

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Curso de Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

**Avaliação da atividade antiparasitária de compostos derivados de
cumarinas sobre *Trichomonas vaginalis***

Luiza Domingues Moron

Pelotas, 2021

Luiza Domingues Moron

**Avaliação da atividade antiparasitária de compostos derivados de
cumarinas sobre *Trichomonas vaginalis***

Trabalho acadêmico apresentado ao
Curso de Biotecnologia da
Universidade Federal de Pelotas,
como requisito parcial à obtenção do
título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sibeles Borsuk

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M868a Moron, Luiza Domingues

Avaliação da atividade antiparasitária de compostos derivados de cumarinas sobre *Trichomonas vaginalis* / Luiza Domingues Moron ; Sibeles Borsuk, orientadora. — Pelotas, 2021.

46 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Tricomoniase. 2. Tricomonicida. 3. Cumarinas. 4. Síntese química. I. Borsuk, Sibeles, orient. II. Título.

CDD : 616.9518

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Luiza Domingues Moron

**Avaliação da atividade antiparasitária de compostos derivados de
cumarinas sobre *Trichomonas vaginalis***

**Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para
obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Centro de
Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.**

Data da Defesa: 11 de junho de 2021

Banca examinadora:

**Prof^a. Dr^a. Sibeles Borsuk (Orientador)
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas**

**Prof^a. Dr^a. Nara Amélia da Rosa Farias
Doutora em Biologia Parasitária pela Fundação Oswaldo Cruz**

**Dr^a. Ângela Sena-Lopes
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas**

**Bárbara da Rocha Fonseca (Suplente)
Graduada em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas**

A todos meus companheiros nessa jornada, e
em especial à minha mãe, dedico.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer minha família, pelo apoio em minha jornada acadêmica. Agradeço principalmente minha mãe Eliana, por nunca soltar minha mão, por sempre ser um porto seguro e fonte de incentivo para mim em todos os momentos que precisei, assim como nos momentos em que eu não achava necessário e se mostraram desafiadores, ter uma mulher forte ao meu lado sempre foi motivo de orgulho.

À minha orientadora Sibebe Borsuk, pela oportunidade de aprender todos os dias sobre a atuação da biotecnologia durante meu período como sua estagiária. Agradeço também a minha supervisora de estágio Mirna Dié, pelo tanto que me ensinou e foi um ombro amigo quando precisei, pelas nossas longas conversas e pela grande ajuda que sempre me ofereceu, sempre buscando me ensinar coisas novas, fez grande parte da minha formação acadêmica.

Aos meus colegas do Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária, Mara, Bárbara, Rodrigo, Nicole e Tallyson pelas conversas descontraídas, ensinamentos, conselhos e risadas que compartilhamos e que sempre vou guardar na memória. Também agradeço aos colegas que mesmo não fazendo mais parte do laboratório, acrescentaram muito na minha formação e espero encontrá-los novamente.

À minha turma, por todos os momentos compartilhados, sou grata por ter conhecido pessoas tão diferentes a mim, mas que serão sempre importantes em minha vida. Em especial, minhas amigas: Carol, Tiffany, Alice e Ana Cláudia. Não sei como seria minha vida se elas não estivessem nela, agradeço todos os dias por termos nos encontrado, obrigada pela paciência, pelo companheirismo e pela cumplicidade que temos, vocês são maravilhosas.

Finalmente, agradeço à banca avaliadora pelas contribuições, à Universidade Federal de Pelotas pela estrutura disponibilizada, aos órgãos de fomento que possibilitaram a realização deste trabalho e aos demais professores do curso por me passarem seus conhecimentos e me influenciarem a ser uma pesquisadora.

“Vocês não podem esperar construir um mundo melhor sem melhorar as pessoas. Cada um de nós deve trabalhar na sua própria melhora.”

Marie Curie

Resumo

MORON, Luiza Domingues. **Avaliação da atividade antiparasitária de compostos derivados de cumarinas sobre *Trichomonas vaginalis***. 2021. 46f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biotecnologia) – Curso de Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

O protozoário flagelado *Trichomonas vaginalis* é o agente etiológico da tricomoníase, a infecção sexualmente transmissível (IST) mais frequente no mundo. Em mulheres, 25% a 50% dos casos são assintomáticos, e essa doença pode ainda estar associada ao aumento da suscetibilidade do indivíduo em contrair outros patógenos, como HIV e HPV. O tratamento é realizado com dois fármacos da classe 5-nitroimidazóis, o metronidazol e o tinidazol. Contudo, estes medicamentos podem levar a reações adversas e de hipersensibilidade devido a sua toxicidade, além disso, o surgimento de isolados resistentes é um grande dificultador, logo, o desenvolvimento de novos tratamentos se faz necessário. Com isso, compostos derivados de cumarinas se apresentam como possíveis alternativas terapêuticas, pois sua síntese química é bem elucidada e possuem atividades farmacológicas já descritas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade tricomonocida de onze derivados de cumarinas (COU) sobre *T. vaginalis*. Para isto, os compostos foram diluídos em DMSO e adicionados a placas de microtitulação, nas concentrações finais de 100µM e 200µM, onde foram incubados juntamente ao isolado ATCC 30236 de *T. vaginalis* em uma densidade inicial de $2,6 \times 10^5$ trofozoítos/ml durante 24 h. Três controles foram realizados: negativo (apenas trofozoítos), positivo (metronidazol 100µM) e veículo de diluição (DMSO 0,6%). Realizou-se a contagem dos trofozoítos viáveis, em câmara de Neubauer, pelo teste de exclusão com corante Azul de Tripán (0,4%), tendo sido observadas ainda a motilidade e morfologia. O ensaio da atividade antiparasitária foi realizado três vezes em triplicata. Os compostos COU 4 e COU 7 a 100µM ocasionaram redução na viabilidade de 16,98% e 23,77%, respectivamente. Já os compostos COU 1, COU 4, COU7 e COU 9 a 200µM reduziram entre 12,1% e 17,8% da viabilidade dos trofozoítos. Contudo, nenhum composto teve redução significativa da viabilidade quando comparado ao controle positivo. Considerando que estudos já demonstraram atividades antiparasitárias das cumarinas e seus derivados, a síntese de outros derivados de cumarinas deve ser realizada para que novos testes possam verificar a ação desta classe de compostos sobre *T. vaginalis* a fim de utilizá-los como alternativa para o tratamento desta infecção.

