitidos reagir no escuro a 37 °C por 40 minutos. A
1016 absorbância da atividade química resultante foi medida a 593 nm com um
1017 espectrofotômetro. Como controle positivo foi utilizado o ácido ascórbico (10 µM),
1018 controle veículo o DMSO 0.6% e controle negativo foi utilizado a solução de FRAP.

1019 **Análise de Expressão Gênica de *T. vaginalis***

1020 O RNA total proveniente de trofozoítos de *T. vaginalis* (10⁷ células/mL) foi
1021 extraído através do Reagente Trizol (Invitrogen), aderindo instruções sugeridas pelo
1022 fabricante. A síntese de cDNA foi realizada utilizando 0,5 µg do RNA total obtido,
1023 empregando o kit de alta capacidade (Applied Biosynthesis, Reino Unido), conforme
1024 as orientações do fabricante. A combinação para a reação de PCR (20 µL) continha
1025 10 µL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Reino Unido), 300nM de
1026 primers, 1µL de cDNA sintetizado, e água livre de RNase-DNase. As condições para
1027 a reação de PCR foram as seguintes: um ciclo a 95 °C por 5 minutos, seguido por 40
1028 ciclos a 95 °C por 10 segundos e, em seguida, a 60 °C por 30 segundos. A análise da

1029 curva de fusão foi conduzida conforme o protocolo de ciclagem com temperaturas de
1030 95 °C por 15 segundos, 55 °C por 15 segundos e 95 °C por 15 segundos.

1031 Todos os ensaios de PCR em tempo real foram realizados no sistema de PCR
1032 em tempo real Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia,
1033 EUA) usando os seguintes primers:

1034 Actina Forward 5'TCACAGCTCTTGCTCCACCA 3' e Reverse
1035 5'AAGCACTTGCGGTGAACGAT 3' sequências (número de acesso GenBank:
1036 KF747377.1) (Dos Santos et al., 2015)

1037 Piruvato-ferredoxina oxidorreductase A (PFORA) Forward 5'
1038 CGGCTACGGTATGTTCAAGG 3' e Reverse 5' TCCTTGTCCTGATCCCAAAC 3',
1039 sequências (número de acesso do GenBank: U16822)

1040 Piruvato-ferredoxina oxidorreductase B (PFORB) Forward 5'
1041 CTGCAAGCTCCTTACACAGC 3' e Reverse 5' 'AAGAGGGATTAGCCCAAGC 3',
1042 sequências (número de acesso do GenBank: U16823)

1043 Enzima málica D Forward 5' CATCTGTTAGCCTCCCAGTCC 3' e Reverse 5'
1044 ACGAGCAGCTTGTTTCATCCT 3', sequências (número de acesso do GenBank:
1045 U16839)

1046 Hydrogenase Forward 5' TGCACACGAAAGAAGGATGA 3' e Reverse 5'
1047 TCGCATGGTGTATCTGGTAA 3' (número de acesso do GenBank: U19897) (Mead et
1048 al.,2006)

1049 O gene da actina foi utilizado como normalizador em todas as análises, de
1050 acordo com Barbosa e colaboradores, 2023.

1051

1052 **Análise estatística**

1053 A análise estatística dos dados foi realizada utilizando uma análise de variância
1054 de um fator, seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas entre grupos. O
1055 valor de significância utilizado foi $p \leq 0,05$. Os resultados do ensaio antiparasitário são
1056 expressos como a média $\pm$ desvio padrão (DP). Os valores de IC_{50} foram calculados
1057 utilizando regressão não linear. Todas as análises foram realizadas utilizando o
1058 software GraphPad Prism 8.0.1.

Resultados

Ensaio *in vitro*

Neste estudo, compostos que reduziram a sobrevivência dos trofozoítos de 95% a 100% foram considerados com atividade tricomonicida. EH1, EH2 e EH3 demonstraram eficácia contra *T. vaginalis* na concentração de 100 µM, o EA2 na mesma concentração inibiu 98.7% dos trofozoítos. O grupo de controle negativo e o DMSO não tiveram impacto na sobrevivência dos trofozoítos, enquanto o controle positivo com MTZ reduziu a sobrevivência do protozoário em 100%. Na concentração de 25 µM, somente o composto EH3 inibiu 94.5% dos parasitos, os outros compostos não foram promissores, não chegando a 90% de inibição. Na concentração de 55 µM, os compostos EH2 e EH3 inibiram 100% dos trofozoítos e se mantiveram assim na concentração de 75 µM. Os compostos EH1 e EA2 inibiram 100% e 95.6% na concentração de 75 µM (Tabela 2).

Ensaio TBARS

Levando em consideração a importância da integridade da membrana para a sobrevivência, investigamos se houve mudanças nos níveis de peroxidação lipídica após o tratamento com os compostos EH1, EH2, EH3 e EA2 (FIGURA 1). No ensaio de peroxidação lipídica TBARS, podemos observar que os compostos EH1 (Figura 1A, B, C e D), EH2 (Figura 1 F, G), EH3 (Figura 1 I, J, K), foram capazes de induzir significativamente os níveis de peroxidação lipídica ($p < 0,05$) de modo dose-dependente nos tempos adequados em comparação com o controle em diferentes tempos (meio TYM e trofozoítos) (Figura 1). Entretanto, o mesmo não aconteceu com composto EA2, que não diferiu estatisticamente do controle (Figura 1 M, N, O e P).

Ensaio ROS

Dada a influência das ROS no contexto do estresse oxidativo e as potenciais implicações para a viabilidade de parasitos, examinamos se a utilização dos compostos poderia desencadear a geração de ROS no *T. vaginalis*, e assim proporcionar uma ação oxidante. De forma geral, as concentrações dos compostos em contato com os trofozoítos induziram significativamente a produção de ROS em comparação com o controle em diferentes tempos (Figura 2B). O composto EH1

induziu a produção de ROS nas concentrações de 55 , 75 e 100 μ M em 72 h e 75 e 100 em 96 h enquanto (Figura 3 C,D) o EH2 apresentaram ação oxidante em 24h e 72h (Figura 3 E e G) e em 24h, 48h e 72h (Figura 3 M,N e O) respectivamente. O composto EH3 provocou a produção de ROS em apenas em 96h de contato (Figura 3 L)

Ensaio DPPH e ABTS+

Para avaliar se compostos possuem alguma atividade antioxidante intrínseca, foi realizado o ensaio de redução de DPPH. Os resultados indicaram que apenas o composto EH3 foi capaz de neutralizar o radical em todas as concentrações testadas (55 μ M, 75 μ M e 100 μ M) (Figura 4 C). O composto EA2 foi eficiente como antioxidante apenas na concentração de 75 μ M (Figura 4 D), enquanto o EH1 mostrou significativa diferença na concentração de 100 μ M (Figura 4 A). Já o composto EH2 não foi capaz de neutralizar o radical, não sendo estatisticamente diferente em nenhuma concentração e dessa forma não apresentando potencial antioxidante para o radical DPPH (FIGURA 4 B).

No ensaio de neutralização do radical ABTS, foi possível observar que todos os compostos em todas as concentrações revelando uma atividade antioxidante promissora em comparação com o controle positivo (FIGURA 5)

Ensaio FRAP

O ensaio FRAP foi empregado para avaliar a capacidade redutora dos compostos, com o intuito de esclarecer a correlação entre a atividade antioxidante e o poder de redução. Os compostos exibiram capacidade redutora em relação aos íons férricos (Fe^{3+}) e dessa forma demonstraram potencial antioxidante. Todas as concentrações testadas de todos os compostos foram estatisticamente significantes em comparação com o controle positivo. Além disso em nenhum dos compostos apresentou diferença estatística entre as concentrações (Figura 6). Entretanto o composto EA2 foi o que apresentou as maiores médias variando de 1.12 (55 μ M e 100 μ M a 1.17 (75 μ M) (Figura 6 D).

1119 **Expressão gênica**

1120 A expressão gênica das proteínas PFOR A, B, hidrogenase e da enzima málica
1121 em *T. vaginalis* foi avaliada por qRT-PCR após 5 h de tratamento na menor
1122 concentração dos compostos (55 μ M) devido sua primeira fissão binária (Fig.7). A
1123 análise foi realizada para avaliar a resposta transcricional do organismo a esses
1124 compostos. Foram observadas diferenças estatísticas na expressão desses genes
1125 entre os grupos tratados com os compostos.

1126 Podemos observar que o EH1 e EH3 promoveram um aumento significativos
1127 (comparados com o controle) dos níveis de expressão das enzima PFOR B e
1128 hidrogenase (Figura 7 B e C) , enquanto o EH2 apresentou um aumento significativo
1129 na expressão da PFOR A e hidrogenase (Figura 7 A e C). Quanto a enzima málica,
1130 praticamente todos os compostos inibiram sua expressão em comparação com o
1131 controle (Figura 7 D).

1132 Entre os compostos testados o EH1 apresentou uma regulação positiva a PFOR
1133 B seguidamente do EH3, enquanto o composto que mais expressou a PFOR A foi o
1134 EH2. O Composto EA2 basicamente se comparou com o controle e não demonstrou
1135 diferença estatística exceto na enzima málica, onde foi o composto que mais
1136 expressou essa enzima (Figura 7 B,A e D).

1137 **Discussão**

1138 A atividade de compostos benzofuroxanos já é relatada em outros protozoários
1139 como *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* sp. e *Plasmodium* spp. (Bonilla-Ramirez et al.
1140 2018; Petry et al., 2021; Zarranz et al. 2006). Como podemos observar os compostos
1141 EH1, EH2, EH3 e EA2 apresentam potencial tripanocida principalmente em
1142 concentrações maiores (100 μ M) quando incubados por 24h. É notável que o
1143 composto EH2 e EH3 são capazes de inibir 100% os trofozoítos na concentração de
1144 55 μ M, e dessa forma são os compostos que apresentam as menores IC₅₀ sendo
1145 11.33 μ M (EH2) e 6.83 μ M (EH3). Além disso, em estudos anteriores envolvendo os
1146 mesmos compostos, nosso grupo de pesquisa observou uma atividade promissora
1147 após 12 horas de incubação em diversas concentrações (De Giacometi et al., 2023).
1148 Porém, quando ao mecanismo de ação dos benzofuroxanos acredita-se que eles
1149 sejam capazes de interagir com a membrana celular dos protozoários e liberar
1150 espécies reativas de nitrogênio (RNS) e ROS (Gutierrez et al. 2009). Há hipóteses que

a presença de diferentes substituintes no anel aromático dos compostos possa estar correlacionada com a sua atividade oxidante biológica (Boiani et al., 2006; Jorge et al., 2009

Benzofuroxanos, de maneira geral, são reconhecidos por suas propriedades tanto antioxidantes quanto oxidantes (Chand et al., 2017; Chugunova et al., 2023). EH1, EH2, EH3 e EA2 são moléculas que integram o sistema N-óxido em sua estrutura e esse tipo de heterociclos estão cada vez mais no foco nas pesquisas químicas e medicinais. Isso se deve à sua característica distintiva de possuir um mecanismo de ação dual (Cerecetto, González, 2007).

A peroxidação lipídica representa um indicador de estresse oxidativo, mensurável por meio da quantificação da formação de malondialdeído (MDA), um biomarcador para a lipoperoxidação. Levando em conta que a peroxidação lipídica é um conjunto de reações desencadeadas por radicais livres, levando a uma deterioração oxidativa de lipídios poli-insaturados, os quais são comuns nos elementos constituintes das membranas biológicas (Grotto et al., 2009). Constatamos que os compostos EH1, EH2 e EH2 foram capazes de causar danos significativos na membrana em diferentes concentrações e tempos de contato, enquanto o composto EA2 não demonstrou diferenças significativas.

Estudos recentes sugerem que a capacidade antioxidante de compostos fenólicos é principalmente devida à sua habilidade de neutralizar radicais livres (Soobrattee et al., 2005). Compostos fenólicos de origem natural e sintética, que possuem grupos doadores de elétrons nas posições orto, demonstraram ser antioxidantes mais eficazes do que aqueles que possuem esses grupos na posição meta (Lee et al., 2011; Cuvelier et al., 1992; Lee et al., 2015). Tanto o composto EA2 quanto o EH2 contêm o grupo metoxila (OCH₃) como substituinte na posição orto, considerado um doador de elétrons (Lee et al., 2015). No entanto, apenas o EH2 apresentou significância estatística no ensaio TBARS. Em contraste, Sartini et al. (2012), ao avaliarem a capacidade antioxidante de derivados benzofuroxanos, observaram que a adição de substituintes doadores de elétrons (OCH₃) em certos compostos resultou na redução da atividade antioxidante, assim como a presença de grupos *scavenger* (sequestradores) de elétrons (Cl) na mesma posição do anel. Diferentemente dos nossos resultados, tanto o EH1 (sem substituinte), EH2 (substituinte OCH₃) quanto o EH3 (substituinte Cl) induziram a peroxidação lipídica no *T. vaginalis*.

As ROS são substâncias produzidas naturalmente pelas vias metabólicas das células, sendo agentes altamente reativos e oxidantes que são eficientemente eliminados. Entretanto, a superprodução e/ou acumulação de ROS podem resultar em estresse oxidativo, ocasionando danos celulares como a quebra de lipídios, proteínas e ácido nucleico e assim poderiam conduzir à morte celular (Grotto et al., 2009; Katerji et al. 2019). Ademais, há relatos que o estresse oxidativo, decorrente da bio-oxidação do benzofuroxano, poderia ser o responsável pelo dano às células de tripanossoma (Persichini et al., 1999; Olea-Azar et al., 2003), considerando que o *T. cruzi* e o *T. vaginalis* são protozoários flagelados, existe a possibilidade de que o mecanismo de ação seja semelhante, porém mais estudos devem ser realizados para confirmar a hipótese.

Neste estudo, os compostos examinados exibiram atividade oxidativa, estimulando a liberação de ROS em variadas concentrações e intervalos de tempo. O composto EH1 revelou diferenças significativas em comparação ao grupo controle (trofozoítos e meio TYM) após 72 horas de experimentação, nas menores concentrações analisadas. Em contraste, o composto EH2 liberou ROS nas primeiras 24 horas. O EH3 não apresentou variações estatisticamente significativas em 48 e 72 horas, evidenciando alterações somente após 96 horas, nas três concentrações testadas. Dentre todos os compostos, o EA2 foi o que mais gerou ROS, mostrando diferenças em relação ao controle em todas as concentrações até 72 horas.

Visto que o estresse oxidativo pode levar a quebra de lipídios, é possível corroborar os dados obtidos no ensaio de TBARS, onde os compostos causaram danos nas membranas dos trofozoítos, possivelmente pela geração de ROS causando assim, um desequilíbrio metabólico no parasito. Nesse contexto, o desequilíbrio mencionado, merece uma análise mais aprofundada onde pode estar intrinsecamente ligado ao metabolismo do oxigênio e à sinalização redox em *T. vaginalis*, o qual promovem um ambiente pró-oxidativo. Considerando a ausência de glutathione e catalase nesta espécie, a defesa contra danos oxidativos em *T. vaginalis* depende parcialmente da atividade enzimática. É possível que os compostos interajam com enzimas como a flavina tiorredoxina redutase, responsável por essa proteção oxidativa, provocando assim um desequilíbrio nas defesas antioxidantes do protozoário (Mayer et al., 2009).

Conforme Gobec et al. (2015), a presença de substituintes hidroxila e metoxila nos anéis fenólicos confere uma influência significativa na capacidade antioxidante

dos compostos. Os derivados de benzofuroxanos, além de suas propriedades oxidantes, também exibiram uma notável capacidade de neutralizar os radicais DPPH e ABTS, conferindo-lhes uma ação antioxidante. Notavelmente, essa atividade antioxidante (ABTS) superou a ação oxidante observada no ensaio de ROS. Portanto, esses compostos se mostraram mais eficazes como antioxidantes do que como agentes oxidantes. O ensaio utilizando o radical ABTS foi mais promissor do que o ensaio utilizando o DPPH, uma vez que, todos os compostos em todas as concentrações reagiram significativamente na neutralização do radical ABTS, isso não foi possível no DPPH. Haa e colaboradores (2009) ao avaliarem o potencial antioxidante de oligostilbenos à base de benzofurano observaram que o ensaio ABTS demonstrou uma capacidade antioxidante superior, apresentando valores mais elevados quando comparado ao controle utilizado. Isso pode ser atribuído à maior sensibilidade do ensaio ABTS em comparação ao DPPH devido à sua cinética de reação mais rápida e à resposta mais intensa aos antioxidantes (Lee et al., 2015).

Embora todos os compostos possuam um grupo NH capaz de transferir facilmente um átomo de hidrogênio para o radical DPPH e assim neutralizando o mesmo (Nazarbahjat et al., 2016), a atividade antioxidante intrínseca não foi observada no composto EH2 e tampouco na concentração de 55 µM dos compostos EA2 e EH1. Entretanto, o composto EH3 foi o melhor neutralizador de DPPH, sendo estatisticamente relevantes em todas as concentrações, quando comparadas com o controle (ácido ascórbico). Sugere-se que a energia de dissociação da ligação N – H pode ser facilmente quebrada, e assim o EH3 é capaz de liberar um radical hidrogênio (H), que pode então agir como agente redutor, doando um elétron para neutralizar o DPPH. Diferentemente de Rupapara e colaboradores (2023), onde correlacionam a presença de cloro (Cl) no anel aromático como comprometedor da eficácia antioxidante, em nosso estudo o EH3 foi promissor em sua atividade antioxidante, sugerido dessa forma que outros substituintes sejam mais eficazes que o Cl na neutralização de radicais livres.

Ademais, observamos que todos os compostos em todas as concentrações foram capazes de reduzir os íons férricos (Fe^{3+}) doando elétrons e assim neutralizando os radicais livres. A capacidade redutora não foi dose dependente pois não houve diferenças estatísticas entre as concentrações. Em pesquisas envolvendo compostos oxadiazóis, foi observado que muitos desses exibiam uma capacidade redutora notável quando presentes em altas concentrações (Nazarbahjat et al., 2016).

De maneira semelhante, os compostos empregados neste estudo, que são derivados benzofuroxanos com a presença de oxadiazóis e hidrazina em sua estrutura, também demonstraram essas propriedades.

Os hidrogenossomos são organelas desempenham um papel ativo nos processos catalíticos, resultando na geração de energia (ATP) e na liberação de hidrogênio molecular, contribuindo assim para a regulação da manutenção do equilíbrio redox (Mallo et al., 2013). Essa organela foi descrita através da caracterização de várias enzimas como hidrogenase, piruvato sintase e malato desidrogenase (Hrdy et al., 2004). Ainda que complexos, os hidrogenossomos compartilham algumas semelhanças com as mitocôndrias, o que os levou a se adaptar para funcionar em ambientes com pouco oxigênio (Tachezy et al., 2022), como é o caso do *T. vaginalis*. O piruvato é utilizado como fonte de energia para reações de geração de ATP que ocorrem independentemente de oxigênio. O metabolismo desse parasito implica a atividade de PFOR e suas subunidades A e B, em conjunto com a enzima málica, as quais exercem diversos papéis essenciais. Por exemplo, tanto a PFOR quando a enzima málica são responsáveis por facilitar a conversão de piruvato a acetil-CoA, no início da via metabólica, gerando o acetato, ATP, hidrogênio molecular e dióxido de carbono molecular como produtos (Benchimol, 2008; Tachezy et al., 2022; LEITSCH, 2021; RADA et al., 2019). A hidrogenase, age na reoxidação da ferredoxina para gerar hidrogênio molecular, facilitando, desse modo, o crescimento celular (GRAVES et al., 2019). Além disso, uma vez internalizado, o MTZ funciona como um receptor de elétrons, entrando em competição direta com a enzima hidrogenase que é o aceptor natural e assim, o fármaco é capaz de impedir a produção de hidrogênio molecular e inibir o trofozoíto (Kulda, 1999; Graves et al., 2020).

Para que possamos compreender melhor os possíveis mecanismos de ação dos compostos utilizados, foi realizada a expressão gênica de enzimas importantes para a sobrevivência do *T. vaginalis*, como PFOR A e B, hidrogenase e enzima málica, após os trofozoítos permanecerem incubados por 5 horas com 55 μ M de cada composto. O tempo de 5 horas foi selecionado considerando que o tempo estimado para a primeira fissão binária dos trofozoítos em meio TYM varia de 4 a 5 horas (Gelbart et al., 1990). Após o período de exposição aos compostos, as mudanças nos níveis de mRNA dessas enzimas-alvo foram significativamente distintas daquelas observadas no grupo controle (meio TYM e trofozoítos). Tanto na PFOR A e B quanto na hidrogenase houve uma regulação positiva dessas proteínas pelos compostos

EH1, EH2 e EH3, com inibição da enzima málica. Esses resultados podem estar relacionados a desequilíbrios bioquímicos dos quais afetam as funções metabólicas essenciais para sobrevivência do *T. vaginalis*. Por esse motivo, as diferenças observadas poderiam causar danos irreversíveis ao parasito e assim explicar a atividade antiparasitária dos compostos (Barbosa et al., 2023 b).

Contudo, concluímos que os compostos BZX (EH1, EH2, EH3 e EA2) apresentaram atividade antiparasitária *in vitro* contra *T. vaginalis* nas diferentes concentrações testadas. Seu possível mecanismo de ação está relacionado com a capacidade de danificar a membrana dos trofozoítos e interagir com enzimas importantes para sua sobrevivência (PFUR A e B, hidrogenase, málica). Ademais constatamos que os BZX são promissores agentes antioxidantes. Estudos adicionais *in vivo* devem ser realizados como perspectivas futuras.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal de Pelotas, à Universidade Federal de Santa Maria e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Brasil (Código de Financiamento 001) ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Conflito de interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

Referências

- Almeida, M. S., Argôlo, D. S., Almeida Júnior, J. S., Pinheiro, M. S., & Brito, A. M. G. D. (2010). Trichomoniasis: prevalence in the female gender in 2004-2005 in Sergipe State, Brazil. *Ciência & Saúde Coletiva*, 15, 1417-1421. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232010000700052>
- Barbosa, T. N., Silva, M. T. D. O., Sena-Lopes, Â., Kremer, F. S., Sousa, F. S. S., Seixas, F. K., ... & Borsuk, S. (2023). Bioprospection of the trichomonacidal activity of

- lipid extracts derived from marine macroalgae *Gelidium coulteri*. *Plos one*, 18(5),
e0285426. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0285426> **a**
- Barbosa, T. N., de Oliveira Silva, M. T., Sena-Lopes, Â., Kremer, F. S., de Pereira, C.
M. P., Sousa, F. S. S., Seixas, F.K, Collares, T , Borsuk, S. (2023). Antiparasitic activity
of lipid extracts from the subantarctic macroalgae *Irileta cordata* against *Trichomonas*
vaginalis. *Biotechnology Research and Innovation Journal*, 7(1), 1-12.
<http://dx.doi.org/10.4322/biori.00102023> **b**
- Benchimol, M. (2009). Hydrogenosomes under microscopy. *Tissue and Cell*, 41(3),
151-168. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2009.01.001>
- Boiani, M., Boiani, L., Denicola, A., Torres de Ortiz, S., Serna, E., Vera de Bilbao, N.,
Sanabria, L., Yaluff, G., Nakayama, H., Rojas de Arias, A., Vega, C., Rolan, M.,
Gómez-Barrio, A., Cerecetto, H., Gonzalez, M., (2006). 2H-Benzimidazole 1,3-dioxide
derivatives: a new family of water-soluble anti-trypanosomatid agents. *Journal of*
medicinal chemistry, 49(11), 3215-3224. <https://doi.org/10.1021/jm0600343>. April.
- Bonilla-Ramírez, L., Galiano, S., Quiliano, M., Aldana, I., Pabón, A., (2019).
Primaquinequinoxaline1,4-di-N-oxide hybrids with action on the exo-erythrocytic forms
of *Plasmodium* induce their effect by the production of reactive oxygen species.
Malaria Journal, 18(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2825-8>.
- Casari AM, Domingues M, Lourenço DDA et al (2020) 3-[(4-chlorophenyl)sulfonyl]-1-
methyl-1H-indole ameliorates long-lasting depression- and anxiogenic-like behaviors
and cognitive impairment in post-septic mice: Involvement of neuroimmune and
oxidative hallmarks. *Chemico-Biological Interactions*, 331, 109278. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109278>
- Cerecetto, H., Di Maio, R., González, M., Risso, M., Saenz, P., Seoane, G., Denicola,
A., Peluffo, G., Quijano, C., & Olea-Azar, C. (1999). 1,2,5-Oxadiazole N-oxide
derivatives and related compounds as potential antitrypanosomal drugs: structure-
activity relationships. *Journal of medicinal chemistry*, 42(11), 1941–1950.
<https://doi.org/10.1021/jm9805790>
- Cerecetto, H., González, M. (2007). Benzofuroxan and furoxan. *Chemistry and*
biology. Bioactive Heterocycles 4, 265-308. . https://doi.org/10.1007/7081_2007_064

1346 Chand K, Rajeshwari, Hiremathad A, Singh M, Santos MA, Keri RS. A review on
 1347 antioxidant potential of bioactive heterocycle benzofuran: Natural and synthetic
 1348 derivatives. (2017). *Pharmacological Reports*, 69(2), 281-295.
 1349 <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.11.007>

1350 Cheng WH, Huang KY, Huang PJ et al (2015) Nitric oxide maintains cell survival of
 1351 *Trichomonas vaginalis* upon iron depletion. *Parasites & Vectors*, 8, 1-12.
 1352 <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1000-5>

1353 Choi CW, Kim SC, Hwang SS et al (2002) Antioxidant activity and free radical
 1354 scavenging capacity between Korean medicinal plants and favonoids by assay-guided
 1355 comparison. *Plant science*, 163(6), 1161-1168. [https://doi.org/10.1016/S0168-](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00332-1)
 1356 [9452\(02\)00332-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00332-1)

1357 Chugunova, E., Gibadullina, E., Matylitsky, K., Bazarbayev, B., Neganova, M., Volcho,
 1358 K., ... & Alabugin, I. (2023). Diverse Biological Activity of Benzofuroxan/Sterically
 1359 Hindered Phenols Hybrids. *Pharmaceuticals*, 16(4), 499.
 1360 <https://doi.org/10.3390/ph16040499>

1361 Conrad, M. D., Gorman, A. W., Schillinger, J. A., Fiori, P. L., Arroyo, R., Malla, N., ... &
 1362 Carlton, J. M. (2012). Extensive genetic diversity, unique population structure and
 1363 evidence of genetic exchange in the sexually transmitted parasite *Trichomonas*
 1364 *vaginalis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(3), e1573.
 1365 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001573>

1366 Coombs, G. H., Westrop, G. D., Suchan, P., Puzova, G., Hirt, R. P., Embley, T. M., ...
 1367 & Muller, S. (2004). The amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis* contains a
 1368 divergent thioredoxin-linked peroxiredoxin antioxidant system. *Journal of Biological*
 1369 *Chemistry*, 279(7), 5249-5256. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304359200>.

1370 Mottram, J.C., Müller, S., (2004). The amitochondriate eukaryote *Trichomonas*
 1371 *vaginalis* contains a divergent thioredoxin-linked peroxiredoxin antioxidant system.
 1372 *Journal of Biological Chemistry*, 279(7), 5249-5256.
 1373 <https://doi.org/10.1074/jbc.M304359200>

1374 Cuvelier, M. E., Richard, H., & Berset, C. (1992). Comparison of the antioxidative
 1375 activity of some acid-phenols: structure-activity relationship. *Biosci. Biotechnol.*
 1376 *Biochem*, 56(2), 324-325. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.56.324>
 1377 de Giacometi, M., Mayer, J. C. P., de Mello, A. B., Islabão, Y. W., Strothmann, A. L.,
 1378 da Fonseca, R. N., ... & Oliveira, C. B. (2023). Activity of compounds derived from
 1379 benzofuroxan in *Trichomonas vaginalis*. *Experimental Parasitology*, 253, 108601.
 1380 <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2023.108601>
 1381 De Simone RW, K.S. Currie, S.A. Mitchell, J.W. Darrow, D.A. Pippin. (2004).
 1382 Privileged structures: applications in drug discovery, *Combinatorial chemistry & high*
 1383 *throughput screening*, 7(5), 473-493. <https://doi.org/10.2174/1386207043328544>
 1384 Diamond, L.S., (1957). The establishment of various trichomonads of animals and man
 1385 in axenic cultures. *The Journal of parasitology*, 43(4), 488-49.
 1386 <https://doi.org/10.2307/3274682>
 1387 Dos Santos O, De Vargas Rigo G, Frasson AP, Macedo AJ, Tasca T. (2015). Optimal
 1388 reference genes for gene expression normalization in *Trichomonas vaginalis*. *PLoS*
 1389 *One*, 10(9), e0138331. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138331>
 1390 Gelbart, S. M., Thomason, J. L., Osypowski, P. J., Kellett, A. V., James, J. A., &
 1391 Broekhuizen, F. F. (1990). Growth of *Trichomonas vaginalis* in commercial culture
 1392 media. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(5), 962-964.
 1393 <https://doi.org/10.1128/jcm.28.5.962-964.1990>
 1394 Gobec, M., Tomašič, T., Markovič, T., Mlinarič-Raščan, I., Dolenc, M. S., & Jakopin, Ž.
 1395 (2015). Antioxidant and anti-inflammatory properties of 1, 2, 4-oxadiazole analogs of
 1396 resveratrol. *Chemico-Biological Interactions*, 240, 200-207.
 1397 <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.08.018>
 1398 Graves, K. J., Reily, C., Tiwari, H. K., Srinivasasainagendra, V., Secor, W. E., Novak,
 1399 J., & Muzny, C. A. (2023). Identification of *Trichomonas vaginalis* 5-Nitroimidazole
 1400 Resistance Targets. *Pathogens*, 12(5), 692.
 1401 <https://doi.org/10.3390/pathogens12050692>
 1402 Grotto, D., Maria, L. S., Valentini, J., Paniz, C., Schmitt, G., Garcia, S. C., ... & Farina,
 1403 M. (2009). Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological

1404 aspects for malondialdehyde quantification. *Quimica Nova*. 32:169–7.
 1405 <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000100032>

1406 Gutierrez, F.R., Mineo, T.W., Pavanelli, W.R., Guedes, P.M., Silva, J.S.. (2009). The
 1407 effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection.
 1408 *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 236-245. [https://doi.org/10.1590/s0074-](https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000900030)
 1409 [02762009000900030](https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000900030)

1410 Kim, H., Thuong, P. T., Ngoc, T. M., Lee, I., Hung, N. D., & Bae, K. (2009). Antioxidant
 1411 and lipoxygenase inhibitory activity of oligostilbenes from the leaf and stem of *Vitis*
 1412 *amurensis*. *Journal of ethnopharmacology*, 125(2), 304-309.
 1413 <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.06.019>

1414 Hernández, H.M., Marcet, R., Sarracent, J. (2014). Biological roles of cysteine
 1415 proteinases in the pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. *Parasite* 21, 2–10.
 1416 <https://doi.org/10.1051/parasite/2014054>.

1417 Hrdy, I., Hirt, R. P., Dolezal, P., Bardonová, L., Foster, P. G., Tachezy, J., & Martin
 1418 Embley, T (2004). *Trichomonas* hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase
 1419 module of mitochondrial complex I. *Nature*, 432(7017), 618-622.
 1420 <https://doi.org/10.1038/nature03149>

1421 Jorge, S.D., Masunari, A., Rangel-Yagui, C.O., Pasqualoto, K.F., Tavares, L.C. (2009).
 1422 Design, synthesis, antimicrobial activity and molecular modeling studies of novel
 1423 benzofuroxan derivatives against *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic & medicinal*
 1424 *chemistry*, 17(8), 3028-3036. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.03.011>. Apr.

1425 Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of methods to determine
 1426 antioxidant capacities. *Food analytical methods*, 2, 41-60. .
 1427 <https://doi.org/10.1007/s12161-008-9067-7>

1428 Karatas, F., Koca, M., Kara, H., & Servi, S. (2006). Synthesis and oxidant properties
 1429 of novel (5-bromobenzofuran-2-yl)(3-methyl-3-mesitylcyclobutyl)
 1430 ketonethiosemicarbazone. *European journal of medicinal chemistry*, 41(5), 664-669.
 1431 <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.01.003>

1432 Katerji, M., Filippova, M., & Duerksen-Hughes, P. (2019). Approaches and methods to
 1433 measure oxidative stress in clinical samples: Research applications in the cancer field.
 1434 *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/1279250>

1435 Khanam, H. (2015). Bioactive Benzofuran derivatives: A review. *European journal of*
 1436 *medicinal chemistry*, 97, 483-504.;97:483-504. doi:10.1016/j.ejmech.2014.11.039

1437 Lee, C. Y., Sharma, A., Uzarski, R. L., Cheong, J. E., Xu, H., Held, R. A., ... & Nelson,
 1438 J. L. (2011). Potent antioxidant dendrimers lacking pro-oxidant activity. *Free Radical*
 1439 *Biology and Medicine*, 50(8), 918-925.
 1440 <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.10.699>

1441 Lee, K. J., Oh, Y. C., Cho, W. K., & Ma, J. Y. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory
 1442 activity determination of one hundred kinds of pure chemical compounds using offline
 1443 and online screening HPLC assay. *Evidence-Based Complementary and Alternative*
 1444 *Medicine*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/165457>

1445 Lee, C. Y., Nanah, C. N., Held, R. A., Clark, A. R., Huynh, U. G., Maraskine, M. C., ...
 1446 & Sharma, A. (2015). Effect of electron donating groups on polyphenol-based
 1447 antioxidant dendrimers. *Biochimie*, 111, 125-134.
 1448 <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.02.001>

1449 Leitsch, D. (2021). Recent advances in the molecular biology of the protist parasite
 1450 *Trichomonas vaginalis*. *Faculty Reviews*, 10. <https://doi.org/10.12703%2Ffr%2F10-26>

1451 Lima, M.C.L.; Cabral, L.M.S.; Silva, S.R.C., Cipriano, A.A.S.; Santos, J.T.C.; Andrade,
 1452 A.L.; Andrade, M.S.(2019). O perfil epidemiológico das mulheres com *Trichomonas*
 1453 *vaginalis* assistidas na atenção primária. *Revista Enfermagem Digital Cuidado e*
 1454 *Promoção da Saúde*, 4 (1), 8-13.

