

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Atividade anti-*Trichomonas vaginalis*: efeitos  
bioquímicos e moleculares de compostos análogos  
a chalconas**

**Raquel Nascimento das Neves**

Pelotas, 2019

**Raquel Nascimento das Neves**

**Atividade anti- anti-*Trichomonas vaginalis*: efeitos  
bioquímicos e moleculares de compostos análogos  
a chalconas**

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

**Orientador:** Sibele Borsuk

**Coorientador:** Claudio Martin Pereira de Pereira

Pelotas, 2019

## **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr<sup>a</sup> Nara Amélia da Rosa Farias (Universidade Federal de Pelotas, IB/DEMP)

Prof. Dr<sup>a</sup> Daniela Fernandes Ramos (Universidade Federal do Rio Grande, FURG)

Prof. Dr<sup>a</sup> Daiane Drawanz Hartwig (Universidade Federal de Pelotas, CDTec)

Prof. Dr<sup>a</sup> Sibeke Borsuk (Orientadora, Universidade Federal de Pelotas, CDTec)

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

N511a Neves, Raquel Nascimento das

Atividade anti-*Trichomonas vaginalis* : efeitos bioquímicos e moleculares de compostos análogos a chalconas / Raquel Nascimento das Neves ; Sibeles Borsuk, orientadora ; Claudio Martin Pereira de Pereira, coorientador. — Pelotas, 2019.

84 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Tricomoníase. 2. Síntese. 3. Hidroxichalconas. 4. Docking molecular. I. Borsuk, Sibeles, orient. II. Pereira, Claudio Martin Pereira de, coorient. III. Título.

CDD : 616.9654

À minha família, pelo incentivo, apoio e amor incondicional  
Dedico.

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, irmãos, namorado e família, agradeço por todo apoio, amor, carinho e principalmente por sempre acreditarem no meu potencial e nos caminhos escolhidos por mim, me incentivando e proporcionando a realização dessa etapa.

À minha orientadora Sibeles Borsuk, agradeço por todas as oportunidades e confiança depositada nesses quatro anos de orientação, sem elas com certeza não teria chegado até aqui, agradeço por ter transferido seu tempo, ensinamentos e sugestões sendo sempre um exemplo de profissional a seguir. À Ângela Sena Lopes, sou muito grata pela confiança de me ter como tua estagiária, pelo carinho e cuidado, por todos os conselhos recebidos e por sempre incentivar a concretização dos meus sonhos. Hoje, tenho muito orgulho do nosso trabalho e conquistas, e com certeza sou o resultado do teu incentivo e ensinamentos.

Aos colegas de laboratório, Mara Thais, Mirna Dié e especialmente Rodrigo Pinho, agradeço pela amizade, colaboração, e apoio em todas as etapas do processo. Aos estagiários, Bárbara, Luiza, Nicole e Gabriel, agradeço por toda ajuda, vocês foram essenciais para o desenvolvimento do meu projeto. Aos laboratórios parceiros, em especial aos colegas Caroline Carapina, Micaela Domingues, Angela Casaril, Mirian Bruni, Carolina Caetano, Bruna Baccega e Juliana Fenalti, que nunca mediram esforços para me ajudar no que fosse necessário, agradeço pela colaboração e amizade.

Aos colegas de graduação, pós-graduação, e consequentemente amigos que durante esses anos foram a minha segunda família, dividindo sonhos e dificuldades, obrigada pelo companheirismo, por tornarem o ambiente de trabalho mais alegre e por sempre estarem presentes nos momentos tristes e felizes. Assim como agradeço aos amigos de fora da faculdade, pela amizade e por acreditarem no meu sucesso. Vocês foram fundamentais.

À Universidade Federal de Pelotas, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, órgãos de fomento e professores, agradeço pela infraestrutura e excelência em ensino.

Por fim, agradeço à todas as oportunidades e também as dificuldades que encontrei, e a todos vocês, que contribuíram para meu sucesso, crescimento profissional e pessoal, meu muito obrigado!

## Resumo

NEVES, Raquel. **Atividade anti-*Trichomonas. Vaginalis*: efeitos bioquímicos e moleculares de compostos análogos a chalconas**. 2019. 84f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O tratamento da tricomoníase é baseado nos fármacos 5'-nitroimidazóis, o qual tem apresentado falhas relacionadas a reações alérgicas, efeitos adversos e o surgimento de isolados resistentes. Não existem medicamentos alternativos aprovados para o tratamento desses casos, sendo necessária a busca por novas moléculas ativas. Nesse cenário, as chalconas têm sido amplamente estudadas por suas promissoras atividades biológicas, tais como: antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitária, entre outras. Neste trabalho, é apresentado um manuscrito contendo a síntese de três hidroxichalconas (**3a**, **b** e **c**) e análises da atividade biológica dessas moléculas *in vitro* e *in silico* sobre *Trichomonas vaginalis*. A avaliação biológica *in vitro* mostrou que a hidroxichalcona **3c** apresentou atividade anti-*T. vaginalis*, com morte completa dos trofozoítos em 12 h de incubação na concentração inibitória mínima (MIC) de 100 µM. **3c** mostrou uma citotoxicidade dose-dependente, com concentração citotóxica para 50% das células (CC<sub>50</sub>) de 118,9 µM em células VERO em 24 h. Já a associação de 12,5 µM de **3c** e 40 µM de Metronidazol (MTZ) mostrou 95,31% de atividade contra trofozoítos de *T. vaginalis* após 24 h de exposição e não afetou o crescimento de células VERO. A avaliação RS (*Reactive Species*) e TBARS (*Thiobarbituric acid reactive substances*) mostrou aumento na produção de RS e dano lipídico induzido por **3c** de forma isolada e em associação com MTZ. A análise *in silico* por docking molecular mostrou que **3c** pode inibir a atividade das enzimas TvMGL (metionina gama-liase), TvLDH (lactato desidrogenase) e TvPNP (purina nucleosídeo fosforilase), afetando a sobrevivência de *T. vaginalis*, sugerindo um mecanismo de ação diferente do MTZ. Além disso, em anexo a este documento, está uma patente de invenção, depositada no Instituto Nacional da Propriedade Intelectual, exemplificando duas classes de chalconas com atividade anti-*T. vaginalis*, as hidroxichalconas, e chalconas com 2-acetiltiofeno. Portanto, estes resultados sugerem que moléculas análogas a chalconas são promissores agentes anti-*T. vaginalis* e devem ser consideradas para novas investigações para o tratamento da tricomoníase tanto de forma isolada, quanto em associação com MTZ.

**Palavras-Chave:** Tricomoníase, Síntese, Hidroxichalconas, Docking Molecular.

## Abstract

NEVES, Raquel. **Anti-*Trichomonas vaginalis* activity: biochemical and molecular effects of chalcones analogues**. 2019. 84f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The treatment for trichomoniasis based on 5'-nitroimidazol agents has been presented failures related to allergic reactions, side effects and appearance of resistant isolates. There are no alternative drugs approved for the treatment of these cases, so the search for new active molecules is necessary. In this scenario, chalcones have been extensively studied for their promising biological activities, such as: antibacterial, antifungal, antiviral, antiparasitic, among others. Here, we present a manuscript containing the synthesis of three hydroxychalcones (**3a**, **b** and **c**), *in vitro* and *in silico* analyses against *Trichomonas vaginalis*. The *in vitro* biological evaluation showed that hydroxychalcone **3c** presented anti-*T. vaginalis* activity, with complete death in 12 h of incubation at the minimum inhibitory concentration (MIC) of 100 µM. **3c** showed a dose-dependent cytotoxicity, with cytotoxic concentration for 50% of cells (CC50) of 118,9 µM against VERO cells in 24 h. To overcome this situation, the association of **3c** at 12,5 µM, and MTZ at 40 µM showed 95,31% activity against *T. vaginalis* trophozoites after 24 h of exposure and did not affect the VERO cells growth. The RS (Reactive Species) e TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) evaluation showed increased RS production and lipid damage induced by **3c** alone and in association with MTZ. *In silico* analysis by molecular docking showed that **3c** could inhibit the enzyme activity of TvMGL (methionine gamma-lyase), TvLDH (lactate dehydrogenase) and TvPNP (purine nucleoside phosphorylase), affecting the *T. vaginalis* survival, and indicating a different mechanism of action from MTZ. In addition, attached to this document, is a patent of invention, deposited in the National Institute of Intellectual Property, exemplifying two classes of chalcones with anti-*T. vaginalis*, hydroxychalcones, and chalcones with 2-acetylthiophene. Therefore, these results suggest that hydroxychalcones are promising anti-*T. vaginalis* agents and must be considering for further investigations for trichomoniasis treatment both in isolation and in association with MTZ.

**Keywords:** Trichomoniasis, Synthesis, Hydroxychalcones, Molecular docking.

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

|                               |                                              |
|-------------------------------|----------------------------------------------|
| ATP                           | Adenosina 5'-trifosfato                      |
| CC <sub>50</sub>              | Concentração Citotóxica para 50% das células |
| CD4+                          | <i>Cluster of Differentiation 4</i>          |
| CDF                           | <i>Cell-Detaching Factor</i>                 |
| CHS                           | Chalcona Sintase                             |
| CIN                           | Neoplasia Intra-epitelial Cervical           |
| CoA                           | Coenzima A                                   |
| DIP                           | Doença Inflamatória Pélvica                  |
| EFA                           | <i>Elongation factor</i>                     |
| FDA                           | <i>Food and Drug Administration</i>          |
| FMN                           | Flavina mononucleótido                       |
| GAPDH                         | <i>Geraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> |
| H <sub>2</sub>                | Hidrogênio molecular                         |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de hidrogênio                       |
| HIV                           | Vírus da Imunodeficiência Humana             |
| IC <sub>50</sub>              | Metade da Concentração Inibitória Máxima     |
| IgA                           | Imunoglobulina A                             |
| IgG                           | Imunoglobulina G                             |
| IgM                           | Imunoglobulina M                             |
| IST                           | Infecção Sexualmente Transmissível           |
| LDH                           | Lactato desidrogenase                        |
| MGL                           | Metionina gama-liase                         |

|         |                                                         |
|---------|---------------------------------------------------------|
| MIC     | Concentração Inibitória Mínima                          |
| mRNA    | RNA mensageiro                                          |
| MTZ     | Metronidazol                                            |
| NAATs   | <i>Nucleic acid amplification test</i>                  |
| OMS     | Organização Mundial da Saúde                            |
| PCR     | <i>Polymerase Chain Reaction</i>                        |
| PFOR    | Piruvato Ferredoxina-Oxidorrreductase                   |
| pH      | Potencial Hidrogeniônico                                |
| PNP     | Purina Nucleosídeo Fosforilase                          |
| qRT-PCR | <i>Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction</i> |
| RNA     | <i>Ribonucleic acid</i>                                 |
| RS      | <i>Reactive Species</i>                                 |
| SOD     | Superóxido dismutase                                    |
| TBARS   | <i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>          |
| TNZ     | Tinidazol                                               |
| α       | Alfa                                                    |
| β       | Beta                                                    |
| γ       | Gama                                                    |

## Sumário

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO GERAL .....                                                | 11 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....                                           | 13 |
| 2.1 <i>Trichomonas vaginalis</i> .....                                  | 13 |
| 2.2 Tricomoníase .....                                                  | 14 |
| 2.2.1 Epidemiologia e transmissão.....                                  | 14 |
| 2.2.2 Manifestações clínicas e complicações.....                        | 16 |
| 2.2.3 Patogênese.....                                                   | 18 |
| 2.2.4 Diagnóstico.....                                                  | 19 |
| 2.2.5 Tratamento e prevenção.....                                       | 22 |
| 2.2.6 Novas alternativas para prevenção e tratamento da tricomoníase... | 24 |
| 2.3 Chalconas .....                                                     | 26 |
| 2.3.1 Síntese.....                                                      | 27 |
| 2.3.2 Atividades biológicas.....                                        | 28 |
| 3 HIPÓTESE E OBJETIVOS.....                                             | 30 |
| 3.1 Hipótese.....                                                       | 30 |
| 3.2 Objetivo Geral.....                                                 | 30 |
| 3.3 Objetivos específicos.....                                          | 30 |
| 4 CAPÍTULO .....                                                        | 31 |
| 5 CONCLUSÃO GERAL.....                                                  | 63 |
| 6 REFERÊNCIAS.....                                                      | 64 |
| 7 ANEXO.....                                                            | 73 |

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A tricomoníase é a infecção sexualmente transmissível (IST) não viral mais comum e prevalente no mundo. Com base nas estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), a tricomoníase afeta mais de 276 milhões de pessoas por ano em todo o mundo (World Health Organization, 2012; Leitsch, 2016). Atualmente, o tratamento para tricomoníase humana é baseado em fármacos da classe 5'-nitroimidazol, mais especificamente Metronidazol (MTZ) e Tinidazol (TNZ), que são os únicos medicamentos aprovados e recomendados pela *Food and Drug Administration* (FDA). No entanto, este curso de tratamento tem mostrado algumas falhas, que podem ser atribuídas a reações alérgicas, efeitos adversos e o aparecimento de isolados resistentes aos 5'-nitroimidazóis (Paulish-miller et al., 2014).

Não há medicamentos alternativos aprovados para o tratamento desses casos, fazendo com que a dependência de uma única classe terapêutica seja problemática, por isso a busca por tratamentos alternativos aos 5'-nitroimidazóis é necessária e tem sido frequentemente estudada. Neste contexto, os compostos sintéticos apresentam uma importante ferramenta para a descoberta de fármacos (de Brum Vieira et al., 2015; Bala & Chhonker, 2018).

No processo de descoberta de novos fármacos antiparasitários, a concepção e síntese de novos compostos com alta especificidade é particularmente importante para o desenvolvimento de fármacos clinicamente úteis. Sendo assim, proteínas de *T. vaginalis*, como a lactato desidrogenase (LDH), metionina gama-liase (MGL) e a purina nucleosídeo fosforilase (PNP) podem servir como alvos para predizer potenciais inibidores, porque diferem das proteínas humanas e são essenciais para a sobrevivência de *T. vaginalis* (Setzer et al., 2017).

O uso da estrutura padrão de chalconas (1,3-difenil-2-propeno-1-ona), permite uma multiplicidade de substituições devido à sua síntese fácil, química simples e facilidade de manipulação de átomos de hidrogênio que podem oferecer diferentes atividades biológicas (Division et al., 1968; Gomes et al., 2017). Chalconas são cetonas aromáticas  $\alpha,\beta$ -insaturadas, precursoras de cadeia aberta para a biossíntese de flavonóides e isoflavonóides, amplamente

distribuídas na natureza, em alimentos e bebidas. Suas atividades biológicas têm sido extensivamente estudadas, apresentando atividades promissoras, como antitumoral (Mahapatra et al., 2015), antifúngica (Palanco et al., 2017), antioxidante, analgésica, anti-inflamatória (Abdellatif et al., 2015), antiparasitária (Borsari, Santarem, Torrado, Olías, et al., 2017) e, mais importante, anti-*T. vaginalis* (Trein et al., 2018).

Para indicar uma nova alternativa para o tratamento da tricomoníase, neste trabalho é descrito a síntese e atividade antiparasitária de três análogos de chalconas, as hidroxichalconas, de forma isolada e em associação com Metronidazol. Além disso, análises dos efeitos bioquímicos contra trofozoítos de *T. vaginalis*, citotoxicidade contra fibroblastos e análise de docking molecular com enzimas de *T. Vaginalis* foram realizados para indicar um perfil mais aprofundado sobre comportamento desses compostos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Trichomonas vaginalis*

*Trichomonas vaginalis*, é um protozoário da família Trichomonadidae, da subfamília Trichomonadinae, da ordem Trichomonadida, da classe Zoomastigophorea, e do filo Sarcomastigophora. As três espécies encontradas no homem são *Trichomonas tenax*, não-patogênico, que vive na cavidade bucal humana e também de chipanzés e macacos; *Trichomonas hominis*, também não-patogênico, que habita o trato intestinal humano; e *Trichomonas vaginalis*, a única espécie que tem potencial patogênico e que coloniza o trato geniturinário de homens e mulheres (Maciel et al., 2004). Em 1836, este protozoário foi descrito por Donné, que o isolou de uma mulher com vaginite, e entre 1894 - 1896, outros pesquisadores observaram este protozoário na uretra de um homem (Thorburn, 1974).

De todos os tricomonadídeos, *T. vaginalis* é o mais amplamente estudado. Segundo Maciel et al. (2004), *T. vaginalis* é uma célula polimorfa, tanto no hospedeiro natural como em meios de cultura, onde as condições físico-químicas do ambiente em que se encontra modificam a aparência do protozoário. Sua multiplicação, como em todos os tricomonadídeos, se dá por divisão binária longitudinal e não possui forma cística, apenas a trofozoítica. Quando vivos, apresentam variação no seu tamanho e forma, podendo ser elipsóides ou ovais e algumas vezes esféricos. Seu comprimento é de aproximadamente 9,7 µm e a largura de 7 µm. Quando presente na mucosa do hospedeiro, verifica-se a forma ameboide, devido a sua alta plasticidade, tendo a capacidade de formar pseudópodes, os quais são usados para capturar os alimentos e se fixar em partículas sólidas (Maciel et al., 2004).

*T. vaginalis* possui quatro flagelos livres, com tamanhos desiguais, provindos do canal periflagelar que auxiliam na locomoção do parasito. Além disso, apresentam uma membrana ondulante voltada para trás que emerge fora do canal periflagelar e que se adere ao corpo. O axóstilo, é uma estrutura rígida e hialina, formada por microtúbulos que emerge para fora do organismo, percorrendo todo o corpo, e tem como função a sustentação do parasito. O núcleo é elipsoide próximo a extremidade anterior, com uma dupla membrana

nuclear e frequentemente apresenta um pequeno nucléolo. Esse protozoário é desprovido de mitocôndrias, mas apresenta hidrogenossomos, grânulos densos que podem ser vistos ao microscópio óptico, e são importantes na regulação do metabolismo pois são portadores da piruvato ferredoxina-oxidorredutase (PFOR), enzima capaz de transformar o piruvato em acetato pela oxidação fermentativa e liberar adenosina 5'-trifosfato (ATP) e hidrogênio molecular (H<sub>2</sub>) (Dino Petrin et al., 1998; Maciel et al., 2004).

*T. vaginalis* é um organismo anaeróbio facultativo, o qual cresce em meio com pH entre 5 e 7,5 e em temperaturas entre 20° C e 40° C. Como fonte de energia, o protozoário utiliza glicose, maltose e galactose (Maciel et al., 2004). Devido ao fato de o ambiente vaginal ser constantemente modificado por variações de pH, hormônios, menstruação e fornecimento de nutrientes, a capacidade de armazenar glicogênio como forma de energia, é importante para o parasito, pois sob condições em que tais compostos são limitados, a utilização de aminoácidos torna-se vital. (Dino Petrin et al., 1998).

## **2.2 Tricomoníase**

### **2.2.1 Epidemiologia e transmissão**

*T. vaginalis* coloniza o trato geniturinário de homens e mulheres, onde provoca infecção e fora deste local não sobrevive. É o parasita responsável pela tricomoníase, IST não viral mais comum no mundo. Em 2008, a OMS estimou em 276,4 milhões de casos anualmente em pessoas entre 15 e 49 anos, sendo 89% desses casos em mulheres. A prevalência mundial de tricomoníase é muito maior do que outras IST's curáveis, como a gonorreia e sífilis, ambos com 36,4 milhões de casos, e infecção por clamídia, com 100,4 milhões de adultos infectados. No Brasil, a prevalência varia de 2,6% a 20% entre mulheres, essa variação é devido ao fato de a tricomoníase não ser uma IST obrigatoriamente reportada e por vários casos não serem diagnosticados, devido à baixa sensibilidade dos testes de diagnóstico disponíveis (Menezes et al., 2016).

No Rio Grande do Sul um estudo realizado por Aguiar et al. (2017) identificou uma prevalência de 4,1% em 345 mulheres, em que, 5,9% entre mulheres grávidas, 8,5% entre mulheres soropositivas e 10,1% entre gestantes

soropositivas. As taxas para grupos com outras características demográficas e clínicas significativas foram: 6,6% entre mulheres com pele branca, 12,3% entre mulheres com renda abaixo do salário mínimo mensal, 7,4% entre mulheres com pH vaginal maior ou igual a 4,6 e 7,9% entre mulheres com outras IST's. Bruni et al. (2018), analisaram amostras de 499 mulheres, e a taxa de positividade foi de 4,2% de trofozoítos de *T. vaginalis* encontrados em mulheres de Pelotas, Rio Grande do Sul, onde 59,7% das mulheres infectadas eram sintomáticas. A incidência da infecção depende de vários fatores, incluindo idade, atividade sexual, número de parceiros sexuais, outras IST's, fase do ciclo menstrual, técnicas de diagnóstico e condições socioeconômicas, entre outros. Diferenças no padrão de vida, nível educacional e higiene pessoal são fatores importantes que influenciam na incidência da infecção (Dino Petrin et al., 1998).

A transmissão de *T. vaginalis* ocorre principalmente através da relação sexual. Os trofozoítos podem sobreviver por mais de uma semana sob o prepúcio do homem sadio após relação com uma mulher infectada, e esse fato faz com que o homem se torne o principal vetor da doença (Maciel et al., 2004). Além disso, atualmente admite-se que a transmissão não-sexual é rara, mas teoricamente pode ocorrer. Como por exemplo, em duchas contaminadas, espécies ou assentos de vasos sanitários, água, urina e sêmen mesmo após algumas horas de exposição ao ar. O organismo, não tendo a forma cística, é suscetível à dessecação e às altas temperaturas, mas pode viver, surpreendentemente, fora de seu hábitat por algumas horas, sob altas condições de umidade, podendo viver durante três horas na urina coletada e seis horas no sêmen ejaculado (Maciel et al., 2004).