Palavras-chave: Tricomonicida; Cumarinas; Tricomoníase; Síntese química.

Abstract

MORON, Luiza Domingues. **Evaluation of the antiparasitic activity of coumarins derivatives on *Trichomonas vaginalis***. 2021. 46f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biotecnologia) – Curso de Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

The flagellated protozoan *Trichomonas vaginalis* is the etiologic agent of trichomoniasis, the most common sexually transmitted infection (STI) in the world. In women, 25% to 50% of cases are asymptomatic, and this disease may also be associated with an increase in the susceptibility to contracting other pathogens, such as HIV and HPV. Treatment is carried out with two drugs of the 5-nitroimidazoles class, metronidazole and tinidazole. However, these drugs can lead to adverse reactions and hypersensitivity due to their toxicity, moreover, the increase of resistant isolates is a problem. Therefore, the development of new treatment alternatives is necessary. In this sense, compounds derived from coumarins might be possible therapeutic alternatives since their chemical synthesis is well-elucidated and pharmacological activities have been described for this class. Hence, the aim of this study was to evaluate the trichomonacidal activity of eleven coumarin derivatives (COU) on *T. vaginalis*. The compounds were diluted in DMSO and added to microtiter plates, in final concentrations of 100 μ M and 200 μ M, where they were incubated together with *T. vaginalis* ATCC 30236 isolate at an initial density of 2.6×10^5 trophozoites/ml for 24 h. Three controls were performed: negative (trophozoites only), positive (metronidazole 100 μ M) and vehicle (0.6% DMSO). Viable trophozoites were counted in a Neubauer chamber using the Trypan Blue dye exclusion test (0.4%); motility and morphology were also observed. Antiparasitic activity assay was performed three times in triplicate. Compounds COU 4 and COU 7 at 100 μ M lead to a reduction of 16.98% and 23.77% in viability, respectively. In addition, compounds COU 1, COU 4, COU7, and COU 9 at 200 μ M reduced between 12.1% and 17.8% of trophozoites viability. However, no compound significantly reduced viability when compared to the positive control. Considering that studies have already shown antiparasitic activities of coumarins and its derivatives, the synthesis of other coumarin derivatives must be carried out so that new tests can verify their action on *T. vaginalis* for them to be studied as an alternative for treating this infection.

Keywords: Trichomonacidal; Coumarins; Trichomoniasis; Chemical synthesis.

Lista de figuras

- Figura 1:** Viabilidade dos trofozoítos após 24 h de incubação com compostos derivados de cumarinas (COU) na concentração de 100 μM 33
- Figura 2:** Viabilidade dos trofozoítos após 24 h de incubação com compostos derivados de cumarinas na concentração de 200 μM 34

Lista de tabelas

Tabela 1: Estrutura química dos compostos derivados de cumarinas	32
---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosinatrifosfato
CD4+	<i>Cluster of Differentiation 4</i>
CDF	<i>Cell-Detaching Factor</i>
CN	Controle Negativo
CO ₂	Dióxido de Carbono
CoA	Coenzima A
DIP	Doença Inflamatória Pélvica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IST	Infecção Sexualmente Transmissível
mL	Mililitro
mmol	Milimolar
MTZ	Metronidazol
mmol	Milimol
NAATs	<i>Nucleic acid amplification tests</i>
nm	Nanometro
°C	Grau Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFOR	Piruvato Ferredoxina-Oxidoredutase
pH	Potencial Hidrogeniônico
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SBA	Soro bovino adulto
TNZ	Tinidazol
TrxR	Tiorredoxina redutase

Lista de símbolos

% Porcentagem

< Menor que

μ Micro

α Alfa

β Beta

Sumário

1 Introdução geral	15
2 Objetivo	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivo específico.....	16
3 Revisão Bibliográfica	17
3.1 <i>Trichomonas vaginalis</i>	17
3.2 Tricomoniase	18
3.2.1 Epidemiologia.....	18
3.2.2 Transmissão.....	19
3.2.3 Patogênese	20
3.2.4 Manifestações clínicas	22
3.2.5 Diagnóstico.....	24
3.2.6 Tratamento	26
3.2.7 Alternativas de tratamento	28
3.3 Cumarinas	29
4 Materiais e métodos	31
4.1 Síntese de cumarinas	31
4.2 Cultivo de <i>T. vaginalis</i>	33
4.3 Ensaio Anti- <i>Trichomonas vaginalis</i>	34
4.4 Análises Estatísticas	34
5 Resultados	35
5.1 Ensaio Anti- <i>T. vaginalis</i>	35
6 Discussão	37
7 Conclusão	40
8 Referências	41

1 Introdução geral

A tricomoníase é a infecção sexualmente transmissível (IST) não-viral mais frequente no mundo e de acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) acometeu cerca de 156 milhões de pessoas no ano de 2016 (WHO, 2018). O agente etiológico desta doença é *Trichomonas vaginalis*, um protozoário flagelado que infecta principalmente o trato urogenital dos hospedeiros e ocasiona uma variedade de manifestações clínicas, além de facilitar a contaminação do indivíduo por outros patógenos (MENEZES; FRASSON; TASCA, 2016; PETRIN et al., 1998).

O único tratamento aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) conta exclusivamente com medicamentos pertencentes a uma classe de fármacos, os 5-nitroimidazóis. Os dois medicamentos utilizados são: metronidazol (MTZ) e tinidazol (TNZ) (BOUCHEMAL; BORIES; LOISEAU, 2017). Porém, tratamentos com estes medicamentos podem apresentar muitas reações adversas e de hipersensibilidade, além da problemática envolvendo a existência de cepas resistentes a estes medicamentos (GRAVES et al., 2020).