1455 Mallo, N., Lamas, J., & Leiro, J. M. (2013). Hydrogenosome metabolism is the key
 1456 target for antiparasitic activity of resveratrol against *Trichomonas vaginalis*.
 1457 *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(6), 2476-2484.
 1458 <https://doi.org/10.1128/aac.00009-13>

1459 Meyer, Y., Buchanan, B. B., Vignols, F., & Reichheld, J. P. (2009). Thioredoxins and
 1460 glutaredoxins: unifying elements in redox biology. *Annual review of genetics*, 43, 335-
 1461 367.. <https://doi.org/10.1146/annur-ev-genet-102108-134201>

- 1462 McGrath, N. A., Brichacek, M., & Njardarson, J. T. (2010). A graphical journey of
1463 innovative organic architectures that have improved our lives. *Journal of chemical*
1464 *education*, 87(12), 1348-1349. <https://doi.org/10.1021/ed1003806>
- 1465 Mead, J. R., Fernadez, M., Romagnoli, P. A., & Secor, W. E. (2006). Use of
1466 *Trichomonas vaginalis* clinical isolates to evaluate correlation of gene expression and
1467 metronidazole resistance. *Journal of Parasitology*, 92(1), 196-
1468 199. <https://doi.org/10.1645/GE-616R.1> PMID: 16629339
- 1469 Morais, S. M. D., Cavalcanti, E. S., Costa, S. M. O., Aguiar, L. A. (2009). Ação
1470 antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Revista Brasileira*
1471 *de Farmacognosia*, 19, 315-320. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000200023>
- 1472 Mtshali A, Ngcapu S, Govender K, Sturm AW, Moodley P, Joubert BC (2022). In Vitro
1473 Effect of 5-Nitroimidazole Drugs against *Trichomonas vaginalis* Clinical Isolates.
1474 *Microbiology Spectrum*, 10(4), 912-922. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00912-22>
- 1475 National Center for Health Statistics (2021). Centers for Disease Control and
1476 Prevention. Available at: [https://www.cdc.gov/std/statistics/prevalence-2020-at-](https://www.cdc.gov/std/statistics/prevalence-2020-at-a-glance.htm)
1477 [aglance.htm](https://www.cdc.gov/std/statistics/prevalence-2020-at-a-glance.htm) [Accessed 25.10.2023]
- 1478 Nazarbajhat, N., Ariffin, A., Abdullah, Z., Abdulla, M. A., Shia, J. K. S., & Leong, K. H.
1479 (2016). Synthesis, characterization, drug-likeness properties and determination of the
1480 in vitro antioxidant and cytotoxic activities of new 1, 3, 4-oxadiazole
1481 derivatives. *Medicinal Chemistry Research*, 25, 2015-2029.
1482 <https://doi.org/10.1007/s00044-016-1660-5>
- 1483 Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues
1484 by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351-358.
1485 [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- 1486 Olea-Azar, C., Rigol, C., Mendizábal, F., Briones, R., Cerecetto, H., Di Maio, R., ... &
1487 Porcal, W. (2003). Electrochemical and microsomal production of free radicals from 1,
1488 2, 5-oxadiazole N-oxide as potential antiprotozoal drugs. *Spectrochimica Acta Part A:*
1489 *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 59(1), 69-74.
1490 [https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(02\)00141-5](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(02)00141-5)

1491 Persichini, T., Colasanti, M., Fraziano, M., Colizzi, V., Medana, C., Polticelli, F., ... &
 1492 Ascenzi, P. (1999). Nitric oxide inhibits the HIV-1 reverse transcriptase
 1493 activity. *Biochemical and biophysical research communications*, 258(3), 624-627.
 1494 <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0581>

1495 Petry, L.D.S, Mayer, J. C. P., de Giacommeti, M., de Oliveira, D. T., Garzon, L. R.,
 1496 Engelmann, A. M., ... & Monteiro, S. G. (2021). In vitro and in vivo trypanocidal activity
 1497 of a benzofuroxan derivative against *Trypanosoma cruzi*. *Experimental*
 1498 *Parasitology*, 226, 108-125. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2021.108125>

1499 Praticò, D., & Delanty, N. (2000). Oxidative injury in diseases of the central nervous
 1500 system: focus on Alzheimer's disease. *The American journal of medicine*, 109(7), 577-
 1501 585. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(00\)00547-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(00)00547-7)

1502 Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination
 1503 of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of*
 1504 *agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>

1505 Rada, P., Kellerová, P., Verner, Z., & Tachezy, J. (2019). Investigation of the secretory
 1506 pathway in *Trichomonas vaginalis* argues against a moonlighting function of
 1507 hydrogenosomal enzymes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(6), 899-910.
 1508 <https://doi.org/10.1111/jeu.12741>

1509 Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999).
 1510 Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization
 1511 assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
 1512 [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

1513 Rey L. Bases da parasitologia médica. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;
 1514 2002.

1515 Robinson, S. C. (1962). Trichomonal vaginitis resistant to metranidazole. *Canadian*
 1516 *Medical Association Journal*, 86(14), 665.

1517 Rowley, J., Vander Hoorn, S., Korenromp, E., Low, N., Unemo, M., Abu-Raddad, L.J.,
 1518 Chico, R.M., Smolak, A., Newman, L., Gottlieb, S., Thwin, S.S., Broutet, N., Taylor,
 1519 M.M., (2019). Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence

1520 and incidence estimates, 2016. *Bulletin of the World Health Organization*, 97(8), 548.
 1521 <https://doi.org/10.2471/BLT.18.228486>. Aug.

1522 Rupapra, M., Chauhan, M., Sangani, C. B., Afzal, M., Alarifi, A., Christy, M., &
 1523 Kapadiya, K. (2023). Synthesis of Oxadiazole-Thiadiazole Fluorochromane Hybrids
 1524 and Their Antioxidant Activity. *Journal of Fluorine Chemistry*, 110171.
 1525 <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2023.110171>

1526 Sartini, S., Cosconati, S., Marinelli, L., Barresi, E., Di Maro, S., Simorini, F., ... & La
 1527 Motta, C. (2012). Benzofuroxane derivatives as multi-effective agents for the treatment
 1528 of cardiovascular diabetic complications. Synthesis, functional evaluation, and
 1529 molecular modeling studies. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(23), 10523-10531.
 1530 <https://doi.org/10.1021/jm301124s>

1531 Sena-Lopes, ^A., das Neves, R.N., Bezerra, F.S.B., de Oliveira Silva, M.T., Nobre,
 1532 P.C., Perin, G., Alves, D., Savegnago, L., Begnini, K.R., Seixas, F.K., Collares, T.,
 1533 Borsuk, S. (2017). Antiparasitic activity of 1,3-dioxolanes containing tellurium in
 1534 *Trichomonas vaginalis*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 89, 284–287.
 1535 <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.173>.

1536 Severina, I.S., Axenova, L.N., Veselovsky, A.V., Pyatakova, N.V., Buneeva, O.A.,
 1537 Ivanov, A.S., Medvedev, A.E. (2003). Nonselective inhibition of monoamine oxidases
 1538 A and B by activators of soluble guanylate cyclase. *Biochemistry (Mosc.)* 68, 1048–
 1539 1054. <https://doi.org/10.1023/a:1026029000085>.

1540 Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T (2005)
 1541 Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions.
 1542 *Mutation Research/Fundamental and Molecular mechanisms of mutagenesis*, 579(1-
 1543 2), 200-213. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.03.023>

1544 Stratil, P., Klejdus, B., & Kubáň, V. (2006). Determination of total content of phenolic
 1545 compounds and their antioxidant activity in vegetables evaluation of
 1546 spectrophotometric methods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(3), 607-
 1547 616. <https://doi.org/10.1021/jf052334j>

1548 Tachezy, J., Makki, A., & Hrdý, I. (2022). The hydrogenosome of *Trichomonas*
 1549 *vaginalis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 69(6), e12922.
 1550 <https://doi.org/10.1111/jeu.12922>

1551 Thévenin M, S. Thoret, P. Grellier, J. Dubois, Synthesis of polysubstituted benzofuran
 1552 derivatives as novel inhibitors of parasitic growth, *Bioorg. Bioorganic & medicinal*
 1553 *chemistry*, 21(17), 4885-4892. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.07.002>

1554 Torrone, E. A., Lewis, F. M. T., Kirkcaldy, R. D., Bernstein, K. T., Ryerson, A. B., de
 1555 Voux, A., Oliver, S. E., Quilter, L. A. S., & Weinstock, H. S. (2021). Genital
 1556 mycoplasma, shigellosis, zika, pubic lice, and other sexually transmitted infections:
 1557 Neither gone nor forgotten. *Sexually Transmitted Diseases*, 48 (4), 310–314.
 1558 <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000001367>

1559 Van Gerwen, O. T., & Muzny, C. A. (2019). Recent advances in the epidemiology,
 1560 diagnosis, and management of *Trichomonas vaginalis* infection. *F1000Research*, 8.
 1561 <https://doi.org/10.12688%2Ff1000research.19972.1>

1562 Van Gerwen, O. T., Camino, A. F., Bourla, L. N., Legendre, D., & Muzny, C. A. (2021).
 1563 Management of trichomoniasis in the setting of 5-nitroimidazole
 1564 hypersensitivity. *Sexually transmitted diseases*, 48(8), e111.
 1565 <https://doi.org/10.1097%2FOLQ.0000000000001326>

1566 Zarranz, B., Jaso, A., Lima, L. M., Aldana, I., Monge, A., Maurel, S., & Sauvain, M.
 1567 (2006). Antiplasmodial activity of 3-trifluoromethyl-2-carbonylquinoxaline di-N-oxide
 1568 derivatives. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42, 357-361..
 1569 <https://doi.org/10.1590/S1516-93322006000300005>. Sep.

1570

1571

1572

1573

1574 Tabela 1. Descrição do composto e sua nomenclatura química, de acordo com a
 1575 IUPAC.

Composto	Descrição
----------	-----------

EA2	5-((5-(4-metoxifenil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)carbamoil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol-N-óxido
EH1	N-Óxido de 6-(2-(3-(4-fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-carbonil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol
EH2	N-Óxido de 6-(2-(3-(4-metoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-5-carbonil)hidrazina-1-carbonil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol
EH3	N-Óxido de 6-(2-(3-(4-clorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-carbonil)hidrazina-1-carbonil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol

1576
1577
1578
1579
1580
1581
1582
1583

Tabela 2. Determinação da viabilidade e IC₅₀ para a atividade antiparasitária de EH1, EH2, EH3 e EA2. Controle negativo (trofozoítos não tratados), controle positivo (MTZ-100 µM), controle DMSO (veículo de solubilização 0,6%). Os resultados são expressos por meio da média e desvio padrão. Todas as análises apresentaram P < 0.05 to MTZ.

VIABILIDADE		MÉDIA % (±DP)			
COMPOSTOS	25 µM	55 µM	75 µM	100 µM	IC ₅₀ (µM)
EH1	52(±11.8) ^{ab}	28.66 (±7.7) ^{abc}	0 (± 0) ^{bc}	0 (±0) ^{bc}	28.71
EH2	12 (±4.2) ^{ab}	0 (±0) ^b	0 (±0) ^b	0 (±0) ^b	11.33
EH3	5.7 (±1.4) ^{ab}	0 (±0) ^b	0 (±0) ^b	0 (±0) ^b	6.83

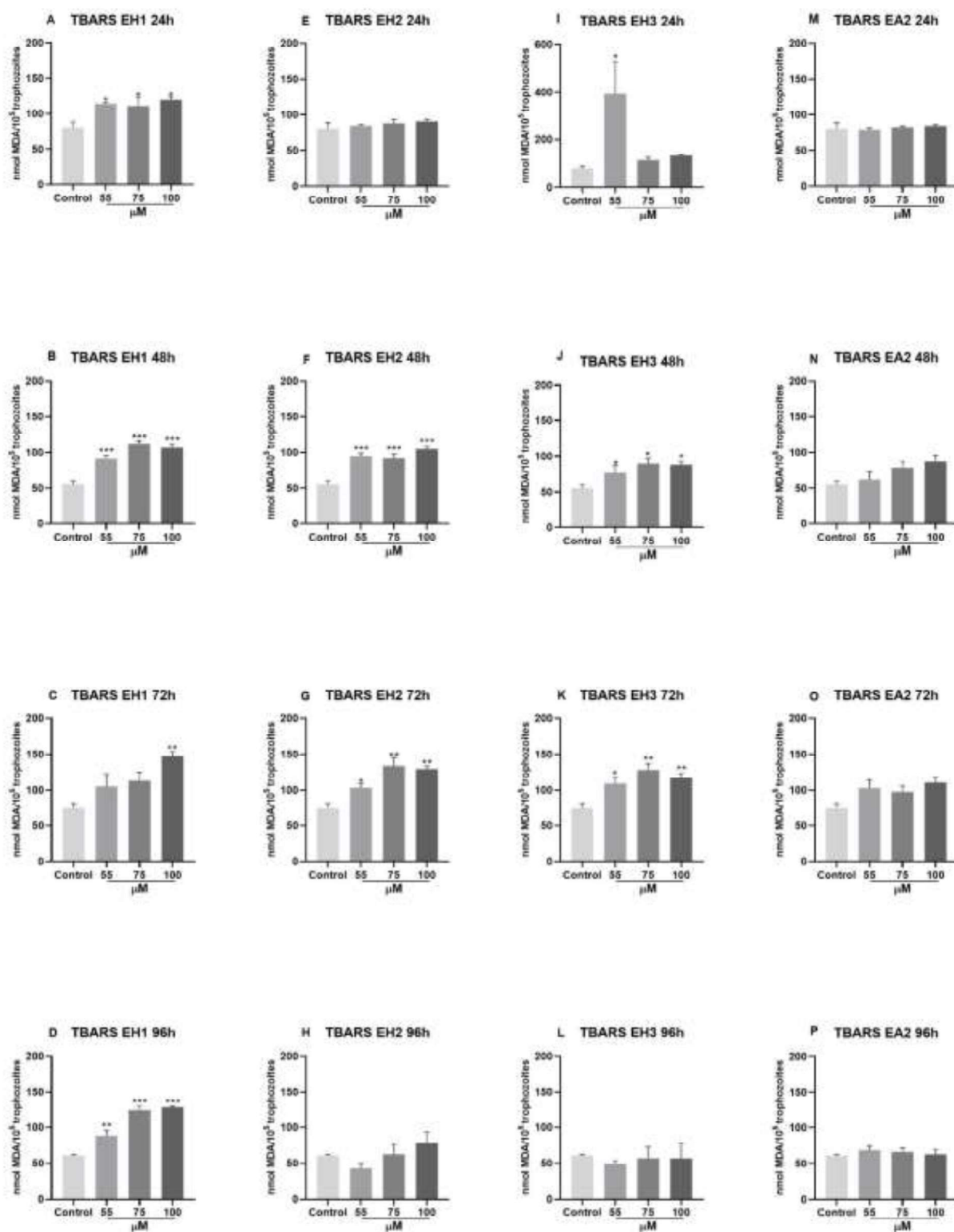
EA2	21.91 (±10.3) ^{ab}	11.33 (±1.9)	4.38 (±2.4) b	1.26 (±0.81) ^b	12.09
CONTROLES	Mean % (±SD)				
NEGATIVO	100 (±0)				
DMSO	100 (±0)				
POSITIVO	0 (±0)				

1584 ^a Indica diferença estatística (P< 0.005) em comparação com o controle positivo (MTZ)

1585 ^{b,c}. Indica diferenças estatísticas (P< 0.005) entre os tratamentos

1586

1587 Figura 1: Ensaio TBARS. Determinação da peroxidação lipídica dos compostos EH1
1588 (A,B,C,D), EH2 (E,F,G,H), EH3 (I,J,K,L) e EA2(M,N,O,P) nas concentrações de 55µM,
1589 75 µM e 100 µM em diferentes tempos (24h, 48h,72h, 96h) de incubação com
1590 trofozoítos de *T. vaginalis*. Todas as análises apresentaram P <0.005 em comparação
1591 com o controle (trofozoítos não tratados).

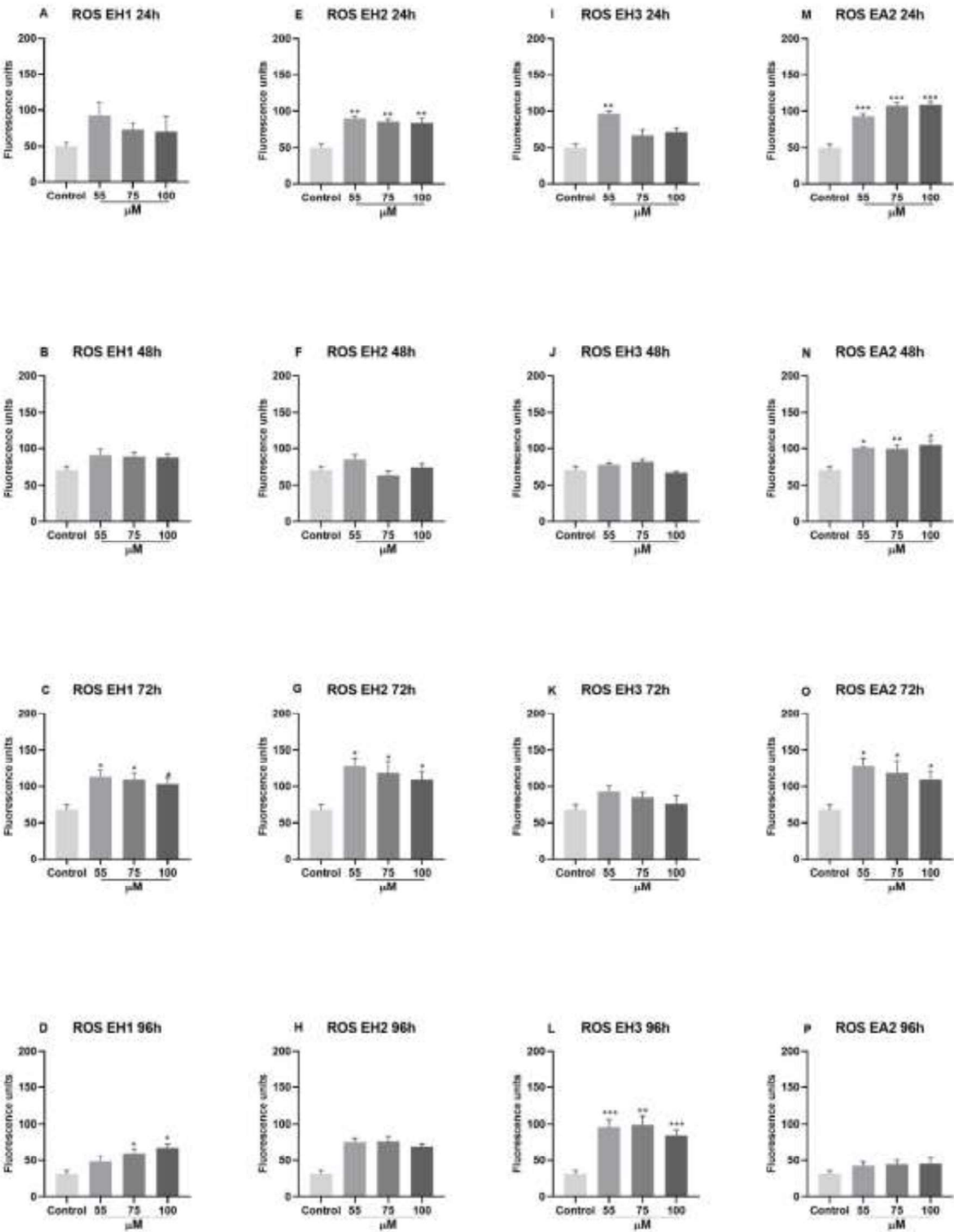


1592

1593 *Indicam a diferença estatística em comparação com o controle (P<0.005).

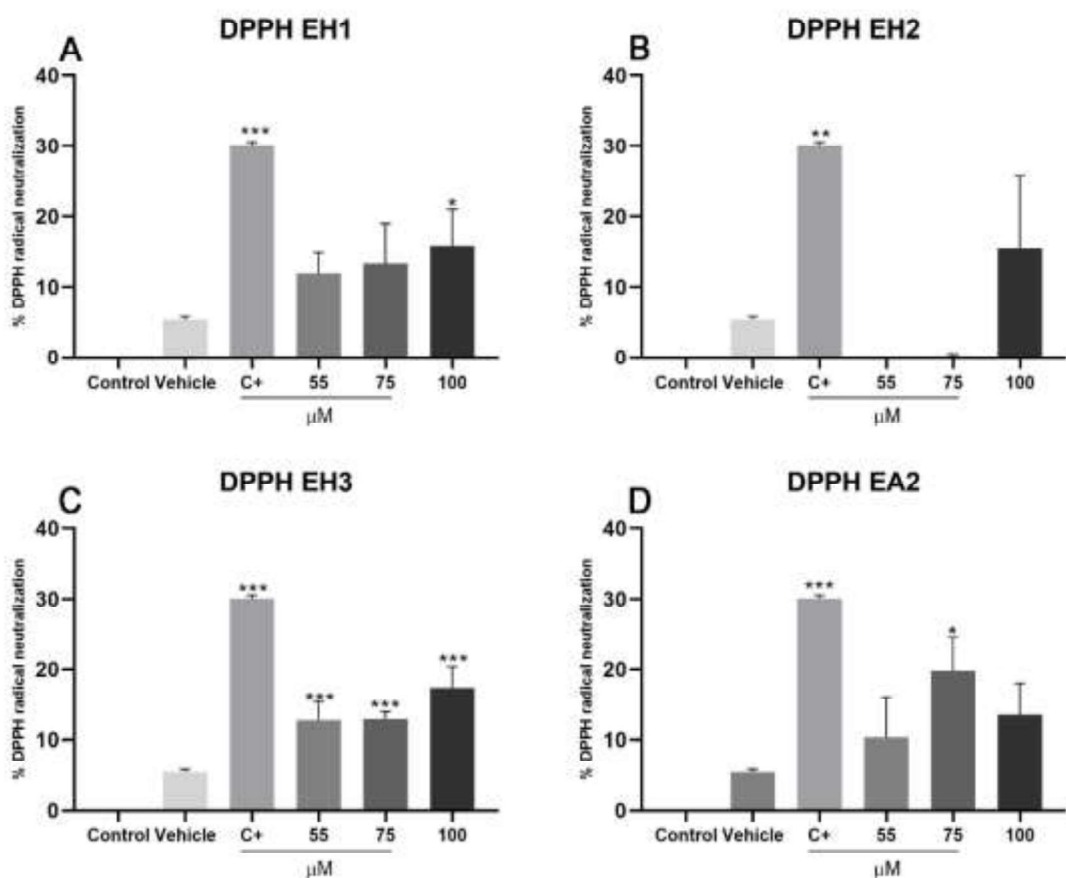
1594

1619 Figura 3. Ensaio de ROS. Determinação de espécies reativas ao oxigênio dos
 1620 compostos EH1 (A, B,C,D), EH2 (E,F,G,H), EH3 (I,J,K,L) e EA2(M,N,O,P) nas
 1621 concentrações de 55µM, 75 µM e 100 µM em diferentes tempos (24h, 48h,72h, 96h)
 1622 de incubação com trofozoítos de *T. vaginalis*. Todas as análises apresentaram P
 1623 <0.005 em comparação com o controle (trofozoítos não tratados).



*Indicam a diferença estatística em comparação com o controle ($P < 0.005$).

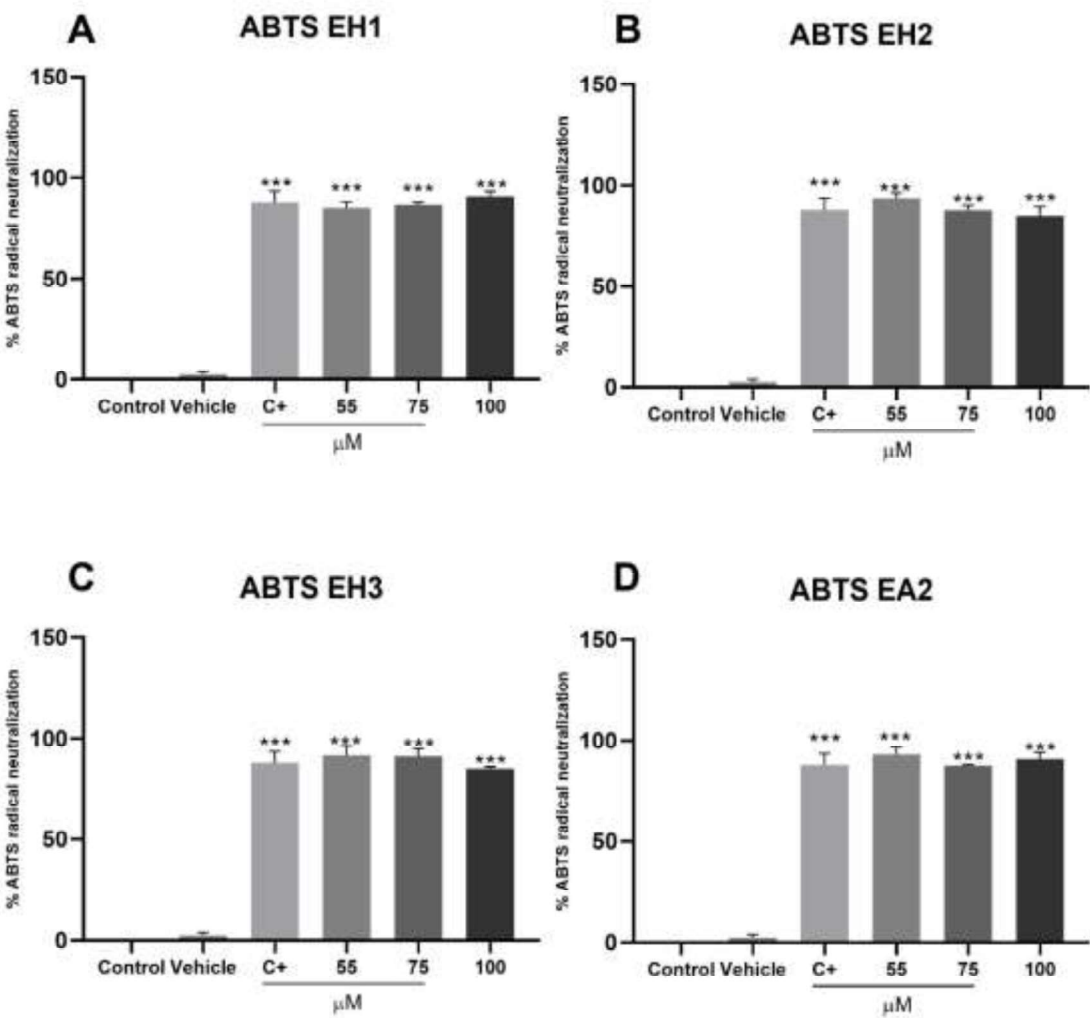
Figura 4. Ensaio DPPH. Determinação da atividade antioxidante através da neutralização do radical DPPH nos compostos EH1 (A), EH2 (B), EH3 (C) e EA2 (D) nas concentrações de 55 μM , 75 μM , 100 μM . Controle positivo (C+ : 10 μM ácido ascórbico), Control (radical DPPH), Vehicle (0.6% DMSO). Todas as análises



apresentam valor de $P < 0.005$ em comparação com o C+.

*Indica diferença estatística em comparação com o C+ ($P < 0.005$).

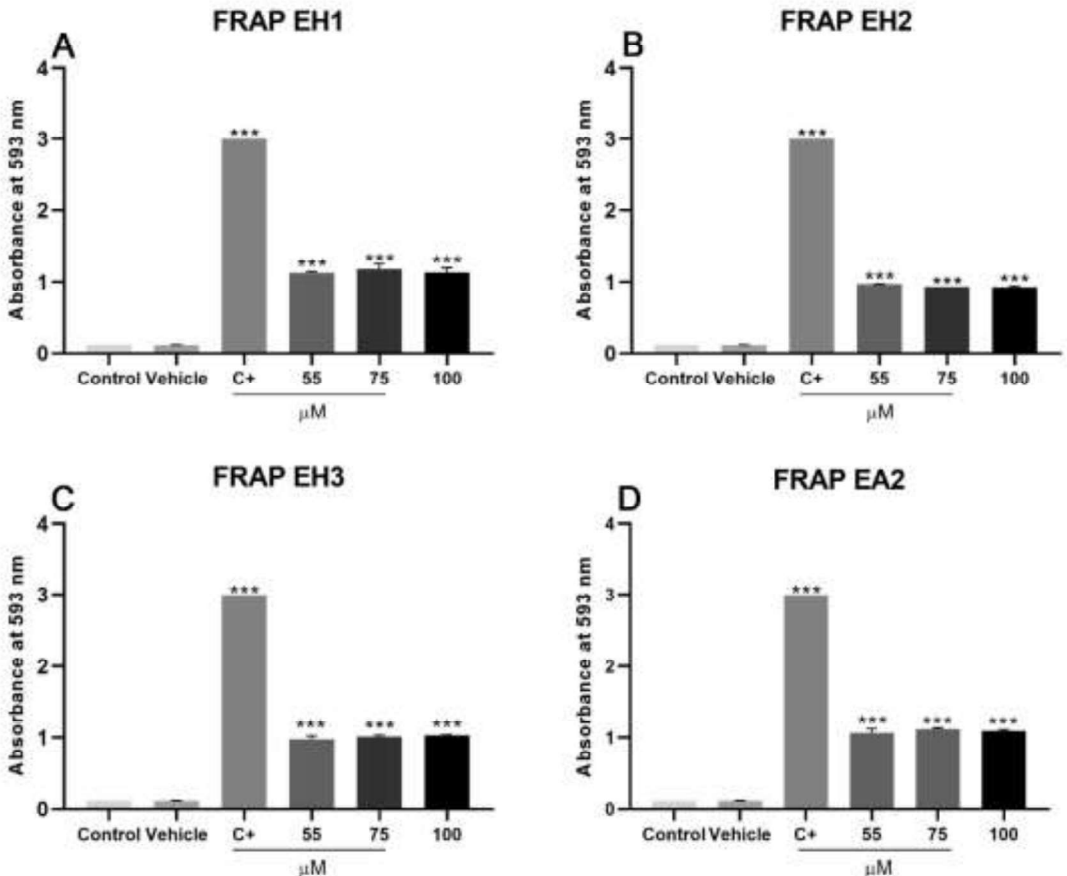
1638 Figura 5. Ensaio ABTS. Determinação da atividade antioxidante através da
 1639 neutralização do radical ABTS nos compostos EH1 (A), EH2 (B), EH3 (C) e EA2 (D)
 1640 nas concentrações de 55 μ M, 75 μ M, 100 μ M. Controle positivo (C+: 10 μ M ácido
 1641 ascórbico), Control (radical ABTS), Vehicle (0.6% DMSO). Todas as análises
 1642 apresentam valor de $P < 0.005$ em comparação com C+.



1643
 1644 *Indica diferença estatística em comparação com o C+ ($P < 0.005$).
 1645

1646
 1647
 1648
 1649

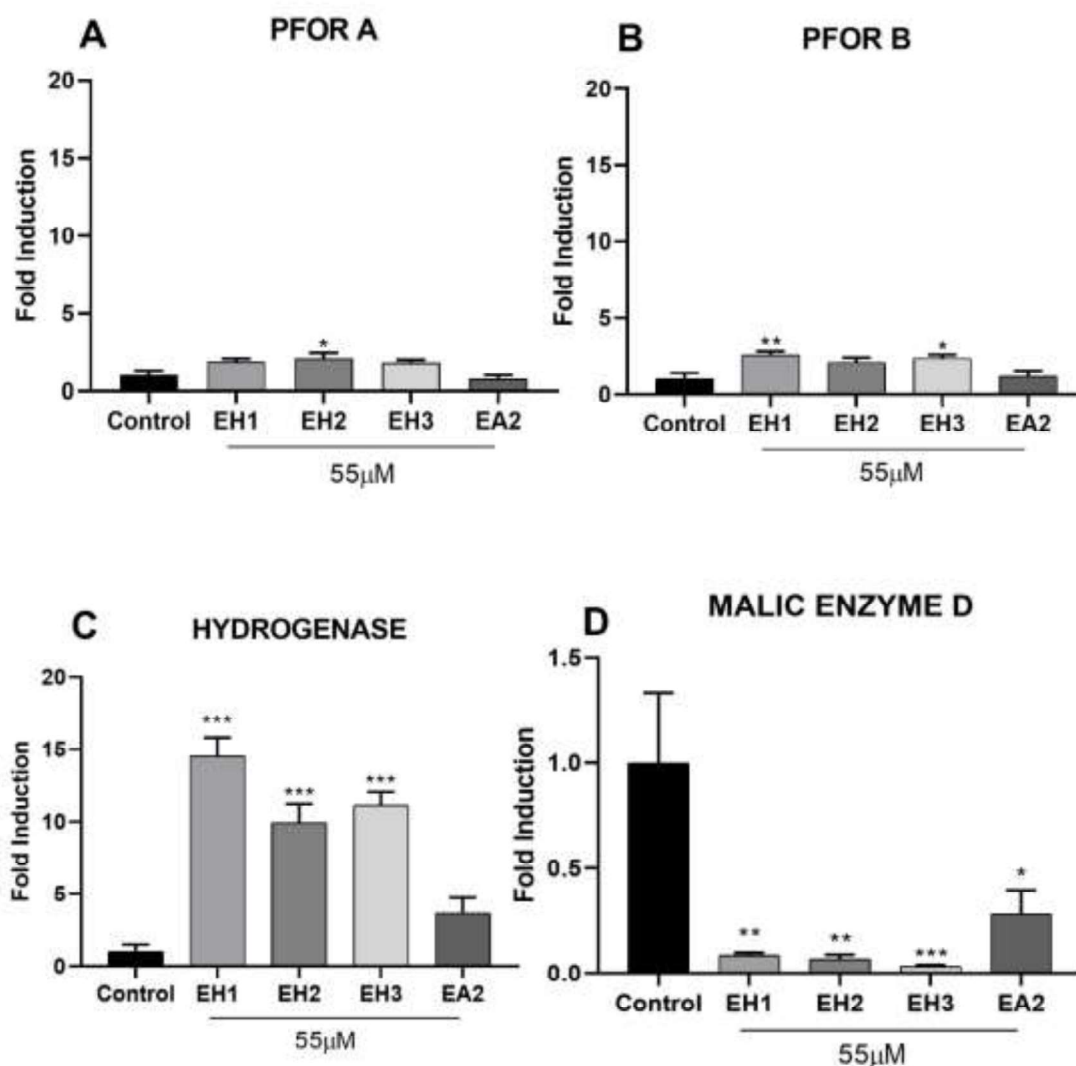
Figura 6. Ensaio FRAP. Determinação da atividade antioxidante através da neutralização do radical ABTS nos compostos EH1 (A), EH2 (B), EH3 (C) e EA2 (D) nas concentrações de 55 μ M, 75 μ M, 100 μ M. Controle positivo (C+: 10 μ M ácido ascórbico), Controle (solução de FRAP), controle veículo (0.6% DMSO). Todas as



análises apresentam valor de $P < 0.005$ em comparação com C+.

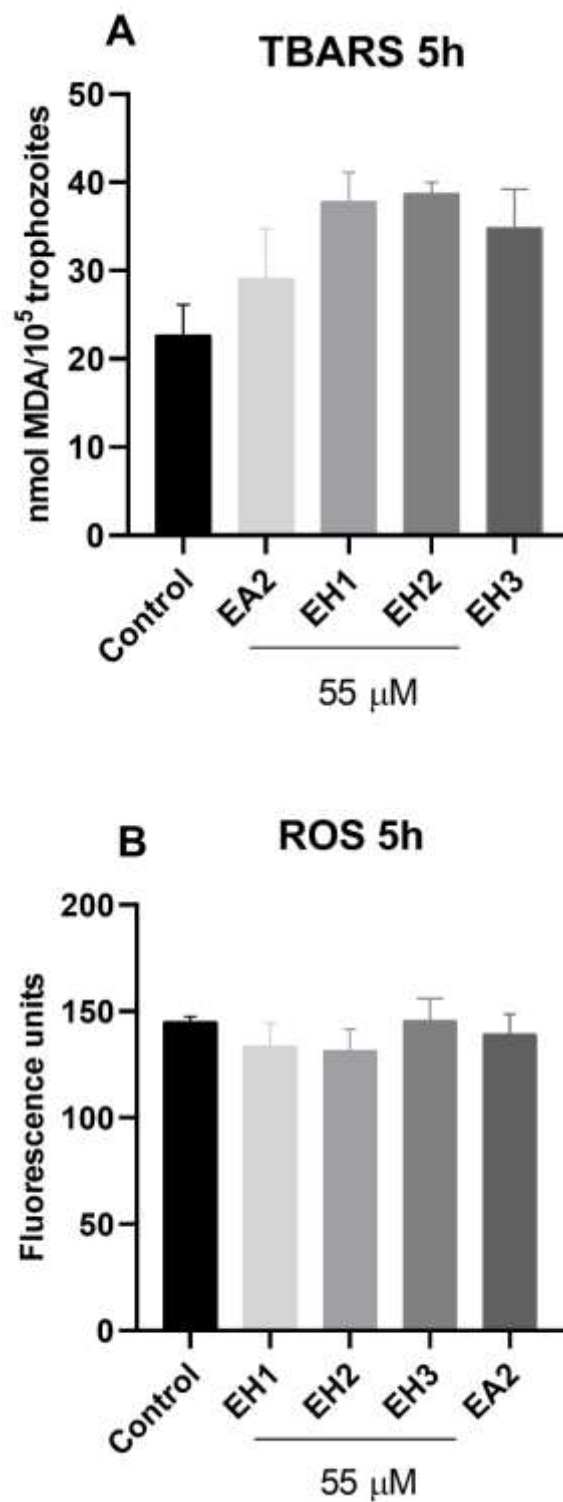
*Indica diferença estatística em comparação com o C+ ($P < 0.005$).

Figura 7. Perfil de expressão gênica de *T. vaginalis* após tratamento com os compostos EH1, EH2, EH3 e EA2 na concentração de 55 μ M em 5 horas de tratamento, A expressão gênica foi determinada por qRT-PCR. Os dados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos independentes. Controle (controle negativo – trofozoítos não tratados). Todas as análises apresentaram valor de $P < 0.005$ em comparação com o controle.



*Indicam diferença estatística com o controle ($P < 0.005$).

Figura 2: Ensaio de TBARS (A) e ROS (B) para determinação da peroxidação lipídica e geração de espécies de oxigênio dos compostos EH1, EH2, EH3 e EA2 nas concentrações de 55μM em 5 horas de incubação com trofozoítos de *T. vaginalis*. Todas as análises apresentaram P <0.005 em comparação com o controle (trofozoítos não tratados).