Outra forma de transmissão se dá durante o parto, onde em 5% dos casos ocorre transmissão da mãe infectada para recém-nascidas, durante a passagem pelo canal vaginal, devido à infecção não-tratada da mãe. Nesses casos de tricomoniase neonatal em meninas, a infecção acontece porque o epitélio escamoso da vagina da recém-nascida está sendo influenciado pelos estrogênios maternos, permitindo a colonização pelo parasito. No entanto, assim que esse efeito hormonal desaparecer, em torno de poucas semanas após a contaminação, o trato genital torna-se resistente à infecção por *T. vaginalis*, sendo possível eliminar espontaneamente o parasito, o que torna a infecção autolimitada nesses casos (Dino Petrin et al., 1998; Maciel et al., 2004).

## 2.2.2 Manifestações clínicas e complicações

A tricomoníase é uma doença que apresenta amplo espectro de manifestações clínicas, desde a apresentação assintomática até um estado de severa inflamação (Gómez-Barrio et al., 2002). Os sinais e sintomas dependem das condições individuais, da virulência e do número de parasitos infectantes. Infecções assintomáticas acontecem em 25 a 50% dos casos e o tempo de incubação é de 4 - 28 dias, onde após esse período, menos de 50% dos casos apresentarão sintomas (Allsworth et al., 2009). Por consequência da doença não apresentar grandes sequelas na maioria dos casos, e também ser considerada mais como um incômodo do que um problema de saúde, os demais pacientes, que são assintomáticos, podem aumentar cerca de 2,7 vezes o risco de infecção por *T. vaginalis* (Pol et al., 2008; Bowden & Garnett, 2000).

A tricomoníase em homens na maioria dos casos é assintomática, (Maciel et al., 2004). Os homens quando infectados, raramente apresentam sintomas (em 10% dos casos), e quando apresentam, esses sintomas podem apresentar-se como corrimento, disúria, prurido uretral, ulceração peniana e sensação de queimação após relação sexual ou doença sintomática leve, clinicamente indistinguível de outras causas de uretrites. Apesar de complicações serem raras, podem acontecer epididimite, infertilidade e prostatite (Bowden; Garnett, 2000; Dino Petrin et al., 1998). É possível que homens refratários a esta infecção, possuam quantidades consideráveis de zinco no fluido prostático, o que é altamente tóxico para *T. vaginalis* e dessa forma, o exame do sedimento urinário, rotineiramente utilizado para o diagnóstico de tricomoníase em homens, pode induzir falsos resultados (López et al., 2000).

A tricomoníase em mulheres é uma doença de fase reprodutiva. As manifestações clínicas da infecção raramente são observadas antes da menarca ou após a menopausa. Das mulheres infectadas, entre 25% e 50% são assintomáticas, têm pH vaginal normal de 3,8 a 4,2 e microbiota vaginal normal (Dino Petrin et al., 1998). Um terço das pacientes assintomáticas torna-se sintomático dentro de seis meses (Maciel et al., 2004). Nos primeiros estágios da infecção há sintomas, porém, são menos agressivos. Em 11 a 17% dos casos esses podem apresentar-se na forma de disúria, dispareunia e discreto desconforto abdominal (Dino Petrin et al., 1998). Ressaltam ainda que os sinais

e sintomas são tipicamente intermitentes, podendo agravar o quadro durante o período menstrual, pois enquanto o número de microrganismos na vagina diminui durante a menstruação, os fatores de virulência mediados pelo ferro contribuem para a exacerbação de sintomas nesse período (Leitsch, 2016; Dino Petrin et al., 1998).

Os sinais e sintomas clínicos durante a fase aguda da infecção são evidenciados por vaginite aguda, devido a infiltração por leucócitos, e também pelo típico corrimento amarelo, espumoso e mucopurulento que caracteriza esta fase, a qual ocorre em somente 20% dos casos. Há também odor vaginal anormal e prurido vulvar. Além disso, em casos mais graves, a vagina e o colo do útero podem apresentar erosões e pontos hemorrágicos na parede cervical, conhecidos como *colpitis macularis* ou cérvix com aspecto de morango, sendo observada em poucos casos (2% a 5%) no exame comum de rotina, mas pode ser detectado com maior precisão durante o exame de colposcopia (Maciel et al., 2004).

Em casos de infecção mais graves, a tricomoníase pode também induzir estados citopatológicos de displasia/metaplasia visto que a infecção é detectada em 39% dos casos em mulheres com neoplasia intra-epitelial cervical (CIN) (López et al., 2000). Além disso, *T. vaginalis* está relacionado com doença inflamatória pélvica (DIP), infecção do trato urinário superior, causando resposta inflamatória que destrói a estrutura tubária e danifica as células ciliadas da mucosa tubária, inibindo a passagem de espermatozoides ou óvulos através da tuba uterina (Cherpes et al., 2006). Sendo assim, o risco de infertilidade é quase duas vezes maior em mulheres com história de tricomoníase comparado com as que nunca tiveram tal infecção (Grodstein et al., 1993). Além disso, a resposta inflamatória gerada pela infecção por *T. vaginalis* em mulheres grávidas, pode conduzir direta ou indiretamente a alterações na membrana fetal fazendo com que exista a associação entre tricomoníase em mulheres grávidas com ruptura espontânea de membrana, parto prematuro, baixo peso de recém-nascidos, endometrite pós-parto, e morte neonatal (Maciel et al., 2004).

Outra complicação que está relacionada com a infecção por *T. vaginalis*, é a que a mesma é considerada como um dos cofatores na amplificação da transmissão e da aquisição do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). O surgimento de uma resposta imune celular local com inflamação do epitélio

vaginal em mulheres e da uretra em homens faz com que haja a indução da infiltração de leucócitos, incluindo células-alvo do HIV, como linfócitos T CD4+ e macrófagos, assim como pontos hemorrágicos na mucosa, aos quais o HIV pode se ligar e ganhar acesso a corrente sanguínea. Além disso, um aumento na secreção de citocinas (interleucinas 1, 6, 8 e 10), conhecidas por aumentar a suscetibilidade ao HIV também é demonstrada durante a tricomoníase (Cu-Uvin et al., 2002; Maciel et al., 2004; Sorvillo, 2001). Segundo (Pol et al., 2008), a tricomoníase é considerada uma doença bidirecional, onde não somente aumenta a transmissão do HIV, mas também infecção por HIV pode tornar um indivíduo mais susceptível à infecção por *T. vaginalis*.

### 2.2.3 Patogênese

O estabelecimento de *T. vaginalis* na vagina se inicia com o aumento do pH, já que o pH normal da vagina é ácido (3,8 a 4,5) e o organismo cresce em pH maior que 5. A elevação do pH vaginal na tricomoníase é evidente, com redução concomitante de *Lactobacillus acidophilus* e aumento na proporção de bactérias anaeróbias (Dino Petrin et al., 1998). No contato inicial entre *T. vaginalis* e as células hospedeiras, o parasita muda sua forma para uma forma ameboide, que permite o aumento da superfície de contato com as células epiteliais vaginais, seguido pela adesão nas células alvo para exercer seus efeitos patogênicos (López et al., 2000). Cinco glicoproteínas são responsáveis por esse mecanismo de adesão, AP23, AP33, AP51 e AP65 e AP120. E a citotoxicidade exercida pelo protozoário sobre as células do hospedeiro são ditadas pelos fatores de virulência, como as integrinas, *cell-detaching factor* (CDF) e glicosidases, mas principalmente pelas cisteína-proteinases 39 e 65, que são citotóxicas e hemolíticas, apresentando capacidade de degradar IgM, IgG e IgA presentes na vagina (Alderete et al., 1988). O funcionamento das proteinases de superfície é modulado pelo ferro. Em casos de microrganismos que são encontrados em ambientes de baixo potencial redox, o ferro também tem papel crucial na sobrevivência destes organismos. Além disso, os mecanismos de defesa desempenhados pelos trofozoítos contra o estresse oxidativo gerado pelos radicais superóxidos estão centrados na atividade

superóxido dismutase (SOD), que necessita de ferro como cofator (López et al., 2000).

As respostas imunes celular e humoral são evidentes em pacientes com a infecção, apresentando um aumento no número de leucócitos polimorfonucleares que podem ser facilmente detectados nas secreções. Um contato inicial entre os trofozoítos e leucócitos resulta em formação de pseudópodes, em internalização e em degradação das células imunes nos vacúolos fagocitários do parasito (Alderete et al., 1988).

Os mecanismos de defesa do hospedeiro na infecção por *T. vaginalis* dependem dos fatores imunológicos, que demonstram a interferência da disponibilidade de ferro na vagina do hospedeiro, uma vez que pode facilitar ou não a síntese de proteínas, a citoaderência, habilidade de resistir à lise do sistema complemento e expressão de muitos genes de *T. vaginalis*, incluindo as adesinas e as cisteínas proteases (Torres-Romero & Arroyo, 2009).

Enquanto o número de organismos na vagina diminui durante a menstruação, os fatores de virulência mediados pelo ferro contribuem para a exacerbação dos sintomas neste período. O ferro contribui para a resistência ao complemento devida a regulação da expressão de cisteína-proteinases, que degradam a porção C3 do complemento depositada sobre a superfície do organismo. Além disso, *T. vaginalis* pode se auto revestir de proteínas plasmáticas do hospedeiro. Esse revestimento impede que o sistema imune reconheça o parasito como estranho (Dino Petrin et al., 1998). A compreensão do mecanismo de interação parasita-hospedeiro ainda está sendo investigada por pesquisadores e pode levar à identificação de novos fármacos anti-*T. vaginalis*.

#### **2.2.4 Diagnóstico**

A tricomoníase pode ser confundida com outras IST's, visto que erosões e pontos hemorrágicos na parede cervical são observados somente em 2% das pacientes, e o corrimento espumoso e mucopurulento, em 20% das mulheres infectadas (Dino Petrin et al., 1998). Devido a isso, o seu diagnóstico não pode ser baseado somente na avaliação clínica, logo se faz necessário e essencial para o diagnóstico da tricomoníase a investigação laboratorial, uma vez que leva

ao tratamento apropriado e facilita o controle da propagação da infecção. Diversos métodos são utilizados para a detecção de *T. vaginalis*, variando tanto na sua sensibilidade quanto na especificidade (Dino Petrin et al., 1998).

O diagnóstico da tricomoniase é feito por exame a fresco, também conhecido por exame direto, onde se faz a coleta de conteúdo vaginal com a observação da motilidade dos trofozoítos de *T. vaginalis* sob microscopia óptica. O mesmo apresenta uma especificidade de até 100% e sensibilidade de até 65%, possui baixo custo e é rapidamente executado (Cortina et al., 2016). Por outro lado, o método de cultura tem sido considerado como padrão-ouro para o diagnóstico de tricomoniase, apresentando especificidade de 100% e sensibilidade entre 75% a 96%. Essa técnica de cultura é simples de interpretar e requer somente 300 a 500 trofozoítos/ml de inóculo para iniciar o crescimento em meio Diamond, preparado e disponibilizado em tubos de ensaio. No entanto, são necessários alguns dias para a identificação do parasito, através de observações diárias por microscopia, tempo durante o qual os pacientes infectados podem continuar a transmitir o protozoário. Sendo assim, não é utilizado como exame de rotina, devido a sua laboriosa execução (Nye et al., 2009; Cortina et al., 2016).

Outro exame amplamente usado na rotina ginecológica é o citopatológico, que consiste no esfregaço de células endo e exocervicais, fixadas e coradas posteriormente pela técnica de Papanicolaou. Com a finalidade de detecção precoce do câncer de colo de útero, esse exame também possibilita identificar condições não-cancerosas, como infecções ou inflamações. Contudo, na detecção de *T. vaginalis*, apresenta pouca sensibilidade, não sendo adequado para triagem desta parasitose (APHL, 2013).

Existem testes comerciais disponíveis, como o *InPouch TV*, fornecido pela *Biomed Diagnostics*, o qual é sensível como o método de cultura tradicional, tem se mostrado uma alternativa eficiente e de baixo custo. Apresenta o meio de cultura de Diamond pré-embalado em bolsas plásticas onde o material é diretamente inoculado. As bolsas permitem o crescimento do protozoário tanto em amostras oriundas de secreções vaginais, quanto em amostras seminais e urinárias. Com isso, a avaliação pode ser realizada direta e diariamente sob o microscópio durante o período de incubação (Hobbs & Seña, 2014; Wendel & Workowski, 2007). Outros testes aprovados pelo FDA, já disponíveis no

mercado, como o *Affirm VP III* (BD Diagnostic Systems) e OSOM *Trichomonas rapid test* (Genzyme Diagnostics) têm mostrado maior sensibilidade que a microscopia ótica, porém estão limitados a amostras vaginais. O primeiro é um teste de amplificação de RNA para detecção molecular de agentes patológicos responsáveis por vaginites, como as provocadas por *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* e *Trichomonas vaginalis*, que permite a detecção de *T. vaginalis* dentro de 30 a 60 min. O segundo, é um teste imunocromatográfico de imunoensaio enzimático de fluxo capilar que detecta a proteína da membrana de *T. vaginalis*, e o resultado está disponível em 10 minutos (Nye et al., 2009).

Com a publicação do genoma completo de *T. vaginalis* em 2007, a disponibilidade da sequência genômica e transcriptoma completos permitiu muito progresso nos estudos de patogenicidade e diagnóstico, e atualmente, novas opções de diagnóstico estão disponíveis (Bradic et al., 2014). O desenvolvimento de testes de diagnóstico altamente sensíveis e específicos baseados em amplificação de ácidos nucleicos (NAATs) de *T. vaginalis*, disponíveis comercialmente tornou-se uma nova alternativa. Devido aos testes desenvolvidos recentemente, apresentarem sensibilidade e especificidade próximas a 100%, estes se tornam adequados para o rastreio e diagnóstico em mulheres e homens assintomáticos, sendo que uma variedade de amostras urogenitais podem ser usadas, incluindo urina, esfregaços endocervicais, e esfregaços vaginais, entretanto não são utilizados rotineiramente no laboratório clínico devido a seu alto custo (Hobbs & Seña, 2014; Soba et al., 2015). O primeiro NAAT a ser aprovado pelo FDA foi o ensaio altamente sensível e específico *Aptima TV* (Hologic, San Diego, Califórnia, EUA). Alguns outros NAATs que estão disponíveis no mercado, são os testes *AmpliVue* e *Solana* (Quidel) (Gaydos et al., 2017). Entretanto, o ensaio *GenXpert (Gx)* (Cefeida) é o único NAAT liberado para uso em homens (Badman et al., 2015).

Bruni et al. (2018), coletaram amostras de 499 mulheres em Pelotas, Rio Grande do Sul, e analisaram com diferentes testes de diagnóstico. A taxa de detecção de *T. vaginalis* foi de 4,2%, 2,4%, 1,2% e 0% usando o ensaio *Aptima TV*, método de cultura, exame direto por microscopia óptica e microscopia com coloração Gram, respectivamente, demonstrando a necessidade de implementação de testes de diagnóstico mais sensíveis na rotina de detecção da tricomoniase.

Além dessas abordagens, a medição da expressão de genes usando PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) também é uma opção para o diagnóstico da tricomoníase, por ser um teste rápido, sensível e preciso para detectar particularmente algumas cópias de mRNA. Nestes são utilizados os genes de referência de *T. vaginalis* já conhecidos, como por exemplo, *Efa*, *GAPDH*,  $\alpha$ -tubulina, actina,  $\gamma$ -tubulina (Dos Santos et al., 2015). Dado que a sensibilidade do qRT-PCR é superior aos dos testes convencionais, a sua utilização para o diagnóstico da tricomoníase deve ser considerada. No entanto, este teste é consideravelmente mais caro, e por isso, a sua modificação em um PCR em tempo real multiplex para a detecção de múltiplos agentes patogênicos sexualmente transmissíveis, pode ser uma alternativa para possibilitar a sua aplicação mais ampla e eficaz (Cortina et al., 2016).

#### 2.2.5 Tratamento e prevenção

Descrito pela primeira vez em 1836, *T. vaginalis* ficou conhecido como causa de vaginites somente em 1916. Em 1954, pela triagem de vários antibióticos, antimaláricos e amebicidas foi descoberta a azomicina (2-nitroimidazól). Através da manipulação da estrutura química da azomicina, em 1959 foi sintetizado o Metronidazol ( $\alpha,\beta$ -hydroxyethyl-2-methyl-5-nitroimidazole). Os únicos fármacos atualmente efetivos contra tricomoníase e aprovados pelo FDA são o Metronidazol e Tinidazol, o qual foi introduzido em 2004 como uma alternativa no tratamento da tricomoníase em casos onde o Metronidazol não apresentava efeito (Bouchemal et al., 2017).

O Metronidazol é um pró-fármaco que possui substituintes nitro, que requer ativação metabólica pela redução destes grupos por várias enzimas e fatores tais como ferredoxina, nitrorredutase e tiorredoxina redutase. Visto que esse mecanismo de ação só ocorre quantitativamente em células aeróbias, os 5-nitroimidazóis são comparativamente seguros em seres humanos, mas altamente tóxicos para organismos microaerofílicos e anaeróbios (Kulda, 1999; Pal et al., 2009). O mecanismo de ação destes compostos acontece em 4 fases: penetração do fármaco na parede celular de *T. vaginalis* por difusão passiva; ativação do mesmo nos hidrogenossomos; redução anaeróbica do grupamento nitro pela enzima PFOR formando radicais nitro citotóxicos; inibição da síntese

e degradação das fitas de DNA, e por consequência, a morte dos trofozoítos (Dino Petrin et al., 1998).

Estes fármacos são relativamente baratos e efetivos, as abordagens terapêuticas utilizadas no tratamento da tricomoníase são as aplicações intravaginais locais, a medicação oral sistêmica e a associação de ambas, levando em consideração de que os fármacos não devem ser administrados indiscriminadamente, e as doses devem ser as mais baixas possíveis. Estudos clínicos com o uso de Metronidazol mostram resultados de cura entre 90-95%, e com o uso do Tinidazol, pode atingir uma taxa de cura de 86-100% (Maciel et al., 2004; Leitsch, 2016).

Embora o índice de cura seja relativamente alto, frequentemente ocorrem falhas no tratamento devido a reinfeção ou não-adesão à terapia. Outras razões propostas são baixa concentração de zinco no soro, baixa absorção do fármaco, distribuição não-efetiva do fármaco na região genital ou inativação do fármaco por bactérias presentes na microbiota vaginal das pacientes (Dino Petrin et al., 1998). Além disso, os nitroimidazóis não são suficientes para tratar a tricomoníase devido aos seus vários efeitos adversos, como dor abdominal, náusea e distúrbios gastrointestinais. Ainda, hipersensibilidade e reações alérgicas aos nitroimidazóis, que quando ocorrem, geralmente se manifestam como urticária, erupção cutânea, prurido, vasodilatação, rubor e broncoespasmo, podendo levar a complicações como síndrome de Stevens-Johnson ou anafilaxia podem ocorrer, prejudicando o sucesso no tratamento (Goodhew & Secor, 2013).

Em adição às falhas no tratamento e efeitos adversos, atualmente existe uma emergente ameaça de isolados de *T. vaginalis* resistentes aos nitroimidazóis. Em 2006, Schwebke e Barrientes demonstram que 10% dos isolados de *T. vaginalis* apresentam resistência *in vitro* aos fármacos atualmente utilizados, o que é preocupante levando em consideração a prevalência e incidência mundial da tricomoníase. O mecanismo de resistência não é totalmente elucidado, entretanto, problemas como reinfeção dos pacientes ou não adesão correta à terapia, são fatores que colaboram para o surgimento de isolados resistentes (Goldman et al., 2009).

Além disso, diversas mutações podem estar relacionadas com essa resistência (Paulish-miller et al., 2014). Na resistência anaeróbica, a atividade da

enzima PFOR diminui ou desaparece, e então o metabolismo do parasito é prejudicado. Na resistência aeróbia, a transcrição do gene ferredoxina é reduzida em isolados de *T. vaginalis* resistentes ao Metronidazol. Tanto a resistência anaeróbia, quanto a aeróbia apresentam diminuição ou perda da atividade da flavina redutase, uma enzima que utiliza flavina mononucleótida (FMN) para reduzir o oxigênio molecular para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, resultando na redução da atividade de remoção de oxigênio, o que leva a elevação dos níveis de oxigênio intracelular (Yarlett et al., 1986; Kulda, 1999; Leitsch et al., 2015). Sendo assim, o tratamento desses casos é problemático, podendo necessitar de altas concentrações dos fármacos, aumentando o risco de toxicidade e consequentes efeitos adversos (Lumsden & Heyworth, 1988; Vieira et al., 2012).

Devido ao fato de a tricomoníase ser transmitida sexualmente, o controle da mesma é constituído das mesmas medidas preventivas tomadas no controle de outras doenças e ISTs. Pode-se citar como por exemplo, o uso de preservativos, abstinência de contatos sexuais com pessoas infectadas e limitação das complicações patológicas mediante a administração de um tratamento imediato e eficaz, tanto para os casos sintomáticos como para os assintomáticos, ou seja, tratamento simultâneo para parceiros sexuais, mesmo que a doença tenha sido diagnosticada em apenas um dos membros do casal (Dino Petrin et al., 1998; Maciel et al., 2004).