A fim de buscar novas alternativas de tratamento, para não perpetuar a dependência em apenas uma classe de fármacos, são necessários estudos envolvendo moléculas de outras classes químicas que já tenham apresentado atividades biológicas e farmacológicas na tricomoníase, como as quinolinas (SENA-LOPES et al., 2019), chalconas (DAS NEVES et al., 2020), curcuminas (CARAPINA DA SILVA et al., 2019), entre outras.

A partir disto, as cumarinas, uma classe de moléculas que se apresenta de forma abundante na natureza e cuja síntese química já é bem estabelecida, já foram descritas como detentoras de atividades biológicas como antibacteriana (HU et al., 2018), antiviral (PATIL et al., 1993), antiplasmodial (MOON et al., 2011) e, inclusive, atividade tricomonocida (GUPTA et al., 2016), tornando-se então moléculas de interesse.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-*T. vaginalis* de compostos derivados de cumarinas, a fim de apresentá-los como possíveis abordagens no tratamento para tricomoníase.

2 Objetivo

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antiparasitária *in vitro* dos compostos derivados de cumarinas sobre *T. vaginalis*.

2.2 Objetivo específico

- Avaliar a atividade anti-*Trichomonas vaginalis in vitro* dos compostos derivados de cumarinas a 100 μ M sobre *T. vaginalis* ATCC 30236;
- Avaliar a atividade anti-*Trichomonas vaginalis in vitro* dos compostos derivados de cumarinas a 200 μ M sobre *T. vaginalis* ATCC 30236.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis é um protozoário flagelado pertencente ao filo Parabasalia, a classe Trichomonadea e a família Trichomonadidae, e dentre as espécies que parasitam seres humanos é o único exemplar com potencial patogênico, tendo sido descrito pela primeira vez por Alfred François Donné em 1836 (MARITZ et al., 2014). O genoma é organizado em 6 cromossomos onde estão contidos aproximadamente 60.000 genes codificadores de proteínas. Além disso, é um parasita obrigatório altamente predatório, que possui como foco principal a fagocitose de células epiteliais das regiões genitais, as quais são as primeiras a serem infectadas (KISSINGER, 2015).

A reprodução de *T. vaginalis* se dá por fissão binária longitudinal e em seu ciclo biológico o parasito se apresenta apenas na forma de trofozoíto, não possuindo uma fase cística. Contudo, suas células são polimorfas e se adaptam quando estão inseridas em meios desfavoráveis (PETRIN et al., 1998). Ademais, este parasito pode apresentar formato piriforme, oval ou elipsoide a depender das propriedades físico-químicas do meio. Além disso, possui 4 flagelos anteriores e uma membrana ondulante os quais facilitam sua motilidade (MENEZES; FRASSON; TASCA, 2016).

Esta espécie possui ainda uma estrutura rígida denominada axóstilo que é composta de hialina, confere suporte a célula e prolonga-se desde a região central até a extremidade posterior do parasito. Adicionalmente, dispõe de um núcleo elipsoide e não possui mitocôndrias, sendo a sua produção de energia realizada nos hidrogenossomas (MACIEL; TASCA; DE CARLI, 2004).

Os hidrogenossomas são estruturas essenciais no metabolismo da célula. São organelas constituídas de dupla membrana e participam de processos catabólicos no patógeno, como por exemplo, da glicólise, produzindo energia e excretando hidrogênio molecular, importante para o equilíbrio redox no parasito (MALLO; LAMAS; LEIRO, 2013). Para auxiliar esse processo, existe uma enzima chamada piruvato-ferredoxina oxidoredutase

(PFOR), a qual promoverá a conversão de piruvato em acetil-CoA por fermentação oxidativa produzindo então acetato, adenosina trifosfato (ATP), hidrogênio molecular (H₂) e dióxido de carbono (CO₂) (PETRIN et al., 1998). Além disso, por apresentarem características moleculares diferentes, bem como vias metabólicas distintas das mitocôndrias, essas organelas podem direcionar a escolha de alvos terapêuticos, diminuindo as chances das células do hospedeiro serem afetadas (MALLO; LAMAS; LEIRO, 2013)

Além disso, o patógeno consegue armazenar glicogênio, importante para sua sobrevivência especialmente no trato vaginal, devido as constantes mudanças no meio as quais podem dificultar a absorção de nutrientes para a célula. Arginina, leucina e treonina podem ser utilizadas como fontes de nutrientes quando carboidratos estiverem escassos no ambiente. Por se tratar de um organismo anaeróbio facultativo, *T. vaginalis* tem bom crescimento em ambientes com pouca disponibilidade de oxigênio e preferencialmente com faixas de pH baixos (4,9 a 7,5) e em temperaturas que podem variar de 20°C e 40°C (MACIEL; TASCA; DE CARLI, 2004).

3.2 Tricomoníase

3.2.1 Epidemiologia

A partir de dados disponibilizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) é sabido que a tricomoníase é a IST tratável com maior número de casos estimados em comparação a outras infecções como clamídia, gonorreia e sífilis, com cerca de 156 milhões de pessoas acometidas pela doença no mundo anualmente e prevalência de aproximadamente 80% em mulheres entre 15-49 anos no continente americano (WHO, 2018). Em comparação com o relatório anterior da OMS é possível verificar uma queda no número de casos anuais que eram aproximadamente 276 milhões (WHO, 2012), contudo é importante ressaltar que esta é uma doença subnotificada em muitos países, incluindo o Brasil, sendo assim os números podem ser maiores.

No Brasil, estudos demonstraram uma prevalência de 4% para doença (ALVES et al., 2011), mas quando analisado apenas no Rio Grande do Sul, essa porcentagem aumenta para 9% (AMBROZIO et al., 2016). Mais especificamente em Pelotas, um estudo demonstrou que de 499 amostras, 4,2% positivaram para a presença de *T. vaginalis*, um valor relativamente alto para uma IST que não exige notificação compulsória (BRUNI et al., 2019).