1674 **5 Manuscrito 3**

1675
1676 Manuscrito redigido nas normas da revista "British poultry science"

1677
1678 **Avian Trichomonosis: An Innovative Approach in Drug Redirection with**
1679 **Ciprofloxacin, Norfloxacin, and Nitrofurantoin**

1680 Marjorie de Giacometi^a, Yan Wahast Islabão^a, Alexia Brauner de Mello^a; Filipe Obelar
1681 Martins^a, Camila Belmonte Oliveira^{a*}

1682
1683 ^a Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal de Pelotas, RS,
1684 Brazil

1685
1686 **Abstract**

1687 *Trichomonas gallinae* is the protozoan responsible for avian trichomonosis, a disease
1688 that affects the upper digestive tract of infected birds, causing various proliferative
1689 lesions. The only class recommended for treatment is the 5-nitroimidazoles, among
1690 which metronidazole is widely used. However, resistance to this class has already
1691 been reported, and for this reason, new treatment alternatives are essential in
1692 veterinary clinical practice. Ciprofloxacin (CP) and norfloxacin (NOR) are
1693 fluoroquinolones, and nitrofurantoin (NF) is a nitrofuran; both antibiotics have a broad
1694 spectrum and are effective in treating various bacterial and parasitic diseases. This
1695 study evaluated the in vitro antiparasitic activity of these antibiotics on *T. gallinae*
1696 trophozoites and determined the mean inhibitory concentration (IC₅₀), minimum
1697 inhibitory concentration (MIC), and mortality curve. All antibiotics were tested at
1698 different concentrations: 5 mg/mL to 0.1 mg/mL (CP); 10 mg/mL to 0.25 mg/mL (NOR);
1699 and 5 mg/mL to 0.03 mg/mL (NF). The highest efficacy was observed at the highest
1700 concentrations (5 mg/mL-CP and NF; 10 mg/mL-NOR) within 24 hours, with inhibition
1701 of approximately 100% of trophozoites. NF and NOR had the lowest MICs at 1 mg/mL
1702 (NF) and 2 mg/mL (NOR), while CP was 3 mg/mL. The activity of antibiotics against *T.*

gallinae began in the first hour of incubation, with over 98% inhibition for NOR compared to approximately 65% for CP and NF. After 12 hours, inhibition of >95% was observed, reaching 100% in 48 hours for all antibiotics. These results demonstrate that CP, NOR, and NF are promising antibiotics for the in vitro treatment of avian trichomonosis.

Keywords: *Trichomonas gallinae*, Flagellated Protozoan, Antibiotics, Fluoroquinolone, Poultry.

Introduction

Trichomonas gallinae is a flagellated protozoan responsible for causing avian trichomonosis. This parasite has been described for almost 15 decades and primarily affects the upper digestive tract of birds (Rivolta, 1878). The main hosts belong to the orders Columbiformes and Falconiformes. The rock pigeon (*Columba livia*) is the most significant host in the spread of the disease and is considered the primary reservoir, as many animals can test positive for trichomonosis without showing clinical signs. (Forrester, Foster, 2008; Robinson et al., 2010; Amin et al., 2014). In general, trichomonosis shows a broad distribution and has been reported in several countries (Bruni et al., 2019; Saikia et al., 2021; Hochleithner, Hochleithner 2021; Ebrahimi Ahmadabad et al., 2023; Arfin et al., 2024).

Transmission occurs through host-to-host contact, but it can also be transmitted through feeders, waterers, and fomites (Amin et al., 2014; Bruni et al., 2019). *T. gallinae* exhibits a direct life cycle, and its multiplication occurs through the binary fission of trophozoites. The severity of the disease depends on various factors, such as the host's immunity and the pathogenicity of the strain (Amin et al., 2014; Zadravec et al., 2017). The most severe clinical signs are associated with the presence of oral lesions that progress and form caseous masses/abscesses. These lesions can obstruct the esophageal and/or tracheal lumen, leading to bird mortality due to starvation and/or suffocation (Ji et al., 2020; Brunthaler et al., 2022).

The treatment for this infection is carried out with drugs from the class of 5-nitroimidazoles, including metronidazole (MTZ), dimetridazole, secnidazole, and tinidazole (Munhoz et al., 1998; Inghelbrech et al., 1996, Biswas et al., 2010; Abd-El-Motelib, Galal, 1993), with MTZ being widely used in clinical practice. The extensive use and prolonged exposure time can lead to treatment failures. Furthermore, there

are reports of drug resistance in strains of *T. gallinae* (Rouffaer et al., 2014; Tabari et al., 2021). In this context, the search for new treatment alternatives becomes necessary, and drug repositioning may be an option.

Drug repurposing is an emerging strategy to accelerate the validation of new therapies by using existing drugs to treat new diseases, aiming to reduce costs and expedite the development of new medications. (Ashburn; Thor, 2004; Chong; Sullivan, 2007). Among the drugs with this potential are quinolones, which are synthetic derivatives with antibacterial activity, widely used in human and animal healthcare. (Alós, 2003). Fluoroquinolones are used in the treatment of various infections, and among the drugs in this class, ciprofloxacin (CP) and norfloxacin (NOR) are widely recommended. The experimental use of CP has already been reported in *Giardia lamblia* (Sousa; Poiares-da-Silva, 2001), *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* (Dubar et al., 2011) as well as *Trichomonas vaginalis* (Inceboz, Inceboz e Ozturk 2004). NOR is reported in *Ascaridia galli* (Lat,Thein 2001) and *Plasmodium falciparum* (Pradines et al., 2001). Nitrofurantoin (NT) is an antibiotic that was derived from a furan along with a nitro group; additionally, it contains a hydantoin substitute (Squadrito; Del Portal, 2023). Its use is recommended for uncomplicated lower urinary tract bacterial infections in humans; however, it has experimentally shown efficacy against various protozoa, including *T. vaginalis*. (Buchner e Edwards, 1975), *T. gondii* (Abdallah et al., 2022), *Trypanosoma congolense* (Suganuma et al., 2022).

Considering the limitations arising from therapeutic failures and the emergence of resistant strains, it becomes necessary to explore new alternatives in the treatment of avian trichomonosis. The objective of this study was to evaluate the in vitro activity of the antibiotics Ciprofloxacin, Norfloxacin, and Nitrofurantoin against a clinical isolate of *T. gallinae*.

Material and Methods

Acquisition of antibiotics

The antibiotics used were Ciprofloxacin (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brazil); Norfloxacin (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brazil); and Nitrofurantoin and MTZ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), all commercially acquired.

Culture of *Trichomonas gallinae*

The clinical isolate of *T. gallinae* used in this study originated from a naturally infected native pigeon (*Columba livia*) (Baccega et al., 2019). The protozoan cultures were maintained axenically in tryptone/yeast extract/maltose (TYM) culture medium without agar (pH 7.4), supplemented with 5 mg/mL of antibiotic (streptomycin) and 10% sterile inactivated fetal bovine serum (56°C for 30 min) (SBS). The tubes were incubated at 37°C under aerobic conditions (Diamond 1957). To assess motility and morphology, cultures were monitored over seven consecutive days using an optical microscope (100x and 400x). Every 48 hours, trophozoites showing more than 95% mobility and normal morphology were resuspended (Seddiek et al., 2014). Additionally, a trypan blue exclusion assay was performed using 0.4% trypan blue to ensure a minimum viability of 95% and that the logarithmic growth phase was achieved in the in vitro test (Sena-Lopes et al., 2017).

In vitro* assay against *T. gallinae

The assay was conducted using 96-well microagglutination plates. In each well, 150 µl of *T. gallinae* culture (initial density of 2×10^6 trophozoites/mL) in TYM medium was added and incubated with 50 µl of the solution containing each antibiotic separately. The positive control was prepared with an MTZ dilution at a concentration of 17 mg/mL. (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). The determination of this concentration for control was due to previous assays. The negative control contained only trophozoites in TYM medium, while the diluent control was prepared with 0.6% DMSO. For the determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and 50% inhibitory concentration (IC₅₀), the antibiotics were diluted at randomly selected concentrations, namely: Ciprofloxacin - 5 mg/mL, 3 mg/mL, 1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.3 mg/mL, and 0.1 mg/mL. Norfloxacin - 10 mg/mL, 5 mg/mL, 3 mg/mL, 2 mg/mL, 0.5 mg/mL, and 0.25 mg/mL. Nitrofurantoin - 5 mg/mL, 3 mg/mL, 1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.07 mg/mL, and 0.03 mg/mL. Additionally, the MTZ MIC test was conducted, where the drug was diluted at concentrations of 17 mg/mL, 15 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2 mg/mL, and 1 mg/mL. Subsequently, the plates were incubated at 37°C under anaerobic conditions with 5% CO₂ for 24 hours. Afterward, readings were taken using an optical microscope (400x) to assess the motility, viability, and morphology of trophozoites after treatment with antibiotics. Trophozoite counting was performed in a mirrored Neubauer chamber, using an aliquot (1:1, v/v) containing trophozoites and

0.4% trypan blue. The tests were conducted in three independent repetitions, each performed in triplicate, presenting the results as percentages of trophozoite viability compared to the negative control (Sena-Lopes et al., 2017).

Confirmation of Minimum Inhibitory Concentration and Kinetic Curve

To confirm the MIC, solutions from the cultures retained in the 96-well plates were transferred to Eppendorf microtubes containing 1.5 mL of TYM medium supplemented with SBS and streptomycin. The concentrations used were the possible MIC concentration, one higher concentration, and one lower concentration, along with the controls. The microtubes were incubated again at 37°C in 5% CO₂ for 96 hours. Trophozoite counting in a Neubauer chamber was performed every 24 hours to confirm the MIC (Sena-Lopes et al., 2017). To determine the kinetic growth curve of trophozoites and understand the time required for the antiparasitic activity of the compounds against *T. gallinae*, according the methodology described by Sena-Lopes (2017). The test was conducted in 96-well plates, where the MIC concentration was incubated at 37°C in 5% CO₂ for 96 hours, along with the controls. Trophozoites were examined under an optical microscope (400x) to assess viability. Growth observation was performed at 1, 6, 12, 24, 48, 72, and 96 hours using the trypan blue exclusion assay (0.4%). Once again, the tests were conducted in triplicate, and the results were expressed as percentages of trophozoite viability compared to the negative control (Sena-Lopes et al., 2017). A morfologia dos trofozoítos foi de acordo com Tanabe (1926),

Statistical analysis

Statistical tests were conducted using one-way Analysis of Variance (ANOVA) followed by the Tukey multiple comparisons test between groups. The probability value used was $P \leq 0.05$. Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). The determination of IC₅₀ was calculated through nonlinear regression. All analyses were performed using GraphPad Prism 8.0.1 software.

Results

In vitro* assay against *T. gallinae

In this study, antibiotics that demonstrated anti-*Trichomonas* activity were those causing a reduction of 95% to 100% in trophozoite viability. Initially, as expected, the negative control and DMSO did not affect trophozoite viability, while the positive control with MTZ resulted in 100% inhibition of the protozoa (Figure 1). Table 1 presents the means and standard deviations of the concentrations used regarding trophozoite viability.

Upon analyzing concentrations that inhibited 95% or more of the trophozoites, it stands out that NT, at the highest concentration of 5 mg/mL, inhibited 100% of the trophozoites. Next, we observed a reduction at concentrations of 3 mg/mL (99.8%) and 1 mg/mL (97.8%). Given these results, the concentration of 1 mg/mL was established as the MIC of NT. This drug proved promising even at lower concentrations of 0.5 mg/mL, achieving an efficacy of 96.2% (Figure 1 C).

CP presented significant inhibition of 99.8%, demonstrating its efficacy at the highest concentration (5 mg/mL). At a lower concentration of 3 mg/mL, it still achieved a remarkable result of 96.3%, establishing the MIC (Figure 1 A). NOR, belonging to the same class as CP, showed superior efficacy at higher concentrations (10 mg/mL) compared to NF and CP. Its maximum inhibition reached 97.9%. However, it is worth noting that this antibiotic maintained stability, exhibiting inhibition of up to 94% even at lower concentrations, such as 0.25 mg/mL. The MIC for NOR was considered at 2 mg/mL (96.1%) (Figure 1 B).

MTZ, a drug recommended for treating protozoa of the genus *Trichomonas* sp., demonstrated complete efficacy against this clinical isolate at its highest concentration (17 mg/mL). At considerably high concentrations of 15 mg/mL and 10 mg/mL, the drug exhibited inhibitions of 92.7% and 86.8%, respectively. It is noteworthy that the concentration of 17 mg/mL was used as the positive control in both the MIC tests and the kinetic growth curve of the other antibiotics (Figure 1 D).

Regarding the determination of IC₅₀, NF was the antibiotic with the lowest value of 0.069 mg/mL, followed by CP with 0.27 mg/mL, and NOR with 0.71 mg/mL. Although MTZ was used as a control, its IC₅₀ was significantly higher, reaching 2.83 mg/mL, thus becoming the highest concentration compared to the other antibiotics (Figure 1). In Figure 3 (B, C, D), we can observe the damage to the trophozoites caused by the antibiotics compared to the control where they internalize their flagella. (Figure 3 A).

Kinetic growth curve

The results of the kinetic growth curve demonstrate that all drugs used were effective at different times. According to Figure 2, we can observe that within just 6 hours of incubation, the viability of trophozoites was reduced by more than 90% by the tested antibiotics. However, complete inhibition was observed in 24 hours for the fluoroquinolones (Figure 2 A, B), while NF in the same time frame showed a reduction of 99.1% (Figure 2 C). Only at 48 hours did NF and MTZ achieve total inhibition (Figure 2 C, D). It is noteworthy that NOR demonstrated higher efficacy in the growth curve; with an MIC of 2 mg/mL, it showed an almost complete inhibition of 98.8% in the first hour of the experiment, remaining so until 96 hours and resulting in complete inhibition of trophozoites (Figure 2 B). Unlike CP (3 mg/mL) and NF (1 mg/mL), which showed a reduction of 65.3% and 60.1% in the first hour, respectively (Figure 2 A, C).

Discussion

Drug repurposing offers advantages regarding the knowledge of drug properties, including pharmacokinetics, pharmacodynamics, and toxicity. This is because these properties have already been established through testing in humans and animals, facilitating the conduct of clinical trials in shorter timeframes (Jain; Gupta, 2015). Both CP and NOR can be used in birds, administered orally (Sárközy; Semjén; Laczay, 2004; Abadía-Patiño et al., 2021). The novel findings of this study pertain to the activity of these drugs, which had not been tested on *T. gallinae* until now.

The preventive use of nitroimidazoles, especially MTZ, can predispose to the emergence of resistant strains. Additionally, in aerobic cultures, the presence of high concentrations of oxygen favors the development of resistance, as MTZ is activated in the hydrogenosomes of the Protozoa (Yarlett et al., 1986; Kulda, 1999; Cudmore et al., 2004). Therefore, new alternatives are necessary in the treatment of trichomonosis, aiming to establish effective clinical therapy and thus reduce antiparasitic resistance and animal mortality.

So far, there are no reports of the activity of NF, CP, and NOR in *T. gallinae* trophozoites. With these results, we can observe that all tested antibiotics showed promise in in vitro experiments of avian trichomonosis in a dose-dependent manner, with relatively low MICs compared to the concentrations used for MTZ (Franssen e Lumeij, 1992; Rupiper and Ehrenberg, 1994). For the treatment of trichomonosis in infected birds, it is recommended to use MTZ at 50 mg/mL orally or 0.05% MTZ in drinking water for 3 to 5 days (McLoughlin 1966; Panigrahy, 1982; Gómez-Muñoz,

2022). In experimental infections, doses of 25 mg/mL have shown efficacy in treatment (Devos, Viaene, Staelens.1965; Tabari et al., 2021). However, there are reports of therapy failures when treated with 50 mg/mL (Tabari et al., 2017; De Freitas et al., 2020).

According to Rouffaer et al. (2014), under in vitro conditions, the minimum lethal concentration of 15.6 µg/mL in 24 hours was established as a criterion to assess the resistance of *T. gallinae* strains to nitroimidazoles. In this study, the MIC of MTZ was 17 mg/mL (100% inhibition); however, at a concentration of 5 mg/mL, an inhibition of 79.8% was observed. This is consistent with the study by Tabari et al. (2021), where the strain used likely demonstrated resistance to MTZ, as cases of resistance are more prevalent in *C. livia* than in other pigeon species.

NOR was the first fluoroquinolone to be approved by the *Food and Drug Administration* (FDA) for use (Santos et al., 2014) and is recommended for the treatment of various diseases in animals (Chierentin, 2013). There are reports of its biological activity against parasites such as *Babesia* sp. (Rizk et al., 2018) and *Plasmodium falciparum* (Pradines et al., 2001), demonstrating its effectiveness. Regarding the pharmacokinetics of NOR in birds, it has been found that the drug has a good distribution in the body, thus exerting greater therapeutic efficacy (Alabbas; Al-Jumaili; Ibrahim, 2023).

For *T. gallinae*, NOR was effective at various concentrations, inhibiting approximately 94% of trophozoites at low concentrations of 0.5 mg/mL. Despite the concentrations of NOR being higher than those of CP and NT, the drug showed stability during the MIC assay, with inhibition rates ranging from about 94% to 98%, covering both lower and higher concentrations, respectively. The concentration of 10 mg/mL did not show a statistically significant difference compared to the positive control. Moreover, when compared to the MTZ MIC assay, it is noted that NOR, at this concentration, inhibited almost 98%, while MTZ did not reach 90% inhibition (Figure 1 A and D). In the kinetic growth curve, NOR demonstrated faster action compared to other drugs. In the first hour, it inhibited 98% of the parasites, reaching 100% inhibition after 6 hours, maintaining this inhibition rate until the end of the experiment. Remarkably, it showed statistical differences only at the initial time point (hour 0) when compared to the positive control (Figure 2 B). In Figure 3 (C), morphological changes induced by NOR can be observed in trophozoites, where vacuoles inside structures resembling pseudocysts are visible.

Considering the pharmacokinetic properties and efficacy of CP, it is relevant to take into account previous reports on the use of this medication. In contrast to the report by Pastel (1989), which mentioned the ineffectiveness of CP against *Trichomonas* sp. species, we emphasize that CP is widely distributed, presenting significant pharmacokinetic properties such as high bioavailability, good penetrability, and reduced side effects, as well as being more active than NOR (Sharma et al., 2010; Zhang et al., 2018).

Inceboz, Inceboz, and Ozturk (2004) contributed evidence of CP efficacy against *Trichomonas vaginalis* trophozoites, achieving 100% inhibition at a concentration of 750 µg/mL. Although the concentrations in this study were higher, CP demonstrated efficacy starting from 3mg/mL (with 96.3% inhibition). However, at 1mg/mL, there was a reduction of over 90% of trophozoites. In the kinetic growth curve, it was observed that this medication achieved complete inhibition within 24 hours, contrasting with the results of the mentioned study, which showed total reduction only after 72 hours of the experiment, using lower concentrations compared to those employed in this assay (Inceboz, Inceboz, and Ozturk, 2004).

In studies with *Giardia lamblia*, CP efficacy was associated with morphological changes and damage to the parasite's membrane. In our study, as observed in Figure 3 (B), CP induced potential stress on the trophozoite, resulting in the internalization of its flagella with probable vacuoles inside. Furthermore, in the study with *G. lamblia*, a loss of viability was noted after 48 hours, accompanied by a significant reduction in adherence, growth, and oxygen uptake capacity by this protozoan (Sousa; Poiares-Da-Silva, 2001). Although the main focus of this research is *G. lamblia*, it is valid to consider that these action characteristics of CP may have relevant impacts on other parasites, such as *T. gallinae*. Thus, understanding the mechanisms of action of CP in *G. lamblia* can provide insights for the investigation and development of therapeutic strategies aimed at *T. gallinae*.

As fluoroquinolones act by inhibiting mitochondrial DNA gyrase (topoisomerase II), which is necessary for the replication of organisms. Topoisomerases are described in various protozoa of the genera *Giardia*, *Entamoeba*, *Babesia*, *Theileria*, *Crithidia*, *Cryptosporidium*, and *Toxoplasma* (Lamba and Roy, 2022). *Plasmodium falciparum* is sensitive to topoisomerase II, and this enzyme is recognized as a valid target for this parasite. According to Petmitr and colleagues (2000), these drugs may not find a suitable target in trichomonads because they lack mitochondria but have

hydrogenosomes, where mitochondrial DNA is not present. However, topoisomerase II has been purified and considered a new target for the development of anti-trichomonas drugs. However, when tested in comparison to CP, incomplete inhibition was observed in *T. vaginalis* (Sithiprom; Petmitr; Chavalitsheewinkoon-Petmitr, 2009). As observed in *T. gallinae*, both NOR (2 mg/mL) and CP (3 mg/mL) were effective in *in vitro* treatment, suggesting that the expression of the topoisomerase II enzyme in *T. gallinae* may be higher than in *T. vaginalis*, and consequently, the action of fluoroquinolones in *T. gallinae* may differ from the observed action in *T. vaginalis*.

The NF is an antibiotic recommended for the treatment of urinary infections in humans (Huttner et al., 2015). It demonstrates an active response to strains of broad-spectrum beta-lactamase-producing bacteria (Squadrito; Del Portal, 2023). Furthermore, its antiparasitic activity has been described in *Toxoplasma gondii*, where it reduced 44.7% (100 mg/mL) of parasites in the peritoneal cavity and showed a decrease in brain cysts in mice. The authors suggested the clinical use of NF (Yeo et al., 2016; Abdallah et al., 2022). Other studies have reported its promising activity against *Plasmodium* sp. and *Trypanosoma congolense* (Shafi et al., 2023; (Suganuma et al., 2022)).

In *in vitro* studies with NF and *T. vaginalis*, a MIC of 0.8 to 10 mcg/mL was observed. However, when associated with MTZ, NF showed significant results, suggesting its clinical use (Kawamura, 1979). In our study, NF was the antibiotic used in the lowest concentrations, with an IC₅₀ of 0.069 mg/mL, the lowest compared to the other drugs. It proved promising at various concentrations, inhibiting over 95% of trophozoites at a concentration of 0.5mg/mL, showing statistical differences only at lower concentrations compared to the positive control (Figure 1 C). The MIC value (1mg/mL) demonstrated total activity within 48 hours of the experiment. However, from 6h onwards, it inhibited over 90% of trophozoites, and from 12h, the inhibition was over 98%, with no significant difference between groups (Figure 2 C). There are no records of NF use in *T. gallinae* for comparison. Still, in studies with *T. vaginalis*, the concentrations used were low, resembling the protocol adopted in this experiment. In *in vivo* assays using NF, the doses varied from 10mg/mL to 30 mg/mL (Suganuma et al., 2022).

Additionally, Büchner and Edwards (1975) described morphological changes in *T. vaginalis* trophozoites caused by NF. These changes were associated with alterations in hydrogenosomes, structures related to the parasite's energy production.

Similarly, in our study, we observed morphological changes in the structure of *T. gallinae* when treated with 1 mg/mL of NF, where the antibiotic caused the formation of vacuoles and altered the shape of the trophozoites (Figure 3 D). Due to the similarity between these protozoa, it is suggested that the mechanism of action of NF may be comparable to what is observed in *T. gallinae*.

The NF is a nitrofurantoin, therefore, it has a nitro group in its aromatic ring, just like MTZ. Nitrofurantoin is already reported to have trypanocidal action (Gadebusch and Bach, 1974; Büchner; Edwards, 1975), and its mechanism of action is similar to that of MTZ. In a study using NF and MTZ on *T. vaginalis*, it was observed that both drugs inhibited trophozoites between 40 to 50 minutes (Büchner; Edwards, 1975). These results are in agreement with our data, where NF and MTZ showed similar effects from 1 hour of incubation in *T. gallinae*, even at different concentrations. From 6 hours until the end of the experiment (96h), there was no statistically significant difference compared to MTZ, and both drugs inhibited 100% of trophozoites in 48 hours.

Due to carcinogenicity risks, NF is not recommended for use in livestock (McCracken; Kennedy, 2007). However, there is no information in the literature regarding its use in wild or captive animals, and for this reason, its use for *T. gallinae* is not ruled out. On the other hand, MTZ also presents carcinogenic potential in animals (Bendesky; Menéndez; Ostrosky-Wegman, 2002), but it remains the preferred option for trichomonosis treatment.

Conclusion

Based on the results of this study and existing literature, the antibiotics NOR, CP, and NF can reduce the number of trophozoites within after 6 hs of exposition. NF and CP showed the lowest IC₅₀ values, while NOR had a faster action in the kinetic growth curve. MTZ was effective at higher doses and presented a higher IC₅₀ compared to other antibiotics. Additionally, there were morphological changes caused by the drugs when compared to the control. Further research should be conducted in vivo to explore new treatment methods for avian trichomonosis and attempt to determine the mechanism of action of these drugs in *T. gallinae*.

6. Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

7. Acknowledgments

The authors thank the Federal University of Pelotas, Federal University of Santa Maria, Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel Brazil (Finance Code 001) to the National Council for Scientific and Technological Development.

8. References

- Abadía-Patiño, L., Meneses-Franco, A. C., Romero-Sudrez, M. E., José, L. P., & Gómez, F. R. (2021). Fluoroquinolonas en aves, huevos, alimentos avícolas y su impacto en la microbiota intestinal de aves/Fluoroquinolone in birds, eggs, poultry feeds and their impact on the intestinal microbiota. *Kasmera*, 49(1), 1c-1c. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4459386>
- Abdallah, K. F., Saleh, M. H., Kishik, S., Barakat, A. M., Ali, B. T., & Elkholy, A. A. (2022). A new approach in treatment of chronic murine models of toxoplasmosis using nitrofurantoin antibiotic. *Zagazig University Medical Journal*, 28(5), 1169-1175. <https://doi.org/10.21608/zumj.2022.112316.2440>
- Abd-El-Motelib, T. Y., & Galal, B. E. G. (1993). Some studies on *Trichomonas gallinae* infection in pigeons. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 30(59), 277-288. <https://doi.org/10.21608/avmj.1993.185833>.
- Alabbas, N. N., Al-jumaili, M. A., & Ibrahim, O. (2023). Pharmacokinetic Profile of Norfloxacin in Pigeons. *Revista de Ciencias Agroveterinarias*, 22(3). 470-474. <https://doi.org/10.5965/223811712232023470>
- Alós, J. I. (2003). Quinolonas. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 21(5), 261-268. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(03\)72932-2](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(03)72932-2)
- Amin, A., Bilic, I., Liebhart, D., & Hess, M. (2014). Trichomonads in birds—a review. *Parasitology*, 141(6), 733-747. <https://doi.org/10.1017/S0031182013002096>.
- Arfin, S., Sayeed, M. A., Sultana, S., Dash, A. K., & Hossen, M. L. (2019). Prevalence of *Trichomonas gallinae* infection in pigeon of jessore district, Bangladesh. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 6(4), 549. <https://doi.org/10.5455%2Fjavar.2019.f381>
- Ashburn, T. T., & Thor, K. B. (2004). Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature reviews Drug discovery*, 3(8), 673-683. <https://doi.org/10.1038/nrd1468>.
- Baccega, B., Alves, M. S. D., Neves, R. N., Velho, M. C., de Godoi, S. N., Ourique, A. F., ... & Oliveira, C. B. (2019). Free essential oils and nanostructured on *Trichomonas*

gallinae trophozoites. *Disciplinarum Scientia| Naturais e Tecnológicas*, 20(3), 337-354.

Bendesky, A., Menéndez, D., & Ostrosky-Wegman, P. (2002). Is metronidazole carcinogenic?. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 511(2), 133-144. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(02\)00007-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(02)00007-8)

Biswas, P. G., Begum, N., Mamun, M. A. A., Bari, M. A., & Mondal, M. M. H. (2010). Efficacy of herbal and commercially available antiprotozoal drugs on pigeon trichomoniasis. *Int J Biores*, 2, 29-33.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Guia de Uso Racional de Antimicrobianos Avicultura de Postura/ Secretaria de Defesa Agropecuária.- Brasília: MAPA/ AECS, 2022. [Acess:22/12/2023]

Bruni, M. P., Echenique, J. V. Z., Dos Santos, C. C., de Macedo, M. R. P., Bandarra, P. M., Timm, C. D., ... & da Rosa Farias, N. A. (2019). The raptor Chimango Caracara (*Milvago chimango*)(Aves: Falconiformes)-A new host for *Trichomonas gallinae* (protozoa: Trichomonadidae). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 10, 310-313. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2019.11.001>

Brunthaler, R., Teufelbauer, N., Seaman, B., Nedorost, N., Bittermann, K., Matt, J., ... & Weissenböck, H. (2022). Trichomonosis in Austrian Songbirds—Geographic Distribution, Pathological Lesions and Genetic Characterization over Nine Years. *Animals*, 12(10), 1306.<https://doi.org/10.3390/ani12101306>

Buchner, Y., & Edwards, D. I. (1975). The effect of metronidazole and nitrofurans on the morphology of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1(2), 229-234. <https://doi.org/10.1093/jac/1.2.229>.

Cai, H., Liu, Y., Zhu, Y., Fang, S., Wang, D., Yan, Z., ... & Sun, M. (2023). Drug resistance patterns and genotype associations of *Trichomonas gallinae* in meat pigeons (*Columba livia*): insights from Guangdong Province, China. *Frontiers in Veterinary Science*, 10. <https://doi.org/10.3389%2Ffvets.2023.1343321>

Chierentin, L. Análise Químico-Farmacêutica de Norfloxacinó comprimidos e Estudos de Complexação com β – Ciclodextrina e Polimorfismo. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara – SP.

Cudmore, S. L., Delgaty, K. L., Hayward-McClelland, S. F., Petrin, D. P., & Garber, G. E. (2004). Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), 783-793. <https://doi.org/10.1128/cmr.17.4.783-793.2004>

De Freitas, S. S. L. R., Martinello, A. F., de Souza Braz, C. H., de Oliveira, G. M., de Oliveira, L. S. L., de Quadros Soares, M. E., & Hirano, L. Q. L. (2020). Uso De

2102 Nitazoxanida No Tratamento De Tricomóníase Em Aves: Relatos De Casos. *Arch Vet*
2103 *Sci*, 25(5).

2104 Devos, A., Viaene, N., & Staelens, M. (1965). Behandeling van de trichomonas-
2105 besmetting bij duiven met thiazol-en imidazol-derivaten. *Vlaams Diergeneeskd.*
2106 *Tijdschr*, 34, 241-252.

2107 Diamond, L. S. (1957). The establishment of various trichomonads of animals and man
2108 in axenic cultures. *The Journal of parasitology*, 43(4), 488-
2109 490. <https://doi.org/10.2307/3274682>

2110 Dubar, F., Wintjens, R., Martins-Duarte, É. S., Vommaro, R. C., de Souza, W., Dive,
2111 D., ... & Biot, C. (2011). Ester prodrugs of ciprofloxacin as DNA-gyrase inhibitors:
2112 synthesis, antiparasitic evaluation and docking studies. *Medchemcomm*, 2(5), 430-
2113 435. <https://doi.org/10.1039/C1MD00022E>

2114 Ebrahimi Ahmabad, A., Taiefi Nasrabadi, N., Momeni, Z., & Shemshadi, B. (2023).
2115 Prevalence of *Trichomonas gallinae* in Birds of Iran and its Pathological Findings: A
2116 Review study. *Archives of Razi Institute*.
2117 <https://doi.org/10.22092/ARI.2023.363654.2873>

2118 Forrester, D.J.; Foster, G.W. Trichomonosis. In: Atkinson, C.T.; Thomas, N.J; Hunter,
2119 D.B. Parasitic Diseases of Wild Birds. 1 ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell. 2009. pp.120-
2120 153

2121 Franssen, F. F. J., & Lumeij, J. T. (1992). In vitro nitroimidazole resistance of
2122 *Trichomonas gallinae* and successful therapy with an increased dosage of ronidazole
2123 in racing pigeons (*Columba livia domestica*). *Journal of veterinary pharmacology and*
2124 *therapeutics*, 15(4), 409-415. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1992.tb01032.x>.

2125 Gadebusch, H. H., & Basch, H. I. (1974). New Antimicrobial Nitrofurán, trans-5-Amino-
2126 3-[2-(5-Nitro-2-Furyl) Vinyl]- Δ^2 -1, 2, 4-Oxadiazole: Antibacterial, Antifungal, and
2127 Antiprotozoal Activities In Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 6(3), 263-
2128 267. <https://doi.org/10.1128/aac.6.3.263>

2129 Gerhold, R. W., Yabsley, M. J., Smith, A. J., Ostergaard, E., Mannan, W., Cann, J. D.,
2130 & Fischer, J. R. (2008). Molecular characterization of the *Trichomonas gallinae*
2131 morphologic complex in the United States. *Journal of Parasitology*, 94(6), 1335-1341.
2132 <https://doi.org/10.1645/GE-1585.1>.

2133 Gómez-Muñoz, M. T., Gómez-Molinero, M. Á., González, F., Azami-Conesa, I., Bailén,
2134 M., García Piqueras, M., & Sansano-Maestre, J. (2022). Avian Oropharyngeal
2135 Trichomonosis: Treatment, Failures and Alternatives, a Systematic
2136 Review. *Microorganisms*, 10(11), 2297.
2137 <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112297>

2138 Hochleithner, M., & Hochleithner, C. (2021). The prevalence of *Trichomonas gallinae*
2139 in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) in a veterinary clinic in Vienna between 2000-
2140 2019.

2141 Huttner, A., Verhaegh, E. M., Harbarth, S., Muller, A. E., Theuretzbacher, U., &
2142 Mouton, J. W. (2015). Nitrofurantoin revisited: a systematic review and meta-analysis
2143 of controlled trials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(9), 2456-2464.
2144 <https://doi.org/10.1093/jac/dkv147>

2145 Inceboz, T., Inceboz, U., & Ozturk, S. (2004). Comparative in vitro cytotoxic effects of
2146 ornidazole, metronidazole and ciprofloxacin against *Trichomonas vaginalis*
2147 trophozoites. *Journal of chemotherapy*, 16(5), 459-462.
2148 <https://doi.org/10.1179/joc.2004.16.5.459>

2149 Inghelbrecht, S., Vermeersch, H., Ronsmans, S., Remon, J. P., DEBACKER, P., &
2150 Vercruysse, J. (1996). Pharmacokinetics and anti-trichomonal efficacy of a
2151 dimetridazole tablet and water-soluble powder in homing pigeons (*Columba*
2152 *livia*). *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 19(1), 62-67.
2153 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1996.tb00010.x>

2154 Ji, F., Zhang, D., Shao, Y., Yu, X., Liu, X., Shan, D., & Wang, Z. (2020). Changes in
2155 the diversity and composition of gut microbiota in pigeon squabs infected with
2156 *Trichomonas gallinae*. *Scientific Reports*, 10(1), 19978.
2157 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76821-9>

2158 Kawamura, N. (1979). Activity Of Oral Antiprotozoal agents against serially subcultured
2159 strains of *Trichomonas Vaginalis* and their synergic effects. 泌尿器科紀要, 25(7), 657-
2160 661.

2161 Kulda, J. (1999). Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *International*
2162 *journal for parasitology*, 29(2), 199-212. [https://doi.org/10.1016/S0020-](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00155-6)
2163 [7519\(98\)00155-6](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00155-6)

2164 Lamba, S., & Roy, A. (2022). DNA topoisomerases in the unicellular protozoan
2165 parasites: Unwinding the mystery. *Biochemical Pharmacology*, 115158.
2166 <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115158>

2167 Lat, L. H., & Thein, T. (2001). The effect of an antibiotic, Norfloxacin on the
2168 development of experimental *Ascaridia galli* infection in chicken. In Proceedings of the
2169 Annual Research Conference (Livestock and Fishery Sciences), Yangon, Myanmar,
2170 4-6 May, 2001 (pp. 147-156). Myanmar Academy of Agricultural, Forestry, Livestock
2171 and Fishery Sciences. <https://doi.org/10.5555/20143398098>

2172 Löfmark, S., Edlund, C., & Nord, C. E. (2010). Metronidazole is still the drug of choice
2173 for treatment of anaerobic infections. *Clinical infectious diseases*, 50(Supplement_1),
2174 S16-S23. <https://doi.org/10.1086/647939>

2175 Lumeij, J. T., & Zwiijnenberg, R. J. G. (1990). Failure of nitro-imidazole drugs to control
2176 trichomoniasis in the racing pigeon (*Columba livia domestica*). *Avian Pathology*, 19(1),
2177 165-166. <https://doi.org/10.1080/030794590008418665>.