#### **2.2.6 Novas alternativas para prevenção e tratamento da tricomoníase**

A dependência de uma única classe terapêutica é problemática, sendo assim, a busca de tratamentos alternativos aos 5-nitroimidazóis e estratégias de prevenção são necessárias e têm sido frequentemente estudadas. A vacinação contra *T. vaginalis* é particularmente interessante para proteção de pessoas de alto risco e resolveria muitos problemas relacionados ao controle da infecção. No final da década de 1970, foi desenvolvida uma vacina de *T. vaginalis*, sob o nome comercial *SolcoTrichovac* ou *Gynatren*, derivada de "cepas anormais de lactobacilos" inativadas pelo calor, sendo isoladas de secreções vaginais de mulheres com tricomoníase. Entretanto, o sistema de defesa do hospedeiro restringe a infecção por *T. vaginalis* ao trato geniturinário e pode desempenhar um papel na limitação da resposta imune e na prevenção da imunidade a longo

prazo. Tendo isso em conta, é improvável que qualquer atividade tricomonicida de *SolcoTrichovac* seja o resultado de uma resposta direta imunológica ou de anticorpos contra *T. vaginalis*. É mais provável que a vacinação tenha estimulado um aumento de fatores imunológicos inespecíficos capazes de aliviar os sintomas e eliminar a infecção (Cudmore et al., 2004). Já em 2015, Smith e Garber, relataram que a vacinação subcutânea de células inteiras de *T. vaginalis* com adjuvante hidróxido de alumínio em camundongos reduziu a incidência e o aumento da infecção *T. vaginalis* (Smith & Garber, 2015).

Os produtos naturais são uma importante fonte de novos fármacos, usados ainda como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos pela indústria farmacêutica. Cerca de 35% dos medicamentos aprovados são de produtos naturais ou derivados semissintéticos, enquanto 30% são moléculas sintéticas inspiradas em produtos naturais ou apresentam um farmacóforo desenvolvido a partir de compostos naturais (de Brum Vieira et al., 2015). A pesquisa de produtos naturais pode ser categorizada em dois tipos: extratos de plantas cruas que foram investigadas para atividade anti-*T. vaginalis*, como por exemplo, o óleo essencial de própolis vermelho e a planta medicinal *Polygala decumbens* (Frasson et al., 2012; Sena-Lopes et al., 2018) e extratos que foram quimicamente caracterizados e seu perfil de atividade foi estabelecido, como por exemplo curcuminas e folhas de *Manilkara rufula* (de Brum Vieira et al., 2015; Wachter et al., 2014).

Apesar do sucesso histórico das fontes naturais para a biossíntese de moléculas bioativas, os compostos sintéticos apresentam uma ferramenta importante para a descoberta de fármacos. Nas últimas décadas uma variedade de bibliotecas químicas tem sido sintetizadas e biologicamente testadas como um tratamento alternativo ao Metronidazol para tricomoníase. Além disso, fármacos antigos ou derivados também podem ser rastreados e novos efeitos apontados. Seguindo este cenário, uma ampla gama de compostos sintéticos ou derivados têm sido estudados em relação à sua atividade contra *T. vaginalis*. Alguns exemplos de classes que apresentam atividade anti-*T. vaginalis* são derivados dos 5'-nitroimidazóis, benzimidazóis, aminas, isatinas. E alguns fármacos já comercializados que também apresentam atividade anti-*T. vaginalis*, são a miltefosina, omeoprazol, lansoprazol, pantoprazol e rabeprazol (Bala & Chhonker, 2018).

No processo de descoberta de novos fármacos antiparasitários, a concepção e síntese de novos compostos com alta especificidade é particularmente importante para o desenvolvimento de fármacos clinicamente úteis (Setzer et al., 2017). A lactato desidrogenase (LDH) catalisa a interconversão de lactato em piruvato com interconversão concomitante de NAD<sup>+</sup> a NADH. A LDH é uma enzima chave na glicólise e é encontrada em quase todas as células vivas. Devido ao fato de a lactato desidrogenase de *T. vaginalis* (TvLDH) ser necessária para sobrevivência do parasita, mas não ser semelhante à LDH humana, a TvLDH pode ser considerado como um alvo para descobertas do fármaco (Wu et al., 2014). A metionina gama-liase (MGL) é uma enzima que degrada aminoácidos contendo enxofre a  $\alpha$ -cetoácidos, amônia e tióis e desempenha um papel fundamental na regulação de aminoácidos contendo enxofre. Mamíferos não têm MGL, sendo assim esta enzima é um potencial alvo para o tratamento anti-*T. vaginalis* (Setzer et al., 2017). Por fim, a purina nucleosídeo fosforilase (PNP) é uma enzima que catalisa a fosforólise das ligações N-glicosídicas de nucleósidos de purina (ou desoxinucleósidos) para dar  $\alpha$ -ribose-1-fosfato e a base purina e funciona na via de salvamento de purinas. O resgate de purinas é essencial para protozoários parasitas obrigatórios, incluindo *T. Vaginalis*, logo, a purina nucleosídeo fosforilase de *T. vaginalis* (TvPNP) foi identificada como um alvo atraente (Datta et al., 2008). Sendo assim, proteínas de *T. Vaginalis* como a LDH, MGL e PNP podem servir como alvos para predizer potenciais inibidores de *T. vaginalis*, porque diferem das proteínas humanas e são essenciais para a sobrevivência de *T. Vaginalis* (Setzer et al., 2017).

### 2.3 Chalconas

As chalconas são caracterizadas como cetonas aromáticas  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturadas que apresentam como núcleo fundamental a 1,3-diarilprop-2-en-1-ona e dois anéis aromáticos, o anel “A” é conectado a um grupo carbonila, enquanto o anel “B” é conectado à instauração  $\alpha$ ,  $\beta$  (Dawane et al., 2009). São compostos de baixo peso molecular, biossintetizados em resposta a estímulos ambientais, e são precursores da biossíntese de flavonóides e isoflavonóides (K. Sahu et al., 2012). Na natureza, estes compostos são amplamente distribuídos

em alimentos e bebidas, como vegetais, frutas, chás, alimentos à base de soja e especiarias. Também estão presentes em numerosas famílias de plantas dicotiledoneas, e em algumas monocotiledoneas, pteridófitas e gimnospermas, sendo sintetizadas como componentes principais nas famílias Asteraceae, Moraceae, Fabaceae e Aristolochiaceae (Iwashina, 2000).

À temperatura ambiente, as chalconas apresentam-se na forma de sólidos com coloração amarela, insolúveis em água, mas solúveis em solventes como etanol ou metanol e altamente solúveis em acetona e benzeno. Em meio alcalino sua coloração é vermelha, que contribui com a pigmentação de flores, tornando-as atrativas a pássaros e insetos para a polinização (Repanas et al., 2013).

### 2.3.1 Síntese

Na natureza, a enzima chave para a síntese de chalconas na via de biossíntese de isoflavonóides e flavonoides é a chalcona sintase (CHS). Também é conhecida por ser induzida em plantas sob condições estressantes, como alta irradiação de luz ultravioleta e infecções bacterianas ou fúngicas, o que corrobora o efeito protetor demonstrado por chalconas. Essa via bioquímica envolve a condensação de três moléculas de malonil coenzima-A e uma molécula de p-coumarol. As moléculas condensadas são descarboxiladas no sítio ativo da CHS e o resultado da descarboxilação é um grupo carbânion acetil-CoA que age como nucleófilo na formação do enolato (Dao et al., 2011; Ferrer et al., 1999).

A necessidade de fármacos ideais, ou seja, com menos efeitos colaterais e maior eficiência, conduziu ao planejamento estrutural e o desenvolvimento de novas moléculas a partir de fontes naturais bioativas e que possam ser de fácil obtenção sintética, o que é um fator crucial no processo de descoberta de novos fármacos. Além da insaturação  $\alpha$ ,  $\beta$ , a estrutura geral das chalconas é altamente versátil, pois os anéis aromáticos podem apresentar uma ampla gama de substituintes em qualquer posição. Assim, muitas moléculas de chalconas naturais ou sintéticas podem ser isoladas ou obtidas, as quais irão diferir estruturalmente dependendo do padrão de substituição da chalcona-mãe

(Orlikova et al., 2011; Ritter et al., 2015). As possibilidades incluem chalconas metoxiladas, hidroxiladas, halogenadas, entre outras (Padhye et al., 2010).

Hoje em dia, a obtenção de chalconas por métodos sintéticos é muito prática. Geralmente é uma síntese com alta pureza, o que evita muitos dos obstáculos enfrentados quando estes produtos são isolados de fontes naturais (Mathew et al., 2017). A síntese laboratorial de chalconas começou no final da década de 1980, principalmente pela reação de condensação entre aldeídos aromáticos e acetofenonas na presença de catalizador alcalino. Essa reação se refere a tradicional condensação de Claisen-Schmidt, método mais comumente utilizado devido a facilidade de execução, uso de condições reacionais brandas, como também tempos de reação relativamente curtos (Nasir et al., 2013; Sivakumar et al., 2007).

### 2.3.2 Atividades biológicas

Chalconas e derivados de chalconas possuem um grande número de diferentes atividades biológicas, que são altamente apreciadas em muitas áreas, devido ao fato de seus alvos moleculares serem numerosos, sendo bioativas contra praticamente todos os eucariotos e alguns procariotos (Zhou, 2015). Durante as últimas décadas, numerosas investigações foram realizadas sobre as atividades farmacológicas de chalconas naturais e sintéticas. A literatura relata a aplicabilidade e eficácia das chalconas no combate a inúmeras doenças. Algumas atividades biológicas de chalconas são: antitumoral, antidiabética (Mahapatra et al., 2015), antifúngica (Palanco et al., 2017), antioxidante, analgésica, anti-inflamatória (Abdellatif et al., 2015), antibacteriana, inseticida, antiviral (Díaz-Tielas et al., 2016), e diversas atividades antiparasitárias, tais como: 2'-Hidroxichalconas metoxiladas com atividade contra *Trypanosoma brucei* (Borsari et al., 2017), 2,2,2-Trifluoroethoxichalconas e 2-Fluoroethoxichalconas com atividade contra *Plasmodium falciparum* (Devi et al., 2018), chalconas naturais como a licochalcona A, extraída das raízes de alcaçuz chinesas, ou derivados sintéticos de chalconas contendo grupos hidroxí e metoxi com atividade contra *Leishmania* spp. (de Mello et al., 2018).

A pesquisa bibliográfica mostra resultados de chalconas com atividade contra *T. vaginalis* geralmente associados a outra classe química, como um

estudo de Singh et al. (2016) no qual uma série de chalconas combinadas com triazol e silatranos foi testada, e apresentou atividade significativa *contra T. vaginalis* com valores de IC<sub>50</sub> variando de 18,24 - 101,26 µM. Anthwal et al. (2014) relataram que os conjugados de Metronidazol e chalcona apresentaram atividade contra isolados de *T. vaginalis* suscetíveis e resistentes a MTZ com valores de MIC variando de 1,56 - 25µg/ml e 3,125 - 100 µg/ml, respectivamente. Outra alternativa é a adição de substituintes em anéis aromáticos, desenvolvendo derivados de chalconas que possam apresentar diferentes atividades biológicas. Como por exemplo, um estudo recente mostrou a atividade potencial da 3'-aminochalcona contra *T. vaginalis* (Trein et al., 2018). Diante da eficiência relatada e da sua fácil obtenção sintética, justifica-se o interesse crescente nessa classe de compostos.

### 3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

#### 3.1 Hipótese

As chalconas são moléculas versáteis com grande variedade de atividades biológicas e uma grande variedade de áreas de aplicação. Sua aplicabilidade no tratamento da tricomoníase é pouco estudada, e visto a necessidade de busca de um tratamento alternativo aos 5'-nitroimidazóis, chalconas com diferentes substituintes podem ser moléculas com atividade promissora contra trofozoítos de *Trichomonas vaginalis*.

#### 3.2 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antiparasitária *in vitro* e *in silico* de análogos a chalconas sobre *Trichomonas vaginalis*.

#### 3.3 Objetivos específicos

- Sintetizar moléculas análogas a chalconas com diferentes substituintes;
- Avaliar a atividade anti-*T. vaginalis* de hidroxichalconas sozinhas e em associação com MTZ *in vitro*;
- Avaliar a curva cinética do tempo de inibição do crescimento de *T. vaginalis* após tratamento com hidroxichalconas sozinhas e em associação com MTZ;
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos que forem eficazes na atividade anti- *T. vaginalis* em linhagem celular VERO;
- Avaliar o efeito de hidroxichalconas sozinhas e em associação com MTZ, no estresse oxidativo de *T. vaginalis*;
- Inferir *in silico* possíveis alvos enzimáticos de hidroxichalconas frente à *T. vaginalis*.

## 4 CAPÍTULO

### 4.1 Manuscrito 1 – 2'-Hydroxychalcones as an alternative treatment for trichomoniasis in association with Metronidazole

Revista: International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance

Raquel Nascimento das Neves<sup>1</sup>, Mirna Samara Dié Alves<sup>1</sup>, Ângela Sena-Lopes<sup>1</sup>, Bárbara da Rocha Fonseca<sup>1</sup>; Caroline Carapina da Silva<sup>2</sup>, Angela Maria Casaril<sup>3</sup>, Lucielli Savegnago<sup>3</sup>, Claudio Martin Pereira de Pereira<sup>2</sup>, Sibele Borsuk<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biotecnologia Infecto-parasitária, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia, UFPel, Pelotas, RS, Brasil, 96010–900

<sup>2</sup> Laboratório de Lipidômica e Bio-orgânica, Grupo de Ciências Químicas Farmacêuticas e de Alimentos, UFPel, Pelotas, RS, Brasil, 96010–900

<sup>3</sup> Laboratório de Neurobiotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia, UFPel, Pelotas, RS, Brasil, 96010–900

\* Corresponding author: Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – Campus Universitário s/n, Prédio 19 –, Pelotas, RS, Brasil, 96010-900. Phone: +55 53 3275 7350. E-mail: [sibeleborsuk@gmail.com](mailto:sibeleborsuk@gmail.com)

**Abstract**

The treatment for trichomoniasis based on 5'-nitroimidazol agents has been presented failures related to allergic reactions, side effects and the appearance of resistant isolates. There are no alternative drugs approved for the treatment of these cases, so the search for new active molecules is necessary. In this scenario, chalcones have been extensively studied for their promising biological activities. Here, we presented the synthesis of three hydroxychalcones (**3a**, **b** and **c**), *in vitro* and *in silico* analyses against *Trichomonas vaginalis*. The *in vitro* biological evaluation showed that hydroxychalcone **3c** presented anti-*T. vaginalis* activity, with complete death in 12 h of incubation at MIC of 100  $\mu$ M. **3c** showed a dose-dependent cytotoxicity, with CC<sub>50</sub> of 118,9  $\mu$ M against VERO cells in 24 h. To overcome this situation, the association of **3c** at 12,5  $\mu$ M, and MTZ at 40  $\mu$ M showed 95,31% activity against *T. vaginalis* trophozoites after 24 h of exposure and did not affect the VERO cells growth, appearing to be a good alternative. *In silico* analysis by molecular docking showed that **3c** could inhibit the activity of TvMGL (methionine gamma-lyase), TvLDH (lactate dehydrogenase) and TvPNP (purine nucleoside phosphorylase), affecting the *T. vaginalis* survival, suggesting a different mechanism of action from MTZ. Therefore, these results propose that hydroxychalcones are promising anti-*T. vaginalis* agents and must be considering for further investigations for trichomoniasis treatment.

**Keywords:** Trichomoniasis; Synthesis; Chalcones; Molecular docking.

## 1. Introduction

Trichomoniasis is the most common and prevalent non-viral sexually transmitted infection (STI) in the world. Based on estimates of the World Health Organization, trichomoniasis affects more than 276 million people every year worldwide (WHO, 2012; Leitsch, 2016). The treatment for human trichomoniasis is currently based on 5'-nitroimidazol agents, more specifically Metronidazole (MTZ) and Tinidazole (TNZ), which are the only drugs approved and recommended by Food and Drug Administration (FDA). However, this course of treatment has been showing some failures, which can be attributed to allergic reactions, side effects and the appearance of resistant isolates to 5'-nitroimidazoles (Paulish-Miller et al., 2014). There are no alternative drugs approved for the treatment of such cases, making dependence on a single therapeutic class problematic, so the search for alternative treatments to 5'-nitroimidazoles is necessary and has been frequently studied. In this context, the synthetic compounds present an important tool for the drug discovery (de Brum Vieira et al., 2015; Bala & Chhonker, 2018).

In the discovery process for new antiparasitic drugs, the design and synthesis of novel compounds with high specificity is particularly important for the future development of clinically useful drugs. Thus, *T. vaginalis* proteins, such as, lactate dehydrogenase (LDH) and methionine gamma-lyase (MGL) and purine nucleoside phosphorylase (PNP) may serve as drug targets to predict potential inhibitors of *T. vaginalis*, because they differ from human proteins and are essential for *T. vaginalis* survival (Setzer et al., 2017).

The use of the standard scaffold of chalcones (1,3-diphenyl-2-propen-1-one), enables a multiplicity of substitutions because of their easy synthesis, simple chemistry and ease hydrogen atom manipulation, that can offer novel biological activities (Division et al., 1968; Gomes et al., 2017). Chalcones are an  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated aromatic ketones, open-chain precursors for biosynthesis of flavonoids and isoflavonoids, widely distributed in nature, in foods and beverages. Its biological activities have been extensively studied, presenting promising activities such as anti-tumoral (Mahapatra et al., 2015), antifungal (Palanco et al., 2017), antioxidant, analgesic, anti-inflammatory (Abdellatif et al.,

2015), antiparasitic (Borsari, Santarem, Torrado, Olías, et al., 2017), and more importantly, anti-*T. vaginalis* (Trein et al., 2018).

To indicate a new alternative for trichomoniasis treatment, here we describe the synthesis and antiparasitic activity of three chalcones analogues, the hydroxychalcones, alone and in association with Metronidazole. In addition, analyzes of the biochemical effects against trophozoites of *T. vaginalis*, cytotoxicity against VERO cells, and molecular docking with *T. vaginalis* enzymes were performed to indicate a more in-depth profile on the behavior of these compounds.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemistry: synthesis and identification of hydroxychalcones

All reagents and solvents employed in the synthesis of chalcones were of analytical grade, purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) using hexane/ethyl acetate, observed under ultraviolet light. Hydroxychalcones **3a**, **3b** and **3c** were synthesized by Claisen-Schmidt condensation based on a previously described procedure (Scheme 1) (Wang et al., 2014). Briefly, an aqueous solution of sodium hydroxide 40% (2.0 mL) was added to a round bottom flask containing 15 mL of ethanol and 1.0 mmol of 2'-hydroxyacetophenone, in an ice bath. After 30 minutes, 1.2 mmol of the aromatic aldehyde was added and the mixture was stirred at room temperature until completion. Diluted hydrochloric acid was then used to neutralize the reaction mixture, the precipitate was filtered by gravity filtration, and washed with cold water. The dried crude solid was purified by recrystallization with hot ethanol. Chalcones **3b** and **3c** were reported before by our group (Da Silva et al., 2018b), and products **3a-c** were confirmed by their melting points (Fisatom 430 apparatus), infrared spectroscopy (FTIR-Prestige 21), and by mass spectrometry (GC-MS-QP 2010 SE Standard Gas Chromatograph-Mass Spectrometer with an AOC-20 automatic injector, RTX-5MS column, using helium as carrier gas). The data related to the identification of synthetic hydroxychalcones is displayed in **Table 1**.

## 2.2. VERO cells line culture

The cytotoxicity assay was performed against mammalian VERO cells line, obtained from the Bank of Cells of Rio de Janeiro (BCRJ, University of Rio de Janeiro). Cells were cultured in monolayer in RPMI 1640 medium (Vitrocell Embriolife, Campinas, Brazil) supplemented with 10% foetal bovine serum (Gibco, Grand Island, NY, USA), 1% L-glutamine and 1% penicillin / streptomycin kept in CO<sub>2</sub> incubator with humidified air (5% CO<sub>2</sub> at 37 ° C).

## 2.3. Cytotoxicity assay against mammalian VERO cells line

To evaluate the cytotoxicity of hydroxychalcones, VERO cells were seeded in 96-well microtiter plates (Cral®) at a density of  $2 \times 10^4$  cells per well in a volume of 100 µL and incubated at 37 ° C in a humidified air atmosphere and 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. When cells reached >80% confluence, the cells were treated with hydroxychalcone previously diluted in Dimethyl Sulfoxid (DMSO) 0.6% at 200 µM – 12,5 µM, and in association with MTZ. Untreated cells were used as negative controls. After 24 h of incubation in CO<sub>2</sub> incubator with humidified air (5% CO<sub>2</sub> at 37 ° C), viability of the cell lines was evaluated by the MTT 3- (4,5-dimethyl-2-thiazolyl) -2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) method. Differences in viability after treatment were measured by spectrophotometry through a plate reader (Mindray) at 492 nm. All assays were performed independently at least three times in quadruplicate and results were expressed as the percentage of cell growth inhibition in comparison with the negative control.

## 2.4. *Trichomonas vaginalis* culture

*T. vaginalis* 30236 isolate (from American Type Culture Collection, ATCC), which is normally susceptible to Metronidazole, was used in this study. Trophozoites were axenically cultured *in vitro* in a trypticase-yeast extract-maltose (TYM) medium without agar (pH 6.0), supplemented with 10% sterile heat-inactivated bovine serum, and 5 mg/mL streptomycin, incubated at 37°C (Diamond, 1957).

## 2.5. Anti- *T. vaginalis* assays

Anti- *T. vaginalis* activity, minimum inhibitory concentration (MIC) and kinetic growth assay were realized following the methodology of Sena-Lopes et al., (2017). Initially, for the anti- *T. vaginalis* assays, it was used cultures with viability equal or higher than 95%, analysed through observation of motility, morphology, and trypan blue dye exclusion (0.4%) assay under the light microscope at 400x magnification. The activity of hydroxychalcones were screened *in vitro* against *T. vaginalis* in 96-well microtiter plates (Cral®). A volume of 150 µL of trophozoites solution was seeded at an initial density of  $2.6 \times 10^5$  trophozoites/mL and incubated with 50 µL of a solution containing TYM medium and hydroxychalcones at concentration of 100 µM, previously diluted in DMSO (0.6%). Three controls were applied in each assay: a negative control containing only trophozoites, a 0.6% DMSO control, and a positive control containing 100 µM of MTZ. The microtiter plates were incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. After that, a preparation containing trophozoites and trypan blue (0.4%) at a ratio of 1:1 was counted in a Neubauer chamber and trophozoites motility and morphology analysed by light microscopy while viability was assessed through trypan blue dye exclusion (0.4%) assay. Only the compounds that reduced the viability of parasites by 100% were used in the following experiments.