Diversos fatores podem contribuir para o número de casos e estatísticas relacionadas a doença, dentre estes podemos citar: idade, vida sexual, número de parceiros sexuais, outras ISTs, fase do ciclo menstrual, coleta de amostras ou ainda a técnica utilizada em laboratório para análise (PETRIN et al., 1998).

Apesar dos fatos citados acima, não existe atualmente protocolo específico para a notificação de casos da doença. A OMS fornece protocolos para doenças como gonorreia e clamídia, os quais são apenas adaptados para serem aplicados na vigilância de tricomoníase (WHO, 2018). Em consequência disto, não há uma vigilância abrangente, justamente porque a notificação de novos casos não é compulsória, gerando subnotificação, o que acaba diminuindo ainda mais o interesse por parte dos governos de investir em programas de saúde pública os quais investiguem a tricomoníase (MENEZES; FRASSON; TASCA, 2016).

3.2.2 Transmissão

A transmissão de *T. vaginalis* se dá majoritariamente pelo contato sexual sem a utilização de preservativos, onde o parasito se adere preferencialmente às células escamosas do epitélio, acometendo principalmente o trato urogenital. Por não possuir em seu ciclo a forma de cisto, este protozoário normalmente não consegue sobreviver por mais de 3 horas fora do corpo humano (KISSINGER, 2015).

O homem é considerado o vetor da doença, pois, mesmo assintomático, é através da ejaculação que os protozoários conseguem chegar ao epitélio da mucosa vaginal, possibilitando o estabelecimento da infecção. Além disso, é

importante ressaltar que este parasito, consegue sobreviver por uma semana no prepúcio de um homem, mesmo que este esteja sadio, que manteve relações sexuais com uma mulher infectada (MACIEL; TASCA; DE CARLI, 2004).

Apesar de ser considerada uma IST, já foram descritos casos em que a transmissão não se deu através do contato sexual, mas sim pelo contato com assentos sanitários, bocais de duchas, espéculos ou ainda água contaminada, sendo estes casos mais raros (PETRIN et al., 1998).

3.2.3 Patogênese

Primeiramente, para o estabelecimento da infecção há um aumento no pH vaginal que normalmente é entre 3,8 e 4,5 e é elevado para 5 ou mais, tornando o ambiente favorável para a multiplicação e crescimento de *T. vaginalis*, bem como levando a uma diminuição de *Lactobacillus acidophilus*, possibilitando conseqüentemente um aumento de bactérias anaeróbias (MACIEL; TASCA; DE CARLI, 2004).

Alguns dos mecanismos e moléculas que facilitam a infecção já foram descritos e dentre eles podemos citar: as adesinas, os fatores responsáveis pela hemólise ou ainda, o mecanismo de excreção de fatores solúveis, como por exemplos as proteinases extracelulares (PETRIN et al., 1998).

Durante a colonização das células do hospedeiro, o parasito acaba desencadeando danos celulares no tecido ao secretar moléculas denominadas fatores citolíticos, dentre as quais podemos citar o fator *Trichomonas vaginalis* (TvF), um efector responsável pelo arredondamento e aglomeração celular nas células epiteliais, mas sem desencadear lise. Outros componentes importantes devem ser citados, como o CDF (*cell-detaching factor*), que é uma glicoproteína que permite o descolamento celular, as adesinas, as integrinas e os lipoglicanos, bem como as cisteína-proteases (CPs), as quais modulam o reconhecimento e a adesão do parasita à célula, além de interferirem na

evasão das defesas imunológicas do hospedeiro (MENEZES; FRASSON; TASCA, 2016).

A adesão às células do hospedeiro é imprescindível para o desenvolvimento desta doença. A superfície celular de *T. vaginalis* é de extrema importância para esta interação parasita-hospedeiro, possibilitada pelas glicoproteínas produzidas pelo patógeno, as quais acabam influenciando também em sua nutrição. As principais adesinas envolvidas na colonização da célula hospedeira pelo patógeno são AP65, AP51, AP33e AP23, as quais são expressas alternadamente na superfície com uma glicoproteína altamente imunogênica, a P270, e esta expressão gênica é regulada positivamente pelo ferro, fator que também modula a atividade de CPs, o que pode estar associado a um aumento dos sintomas da doença no período menstrual (MENEZES; FRASSON; TASCA, 2016; PETRIN et al., 1998).

A partir disso, outro grupo molecular relevante para a virulência do parasito são as cisteínas-proteases. Estas moléculas são associadas a citoaderência por apresentarem atividade proteolítica, degradando componentes da barreira da mucosa vaginal e permitindo a entrada do microrganismo (HERNÁNDEZ; MARCET; SARRACENT, 2014). Somado a isso, outro papel importante das CPs é o auxílio ao parasita na evasão das defesas imunológicas do hospedeiro, ao degradarem anticorpos IgA e IgG, a matriz extracelular humana e ainda as proteínas do complemento (MENEZES; FRASSON; TASCA, 2016).

O protozoário ainda conta com a liberação de substâncias citotóxicas, entre elas a glicoproteína CDF, que é danosa para as células epiteliais e promove a destruição destas. Um fator interessante é que a produção desta proteína é diretamente influenciada pela concentração de estrógeno, tendo em vista a diminuição da sua produção na presença de β -estradiol (MACIEL; TASCA; DE CARLI, 2004).

Já da perspectiva do hospedeiro, é gerada tanto uma resposta imune inata quanto as respostas celular e humoral, contudo estas acabam sendo insuficientes ao transcorrer do tempo, permitindo que a infecção ocorra de forma persistente. Os trofozoítos acabam desencadeando uma resposta

inflamatória, através da liberação de interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e da proteína inflamatória de macrófagos (MIP-3 α) (MENEZES; FRASSON; TASCA, 2016). Além disso, já foram encontrados imunoglobulinas (IgA, IgM e IgG) em secreções vaginais, demonstrando uma resposta imune adaptativa com produção de anticorpos específicos, mesmo que temporários (YADAV; GUPTA; MALLA, 2005). Porém, após um período de aproximadamente 12 meses do fim da infecção, já não são encontrados anticorpos circulantes na corrente sanguínea, possibilitando uma nova infecção do indivíduo e ainda dificultando o diagnóstico da doença (CUDMORE et al., 2004; MENEZES; FRASSON; TASCA, 2016).