2178 McCracken, R. J., & Kennedy, D. G. (2007). Detection, accumulation and distribution
2179 of nitrofurantoin residues in egg yolk, albumen and shell. *Food additives and*
2180 *contaminants*, 24(1), 26-33. <https://doi.org/10.1080/02652030600967214>

2181 McLoughlin, D. K. (1966). Observations on the Treatment of *Trichomonas gallinae* in
2182 Pigeons. *Avian Diseases*, 10(3), 288-290. <https://doi.org/10.2307/1588274>

2183 Munoz, E., Castella, J., & Gutierrez, J. F. (1998). In vivo and in vitro sensitivity of
2184 *Trichomonas gallinae* to some nitroimidazole drugs. *Veterinary parasitology*, 78(4),
2185 239-246. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(98\)00164-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(98)00164-2)

2186 Pal, D., Banerjee, S., Cui, J., Schwartz, A., Ghosh, S. K., & Samuelson, J. (2009).
2187 *Giardia*, *Entamoeba*, and *Trichomonas* enzymes activate metronidazole
2188 (nitroreductases) and inactivate metronidazole (nitroimidazole
2189 reductases). *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(2), 458-464.
2190 <https://doi.org/10.1128/AAC.00909-08>

2191 Panigraphy, B., Grimes, J. E., Glass, S. E., Naqi, S. A., & Hall, C. F. (1982). Diseases
2192 of pigeons and doves in Texas--clinical findings and recommendations for
2193 control. <https://doi.org/10.5555/19830804782>

2194 Pastel, D. (1989). Focus on oral ciprofloxacin; clinical and economic
2195 considerations. *Hospital Pharmacy*, 24(10), 814-20.

2196 Petmitr, P. C., Ramdja, M., & Kajorndechakiat, S. (2000). In vitro sensitivity of
2197 *Trichomonas vaginalis* to DNA topoisomerase II inhibitors. *Southeast Asian journal of*
2198 *tropical medicine and public health*, 31(1), 118-122.

2199 Pradines, B., Rogier, C., Fusai, T., Mosnier, J., Daries, W., Barret, E., & Parzy, D.
2200 (2001). In vitro activities of antibiotics against *Plasmodium falciparum* are inhibited by
2201 iron. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(6), 1746-1750.
2202 <https://doi.org/10.1128/AAC.45.6.1746-1750.2001>.

2203 Rivolta, S. 1878. Una forma di croup prodotta da un infusorio, nei polli. *Giornale di*
2204 *Anatomia, Fisiologia, e Patologia Animale* 10:149–158.

2205 Rizk, M. A., AbouLaila, M., El-Sayed, S. A. E. S., Guswanto, A., Yokoyama, N., &
2206 Igarashi, I. (2018). Inhibitory effects of fluoroquinolone antibiotics on *Babesia*
2207 *divergens* and *Babesia microti*, blood parasites of veterinary and zoonotic
2208 importance. *Infection and Drug Resistance*, 1605-1615.
2209 <https://doi.org/10.2147/IDR.S159519>

6 Considerações finais

Com base nos resultados deste estudo, é possível fazer algumas considerações finais significativas. O trabalho inicial investigou o potencial antiparasitário de compostos benzofuroxanos (BZX) em trofozoítos de *Trichomonas vaginalis*, um protozoário flagelado que acomete humanos e causa sérios problemas se não tratado corretamente. Podemos observar que compostos EH1, EH2, EH3 e EA2 (menor efetividade) apresentaram alta eficácia antiparasitária *in vitro*, inibindo mais de 95% dos trofozoítos após 12 horas de experimento, atingindo 100% em 24 horas.

No segundo manuscrito, exploramos os potenciais atividades dos compostos BZX em relação ao seu mecanismo de ação. Verificamos que esses compostos parecem causar danos na membrana dos trofozoítos, interagindo intracelularmente e evocando um desequilíbrio redox. Além disso, destacamos uma atividade antioxidante, especialmente na concentração mais elevada (100 μ M) de todos os compostos. Ademais, os compostos inibiram a expressão de proteínas fundamentais para a sobrevivência do *T. vaginalis*, sugerindo uma possível interação entre os compostos e as proteínas avaliadas.

No manuscrito 3 foi explorado *in vitro* a eficácia de antibióticos (nitrofuranos e fluoroquinolonas) no tratamento da tricomonose aviária onde, os antibióticos Nitrofurantoína, Norfloxacino e Ciprofloxacina mostraram-se promissores, atingindo cerca de 100% de inibição do *T. gallinae* nas concentrações mais elevadas em 24 horas.

Portanto, conclui-se que tanto os compostos BZX quanto os antibióticos testados apresentaram resultados promissores no tratamento *in vitro* da tricomoníase humana e tricomonose aviária, respectivamente. Essas descobertas destacam a relevância desses compostos como potenciais agentes terapêuticos para essas infecções parasitárias, abrindo caminho para futuras investigações e desenvolvimentos na área.

2210 Robinson, R. A. et al. The finch epidemic strain of *Trichomonas gallinae* is predominant
 2211 in British non-passerines. Emerging infectious disease leads to rapid population
 2212 declines of common British birds. *Plos One*, v. 5, n. 8, p. 1234-1245, 2010.

2213 Rouffaer, L. O., Adriaensen, C., De Boeck, C., Claerebout, E., & Martel, A. (2014).
 2214 Racing pigeons: a reservoir for nitro-imidazole-resistant *Trichomonas gallinae*. *The*
 2215 *Journal of Parasitology*, 100(3), 360-363. <https://doi.org/10.1645/13-359.1>

2216 Rupiper DJ, Ehrenberg M. Introduction to pigeon practice. Proceedings of Annual
 2217 Conference Association of Avian Veterinarians, 1994, 203-21

2218 Saikia, M., Bhattacharjee, K., Sarmah, P. C., Deka, D. K., Upadhyaya, T. N., & Konch,
 2219 P. (2021). Prevalence and pathology of *Trichomonas gallinae* in domestic pigeon
 2220 (*Columba livia domestica*) of Assam, India. *Indian Journal of Animal Research*, 55(1),
 2221 84-89.

2222 Santos, M. C.; Galvan, F.B.; Rosa, M.F. Emprego de Métodos Fotolíticos e
 2223 Fotocatalíticos na degradação do antibiótico norfloxacino. XII Congresso Nacional de
 2224 Meio Ambiente de Poços de Caldas – Minas Gerais, 2014

2225 Sárközy, G., Semjén, G., Laczay, P., & et al. (2002). Pulse and continuous oral
 2226 norfloxacin treatment of experimentally induced *Escherichia coli* infection in broiler
 2227 chicks and turkey poults. *Acta Veterinaria Hungarica*, 50(2), 199-210.
 2228 <https://doi.org/10.1556/avet.50.2002.2.9>

2229 Seddiek, S. A., El-Shorbagy, M. M., Khater, H. F., & Ali, A. M. (2014). The
 2230 antitrichomonal efficacy of garlic and metronidazole against *Trichomonas gallinae*
 2231 infecting domestic pigeons. *Parasitology Research*, 113, 1319-1329.
 2232 <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3771-6>

2233 Sena-Lopes, Â., das Neves, R. N., Bezerra, F. S. B., de Oliveira Silva, M. T., Nobre,
 2234 P. C., Perin, G., ... & Borsuk, S. (2017). Antiparasitic activity of 1, 3-dioxolanes
 2235 containing tellurium in *Trichomonas vaginalis*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 89,
 2236 284-287. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.173>

2237 Shafi, S., Gupta, S., Jain, R., Shoaib, R., Munjal, A., Maurya, P., ... & Singh, S. (2023).
 2238 Tackling the emerging Artemisinin-resistant malaria parasite by modulation of
 2239 defensive oxido-reductive mechanism via nitrofurantoin repurposing. *Biochemical*
 2240 *Pharmacology*, 215, 115756. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.11575>.

2241 Sharma, P. C., Jain, A., Jain, S., Pahwa, R., & Yar, M. S. (2010). Ciprofloxacin: review
 2242 on developments in synthetic, analytical, and medicinal aspects. *Journal of enzyme*
 2243 *inhibition and medicinal chemistry*, 25(4), 577-589.
 2244 <https://doi.org/10.3109/14756360903373350>

- 2245 Sithiprom, S., Petmitr, S., & Chavalitshewinkoon-Petmitr, P. (2009). Partial purification
2246 and characterization of *Trichomonas vaginalis* DNA topoisomerase II. *Southeast Asian*
2247 *journal of tropical medicine and public health*, 40(5), 877.
- 2248 Sobel, J. D., Nagappan, V., & Nyirjesy, P. (1999). Metronidazole-resistant vaginal
2249 trichomoniasis—an emerging problem. *New England Journal of Medicine*, 341(4),
2250 292-293. <https://doi.org/10.1056/NEJM199907223410417>.
- 2251 Sousa, M. C., & Poiaraes-da-Silva, J. (2001). The cytotoxic effects of ciprofloxacin in
2252 *Giardia lamblia* trophozoites. *Toxicology in vitro*, 15(4-5), 297-301.
2253 [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(01\)00026-1](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(01)00026-1)
- 2254 Spinosa, H.S.; Górniak, S.L.; Bernardi, M.M. *Farmacologia Aplicada à Medicina*
2255 *Veterinária*. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- 2256 Squadrito, F. J., & del Portal, D. (2022). Nitrofurantoin. In StatPearls [Internet].
2257 StatPearls Publishing. [Disponível em:
2258 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470526/>]. [Acess in: 28/01/2024]
- 2259 Suganuma, K., N'Da, D. D., Watanabe, K. I., Tanaka, Y., Mossaad, E., Elata, A., ... &
2260 Kawazu, S. I. (2022). Therapeutic efficacy of orally administered nitrofurantoin against
2261 animal African trypanosomosis caused by *Trypanosoma congolense* infection.
2262 *Pathogens*, 11(3), 331. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030331>
- 2263 Tabari, M. A., Youssefi, M. R., & Moghadamnia, A. A. (2017). Antitrichomonal activity
2264 of *Peganum harmala* alkaloid extract against trichomoniasis in pigeon (*Columba livia*
2265 *domestica*). *British Poultry Science*, 58(3), 236-241.
2266 <https://doi.org/10.1080/00071668.2017.1280725>
- 2267 Tabari, M. A., Poźniak, B., Youssefi, M. R., Roudaki Sarvandani, M. R., & Giorgi, M.
2268 (2021). Comparative pharmacokinetics of metronidazole in healthy and *Trichomonas*
2269 *gallinae* infected pigeons (*Columba livia*, var. *domestica*). *British Poultry*
2270 *Science*, 62(4), 485-491. <https://doi.org/10.1080/00071668.2021.1881043>
- 2271 Tanabe, M. (1926). Morphological studies on *Trichomonas*. *The Journal of*
2272 *Parasitology*, 12(3), 120-130. <https://doi.org/10.2307/3271220>
- 2273 Zadavec, M., Slavec, B., Krapež, U., Gombač, M., Švara, T., Poljšak-Prijatelj, M., ...
2274 & Račnik, J. (2017). Trichomonosis outbreak in a flock of canaries (*Serinus canaria* f.
2275 *domestica*) caused by a finch epidemic strain of *Trichomonas gallinae*. *Veterinary*
2276 *parasitology*, 239, 90-93. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.001>
- 2277 Zhang, G. F., Liu, X., Zhang, S., Pan, B., & Liu, M. L. (2018). Ciprofloxacin derivatives
2278 and their antibacterial activities. *European journal of medicinal chemistry*, 146, 599-
2279 612. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.078>

2280 Yarlett, N., Yarlett, N. C., & Lloyd, D. (1986). Metronidazole-resistant clinical isolates
 2281 of *Trichomonas vaginalis* have lowered oxygen affinities. *Molecular and biochemical*
 2282 *parasitology*, 19(2), 111-116. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(86\)90115-5](https://doi.org/10.1016/0166-6851(86)90115-5).

2283 Yeo, S. J., Jin, C., Kim, S., & Park, H. (2016). In vitro and in vivo effects of nitrofurantoin
 2284 on experimental toxoplasmosis. *The Korean Journal of Parasitology*, 54(2), 155.
 2285 <https://doi.org/10.3347%2Fkjp.2016.54.2.155>

2286

2287

2288 Tabela 1: Viability of *T. gallinae* Trophozoites with Antibiotics: NF, CP, NOR e MTZ

<i>Antibiotic</i>	<i>Concentration</i> (mg/mL)	<i>Mean(±SD)</i>
<i>Nitrofurantoin</i>	5 mg/mL	0 (± 0)
	3mg/mL	0.66 (± 0.54)
	1 mg/mL	3.44 (± 1.34)
	0.5 mg/mL	5.44 (± 0.31)
	0.07 mg/mL	49.66 (± 6.26)
	0.03 mg/mL	100 (±0)
<i>Ciprofloxacin</i>	5 mg/mL	0.11 (± 0.15)
	3mg/mL	4.66 (± 0.27)
	1 mg/mL	6.77 (± 2.0)
	0.5 mg/mL	9 (± 1.9)
	0.3 mg/mL	10.9 (± 0.34)
	0.1 mg/mL	100 (± 0)
<i>Norfloxacin</i>	10 mg/mL	2,44 (± 1.59)
	5 mg/mL	3,77 (± 0.41)

	3mg/mL	4,77 ($\pm$ 1.13)
	2 mg/mL	6 ($\pm$ 1.36)
	0.5 mg/mL	8,16 ($\pm$ 1.22)
	0.25mg/mL	100 ($\pm$ 0)
<i>Metronidazole</i>	17 mg/mL	0 ($\pm$ 0)
	15 mg/mL	7.22 ($\pm$ 1.34)
	10 mg/mL	13.1 ($\pm$ 0.68)
	5 mg/mL	20.1 ($\pm$ 4.2)
	2 mg/mL	63.6 ($\pm$ 1.0)
	1 mg/mL	94.3 ($\pm$ 8.0)
<i>Negative control</i>	Meio TYM	100 ($\pm$ 0)
<i>Positive control</i>	17mg/mL (MTZ)	0 ($\pm$ 0)
<i>DMSO control</i>	0.06%	100 ($\pm$ 0)

2289

2290

2291

2292

2293

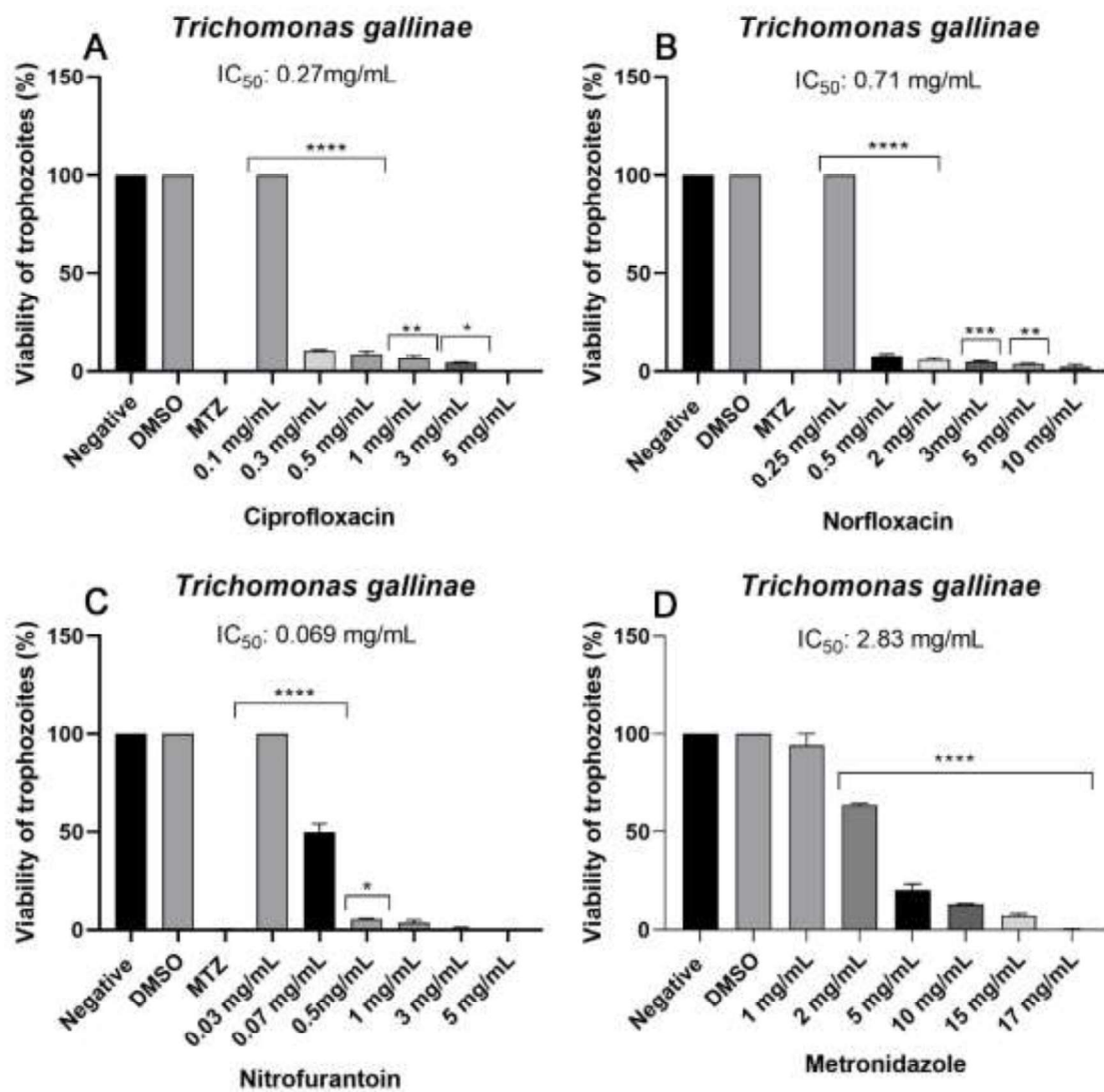
2294

2295

2296

2297

2298 Figure 1: In vitro anti-*T. gallinae* assay. MIC and IC₅₀ for the anti-parasitic activity of
 2299 CP (a), NOR (b), NF (c), and MTZ (d). Negative (untreated trophozoites), Positive (MTZ
 2300 - 17 mg/mL), DMSO (solubilization vehicle 0.6%). Asterisks represent a significant
 2301 difference at P < 0.05 for the positive control. Asterisks for MTZ (d) indicate a significant
 2302 difference compared to the negative control P < 0.05.



2303

2304

2305

2306

2307

2308

Figure 2: Kinetic growth curve of *T. gallinae* in relation to the MIC concentration of antibiotics CP (a), NOR (b), NF (c), and MTZ (d). Negative control (untreated trophozoites), Positive control (MTZ - 17 mg/mL), DMSO (solubilization vehicle 0.6%). Asterisks indicate significant difference compared to the positive control with $P < 0.05$. Asterisks for MTZ (d) indicate significant difference compared to the negative control $P < 0.05$.

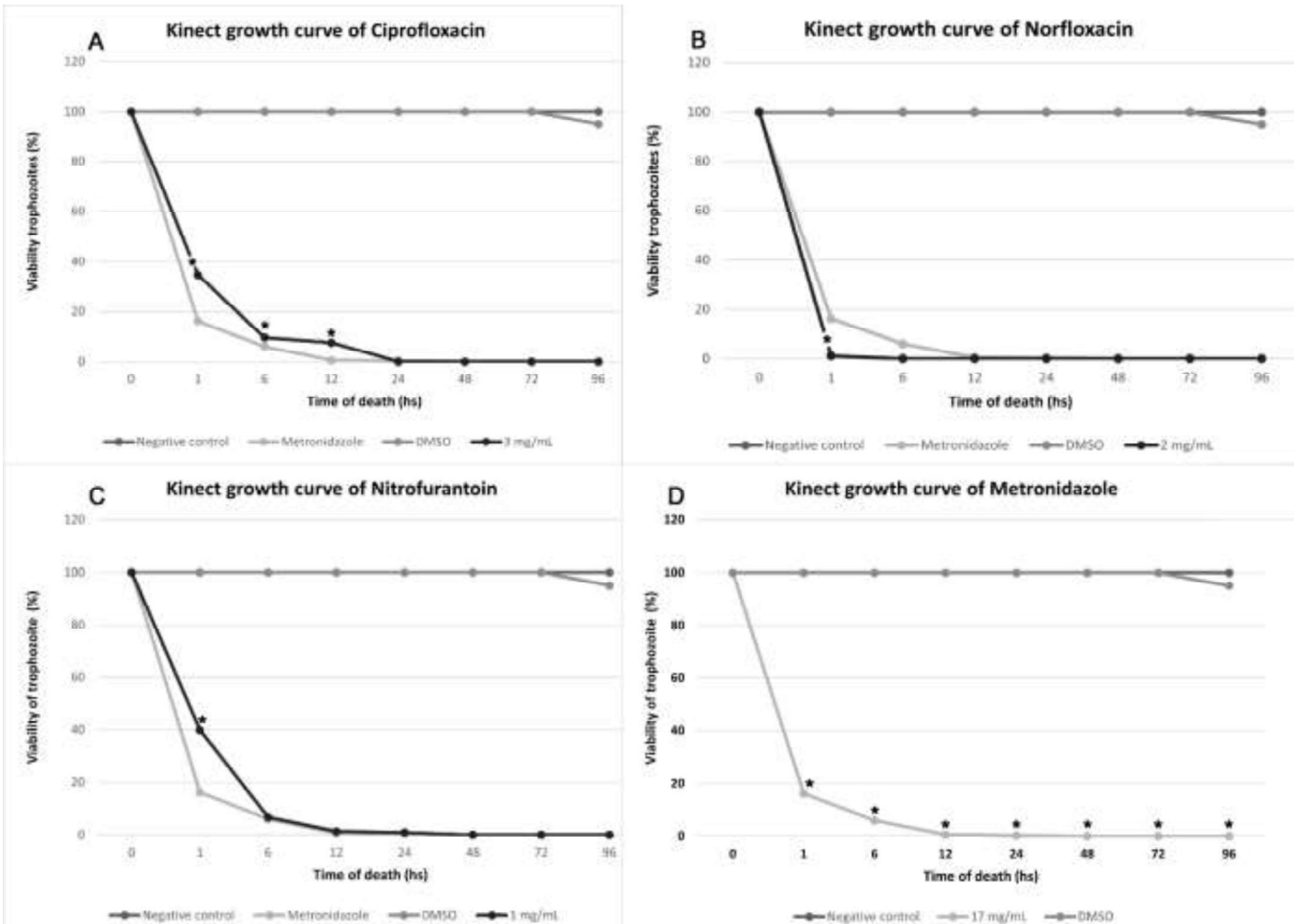
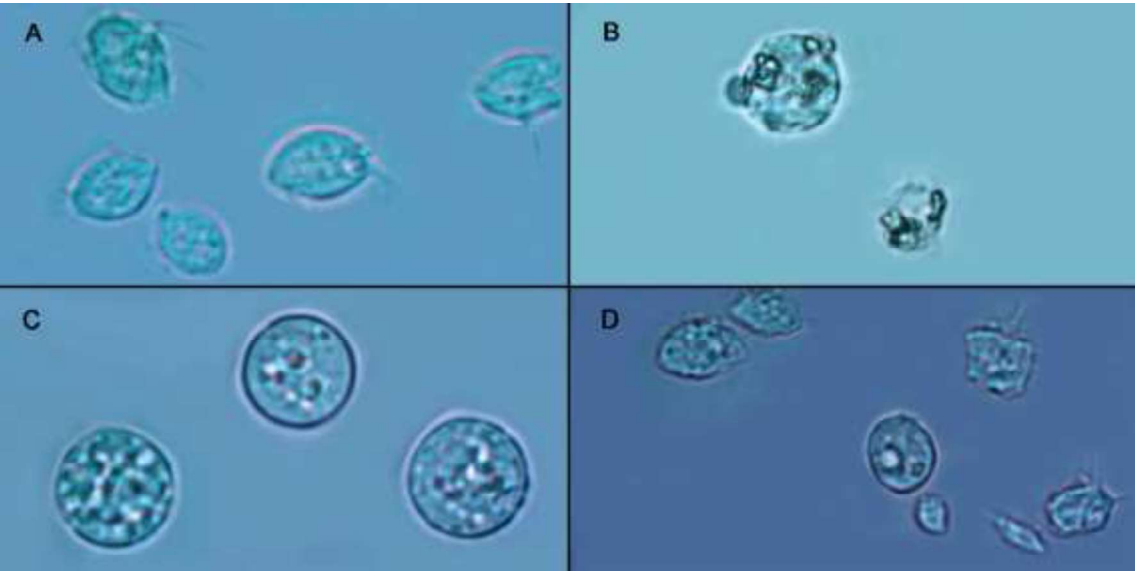


Figure 3: Images of *T. gallinae* trophozoites after 24 hours of treatment with the MIC concentrations of each antibiotic: Negative control (untreated trophozoites) (A); CP-3 mg/mL (B); NOR-2 mg/mL (C); NF-1 mg/mL (D).



Referências bibliográficas

AANANDHI, M. Vijey *et al.* Molecular docking Q-SAR studies of benzimidazole as antifungal nucleus. **Research Journal of Pharmacy and Technology**., v. 1, n., 4, p. 1083-1090, 2010.

ABRAHAM, J Dounald's *et al.* **Burger's Medicinal Chemistry& Drug Discovery**. 2003.

ACOSTA, Isis Guevara; PIÑEIRO, Carlos Jesús Soto; LÓPEZ, Eliécer Cruz. Incidencia subclínica de *Trichomonas* en palomas. **Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 10, n. 7B, p. 1-6, 2009.

AFSSAPS (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé). Recommendations de bonne pratique: Diagnostic et antibiothérapie des infections urinaires bactériennes communautaires chez l'adulte [AFSSAPS Practice recommendations for diagnosis and antibiotic therapy of adult community urinary tract infections]. **Med Mal Infect.** v.38, n. 3, p. 203-252, 2008.

ALABBAS, Nibras N.A; AL-JUMAILI, Mustafa A.; IBRAHIM, Orooba. Pharmacokinetic Profile of Norfloxacin in Pigeons. **Revista de Ciencias Agroveterinarias**, v. 22, n. 3, 2023.

ALBUQUERQUE, G.R. *et al.*, Sobrevivência e infectividade do *Trypanosoma cruzi* na polpa de açaí: estudo *in vitro* e *in vivo*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.37, n. 1, 2016.

ALDERETE, J. F.; GARZA, G. E. Identification and properties of *Trichomonas vaginalis* proteins involved in cytoadherence. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 1, p. 28-33, 1988.

ALDERETE, J. F.; PROVENZANO, D.; LEHKER, M. W. Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complement lysis. **Microbial Pathogenesis**, v. 19, n. 2, p. 93–103, 1995.

ALDERETE, J. F *et al.* Only two of the *Trichomonas vaginalis* triplets AP51 adhesins are regulated by iron. **Microbial Pathogens**, v. 24, n.1, p. 1-16, 1998.

ALDERETE, J. F. *et al.* Enzymes on microbial pathogens and *Trichomonas vaginalis*: molecular mimicry and functional diversity. **Cellular microbiology**, v.3, n.6, p.359-370, 2001.

ALÓS, Juan Ignacio. Quinolonas. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 21, n. 5, p. 261-268, 2003.

Alos, Juan Ignacio. Quinolonas. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 27, n. 5, p. 290-297, 2009.

ALVES, M.J *et al.* Epidemiologia de *Trichomonas vaginalis* em mulheres. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v.29, n. 1, p.27-34, 2011.

AMBORZIO, C.L *et al.* *Trichomonas vaginalis* prevalence and risk factors for women In Southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 58, n.61, p.1-5, 2016.

AMIN, A *et al.* Experimental infection of turkeys and chickens with a clonal strain of *Tetratrichomonas gallinarum* induces a latent infection in the absence of clinical signs and lesions. **Journal of Comparative Pathology**, v.144, n. 1, p.55–62, 2011.

AMIN, A *et al.* Trichomonads in birds—a review. **Parasitology**, v.141, n. 6, p. 733–747, 2014.

AMIR M.; SHIKHA, K. Synthesis and anti-inflammatory, analgesic, ulcerogenucand lipid peroxidation activities of some new 2-[(2,6-dichloroanilino) phenyl] acetic acid. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 6, p. 535-545, 2004.

ANDRIOLE, Vincent T. Urinary tract agents: quinolones, nitrofurantoin, and methenamine. In: **Principles and Practice of Infectious Diseases**. John Wiley and Sons New York, 1985. p. 244-253.

ANDRIOLE, Vincent T. **The quinolones**. Elsevier, 2000.

APPELBAUM, P.C.; HUNTER, P.A. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.16,n. 1, p.5-15, 2000.

AQUINO, M.F.K. DE, HINDERFELD, A.S; SIMOES-BARBOSA. *Trichomonas vaginalis*. **Trends in Parasitology**, v. 36, n.7, p. 646–647, 2020.

ARI, Marzie Mahdizade *et al.* Nitrofurantoin: Properties and potential in treatment of urinary tract infection: A narrative review. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 13, 2023.

ARROYO, R. ENGBRING, J. ALDERETE JF, Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*, **Molecular microbiology**, v. 6, n. 7, p. 853-862, 1992.

ASSOCIATION OF PUBLIC HEALTH LABORATORY ISSUES IN BRIEF (APHL). **Advances in laboratory detection of Trichomonas vaginalis**. Laboratory detection of trichomonas, 2013.

AZULAY, M.M.; AZULAY, D. R. Doenças sexualmente transmissíveis. In: SCHECHTER, M.; MARANGONI, D. V. **Doenças infecciosas: conduta diagnóstica e terapêutica**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p. 335-357.

BARRATT, J.R *et al.* Bulky Trichomonad Genomes: Encoding a Swiss Army Knife. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 10, p. 783–797, 2016

BARREIRO E.J. **Química Nova**, v. 14, n. 3, p. 179-88, 1991.

BARRIO, A.G *et al.* Biological variability in clinical isolates of *Trichomonas vaginalis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 893-6, 2002.

BASTIDA Corcuera, *et al.* *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan mutants have reduced adherence and cytotoxicity to human ectocervical cells. **Eukaryotic cell**, v. 4, n. 11, p.1951-1958, 2005.

BENZIE, I.F.F; STRAIN, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power: The FRAP. **Assay Analytical Biochemistry**, v. 76, n. 1, p. 70–76, 1996.

BIRMANN, P.T *et al.* A novel pyrazole-containing selenium compound modulates the oxidative and nitric pathways to reverse the depression-pain syndrome in mice. **Brain Research**. v. 1741, p. 146880, 2020.

BUCHNER, Yvonne; EDWARDS, D.I. The effect of metronidazole and nitrofurans on the morphology of *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 1, n. 2, p. 229-234, 1975.

BOAL, C. W., MANNAN, R.W.; HUDELSON, K.S. Trichomoniasis in Cooper's hawks from Arizona. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 34, n. 3, p. 590–593, 1998.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, v. 10, n. 2, p. 907-16, 2001.

BOIANI, L. *et al.* Furoxan-, alkyl nitrate-derivatives and related compounds as antitrypanosomatid agents: mechanism of action studies. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v.16, n. 17, p. 7900–7907, 2008.

BONDURANT, R.H.; HONIGBERG, B.M. **Trichomonads of Veterinary importance**. New York: Parasitic Protozoa Academic Press, p. 111–206, 1994.

BORCHARDT, K.A.; SMITH, R.F. An evaluation of an InPouch TV culture method for diagnosing *Trichomonas vaginalis* infection. **Sexually Transmitted Infections**, v. 67, n. 2, p. 149-152, 1991.

BORJI, H *et al.* Prevalence and pathological lesion of *Trichomonas gallinae* in pigeons of Iran. **Journal of Parasitology Diseases**, v. 35, p. 186–189, 2011.

BOSSERMAN, E.A *et al.* Utility of antimicrobial susceptibility testing in trichomonas vaginalis-infected women with clinical treatment failure. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 38, n.10, p. 983– 987, 2011.

BOWDEN, F. J.; GARNETT, G. P. Why is *Trichomonas vaginalis* ignored? **Sexually Transmitted Infections**, v. 75, p. 372-4, 1999.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30.1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Controle dos cânceres do colo do útero e da mama**. Série A.

Normas e Manuais Técnicos. Cadernos de Atenção Básica, n. 13. Brasília: Ministério da Saúde, 2006a. 192 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Manual de Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis**. Série Manuais Técnicos. Coleção DST e AIDS, n. 68. 4a edição. Brasília: Ministério da Saúde, 2006b. 142 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (2015). **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT). Atenção Integral às pessoas com infecções sexualmente transmissíveis** (IST), Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_clinico_diretrizes_terapeutica_atencao_integral_pessoas_infecoes_sexualmente_transmissiveis.pdf.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Guia de uso Racional de Antimicrobianos Avicultura Postura**/ Secretaria de Defesa Agropecuária_ Brasília: MAPA/AECS, 1ª edição, 2022.

BRITO, Monique Araujo de; CORDEIRO, Benedito Carlos. Necessidade de novos antibióticos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, p. 247-249, 2012.

BRUNI, M.P *et al.* *Trichomonas Vaginalis* infection in women attended by the service public in Rio Grande do Sul, Brazil: frequency, risk factors and clinical signs. **DST - Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, Rio Grande do Sul, v. 27, p. 86-91, 2015.

BRUNI, Mirian Pinheiro *et al.* The raptor Chimango Caracara (Milvago chimango)(Aves: Falconiformes)-A new host for *Trichomonas gallinae* (protozoa: Trichomonadidae). **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 10, p. 310-313, 2019.

BRUNZEL, Nancy A. **Fundamentals of Urine and Body Fluid Analysis-E-Book**. Elsevier Health Sciences, 2021.

BUNBURY, N.; JONES, C. G.; GREENWOOD, A. G.; BELL, D. J. *Trichomonas gallinae* in *Mauritian Columbids*: Implications for an endangered endemic. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 43, n. 3, p. 399–407, 2007.

CALDERARO, Antonella *et al.* Molecular basis of interactions between the antibiotic nitrofurantoin and human serum albumin: A mechanism for the rapid drug blood transportation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 8740, 2021.

CASTRO, Cássia *et al.* Iron-modulated pseudocyst formation in *Tritrichomonas foetus*. **Parasitology**, v. 143, n. 8, p. 1034-1042, 2016.

CAMPBELL W.C. A historic photomicrograph of a parasite (*Trichomonas vaginalis*). **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 10, p.499-500, 2001.

CAZORLA SI *et al.* .Redirection Of The Immune Response To The Functional Catalytic Domain Of The Cystein Proteinase Cruzipain Improves Protective Immunity

Against *Trypanosoma Cruzi* Infection. **The Journal Infectious Diseases**, v. 202, n. 1, p. 136-144, 2010.

CERQUEIRA N. F.; YOSHIDA W. B. Óxido Nítrico, revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. 6, p. 417-423, 2002.

CERUELOS, A. Hernández *et al.* Therapeutic uses of metronidazole and its side effects: an update. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 23, n. 1, p. 397-401, 2019.

CHESSON, H.W.; BLANDFORD, J. M.; PINKERTON, S.D. Estimates of the Annual Number and Cost of New HIV Infections Among Women Attributable to Trichomoniasis in the United States. Sexually Transmitted Diseases. **Ovid Technologies**, v. 31, n. 9, p. 547-551, 2004.

CHI, Jean F. *et al.* The finch epidemic strain of *Trichomonas gallinae* is predominant in British non-passerines. **Parasitology**, v. 140, n. 10, p. 1234-1245, 2013.

CHIERENTIN, Lucas. **Análise Químico-Farmacêutica de Norfloxacino comprimidos e Estudos de Complexação com β – Ciclodextrina e Polimorfismo**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara, São Paulo, 2013.

CHIFIRIUC, Mariana Carmen *et al.* Antibiotic drug delivery systems for the intracellular targeting of bacterial pathogens. In: **Smart drug delivery system**. IntechOpen, 2016.

COOPER, J. E.; PETTY, S. J. Trichomoniasis in free-living goshawks (*Accipiter gentilis gentilis*) from Great Britain. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 24, n.1, p. 80-87, 1988.

COLE R.A. Trichomoniasis. In: Friend M.; Franson J.C.; editors. **Field Manual of Wildlife Diseases: General Field Procedures and Diseases of Birds**. U.S. Department of Interior, U.S. Geographical Survey; Washington, D.C., USA, pp. 201–206. 1999.

COLE, Rebecca A.; FRIEND, Milton. Parasites and parasitic diseases (field manual of wildlife diseases). **Other Publications in Zoonotics and Wildlife Disease**, p. 15, 1999.

COLLIN, Frédéric; KARKARE, Shantanu; MAXWELL, Anthony. Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 92, p. 479-497, 2011.

COTCH, Mary Frances *et al.* *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. **Sexually transmitted diseases**, p. 353-360, 1997.

CRESPO, Rocio *et al.* Galliformes and columbiformes. In: **Pathology of wildlife and zoo animals**. Academic Press, 2018. p. 747-773.

CROFTON, Sir John *et al.* **Guidelines for the management of drug-resistant tuberculosis**. World Health Organization, 1997.