The MIC value against *T. vaginalis* were established in the same conditions as described above with variations on the concentrations of the active hydroxychalcone. After MIC determination, confirmation was performed by transferring the culture solution from MIC wells and from the concentrations directly below and above, as well as controls, were inoculated in fresh TYM medium and re-incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Trophozoites were counted in a Neubauer chamber every 24 h during 96 h to confirm MIC and the viability was assessed by trypan blue dye exclusion (0.4%) assay. A kinetic growth curve was established to obtain a more accurate profile for hydroxychalcones activity against *T. vaginalis*. Trophozoites viability was observed by light microscopy after incubation at respective MIC or in association with MTZ. Growth analysis was performed at 1, 6, 12, 24, 48, 72, and 96 h by trypan blue dye exclusion (0.4%) assay.

The effect of the association between the active hydroxychalcone and MTZ was evaluated following the methodology of Hübner et al., (2016), established in 96-well microtiter plates where trophozoites were treated considering the association of following incubation conditions: 40  $\mu$ M or 20  $\mu$ M of MTZ + active hydroxychalcone at non-cytotoxic concentrations for VERO cell line. Untreated parasites were used as negative control. Plates were incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. After that, trophozoites motility and morphology analysed by light microscopy counted in a Neubauer chamber, while viability was assessed through trypan blue dye exclusion (0.4%) assay. All assays were performed independently at least three times in triplicate and results were expressed as the percentage of viable trophozoites in comparison with the negative control.

## 2.6. Molecular Docking

The binding modes of the compound active hydroxychalcone with *T. vaginalis* methionine gamma-lyase (TvMGL; PDB: 1E5E), lactate dehydrogenase (TvLDH; PDB 5A1T) and purine nucleoside phosphorylase (TvPNP; PDB 1Z36) were predicted using the software Autodock Vina 1.1.2 (Trott & Olson, 2009). The crystal structure of TvMGL, TvLDH and TvPNP were retrieved from the Protein Data Bank (<http://www.pdb.org/pdb/>) and prepared by CHIMERA 1.5.3, including removal of ligands (Pettersen et al., 2004). A grid box size covering the residues in the active site of the proteins was implemented by Autodock Tools 1.5.6 (Morris et al., 2004). The active hydroxychalcone was built and optimized in the software Avogadro 1.1.1. (Hanwell et al., 2012). Docking poses of the investigated compound were visualized using Accelrys Discovery Studio 3.5.

## 2.7. Statistical analysis

Statistical analysis was carried out by one-way analysis of variance (ANOVA) using a probability value of  $p < 0.05$  using the GraphPad Prism 5.0 software. For anti-*T. vaginalis* assays, Tukey's post-test was conducted to multiple comparisons between all treatments. For cytotoxicity assay, Dunnett's post-test was conducted to identify significant differences between negative

control and the means of different treatments. The IC<sub>50</sub> and CC<sub>50</sub> values were assessed through a nonlinear regression model.

### 3. Results

#### 3.1. Synthesis and identification of hydroxychalcones

Regarding the synthesis of the hydroxychalcones, it can be seen in **Table 1** that three products were obtained in moderate yields (32 – 60%). Infrared and mass spectra of products **3a**, **3b** and **3c** are displayed in **Figures 1 – 2** and were in agreement with the proposed structures. Infrared spectra showed absorption bands related to the carbonyl (1635 cm<sup>-1</sup>) and hydroxyl groups (3300 cm<sup>-1</sup>). The molecular ions were identified for all molecules, matching their exact mass, as demonstrated in the mass spectra, indicating that the target products were obtained satisfactorily.

#### 3.2. Cytotoxicity assay against mammalian VERO cells line

The MTT assay showed that **3c** decreased the cell viability in a dose-dependent manner. The CC<sub>50</sub> value was established at 118,9 µM, and a significant cell growth inhibition was observed in VERO cells after treatment with **3c** at MIC concentration, which inhibited 47,7% of growth, however from the concentration of 25, there was no inhibition of cells growth. Thus, the association of **3c** at 12,5 µM and MTZ at 40 µM did not inhibited the cells growth after 24 h of exposure, showing no significant difference when compared with negative control (**Figure 3**).

#### 3.3. Anti- *T. vaginalis* assays

Analysis of the data obtained in the evaluation of anti-*T. vaginalis* assay showed that hidroxychalcone **3a**, **3b** and **3c** displayed a reduction of the *Trichomonas vaginalis* ATCC 30236 trophozoites viability by 12,7%, 54,5% and 95,4%, respectively, after 24 h of exposure, showing the potential antiparasitic activity of all three compounds, but at tested concentration, **3c** was the most

potent, without showing a significant difference of the positive control (100  $\mu$ M MTZ), which as expected, reduced 100% viability of trophozoites. In addition, the control group DMSO (0.6%), did not present significant difference of the negative control (untreated trophozoites) (**Figure 4.A**). The  $IC_{50}$  was established through a nonlinear regression model at 44,3  $\mu$ M, and as results of MIC assay, the ideal concentration for complete trophozoites death was established at 100  $\mu$ M, without showing a significant difference of the positive control (100  $\mu$ M MTZ) (**Figure 4.B**). The effect of **3c** association with MTZ against *T. vaginalis* trophozoites, showed that hydroxychalcone **3c** at 12,5  $\mu$ M in association of MTZ at 40  $\mu$ M reduced the trophozoites viability by 98% after 24 h of incubation. (**Figure 4.C**). The kinetic growth curve showed that time of exposure affect de trophozoites growth after treatment with **3c** alone and in association with MTZ. **3c** alone at MIC concentration was able to reduce the trophozoites growth by 86%, and **3c** at 12,5  $\mu$ M in association of MTZ at 40  $\mu$ M reduce the trophozoites growth by 89,2%, both at 12 h of exposure, and complete death in 24h (**Figure 4.D**).

### 3.4. Molecular Docking

As depicted in **Figure 5.A** and **5.B**, the binding mode of the compound **3c** with the active site of TvMGL involves conventional hydrogen bonds with THR114 (2.65 Å) and LYS209 (3.14 Å). In addition, pi-donor hydrogen bonds, pi-alkyl, pi-anion and van der Waals forces contribute to the binding mode of compound **3c** with TvMGL, yielding binding free energy ( $\Delta G_{bind}$ ) of -7.8 kcal/mol. A likely binding mode of the compound **3c** in the active site of TvLDH is depicted in **Figure 5.C** and **5.D** ( $\Delta G_{bind}$  of -7.4 kcal/mol). A hydrogen bonds is formed between the compound **3c** THR239 (2.40 Å), while non-covalent interactions with other amino acid residues help to maintain the binding mode of the compound **3c** with TvLDH. The best mode of compound **3c** with TvPNP is represented in **Figure 5.E** and **5.F**, with a docking score of -7.8 kcal/mol. ASP204 (2.40 Å) is involved in a hydrogen bond with the compound **3c**, while pi-alkyl and pi-sigma interactions, and van der Waals forces are formed between **3c** and other aminoacid residues in the active site of TvPNP.

#### 4. Discussion

The treatment of trichomoniasis relies on a single class of drugs, the 5'-nitroimidazoles, which are the most prescribed and effective drug against *T. vaginalis*. But the development of resistant *T. vaginalis* isolates across the globe has made the research and development of alternatives to Metronidazole treatment extremely necessary (Bala & Chhonker, 2018).

In the development of new drugs, chalcones and chalcone derivatives possess a large number of different biological activities, which are highly appreciated in many areas, because they are bioactive against virtually all eukaryotes and some prokaryotes, and their molecular targets are numerous (Zhou, 2015). During the last decades, numerous investigations have been carried out on the pharmacological activities of natural and synthetic chalcones. Some studies shows that chalcones tested against *T. vaginalis* are usually associated with another chemical class, such as a study of Anthwal et al., (2014) shows that Metronidazole-chalcone conjugates exhibited anti-*T. vaginalis* activity against MTZ susceptible and resistant *T. vaginalis* strains and Singh et al., (2016) described a series of chalconyl blended triazole allied silatranes displaying significant activity against *T. vaginalis*.

Another alternative is the addition of substituents in aromatic rings, developing chalcones-derivatives that might present different biological activities. In this manner, a recent study showed the potential activity of 3'-aminochalcone against *T. vaginalis* (Trein et al., 2018). And here we present the potential activity of another possibility of chalcone-derivate, the hydroxychalcones. Until now, there is no data reported about hydroxychalcones with activity against *T. vaginalis* trophozoites, however, Borsari et al., (2017) discovered methoxylated 2'-hydroxychalcones as potent anti-*Trypanosoma brucei* agents, showing antiprotozoal activity. Thus, in this study, we evaluate the use of three hydroxychalcones for *in vitro* potential against *T. vaginalis*.

All synthetic products tested in this study are chalcones containing hydroxyl groups in their structure, specifically all of them possess a hydroxyl group at the *-ortho* position of ring A (derived from the reagent 2'-hydroxyacetophenone). The different results determined in the anti-*T. vaginalis* assay demonstrated that, although being from the same subclass of compounds,

the structural differences influenced in their antiparasitic potential. Hydroxychalcone **3a** is derived from cinnamaldehyde, which itself has been reported to exhibit anthelmintic activity against *Dactylogyrus intermedius* (Ling et al., 2015), and, because of that, has a central 5-carbon linker and an additional unsaturation when compared to **3b** and **3c**. However, product **3a** did not exert anti-*T. vaginalis* activity at the tested concentration, so that the additional unsaturation does not seem to have an effect against this strain, or it possibly stabilizes the hydroxyl group in a way that prevents an inhibitory interaction with *T. vaginalis* cells. This is nonetheless an interesting result because, as shown by Rezk et al., (2002), a certain biological activity can differ significantly for a starting reagent and its derived synthetic product.

Hydroxychalcones **3b** and **3c** have a 3-carbon linker, but **3c** has another hydroxyl group at the *-meta* position of ring B (derived from the 3-hydroxybenzaldehyde). Borsari et al., (2017) investigated the antiparasitic potential of chalcones from the same class reported herein (2'-hydroxychalcones) but containing also methoxy substituents in the aromatic rings. Most of the methoxylated 2'-hydroxychalcones with an antiparasitic activity against *Trypanosoma brucei* were also substituted in the *-meta* position of ring B, which could indicate an important pattern of substitution associated with a pharmacological potential. It seems that the additional hydroxyl substituent present at chalcone **3c** contributed for its higher potential, while the length of the conjugated bonds (*i.e.* **3a**) did not seem to play a crucial role for the antiparasitic activity. Other synthetic hydroxychalcones with different substitution patterns can be obtained for a better understanding of the structural motifs required for an anti-*T. vaginalis* activity.

To evaluate the cytotoxicity of hydroxychalcone **3c**, we use mammalian VERO cells line. After 24h of exposure, the CC<sub>50</sub> value was established at 118,9 µM and **3c** at MIC concentration showed a cell growth inhibition of 47,7%, which is significant high. No other previous report was found with the evaluation of hydroxychalcone **3c** in VERO cells, although two research articles performed toxicity assessments of molecules with the same structures of **3b** and **3c**. Lee et al., (2014) investigate the *in vivo* toxicities of some synthetic chalcones in zebrafish embryos, in which compounds equal to **3b** and **3c** (original codes: **1a** and **1d**, respectively) did not show significant differences from the no-treatment

control up until concentrations of 5 ppm ( $\approx 20 \mu\text{M}$ ). At a concentration of 3 ppm of **3c** ( $\approx 12.5 \mu\text{M}$  considering its molar weight of 240.25), the survival rate was kept near 100% for 60 hours post-fertilization. These results are in agreement with our *in vitro* assays, as the cell viability starts to decrease at concentrations above  $25 \mu\text{M}$ . Forejtníková et al., (2005) demonstrated that hydroxychalcones, including **3b** and **3c**, display *in vitro* chemoprotective and toxic potentials depending on the tested concentration. In their report, chalcone equal to **3c** (original code: chalcone 2',3-diOH; **Table 1**) inhibited 10% of CYP1A-dependent EROD activity and its  $\text{IC}_{50}$  cytotoxicity in rat liver epithelial WB-F344 cells was higher than  $50 \mu\text{M}$ .

Considering **3c** cytotoxicity on VERO cells, the pharmacological effects of chalcone **3c** are dose-dependent and could be optimized to avoid adverse effects. Other synthetic approaches could be attempted to enhance the antiparasitic activity of chalcone **3c** and decrease its cytotoxicity effect, such as hydrogenation of its double bond to form a dihydrochalcone (Forejtníková et al., 2005); or cyclization of **3c** to yield a chromenone (Badavath et al., 2016). Other possibility is the cytotoxicity evaluation in other cell lines, to get a better understanding of this cytotoxic effect, and alternatives such as nanoencapsulation and topical application has many advantages for drug delivery, because can increase its interaction with tissues and cells, bioavailability, drug targeting and, consequently, resulting in increased efficacy and decreased drug adverse effects (Frank et al., 2015; Bouchemal et al., 2017). Thereby, these approaches can allow the use of lower concentrations of treatment.

Due of the limited treatment options for trichomoniasis and since **3c** showed high cytotoxicity, the association of different chemical classes is a good alternative and allows the use of lower doses of the constituents, a situation that may reduce adverse reactions and overcome the resist strains problem (Tallarida, 2011). To confirm if the use of lower concentrations of **3c** could be used in the treatment of trichomoniasis, we chose to test the effect of **3c** in association with MTZ in different concentrations determined from **3c** MIC value and MTZ MIC value (data not shown) against *T. vaginalis* trophozoites. The best association was the use of **3c** at  $12,5 \mu\text{M}$  and MTZ at  $40 \mu\text{M}$ , that reduced the trophozoites viability by 89,2% in 12 h of exposure and leads to complete death

in 24 h, similar to anti- *T. vaginalis* assay results of **3c** alone at MIC concentration. The results also demonstrate that the interaction between both compounds reduces the concentration required to cause parasite death, since **3c** concentration of 12,5  $\mu$ M did not affected the growth of mammalian VERO cells, this is a good alternative to reduce the possible side effects caused by cytotoxicity.

Molecular docking analyses with three *T. vaginalis* enzymes was performed to investigate the possible molecular mechanism responsible for the anti-*T. vaginalis* activity of compound **3c**. TvMGL is a pyridoxal-5-phosphate-dependent enzyme that catalyzes an  $\alpha,\gamma$ -elimination reaction on L-methionine to generate ammonia, methanethiol and  $\alpha$ -oxobutyrate (Lockwood & Coombs, 1991). Since mammals do not have MGL, developing drugs targeting this enzyme is a rational strategy to reduce the toxicity following anti-*T. vaginalis* treatment. TvLDH plays an essential role in *T. vaginalis* metabolism via generation of NAD<sup>+</sup> required for glycolysis through the reduction of pyruvate to lactate (Steindel et al., 2016). TvPNP is essential for *T. vaginalis* survival, since this protozoa lack *de novo* synthesis of purine nucleosides, relying exclusively on the functions of TvPNP and nucleoside kinase (Rinaldo-Matthis et al., 2007). This metabolic feature makes the purine salvage pathway a key target for antiparasitic chemotherapy, reinforcing the promising anti-*T. vaginalis* action of **3c**.

The binding mode of the compound **3c** with the active site of TvMGL, TvLDH and TvPNP, shows that **3c** could inhibit the active sites of this enzymes, affecting the *T. vaginalis* survival as evidenced in our *in vitro* studies. Nonetheless, the activity of these enzymes in the presence of the compound **3c** should be further investigated. The molecular docking studies are in agreement with the preliminary anti-*T. vaginalis* screening as it indicates that the additional *meta*-hydroxyl substituent of chalcone **3c** is an important binding site for TvMGL and TvLDH. As discussed before, carbonyl molecules containing a hydroxyl group at the *ortho* position of the ring may form intramolecular bonding, which would prevent these groups from forming the hydrogen bonds (Da Silva et al., 2018; Lee et al., 2014). Therefore, for hydroxychalcone **3c**, even if that happened, the *meta*-hydroxy group would still be available for interaction with the evaluated enzymes, which would not be possible for chalcones **3a** and **3b**. Also, when a

hydroxyl group loses its hydrogen, it forms a phenoxy radical with unpaired electrons which could be responsible for the predicted alkyl bonding.

Since MTZ did not presented a good binding mode with the tested enzymes (data not shown), we believe that the association of different mechanism of action of compounds **3c** and MTZ, are responsible for the parasite death, whereas MTZ mechanism of action is based on drug penetration into the cell wall of *T. vaginalis* by passive diffusion, activation in the hydrogenosomes, anaerobic reduction of the nitro group by the enzyme pyruvate ferredoxin-oxidoreductase (PFOR) forming nitro cytotoxic radicals, inhibition of the synthesis and degradation of DNA strands, and consequently, the death of trophozoites (Dino Petrin et al., 1998), here we suggest that **3c** mechanism of action may be by increase of RS and damage in plasmatic membrane, by inhibition of three enzymes important for *T. vaginalis* survival.

## 5. Conclusion

Hydroxychalcone **3c** demonstrated a potent anti-*T. vaginalis* activity against ATCC 30236 isolate, and the association of **3c** and MTZ in lower concentrations also displayed a good anti-*T. vaginalis* activity, not affecting VERO cells growth, indicating that this association may not cause damage to human cells, and can be considered a new alternative treatment for trichomoniasis. In addition, enzymes related to *T. vaginalis* survival could be inhibited by **3c** binding, suggesting a molecular mechanism of action different of MTZ, which allows lower doses of both compounds, reducing possible adverse effects caused by high cytotoxicity and can also prevent cross resistance development. Together, these results indicate that hydroxychalcones can be considered a good option for development of a new alternative drug for trichomoniasis treatment in association with Metronidazole.

## Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

## References

- ABDELLATIF, K.R.A., ELSHEMY, H.A.H., SALAMA, S.A. & OMAR, H.A. (2015). Synthesis, characterization and biological evaluation of novel 4'-fluoro-2'-hydroxy-chalcone derivatives as antioxidant, anti-inflammatory and analgesic agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 30(3). p. 484–491. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/14756366.2014.949255>.
- AGUIAR, F., CEOLAN, E., SALLES, F., GRECO, R., SANTOS, P.C., KLAFKE, G.B., DE, G.R., GROLL, A. VON, MARIA, A., MARTINEZ, B. DE & GONC, C.V. (2017). The prevalence of trichomoniasis and associated factors among women treated at a university hospital in southern Brazil. . p. 1–11.
- ALDERETE, J.F., DEMES, P., GOMBOSOVA, A., VALENT, M., FABUSOVA, M., JANOSKA, A. & ARROYO, R. (1988). Specific Parasitism of Purified Vaginal Epithelial Cells by *Trichomonas vaginalis*. . 56(10). p. 2558–2562.
- ALLSWORTH, J.E., RATNER, J.A. & PEIPERT, J.F. (2009). Trichomoniasis and Other Sexually Transmitted Infections: Results From the 2001–2004 National Health and Nutrition Examination Surveys. *Sexually Transmitted Diseases*. 36(12). p. 738–744. Available at: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00007435-200912000-00002>.
- ANTHWAL, A., RAJESH, U.C., RAWAT, M.S.M., KUSHWAHA, B., MAIKHURI, J.P., SHARMA, V.L., GUPTA, G. & RAWAT, D.S. (2014). Novel metronidazole-chalcone conjugates with potential to counter drug resistance in *Trichomonas vaginalis*. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 79. p. 89–94. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.03.076>.
- BADAVATH, V.N., JADAV, S.S., PASTORINO, B., LAMBALLERIE, X. DE & JAYAPRAKASH, B.N.S. AND V. (2016). Synthesis and Antiviral Activity of 2-aryl-4H-chromen-4-one Derivatives Against Chikungunya Virus. *Letters in Drug Design & Discovery*. 13(10). p. 1019–1024. Available at: <http://www.eurekaselect.com/node/143865/article>.
- BADMAN, S.G., CAUSER, L.M., GUY, R., TABRIZI, S.N., FRANCIS, F., DONOVAN, B. & WHILEY, D. (2015). SHORT REPORT A preliminary evaluation of a new GeneXpert ( Gx ) molecular point-of-care test for the detection of *Trichomonas vaginalis*. . p. 1–3.
- BALA, V. & CHHONKER, Y.S. (2018). Recent developments in anti-*Trichomonas* research: An update review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 143. p. 232–243. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.029>.
- BORSARI, C., SANTAREM, N., TORRADO, J., OLÍAS, A.I., CORRAL, M.J., BAPTISTA, C., GUL, S., WOLF, M., KUZIKOV, M., ELLINGER, B., WITT, G., GRIBBON, P., REINSHAGEN, J., LINCiano, P., TAIT, A., COSTANTINO, L., FREITAS-JUNIOR, L.H., MORAES, C.B., BRUNO DOS SANTOS, P., ET AL. (2017). Methoxylated 2'-hydroxychalcones as antiparasitic hit compounds. *European Journal of*

- 1145 *Medicinal Chemistry*. 126. p. 1129–1135.
- 1146 BORSARI, C., SANTAREM, N., TORRADO, J., OLİÇİAS, A.I., CORRAL, M.J., BAPTISTA,  
1147 C., GUL, S., WOLF, M., KUZIKOV, M., ELLINGER, B., WITT, G., GRIBBON, P.,  
1148 REINSHAGEN, J., LINCiano, P., TAIT, A., COSTANTINO, L., FREITAS-JUNIOR, L.H.,  
1149 MORAES, C.B., BRUNO DOS SANTOS, P., ET AL. (2017). Methoxylated 2'-  
1150 hydroxychalcones as antiparasitic hit compounds. *European Journal of*  
1151 *Medicinal Chemistry*. 126(2017). p. 1129–1135. Available at:  
1152 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.12.017>.
- 1153 BOUCHEMAL, K., BORIES, C. & LOISEAU, P.M. (2017). crossm of *Trichomonas*  
1154 *vaginalis* Infections. . 30(3). p. 811–825.
- 1155 BOWDEN, F.J. & GARNETT, G.P. (2000). *Trichomonas vaginalis* epidemiology:  
1156 parameterising and analysing a model of treatment interventions. *Sexually*  
1157 *transmitted infections*. 76. p. 248–256.
- 1158 BRADIC, M., WARRING, S.D., LOW, V. & CARLTON, J.M. (2014). The Tc1 / mariner  
1159 transposable element family shapes genetic variation and gene expression  
1160 in the protist *Trichomonas vaginalis* The Tc1 / mariner transposable  
1161 element family shapes genetic variation and gene expression in the protist  
1162 *Trichomonas vaginalis*. . 5(1). p. 1–10.
- 1163 DE BRUM VIEIRA, P., GIORDANI, R.B., MACEDO, A.J. & TASCA, T. (2015). Natural  
1164 and synthetic compound anti-*Trichomonas vaginalis*: an update review.  
1165 *Parasitology Research*. 114(4). p. 1249–1261.
- 1166 BRUNI, M.P., FREITAS, M., STAUFFERT, D., LUCAS, G., BICCA, D.O., CAETANO, C.,  
1167 AMÉLIA, N., GOLPARIAN, D. & UNEMO, M. (2018). Aptima *Trichomonas*  
1168 *vaginalis* assay elucidates significant underdiagnosis of trichomoniasis  
1169 among women in Brazil according to an observational study. . p. 1–4.
- 1170 CARLIER, Y., TRUYENS, C., DELORON, P. & PEYRON, F. (2012). Congenital parasitic  
1171 infections: A review. *Acta Tropica*. 121(2). p. 55–70. Available at:  
1172 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X11003147>.
- 1173 CHERPES, T.L., WIESENFELD, H.C., MELAN, M.A., KANT, J.A., COSENTINO, L.A.,  
1174 MEYN, L.A. & HILLIER, S.L. (2006). The associations between pelvic  
1175 inflammatory disease, *Trichomonas vaginalis* infection, and positive herpes  
1176 simplex virus type 2 serology. *Sexually Transmitted Diseases*. 33(12). p.  
1177 747–752.
- 1178 CORTINA, S.H. DE, BRISTOW, C.C., DAVEY, D.J. & KLAUSNER, J.D. (2016). A  
1179 Systematic Review of Point of Care Testing for *Chlamydia trachomatis* ,  
1180 *Neisseria gonorrhoeae* , and *Trichomonas vaginalis*. . 2016.
- 1181 CU-UVIN, S., KO, H., JAMIESON, D.J., HOGAN, J.W., SCHUMAN, P., ANDERSON, J. &  
1182 KLEIN, R.S. (2002). Prevalence, incidence, and persistence or recurrence of  
1183 trichomoniasis among human immunodeficiency virus (HIV)-positive  
1184 women and among HIV-negative women at high risk for HIV infection.  
1185 *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious*  
1186 *Diseases Society of America*. 34(10). p. 1406–11.