3.2.4 Manifestações clínicas

A maioria dos casos de tricomoníase são assintomáticos, contudo, quando os sintomas se desenvolvem, mulheres e homens podem apresentá-los de forma distinta. Além disso, a tricomoníase é classificada de acordo com a sua severidade em: aguda, crônica e assintomática (KISSINGER, 2015; PETRIN et al., 1998).

Na forma aguda da doença, a sintomatologia mais consistente engloba, corrimento vaginal amarelado mucopurulento, disúria, irritação vulvar e dor abdominal, bem como odor vaginal anormal. Alguns sintomas são cíclicos e tendem a piorar com a aproximação do período menstrual, possivelmente devido ao aumento da disponibilidade de ferro durante a menstruação, fator que pode contribuir também para a virulência do parasita (EDWARDS et al., 2014; MACIEL; TASCA; DE CARLI, 2004; PETRIN et al., 1998). Ocasionalmente, em casos mais graves (apenas 2% a 5% das mulheres), pode ocorrer o chamado *cérvix morango* ou *colpitis macularis*. Nessa condição, a aparência de “morango” do *cérvix* é consequência da presença de pontos hemorrágicos (MENEZES; FRASSON; TASCA, 2016).

Contudo, a infecção pode evoluir para casos mais graves e, por tratar-se de uma doença que afeta o indivíduo a níveis citopatológicos, o desenvolvimento de displasias e neoplasias podem ocorrer. A detecção da

infecção em mulheres com neoplasia intraepitelial cervical corrobora com essa hipótese, afinal há um alto risco relativo de lesão pré-invasiva e câncer cervical invasivo em pacientes com tricomoníase (MENEZES; FRASSON; TASCA, 2016). A infecção por *T. vaginalis* pode aumentar a ativação de fatores de transcrição inflamatórios os quais causam danos ao tecido cervical, aumentando a suscetibilidade ao vírus do HPV e possivelmente o desenvolvimento de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (YANG et al., 2020).

A tricomoníase pode ainda estar relacionada ao surgimento e/ou agravamento de outra doenças, como a doença inflamatória pélvica (DIP), a qual gera uma infecção no trato urogenital superior, capaz de danificar as células ciliadas da mucosa tubária e sua estrutura, aumentando o risco de infertilidade (CHERPES et al., 2006; POOLE; MCCLELLAND, 2013). Outra possível complicação é a contração do protozoário durante a gestação, aumentando a possibilidade de parto prematuro e de recém-nascidos abaixo do peso (MACIEL; TASCA; DE CARLI, 2004; MENEZES; FRASSON; TASCA, 2016).

Mesmo que esta IST seja predominantemente relatada em mulheres e a maioria dos homens sejam portadores assintomáticos, alguns sintomas da doença em homens já foram descritos na literatura. No trato urogenital masculino, a tricomoníase pode aparecer de diversas formas, como: doença assintomática, constatada através da investigação de contatos sexuais com mulheres infectadas; tricomoníase aguda, representada por uretrite purulenta profusa, bem como sensação de queimação após a relação sexual; e doença sintomática leve, que é indiscriminável de outras causas de uretrite não gonocócica numa perspectiva clínica, podendo apresentar secreção clara mucopurulenta, disúria e prurido leve (MENEZES; FRASSON; TASCA, 2016). Em alguns casos, já foram identificados a presença de *T. vaginalis* em homens em idades entre 16 e 22 anos, em testes após a realização de massagem prostática, e ainda, é possível que alguns homens não contraiam a doença devido à alta concentração de zinco no fluido prostático, substância que é altamente tóxica para o parasita (MACIEL; TASCA; DE CARLI, 2004).

Ademais, quando a doença se apresenta de forma crônica, aumentam as chances de os parasitos ascenderem à próstata e estabelecerem um local

de inflamação que pode levar ao câncer de próstata, tendo em vista que trofozoítos de *T. vaginalis* já foram encontrados em tecido prostático hiperplásico benigno (SUTCLIFFE et al., 2012).

Outra grande preocupação que se dá pela tricomoníase, é a suscetibilidade do indivíduo a contrair o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Isso se dá através do fenômeno de migração das células do sistema imune (incluindo células-alvo do HIV, os linfócitos TCD4+) devido a inflamação no epitélio vaginal e na uretra de homens. Ademais, assim como outras ISTs, a relação entre *T. vaginalis* e o HIV é bidirecional, pois assim como a tricomoníase aumenta a transmissão do HIV, a infecção por HIV também aumenta a suscetibilidade à *T. vaginalis*. Outro estudo sugere que o aumento da suscetibilidade ao HIV se dá também pela ruptura das camadas epiteliais urogenitais do hospedeiro por *T. vaginalis*, podendo facilitar entrada do vírus nas camadas subjacentes (GUENTHNER; SECOR; DEZZUTTI, 2005; VAN DER POL et al., 2008).

3.2.5 Diagnóstico

Um método de diagnóstico amplamente utilizado é a identificação do parasito por microscopia óptica para avaliação de motilidade dos trofozoítos a partir de amostras de secreções vaginais. Contudo, essa técnica apresenta sensibilidade variada (entre 38% a 82%) que pode ser influenciada pelas condições da amostra e do profissional o qual está analisando, por exemplo, fato que pode acabar comprometendo a veracidade do diagnóstico, mesmo que seja menos onerosa (PETRIN et al., 1998). O método considerado “padrão ouro” para o diagnóstico de tricomoníase é o cultivo celular de amostras coletadas de pacientes em meio Diamond, para observação do crescimento dos trofozoítos, se estes estiverem de fato presentes na amostra. Entretanto, essa cultura necessita de alguns dias para ser analisada, sendo uma problemática deste método, pois o indivíduo permanece infectado e transmitindo o parasito durante esse tempo (MACIEL; TASCA; DE CARLI, 2004).