CRUCITTI, T. *et al.* Non-sexual transmission of *Trichomonas vaginalis* in adolescent girls attending school in Ndola, Zambia. **PLoS One**, v. 6, n. 1, p. e16310, 2011.

CRYAN, J.F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacological Sciences**, V. 23, n, 5, p. 238-245, 2002.

CUDMORE, Sarah L. *et al.* Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. **Clinical microbiology reviews**, v. 17, n. 4, p. 783-793, 2004.

CUERVO, P *et al.* Differential soluble protein expression between *Trichomonas vaginalis* isolates exhibiting low and high virulence phenotypes. **Journal Proteomics**, v. 71, n. 1, p. 109-122, 2008.

DA SILVA, J. M. B.; HOLLENBACH, C. B. Fluoroquinolonas x Resistência bacteriana na medicina veterinária. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 363-369, 2020.

DE ALMEIDA, Mauro V. *et al.* Synthesis and antitubercular activity of lipophilic moxifloxacin and gatifloxacin derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 17, n. 20, p. 5661-5664, 2007.

DE CARLI, G. A. *Trichomonas*. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 101-105.

DE CARLI, G. A. Exame de outros espécimes do trato intestinal e sistema urogenital. In: DE CARLI, G. A. **Parasitologia clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas**. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 165-199.

DE CARLI, G. A.; TASCA, T. *Trichomonas*, In: NEVES, D. P. *et al.* **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 115-120.

DE CARLI, G. A. *Parasitologia Clínica* Ed. Atheneu, Cap, v. 2, p. 49-59, 2007.

DE CARLI, G. A.; TASCA, T. Tricomoníase. In: NETO, V. A. *et al.* **Parasitologia: uma abordagem clínica**. São Paulo: Elsevier, 2008.

DE WAAIJ, Dewi J. *et al.* Prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection and protozoan load in South African women: a cross-sectional study. **BMJ open**, v. 7, n. 10, p. e016959, 2017.

DEWANGAN, Dhansay *et al.* Synthesis of some novel 2, 5-disubstituted 1, 3, 4-oxadiazole and its analgesic, anti-inflammatory, anti-bacterial and anti-tubercular activity. **International Journal of ChemTech Research**, v. 2, n. 3, p. 1397-412, 2010.

DHARMARAJA, Allimuthu T. *et al.* Design, synthesis and evaluation of small molecule reactive oxygen species generators as selective *Mycobacterium tuberculosis* inhibitors. **Chemical communications**, v. 48, n. 83, p. 10325-10327, 2012.

DIAMOND, L.S. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. **Journal of Parasitology**, v. 43, n.4, p. 488-499, 1957.

DOS SANTOS, Odelta *et al.* Trichomonas vaginalis clinical isolates: cytoadherence and adherence to polystyrene, intrauterine device, and vaginal ring. **Parasitology research**, v. 116, p. 3275-3284, 2017.

DUBAR, Faustine *et al.* Ester prodrugs of ciprofloxacin as DNA-gyrase inhibitors: synthesis, antiparasitic evaluation and docking studies. **Medchemcomm**, v. 2, n. 5, p. 430-435, 2011.

DUNNE, Rebecca L. *et al.* Drug resistance in the sexually transmitted protozoan Trichomonas vaginalis. **Cell research**, v. 13, n. 4, p. 239-249, 2003.

DUSCHAK, Vilma G.; COUTO, Alicia S. Cruzipain, the major cysteine protease of Trypanosoma cruzi: a sulfated glycoprotein antigen as relevant candidate for vaccine development and drug target. A review. **Current medicinal chemistry**, v. 16, n. 24, p. 3174-3202, 2009.

ECHENIQUE, Joanna VZ *et al.* Oral trichomoniasis in raptors in Southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, p. 983-988, 2020.

EDWARDS, D. I. Nitroimidazole drugs – action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. **Journal Antimicrob Chemother**, v. 31, p. 9-20, 1993.

EL-EMAM, Ali A. *et al.* Synthesis, antimicrobial, and anti-HIV-1 activity of certain 5-(1-adamantyl)-2-substituted thio-1, 3, 4-oxadiazoles and 5-(1-adamantyl)-3-substituted aminomethyl-1, 3, 4-oxadiazoline-2-thiones. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 12, n. 19, p. 5107-5113, 2004.

ESTES, Wendy A.; MANNAN, R. William. Feeding behavior of Cooper's Hawks at urban and rural nests in southeastern Arizona. **The Condor**, v. 105, n. 1, p. 107-116, 2003.

ENGLERT, Sérgio Inácio. **Avicultura: tudo sobre raças, manejo e nutrição**. Guaíba: Agropecuária, 1998.

FAN, Yi-Lei *et al.* Fluoroquinolone derivatives and their anti-tubercular activities. **European journal of medicinal chemistry**, v. 146, p. 554-563, 2018.

FANG, F.C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 10, p. 820–832, 2004.

FEDIK, Nikita S. *et al.* Comprehensive study of nitrofuroxanoquinolines. New perspective donors of NO molecules. **Nitric Oxide**, v. 93, p. 15-24, 2019.

FERNANDEZ, C.A. **Tratado y atlas de vaginitis**. 2. ed. Barcelona: Sovat, 1986. p. 193-206.

FEITTOSA, C. F.; CONSOLARO, M.E.L. Tricomoniase: aspectos gerais e diagnóstico pela colpocitologia de papanicolaou. **Arquivos Ciência e Saúde Unipar, Umuarama**, v. 9, n. 3, p.199-206, 2005.

FIGUEROA-ANGULO, Elisa E. *et al.* The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. **Microbes and infection**, v. 14, n. 15, p. 1411-1427, 2012.

FORRESTER, D.J.; FOSTER, G.W. Trichomonosis. In: Atkinson, C.T.; Thomas, N.J.; Hunter, D.B. **Parasitic Diseases of Wild Birds**. 1 ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell. 2009. pp.120-153.

FORZAN, Maria J. *et al.* Trichomoniasis in finches from the Canadian Maritime provinces—an emerging disease. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 51, n. 4, p. 391, 2010.

FRANSEN, Fiona *et al.* Pharmacodynamics and differential activity of nitrofurantoin against ESBL-positive pathogens involved in urinary tract infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 10, p. 2883-2889, 2016.

FRANSEN, F. F. J.; LUMEIJ, J. T. In vitro nitroimidazole resistance of *Trichomonas gallinae* and successful therapy with an increased dosage of ronidazole in racing pigeons (*Columba livia domestica*). **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 15, n. 4, p. 409-415, 1992.

FRIEDHOFF, K. T. Pathogene, intestinale Flagellaten bei Tauben, Sittichen und Papageien. **Praktische Tierarzt**, v. 63, 1982.

GALLI, U *et al.* D.Synthesis and antimalarial activities of some furoxan sulfones and related furazans. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, p. 1335–1340, 2005.

GARCIA, A.F *et al.* Iron e contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. **Molecular Microbiology**, v. 47, p. 1207-24, 2003.

GARDINER, Bradley J. *et al.* Nitrofurantoin and fosfomycin for resistant urinary tract infections: old drugs for emerging problems. **Australian prescriber**, v. 42, n. 1, p. 14, 2019.

GASCO, A. *et al.* NO donors: Focus on furoxan derivatives. **Pure and Applied Chemistry**, v. 76, n. 5, p. 973 – 981, 2004.

GATSKI, Megan *et al.* Patient-delivered partner treatment and *Trichomonas vaginalis* repeat infection among human immunodeficiency virus-infected women. **Sexually transmitted diseases**, v. 37, n. 8, p. 502, 2010.

GATTI, Fabiane Aguiar dos Anjos *et al.* The prevalence of trichomoniasis and associated factors among women treated at a university hospital in southern Brazil. **PLoS One**, v. 12, n. 3, p. e0173604, 2017.

GHAZVINI, Hosseinali *et al.* Virulence factors and antimicrobial resistance in uropathogenic *Escherichiacoli* strains isolated from cystitis and pyelonephritis. **Turkish journal of medical sciences**, v. 49, n. 1, p. 361-367, 2019.

GIEDRAITIENE, Agne *et al.* CTX-M-producing *Escherichia coli* strains: resistance to temocillin, fosfomicin, nitrofurantoin and biofilm formation. **Future Microbiology**, v. 17, n. 10, p. 789-802, 2022.

GILANI, Sadaf Jamal *et al.* Synthesis of some derived thiazolidin-4-one, azetidin-2-one and 1, 3, 4-oxadiazole ring systems from Isonicotinic acid hydrazide: A novel class of potential anticonvulsant agents. **Der Pharmacia Letter**, v. 1, n. 2, p. 1-8, 2009.

GÓMEZ MUÑOZ, María Teresa *et al.* Oropharyngeal trichomonads in wild birds. **Jenkins, Owen P.(ed.)(2018). Advances in Animal Science and Zoology. Volume 11.**, 2018.

GÓMEZ MUÑOZ, María Teresa *et al.* Avian Oropharyngeal Trichomonosis: Treatment, Failures and Alternatives, a Systematic Review. **Microorganisms**, v. 10, n. 11, p. 2297, 2022.

GRABENSTEINER, E.; HESS, M. PCR for the identification and differentiation of *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* and *Blastocystis* spp. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3-4, p. 223-230, 2006.

GRABENSTEINER, Elvira *et al.* Molecular analysis of clonal trichomonad isolates indicate the existence of heterogenic species present in different birds and within the same host. **Veterinary Parasitology**, v. 172, n. 1-2, p. 53-64, 2010.

GRAM, I.T. *et al.* *Trichomonas vaginalis* (TV) e human papillomavirus (HPV) infection and the incidence of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) grade III. **Cancer Causes Control**, v. 3, p. 231-6, 1992.

GRAVES, Keonte J. *et al.* A systematic review of the literature on mechanisms of 5-nitroimidazole resistance in *Trichomonas vaginalis*. **Parasitology**, v. 147, n. 13, p. 1383-1391, 2020.

GROSTEIN, F.; GOLDMAN, M. B.; CRAMER D. W. Relation of tubal infertility to history of sexually transmitted diseases. **American Journal of Epidemiology**, v. 137, p. 577-584, 1993.

GUENTHNER, Patricia C.; SECOR, W. Evan; DEZZUTTI, Charlene S. *Trichomonas vaginalis*-induced epithelial monolayer disruption and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication: implications for the sexual transmission of HIV-1. **Infection and immunity**, v. 73, n. 7, p. 4155-4160, 2005.

GUNEYSEL, Ozlem *et al.* Trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in urinary tract infections. **The Journal of emergency medicine**, v. 36, n. 4, p. 338-341, 2009.

HAMILTON, M. A.; STABLER, R. M. Combined trichomoniasis and aspergillosis in a gyrfalcon. **Journal of the Colorado-Wyoming Academy of Science**, v. 4, p. 58-59, 1953..

HAQ, Kalsoom UI *et al.* Comparative efficacy of Norfloxacin, Clarithromycin and Cefpodoxime against experimentally induced colibacillosis in pigeons. **American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences**, v. 7, n. 2, p. 72-82, 2015.

HARITOVA, A. M.; LASHEV, L. D. Comparison of the pharmacokinetics of seven fluoroquinolones in mammalian and bird species using allometric analysis. **Bulgarian journal of veterinary medicine**, v. 12, n. 1, 2009.

HEINE, R.P *et al.* Polymerase chain reaction analysis of distal vaginal specimens: a less invasive strategy for detection of *Trichomonas vaginalis*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, p. 985-987, 1997.

HERDT PD, PASMANS F. 2009. 15 - PIGEONS. IN: TULLY TN, DORRESTEIN GM, JONES AK, COOPER JE, editors. **Handbook of Avian Medicine** (Second Edition). Edinburgh: W.B. Saunders. p. 350–376.

HERNÁNDEZ, H. *et al.* Monoclonal antibodies against a 62 kDa proteinase of *Trichomonas vaginalis* decrease parasite cytoadherence to epithelial cells and confer protection in mice. **Parasite Immunology**, v. 26, n. 3, p. 119-125, 2004.

HIGGINS, P. G.; FLUIT, A. C.; SCHMITZ, F. J. Fluoroquinolones: structure and target sites. **Current drug targets**, v. 4, n. 2, p. 181-190, 2003.

HO, Pak-Leung *et al.* Plasmid-mediated OqxAB is an important mechanism for nitrofurantoin resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 1, p. 537-543, 2016.

HOBBS M.M.; SEÑA A.C. Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. **Sexually Transmitted Infections**. v.89, n 6, p. 434–8. 2013.

HÖFLE, U *et al.* Outbreak of trichomoniasis in a woodpigeon (*Columba palumbus*) wintering roost. **European Journal of Wildlife Res**, v. 50, p. 73-77, 2004.

HOLMES, B.; BROGDEN, R. N.; RICHARDS, D. M. Norfloxacin: a review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. **Drugs**, v. 30, p. 482-513, 1985.

HOOPER, David C. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. **Emerging infectious diseases**, v. 7, n. 2, p. 337, 2001.

HOSNY, Alaa El-Dien MS *et al.* Association between preterm labor and genitourinary tract infections caused by *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, Gram-negative bacilli, and coryneforms. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 80, n. 9, p. 575-581, 2017.

HOWE, Katharine; KISSINGER, Patricia J. Single-dose compared with multidose metronidazole for the treatment of trichomoniasis in women: a meta-analysis. **Sexually transmitted diseases**, v. 44, n. 1, p. 30-35, 2017.

HUGHES, J.P., BAETEN, J.M., LINGAPPA, J.R., MAGARET, A.S., WALD, A., DE BRUYN, G., KIARIE, J., INAMBAO, M., KILEMBE, W., FARQUHAR, C. & CELUM, C. (2012). Determinants of per-coital-act HIV-1 infectivity among African HIV-1-serodiscordant couples. **Journal of Infectious Diseases**. 205(3). p. 358–365.

HUGHES, James P. *et al.* Determinants of per-coital-act HIV-1 infectivity among African HIV-1–serodiscordant couples. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 3, p. 358-365, 2012.

IAFIGLIOLA, M. C. *et al.* Cobre e antibiótico como promotores de crescimento em rações para frangos de corte. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 2, p. 201-208, 2000.

JALADI, S.; SALIH, Z.T.; **Trichomonas vaginalis**. PathologyOutlines.com website. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/cervixtrichomonasvaginalis.html>. Accessed March 6th, 2023.

JAQUETTE, D. S. Copper sulfate as a treatment for subclinical trichomoniasis in pigeons. 1948.

JONES, Travis M. *et al.* Focus on JNJ-Q2, a novel fluoroquinolone, for the management of community-acquired bacterial pneumonia and acute bacterial skin and skin structure infections. **Infection and Drug Resistance**, p. 119-128, 2016.

KALIA, Namarta; SINGH, Jatinder; KAUR, Manpreet. Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: a critical review. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 19, n. 1, p. 1-19, 2020.

KAUFMAN, Raymond H.; FARO, Sebastian; BROWN, Dale. Benign diseases of the vulva and vagina. **(No Title)**, 1989.

KAWAMURA, Nobuo. Activity of oral antiprotozoal agents against serially subcultured strains of *Trichomonas Vaginalis* and their synergic effects. **泌尿器科紀要**, v. 25, n. 7, p. 657-661, 1979.

KHARSANY, A. B. *et al.* The association between sexually transmitted pathogens and cervical intra-epithelial neoplasia in a developing community. **Sexually transmitted infections**, v. 69, n. 5, p. 357-360, 1993.

KHOSHBAYAN, Amin *et al.* Molecular determination of O25b/ST131 clone type among extended spectrum β -lactamases production *Escherichia coli* recovering from urinary tract infection isolates. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 21, n. 1, p. 35, 2022.

KIETZMANN JR, Glenn E. Relationships of *Trichomonas gallinae* to the palatal-esophageal junction of ring doves (*Streptopelia risoria*) as revealed by scanning electron microscopy. **The Journal of parasitology**, p. 408-415, 1993.

KINGSTON, M. A.; BANSAL, D.; CARLIN, E. M. 'Shelf life' of *Trichomonas vaginalis*. **International journal of STD & AIDS**, v. 14, n. 1, 2003.

KISSINGER, Patricia. J *et al.* Vaginal swabs versus lavage for detection of *Trichomonas vaginalis* and Bacterial Vaginosis among HIV-positive women. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 4, p. 227-230, 2005.

KISSINGER, Patricia *et al.* A randomized treatment trial: single versus 7-day dose of metronidazole for the treatment of *Trichomonas vaginalis* among HIV-infected

women. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 55, n. 5, p. 565-571, 2010.

KISSINGER, Patricia *et al.* Single-dose versus 7-day-dose metronidazole for the treatment of trichomoniasis in women: an open-label, randomised controlled trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 11, p. 1251-1259, 2018.

KOCAN, RICHARD M.; AMEND, SPENCER R. Immunologic status of mourning doves following an epizootic of trichomoniasis. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 8, n. 2, p. 176-180, 1972.

KOMP LINDGREN, Patricia *et al.* Pharmacodynamic studies of nitrofurantoin against common uropathogens. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 4, p. 1076-1082, 2015.

KRIEGER, John N.; REIN, Michael F. Zinc sensitivity of *Trichomonas vaginalis*: in vitro studies and clinical implications. **Journal of infectious Diseases**, v. 146, n. 3, p. 341-345, 1982.

KRONE, Oliver; ALTENKAMP, Rainer; KENNTNER, Norbert. Prevalence of *Trichomonas gallinae* in northern goshawks from the Berlin area of northeastern Germany. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, n. 2, p. 304-309, 2005.

KUCKNOOR, Ashwini S.; MUNDODI, Vasanthakrishna; ALDERETE, J. F. Adherence to human vaginal epithelial cells signals for increased expression of *Trichomonas vaginalis* genes. **Infection and immunity**, v. 73, n. 10, p. 6472-6478, 2005.

KULDA, Jaroslav; TACHEZY, Jan; ČERKASOVOVA, Apolena. In vitro induced anaerobic resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 262-269, 1993.

KULDA, J. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. **International Journal Parasitology**, v. 29, n. 2, p. 199-212, 1999.

KUREWA, Nyaradzai E. *et al.* The burden and risk factors of sexually transmitted infections and reproductive tract infections among pregnant women in Zimbabwe. **BMC infectious diseases**, v. 10, p. 1-8, 2010.

LAMP, Kenneth C. *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the nitroimidazole antimicrobials. **Clinical pharmacokinetics**, v. 36, p. 353-373, 1999.

LAT, Lat Htun *et al.* The effect of an antibiotic, Norfloxacin on the development of experimental *Ascaridia galli* infection in chicken. In: **Proceedings of the Annual Research Conference (Livestock and Fishery Sciences), Yangon, Myanmar, 4-6 May, 2001**. Myanmar Academy of Agricultural, Forestry, Livestock and Fishery Sciences, 2001. p. 147-156.

LAWSON, Becki *et al.* A clonal strain of *Trichomonas gallinae* is the aetiologic agent of an emerging avian epidemic disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 7, p. 1638-1645, 2011.

LECKE, Sheila B. *et al.* Perspective of a new diagnostic for human trichomonosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 273-276, 2003.

LEHKER, Michael W.; ALDERETE, John F. Biology of trichomonosis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 13, n. 1, p. 37-45, 2000.

LEITSCH, David. Recent advances in the *Trichomonas vaginalis* field. **F1000Research**, v. 5, 2016.

LEON, Segundo R. *et al.* *Trichomonas vaginalis* infection and associated risk factors in a socially-marginalized female population in coastal Peru. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 2009, 2009.

LESHER, George Y. *et al.* 1, 8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 5, p. 1063-1065, 1962.

LEVINE, N. D. Veterinary Protozoology, Iowa State Univ. **Press Ames Iowa**, 1985.

LEVISON, Matthew E.; LEVISON, Julie H. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibacterial agents. **Infectious Disease Clinics**, v. 23, n. 4, p. 791-815, 2009.

LIEBHART, D.; WEISSENBOCK, H.; HESS, M. In-situ hybridization for the detection and identification of *Histomonas meleagridis* in tissues. **Journal of comparative pathology**, v. 135, n. 4, p. 237-242, 2006.

LIMA, Ana Lucia Munhoz; KIFFER, Carlos Roberto Veiga. HIV/Aids: perguntas e respostas. In: **HIV/AIDS: perguntas e respostas**. 1996. p. 351-351.

LINZMEIER, Lissiane Geise *et al.* Uso de antibióticos em aves de produção. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 7, n. 12, 2009.

LÓPEZ, Luciene Bottentuit *et al.* Strategies by which some pathogenic trichomonads integrate diverse signals in the decision-making process. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 72, p. 173-186, 2000.

LUMEIJ, J.T.; ZWIJNENBERG, R.J.G. Failure of nitro-imidazole drugs to control trichomoniasis in the racing pigeon (*Columba livia domestica*). **Avian Pathology**, v. 19, n. 1, p. 165-166, 1990.

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

MACHADO, Y.T.; LÓPES, R.P.; MENESES A.M. **Aspectos Significativos de Trichomonas vaginalis**. Disponível em: www.monografias.com/trabajos16/trichomonasvaginalis/trichomonas-vaginalis.shtml - acesso em 29/05/2020.

MANN, Joshua R.; MCDERMOTT, Suzanne; GILL, Tariq. Sexually transmitted infection is associated with increased risk of preterm birth in South Carolina women insured by Medicaid. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 23, n. 6, p. 563-568, 2010.

MARIANTE, R. M., LOPES L. C; BENCHIMOL M. *Tritrichomonas foetus* pseudocysts adhere to vaginal epithelial cells in a contact-dependent manner. **Parasitology Research**, v. 92, p. 303–312, 2004.

MARQUES-SILVA, M. *et al.* Trichomonas vaginalis and growing concern over drug resistance: a systematic review. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 35, n. 10, p. 2007-2021, 2021.

MARTÍNEZ, Jenny Paola Hidalgo *et al.* First reported case of Trichomonas gallinae infection in red-breasted toucan (Ramphastos dicolorus). **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 47, p. 100962, 2024.

MARTÍNEZ HERRERO, M. C. *et al.* Oral trichomonosis: Description and severity of lesions in birds in Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 283, p. 109196, 2020.

MASHA, Simon Chengo *et al.* Trichomonas vaginalis and HIV infection acquisition: a systematic review and meta-analysis. **Sexually transmitted infections**, v. 95, n. 1, p. 36-42, 2019.

MAYER, Bernd; HEMMENS, Benjamin. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. **Trends in biochemical sciences**, v. 22, n. 12, p. 477-481, 1997.

MAYER, Joao CP *et al.* Ferrocenylethenyl-substituted 1, 3, 4-oxadiazolyl-1, 2, 4-oxadiazoles: Synthesis, characterization and DNA-binding assays. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 841, p. 1-11, 2017.

MCCRACKEN, R. J.; KENNEDY, D. G. Detection, accumulation and distribution of nitrofurantoin residues in egg yolk, albumen and shell. **Food additives and contaminants**, v. 24, n. 1, p. 26-33, 2007.

MCDUGALD, L. R. *et al.* Histomoniasis (Blackhead) and other protozoan diseases of the intestinal tract. **Diseases of poultry**, v. 12, p. 1095-1105, 2008.

MEITES, Elissa *et al.* 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.

MEITES, Elissa; WORKOWSKI, Kimberly A. Trichomonas vaginalis. In: **Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases**. Elsevier, 2018. p. 1364-1366. e2.

MELO, J.O.F. Heterociclos 1,2,3- triazólicos: Histórico, Métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Química Nova**, v.29, n.3, p. 569 – 579, 2006

MENDOZA LÓPEZ, M. Remedios *et al.* CP30, a cysteine proteinase involved in Trichomonas vaginalis cytoadherence. **Infection and immunity**, v. 68, n. 9, p. 4907-4912, 2000.

MENDZ, George L.; MÉGRAUD, Francis. Is the molecular basis of metronidazole resistance in microaerophilic organisms understood?. **Trends in microbiology**, v. 10, n. 8, p. 370-375, 2002.

MENEZES, Camila Braz; TASCA, Tiana. Trichomoniasis immunity and the involvement of the purinergic signaling. **Biomedical journal**, v. 39, n. 4, p. 234-243, 2016.

MERCER, Frances; JOHNSON, Patricia J. Trichomonas vaginalis: pathogenesis, symbiont interactions, and host cell immune responses. **Trends in parasitology**, v. 34, n. 8, p. 683-693, 2018.

.

MILLER, Maureen *et al.* HIV, the clustering of sexually transmitted infections, and sex risk among African American women who use drugs. **Sexually transmitted diseases**, p. 696-702, 2008.

MIRANDA, Angelica E.; PINTO, Valdir M.; GAYDOS, Charlotte A. Trichomonas vaginalis infection among young pregnant women in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, p. 669-671, 2014.

MONTEIRO, S.G. **Parasitologia na Medicina Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Roca Ltda, 2017.

MOODLEY, Prashini; CONNOLLY, Cathy; STURM, A. Willem. Interrelationships among human immunodeficiency virus type 1 infection, bacterial vaginosis, trichomoniasis, and the presence of yeasts. **The Journal of infectious diseases**, v. 185, n. 1, p. 69-73, 2002.

MORENO-BRITO, Verónica *et al.* A Trichomonas vaginalis 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate: ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron. **Cellular microbiology**, v. 7, n. 2, p. 245-258, 2005.

MOSCA, V.A.B.; MENDONÇA, P.S. Tricomoníase e outras vulvovaginites em mulheres atendidas em unidades básicas de saúde de Mandaguari. **Revista Uningá Review**, Paraná, v. 28, p. 47-51, 2016.

MOSTEGL, M.M *et al.* Design and validation of an oligonucleotide probe for the detection of protozoa from the order Trichomonadida using chromogenic in situ hybridization. **Veterinary Parasitology**, v. 171, n. 1-2, p. 1-6, 2010.

MTSHALI, Andile *et al.* In vitro effect of 5-nitroimidazole drugs against Trichomonas vaginalis clinical isolates. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 4, p. e00912-22, 2022.

MÜLLER, M. Reductive activation of nitroimidazoles in anaerobic 4871 microorganisms. **Biochemical Pharmacology**, v. 35, n. 1, p. 37-41, 1986.

MUNOZ, E.; CASTELLA, J.; GUTIERREZ, J. F. In vivo and in vitro sensitivity of Trichomonas gallinae to some nitroimidazole drugs. **Veterinary parasitology**, v. 78, n. 4, p. 239-246, 1998.

MUZNY, Christina A. *et al.* Trichomonas vaginalis nucleic acid amplification testing at an urban HIV clinic. **Sexually transmitted diseases**, v. 43, n. 8, p. 483-488, 2016.

NEIMANIS, Aleksija S. *et al.* First report of epizootic trichomoniasis in wild finches (family Fringillidae) in southern Fennoscandia. **Avian diseases**, v. 54, n. 1, p. 136-141, 2010.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2016.

NICHELATTI, Ana Luiza *et al.* Ocorrência de Candida spp. e Trichomonas vaginalis em mulheres no Sul do Brasil: Casos de importância em saúde pública nos dias atuais. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2021.

NIEDRINGHAUS, Kevin D. *et al.* Trichomonosis due to Trichomonas gallinae infection in barn owls (Tyto alba) and barred owls (Strix varia) from the eastern United States. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 16, p. 100281, 2019.

NORRBY, S. Ragnar; JONSSON, Monica. Antibacterial activity of norfloxacin. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v. 23, n. 1, p. 15-18, 1983.

NYE, Melinda B.; SCHWEBKE, Jane R.; BODY, Barbara A. Comparison of APTIMA Trichomonas vaginalis transcription-mediated amplification to wet mount microscopy, culture, and polymerase chain reaction for diagnosis of trichomoniasis in men and women. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 200, n. 2, p. 188. e1-188. e7, 2009.

OHKAWA, Hiroshi; OHISHI, Nobuko; YAGI, Kunio. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OVANDO, H. García *et al.* Simultaneous quantification of ciprofloxacin, enrofloxacin and balofloxacin in broiler chicken muscle. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 36, n. 1, p. 93-98, 2004.

PAL, Chinmay; BANDYOPADHYAY, Uday. Redox-active antiparasitic drugs. **Antioxidants & redox signaling**, v. 17, n. 4, p. 555-582, 2012.

PARK, Hyoung-Ryun; KIM, Tae Heung; BARK, Ki-Min. Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments. **European journal of medicinal chemistry**, v. 37, n. 6, p. 443-460, 2002.

PARK, F. J. Avian trichomoniasis: a study of lesions and relative prevalence in a variety of captive and free-living bird species as seen in an Australian avian practice. **Australian veterinary journal**, v. 89, n. 3, p. 82-88, 2011.

PASTEL, D. Focus on oral ciprofloxacin; clinical and economic considerations. **Hospital Pharmacy**, v. 24, n. 10, p. 814-20, 823, 1989.

PAULAI, Fávero Reisdorfer; SERRANO, Silvia Helena Pires; TAVARES, Leoberto Costa. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Química Nova**, v. 32, p. 1013-1020, 2009.

PENG, X. M.; CAI, G. X.; ZHOU, C. H. Recent developments in azole compounds as antibacterial and antifungal agents. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 13, n. 16, p. 1963 – 2010, 2013.

PEREIRA, C.; ALMEIDA, W. F. Sobre a verdadeira natureza das “formas ameboides”, dos pretensos “cistos” e formas “degenerativas” no gênero “*Trichomonas* Donné, 1836”. *Arch. Inst. Biol*, v. 11, p. 347-366, 1940.

PEREIRA NEVES, Antonio *et al.* Identification of *Tritrichomonas foetus* pseudocysts in fresh preputial secretion samples from bulls. *Veterinary parasitology*, v. 175, n. 1-2, p. 1-8, 2011.

PEREIRA NEVES, Antonio; NASCIMENTO, Ligia Ferreira; BENCHIMOL, Marlene. Cytotoxic effects exerted by *Tritrichomonas foetus* pseudocysts. *Protist*, v. 163, n. 4, p. 529-543, 2012.

PETERMAN, Thomas A. *et al.* Persistent, undetected *Trichomonas vaginalis* infections?. *Clinical Infectious Diseases*, v. 48, n. 2, p. 259-260, 2009.

PETMITR, Porntip Chavalitsheewinkoon; RAMDJA, Muhaimin; KAJORNDECHAKIAT, Somsri. In vitro sensitivity of *Trichomonas vaginalis* to DNA topoisomerase II inhibitors. *Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, v. 31, n. 1, p. 118-122, 2000.

PETRIN, Dino *et al.* Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical microbiology reviews*, v. 11, n. 2, p. 300-317, 1998.

PHILLIPS, M. A.; STANLEY, S. L. Chemotherapy of protozoal infections. **Goodman & Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics (Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, eds). 11th ed. Available: <http://www.accessmedicine.com/content.aspx>, 2006.**

POOLE, Danielle N.; MCCLELLAND, R. Scott. Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. *Sexually transmitted infections*, v. 89, n. 6, p. 418-422, 2013.

PRADINES, Bruno *et al.* In vitro activities of antibiotics against *Plasmodium falciparum* are inhibited by iron. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 45, n. 6, p. 1746-1750, 2001.

QUON, D.-V.; D'OLIVEIRA, Christine E.; JOHNSON, Patricia J. Reduced transcription of the ferredoxin gene in metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 89, n. 10, p. 4402-4406, 1992.

RACE, Paul R. *et al.* Structural and mechanistic studies of *Escherichia coli* nitroreductase with the antibiotic nitrofurazone: Reversed binding orientations in different redox states of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 14, p. 13256-13264, 2005.

RAETHER, W.; HÄNEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasitology Research*, v. 90, p. S19-S39, 2003.

RE, Roberta *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REECE, R. L. *et al.* Investigations of toxicity episodes involving chemotherapeutic agents in Victorian poultry and pigeons. **Avian Diseases**, p. 1239-1251, 1985.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 404 p.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 424 p.

RIGO, Graziela V.; TASCA, Tiana. Vaginitis: Review on drug resistance. **Current Drug Targets**, v. 21, n. 16, p. 1672-1686, 2020.

RIBEIRO, Luiz Carlos; SANTOS, Carlos; BENCHIMOL, Marlene. Is *Trichomonas tenax* a parasite or a commensal?. **Protist**, v. 166, n. 2, p. 196-210, 2015 .

RILEY, Donald E. *et al.* Development of a polymerase chain reaction-based diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 465-472, 1992.

RISSARDO, Jamir Pitton; CAPRARA, Ana Letícia Fornari. Fluoroquinolone-Associated Movement Disorder: A Literature Review. **Medicines**, v. 10, n. 6, p. 33, 2023.

ROBERT, J. Saúde pública, Aids e prostituição. **NAUD P. Doenças sexualmente transmissíveis e Aids. Porto Alegre: Artes Médicas Sul**, p. 287-288, 1993.

ROESLER, Roberta *et al.* Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Food Science and Technology**, v. 27, p. 53-60, 2007.

ROJAS, Lazara; FRAGA, Jorge; SARIEGO, Idalia. Genetic variability between *Trichomonas vaginalis* isolates and correlation with clinical presentation. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 4, n. 1, p. 53-58, 2004.

ROSENWALD, A. S. Veterinary problems in a signal pigeon company. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 104, p. 141-143, 1944.

ROWLEY, Jane *et al.* Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 97, n. 8, p. 548, 2019.

SAGGESE, Miguel D. *et al.* Gross and microscopic findings and investigation of the aetiopathogenesis of mycobacteriosis in a captive population of white-winged ducks (*Cairina scutulata*). **Avian Pathology**, v. 36, n. 5, p. 415-422, 2007.

SAMOUR, J.; BAILEY, T.; COOPER, J. Trichomoniasis in birds of prey (order Falconiformes) in Bahrain. **Veterinary Record**, v. 136, n.14, p.358-62, 1995.

SÁNCHEZ, R.E.; SANSANO, M.J. **Prevalencia de Tricomonos en Palomas de la Comunidad Valenciana**. Comunicação apresentada no III Congresso Internacional de Estudantes de Ciências Experimentais e da Saúde da Universidade Cardenal Herrera, Valência. 2006.

SANCHEZ, Guillermo V. *et al.* In vitro antimicrobial resistance of urinary *Escherichia coli* isolates among US outpatients from 2000 to 2010. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 2181-2183, 2012.

SANSANO, J., GÓMEZ, M.T., GERIQUEL, C.; GARIJO, M.M. **Presence of Trichomonas gallinae in Birds of Prey from the Comunidad Valenciana (Spain)**. Comunicação apresentada no IX Congresso Ibérico de Parasitologia, Coimbra. 2005.

SANSANO, J.; GARIJO, M.M.; GÓMEZ, M.T. **Prevalencia y Ribotipado de Trichomonas gallinae en Palomas y Aves de Presa en la Comunidad Valenciana**. Comunicação apresentada no X Congresso Ibérico de Parasitologia, Madrid. 2007.

SANSANO-MAESTRE, Jose; GARIJO-TOLEDO, María Magdalena; GÓMEZ-MUÑOZ, María Teresa. Prevalence and genotyping of *Trichomonas gallinae* in pigeons and birds of prey. **Avian Pathology**, v. 38, n. 3, p. 201-207, 2009.

SANTANA, Eliete *et al.* Uso de antibióticos e quimioterápicos na avicultura. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 12, 2011.

SANTOS, M. C.; GALVAN, F.B.; ROSA, M.F. **Emprego de Métodos Fotolíticos e Fotocatalíticos na degradação do antibiótico norfloxacino**. XII Congresso Nacional de Meio Ambiente de Poços de Caldas – Minas Gerais, 2014

SANTOS, Carolina.C. **Infecção por Trichomonas vaginalis em mulheres de baixa renda de Pelotas**. 2017. 42f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas), Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

SARKOEZY, G. S. I. U. *et al.* Quinolones: a class of antimicrobial agents. **Veterinari Medicina**, v. 46, n. 9-10, p. 257-274, 2001.

SASTRY, Srinivas S.; JAYARAMAN, R. Nitrofurantoin-resistant mutants of *Escherichia coli*: Isolation and mapping. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 196, p. 379-380, 1984.

SAYED EL-WAKIL, H. *et al.* A preliminary study on the relationship between *Trichomonas vaginalis* and cervical cancer in Egyptian women. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 32, n. 1, p. 167-178, 2002.

SAYED EL-AHL, S.A *et al.* Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of schistosomiasis. **Nature Medicine**, v. 14, n.4, p. 408-412. 2008.

SCHEE, C. V. D. *et al.* Improved Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* Infection by PCR Using Vaginal Swabs and Urine Specimens Compared to Diagnosis by Wet Mount Microscopy, Culture, and Fluorescent Staining. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 12, p. 4127-4130, 1999.