- 1187 CUDMORE, S.L., DELGATY, K.L., HAYWARD-MCCLELLAND, S.F., PETRIN, D.P. &  
 1188 GARBER, G.E. (2004). Treatment of infections caused by metronidazole-  
 1189 resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*. 17(4). p.  
 1190 783–793.
- 1191 DAO, T.T.H., LINTHORST, H.J.M. & VERPOORTE, R. (2011). Chalcone synthase  
 1192 and its functions in plant resistance. *Phytochemistry Reviews*. 10(3). p.  
 1193 397–412.
- 1194 DATTA, A.K., DATTA, R. & SEN, B. (2008). Antiparasitic Chemotherapy : Tinkering  
 1195 with the Purine Salvage Pathway.
- 1196 DAWANE, B., KONDA, S., SHAIKH, B. & BHOSALE, R. (2009). An improved  
 1197 procedure for synthesis of some new 1,3-diaryl-2-propen-1-ones using  
 1198 PEG-400 as a recyclable solvent and their antimicrobial evaluation. *Acta*  
 1199 *Pharmaceutica*. 59(4). p. 473–482.
- 1200 DESIDERI, N., MASTROMARINO, P. & CONTI, C. (2003). Synthesis and evaluation of  
 1201 antirhinovirus activity of 3-hydroxy and 3-methoxy 2-styrylchromones.  
 1202 *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*. 14(4). p. 195–203.
- 1203 DEVI, K., RAJENDRAN, V., AYUSHEE, RANGARAJAN, T.M., SINGH, R.P., GHOSH, P.C.  
 1204 & SINGH, M. (2018). Synthesis and evaluation of antiplasmodial activity of  
 1205 2,2,2-trifluoroethoxychalcones and 2-fluoroethoxy chalcones against  
 1206 plasmodium falciparum in culture. *Molecules*. 23(5).
- 1207 DIAMOND, L.S. (1957). The Establishment of Various Trichomonads of Animals  
 1208 and Man in Axenic Cultures Author ( s ): Louis S . Diamond Published by :  
 1209 The American Society of Parasitologists Stable URL :  
 1210 <http://www.jstor.org/stable/3274682> Your use of the JSTOR archive  
 1211 indicates. *The Journal of Parasitology*. 43(4). p. 488–490.
- 1212 DÍAZ-TIELAS, C., GRAÑA, E., REIGOSA, M.J. & SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.M. (2016).  
 1213 Biological Activities and Novel Applications of Chalcones. *Planta Daninha*.  
 1214 34(3). p. 607–616. Available at:  
 1215 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-83582016000300607&lng=en&tlng=en)  
 1216 [83582016000300607&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-83582016000300607&lng=en&tlng=en).
- 1217 DIVISION, P.C., NORTH, P., ZEALAND, N., WONO, E., BMCH, A J., PRESS, A.,  
 1218 GMSEBACH, H. & BARZ, W. (1968). the Role of Chalcones a N D Flavanones  
 1219 in. . 7(1964). p. 1751–1758.
- 1220 FERRER, J., JEZ, J.M., BOWMAN, M.E., DIXON, R.A. & NOEL, J.P. (1999).  
 1221 Ferrer1999.pdf. . 6(8). p. 775–784.
- 1222 FOREJTNIKOVÁ, H., LUNEROVÁ, K., KUBÍNOVÁ, R., JANKOVSKÁ, D., MAREK, R.,  
 1223 KAREŠ, R., SUCHÝ, V., VONDRÁČEK, J. & MACHALA, M. (2005).  
 1224 Chemoprotective and toxic potentials of synthetic and natural chalcones  
 1225 and dihydrochalcones in vitro. *Toxicology*. 208(1). p. 81–93.
- 1226 FRANK, L.A., CONTRI, R. V, BECK, R.C.R., POHLMANN, A.R. & GUTERRES, S.S.  
 1227 (2015). Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric

- 1228 nanocapsules.
- 1229 FRASSON, A.P., DOS SANTOS, O., DUARTE, M., DA SILVA TRENTIN, D., GIORDANI,  
1230 R.B., DA SILVA, A.G., DA SILVA, M.V., TASCA, T. & MACEDO, A.J. (2012). First  
1231 report of anti-Trichomonas vaginalis activity of the medicinal plant Polygala  
1232 decumbens from the Brazilian semi-arid region, Caatinga. *Parasitology*  
1233 *Research*. 110(6). p. 2581–2587.
- 1234 GAYDOS, C.A., KLAUSNER, J.D., PAI, N.P., KELLY, H., COLTART, C., PEELING, R.W.,  
1235 BALTIMORE, M. & ANGELES, L. (2017). vaginalis in women and men. .  
1236 93(Suppl 4).
- 1237 GOLDMAN, L.M.A., UPCROFT, J.A.B., WORKOWSKI, K.C. & RAPKIN, A.A. (2009).  
1238 Treatment of metronidazole-resistant Trichomonas vaginalis. . p. 345–347.
- 1239 GOMES, M.N., MURATOV, E.N., PEREIRA, M., PEIXOTO, J.C., ROSSETO, L.P.,  
1240 CRAVO, P.V.L., ANDRADE, C.H. & NEVES, B.J. (2017). Chalcone derivatives:  
1241 Promising starting points for drug design. *Molecules*. 22(8).
- 1242 GÓMEZ-BARRIO, A., NOGAL-RUIZ, J.J., MONTERO-PEREIRA, D., RODRÍGUEZ-  
1243 GALLEGU, E., ROMERO-FERNÁNDEZ, E. & ESCARIO, J.A. (2002). Biological  
1244 variability in clinical isolates of Trichomonas vaginalis. *Memorias do*  
1245 *Instituto Oswaldo Cruz*. 97(6). p. 893–896.
- 1246 GOODHEW, E.B. & SECOR, W.E. (2013). Drug library screening against  
1247 metronidazolesensitive and metronidazole-resistant Trichomonas vaginalis  
1248 isolates. *Sexually Transmitted Infections*. 89(6). p. 479–484.
- 1249 GRODSTEIN, F., GOLDMAN, M.B. & CRAMER, D.W. (1993). Relation of tubal  
1250 infertility to history of sexually transmitted diseases. *American journal of*  
1251 *epidemiology*. 137(5). p. 577–84.
- 1252 HANWELL, M.D., CURTIS, D.E., LONIE, D.C., VANDERMEERSCH, T., ZUREK, E. &  
1253 HUTCHISON, G.R. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor,  
1254 visualization, and analysis platform. *Journal of cheminformatics*. 4(1). p. 17.
- 1255 HOBBS, M.M. & SEÑA, A.C. (2014). Modern diagnosis of Trichomonas vaginalis  
1256 infection. *NIH Public Access*. 89(6). p. 434–438.
- 1257 HÜBNER, D.P.G., DE BRUM VIEIRA, P., FRASSON, A.P., MENEZES, C.B., SENER,  
1258 F.R., SANTOS DA SILVA, G.N., BAGGIO GNOATTO, S.C. & TASCA, T. (2016).  
1259 Anti-Trichomonas vaginalis activity of betulinic acid derivatives.  
1260 *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 84. p. 476–484. Available at:  
1261 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.09.064>.
- 1262 IWASHINA, T. (2000). The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants.  
1263 *Journal of Plant Research*. 113(3). p. 287–299. Available at:  
1264 <http://link.springer.com/10.1007/PL00013940>.
- 1265 JHALA, Y.S., DULAWAT, S.S. & VERMA, B.L. (2006). Solvent-free improved  
1266 syntheses of some substituted 1 , 3-diaryl-propenones and 3 , 5-diaryl-6-  
1267 carbethoxycyclohexenones under microwave irradiation and their

- 1268 antibacterial activity. *Indian Journal of Chemistry*. 45(February). p. 466–  
1269 469.
- 1270 K. SAHU, N., S. BALBHADRA, S., CHOUDHARY, J. & V. KOHLI, D. (2012). Exploring  
1271 Pharmacological Significance of Chalcone Scaffold: A Review. *Current*  
1272 *Medicinal Chemistry*. 19(2). p. 209–225. Available at:  
1273 [http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=092](http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=19&issue=2&page=209)  
1274 [9-8673&volume=19&issue=2&page=209](http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=19&issue=2&page=209).
- 1275 KAMBOJ, R.C., ARORA, R., SHARMA, G., KUMAR, D., SHARMA, C., JOSHI, R. &  
1276 ANEJA, K.R. (2010). Eco-friendly synthesis and antimicrobial activity of  
1277 chalcones. *Der Pharma Chemica*. 2(3). p. 157–170.
- 1278 KULDA, J. (1999). Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance.  
1279 *International Journal for Parasitology*. 29(2). p. 199–212.
- 1280 LEE, Y.T., FONG, T.H., CHEN, H.M., CHANG, C.Y., WANG, Y.H., CHERN, C.Y. &  
1281 CHEN, Y.H. (2014). Toxicity assessments of Chalcone and some Synthetic  
1282 Chalcone Analogues in a Zebrafish model. *Molecules*. 19(1). p. 641–650.
- 1283 LEITSCH, D. (2016). Recent Advances in the Trichomonas vaginalis Field [  
1284 version 1 ; referees : 2 approved ] Referee Status : . 5. p. 1–7.
- 1285 LEITSCH, D., JANSSEN, B.D., KOLARICH, D., JOHNSON, P.J. & DUCHÊNE, M. (2015).  
1286 Trichomonas vaginalis Flavin Reductase 1 and its Role in Metronidazole  
1287 Resistance. . 91(1). p. 198–208.
- 1288 LING, F., JIANG, C., LIU, G., LI, M. & WANG, G. (2015). Anthelmintic efficacy of  
1289 cinnamaldehyde and cinnamic acid from cortex cinnamon essential oil  
1290 against Dactylogyrus intermedius. *Parasitology*. 142(14). p. 1744–1750.  
1291 Available at:  
1292 [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0031182015001031](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182015001031).
- 1293 LOCKWOOD, B.C. & COOMBS, G.H. (1991). Purification and characterization of  
1294 methionine γ-lyase from. *Biochem.J.*. 279. p. 675–682.
- 1295 LÓPEZ, L.B., DE MELO BRAGA, M.B., LÓPEZ, J.O., ARROYO, R. & E SILVA FILHO,  
1296 F.C. (2000). Strategies by which some pathogenic trichomonads integrate  
1297 diverse signals in the decision-making process. *Anais da Academia*  
1298 *Brasileira de Ciencias*. 72(2). p. 173–186.
- 1299 LUMSDEN, R. & HEYWORTH, H. (1988). Review article Treatment failure in  
1300 Trichomonas vaginalis vaginitis. . p. 217–218.
- 1301 MACIEL, G. DE P., TASCA, T. & DE CARLI, G.A. (2004). Aspectos clínicos,  
1302 patogênese e diagnóstico de Trichomonas vaginalis. *Jornal Brasileiro de*  
1303 *Patologia e Medicina Laboratorial*. 40(3). p. 152–160. Available at:  
1304 [http://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs\\_all.jsp?arnumber=751291%5Cnhttp://iee](http://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs_all.jsp?arnumber=751291%5Cnhttp://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=751291)  
1305 [explore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=751291](http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=751291).
- 1306 MAHAPATRA, D.K., BHARTI, S.K. & ASATI, V. (2015). Anti-cancer chalcones:  
1307 Structural and molecular target perspectives. *European Journal of*

- 1308 *Medicinal Chemistry*. 98. p. 69–114. Available at:  
1309 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.05.004>.
- 1310 MATHEW, B., ADENIYI, A.A., JOY, M., MATHEW, G.E., SINGH-PILLAY, A.,  
1311 SUDARSANAKUMAR, C., SOLIMAN, M.E.S. & SURESH, J. (2017). Anti-oxidant  
1312 behavior of functionalized chalcone-a combined quantum chemical and  
1313 crystallographic structural investigation. *Journal of Molecular Structure*.  
1314 1146. p. 301–308. Available at:  
1315 <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.05.100>.
- 1316 DE MELLO, M.V.P., ABRAHIM-VIEIRA, B. DE A., DOMINGOS, T.F.S., DE JESUS, J.B.,  
1317 DE SOUSA, A.C.C., RODRIGUES, C.R. & SOUZA, A.M.T. DE (2018). A  
1318 comprehensive review of chalcone derivatives as antileishmanial agents.  
1319 *European Journal of Medicinal Chemistry*. 150. p. 920–929. Available at:  
1320 <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.047>.
- 1321 MENEZES, C.B., FRASSON, A.P. & TASCA, T. (2016). Trichomoniasis – are we  
1322 giving the deserved attention to the most common non-viral sexually  
1323 transmitted disease worldwide ? . 3(9). p. 404–418.
- 1324 NASIR, S., BUKHARI, A., JANTAN, I., KOK, L., HAJI, N. & ABBAS, F. (2013). Synthesis  
1325 and Effects of Pyrazolines and Isoxazoles on the Phagocytic Chemotaxis  
1326 and Release of Reactive Oxygen Species by Zymosan Stimulated Human  
1327 Neutrophils. . p. 1091–1098.
- 1328 NYE, M.B., SCHWEBKE, J.R. & BODY, B.A. (2009). Comparison of APTIMA  
1329 *Trichomonas vaginalis* transcription-mediated amplification to wet mount  
1330 microscopy , culture , and polymerase chain reaction for diagnosis of  
1331 trichomoniasis in men and women. *YMOB*. 200(2). p. 188–190. Available  
1332 at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2008.10.005>.
- 1333 ORLIKOVA, B., TASDEMIR, D., GOLAIS, F., DICATO, M. & DIEDERICH, M. (2011).  
1334 Dietary chalcones with chemopreventive and chemotherapeutic potential.  
1335 *Genes and Nutrition*. 6(2). p. 125–147.
- 1336 PADHYE, S., AHMAD, A., OSWAL, N., DANDAWATE, P., RUB, R.A., DESHPANDE, J.,  
1337 SWAMY, K.V. & SARKAR, F.H. (2010). Fluorinated 2'-hydroxychalcones as  
1338 garcinol analogs with enhanced antioxidant and anticancer activities.  
1339 *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 20(19). p. 5818–5821.  
1340 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.07.128>.
- 1341 PAL, D., BANERJEE, S., CUI, J., SCHWARTZ, A., GHOSH, S.K. & SAMUELSON, J.  
1342 (2009). Giardia , Entamoeba , and Trichomonas Enzymes Activate  
1343 Metronidazole ( Nitroreductases ) and Inactivate Metronidazole (   
1344 Nitroimidazole Reductases ) □ † . 53(2). p. 458–464.
- 1345 PALANCO, A.C., LACORTE SINGULANI, J. DE, COSTA-ORLANDI, C.B., GULLO, F.P.,  
1346 STROHMAYER LOURENCETTI, N.M., GOMES, P.C., AYUSSO, G.M., DUTRA, L.A.,  
1347 SILVA BOLZANI, V. DA, REGASINI, L.O., SOARES MENDES-GIANNINI, M.J. &  
1348 FUSCO-ALMEIDA, A.M. (2017). Activity of 3'-hydroxychalcone against  
1349 *Cryptococcus gattii* and toxicity, and efficacy in alternative animal models.

- 1350 *Future Microbiology*. 12(13). p. 1123–1134.
- 1351 PAULISH-MILLER, T.E., AUGOSTINI, P., SCHUYLER, J.A., SMITH, W.L., MORDECHAI,  
1352 E., ADELSON, M.E., GYGAX, S.E., SECOR, W.E. & HILBERT, W. (2014).  
1353 *Trichomonas vaginalis* Metronidazole Resistance Is Associated with Single  
1354 Nucleotide Polymorphisms in the Nitroreductase Genes *ntr4* Tv and *ntr6*  
1355 Tv. . 58(5). p. 2938–2943.
- 1356 PETRIN, D., DELGATY, K., BHATT, R. & GARBER, G. (1998). Clinical and  
1357 microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical microbiology*  
1358 *reviews*. 11(2). p. 300–17.
- 1359 PETRIN, D., DELGATY, K., BHATT, R. & GARBER, G. (1998). Clinical and  
1360 Microbiological Aspects of *Trichomonas vaginalis*. . 11(2). p. 300–317.
- 1361 PETTERSEN, E.F., GODDARD, T.D., HUANG, C.C., COUCH, G.S., GREENBLATT, D.M.,  
1362 MENG, E.C. & FERRIN, T.E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system  
1363 for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*.  
1364 25(13). p. 1605–1612.
- 1365 POL, B. VAN DER, KWOK, C., PIERRE-LOUIS, B., RINALDI, A., SALATA, R.A., CHEN, P.,  
1366 WIJGERT, J. VAN DE, MMIRO, F., MUGERWA, R., CHIPATO, T. & MORRISON, C.S.  
1367 (2008). *Trichomonas vaginalis* Infection and Human Immunodeficiency  
1368 Virus Acquisition in African Women. . 197.
- 1369 REPANAS, A., KATSORI, A.M. & HADJIPAVLOU-LITINA, D. (2013). Chalcones in  
1370 Cancer : Understanding their Role in Terms of QSAR . *Mini-Reviews in*  
1371 *Medicinal Chemistry*. 13. p. 952–970.
- 1372 REZK, B.M., HAENEN, G.R.M.M., VAN DER VIJGH, W.J.F. & BAST, A. (2002). The  
1373 antioxidant activity of phloretin: The disclosure of a new antioxidant  
1374 pharmacophore in flavonoids. *Biochemical and Biophysical Research*  
1375 *Communications*. 295(1). p. 9–13.
- 1376 RINALDO-MATTHIS, A., WING, C., GHANEM, M., DENG, H., WU, P., GUPTA, A., TYLER,  
1377 P.C., EVANS, G.B., FURNEAUX, R.H., ALMO, S.C., WANG, C.C. & SCHRAMM,  
1378 V.L. (2007). Inhibition and structure of *Trichomonas vaginalis* purine  
1379 nucleoside phosphorylase with picomolar transition state analogues.  
1380 *Biochemistry*. 46(3). p. 659–668.
- 1381 RITTER, M., MARTINS, R.M., ROSA, S.A., MALAVOLTA, J.L., LUND, R.G., FLORES,  
1382 A.F.C. & PEREIRA, C.M.P. (2015). Green synthesis of chalcones and  
1383 microbiological evaluation. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 26(6).  
1384 p. 1201–1210.
- 1385 DOS SANTOS, O., DE VARGAS RIGO, G., FRASSON, A.P., MACEDO, A.J. & TASCA, T.  
1386 (2015). Optimal reference genes for gene expression normalization in  
1387 *Trichomonas vaginalis*. *PLoS ONE*. 10(9). p. 1–17.
- 1388 SENA-LOPES, Â., DAS NEVES, R.N., BEZERRA, F.S.B., DE OLIVEIRA SILVA, M.T.,  
1389 NOBRE, P.C., PERIN, G., ALVES, D., SAVEGNAGO, L., BEGNINI, K.R., SEIXAS,  
1390 F.K., COLLARES, T. & BORSUK, S. (2017). Antiparasitic activity of 1,3-