Testes comerciais já estão disponíveis no mercado, dentre estes pode-se citar o sistema InPouch® (BioMedDiagnostics, White City, OR), o qual consiste na utilização de bolsa plástica com duas câmaras, permitindo a amostragem simultânea para montagem úmida e cultura, diminuindo as chances de contaminação, porém trata-se de um método que necessita de avaliação microscópica diariamente por alguns dias por se basear na cultura do parasito em meio seletivo (VAN GERWEN; MUZNY, 2019).

Neste contexto, uma alternativa para reduzir essa problemática, é a utilização de métodos de análise da amplificação de ácidos nucleicos do parasito na amostra, se esta estiver positivada. Alguns testes já foram aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) dentre eles estão: o Aptima® *T. vaginalis* assay (Hologic, Bedford, MA), o ensaio BD ProBTec *T. vaginalis* Qx (TVQ) (BD Diagnostics, Baltimore, MD) e o ensaio Xpert® TV (Cepheid, Sunnyvale, CA). Apenas o último teste pode ser utilizado a partir de amostras de ambos os sexos. Porém, são métodos que contam com elevada sensibilidade (88% a 100%) e os resultados são gerados de forma relativamente rápida, o que facilita a aplicação destes em clínicas e postos de saúde. Além disso, estes testes podem ser utilizados se não forem detectados trofozoítos nos métodos de cultura e microscopia mesmo que o indivíduo apresente indicação de infecção. Contudo, as principais desvantagens se dão pela impossibilidade de alguns destes testes serem utilizados em amostras do sexo masculino, aliado com a falta de interesse dos governos em adquiri-los (ADAMSON; LOEFFELHOLZ; KLAUSNER, 2020; DOMEIKA et al., 2010; VAN GERWEN; MUZNY, 2019).

Outros métodos de diagnósticos que já foram descritos e são aplicados, têm como objetivo analisar amostras sorológicas e a presença de antígenos. Um exemplo é o teste OSOM *Trichomonas rapid test* (*Genzyme Diagnostics*), o qual através de imunocromatografia de fluxo capilar consegue detectar a presença de antígeno (proteínas da membrana de *T. vaginalis*) em um período de 10 a 15 minutos, e ainda apresenta sensibilidade de 82% a 95% e especificidade de 97% a 100% (GAYDOS et al., 2017; VAN GERWEN; MUZNY, 2019). Em relação às avaliações sorológicas, têm-se o teste ELISA que pode ser empregado preferencialmente em populações assintomáticas ou

que não estão na fase aguda da doença, pois são testes com taxas mais altas de sensibilidade e especificidade, podendo gerar ainda resultados (falso)-positivos para outras infecções que não a tricomoníase (VAN GERWEN; MUZNY, 2019).

3.2.6 Tratamento

Os únicos fármacos aprovados pelo FDA para o tratamento da tricomoníase são metronidazol (MTZ) e tinidazol (TNZ), ambos constituídos de uma estrutura chamada 5-nitroimidazol. Empregados desde 1959, estes dois compostos apresentam uma significativa atividade tricomonocida, com taxas de cura que variam entre 70-95% para MTZ e 86%–100% para TNZ (MEITES et al., 2015; WORKOWSKI; BOLAN, 2015).

Por serem pró-fármacos, os nitroimidazóis só desempenharão sua função depois de entrarem na célula e na organela responsável pela sua ativação. Em se tratando de *T. vaginalis*, após a entrada do fármaco (MTZ), o hidrogenossoma é a organela encarregada de reduzir o grupo nitro do composto, essa etapa é catalisada pela ação de enzimas presentes na organela, principalmente pela PFOR, ferredoxina e pela tiorredoxina redutase (TrxR), esse processo forma intermediários lábeis, os radicais nitro citotóxicos, que degradam as fitas de DNA, podendo reduzir a divisão celular e a motilidade, bem como ocasionar a morte dos trofozoítos (LEITSCH, 2016; PETRIN et al., 1998).

Em relação as abordagens terapêuticas empregadas, estas consistem na medicação por via oral ou, quando necessário, por via intravenosa, nas aplicações intravaginais, ou na combinação destas estratégias. Contudo, as doses não devem ser administradas de forma descomedida. De acordo com as diretrizes da OMS, primeiramente é recomendado uma dose única de MTZ, se a medicação for ineficaz, é indicado então o uso da dose única de TNZ ou o tratamento de 7 dias com o MTZ. É importante também, o tratamento de ambos parceiros sexuais afim de diminuir as chances de reinfecção e aumentar a taxa

de sucesso que vai de 88% para 95% com essa medida (MACIEL; TASCA; DE CARLI, 2004; MENEZES; FRASSON; TASCA, 2016; PETRIN et al., 1998).

Apesar destes tratamentos apresentarem resultados efetivos, não é incomum a constatação de falhas terapêuticas e estas se devem principalmente às altas taxas de reinfecção e a não-adesão ao tratamento disponível. Esse tratamento pode gerar ainda reações adversas e de hipersensibilidade, as quais contribuem para a má adesão aos medicamentos. A baixa absorção do fármaco ou inativação deste por bactérias da flora vaginal também pode ser problemática (KISSINGER, 2015; MENEZES; FRASSON; TASCA, 2016). Dentre os efeitos colaterais e reações de hipersensibilidade pode-se citar: vômitos, tontura, náusea, dor de cabeça, sonolência ou ainda febre, urticária, angioedema, rubor e choque anafilático em decorrência da reação de hipersensibilidade imediata (MENEZES; FRASSON; TASCA, 2016; NANDA et al., 2006; PETRIN et al., 1998). Adicionalmente, MTZ e TNZ são fármacos com estruturas químicas similares, por esse motivo indivíduos que apresentaram efeitos colaterais ou hipersensibilidade em consequência de um dos medicamentos, provavelmente irão apresentar o mesmo quadro se o outro for administrado (HELMS et al., 2008).