SCHMIDT G.D.R; LARRY S. Foundations of Parasitology. EUA, **Wm. C. Brown Publishers**.v. 37, n. 12, p. 4127–4130, 1999.

SCHWEBKE, Jane R.; BURGESS, Donald. Trichomoniasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 17, n. 4, p. 794-803, 2004.

SENA-LOPES, Ângela *et al.* Antiparasitic activity of 1, 3-dioxolanes containing tellurium in Trichomonas vaginalis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 284-287, 2017.

SHAFI, Sadat *et al.* Tackling the emerging Artemisinin-resistant malaria parasite by modulation of defensive oxido-reductive mechanism via nitrofurantoin repurposing. **Biochemical Pharmacology**, v. 215, p. 115756, 2023.

SHAH, R. R.; WADE, G. Reappraisal of the risk/benefit of nitrofurantoin: review of toxicity and efficacy. **Adverse drug reactions and acute poisoning reviews**, v. 8, n. 4, p. 183-201, 1989.

SHARMA, Prabodh Chander *et al.* Ciprofloxacin: review on developments in synthetic, analytical, and medicinal aspects. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 25, n. 4, p. 577-589, 2010.

SILVA, J. M. B.; HOLLENBACH, C. B. Fluoroquinolonas x Resistência bacteriana na medicina veterinária. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 363-369, 2020.

SILVA, T.E.S. **Estudo da prevalência e do impacto da tricomonose em aves silvestres**. 2017. 43 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2017.

SILVER, Bronwyn J. *et al.* Trichomonas vaginalis as a Cause of Perinatal Morbidity. **Sexually transmitted diseases**, v. 41, n. 6, p. 369-376, 2014.

SINGER, Randall S.; HOFACRE, Charles L. Potential impacts of antibiotic use in poultry production. **Avian diseases**, v. 50, n. 2, p. 161-172, 2006.

SINGH, A. K.; SINGH, J. Anti-Diabetic Effect Of Flacourtia Jangomas Extract in Alloxan-Induced Diabetic Rats. **Pharmacology online**, v. 2, p. 253-259, 2010.

SOBEL, J. D.; NYIRJESY, P.; BROWN, W. Tinidazole therapy for metronidazoleresistant vaginal trichomoniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n.8, p.1341-1346, 2001.

SOLIMAN, Dayana; DALZUCHIO, Thaís. Prevalência de Trichomonas vaginalis em mulheres no Brasil. **Revista Cereus**, v. 15, n. 1, p. 133-147, 2023.

SOUSA, M. C.; POIARES-DA-SILVA, J. The cytotoxic effects of ciprofloxacin in Giardia lamblia trophozoites. **Toxicology in vitro**, v. 15, n. 4-5, p. 297-301, 2001.

SOUZA, Marcus VN. New fluoroquinolones: a class of potent antibiotics. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 5, n. 11, p. 1009-1017, 2005.

SQUADRITO, Francis J.; DEL PORTAL, Daniel. Nitrofurantoin. In: **StatPearls [Internet]**. StatPearls Publishing, 2022.

STABLER, Robert M. Protection in pigeons against virulent *Trichomonas gallinae* acquired by infection with milder strains. **The Journal of Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 150-153, 1948.

STABLER, Robert M. *Trichomonas gallinae*: a review. **Experimental parasitology**, v. 3, n. 4, p. 368-402, 1954.

STARY, Angelika; KUCHINKA-KOCH, Angelika; TEODOROWICZ, Lilianna. Detection of *Trichomonas vaginalis* on modified Columbia agar in the routine laboratory. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3277-3280, 2002.

SUTTON, Madeline *et al.* The prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection among reproductive-age women in the United States, 2001–2004. **Clinical infectious diseases**, v. 45, n. 10, p. 1319-1326, 2007.

SZARMACH, H. *et al.* Trichomoniasis of the urogenital tract in patients hospitalized in 1976-1983. **Zeitschrift fur Hautkrankheiten**, v. 60, n. 3, p. 261-4, 269, 1985.

SWINNERTON, K. J. *et al.* The incidence of the parasitic disease trichomoniasis and its treatment in reintroduced and wild Pink Pigeons *Columba mayeri*. **Ibis**, v. 147, n. 4, p. 772-782, 2005.

SWYGARD, H. *et al.* Trichomoniasis: clinical manifestations, diagnosis and management. **Sexually transmitted infections**, v. 80, n. 2, p. 91-95, 2004.

TABILE, P. M. *et al.* Clinical characteristics and prevalence of vulvovaginitis in a clinic in the interior of the Rio Rio Grande do Sul. **J Health Biol S**, v. 4, p. 160-165, 2016.

TASCA, T.; DE CARLI, G.A. ***Trichomonas gallinae***. In: Animal health and Production Compendium. Wallingford: CAB International, Oxfordshire, v. 1, p. 1-20, 2006.

TAYLOR, A. P. *et al.* Modern advances in heterocyclic chemistry in drug discovery. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 14, n. 28, p. 6611 – 6637, 2016.

TODRES, Zory Vlad. **Chalcogenadiazoles: Chemistry and Applications**. CRC Press, 2011.

TRACY, JW. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections. **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**, p. 965-985, 1996.

TULARA, Neeraj Kumar. Nitrofurantoin and fosfomycin for extended spectrum beta-lactamases producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of global infectious diseases**, v. 10, n. 1, p. 19, 2018.

QUEIRÓZ, S. L.; BATISTA, A. Z. Funções Biológicas do Óxido Nítrico. **Química Nova**. v. 22, n. 4, p. 584-590, 1999.

UPCROFT, Jacqueline A. *et al.* Metronidazole resistance in *Trichomonas vaginalis* from highland women in Papua New Guinea. **Sexual Health**, v. 6, n. 4, p. 334-338, 2009.

URQUHART, George M. *et al.* Parasitologia veterinária. 2001.

VAN DER POL, Barbara *et al.* *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. **The Journal of infectious diseases**, v. 197, n. 4, p. 548-554, 2008.

VAN GERWEN, Olivia T.; MUZNY, Christina A. Recent advances in the epidemiology, diagnosis, and management of *Trichomonas vaginalis* infection. **F1000Research**, v. 8, 2019.

VAN GERWEN, Olivia T. *et al.* Trichomoniasis and adverse birth outcomes: a systematic review and meta-analysis. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 128, n. 12, p. 1907-1915, 2021.

VAN DE WIJGERT, Janneke HHM *et al.* Disentangling contributions of reproductive tract infections to HIV acquisition in African Women. **Sexually transmitted diseases**, p. 357-364, 2009.

VERDEROSA, Anthony D. *et al.* Ciprofloxacin-nitroxide hybrids with potential for biofilm control. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 138, p. 590-601, 2017.

VERTERAMO, Rosita *et al.* *Trichomonas vaginalis* infection: risk indicators among women attending for routine gynecologic examination. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 34, n. 2, p. 233-237, 2008.

VIEIRA, P. M. A. **Participação do Óxido Nítrico na Infecção Experimental de cães pelo *Trypanosoma cruzi***. 2007. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto. 2007.

VOGEL, K. (1992). Trichomoniasis. In **Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels** (ed. Heider, G. and Monreal, G.), pp. 352–363. Gustav Fischer Verlag, Jena, Germany.

ZADRAVEC, Marko *et al.* Trichomonosis outbreak in a flock of canaries (*Serinus canaria* f. *domestica*) caused by a finch epidemic strain of *Trichomonas gallinae*. **Veterinary parasitology**, v. 239, p. 90-93, 2017.

ZAREEF, M *et al.* Synthesis And Antimalarial Activity of Novel Chiral And Achiral Benzenesulfonamides Bearing 1, 3, 4-Oxadiazole Moieties. **Journal Of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 301-308, 2007.

ZHANG, Zuo-Feng; BEGG, Colin B. Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasia? Results from a combined analysis of 24 studies. **International Journal of Epidemiology**, v. 23, n. 4, p. 682-690, 1994.

ZHANG, GUI-FU *et al.* 4-Quinolone derivatives and their activities against Gram positive pathogens. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 710-723, 2018.

ZIMREGRABENSTEINER, Elvira *et al.* Genetically different clonal isolates of *Trichomonas gallinae*, obtained from the same bird, can vary in their drug susceptibility, an in vitro evidence. **Parasitology international**, v. 60, n. 2, p. 213-215, 2011.

WAN, Yu *et al.* Alterations in chromosomal genes *nfsA*, *nfsB*, and *ribE* are associated with nitrofurantoin resistance in *Escherichia coli* from the United Kingdom. **Microbial Genomics**, v. 7, n. 12, 2021.

WENDEL, Karen A.; WORKOWSKI, Kimberly A. Trichomoniasis: challenges to appropriate management. **Clinical infectious diseases**, v. 44, n. Supplement_3, p. S123-S129, 2007.

WØLNER-HANSEN, Pål *et al.* Clinical manifestations of vaginal trichomoniasis. **Jama**, v. 261, n. 4, p. 571-576, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.* **Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections-2008**. World Health Organization, 2012.

WORKOWSKI, Kimberly A.; BOLAN, Gail A. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. **MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports**, v. 64, n. RR-03, p. 1, 2015.

WORKOWSKI, Kimberly A. *et al.* Sexually transmitted infections treatment guidelines, 2021. **MMWR Recommendations and Reports**, v. 70, n. 4, p. 1, 2021.

YARLETT, Nigel; YARLETT, Nuriza C.; LLOYD, David. Metronidazole-resistant clinical isolates of *Trichomonas vaginalis* have lowered oxygen affinities. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 19, n. 2, p. 111-116, 1986.

YEO, Seon-Ju *et al.* In vitro and in vivo effects of nitrofurantoin on experimental toxoplasmosis. **The Korean Jour**

ANEXOS

Activity of compounds derived from benzofuroxan in *Trichomonas vaginalis*

Marjorie de Giacometti^a, João Cândido Pilar Mayer^b, Alexia Brauner de Mello^a,
Yan Wahast Islabão^a, Adriane Leites Strothmann^c, Renata Nobre da Fonseca^d,
Ângela Sena-Lopes^c, Luciano Dornelles^b, Sibeles Borsuk^c, Silvia de Oliveira Hübner^d,
Camila Belmonte Oliveira^{a,*}

^a Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

^b Department of Chemistry, Lactofen-Núcleo, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^c Center for Technological Development, Biotechnology, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

^d Department of Preventive Veterinary, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Trichomonadidae
Flagellated protozoa
Synthetic compounds
Heterocycles
Human trichomoniasis

ABSTRACT

Trichomoniasis is a sexually transmitted infection caused by the protozoan *Trichomonas vaginalis*. Currently, trichomoniasis is treated with the class of nitroimidazoles, namely, metronidazole; however, resistant isolates and strains have been reported. The compounds derived from benzofuroxan are biologically active heterocycles. This study evaluated the *in vitro* antiparasitic activity of these compounds in trophozoites of *T. vaginalis* and determined the mean inhibitory concentration (IC₅₀), minimum inhibitory concentration (MIC), mortality curve, and cytotoxicity. The compounds were named EH1, EH2, EH3, and EA2 and tested in various concentrations: 100 to 15 μ M (EH1 and EH2); 100 to 5 μ M (EH3); and 100 to 25 μ M (EA2), respectively. The greatest efficacy was observed in the highest concentrations in 24 h, with inhibition of approximately 100% of trophozoites. Compounds EH2 and EH3 had the lowest MIC: EH2 (35 μ M) and EH3 (45 μ M), with IC₅₀ of 11.33 μ M and 6.83 μ M, respectively. Compound EA2 was effective at the highest concentrations. The activity of the compounds in *T. vaginalis* started in the first hour of incubation with 90% inhibition; after 12 h, inhibition > 95% was observed. Compound EH1 showed the lowest activity, with the highest activity between 12 and 24 h after incubation. These results demonstrate that benzofuroxan derivatives are promising compounds for the *in vitro* treatment of *T. vaginalis*.

1. Introduction

Trichomonas vaginalis is a flagellate protozoan responsible for trichomoniasis (Kissinger, 2015). Currently, this non-viral sexually transmitted infection is the highest prevalence. According to estimates from the World Health Organization, there are 156 million cases globally (World Health Organization, 2012; Rowley et al., 2019). This disease affects the urogenital system of men and women and mainly causes vaginitis, urethritis, cervicitis, and genital ulceration (Holmes et al., 2008; Rowley et al., 2019). Trichomoniasis is related to several risk factors, including personal hygiene, unprotected sex, phase of the estrous cycle, bacterial vaginosis, and socioeconomic conditions (Mielczarek and Blaszkowska, 2016; Mirzadeh et al., 2021). Patients infected with *T. vaginalis* are at an increased risk of acquiring the human immunodeficiency virus (HIV), which may enhance genital

dissemination of the virus (McClelland et al., 2007; Shunu and Mushayabasa, 2015). Furthermore, HIV may interfere with the diagnosis of trichomoniasis or reduce the effectiveness of trichomoniasis treatment, increasing susceptibility to infection (Masha et al., 2019; Lawrence et al., 2021).

The recommended drug class for treating trichomoniasis is 5-nitroimidazoles. According to the United States Food and Drug Administration, only metronidazole (MTZ) and tinidazole are approved for treating trichomoniasis, and the standard treatment has not changed since 1960 (Davel et al., 1960; Sylvestre et al., 1960). MTZ is the standard drug used to control trichomoniasis, and although the cure rate is satisfactory, treatment failures and the development of drug-resistant strains have been reported. The estimated resistance to MTZ is 29–10% (Schweblé and Barrientes, 2006; Kirkcaldy et al., 2012). Their mechanism of action is not fully understood. MTZ penetrates by passive diffusion and is activated in the hydrogenosomes of *T. vaginalis*. After the reductive

* Corresponding author.

E-mail address: camilabelmonteoliveira@yahoo.com.br (C.B. Oliveira).

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2023.108601>

Received 19 May 2023; Received in revised form 8 August 2023; Accepted 19 August 2023

Available online 23 August 2023

0014-4894/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviation

MTZ	Metronidazole
BZX	Benzofuroxan-derived
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration
MIC	Minimum inhibitory concentration
SD	standard deviation
NO	Nitric oxide
NMR	Nuclear magnetic resonance spectroscopy
DMSO	Dimethylsulfoxide
TvLDH	<i>T. vaginalis</i> lactate dehydrogenase
TvGPC	Guthrie-like cysteine protease
ATCC	American Type Culture Collection
TYM	Trypsin-yeast extract-maltose
SBS	bovine serum
Cl	Chlorine molecule
OCH ₃	Methoxy group
NH	Amino group
LDH	Lactate dehydrogenase

activation of its nitro group and the reduction of the parasite's ferredoxin, MTZ generates a toxic nitro radical that leads to the death of the protozoan (Lofmark et al., 2010).

Benzofuroxan compounds (BZX) are heterocycles that exhibit biological activity relevant to trichomoniasis (Barreiro, 1991; Melo et al., 2006; Dewangan et al., 2010). Benzofuroxan compounds can generate reactive oxygen/nitrogen species, including nitric oxide (NO) (Bisani et al., 2006). The antiparasitic activity of NO has been reported against protozoa of the genera *Plasmodium* sp., *Leishmania* sp., and *Trypanosoma cruzi* (Galli et al., 2005; Olea-Azar et al., 2005; Bisani et al., 2006). Due to the presence of the subunit $=N(-O)O$ in BZX, perceiving electron acceptor characteristics similar to those of aromatic nitro compounds (N-oxides) used with bio-reductively activated antitumor and cytotoxic properties is possible (Jorge et al., 2013). Similarly, BZX derivatives have similarities with N-oxides, such as reactions with electron-transferring flavoenzymes. Thus, the BZX system is a promising alternative for treating trichomoniasis. Therefore, this study aimed to evaluate the in vitro activity of four BZX: EA2, EH1, EH2, and EH3.

2. Materials and methods

2.1. General considerations

Synthetic reactants were commercially purchased from Sigma-Aldrich®, Merck®, TCI®, and Alfa-Aesar®. Solvents were treated according to standard procedures. ¹H and ¹³C Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) analyses were performed at the Chemistry Department of the Federal University of Santa Maria (Rio Grande do Sul, Brazil) by using a Bruker Avance III HD NMR spectrometer. All NMR spectra were recorded in deuterated solvents (CDCl₃ and dimethylsulfoxide (DMSO)-d₆) by using tetramethylsilane (TMS) as a reference (singlet, 0.00 ppm). The results are shown in ppm. Elemental Analysis % (CHN) analysis was obtained at the University of São Paulo (São Paulo, Brazil) using a Perkin-Elmer CHN% 2400e. Melting points were recorded in a Fusometer type MQAPP Melting Point apparatus (Micro-química®). Thin-layer chromatography was performed on 0.25 mm Merck® GF₂₅₄ silica plates, employing 254 nm ultraviolet light and iodine vapor or acidic hydromethanolic vanillin solution for visualization.

2.2. Compounds derived from benzofuroxans

The compounds used in this study were synthesized at the LabSelen-

NanoBio laboratory (Federal University of Santa Maria). They were named according to the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) nomenclature (Fig. 1) (unpublished data).

EA2: "6-((5-(4-methoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)(carbamoyl)benzo [c] (Kissinger, 2015; World Health Organization, 2012; Mielczarek and Blaszkowska, 2016)oxadiazole 1-oxide;

EH1: "6-(2-(3-(4-phenyl)-1,2,4-oxadiazole-5-carbonyl)benzo [c] (Kissinger, 2015; World Health Organization, 2012; Mielczarek and Blaszkowska, 2016)oxadiazole 1-oxide"

EH2: "6-(2-(3-(4-Methoxyphenyl)-1,2,4-oxadiazole-5-carbonyl)hydrazine-1-carbonyl)benzo [c] (Kissinger, 2015; World Health Organization, 2012; Mielczarek and Blaszkowska, 2016)oxadiazole 1-oxide";

EH3: "6-(2-(3-(4-Chlorophenyl)-1,2,4-oxadiazole-5-carbonyl)hydrazine-1-carbonyl)benzo [c] (Kissinger, 2015; World Health Organization, 2012; Mielczarek and Blaszkowska, 2016)oxadiazole 1-oxide"

2.3. Synthetic procedures

Compounds EH1 (Fig. 2. 7a), EH2 (Fig. 2. 7b), and EH3 (Fig. 2. 7c) were obtained using condensation between hydrazides 6a-e and benzofuroxan-6-carboxylic acid, 2 (Stabile et al., 2010; Mayer et al., 2017). Benzofuroxan-6-carboxylic acid (Fig. 2. 2) was prepared using sodium hypochlorite-promoted oxidation of 4-amino-3-nitrobenzoic acid (Fig. 2. 1), according to the literature (Haroun et al., 2001).

The three-step route to obtaining hydrazides (Fig. 2. 6a-c) was previously published by our group, along with spectroscopic data and other characterization results (Mayer et al., 2017). Nitriles were converted into amidoximes (Srivastava et al., 2009), which were condensed with ethyl oxalyl chloride, originating the ethyl 1,2,4-oxadiazole-5-carboxylates 5a-c (Huguet et al., 2012). Hydrazinolysis of the intermediate esters resulted in the production of hydrazides 6a-e (Huhtiniemi et al., 2006).

2.4. Synthesis of compounds EH1, EH2, EH3, and EA2

2.4.1. General procedure for the synthesis of diacylhydrazines

The synthesis of diacylhydrazines was performed as follows (Fig. 2. 7a-c) (Haroun et al., 2001; Srivastava et al., 2009; Huguet et al., 2012; Huhtiniemi et al., 2006): Triethylamine (2.5 mmol) and TBTU (0.55 mmol) were added to a 25 mL round-bottom flask containing a suspension of benzofuroxan-6-carboxylic acid (0.5 mmol) and the appropriate hydrazide 6a-c (0.5 mmol) in dichloromethane (5 mL). The mixture was stirred for 2 h at room temperature until the starting materials were consumed, as verified by Thin-layer chromatography (TLC). Next, 5 mL of aqueous HCl (2 mol. L⁻¹) was added, and the mixture was stirred for 5 min. The content was transferred to a separatory funnel containing dichloromethane (50 mL), and the organic phase was washed with aqueous 2 mol. L⁻¹ HCl (3 × 50 mL). The organic phase was dried over anhydrous magnesium sulfate and filtered; next, the solvent was removed under reduced pressure, resulting in diacylhydrazines (Fig. 2. 7a-c).

2.4.2. Synthesis of amide EA2

EA2 (Fig. 3. 10) was obtained through EDC-promoted amide coupling between carboxylic acid 2 and 5-(4-methoxyphenyl)-2-amino-1,3,4-oxadiazole, 9 (Elliot et al., 2006; Oquere and Taylor, 2006). Amino-1,3,4-oxadiazole 9 was prepared using the method of Niu et al. (2015).

In a round-bottom flask containing benzofuroxan-6-carboxylic acid 2 (0.5 mmol) and 2-amino-5-(4-methoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazole 9 (0.5 mmol) in a mixture of dichloromethane (5 mL) and acetonitrile (5 mL) under magnetic stirring, this study added EDC (0.6 mmol). After 2 h, the solvent was removed by rotary evaporation. Next, the crude solid was triturated in 5 mL water and then vacuum filtered and washed with an

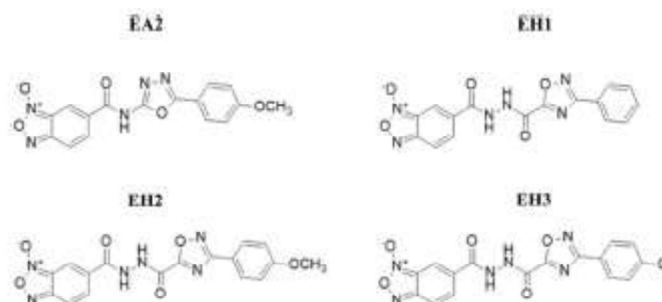


Fig. 1. Chemical structure of compounds used against *T. vaginalis*: EA2, EH1, EH2, EH3.

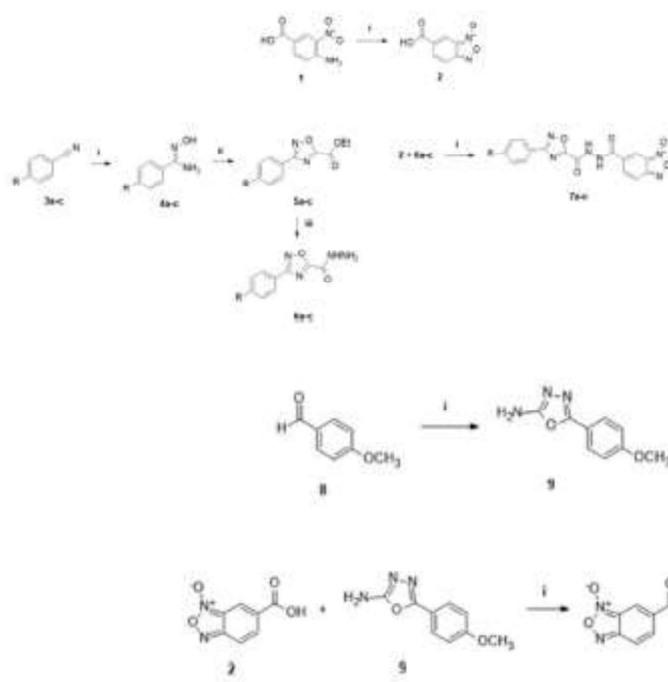


Fig. 3. Conditions for obtention of amide-1,3,4-oxadiazole (9): i) **8** (5 mmol), $\text{NH}_2\text{NHC(O)NH}_2\text{-HCl}$ (5 mmol), AcONa (5.5 mmol), MeOH , rt, 15 min, solvent removal. Then, I_2 (5.5 mmol), K_2CO_3 (10 mmol), dioxane (15 mL), 101°C , 15 h. Yield: 76%. Conditions for obtention of amide EA2: i) **2** (0.5 mmol), (**9**) (0.5 mmol), EDC (0.6 mmol), DCM (5 mL), MeCN (5 mL), rt, 1 h.

additional 10 mL water. The resulting solid was transferred to a round-bottom flask, and ethyl acetate (30 mL) was added. The solvent was removed under reduced pressure, producing the amide (Fig. 3. 10) (EA2).

2.5. Molecular docking

The EH3 compound was used for molecular docking because it has a lower half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) than the other

Fig. 2. Obtention of benzo[*f*]furan-6-carboxylic acid. Conditions: i) a) potassium hydroxide (KOH), EtOH , 70°C , 15 min. b) $\text{NaClO}_{4(\text{aq})}$, $0-5^\circ\text{C}$, 1 h. c) $\text{HCl}_{(\text{aq})}$, $\text{pH} < 2$. Yield: 75% (1 and 2). Route for obtention of hydrazides (6a-c). Conditions: i) $\text{NH}_2\text{OH-HCl}$, NaOH , $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$, rt, 15 a 20 h ii) $\text{EtO}_2\text{CCl(O)Cl}$, DIPEA , THF , reflux, 2 h iii) $\text{N}_3\text{H}_4\text{-H}_2\text{O}$, EtOH , rt, 1 h RjH (a), OCH_3 (b), Cl (c). Conditions for acquisition of diacylhydrazines (7a-c. i) **2** (0.5 mmol), 6a-c (0.5 mmol), Et_3N (5 eq.), TBUT (1.1 eq.), dichloromethane (5 mL), rt, 2 h.

compounds. The crystal structure of *T. vaginalis* lactate dehydrogenase (TvLDH; PDB 5A1T) from the RCSB protein database (<http://www.rcsb.org/>) was used. The structure of cathepsin-like cysteine protease (TvCPC) was generated using the SWISS-MODEL server (Waterhouse et al., 2018) based on the UniProt entry A2DSU2 (TVAG_348,010) (Alves et al., 2022). Before executing the aforementioned step protein structures were prepared by removing other ligands and water molecules using CHIMERA 1.5.3 software (Pettersen et al., 2004). Non-polar hydrogen atoms and Gasteiger charges (Alves et al., 2020) were added

with blind docking (Stanzione et al., 2021). Ligands were prepared according to Troit Olson (Troit et al., 2010) and Alves et al. (2020). Autodock Vina 1.1.2 software was used for the simulation. The EH3 composite was built and optimized using Avogadro 1.11 software (Hanwell et al., 2012). The poses resulting from the anchoring of the study compound were observed using Accelrys Discovery Studio 3.5. TrLdH and TrCPC were utilized because they bind to the EH3 compound. In addition, according to the literature, lactate dehydrogenase is an essential enzyme for the parasite's survival because it interferes with its glycolysis (Alves et al., 2020, 2022). Cathepsin-like cysteine protease was used because of its catabolic (catalytic) and immunogenic functions. The literature reported the interaction of benzofuroxanes with the thiol group, in which the former modulated the catalytic activity of cysteine-containing enzymes, inhibiting the protease (Li et al., 2012) (Shipton and Brocklehurst, 1977).

2.6. Culture of *Trichomonas vaginalis*

The isolates of *T. vaginalis* 30,236 were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC), sensitive to MTZ, and cultured axenically in trypticase-yeast extract-maltose (TYM) medium without agar (pH 6.0) supplemented with 5 mg/mL streptomycin and 10% sterile inactivated (56 °C for 30 min) bovine serum (SBS). The tubes were incubated at 37 °C under aerobic conditions (Diamond, 1957). Motility and morphology were examined under a light microscope at 400 × magnification. Before proceeding with the antiparasitic assay, a trypan blue exclusion test (0.4%) was performed to ensure a minimum viability of 95%, and a logarithmic growth phase was achieved.

2.7. Anti-*Trichomonas vaginalis* in vitro assay

BZX-derived compounds (EH1, EH2, EH3, and EA2) were synthesized and diluted in DMSO to evaluate their antiparasitic potential in vitro against *T. vaginalis*. The assay was performed on 96-well microtiter plates. Next, 150 µL of the culture at an initial density of 2×10^6 trophozoites/mL in TYM medium was added to each plate and incubated with 50 µL of the solution containing each compound. The plates were incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 24 h. Subsequently, the motility, morphology, and viability of the trophozoites were evaluated using an aliquot (1:1, v/v) containing trophozoites and trypan blue (0.4%), which was counted in a Neubauer chamber. Controls were used for each assay: a negative control containing only the trophozoites; a control with 0.6% DMSO; and a positive control with 100 µM MTZ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). The concentration of positive control (MTZ) was in accordance with that of Sena-Lopes et al. (Sena-Lopes et al., 2017).

Subsequently, the minimum inhibitory concentration (MIC) and IC₅₀ assays were performed under the aforementioned conditions. Before determining the concentrations used in the manuscript (graphs), a screening of all compounds at concentrations from 5 to 100 µM was performed. Next, concentrations were selected for each compound according to their effectiveness. The concentrations used for each compound were 100, 75, 65, 55, 45, 35, 25, and 15 µM (EH1 e EH2); 100, 75, 55, 45, 35, 25, 15, and 5 µM (EH3); and 100, 95, 85, 75, 65, 55, 45, and 25 µM (EA2). The MIC of each compound was confirmed by pouring the retained culture solutions in the 96-well plates into Eppendorf microtubes containing 1.5 mL TYM medium supplemented with SBS and streptomycin. The MIC was used in these solutions, one concentration above and one below, along with the controls. The microtubes were again incubated at 37 °C in 5% CO₂ for 96 h. Trophozoites were counted every 24 h in a Neubauer chamber to confirm the MIC. IC₅₀ was calculated using GraphPad Prism 8.0.1 software.

To understand the time required for the antiparasitic activity of the compounds against *T. vaginalis*, this study determined the kinetic growth curve of the trophozoites. Again, 96-well plates were prepared according to the aforementioned methodology. MIC was added to each plate and

incubated at 37 °C in 5% CO₂ for 96 h, as were the controls. Trophozoite viability was assessed under a light microscope, and growth was monitored at 1, 6, 12, 24, 48, 72, and 96 h using the trypan blue dye exclusion assay (0.4%). The assays were independently performed in triplicate and exposed to the percentage of trophozoite viability compared with the negative control (Sena-Lopes et al., 2017).

2.8. Cytotoxicity assay

Monkey renal epithelial cells (VERO) procured from the Cell Bank of the Laboratory of Virology and Immunology of the Faculty of Veterinary Medicine of the Federal University of Pelotas were used to evaluate the cytotoxic effect of the compounds; the method used was that of Picoli et al. (Picoli et al., 1921). Cells were cultured in Minimal Essential Medium (MEM) (E-MEM, Sigma-Aldrich®) supplemented with fetal bovine serum (SFB, Gibco®, USA).

Cells were seeded in 96-well microagglutination plates (Kasvi®) at a density of 3×10^4 in a volume of 100 µL per well. Plates were incubated in an oven at 37 °C in an atmosphere of 95% humidified air and 5% CO₂ for 24 h to form the monolayer. When the cells reached 80% confluence, they were treated with compounds EH1, EH2, EH3, and EA2, previously diluted in DMSO at various concentrations: EH1 (75, 55, 35, and 28.71 µM); EH2 (55, 70, 15, and 11.33 µM); EH3 (45, 25, and 6.83 µM) and EA2 (100, 85, 55, 25, and 12.09 µM). The medium, MEM, was used as a negative control. The plate was incubated in a CO₂ oven with humidified air (5% CO₂ at 37 °C) for 24 h. Cell viability was analyzed using the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) method. Next, 50 µL MTT was added to each well. The plates were incubated for an additional 4 h under the aforementioned conditions. After removing the cell supernatant, crystals were solubilized by adding 100 µL DMSO (Sigma-Aldrich®) to each well; next, they were manually shaken and incubated at 37 °C for 15 min. The changes in viability after treatment were measured spectrophotometrically using a plate reader (Thermo plate®) with a wavelength of 540 nm. All assays were performed independently in triplicate. Results were expressed as viability (%) of cell growth compared with that of the negative control. The viability of MTZ in VERO is described by Alves et al. and Sena-Lopes et al. (Alves et al., 2022; Sena-Lopes et al., 2017).

2.9. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using a one-way analysis of variance followed by Tukey's test for multiple comparisons among groups. The probability value used was $P \leq 0.05$. The results of MIC are expressed as the mean ± standard deviation (SD). The IC₅₀ values were calculated using nonlinear regression. All analyses were performed using GraphPad Prism 8.0.1 software.

3. Results

3.1. Characterization data of compound of EH1

Yield: 76%. Yellow solid, mp > 184.2 °C (dec.). Anal. Calcd. For C₂₆H₁₀N₆O₂·H₂O: C, 50.01; H, 3.15; N, 21.87. Found: C, 48.60; H, 3.04; N, 20.58. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz), δ (ppm): 11.71–11.28 (br, 2 H), 8.23 (br, 1 H), 8.10 (d, 2 H, $J = 6.8$ Hz), 7.91 (br, 1 H), 7.68–7.62 (m, 3 H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ (ppm): 168.3, 168.0, 152.4, 132.2, 129.5, 127.3, 125.3 (some signals were not visible owing to tautomerism at the BZX moiety) (Fig. 2. 7a).

3.2. Characterization data of compound of EH2

Yield = 70%. Yellow solid, mp > 163.2 °C (dec.). Anal. Calcd. For C₂₆H₁₀N₆O₂·H₂O: C, 49.28; H, 3.41; N, 20.28. Found: C, 47.12; H, 3.84; N, 18.85. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz), δ (ppm): 8.17 (br, 1 H), 8.02 (d, 2 H, $J = 8.7$ Hz), 7.89 (br, 2 H), 7.16 (d, 2 H, $J = 8.7$ Hz), 3.85 (s, 3 H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ (ppm): 168.3, 168.0, 152.4, 132.2, 129.5, 127.3, 125.3 (some signals were not visible owing to tautomerism at the BZX moiety) (Fig. 2 7b).

3.3. Characterization data of compound of EH3

Yield = 88%. Yellow solid, mp > 157.7 °C (dec.). Anal. Calcd. For $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$: C, 45.89; H, 2.65; N, 20.07. Found: C, 44.82; H, 2.86; N, 19.13. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ (ppm): 11.75 (br, 1 H), 11.27 (br, 1 H), 8.23 (br, 1 H), 8.10 (d, 2 H, $J = 8.5$ Hz), 7.88 (br, 2 H), 7.71 (d, 2 H, $J = 8.5$ Hz). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ (ppm): 168.1, 167.5, 152.3, 136.9, 129.7, 129.1, 124.2 (some signals were not visible owing to tautomerism at the BZX moiety) (Fig. 2 7e).

3.4. Characterization data of compound of EA2

Yield = 46%. Yellow solid, mp = 130.7–132.4 °C. Anal. Calcd. For $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$: C, 51.76; H, 3.53; N, 18.86. Found: C, 51.46; H, 3.47; N, 18.19. ^1H NMR (CDCl $_3$, 400 MHz) δ (ppm): 8.48 (s, 1 H), 8.35 (br, 1 H), 7.87 (d, 2 H, $J = 8.8$ Hz), 7.71 (br, 1 H), 7.01 (d, 2 H, $J = 8.8$ Hz), 3.90 (s, 3 H). ^{13}C NMR (CDCl $_3$, 100 MHz) δ (ppm): 163.5, 154.6, 151.2, 128.9, 127.6, 114.7, 114.0, 55.6 (some signals were not visible owing to tautomerism at the BZX moiety).

3.5. Molecular docking

The estimated free energy of binding ($\Delta\text{G}_{\text{bind}}$) was determined upon molecular docking, and the interaction with an active site of TvLDH with $\Delta\text{G}_{\text{bind}}$ of -10.03 kcal/mol was observed. Interaction of the carboxylate with electron-deficient atoms of the BZX compound, a hydrogen interaction between diacyl hydrazine and the oxygen of the aspartate carboxylate, another interaction between the carbonyl oxygen of diacyl hydrazine and the hydrogen of serine, a hydrogen interaction between the nitrogen of the 1,2,4-oxadiazole position and the hydrogen of the threonine alcohol, and a π stacking interaction and a favorable van der Waals bond between the benzene ring and phenylalanine were observed (Fig. 4 a).

Another protein used, TvCPC, showed an interaction with $\Delta\text{G}_{\text{bind}}$ of -8.3 kcal/mol. The interactions observed were between the carbonyl hydrogen of diacyl hydrazine and the guanidinic hydrogens of arginine; the interaction between the π cation of guanidine and the electron cloud

of BZX, the interaction between hydrogen π between the hydrogen of the starch of the peptide chain and the electron cloud of furoxans, the interaction between the sulfur of methionine and the furoxan ring, and the interaction of the alkyl-carbon-hydrogen bond with the oxygen of BZX (Fig. 4 b).