- 1391 dioxolanes containing tellurium in *Trichomonas vaginalis*. *Biomedicine and*  
 1392 *Pharmacotherapy*. 89. p. 284–287. Available at:  
 1393 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.173>.
- 1394 SENA-LOPES, Â., BEZERRA, F.S.B., DAS NEVES, R.N., DE PINHO, R.B., DE OLIVEIRA  
 1395 SILVA, M.T., SAVEGNAGO, L., COLLARES, T., SEIXAS, F., BEGNINI, K.,  
 1396 HENRIQUES, J.A.P., ELY, M.R., RUFATTO, L.C., MOURA, S., BARCELLOS, T.,  
 1397 PADILHA, F., DELLAGOSTIN, O. & BORSUK, S. (2018). Chemical composition,  
 1398 immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil  
 1399 from Brazilian red propolis. *PLoS ONE*. 13(2). p. 1–16.
- 1400 SETZER, M.S., BYLER, K.G., OGUNGBE, I.V. & SETZER, W.N. (2017). Natural  
 1401 Products as New Treatment Options for Trichomoniasis : A Molecular  
 1402 Docking Investigation.
- 1403 DA SILVA, C.C., PACHECO, B.S., DE FREITAS, S.C., BERNEIRA, L.M., DOS SANTOS,  
 1404 M.A.Z., PIZZUTI, L. & DE PEREIRA, C.M.P. (2018a). Hydroxychalcones:  
 1405 Synthetic alternatives to enhance oxidative stability of biodiesel. *Green*  
 1406 *Energy and Technology*. (9783319735511). p. 81–110.
- 1407 DA SILVA, C.C., PACHECO, B.S., DE FREITAS, S.C., BERNEIRA, L.M., DOS SANTOS,  
 1408 M.A.Z., PIZZUTI, L. & DE PEREIRA, C.M.P. (2018b). Hydroxychalcones:  
 1409 Synthetic Alternatives to Enhance Oxidative Stability of Biodiesel. In M.  
 1410 Trindade (ed.). *Increased Biodiesel Efficiency: Alternatives for Production,*  
 1411 *Stabilization, Characterization and Use of Coproduct*. Cham: Springer  
 1412 International Publishing, p. 81–110.
- 1413 SINGH, G., ARORA, A., MANGAT, S.S., RANI, S., KAUR, H., GOYAL, K., SEHGAL, R.,  
 1414 MAURYA, I.K., TEWARI, R., CHOQUESILLO-LAZARTE, D., SAHOO, S. & KAUR, N.  
 1415 (2016). Design, synthesis and biological evaluation of chalconyl blended  
 1416 triazole allied organosilatrane as giardicidal and trichomonacidal agents.  
 1417 *European Journal of Medicinal Chemistry*. 108. p. 287–300. Available at:  
 1418 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.11.029>.
- 1419 SIVAKUMAR, P.M., KAILASAM, S., ABU, G.E.B. & UKESH, D.M. (2007). QSAR  
 1420 Studies on Chalcones and Flavonoids as Anti-tuberculosis Agents Using  
 1421 Genetic Function Approximation ( GFA ) Method. . 55(1). p. 44–49.
- 1422 SMITH, J.D. & GARBER, G.E. (2015). *Trichomonas vaginalis* infection induces  
 1423 vaginal CD4<sup>+</sup> T-cell infiltration in a mouse model: A vaccine strategy to  
 1424 reduce vaginal infection and HIV transmission. *Journal of Infectious*  
 1425 *Diseases*. 212(2). p. 285–293.
- 1426 SOBA, P., HAN, C., ZHENG, Y., PEREA, D. & MIGUEL-ALIAGA, I. (2015). The Ret  
 1427 receptor regulates sensory neuron dendrite growth and integrin mediated  
 1428 adhesion. . p. 1–21.
- 1429 SORVILLO, F. (2001). *Trichomonas vaginalis*, HIV, and African-Americans.  
 1430 *Emerging Infectious Diseases*. 7(6). p. 927–932. Available at:  
 1431 <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol7no6/sorvillo.htm>.
- 1432 STEINDEL, P.A., CHEN, E.H., WIRTH, J.D. & THEOBALD, D.L. (2016). Gradual

- 1433 neofunctionalization in the convergent evolution of trichomonad lactate and  
1434 malate dehydrogenases. *Protein Science*. 25. p. 1319–1331.
- 1435 TALLARIDA, R.J. (2011). Quantitative Methods for Assessing Drug Synergism.  
1436 *Genes and Cancer*. 2(11). p. 1003–1008.
- 1437 THORBURN, A.L. (1974). Alfred Francois Donné, 1801-1878, discoverer of  
1438 trichomonas vaginalis and of leukaemia. *Sexually Transmitted Infections*.  
1439 50(5). p. 377–380.
- 1440 TORRES-ROMERO, J.C. & ARROYO, R. (2009). Responsiveness of Trichomonas  
1441 vaginalis to iron concentrations: Evidence for a post-transcriptional iron  
1442 regulation by an IRE/IRP-like system. *Infection, Genetics and Evolution*.  
1443 9(6). p. 1065–1074.
- 1444 TREIN, M.R., RODRIGUES, L., RIGO, G.V., APARECIDA, M. & GARCIA, R. (2018).  
1445 Anti-Trichomonas vaginalis activity of chalcone and amino-analogues.
- 1446 TROTT, O. & OLSON, A.J. (2009). AutoDock Vina: improving the speed and  
1447 accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and  
1448 multithreading. *Journal of Computational Chemistry*.
- 1449 VIEIRA, P. DE B., BRANDELLI, C.L.C., VERÍSSIMO, C. DE M. & TASCA, T. (2012).  
1450 Mecanismos específicos de patogenicidade de protozoários de mucosa:  
1451 Entamoeba histolytica, Giardia lamblia e Trichomonas vaginalis. *Clinical &*  
1452 *Biomedical Research*. 32(1). p. 58–70. Available at:  
1453 <http://seer.ufrgs.br/hcpa/article/view/22570>.
- 1454 WACHTER, B., SYROWATKA, M., OBWALLER, A. & WALOCHNIK, J. (2014). In vitro  
1455 efficacy of curcumin on Trichomonas vaginalis. . p. 32–36.
- 1456 WANG, F.-W., WANG, S.-Q., ZHAO, B.-X. & MIAO, J.-Y. (2014). Discovery of 2'-  
1457 hydroxychalcones as autophagy inducer in A549 lung cancer cells. *Organic*  
1458 *& biomolecular chemistry*. 12. p. 3062–3070.
- 1459 WENDEL, K.A. & WORKOWSKI, K.A. (2007). Trichomoniasis: challenges to  
1460 appropriate management. *Clinical infectious diseases : an official*  
1461 *publication of the Infectious Diseases Society of America*. 44 Suppl  
1462 3(Supplement 3). p. S123-9.
- 1463 WORLD HEALTH ORGANIZATION (2012). *Global incidence and prevalence of*  
1464 *selected curable sexually transmitted infections - 2008*,
- 1465 WU, G., FISER, A.S., KUILE, B.T.E.R., SALI, A. & MULLER, M. (2014). Convergent  
1466 evolution of Trichomonas vaginalis lactate dehydrogenase from malate  
1467 dehydrogenase. . 96(11). p. 6285–6290.
- 1468 YARLETT, N., YARLETT, N. & LLOYD, D. (1986). FERREDOXIN-DEPENDENT  
1469 REDUCTION OF NITROIMIDAZOLE DERIVATIVES IN DRUG-  
1470 RESISTANT AND SUSCEPTIBLE STRAINS OF TRICHOMONAS  
1471 VAGINALIS. *Biochemical pharmacology*. 35(5 ml). p. 1703–1708.

ZHOU, B. (2015). Diverse Molecular Targets for Chalcones with Varied Bioactivities. *Medicinal Chemistry*. 5. p. 388–404. Available at: <https://www.omicsonline.org/open-access/diverse-molecular-targets-for-chalcones-with-varied-bioactivities-2161-0444-1000291.php?aid=58791>.

## Legends

**Table 1.** Data of hydroxychalcones **3a-3c**.

**Scheme 1.** Synthesis of hydroxychalcones **3a-3c**.

**Figure 1.** Mass spectrum of chalcone **3a (A)**, **3b (B)**, **3c (C)**.

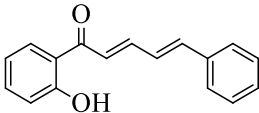
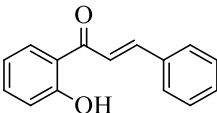
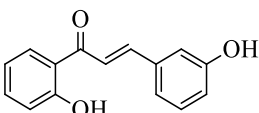
**Figure 2.** Infrared spectrum of chalcone **3a (A)**, **3b (B)**, **3c (C)**.

**Figure 3.** Cytotoxicity effect of **3c** at 200 – 12,5  $\mu$ M and in association with MTZ against VERO cells. Cell proliferation was investigated by MTT assay. Data are expressed as means  $\pm$  SEM from three independent experiments. (\*\*\*) (\*\*) show a significant difference. For all  $p < 0.05$ .

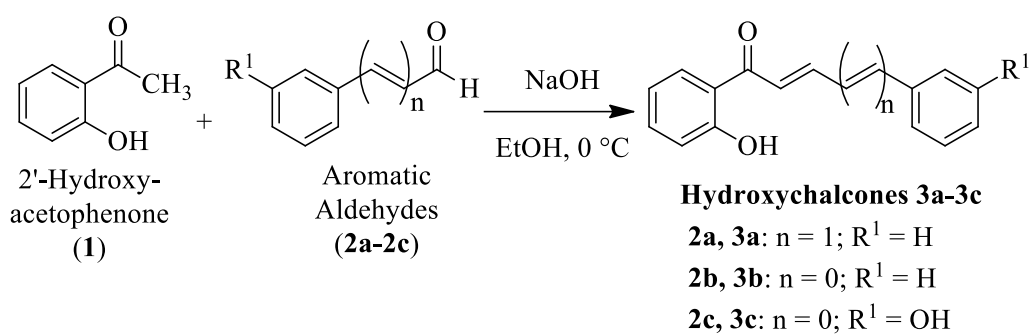
**Figure 4. (A)** Anti-*T. vaginalis* activity of hydroxychalcones **3a**, **3b** and **3c** at 100  $\mu$ M confirmed by trypan blue dye exclusion assay (0.4%) after 24h of exposure. **(B)** Determination of **3c** MIC after *T. vaginalis* 30236 isolate treatment at 50, 60, 70, 80, 90 and 100  $\mu$ M concentrations after 24 h of exposure. **(C)** Anti-*T. vaginalis* effects with association of different concentrations of **3c** and MTZ. Vehicle for solubilization at 0.6% (DMSO), Metronidazole at 100  $\mu$ M (MTZ), untreated trophozoites (NC). Data is represented as mean  $\pm$  standard deviation of at least three independent experiments in triplicate. Different letters and (\*\*\*) indicate significant statistical difference considering  $p < 0,05$ . **(D)** Kinetic growth curve of *T. vaginalis* 30236 isolate after treatment with **3c** at 100  $\mu$ M and in association with MTZ at the period of 1, 6, 12, 24, 48, 72, and 96 h.

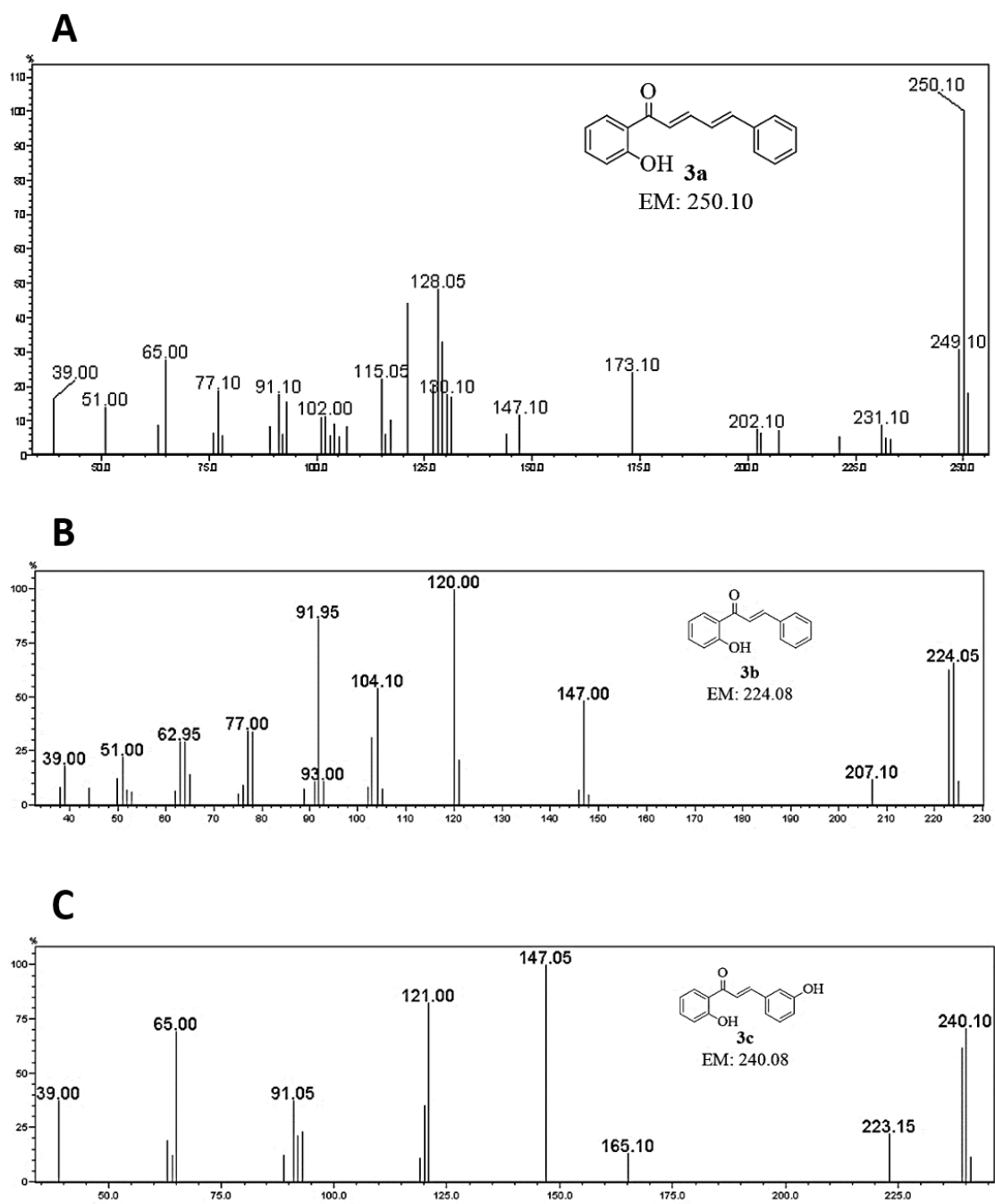
**Figure 5.** Predicted binding mode of compound **3c** in the active site of TvMGL (A and B), TvLDH (C and D) and TvPNP (E and F).

**Table 1.**

| Code                                                                           | Structure                                                                           | Yield | CLog P <sup>a</sup> | Melting point (°C)                                                             | Exact Mass |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>3a</b><br><b>(2E,4E)-1-(2-hydroxyphenyl)-5-phenylpenta-2,4-dien-1-one</b>   |    | 60%   | 4.4                 | Exp.: 151 – 152<br>Lit.: 150 – 152<br>(Desideri et al., 2003)<br>Exp.: 90 – 91 | 250.10     |
| <b>3b</b><br><b>(E)-1-(2-hydroxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one</b>            |    | 46%   | 3.9                 | Lit.: 89<br>(Jhala et al., 2006)<br>Exp.: 163 – 165                            | 224.08     |
| <b>3c</b><br><b>(E)-1-(2-hydroxyphenyl)-3-(3-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one</b> |  | 32%   | 3.3                 | Lit.: 165 – 167<br>(Kamboj et al., 2010)                                       | 240.08     |

<sup>a</sup>: theoretical value of CLog P determined by Chemdraw software 8.0, CambridgeSoft, Cambridge, MA.