Somado a isso, outra problemática aparece de forma crescente, os isolados resistentes à 5-nitroimidazóis. Estima-se uma prevalência de 2,5 a 9,6% destes isolados resistentes ao MTZ e esta insensibilidade está associada, entre outros fatores, à resistência-cruzada com outros fármacos da mesma classe (GRAVES et al., 2020; MENEZES; FRASSON; TASCA, 2016). Essa resistência clínica ao fármaco parece estar relacionada ainda com a diminuição da eliminação de oxigênio pelo trofozoíto, possivelmente em decorrência da diminuição da expressão da enzima flavina-redutase 1, responsável pela redução de oxigênio a peróxido de hidrogênio, isso acaba aumentando a concentração deste elemento dentro da célula e esse fato possibilita o desenvolvimento de resistência aeróbica, a qual é encontrada principalmente em isolados clínicos (GRAVES et al., 2020; LEITSCH, 2016).

3.2.7 Alternativas de tratamento

Levando em consideração as adversidades citadas anteriormente, se faz necessária a descoberta de novas moléculas com atividade tricomonocida a fim de disponibilizar novas possibilidades de tratamento para tricomoníase, de forma que não se dependa de apenas uma classe de fármacos. Diversos estudos já foram conduzidos com esse objetivo e demonstraram resultados promissores, entre eles estão as avaliações da pentamicina (KRANZLER et al., 2015), do ácido bórico (BRITTINGHAM; WILSON, 2014) e da N-clorotaurina (FÜRNKRANZ et al., 2010). Desta forma, abordagens utilizando novos produtos sintéticos e seus derivados, bem como o redirecionamento de medicamentos já utilizados, sozinhos ou associados a estas novas moléculas, são bons caminhos na busca por alternativas de tratamento (LEITSCH, 2016).

Uma outra estratégia interessante é a utilização de produtos naturais, assim como moléculas derivadas destes, tendo em vista a sua gama de metabólitos secundários, os quais podem apresentar atividades contra doenças emergentes ou no caso da tricomoníase, doenças infecciosas (NGO; OKOGUN; FOLK, 2013). Além disso, dos 15 medicamentos antiparasitários aprovados pelas autoridades entre 1981 e 2006, 65% são produtos ou derivados naturais (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Em outro aspecto, estudos buscaram analisar a atividade de compostos sintéticos derivados ou análogos como por exemplo, quinolinas (SENA-LOPES et al., 2019) e chalconas, que chegaram a reduzir entre 12% e 95% da viabilidade de trofozoítos (DAS NEVES et al., 2020). Neste contexto que se pode citar as bibliotecas químicas de moléculas sintéticas, pois é possível utiliza-las na identificação de moléculas com efeitos terapêuticos, para assim auxiliar na síntese de novos compostos contendo modificações inspiradas em produtos naturais (DE BRUM VIEIRA et al., 2015; NEWMAN; CRAGG, 2016).

O tratamento ideal, além de apresentar praticamente nenhum efeito adverso, deveria contar com uma alta especificidade, não prejudicando as células do hospedeiro. Sendo assim, outra ferramenta explorada é o direcionamento dos estudos para compostos com atividade sobre proteínas específicas deste protozoário, principalmente aquelas envolvidas em

importantes processos biológicos destes parasitas, como: lactato desidrogenase (LDH), metionina gama-liase (MGL), tioredoxina redutase (TrxR) e purina nucleosídeo fosforilase (PNP) (SETZER et al., 2017).

A partir disso, os compostos sintéticos vêm se mostrando promissores pois muitos apresentam atividade biológica, incluindo atividade tricomonocida. Ademais, cerca de 30% dos medicamentos aprovados, utilizam moléculas sintéticas inspiradas em produtos naturais ou apresentam um farmacóforo desenvolvido a partir de compostos naturais (DE BRUM VIEIRA et al., 2015). Dentre os grupos previamente citados neste trabalho, estão as cumarinas, compostos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos, por já terem apresentado atividade antiparasitária (MEDINA et al., 2015).

3.3 Cumarinas

As cumarinas (2H-1-benzopirano-2-ona) consistem em uma grande classe de compostos heterocíclicos, além de serem substâncias fenólicas, encontradas nas plantas e formadas a partir de benzeno fundido a anéis α -pirona. Ademais, elas são amplamente distribuídas nas plantas e foram inicialmente encontradas na fava tonka ou cumaru (*Dipteryx odorata* selvagem) e nas últimas décadas vêm sendo amplamente estudadas para aplicações nas áreas bioquímicas e farmacêuticas, por exemplo (MEDINA et al., 2015; VENUGOPALA; RASHMI; ODHAV, 2013).

Ainda que distribuídas por todas as partes da planta, as cumarinas estão presentes em níveis mais elevados nos frutos e sementes, seguido pelas raízes e folhas, bem como látex da árvore de floresta tropical *Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide*, além de chá verde e outros alimentos como chicória. Elas também são encontradas em alguns óleos essenciais como, óleo de casca de canela e óleo de lavanda. Contudo, alterações ambientais e sazonais, podem influenciar a incidência destas substâncias em diversas partes da planta (VENUGOPALA; RASHMI; ODHAV, 2013).

A função das cumarinas em plantas ainda não foi totalmente elucidada, porém alguns estudos sugerem a influência destas nos reguladores de

crescimento de plantas, ação bacteriostáticas e fungistáticas e até mesmo produtos residuais (VENUGOPALA; RASHMI; ODHAV, 2013).