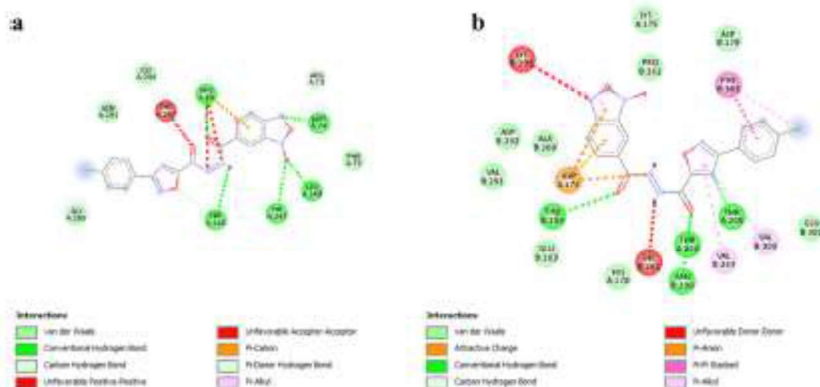
3.6. Efficacy in vitro (MIC)

In this study, compounds that reduced trophozoite viability from 95% to 100% were considered to have trichomonocidal activity. All compounds used showed activity against *T. vaginalis* at a concentration of 100 μM , the negative control and DMSO did not affect the viability of trophozoites, and the positive control with MTZ reduced the viability of protozoa by 100% (Fig. 5).

Regarding the MIC, the concentrations that inhibited 95% or more of the trophozoites, compound EH1 had a MIC of 75 μM (Fig. 5 b), reducing trophozoite viability. Compound EH2 exhibited the lowest MIC (35 μM ; mean $3.22 \pm \text{SD } 1.13$) (Fig. 5 c) and inhibited up to 95.47%. For compound EH3, we considered the MIC of 45 μM (Fig. 5 d), where it reduced the viability in 95% of trophozoites, and EA2 with a MIC of 95 μM (mean $1.44 \pm \text{SD } 0.62$) (Fig. 5 a) inhibited 98.17% of trophozoites. Additionally, the IC_{50} was statistically determined for each compound, and EH3 had a lower IC_{50} (6.83 μM ; $\text{LogIC}_{50} = 0.8347$ μM ; $R^2 = 0.9642$) (Fig. 5 d) than that with compound EH1, which had an IC_{50} of 28.71 μM ($\text{LogIC}_{50} = 1.458$ μM ; $R^2 = 0.8481$) (Fig. 5 b). Compound EH2 presented an IC_{50} of 11.33 μM ($\text{LogIC}_{50} = 1.054$ μM ; $R^2 = 0.9876$), and that of EA2 IC_{50} was 12.09 μM ($\text{LogIC}_{50} = 1.082$ μM ; $R^2 = 0.9766$). Owing to the total inhibition of the trophozoites, compounds EH1 (75 μM) and EH3 (35 μM) did not show a mean and SD.

3.7. Assay in vitro (kinetic curve)

The data obtained from the kinetic growth curve showed that all tested compounds reduced trophozoite viability by > 90% in the first hour of incubation, compared with that of the negative control and MTZ (Fig. 6). When read after 6 h, the compounds with the lowest MICs, EH2 (35 μM) and EH3 (45 μM) (Fig. 6 c and d, respectively), inhibited *T. vaginalis* the most. However, after 12 h of incubation, compound EA2 inhibited 100% of trophozoites and persisted for up to 96 h (Fig. 6 a). Compounds EH2 and EH3 completely reduced trophozoite viability within 48 h (Fig. 6 c and d, respectively). For compound EH1, the



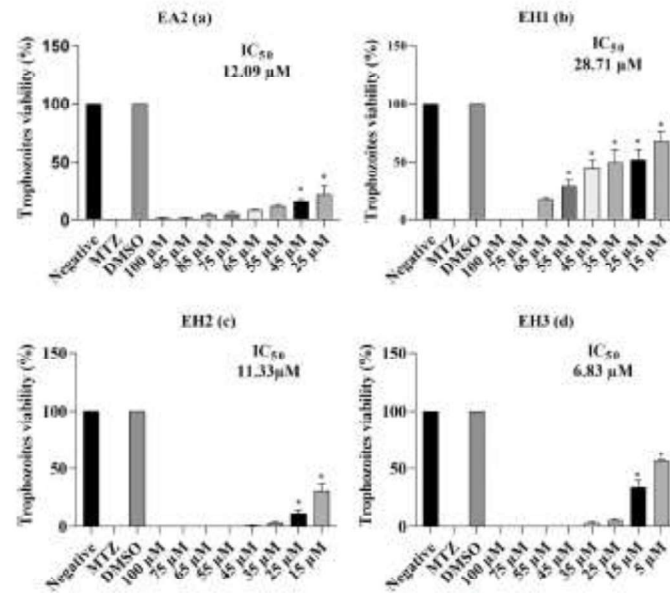


Fig. 5. In vitro anti-*T. vaginalis* assay. MIC and IC_{50} for the antiparasitic activity of EA2 (a), EH1 (b), EH2 (c), and EH3 (d). Negative (untreated trophozoites), MTZ (100 µM), DMSO (0.6% solubilization vehicle). Asterisks represent a significant difference at $P < 0.05$ to MTZ.

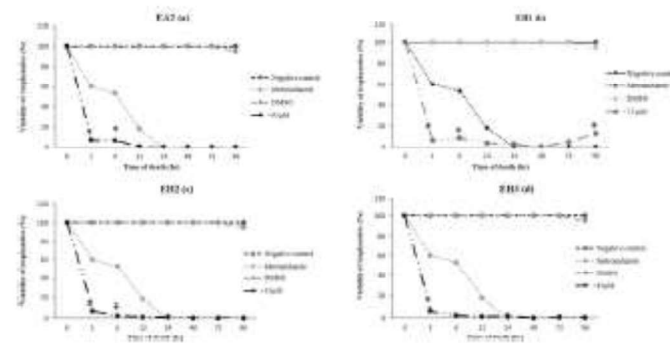


Fig. 6. Kinetic growth curve of *T. vaginalis* about the concentration of the MIC of compounds EA2 (a), EH1 (b), EH2 (c), and EH3 (d). Negative control (untreated trophozoites), MTZ (100 µM), DMSO (0.6% solubilization vehicle). Asterisks represent a significant difference at $P < 0.05$ to MTZ.

greatest inhibition (99.67%) was also achieved after 48 h, but trophozoites proliferated again in the subsequent hours (Fig. 6 b).

3.8. Cytotoxicity assay

The viability of VERO ranged from ~55% to ~90%. For the IC_{50} of the EH2 compound, the viability was 93.51%. For the IC_{50} of the EA2 compound, the viability was 90%; furthermore, this compound showed significant viability at concentrations of 55 µM and 25 µM (~82% and ~91%, respectively).

4. Discussion

The compounds EH1, EH2, and EH3 used in this study are new, and their biological activity has never been tested. However, the antiparasitic activity of compound EA2 in *Trypanosoma cruzi* (Petty et al., 2021) has been reported. All these N-oxide-derived heterocycles showed promising activity against *T. vaginalis* in our results. This phenomenon was demonstrated in the results of the kinetic growth curve, in which compounds EA2, EH1, and EH2 showed no statistical difference in the reduction of trophozoite viability compared with that with MTZ after 12 h, which was similar to that of compound EH3, which showed no

significant difference after 6 h of the experiment.

The positive control (MTZ) had its highest activity at 24 h (100% inhibition). Our results differ from those of Das Neves et al. and Alves et al. (Das Neves et al., 2020; Alves et al., 2020). Both of those studies observed the total effectiveness of MTZ after 12 h by using the concentration of 100 μ M and against the same ATCC of *T. vaginalis* used in our study (Fig. 5). In the kinetic growth curve, the compounds EH2 and EH3 are presented similarly, at concentrations of 35 μ M and 45 μ M, respectively (Fig. 5 d and c).

Use of BZX has been described against flagellated protozoa, *T. cruzi* (Aguirre et al., 2005; Castro et al., 2009; Petry et al., 2021), *Leishmania amazonensis* (Dutra et al., 2014), and *Plasmodium* sp. (Zarranz et al., 2006; Bonilla-Ramírez et al., 2019), in addition to its antitumor, antibacterial, and antifungal activity (Chugunova et al., 2014; Farias et al., 2015). A few reports of N-oxide derivatives against *T. vaginalis* are available. Aguirre et al. (2004) evaluated compounds derived from imidazole and benzimidazole N-oxides in *T. vaginalis* and *T. cruzi*. They obtained promising results with compounds against *T. vaginalis* at a concentration of 100 μ g/mL and linked the parasitic activity to the lipophilicity of these derivatives, owing to the carbon portion of the protozoan nucleus being hydrolyzed and then converted to N-oxides. Three mechanisms of action of these compounds may be related to the antiparasitic activity: release of NO, physicochemical properties of the compounds, and interaction with thiol group enzymes (-SH) (Severina et al., 2003; Gutierrez et al., 2009; Jorge et al., 2009; Roiani et al., 2006).

One study suggested that the NO moiety of these compounds can release toxic radicals such as NO, which generate reactive oxygen and nitrogen species and are responsible for destabilizing the Trypanosoma cell membrane (Gutierrez et al., 2009). A similar mechanism can be applied to *T. vaginalis* because the activity of these compounds is associated with their ability to inhibit the cellular respiration of the parasites (Aguirre et al., 2005). Compound EA2 was used in vitro against *T. cruzi*, and although at different concentrations than those in our study, it was effective, inhibiting 100% of epimastigotes within 48 h (1%, 0.5%, and 0.25%) (Petry et al., 2021). Notably, the MIC of EA2 (95 μ M) inhibited trophozoite viability (99.45%) in the first 12 h, and trophozoites did not multiply after 24 h at the end of the experiment. There was no statistical difference between the groups after 12 h. Even at the highest MIC of the other compounds tested, EA2 was promising against *T. vaginalis*, with an IC_{50} of 12.09 μ M. Moreover, this did not exhibit cytotoxicity at IC_{50} , 55 μ M, and 25 μ M concentrations, and significant results were observed regarding inhibiting the protozoan.

The substituents present in the chemical structure of each compound are probably related to their antiparasitic activity because there is a chlorine molecule (Cl) in EH3 and a methoxy group (OCH3) in EH2, a methoxy group (OCH3) in EA2, and an amino group (NH) one less than that in the other compounds. Roiani et al. (2006) tested the derivative BZX 1,3-dioxides using a methoxy substituent (OCH3) against three strains of *T. cruzi* and three species of *Leishmania* sp. And reported low activity in both parasites. This finding differs from that of our study, where EH2 and EA2 have the same substituent and were effective at different concentrations against *T. vaginalis*. Although they are neither the same protozoa nor the same compound, this difference in the substituent in our study may be related to their biological activity.

Jorge et al. (2009) tested BZX derivatives against three strains of *Staphylococcus aureus*. They reported the bactericidal activity of hydrophobic substituents (Cl, CF3, Br) attached to the benzene fraction, as well as compounds with an electron character in the substituent (e.g., NH2 and OCH3). This result agrees with our results: we observed an antiparasitic activity with the lowest IC_{50} (6.83 μ M) in the EH3 compound, relating the best antiparasitic activity to the hydrophobic Cl molecule of the benzene ring. Furthermore, both studies positively correlated a methoxy group with anti-trichomonas and antimicrobial activities. Therefore, the physicochemical properties of the compounds may influence their biological activity.

Thiol groups (-SH) are relevant agents in oxidation/reduction

processes (Coulter et al., 2000; Li et al., 2012). We posit that the activity of BZX may also be related to surface proteins, especially in the thiol groups (-SH) in the thiolate form, because the interaction of BZX with -SH has been reported (Shipton and Brockhurst, 1977; Kota et al., 2000; Severina et al., 2003). Furthermore, thiol groups are possible targets for NO and can modulate the catalytic activity of cysteine-containing enzymes (Persichini et al., 1999). This activity may be related to the inhibition of cysteine-type proteinases, abundant on the surface of *T. vaginalis* (Ramón-Luque et al., 2011; Hernandez et al., 2014), providing for the maintenance/protection of -SH on the surface of the parasites; thus, cysteine-type proteinases are notable surface proteins for the survival of the protozoan (Gillin et al., 1994; Coombs et al., 2004).

These results indicate that BZX derivatives are concentration-dependent; the higher the concentration, the stronger the inhibition of trophozoites. All compounds tested at the highest concentration (100 μ M) were effective within 24 h. This result suggests that NO inhibits the dose-dependent enzymatic action of BZX (Persichini et al., 1999). Therefore, Cerecetto and Porral (2005) stated that trypanocidal activity is reduced when the N-oxide fraction is removed from the compound. We suspect that this finding case also applies to *T. vaginalis* and that NO release is the main culprit for parasitic activity.

The ATCC 30236 strain is sensitive to MTZ and exhibits heterogeneity due to the presence of high molecular weight proteins. Additionally, this strain possesses chaperones, such as HSP70, which are responsible for properly folding other proteins, ensuring that they achieve the correct three-dimensional structure (Alderete et al., 1985; Davis-Hayman et al., 2000).

Proteases are known to perform important biological processes in protozoa (Setzer et al., 2017) (e.g., cytoadherence, cytotoxicity, and hemolysis) relevant to the pathogenesis of trichomoniasis (León-Sicairens et al., 2004; Hernández et al., 2014). Lactate dehydrogenase (LDH) is an enzyme found in most living cells and plays a notable role in catalyzing the interconversion of lactate to pyruvate and converting nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) into NAD⁺ (Wu et al., 1999; Alderete et al., 1985). Energy production depends on the catalytic routes of LDH and malate dehydrogenase because the protozoan depends on glycolysis. As such, they are ideal targets for interaction with compounds. Thus, any attempt to negatively regulate or interrupt the activities of these enzymes would be self-destructive for the parasite. *T. vaginalis* energy is generated through substrate-level glycolytic phosphorylation, which converts pyruvate to molecular hydrogen and acetate. In the crystal structure of TvLDH, Leu9 (leucine) has been observed (Burstein et al., 2012; Jeffers et al., 2018; Kayumbaa et al., 2021). According to Westrop et al. (2017) (Westrop et al., 2017), LDH has broad specificity for leucine-derived hydroxy acids. This finding suggests that the parasite produces a significant amount of 2-hydroxyisocaproate acid, indicating that leucine catabolism is important for the viability of trophozoites. Since 1960, a drug other than 5-nitroimidazoles has not been available that inhibits TvLDH other than 5-nitroimidazoles (Leisch, 2016). In this study, *in silico* analysis by molecular docking showed that the binding site of EH3 interacted with the binding sites of TvCPC and TvLDH, suggesting that these proteins are related to the action of these compounds against *T. vaginalis*. Therefore, the BZX system is promising for developing new drugs that target the protozoa associated with public health.

Based on the findings of this study and those of the literature, our conclusion is that the BZX compounds can reduce the number of trophozoites within a few hours after the experiment at a concentration of MIC and inhibit their proliferation again over time. Compounds EH2 and EH3 had the lowest IC_{50} and were the most promising. Further research should be conducted *in vivo* to explore a new form of treatments for trichomoniasis and attempt to determine the mechanism of action of these compounds in *T. vaginalis*.

Author statement

Marjorie Giacometti: Conceptualization, Methodology, Validation, Investigation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing, Data Curation, Supervision.

João Cândido Pillar Mayer: Conceptualization, Methodology, Writing - Review & Editing.

Alexia Brauner de Mello: Conceptualization, Methodology, Investigation.

Yan Wahast Islabão: Formal analysis, Methodology, Investigation.

Adriane Leites Strothmann: Investigation, Methodology.

Renata Nobre Fonseca: Validation, Methodology.

Angela Sena-Lopes: Validation, Methodology.

Luciano Dornelles: Writing - Review & Editing.

Sibele Borsuk: Methodology, Validation.

Silvia De Oliveira Rodrigues Hübner: Methodology, Validation.

Camila Belmonte Oliveira: Conceptualization, Resources, Writing - Review & Editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

The authors thank the Federal University of Pelotas, Federal University of Santa Maria, Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel Brazil (Finance Code 001) to the National Council for Scientific and Technological Development.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.xppara.2023.108601>.

References

- Aguiar, G., Bonini, M., Ceronetti, H., Gerson, A., González, M., Salas, T.F., Denicola, A., Ocarin, C.O.D., Negal, J.J., Monteiro, D., Racheo, J.A., 2004. Novel antiparasitic products: imidazole and benzimidazole N-oxide derivatives and related compounds. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 337, 259–270. <https://doi.org/10.1002/arpa.200300040>.
- Aguiar, G., Boland, M., Ceronetti, H., Di Majo, E., González, M., Porcel, W., Denicola, A., Miller, M., Thomson, L., Torres, V., 2005. Benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazole N-oxide derivatives as potential antitrypanosomal drugs. Part 3: substitution-clustering methodology in the search for new active compounds. *Bioorg. Med. Chem.* 13, 6324–6335. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.08.000>.
- Akter, J.P., Suprun-Brown, L., Kamada, L., Smith, J., Spencer, M., 1985. Heterogeneity of *Trichomonas vaginalis* and discrimination among trichomonal isolates and subpopulations with sera of patients and experimentally infected mice. *Infect. Immun.* 49, 463–468. <https://doi.org/10.1128/iai.49.3.463-468.1985>.
- Alves, M.S.D., das Neves, R.N., Sena-Lopes, A., Domingues, M., Casati, A.M., Segatto, N. V., Nogueira, T.C.M., Souza, M.V.N., Savignolo, L., Seixas, F.K., Collares, T., Borsuk, S., 2020. Antiparasitic activity of furanyl N-acetyldiazene derivatives against *Trichomonas vaginalis*: in vitro and in silico analyses. *Parasitol. Vectors* 13, 2–13. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3925-8>.
- Alves, M.S.D., Sena-Lopes, A., das Neves, R.N., Casati, A.M., Domingues, M., Bazzani, P. T., da Silva, E.T., de Souza, M.V.N., Savignolo, L., Borsuk, S., 2022. In vitro and in silico trichomonocidal activity of 2,6-bis(trifluoromethyl) quaternary analogs against *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol. Res.* 121, 2697–2711. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07596-1>.
- Barrett, B.J., 1991. A importância da Síntese de Fármacos na Produção de Medicamentos. *Quim. Nova* 14, 179–188.
- Bhram, C.P., Mudanyasa, S., 2015. Transmission dynamics of *Trichomonas vaginalis* and HIV/AIDS coinfection. *HIV AIDS Rev* 14, 128–132. <https://doi.org/10.1016/j.hiv.2015.05.005>.
- Boland, M., Boland, L., Denicola, A., Torres de Ortiz, S., Serra, E., Vera de Bilbao, N., Sanabeta, L., Yaloff, G., Nakayama, H., Rojas de Arias, A., Vega, C., Bolan, M., Gómez-Barrio, A., Ceronetti, H., González, M., 2006. 2H-Benzimidazole 1,3-dioxide derivatives: a new family of water-soluble anti-trypanosomal agents. *J. Med. Chem.* 49, 3275–3284. <https://doi.org/10.1021/jm060034i>.
- Bonilla-Sánchez, L., Galano, S., Quillano, M., Aldana, I., Pachón, A., 2019. Pritraspiroquinolone 1,4-di-N-oxide hybrids with action on the extra-erythrocytic forms of *Plasmodium* induce their effect by the production of reactive oxygen species. *Malar. J.* 18, 201. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2825-8>.
- Burnett, D., Gould, S.E., Zimorski, V., Kloogay, T., Klause, F., Major, P., Martin, W.F., Pupko, T., Daga, T., 2012. A machine learning approach to identify hydrogenosomal proteins in trichomonas vaginalis. *Eukaryot. Cell* 11, 217–228. <https://doi.org/10.1128/Euk.05.0225-11>.
- Castro, D., Boland, L., Benítez, D., Hernández, P., Morales, A., Gil, C., Oliva-Azar, C., González, M., Ceronetti, H., Porcel, W., 2009. Anti-trypanosomal benzimidazoles and deoxyguanosine analogs: synthesis using polymer-supported triphenylphosphine, biological evaluation and mechanism of action studies. *Eur. J. Med. Chem.* 44, 5055–5065. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.09.049>.
- Ceronetti, H., Porcel, W., 2005. Pharmacological properties of furanose and benzimidazole: recent developments. *Mini-Rev. Med. Chem.* 5, 57–71. <https://doi.org/10.2174/156996105384002864>.
- Chapman, E.A., Voloshina, A.D., Mukhanovskaya, E.E., Serikov, I.V., Prudkin, A.N., Gubachina, E.M., Bortko, A.B., Kell, N.V., Zolov, V.V., Krivolapov, D.B., Dobrynin, A.B., Goumova, E., 2014. The study of the biological activity of amino-substituted benzimidazoles. *Leit. Drug Discov.* 11, 502–512. <https://doi.org/10.2174/157010081066611122010403>.
- Coombes, G.H., Westrop, G.D., Suchan, P., Puzova, G., Hirt, R.P., Bentley, T.M., Mottram, J.C., Müller, S., 2004. The antitrypanosomal eukaryotic *Trichomonas vaginalis* contains a divergent thioether-linked peroxiredoxin antioxidant system. *JBC* 279, 5249–5258. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304359200>.
- Cordier, C.V., Rafay, G.F., Lin, T.K., Smith, R.A., Murphy, M.P., 2000. Mitochondrially targeted antioxidants and thiol reagents. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1547–1554. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00255-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00255-0).
- Das Neves, R.N., Sena-Lopes, A., Alves, M.S.D., da Rocha Fonseca, B., da Silva, C.C., Casati, A.M., Savignolo, L., Pereira, C.M.P., Razon, D.F., Borsuk, S., 2020. Z-Hydroxychalcones as an alternative treatment for trichomoniasis in association with metronidazole. *Parasitol. Res.* 119, 725–736. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-0596-4>.
- Davis-Hayman, S.R., Shoh, P.H., Hrdy, R.W., Lushbaugh, W.B., Meade, J.C., 2000. *Trichomonas vaginalis*: analysis of a heat-labile member of the ciliated heat-shock protein 70 multigene family. *Parasitol. Res.* 86, 608–612. <https://doi.org/10.1007/s00066000036>.
- Devagada, D., Pandey, A., Shrivastava, T., Rajavel, R., Dubey, R.D., 2010. Synthesis of some novel 2, 5- disubstituted 1, 3, 4-oxadiazole and its analgesic, anti-inflammatory, anti-bacterial and anti-tubercular activity. *J. ChemTech Res.* 2, 1299–1412. <https://doi.org/10.1016/j.jchem.2010.12.016>.
- Diamond, L.S., 1957. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J. Parasitol.* 43, 486–490. <https://doi.org/10.2307/3294662>.
- Durel, P., Rotun, V., Riboulet, A., Borel, J.J., 1960. Systemic treatment of human trichomoniasis with a derivative of nitroimidazole, 4023 BP. *Br. J. Vener. Dis.* 36, 21–26. <https://doi.org/10.1136/bjv.36.1.21>.
- Estro, L.A., de Almeida, L., Paruchaporn, T.O., Reis, J.S., Torres, P.A., Martins, I., dos Santos, J.L., 2014. Leishmanicidal activities of novel synthetic furan and benzimidazole derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 4637. <https://doi.org/10.1128/AAC.00052-14>.
- Eller, G.J., Fuchs, J.B., Slagg, S.S.J., Ishikawa, H., Tao, H., Yuan, Z.Q., Boyer, D.J., 2006. Intramolecular Diels-Alder/1,3-dipolar cycloaddition cascade of 1,3,4-oxadiazoles. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 10589–10595. <https://doi.org/10.1021/ja061254e>.
- Farias, C.F., Mazzuca, M.H., Girda, N., Azevedo, R.A., Ferreira, A.J., Jorge, S.D., Tavares, L.C., Figueiredo, C.R., Travenço, L.R., 2015. Benzimidazole derivatives N-Br and N-I induce intrinsic apoptosis in melanoma cells by regulating Akt/RIM signaling and display anti-metastatic activity in vivo. *BMC Cancer* 15, 2–11. <https://doi.org/10.1186/s12928-015-1025-5>.
- Gall, U., Lazzeroni, L., Bertinetti, M., Sorba, G., Guccio, A., Paragetti, S., Taramelli, D., 2005. Synthesis and antimalarial activities of some furanone enones and related furanones. *Eur. J. Med. Chem.* 40, 1335–1340. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2005.05.001>.
- Gillis, F.D., Retner, D.S., Levy, R.B., Henkart, P.A., 1994. Thiol groups on the surface of anaerobic parasite protozoa. *Mol. Biochem. Parasitol.* 13, 1–12. [https://doi.org/10.1016/0167-0289\(94\)90096-3](https://doi.org/10.1016/0167-0289(94)90096-3).
- Gutierrez, F.R., Miano, T.W., Pavanelli, W.R., Guedes, P.M., Silva, J.S., 2009. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 236–245. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000900000>.
- Howell, M.D., Curtis, D.E., Loria, D.C., Vandermolen, V., Zurek, R., Hutchison, G.B., 2012. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminf.* 4, 2–17. <https://doi.org/10.1186/1756-2948-4-17>.
- Harmon, M., Hellawey, P., Giorgi-Romano, S., 2001. New synthesis of 5,10-dicyanopharmazine-2-carboxylic acid. *Synth. Commun.* 31, 2329–2334. <https://doi.org/10.1081/SCC-100104833>.
- Hernández, H.M., Marcet, R., Saraceni, J., 2014. Biological roles of cysteine proteinases in the pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol.* 21, 2–10. <https://doi.org/10.1051/parasitol/2014054>.
- Holmes, R.E., Sparling, P., Hansen, W., Piot, P., Wasserheit, J., Carey, L., Cohen, M., 2006. Sexually Transmitted Diseases, fourth ed. McGraw-Hill Medical, New York.
- Huguet, F., Melet, A., Souas, E.A., Lemerand, A., Chevillard, J., Maigre, L., Deschamps, P., Tomas, A., Lemaître, N., Pages, J.M., Artaud, I., 2012. Hydroxyamic acids as potent

- inhibitors of Fell and Moll E. coli methionine aminopeptidase: biological activities and X-ray structures of oxazole hydroxamate-ECHEAP-Ma complexes. *ChemMedChem* 7, 1026–1030. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201200376>.
- Hakolahti, T., Suuronen, T., Rinne, V.M., Wirtskis, C., Lahti-Sakken, M., Jurio, E., Wallin, E.A.A., Salonen, A., Posa, A., Leppanen, J., 2006. Oxazolinone-carboxylamidohydroxamate as SHIT1 and SHIT2 inhibitors. *J. Med. Chem.* 49, 4377–4380. <https://doi.org/10.1021/jm060063y>.
- Jeffers, V., Tampaki, Z., Kite, K., Sullivan, W.J., 2018. A latent ability to persist: differentiation in *Tricomonas gonitii*. *Cellular Mol. Life Sci.* 75, 2355–2373. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2808-z>.
- Jorge, S.D., Mazzanti, A., Saugel-Yagui, C.O., Pasqualoto, K.F., Taveira, L.C., 2009. Design, synthesis, antimicrobial activity and molecular modeling studies of novel benzofuran derivatives against *Staphylococcus aureus*. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 3028–3036. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.03.011>.
- Jorge, S.D., Palazzi-Berl, P., Mesquita Pasqualoto, K.F., Ishii, M., Ferreira, A.K., Serra, C.M., Rouch, R.V., Marín, D.A., Taveira, L.C., 2013. Ligand-based design, synthesis, and experimental evaluation of novel benzofuran derivatives as anti-*Trichomonas cruzi* agents. *Eur. J. Med. Chem.* 64, 200–214. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.03.053>.
- Kaplanova, P., Raza, M., Poot, O.J., Sridharan, B., Kundrath, N.D., Chakraborty, V.A., Nyamori, V.O., Karpovskiy, R., 2021. Lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase: potential antiparasitic targets for drug development studies. *Bioorg. Med. Chem.* 50, 116458. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116458>.
- Kirkcaldy, R.D., Augustini, P., Asbel, L.R., Bernstein, K.T., Kerasi, R.P., Mettenleiter, C.J., Pathela, P., Schwelke, J.R., Sencer, W.E., Workowski, K.A., Davis, D., Stratos, J., Weinstock, H.S., 2012. *Trichomonas vaginalis* antimicrobial drug resistance in 6 US sites, STD Surveillance Network, 2009–2010. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 939–943. <https://doi.org/10.3201/e1806.111590>.
- Kluge, F., 2015. *Trichomonas vaginalis*: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. *BMC Infect. Dis.* 15, 2–6. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1025-0>.
- Kota, A.Y., Gnani, M.A., Khropov, Y.V., Denis, V.I., Belushkina, N.N., Borygina, O.G., Yasykova, M.Y., Ovdinnikov, I.V., Kiklev, A.S., Makhova, N.N., Medvedeva, N.A., Bolshakov, T.V., Severina, L.S., 2000. Virocidal and antiproliferative activity of 4,7-dimethyl-1,2,5-oxadiazolo[3,4-d]pyridazine 1,5-bis-oxazole: role of soluble guanylate cyclase, nitric oxide and thiols. *Br. J. Pharmacol.* 129, 1163–1177. <https://doi.org/10.1056/ajbp0703156>.
- Lavenson, Q.O., Anadi, A.N.C., Olson, C., Beg, P.O., Chakraborty, R.C., 2021. *Trichomonas vaginalis* and associated health risk factors among prison inmates in Assam, India state, northeastern Nigeria. *J. BAZ* 7, 70–75. <https://doi.org/10.1186/s41296-021-00232-z>.
- Leitch, D., 2016. Recent advances in the *Trichomonas vaginalis* field. *Frontiers* 5, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00054>.
- León-Salazar, C.R., León-Méjía, J., Arroyo, B., 2004. *trcp12*: a novel *Trichomonas vaginalis* cathepsin L-like cysteine proteinase-encoding gene. *Microbiology (Read.)* 150, 1131–1138. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26927-0>.
- Li, Y., Yang, Y., Guan, X., 2012. Benzofuran scaffold for dual imaging and quantification in live cells through fluorescence microscopy. *Anal. Chem.* 84, 6877–6883. <https://doi.org/10.1021/ja301300a>.
- Lidmark, S., Edlund, C., Nord, C.E., 2010. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. *Gin. Infect. Dis.* 50, 16–23. <https://doi.org/10.1006/ginf.2009.0099>.
- Makhs, S.C., Cooks, P., Sanders, R.J., Vasanthakumari, M., Craciun, Y., 2019. *Trichomonas vaginalis* and HIV infection acquisition: a systematic review and meta-analysis. *Sex. Transm. Infect.* 95, 36–42. <https://doi.org/10.1136/sti-2018-025773>.
- Mayer, J.C.P., Ester, A.C., Iglesias, R.A., Acuña, T.V., Back, D.F., Rodríguez, O.E.D., Domínguez, L., 2017. Ferrocenylphosphine-substituted 1,3,4-oxadiazole-1,2,4-oxadiazole synthesis, characterization and DNA-binding assays. *J. Organomet. Chem.* 841, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2017.04.014>.
- McClelland, R.S., Sangare, L., Hanson, W.M., Laverys, L., Mandilaya, K., Klaris, J., Ndirya-Achola, J., Jocko, W., Sauer, J.M., 2007. Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. *J. Infect. Dis.* 195, 698–702. <https://doi.org/10.1093/infdis/j1278>.
- Melo, J.O.F., Donatelli, C.L., Angusti, B., Ferreira, V.F., De Souza, M.C.B.V., Ferreira, M.L.G., Cunha, A.C., 2006. Heterocyclic 1,2,3-triazolones: História, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. *Quím. Nova* 29, 569–579. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000200020>.
- Mielczarek, E., Blazkowska, J., 2016. *Trichomonas vaginalis*: pathogenicity and potential role in human reproductive failure. *Infection* 44, 447–458. <https://doi.org/10.1007/s1501-015-0090-0>.
- Mirzadeh, M., Ollatir, M., Elahi, A.Y., Abdoli, A., Houshmand, E., Moghaddi, H., Jobkool, M.G., Askari, S., Houshmand, S., Badri, M., 2021. Global prevalence of *Trichomonas vaginalis* among female sex workers: a systematic review and meta-analysis. *Parasitol. Res.* 120, 2311–2322. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07215-6>.
- Niu, P., Kang, J., Tian, X., Song, L., Lin, H., Wu, J., Yu, W., Chang, J., 2015. Synthesis of 2-Amino-1,3,4-oxadiazoles and 2-Amino-1,3,4-triazoles via sequential condensation and I2-mediated oxidative C–O/C–S bond formation. *J. Org. Chem.* 80, 1018–1024. <https://doi.org/10.1021/jo50251a>.
- Olea-Ace, C., Riquel, C., Mendez-Rodriguez, F., Cerecetto, H., Melo, D.H., Gonzalez, M., Peralta, W., Morello, A., Repetto, Y., Mayra, D.J., 2005. Novel benzimidazole-2,5-oxadiazole N-oxide derivatives as antischistosomal agents: chemical and biological studies. *lett. Drug des. Discover* 2, 294–301. <https://doi.org/10.1016/j.lidd.2005.03.001>.
- Oquar, E.Y., Taylor, J.S., 2008. Synthesis of peptide nucleic acid (PNA) probes via an orthogonally protected building block for post-synthetic labeling of peptide nucleic acids at the 5'-position of triethyl. *Bioconjugate Chem.* 19, 2196. <https://doi.org/10.1021/bc0800294>.
- Petrachini, T., Colaneri, M., Pizzani, M., Galizzi, V., Medina, C., Pollicelli, F., Ventrini, G., Accardi, F., 1999. Nitric oxide inhibits the HIV-1 reverse transcriptase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 624–627. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0581>.
- Petry, D.S.L., Mayer, J.C.P., De Giacomini, M., Oliveira, D.T., Garzon, L.R., Fagundes, A.M., Matos, A.F.M., Baldimera, M.D., Dornelles, L., Andrade, C.M., Monteiro, S.G., 2021. In vitro and in vivo trypanocidal activity of a benzofuran derivative against *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 226–227, 108–125. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2021.108125>.
- Petersen, E.J., Goodland, T.D., Huang, C.C., Goch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, K.C., Ferris, T.E., 2004. UGIF: a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
- T. Picoli, J.S. Barbosa, G.D. Vargui, S.D. Hilner, G. Fischer, Toxicity and efficiency of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the freezing of Media-Darby Bovine Kidney cells (mdbk). *Sci. Anis. Health*, 3 (215), 159–168. <https://doi.org/10.1521/ais.2021.4608>.
- Ramón-Liu, L.D.J.A., Brindón-García, F.J., Puente-Rivera, J., Ávila-González, L., Arroyo, B., 2011. Identification and characterization of the human cytosolic TrCP99 proteinase gene of *Trichomonas vaginalis*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 1500–1511. <https://doi.org/10.1016/j.bbcel.2011.07.003>.
- Rowley, J., Vander Hoot, S., Komarova, E., Low, N., Unuma, M., Abu-Baddad, L.J., Chien, R.M., Smolák, A., Newman, L., Gottlieb, S., Thoen, S.S., Bronte, N., Taylor, M.M., 2019. Chlamydia, gonorrhea, trichomonas and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull. World Health Organ.* 97, 548–562. <https://doi.org/10.2471/BLT.18.268406>.
- Schwelke, J.R., Barrientes, F.J., 2006. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 4209–4210. <https://doi.org/10.1128/AAC.00814-06>.
- Sosa-Lopez, A., das Neves, R.N., Bozner, F.B., de Oliveira Silva, M.T., Nobre, P.C., Perin, G., Alves, D., Salvaggio, L., Beghini, R.R., Seixas, F.R., Gollara, T., Sorok, S., 2017. Antiparasitic activity of 1,3-dioxolane containing thiolates in *Trichomonas vaginalis*. *Res. Pharmaceut.* 89, 284–287. <https://doi.org/10.1016/j.molpa.2017.01.031>.
- Seizer, M., Byler, K., Oganigle, L., Setzer, W., 2017. Natural products as new treatment options for trichomoniasis: a molecular docking investigation. *Sci. Pharm.* 85, 1–5. <https://doi.org/10.3390/scipharm85010005>.
- Severina, L.S., Azumova, L.N., Vasilovsky, A.V., Pyatkov, N.V., Bunova, O.A., Ivanov, A.S., Medvedev, A.E., 2003. Nonspecific inhibition of noncyclic oxidases A and B by activators of soluble guanylate cyclase. *Biochemistry (Moscow)* 58, 1048–1054. <https://doi.org/10.1023/a:1028070000003>.
- Shipton, M., Brocklehurst, K., 1977. Benzofuran as a thiol-specific reactivity probe. Kinetics of its reactions with papain, ficin, bromelain and low-molecular-weight thiols. *Biochem. J.* 167, 799–810. <https://doi.org/10.1042/bj1670799>.
- Srivastava, R.M., Pereira, M.C., Pizzani, W.W.M., Gontijo, K., Dos Anjos, J.V., De Melo, S.J., 2009. Synthesis, mechanism of formation, and molecular orbital calculations of arylamidoximes. *Monatsh. Chem.* 140, 1319–1324. <https://doi.org/10.1007/s00706-009-0185-7>.
- Stable, P., Lamasica, A., Ribeca, A., Caricelli, D., Gennaro, G., Cennamo, G., 2010. Mild and convenient one-pot synthesis of 1,3,4-oxadiazoles. *Tetrahedron Lett.* 51, 4801–4805. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2010.09.130>.
- Stanton, P., Glasgow, I., Ode, J.C., 2021. Use of molecular docking computational tools in drug discovery. *Prog. Med. Chem.* 80, 273–343. <https://doi.org/10.1016/b.pmc.2021.01.004>.
- Sylvester, L., Selinger, M., Galai, Z., 1960. Unusual trichomoniasis in the male: review of the literature and report on treatment of 37 patients by a new nitroimidazole derivative (Eflor). *Canad. med. Assoc. J.* 83, 1198–1199.
- Trott, O., Olson, A.J., 2010. AutoDock: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* 31, 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- Waterhouse, A., Bernard, M., Bissert, S., Studer, G., Taurin, G., Guarnieri, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempler, C., Bork, L., Lepore, B., Schwede, T., 2018. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46, 296–303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>.
- Westrop, G.D., Wang, L., Blackburn, G.J., Zhang, T., Zhang, L., Watson, D.G., Costas, G.H., 2017. Metabolic profiling and stable isotope labelling of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas foetus* reveal major differences in amino acid metabolism including the production of 2-hydroxyisocaproic acid, cystathionine and 5-methylcysteine. *PLoS One* 12, 1–34. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186072>.
- World Health Organization, 2012. *Global Incidence and Prevalence of Selected Contagious Sexually Transmitted Infections-2000*. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Wu, G., Hua, A., Ter Kruit, B., Sali, A., Müller, M., 1999. Convergent evolution of *Trichomonas vaginalis* lactate dehydrogenase from lactate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 6285–6290. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6285>.
- Zarraz, R., Jais, A., Lima, L.M., Aldana, I., Menge, A., Morel, S., Sorvén, M., 2006. Antiparasitic activity of 3-oxo-1,2,3,4-tetrahydro-2H-pyridine-2-thione derivatives. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 42, 357–361. <https://doi.org/10.1590/S1518-93322006000300036>.