**Scheme 1.**

1574 **Figure 1.**

1575

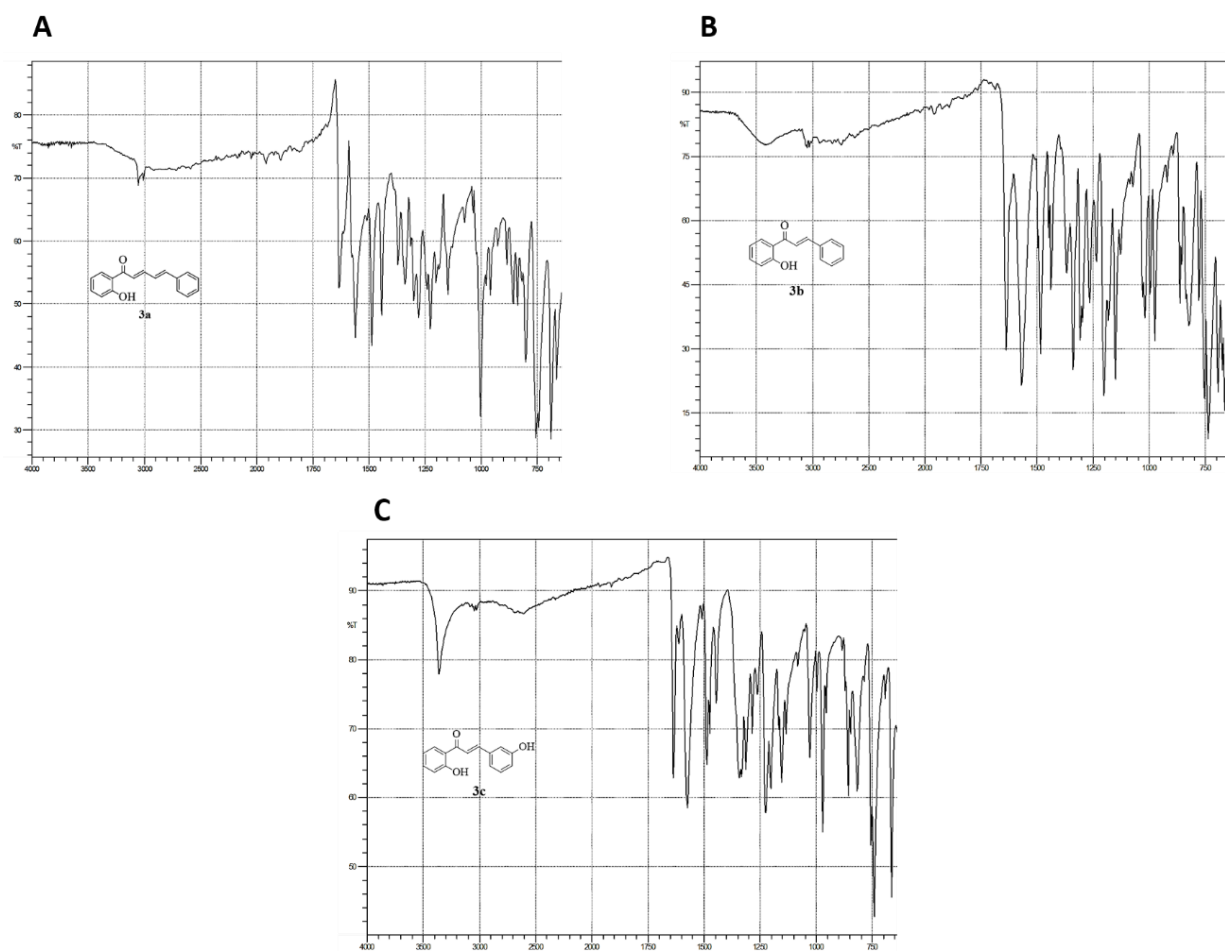
1576

1577

1578

1579

1580

1581 **Figure 2.**

1582

1583

1584

1585

1586

1587

1588

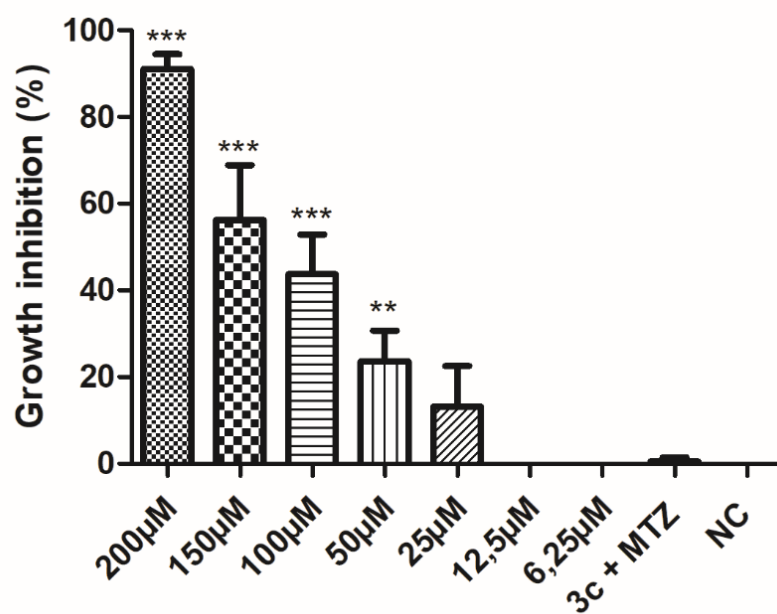
1589

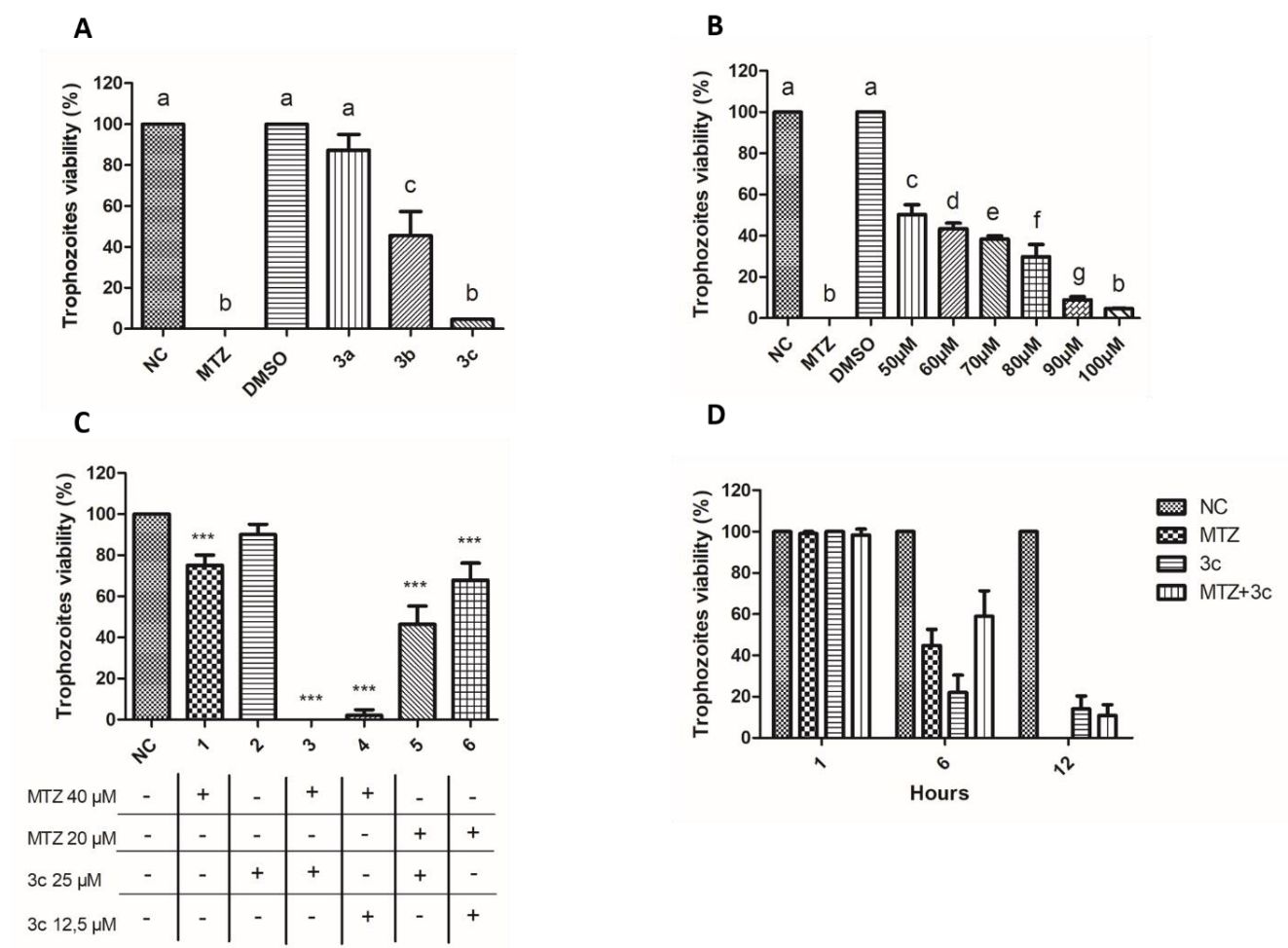
1590

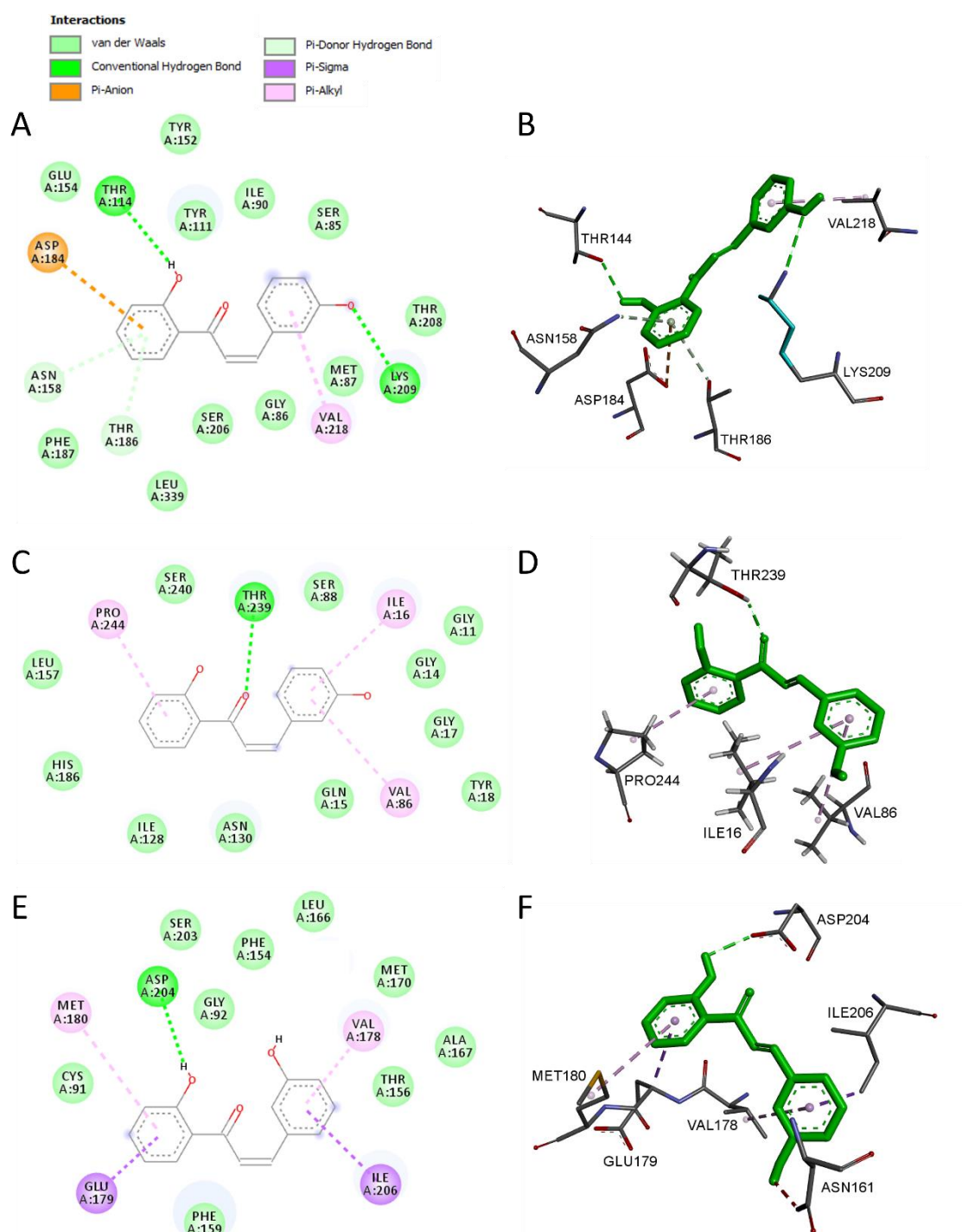
1591

1592

1593

1594 **Figure 3.**

**Figure 4.**

1624 **Figure 5.**

## 5 CONCLUSÃO GERAL

- Hidroxichalconas demonstraram atividade anti-*T. vaginalis* contra o isolado ATCC 30236.
- A associação de **3c** e MTZ em concentrações mais baixas apresentou atividade anti-*T. vaginalis*, e não afetou o crescimento de células VERO, indicando que esta associação pode não causar danos às células humanas, e pode ser considerada uma nova alternativa de tratamento para tricomoníase.
- Enzimas relacionadas à sobrevivência de *T. vaginalis* poderiam ser inibidas pela ligação **3c**, sugerindo um mecanismo de ação molecular diferente do MTZ, que permite doses menores de ambos os compostos, reduzindo possíveis efeitos adversos causados pela alta citotoxicidade e também prevenindo o desenvolvimento de resistência cruzada.
- Esses resultados indicam que as hidroxichalconas podem ser consideradas uma boa opção para o desenvolvimento de um novo fármaco alternativo para o tratamento da tricomoníase através da associação ao Metronidazol.

## 6 REFERÊNCIAS

- ABDELLATIF, K.R.A., ELSHEMY, H.A.H., SALAMA, S.A. & OMAR, H.A. (2015). Synthesis, characterization and biological evaluation of novel 4'-fluoro-2'-hydroxy-chalcone derivatives as antioxidant, anti-inflammatory and analgesic agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 30(3). p. 484–491. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/14756366.2014.949255>.
- AGUIAR, F., CEOLAN, E., SALLES, F., GRECO, R., SANTOS, P.C., KLAFKE, G.B., DE, G.R., GROLL, A. VON, MARIA, A., MARTINEZ, B. DE & GONC, C.V. (2017). The prevalence of trichomoniasis and associated factors among women treated at a university hospital in southern Brazil. . p. 1–11.
- ALDERETE, J.F., DEMES, P., GOMBOSOVA, A., VALENT, M., FABUSOVA, M., JANOSKA, A. & ARROYO, R. (1988). Specific Parasitism of Purified Vaginal Epithelial Cells by *Trichomonas vaginalis*. . 56(10). p. 2558–2562.
- ALLSWORTH, J.E., RATNER, J.A. & PEIPERT, J.F. (2009). Trichomoniasis and Other Sexually Transmitted Infections: Results From the 2001–2004 National Health and Nutrition Examination Surveys. *Sexually Transmitted Diseases*. 36(12). p. 738–744. Available at: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00007435-200912000-00002>.
- ANTHWAL, A., RAJESH, U.C., RAWAT, M.S.M., KUSHWAHA, B., MAIKHURI, J.P., SHARMA, V.L., GUPTA, G. & RAWAT, D.S. (2014). Novel metronidazole-chalcone conjugates with potential to counter drug resistance in *Trichomonas vaginalis*. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 79. p. 89–94. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.03.076>.
- BADAVATH, V.N., JADAV, S.S., PASTORINO, B., LAMBALLERIE, X. DE & JAYAPRAKASH, B.N.S. AND V. (2016). Synthesis and Antiviral Activity of 2-aryl-4H-chromen-4-one Derivatives Against Chikungunya Virus. *Letters in Drug Design & Discovery*. 13(10). p. 1019–1024. Available at: <http://www.eurekaselect.com/node/143865/article>.
- BADMAN, S.G., CAUSER, L.M., GUY, R., TABRIZI, S.N., FRANCIS, F., DONOVAN, B. & WHILEY, D. (2015). SHORT REPORT A preliminary evaluation of a new GeneXpert ( Gx ) molecular point-of-care test for the detection of *Trichomonas vaginalis*. . p. 1–3.
- BALA, V. & CHHONKER, Y.S. (2018). Recent developments in anti-*Trichomonas* research: An update review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 143. p. 232–243. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.029>.
- BORSARI, C., SANTAREM, N., TORRADO, J., OLÍAS, A.I., CORRAL, M.J., BAPTISTA, C., GUL, S., WOLF, M., KUZIKOV, M., ELLINGER, B., WITT, G., GRIBBON, P., REINSHAGEN, J., LINCIANO, P., TAIT, A., COSTANTINO, L., FREITAS-JUNIOR, L.H., MORAES, C.B., BRUNO DOS SANTOS, P., ET AL. (2017). Methoxylated 2'-hydroxychalcones as antiparasitic hit compounds. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 126. p. 1129–1135.

- 1693 BORSARI, C., SANTAREM, N., TORRADO, J., OLÍZEAS, A.I., CORRAL, M.J., BAPTISTA,  
1694 C., GUL, S., WOLF, M., KUZIKOV, M., ELLINGER, B., WITT, G., GRIBBON, P.,  
1695 REINSHAGEN, J., LINCiano, P., TAIT, A., COSTANTINO, L., FREITAS-JUNIOR, L.H.,  
1696 MORAES, C.B., BRUNO DOS SANTOS, P., ET AL. (2017). Methoxylated 2'-  
1697 hydroxychalcones as antiparasitic hit compounds. *European Journal of*  
1698 *Medicinal Chemistry*. 126(2017). p. 1129–1135. Available at:  
1699 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.12.017>.
- 1700 BOUCHEMAL, K., BORIES, C. & LOISEAU, P.M. (2017). crossm of *Trichomonas*  
1701 *vaginalis* Infections. . 30(3). p. 811–825.
- 1702 BOWDEN, F.J. & GARNETT, G.P. (2000). *Trichomonas vaginalis* epidemiology:  
1703 parameterising and analysing a model of treatment interventions. *Sexually*  
1704 *transmitted infections*. 76. p. 248–256.
- 1705 BRADIC, M., WARRING, S.D., LOW, V. & CARLTON, J.M. (2014). The Tc1 / mariner  
1706 transposable element family shapes genetic variation and gene expression  
1707 in the protist *Trichomonas vaginalis* The Tc1 / mariner transposable  
1708 element family shapes genetic variation and gene expression in the protist  
1709 *Trichomonas vaginalis*. . 5(1). p. 1–10.
- 1710 DE BRUM VIEIRA, P., GIORDANI, R.B., MACEDO, A.J. & TASCA, T. (2015). Natural  
1711 and synthetic compound anti-*Trichomonas vaginalis*: an update review.  
1712 *Parasitology Research*. 114(4). p. 1249–1261.
- 1713 BRUNI, M.P., FREITAS, M., STAUFFERT, D., LUCAS, G., BICCA, D.O., CAETANO, C.,  
1714 AMÉLIA, N., GOLPARIAN, D. & UNEMO, M. (2018). Aptima *Trichomonas*  
1715 *vaginalis* assay elucidates significant underdiagnosis of trichomoniasis  
1716 among women in Brazil according to an observational study. . p. 1–4.
- 1717 CARLIER, Y., TRUYENS, C., DELORON, P. & PEYRON, F. (2012). Congenital parasitic  
1718 infections: A review. *Acta Tropica*. 121(2). p. 55–70. Available at:  
1719 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X11003147>.
- 1720 CASARIL, A.M., DOMINGUES, M., FRONZA, M., VIEIRA, B., BEGNINI, K., LENARDÃO,  
1721 E.J., SEIXAS, F.K., COLLARES, T., NOGUEIRA, C.W. & SAVEGNAGO, L. (2017).  
1722 Antidepressant-like effect of a new selenium-containing compound is  
1723 accompanied by a reduction of neuroinflammation and oxidative stress in  
1724 lipopolysaccharide-challenged mice.
- 1725 CHERPES, T.L., WIESENFELD, H.C., MELAN, M.A., KANT, J.A., COSENTINO, L.A.,  
1726 MEYN, L.A. & HILLIER, S.L. (2006). The associations between pelvic  
1727 inflammatory disease, *Trichomonas vaginalis* infection, and positive herpes  
1728 simplex virus type 2 serology. *Sexually Transmitted Diseases*. 33(12). p.  
1729 747–752.
- 1730 CORTINA, S.H. DE, BRISTOW, C.C., DAVEY, D.J. & KLAUSNER, J.D. (2016). A  
1731 Systematic Review of Point of Care Testing for *Chlamydia trachomatis* ,  
1732 *Neisseria gonorrhoeae* , and *Trichomonas vaginalis*. . 2016.
- 1733 CU-UVIN, S., KO, H., JAMIESON, D.J., HOGAN, J.W., SCHUMAN, P., ANDERSON, J. &  
1734 KLEIN, R.S. (2002). Prevalence, incidence, and persistence or recurrence of  
1735 trichomoniasis among human immunodeficiency virus (HIV)-positive  
1736 women and among HIV-negative women at high risk for HIV infection.

- 1737 *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious*  
1738 *Diseases Society of America.* 34(10). p. 1406–11.
- 1739 CUDMORE, S.L., DELGATY, K.L., HAYWARD-MCCLELLAND, S.F., PETRIN, D.P. &  
1740 GARBER, G.E. (2004). Treatment of infections caused by metronidazole-  
1741 resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews.* 17(4). p.  
1742 783–793.
- 1743 DAO, T.T.H., LINTHORST, H.J.M. & VERPOORTE, R. (2011). Chalcone synthase  
1744 and its functions in plant resistance. *Phytochemistry Reviews.* 10(3). p.  
1745 397–412.
- 1746 DATTA, A.K., DATTA, R. & SEN, B. (2008). Antiparasitic Chemotherapy : Tinkering  
1747 with the Purine Salvage Pathway.
- 1748 DAWANE, B., KONDA, S., SHAIKH, B. & BHOSALE, R. (2009). An improved  
1749 procedure for synthesis of some new 1,3-diaryl-2-propen-1-ones using  
1750 PEG-400 as a recyclable solvent and their antimicrobial evaluation. *Acta*  
1751 *Pharmaceutica.* 59(4). p. 473–482.
- 1752 DESIDERI, N., MASTROMARINO, P. & CONTI, C. (2003). Synthesis and evaluation of  
1753 antirhinovirus activity of 3-hydroxy and 3-methoxy 2-styrylchromones.  
1754 *Antiviral Chemistry and Chemotherapy.* 14(4). p. 195–203.
- 1755 DEVI, K., RAJENDRAN, V., AYUSHEE, RANGARAJAN, T.M., SINGH, R.P., GHOSH, P.C.  
1756 & SINGH, M. (2018). Synthesis and evaluation of antiplasmodial activity of  
1757 2,2,2-trifluoroethoxychalcones and 2-fluoroethoxy chalcones against  
1758 plasmodium falciparum in culture. *Molecules.* 23(5).
- 1759 DIAMOND, L.S. (1957). The Establishment of Various Trichomonads of Animals  
1760 and Man in Axenic Cultures Author ( s ): Louis S . Diamond Published by :  
1761 The American Society of Parasitologists Stable URL :  
1762 <http://www.jstor.org/stable/3274682> Your use of the JSTOR archive  
1763 indicates. *The Journal of Parasitology.* 43(4). p. 488–490.
- 1764 DÍAZ-TIELAS, C., GRAÑA, E., REIGOSA, M.J. & SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.M. (2016).  
1765 Biological Activities and Novel Applications of Chalcones. *Planta Daninha.*  
1766 34(3). p. 607–616. Available at:  
1767 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-83582016000300607&lng=en&tlng=en)  
1768 [83582016000300607&lng=en&tlng=en.](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-83582016000300607&lng=en&tlng=en)
- 1769 DIVISION, P.C., NORTH, P., ZEALAND, N., WONO, E., BMCH, A J., PRESS, A.,  
1770 GMSEBACH, H. & BARZ, W. (1968). the Role of Chalcones a N D Flavanones  
1771 in. . 7(1964). p. 1751–1758.
- 1772 FERRER, J., JEZ, J.M., BOWMAN, M.E., DIXON, R.A. & NOEL, J.P. (1999).  
1773 Ferrer1999.pdf. . 6(8). p. 775–784.
- 1774 FOREJTŇÍKOVÁ, H., LUNEROVÁ, K., KUBÍNOVÁ, R., JANKOVSKÁ, D., MAREK, R.,  
1775 KAREŠ, R., SUCHÝ, V., VONDRÁČEK, J. & MACHALA, M. (2005).  
1776 Chemoprotective and toxic potentials of synthetic and natural chalcones  
1777 and dihydrochalcones in vitro. *Toxicology.* 208(1). p. 81–93.
- 1778 FRANK, L.A., CONTRI, R. V, BECK, R.C.R., POHLMANN, A.R. & GUTERRES, S.S.  
1779 (2015). Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric

- 1780 nanocapsules.
- 1781 FRASSON, A.P., DOS SANTOS, O., DUARTE, M., DA SILVA TRENTIN, D., GIORDANI,  
1782 R.B., DA SILVA, A.G., DA SILVA, M.V., TASCA, T. & MACEDO, A.J. (2012). First  
1783 report of anti-*Trichomonas vaginalis* activity of the medicinal plant *Polygala*  
1784 *decumbens* from the Brazilian semi-arid region, Caatinga. *Parasitology*  
1785 *Research*. 110(6). p. 2581–2587.
- 1786 GAYDOS, C.A., KLAUSNER, J.D., PAI, N.P., KELLY, H., COLTART, C., PEELING, R.W.,  
1787 BALTIMORE, M. & ANGELES, L. (2017). *vaginalis* in women and men. .  
1788 93(Suppl 4).
- 1789 GOLDMAN, L.M.A., UPCROFT, J.A.B., WORKOWSKI, K.C. & RAPKIN, A.A. (2009).  
1790 Treatment of metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. . p. 345–347.
- 1791 GOMES, M.N., MURATOV, E.N., PEREIRA, M., PEIXOTO, J.C., ROSSETO, L.P.,  
1792 CRAVO, P.V.L., ANDRADE, C.H. & NEVES, B.J. (2017). Chalcone derivatives:  
1793 Promising starting points for drug design. *Molecules*. 22(8).
- 1794 GÓMEZ-BARRIO, A., NOGAL-RUIZ, J.J., MONTERO-PEREIRA, D., RODRÍGUEZ-  
1795 GALLEGU, E., ROMERO-FERNÁNDEZ, E. & ESCARIO, J.A. (2002). Biological  
1796 variability in clinical isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Memorias do*  
1797 *Instituto Oswaldo Cruz*. 97(6). p. 893–896.
- 1798 GOODHEW, E.B. & SECOR, W.E. (2013). Drug library screening against  
1799 metronidazolesensitive and metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*  
1800 isolates. *Sexually Transmitted Infections*. 89(6). p. 479–484.
- 1801 GRODSTEIN, F., GOLDMAN, M.B. & CRAMER, D.W. (1993). Relation of tubal  
1802 infertility to history of sexually transmitted diseases. *American journal of*  
1803 *epidemiology*. 137(5). p. 577–84.
- 1804 HANWELL, M.D., CURTIS, D.E., LONIE, D.C., VANDERMEERSCH, T., ZUREK, E. &  
1805 HUTCHISON, G.R. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor,  
1806 visualization, and analysis platform. *Journal of cheminformatics*. 4(1). p. 17.
- 1807 HOBBS, M.M. & SEÑA, A.C. (2014). Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis*  
1808 infection. *NIH Public Access*. 89(6). p. 434–438.
- 1809 HÜBNER, D.P.G., DE BRUM VIEIRA, P., FRASSON, A.P., MENEZES, C.B., SENER,  
1810 F.R., SANTOS DA SILVA, G.N., BAGGIO GNOATTO, S.C. & TASCA, T. (2016).  
1811 Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of betulinic acid derivatives.  
1812 *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 84. p. 476–484. Available at:  
1813 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.09.064>.
- 1814 IWASHINA, T. (2000). The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants.  
1815 *Journal of Plant Research*. 113(3). p. 287–299. Available at:  
1816 <http://link.springer.com/10.1007/PL00013940>.
- 1817 JHALA, Y.S., DULAWAT, S.S. & VERMA, B.L. (2006). Solvent-free improved  
1818 syntheses of some substituted 1 , 3-diaryl-propenones and 3 , 5-diaryl-6-  
1819 carbethoxycyclohexenones under microwave irradiation and their  
1820 antibacterial activity. *Indian Journal of Chemistry*. 45(February). p. 466–  
1821 469.
- 1822 K. SAHU, N., S. BALBHADRA, S., CHOUDHARY, J. & V. KOHLI, D. (2012). Exploring