ANEXO



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

Número do Processo: BR 10 2023 014463 2

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: epit@ufpel.edu.br

PETICIONAMENTO ELETRÔNICO

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 19/07/2023 às 10:32, Petição 870230063132

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Avaliação in vitro dos derivados benzofuroxanos frente ao

Utilidade (54): Trichomonas vaginalis

Resumo: A presente invenção refere-se a diferentes compostos derivados benzofuroxanos N-óxidos avaliados quanto sua atividade em Trichomonas vaginalis, agente responsável pela tricomontase humana. Esta enfermidade tem grande importância na saúde pública, por ser uma infecção sexualmente transmissível prevalente em todo o mundo que afeta principalmente mulheres. Os compostos que foram avaliados neste estudo incluem uma base heterocídica contendo quatro átomos de nitrogênio e oxigênio, além de um grupo amina (EA2) e quatro átomos de nitrogênio e cinco átomos de oxigênio além de dois grupos amina nos anéis aromáticos (EH1, EH2, EH3). Além disso os heterocídios EH2 e EA2 dispõem de um grupo metoxilo (OCH3) e o EH3 contém uma molécula hidrofóbica de Cloro (Cl) na sua estrutura. Estas substâncias são capazes de interagir com o protozoário Trichomonas vaginalis inibindo os trofozoítos de forma dose dependente. A presente invenção pertence ao Laboratório de Protozoologia e Entomologia (LAPEN) do departamento de Microbiologia de Parasitologia do Instituto de Biologia e ao Laboratório de Química (Lab-Selen) da Universidade Federal de Santa Maria e tem como objetivo desenvolver um novo fármaco com ação tricomonocida que poderá ser de grande importância na saúde humana e animal.

Figura a publicar: 1

PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 19/07/2023 às 10:32, Petição 870230063132

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 8

Nome: CAMILA BELMONTE OLIVEIRA
CPF: 99262746091
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Professor do ensino superior
Endereço: Av. Adolfo Fetter, 4831, Fase 2, lote G10
Cidade: Pelotas
Estado: RS
CEP: 96095-750
País: BRASIL
Telefone: (55) 999 038779
Fax:
Email: camilabelmonteivet@yahoo.com.br

Inventor 2 de 8

Nome: MARJORIE DE GIACOMETI
CPF: 08653207996
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Doutorando
Endereço: Rua Santa Clara, 1048 Três Vendas
Cidade: Pelotas
Estado: RS
CEP: 96065-420
País: BRASIL
Telefone: (49) 998 041572
Fax:
Email: marjorie.giacometti@gmail.com

Inventor 3 de 8

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 19/07/2023 às 10:32, Petição 870230063132.

Nome: LUCIANO DORNELLES
CPF: 48753041020
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Professor do ensino superior
Endereço: Rua Victorino da Casa, n 600, casa 36C, Centro
Cidade: Santa Maria
Estado: RS
CEP: 97060-491
País: BRASIL
Telefone: (55) 991 052065
Fax:
Email: ldomei@gmail.com

Inventor 4 de 8

Nome: JOÃO CÂNDIDO PILAR MAYER
CPF: 00777171040
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Doutorando
Endereço: Avenida Rio Branco, n° 665, apto. 205, Centro
Cidade: Santa Maria
Estado: RS
CEP: 97010-423
País: BRASIL
Telefone: (55) 984 121603
Fax:
Email: jcmayer01@gmail.com

Inventor 5 de 8

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 19/07/2023 às 10:32, Petição 870230063132

Nome: SIBELE BORSUK

CPF: 95168192068

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Padre Anchieta, 4563 casa 9, Centro

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96015-420

País: BRASIL

Telefone: (53) 961 416888

Fax:

Email: sibleborsuk@gmail.com

Inventor 6 de 8

Nome: FILIPE OBELAR MARTINS

CPF: 04137270090

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Graduação

Endereço: Rua Gonçalves Chaves, 862 apto 101, Centro

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96015-560

País: BRASIL

Telefone: (53) 964 772227

Fax:

Email: obelar05@gmail.com

Inventor 7 de 8

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 19/07/2023 às 10:32, Petição 870230063132

Nome: ALEXIA BRAUNER DE MELLO

CPF: 03748954069

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua General Osório, 969, Centro

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96020-000

País: BRASIL

Telefone: (53) 964 523324

Fax:

Email: alexibraunermello@gmail.com

Inventor 8 de 8

Nome: YAN WAHAST ISLOBÃO

CPF: 01731560028

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Mestrando

Endereço: Avenida Duque de Caxias, 495, Fragata

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96030-001

País: BRASIL

Telefone: (53) 961 152624

Fax:

Email: yanwahast06@gmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	PROCURAÇÃO_DIGITAL.pdf
Resumo	Resumo.pdf
Relatório Descritivo	Relatorio_descritivo.pdf
Reivindicação	REIVINDICACOES.pdf
Desenho	Desenhos.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante.pdf

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 19/07/2023 às 10:32, Petição 870230063132

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.

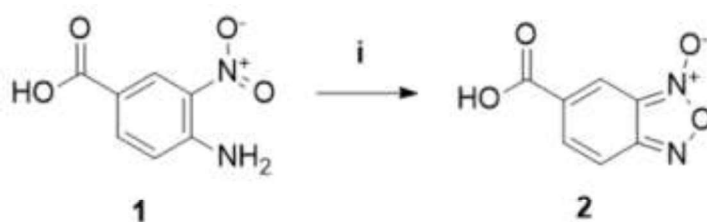
**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 19/07/2023 às 10:32, Petição 870230063132

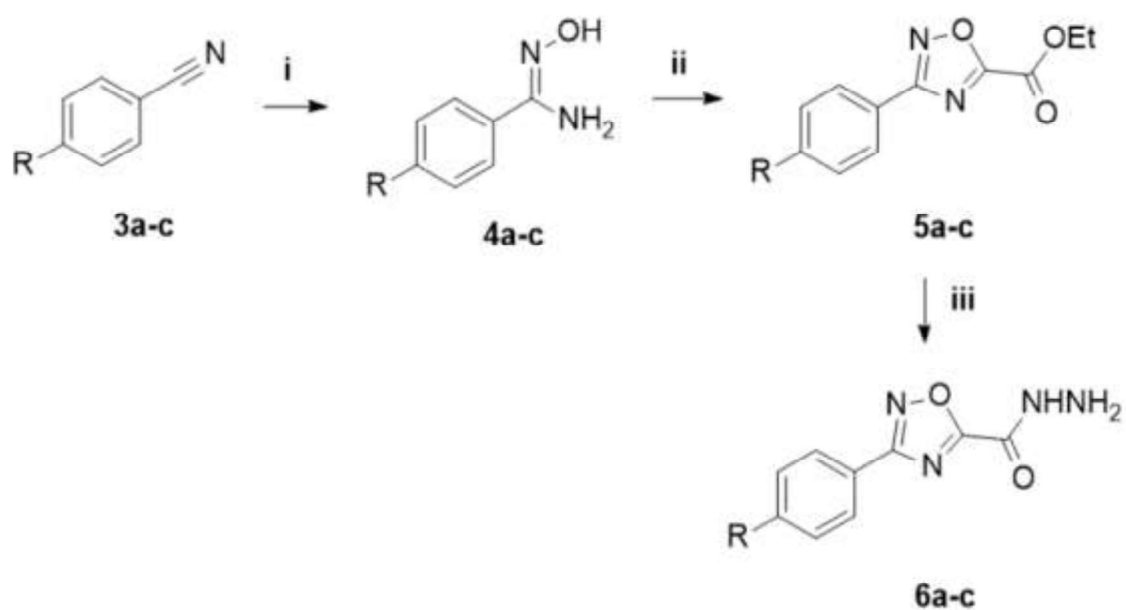
APÊNDICE

Sintetização dos compostos EA2, EH1, EH2, EH3

Rota sintética para obtenção dos intermediários



i) a) KOH, EtOH, 70 °C, 15 min. b) NaClO_(aq), 0 – 5 °C, 1 h (HAROUN, 2001).

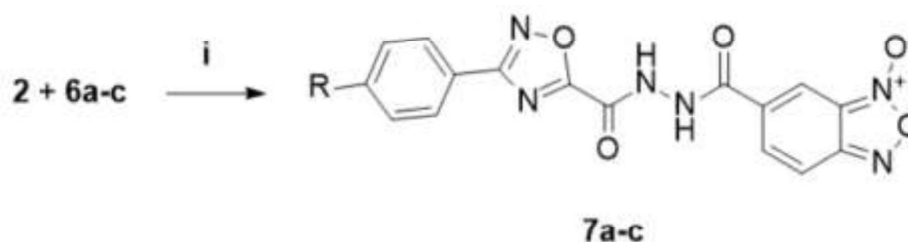


R = H (a), OCH₃ (b), Cl (c).

i) NH₂OH.HCl, NaOH, EtOH/ H₂O; t. a., 15 a 20 h (SRIVASTAVA, 2009). ii) EtO₂CC(O)Cl, DIPEA, THF; refluxo, 2 h (HUGUET, 2012). iii) N₂H₄.H₂O, EtOH; 1 h, t. a. (HUHTINIEMI, 2008).

Síntese dos compostos 7a-c (EH1, EH2 e EH3)

Tabela 1 – Síntese das diacilidrazinas 7a-c.



R = H (a), OCH₃ (b), Cl (c).

Composto	Código	R	Rendimento (%) ^a
7a	EH1	H	76
7b	EH2	OCH ₃	70
7c	EH3	Cl	88

i) **2** (0,5 mmol), **6a-c** (0,5 mmol), Et₃N (5 eq.), TBTU (1,1 eq.), diclorometano (5 mL), t. a., 2 h (adaptado de STABILE, 2010; MAYER, 2017). a) Produto isolado e purificado por extração com solventes.

Procedimento experimental para síntese dos compostos 7a-c:

Em um balão de duas bocas munido de agitação magnética, solubilizou-se ácido benzofuroxano-6-carboxílico (**2**) em diclorometano (5 mL), e foram adicionados, em seguida, trietilamina (5 eq.), TBTU (1,1 eq.) e a hidrazida apropriada **6a-c**. Manteve-se o sistema sob agitação por 2 h, e, após, adicionou-se solução aquosa de HCl a 2 mol.L⁻¹ (5 mL). A mistura foi agitada por mais 5 min adicionais e transferida para um funil de extração, ao qual foi adicionado diclorometano (50 mL). A fase orgânica foi lavada três vezes com solução aquosa de HCl a 2 mol.L⁻¹ (30 mL), seca sob sulfato de magnésio e filtrada, lavando-se o resíduo sólido com acetato de etila. O solvente foi removido sob pressão reduzida, fornecendo a diacilidrazina pura.

1-Óxido de 6-(2-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-carbonil)hidrazinocarbonil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol (7a, EH1):

Rendimento = 76 % (sólido amarelo). **RMN ¹H (DMSO-d₆, 600 MHz), δ (ppm):** 11,71 – 11,28 (sl, 2 H); 8,23 (sl, 1 H); 8,10 (d, 2 H, *J* = 6,8 Hz); 7,91 (sl, 1 H); 7,68 – 7,62 (m, 3 H). **RMN ¹³C (DMSO-d₆, 150 MHz) δ (ppm):** 168,3; 168,0; 152,4; 132,2; 129,5; 127,3; 125,3.

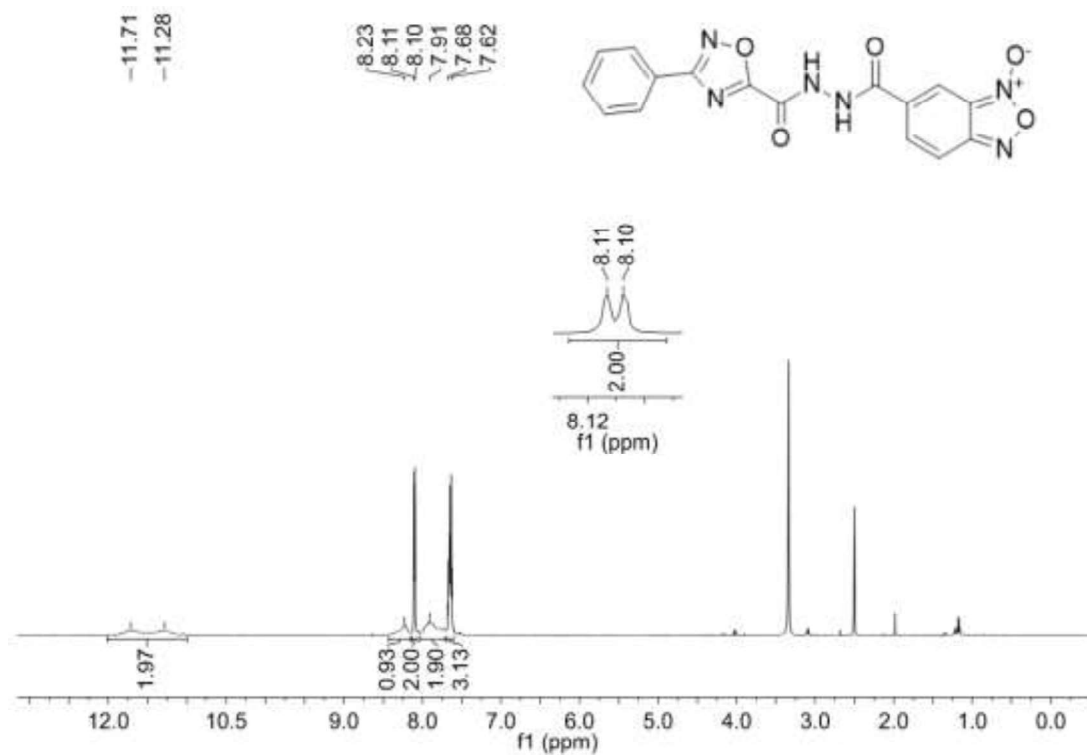
1-Óxido de 6-(2-(3-(4-metoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-5-carbonil)hidrazinocarbonil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol (7b, EH2):

Rendimento = 70 % (sólido amarelo). **RMN ¹H (DMSO-d₆, 600 MHz), δ (ppm):** 8,17 (sl, 1 H); 8,02 (d, 2 H, *J* = 8,7 Hz); 7,89 (sl, 2 H); 7,16 (d, 2 H, *J* = 8,7 Hz), 3,85 (s, 3 H). **RMN ¹³C (DMSO-d₆, 150 MHz) δ (ppm):** 168,3; 168,0; 152,4; 132,2; 129,5; 127,3; 125,3.

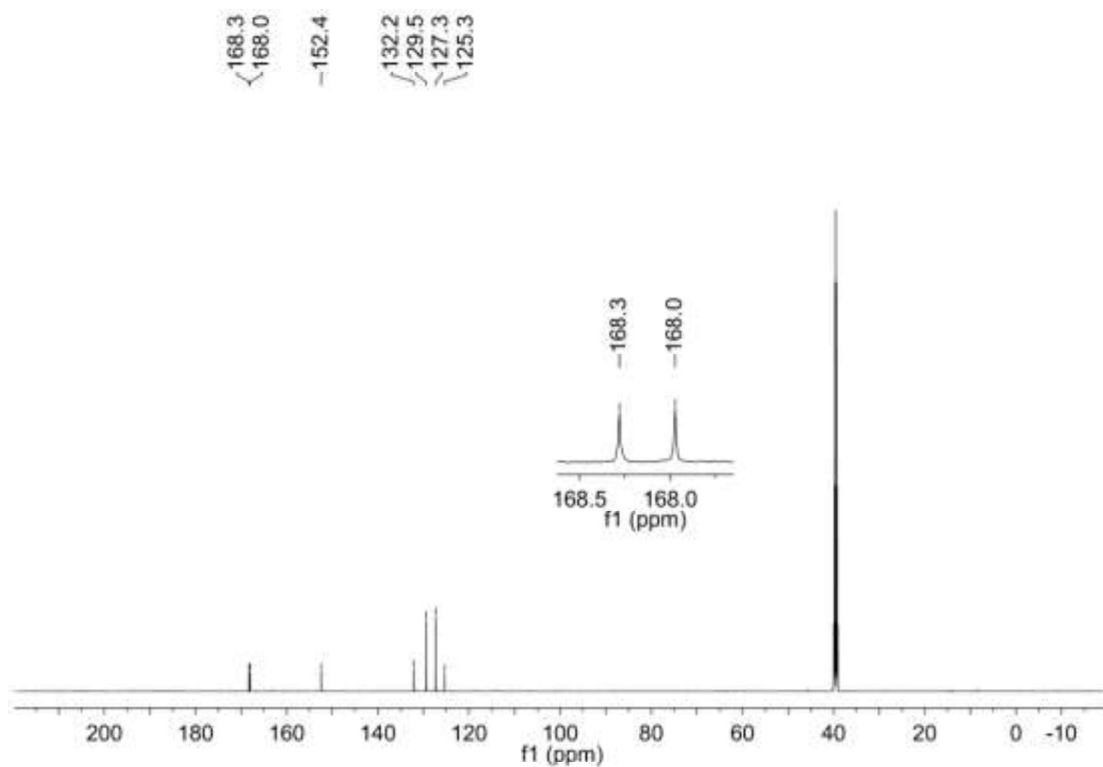
1-Óxido de 6-(2-(3-(4-clorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-carbonil)hidrazinocarbonil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol (7c, EH3):

Rendimento = 88 % (sólido amarelo). **RMN ¹H (DMSO-d₆, 600 MHz), δ (ppm):** 11,75 (sl, 1 H); 11,27 (sl, 1 H); 8,23 (sl, 1 H); 8,10 (d, 2 H, *J* = 8,5 Hz); 7,88 (sl, 2 H); 7,71 (d, 2 H, *J* = 8,5 Hz). **RMN ¹³C (DMSO-d₆, 150 MHz) δ (ppm):** 168,1; 167,5; 152,3; 136,9; 129,7; 129,1; 124,2.

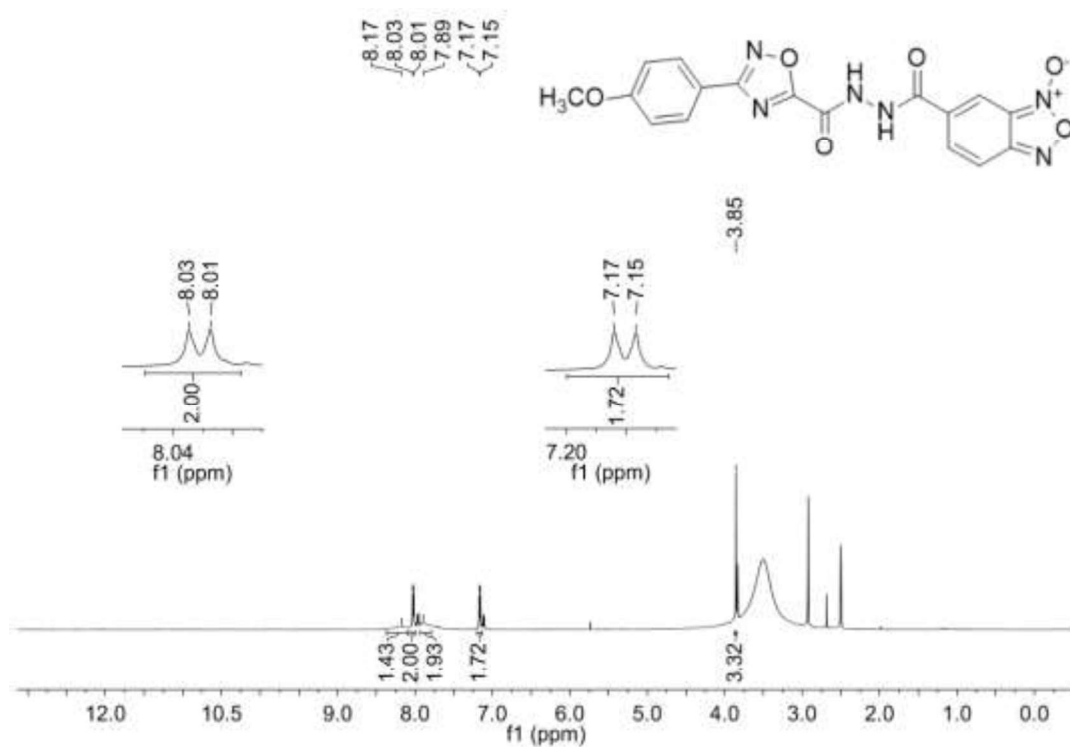
Espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C



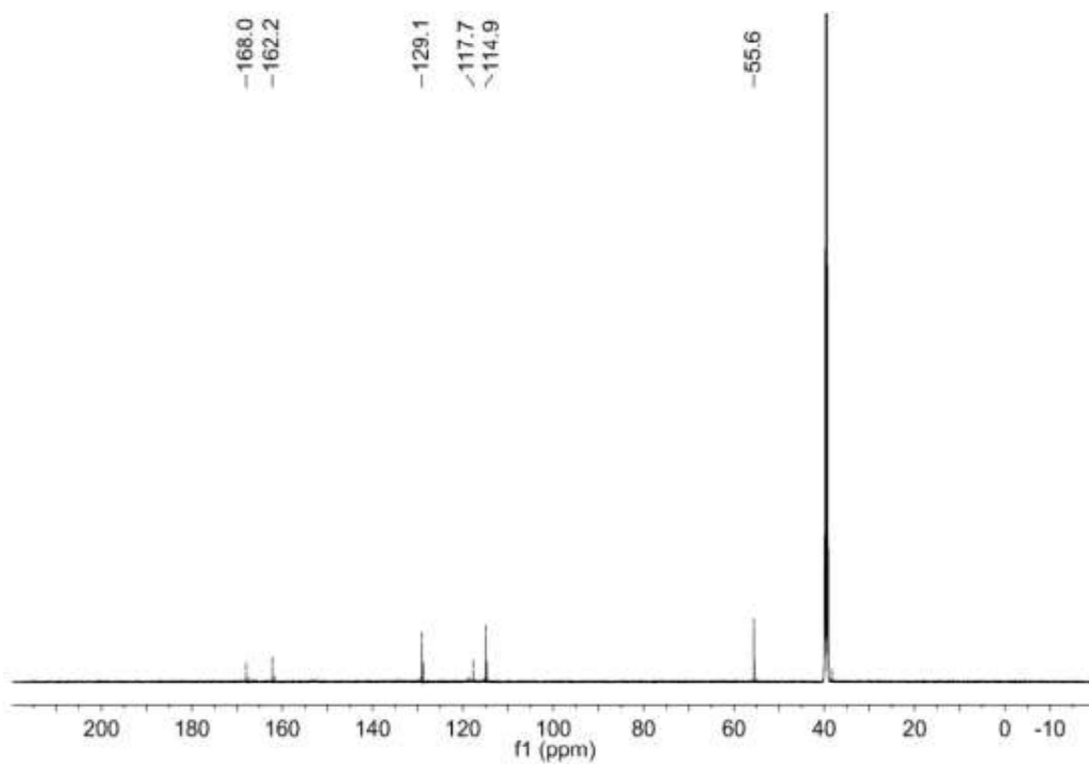
Espectro de RMN de ^1H do composto **7a** (DMSO- d_6 , 600 MHz).



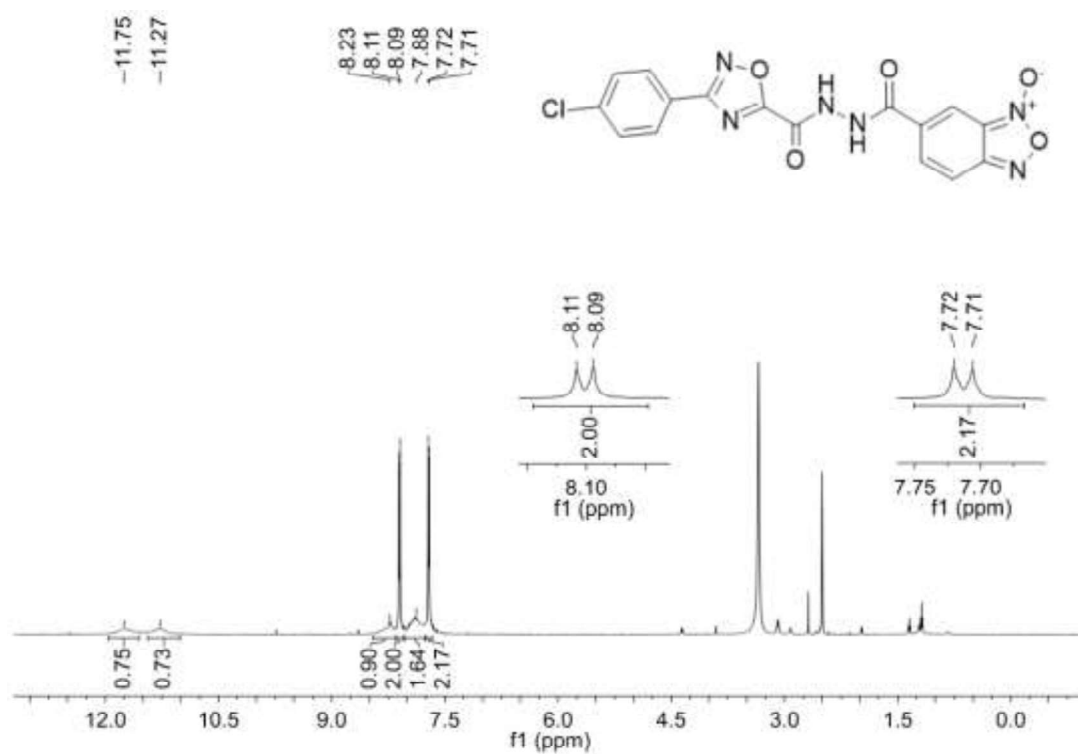
Espectro de RMN de ^{13}C do composto **7a** (DMSO- d_6 , 150 MHz).



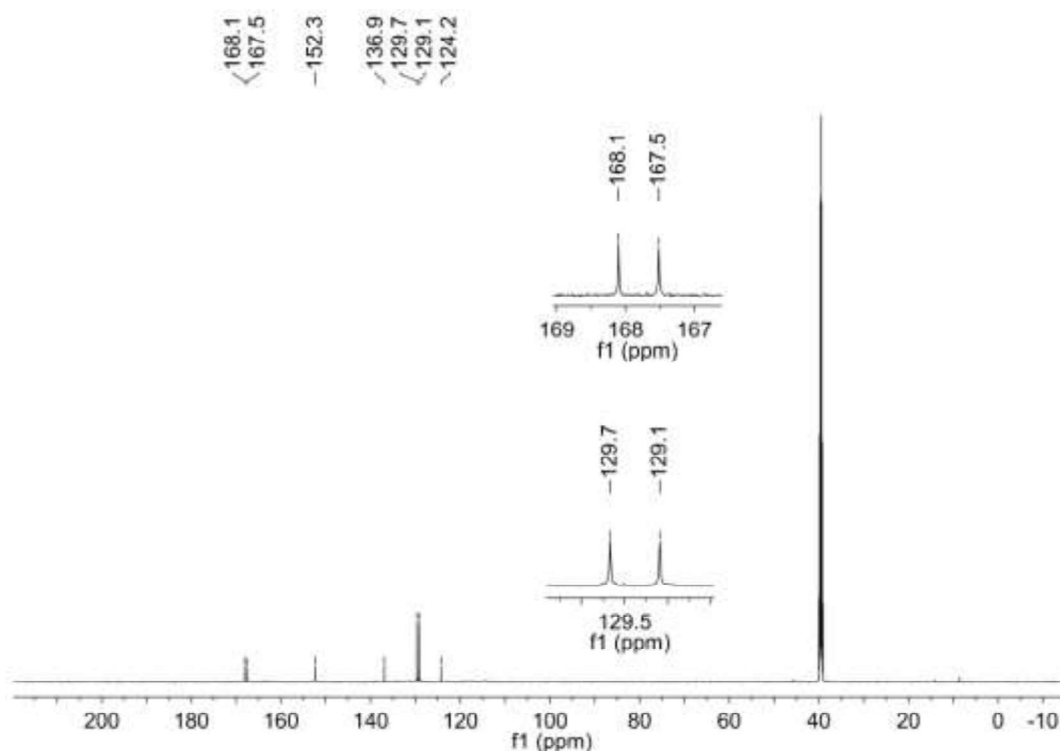
Espectro de RMN de ^1H do composto **7b** (DMSO- d_6 , 600 MHz).



Espectro de RMN de ^{13}C do composto **7b** (DMSO- d_6 , 150 MHz).

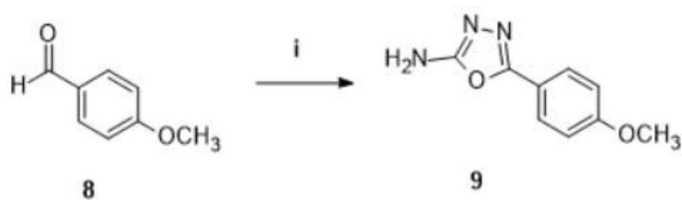


Espectro de RMN de ^1H do composto **7c** (DMSO- d_6 , 600 MHz).



Espectro de RMN de ^{13}C do composto **7c** (DMSO- d_6 , 150 MHz).

Composto denominado EA2



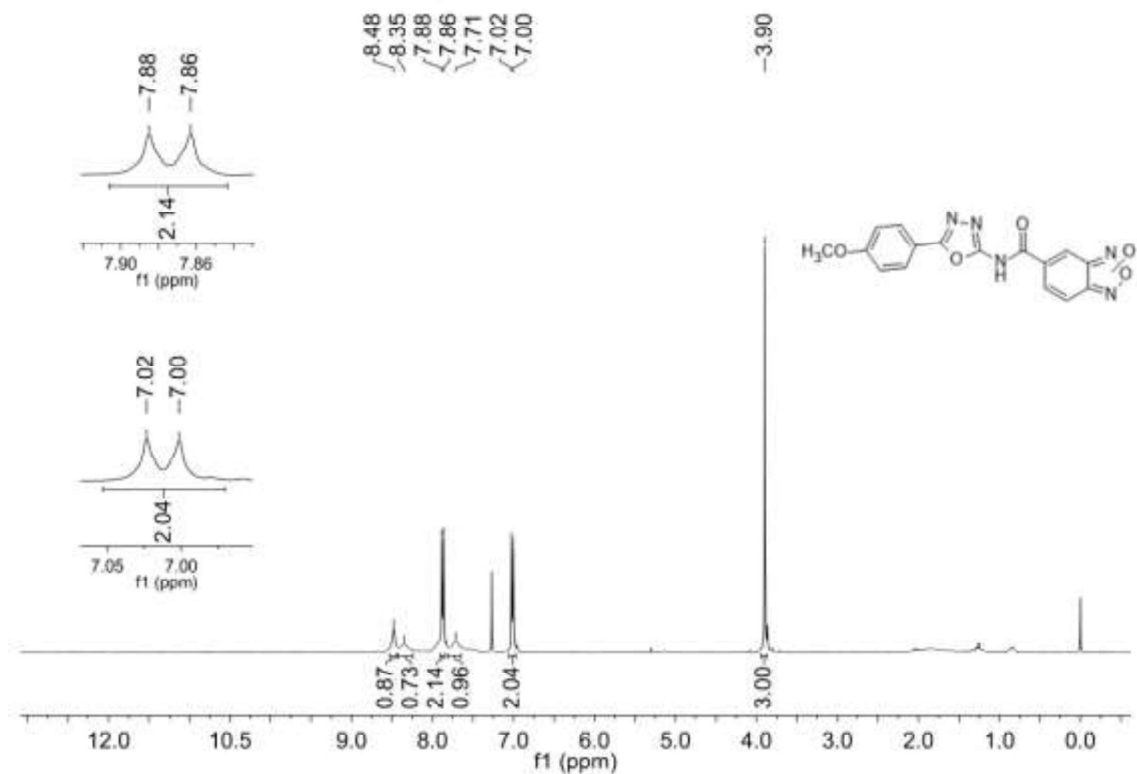
i) a) **8** (5 mmol), $\text{NH}_2\text{NHC(O)NH}_2\cdot\text{HCl}$ (5 mmol), AcONa (5,5 mmol), MeOH , t. a., 15 min., remoção do solvente. b) I_2 (5,5 mmol), K_2CO_3 (10 mmol), dioxano (15 mL), 101°C , 15 h. Rendimento = 78 %.

NIU, P. *et al.* Synthesis of 2-Amino-1,3,4-oxadiazoles and 2-Amino-1,3,4-thiadiazoles via Sequential Condensation and I_2 -Mediated Oxidative C–O/C–S Bond Formation. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 80, n. 2, p. 1018 – 1024, 2015.

A um balão munido de agitação magnética contendo ácido benzofuroxano-6-carboxílico (**2**, 0,5 mmol) e o 2-amino-1,3,4-oxadiazol **9** (0,5 mmol) em uma mistura de diclorometano (5 mL) e acetonitrila (5 mL), adicionou-se cloridrato de 1-etil-2-(3-(dimetilamino)propil)carbodi-imida (EDC, 0,6 mmol). A mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 2 h, e o solvente foi removido por evaporação rotativa sob pressão reduzida. Após, adicionou-se 5 mL de água ao balão e o resíduo foi rapidamente triturado para a dissolução do subproduto de ureia dissubstituída. A suspensão obtida foi filtrada a vácuo e o sólido foi lavado com 10 mL de água, vertida aos poucos durante cerca de 30 s. O produto sólido foi transferido para um balão ao qual se adicionou acetato de etila (30 mL), e o solvente foi removido por evaporação rotativa. Após uma nova adição de acetato de etila (30 mL) seguida de evaporação e secagem sob pressão reduzida, o produto **10** (EA2) foi obtido como um sólido amarelo. Rendimento = 34 %.

RMN de ^1H (CDCl_3 , δ 400 MHz): 8,48 (s, 1 H); 8,35 (sl, 1 H); 7,87 (d, 2 H, $J = 8,8$ Hz); 7,71 (sl, 1 H); 7,01 (d, 2 H, $J = 8,8$ Hz); 3,90 (s, 3 H). **RMN de ^{13}C (CDCl_3 , δ 100 MHz):** 163,5; 154,6; 151,2; 128,9; 127,6; 114,7; 114,0; 55,6.

Espectro de RMN de ^1H do composto **10** (EA2) em CDCl_3 , 400 MHz (δ , TMS).



Espectro de RMN de ^{13}C do composto **10** (EA2) em CDCl_3 , 100 MHz (δ , TMS).