- 1823 Pharmacological Significance of Chalcone Scaffold: A Review. *Current*  
 1824 *Medicinal Chemistry*. 19(2). p. 209–225. Available at:  
 1825 [http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=092](http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=19&issue=2&page=209)  
 1826 [9-8673&volume=19&issue=2&page=209](http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=19&issue=2&page=209).
- 1827 KAMBOJ, R.C., ARORA, R., SHARMA, G., KUMAR, D., SHARMA, C., JOSHI, R. &  
 1828 ANEJA, K.R. (2010). Eco-friendly synthesis and antimicrobial activity of  
 1829 chalcones. *Der Pharma Chemica*. 2(3). p. 157–170.
- 1830 KULDA, J. (1999). Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance.  
 1831 *International Journal for Parasitology*. 29(2). p. 199–212.
- 1832 LEE, Y.T., FONG, T.H., CHEN, H.M., CHANG, C.Y., WANG, Y.H., CHERN, C.Y. &  
 1833 CHEN, Y.H. (2014). Toxicity assessments of Chalcone and some Synthetic  
 1834 Chalcone Analogues in a Zebrafish model. *Molecules*. 19(1). p. 641–650.
- 1835 LEITSCH, D. (2016). Recent Advances in the Trichomonas vaginalis Field [  
 1836 version 1 ; referees : 2 approved ] Referee Status : . 5. p. 1–7.
- 1837 LEITSCH, D., JANSSEN, B.D., KOLARICH, D., JOHNSON, P.J. & DUCHÊNE, M. (2015).  
 1838 Trichomonas vaginalis Flavin Reductase 1 and its Role in Metronidazole  
 1839 Resistance. . 91(1). p. 198–208.
- 1840 LING, F., JIANG, C., LIU, G., LI, M. & WANG, G. (2015). Anthelmintic efficacy of  
 1841 cinnamaldehyde and cinnamic acid from cortex cinnamon essential oil  
 1842 against Dactylogyrus intermedius. *Parasitology*. 142(14). p. 1744–1750.  
 1843 Available at:  
 1844 [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0031182015001031](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182015001031).
- 1845 LOCKWOOD, B.C. & COOMBS, G.H. (1991). Purification and characterization of  
 1846 methionine γ-lyase from. *Biochem.J.*. 279. p. 675–682.
- 1847 LÓPEZ, L.B., DE MELO BRAGA, M.B., LÓPEZ, J.O., ARROYO, R. & E SILVA FILHO,  
 1848 F.C. (2000). Strategies by which some pathogenic trichomonads integrate  
 1849 diverse signals in the decision-making process. *Anais da Academia*  
 1850 *Brasileira de Ciencias*. 72(2). p. 173–186.
- 1851 LUMSDEN, R. & HEYWORTH, H. (1988). Review article Treatment failure in  
 1852 Trichomonas vaginalis vaginitis. . p. 217–218.
- 1853 MACIEL, G. DE P., TASCA, T. & DE CARLI, G.A. (2004). Aspectos clínicos,  
 1854 patogênese e diagnóstico de Trichomonas vaginalis. *Jornal Brasileiro de*  
 1855 *Patologia e Medicina Laboratorial*. 40(3). p. 152–160. Available at:  
 1856 [http://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs\\_all.jsp?arnumber=751291%5Cnhttp://iee](http://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs_all.jsp?arnumber=751291%5Cnhttp://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=751291)  
 1857 [explore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=751291](http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=751291).
- 1858 MAHAPATRA, D.K., BHARTI, S.K. & ASATI, V. (2015). Anti-cancer chalcones:  
 1859 Structural and molecular target perspectives. *European Journal of*  
 1860 *Medicinal Chemistry*. 98. p. 69–114. Available at:  
 1861 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.05.004>.
- 1862 MATHEW, B., ADENIYI, A.A., JOY, M., MATHEW, G.E., SINGH-PILLAY, A.,  
 1863 SUDARSANAKUMAR, C., SOLIMAN, M.E.S. & SURESH, J. (2017). Anti-oxidant  
 1864 behavior of functionalized chalcone-a combined quantum chemical and  
 1865 crystallographic structural investigation. *Journal of Molecular Structure*.

- 1866 1146. p. 301–308. Available at:  
1867 <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.05.100>.
- 1868 DE MELLO, M.V.P., ABRAHIM-VIEIRA, B. DE A., DOMINGOS, T.F.S., DE JESUS, J.B.,  
1869 DE SOUSA, A.C.C., RODRIGUES, C.R. & SOUZA, A.M.T. DE (2018). A  
1870 comprehensive review of chalcone derivatives as antileishmanial agents.  
1871 *European Journal of Medicinal Chemistry*. 150. p. 920–929. Available at:  
1872 <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.047>.
- 1873 MENEZES, C.B., FRASSON, A.P. & TASCA, T. (2016). Trichomoniasis – are we  
1874 giving the deserved attention to the most common non-viral sexually  
1875 transmitted disease worldwide ? . 3(9). p. 404–418.
- 1876 NASIR, S., BUKHARI, A., JANTAN, I., KOK, L., HAJI, N. & ABBAS, F. (2013). Synthesis  
1877 and Effects of Pyrazolines and Isoxazoles on the Phagocytic Chemotaxis  
1878 and Release of Reactive Oxygen Species by Zymosan Stimulated Human  
1879 Neutrophils. . p. 1091–1098.
- 1880 NYE, M.B., SCHWEBKE, J.R. & BODY, B.A. (2009). Comparison of APTIMA  
1881 *Trichomonas vaginalis* transcription-mediated amplification to wet mount  
1882 microscopy , culture , and polymerase chain reaction for diagnosis of  
1883 trichomoniasis in men and women. *YMOB*. 200(2). p. 188–190. Available  
1884 at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2008.10.005>.
- 1885 OHKAWA, H., OHISHI, N. & YAGI, K. (1979). {Assay} {for} {Lipid} {Peroxides} {in}  
1886 {Animal-Tissues} {By} {Thiobarbituric} {Acid} {Reaction}. *Analytical*  
1887 *Biochemistry*. 95(2). p. 351–358.
- 1888 ORLIKOVA, B., TASDEMIR, D., GOLAIS, F., DICATO, M. & DIEDERICH, M. (2011).  
1889 Dietary chalcones with chemopreventive and chemotherapeutic potential.  
1890 *Genes and Nutrition*. 6(2). p. 125–147.
- 1891 PADHYE, S., AHMAD, A., OSWAL, N., DANDAWATE, P., RUB, R.A., DESHPANDE, J.,  
1892 SWAMY, K.V. & SARKAR, F.H. (2010). Fluorinated 2'-hydroxychalcones as  
1893 garcinol analogs with enhanced antioxidant and anticancer activities.  
1894 *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 20(19). p. 5818–5821.  
1895 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.07.128>.
- 1896 PAL, D., BANERJEE, S., CUI, J., SCHWARTZ, A., GHOSH, S.K. & SAMUELSON, J.  
1897 (2009). Giardia , Entamoeba , and Trichomonas Enzymes Activate  
1898 Metronidazole ( Nitroreductases ) and Inactivate Metronidazole (   
1899 Nitroimidazole Reductases ) □ † . 53(2). p. 458–464.
- 1900 PALANCO, A.C., LACORTE SINGULANI, J. DE, COSTA-ORLANDI, C.B., GULLO, F.P.,  
1901 STROHMAYER LOURENCETTI, N.M., GOMES, P.C., AYUSSO, G.M., DUTRA, L.A.,  
1902 SILVA BOLZANI, V. DA, REGASINI, L.O., SOARES MENDES-GIANNINI, M.J. &  
1903 FUSCO-ALMEIDA, A.M. (2017). Activity of 3'-hydroxychalcone against  
1904 *Cryptococcus gattii* and toxicity, and efficacy in alternative animal models.  
1905 *Future Microbiology*. 12(13). p. 1123–1134.
- 1906 PAULISH-MILLER, T.E., AUGOSTINI, P., SCHUYLER, J.A., SMITH, W.L., MORDECHAI,  
1907 E., ADELSON, M.E., GYGAX, S.E., SECOR, W.E. & HILBERT, W. (2014).  
1908 *Trichomonas vaginalis* Metronidazole Resistance Is Associated with Single  
1909 Nucleotide Polymorphisms in the Nitroreductase Genes ntr4 Tv and ntr6

- 1910 Tv. . 58(5). p. 2938–2943.
- 1911 PETRIN, D., DELGATY, K., BHATT, R. & GARBER, G. (1998). Clinical and  
1912 microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical microbiology*  
1913 *reviews*. 11(2). p. 300–17.
- 1914 PETRIN, D., DELGATY, K., BHATT, R. & GARBER, G. (1998). Clinical and  
1915 Microbiological Aspects of *Trichomonas vaginalis*. . 11(2). p. 300–317.
- 1916 PETTERSEN, E.F., GODDARD, T.D., HUANG, C.C., COUCH, G.S., GREENBLATT, D.M.,  
1917 MENG, E.C. & FERRIN, T.E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system  
1918 for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*.  
1919 25(13). p. 1605–1612.
- 1920 POL, B. VAN DER, KWOK, C., PIERRE-LOUIS, B., RINALDI, A., SALATA, R.A., CHEN, P.,  
1921 WIJGERT, J. VAN DE, MMIRO, F., MUGERWA, R., CHIPATO, T. & MORRISON, C.S.  
1922 (2008). *Trichomonas vaginalis* Infection and Human Immunodeficiency  
1923 Virus Acquisition in African Women. . 197.
- 1924 REPANAS, A., KATSORI, A.M. & HADJIPAVLOU-LITINA, D. (2013). Chalcones in  
1925 Cancer : Understanding their Role in Terms of QSAR . *Mini-Reviews in*  
1926 *Medicinal Chemistry*. 13. p. 952–970.
- 1927 REZK, B.M., HAENEN, G.R.M.M., VAN DER VIJGH, W.J.F. & BAST, A. (2002). The  
1928 antioxidant activity of phloretin: The disclosure of a new antioxidant  
1929 pharmacophore in flavonoids. *Biochemical and Biophysical Research*  
1930 *Communications*. 295(1). p. 9–13.
- 1931 RINALDO-MATTHIS, A., WING, C., GHANEM, M., DENG, H., WU, P., GUPTA, A., TYLER,  
1932 P.C., EVANS, G.B., FURNEAUX, R.H., ALMO, S.C., WANG, C.C. & SCHRAMM,  
1933 V.L. (2007). Inhibition and structure of *Trichomonas vaginalis* purine  
1934 nucleoside phosphorylase with picomolar transition state analogues.  
1935 *Biochemistry*. 46(3). p. 659–668.
- 1936 RITTER, M., MARTINS, R.M., ROSA, S.A., MALAVOLTA, J.L., LUND, R.G., FLORES,  
1937 A.F.C. & PEREIRA, C.M.P. (2015). Green synthesis of chalcones and  
1938 microbiological evaluation. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 26(6).  
1939 p. 1201–1210.
- 1940 DOS SANTOS, O., DE VARGAS RIGO, G., FRASSON, A.P., MACEDO, A.J. & TASCA, T.  
1941 (2015). Optimal reference genes for gene expression normalization in  
1942 *Trichomonas vaginalis*. *PLoS ONE*. 10(9). p. 1–17.
- 1943 SENA-LOPES, Â., DAS NEVES, R.N., BEZERRA, F.S.B., DE OLIVEIRA SILVA, M.T.,  
1944 NOBRE, P.C., PERIN, G., ALVES, D., SAVEGNAGO, L., BEGNINI, K.R., SEIXAS,  
1945 F.K., COLLARES, T. & BORSUK, S. (2017). Antiparasitic activity of 1,3-  
1946 dioxolanes containing tellurium in *Trichomonas vaginalis*. *Biomedicine and*  
1947 *Pharmacotherapy*. 89. p. 284–287. Available at:  
1948 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.173>.
- 1949 SENA-LOPES, Â., BEZERRA, F.S.B., DAS NEVES, R.N., DE PINHO, R.B., DE OLIVEIRA  
1950 SILVA, M.T., SAVEGNAGO, L., COLLARES, T., SEIXAS, F., BEGNINI, K.,  
1951 HENRIQUES, J.A.P., ELY, M.R., RUFATTO, L.C., MOURA, S., BARCELLOS, T.,  
1952 PADILHA, F., DELLAGOSTIN, O. & BORSUK, S. (2018). Chemical composition,  
1953 immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil

- 1954 from Brazilian red propolis. *PLoS ONE*. 13(2). p. 1–16.
- 1955 SETZER, M.S., BYLER, K.G., OGUNGBE, I.V. & SETZER, W.N. (2017). Natural  
1956 Products as New Treatment Options for Trichomoniasis : A Molecular  
1957 Docking Investigation.
- 1958 DA SILVA, C.C., PACHECO, B.S., DE FREITAS, S.C., BERNEIRA, L.M., DOS SANTOS,  
1959 M.A.Z., PIZZUTI, L. & DE PEREIRA, C.M.P. (2018a). Hydroxychalcones:  
1960 Synthetic alternatives to enhance oxidative stability of biodiesel. *Green*  
1961 *Energy and Technology*. (9783319735511). p. 81–110.
- 1962 DA SILVA, C.C., PACHECO, B.S., DE FREITAS, S.C., BERNEIRA, L.M., DOS SANTOS,  
1963 M.A.Z., PIZZUTI, L. & DE PEREIRA, C.M.P. (2018b). Hydroxychalcones:  
1964 Synthetic Alternatives to Enhance Oxidative Stability of Biodiesel. In M.  
1965 Trindade (ed.). *Increased Biodiesel Efficiency: Alternatives for Production,*  
1966 *Stabilization, Characterization and Use of Coproduct*. Cham: Springer  
1967 International Publishing, p. 81–110.
- 1968 SINGH, G., ARORA, A., MANGAT, S.S., RANI, S., KAUR, H., GOYAL, K., SEHGAL, R.,  
1969 MAURYA, I.K., TEWARI, R., CHOQUESILLO-LAZARTE, D., SAHOO, S. & KAUR, N.  
1970 (2016). Design, synthesis and biological evaluation of chalconyl blended  
1971 triazole allied organosilatrane as giardicidal and trichomonacidal agents.  
1972 *European Journal of Medicinal Chemistry*. 108. p. 287–300. Available at:  
1973 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.11.029>.
- 1974 SIVAKUMAR, P.M., KAILASAM, S., ABU, G.E.B. & UKESH, D.M. (2007). QSAR  
1975 Studies on Chalcones and Flavonoids as Anti-tuberculosis Agents Using  
1976 Genetic Function Approximation ( GFA ) Method. . 55(1). p. 44–49.
- 1977 SMITH, J.D. & GARBER, G.E. (2015). *Trichomonas vaginalis* infection induces  
1978 vaginal CD4<sup>+</sup> T-cell infiltration in a mouse model: A vaccine strategy to  
1979 reduce vaginal infection and HIV transmission. *Journal of Infectious*  
1980 *Diseases*. 212(2). p. 285–293.
- 1981 SOBA, P., HAN, C., ZHENG, Y., PEREA, D. & MIGUEL-ALIAGA, I. (2015). The Ret  
1982 receptor regulates sensory neuron dendrite growth and integrin mediated  
1983 adhesion. . p. 1–21.
- 1984 SORVILLO, F. (2001). *Trichomonas vaginalis*, HIV, and African-Americans.  
1985 *Emerging Infectious Diseases*. 7(6). p. 927–932. Available at:  
1986 <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol7no6/sorvillo.htm>.
- 1987 STEINDEL, P.A., CHEN, E.H., WIRTH, J.D. & THEOBALD, D.L. (2016). Gradual  
1988 neofunctionalization in the convergent evolution of trichomonad lactate and  
1989 malate dehydrogenases. *Protein Science*. 25. p. 1319–1331.
- 1990 TALLARIDA, R.J. (2011). Quantitative Methods for Assessing Drug Synergism.  
1991 *Genes and Cancer*. 2(11). p. 1003–1008.
- 1992 THORBURN, A.L. (1974). Alfred Francois Donné, 1801-1878, discoverer of  
1993 trichomonas vaginalis and of leukaemia. *Sexually Transmitted Infections*.  
1994 50(5). p. 377–380.
- 1995 TORRES-ROMERO, J.C. & ARROYO, R. (2009). Responsiveness of *Trichomonas*  
1996 *vaginalis* to iron concentrations: Evidence for a post-transcriptional iron

- 1997 regulation by an IRE/IRP-like system. *Infection, Genetics and Evolution*.  
1998 9(6). p. 1065–1074.
- 1999 TRACHOOTHAM, D., LU, W., OGASAWARA, M.A., VALLE, N.R.-D. & HUANG, P.  
2000 (2008). Redox Regulation of Cell Survival. *Antioxidants & Redox Signaling*.  
2001 10(8). p. 1343–1374. Available at:  
2002 <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ars.2007.1957>.
- 2003 TREIN, M.R., RODRIGUES, L., RIGO, G.V., APARECIDA, M. & GARCIA, R. (2018).  
2004 Anti-Trichomonas vaginalis activity of chalcone and amino-analogues.
- 2005 TROTT, O. & OLSON, A.J. (2009). AutoDock Vina: improving the speed and  
2006 accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and  
2007 multithreading. *Journal of Computational Chemistry*.
- 2008 VIEIRA, P. DE B., BRANDELLI, C.L.C., VERÍSSIMO, C. DE M. & TASCA, T. (2012).  
2009 Mecanismos específicos de patogenicidade de protozoários de mucosa:  
2010 Entamoeba histolytica, Giardia lamblia e Trichomonas vaginalis. *Clinical &*  
2011 *Biomedical Research*. 32(1). p. 58–70. Available at:  
2012 <http://seer.ufrgs.br/hcpa/article/view/22570>.
- 2013 WACHTER, B., SYROWATKA, M., OBWALLER, A. & WALOCHNIK, J. (2014). In vitro  
2014 efficacy of curcumin on Trichomonas vaginalis. . p. 32–36.
- 2015 WANG, F.-W., WANG, S.-Q., ZHAO, B.-X. & MIAO, J.-Y. (2014). Discovery of 2'-  
2016 hydroxychalcones as autophagy inducer in A549 lung cancer cells. *Organic*  
2017 *& biomolecular chemistry*. 12. p. 3062–3070.
- 2018 WENDEL, K.A. & WORKOWSKI, K.A. (2007). Trichomoniasis: challenges to  
2019 appropriate management. *Clinical infectious diseases : an official*  
2020 *publication of the Infectious Diseases Society of America*. 44 Suppl  
2021 3(Supplement 3). p. S123-9.
- 2022 WORLD HEALTH ORGANIZATION (2012). *Global incidence and prevalence of*  
2023 *selected curable sexually transmitted infections - 2008*,
- 2024 WU, G., FISER, A.S., KUILE, B.T.E.R., SALI, A. & MULLER, M. (2014). Convergent  
2025 evolution of Trichomonas vaginalis lactate dehydrogenase from malate  
2026 dehydrogenase. . 96(11). p. 6285–6290.
- 2027 YARLETT, N., YARLETT, N. & LLOYD, D. (1986). FERREDOXIN-DEPENDENT  
2028 REDUCTION OF NITROIMIDAZOLE DERIVATIVES IN DRUG-  
2029 RESISTANT AND SUSCEPTIBLE STRAINS OF TRICHOMONAS  
2030 VAGINALIS. *Biochemical pharmacology*. 35(5 ml). p. 1703–1708.
- 2031 ZHOU, B. (2015). Diverse Molecular Targets for Chalcones with Varied  
2032 Bioactivities. *Medicinal Chemistry*. 5. p. 388–404. Available at:  
2033 [https://www.omiconline.org/open-access/diverse-molecular-targets-for-](https://www.omiconline.org/open-access/diverse-molecular-targets-for-chalcones-with-varied-bioactivities-2161-0444-1000291.php?aid=58791)  
2034 [chalcones-with-varied-bioactivities-2161-0444-1000291.php?aid=58791](https://www.omiconline.org/open-access/diverse-molecular-targets-for-chalcones-with-varied-bioactivities-2161-0444-1000291.php?aid=58791).  
2035  
2036  
2037  
2038

2039    **7 ANEXO**

2040

2041    **Anexo A – Patente - APLICAÇÃO DE CHALCONAS SINTÉTICAS COMO**

2042    **AGENTES ANTI-*Trichomonas vaginalis***