Somado a isso, o aumento do interesse científico nestas substâncias, se deu através do fato de estas tanto em sua forma natural, quanto na forma sintética (de seus derivados e análogos), apresentarem atividades farmacológicas, tais como: anti-HIV (KOSTOVA et al., 2006), antibacteriana (CHOUGALA et al., 2018), antifúngica (WANG et al., 2009), anti-inflamatória (UPADHYAY et al., 2011) e antitumoral (MA et al., 2019).

Em estudo recente, um composto derivado de cumarina (C2) demonstrou atividade antileishmania contra *Leishmania major*. Os parasitas tratados com C2 mostraram redução drástica na motilidade e no tamanho, além de perderem a capacidade de infectar macrófagos. Ademais, camundongos infectados com *L. major* tiveram melhora nas feridas causadas pela doença quando tratados com o composto (MANDLIK et al., 2016). Gupta et al. 2019 testaram a ação de compostos sintetizados a partir da fusão de um grupo carboidrato a 4-hidroxicumarina sobre a cepa 3D7 de *Plasmodium falciparum* e a maioria dos compostos inibiu o crescimento dos parasitas e uma das moléculas não apresentou citotoxicidade em células HepG2.

Aliado a isso, um estudo utilizando 4-hidroxicumarinas conjugadas a glioxal revelou o potencial anti-*T. vaginalis* dessas moléculas em ambas linhagens de células suscetíveis e resistentes a MTZ e estes compostos demonstraram ainda baixa citotoxicidade em células do epitélio vaginal (GUPTA et al., 2016).

Tendo em vista as possíveis aplicações farmacológicas e biológicas de compostos derivados de cumarinas, aliadas a necessidade constante de inovações para tratamentos de diversas enfermidades, estudos envolvendo essas substâncias podem agregar novos resultados para diferentes obstáculos presentes na área de desenvolvimento de novos fármacos, inclusive para o tratamento da tricomoníase. Por fim, considerando a escassez de trabalhos avaliando o potencial dessa classe química especificamente sobre *T. vaginalis* a execução de trabalhos nessa área se torna muito relevante.

4 Materiais e métodos

4.1 Síntese de cumarinas

Os compostos derivados de cumarinas (COU) foram sintetizados e cedidos para os experimentos pelo Dr. Marcus Vinícius Nora de Souza pesquisador do Instituto de Tecnologia em Fármacos - Far-Manguinhos, Fiocruz e do programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Para a síntese, foram utilizados compostos de metileno ativo e 2-hidroxibenzaldeídos ou resorcina e foi empregada a técnica de sonoquímica que se baseia no uso de irradiação ultrassônica (a uma frequência de 20 kHz com 90% da potência máxima de saída sem pulsação). Para a obtenção dos 11 compostos, COU 1 a 11 (Tabela 1), avaliados nesse estudo foram utilizados diferentes reagentes e protocolos de síntese brevemente descritos a seguir.

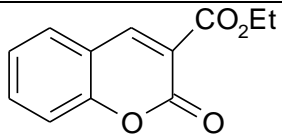
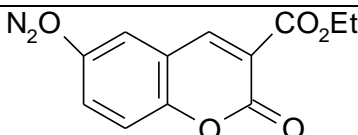
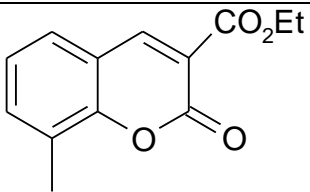
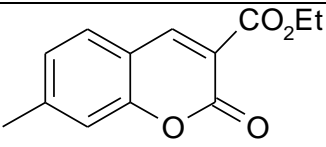
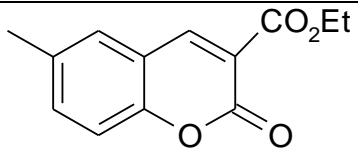
Para COU 1, a síntese foi realizada a partir de salicilaldeído (200 g, 1,6 mol), malonato de dietila (288 g, 1,8 mol) e etanol absoluto (500 mL). A esta mistura foram adicionados piperidina (21 mL, 0,2 mol) e ácido acético glacial (2,1 mL, 0,04 mol) e a irradiação ultrassônica foi aplicada por 40 min. Após lavagens, resfriamento e filtração o produto foi obtido (DA SILVEIRA PINTO; DE SOUZA, 2017).

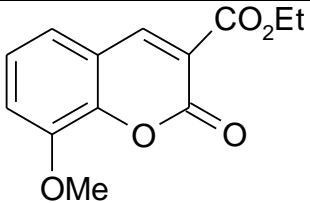
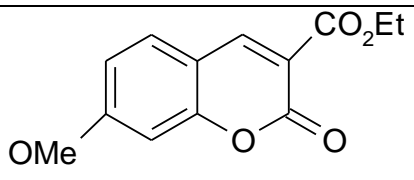
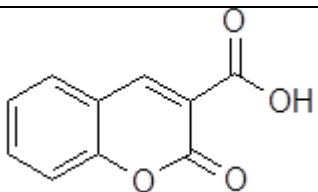
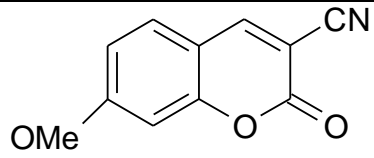
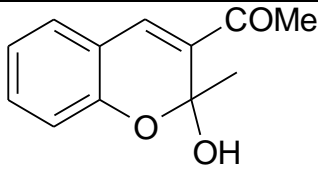
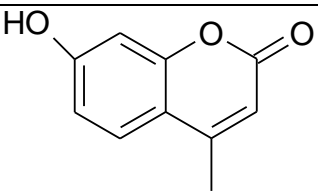
Já para os compostos COU 2-7 foram utilizados salicilaldeído (500 mg, 4,1 mmol) e malonato de dietila (722 mg, 4,51 mmol) em etanol absoluto (2 mL). Adicionou-se então piperidina (34,5 mg, 0,4 mmol) e uma quantidade catalítica de ácido acético glacial. A irradiação ultrassônica foi realizada por 5–30 min. Após lavagens, resfriamento e filtração os produtos foram obtidos. O composto COU 8 foi obtido utilizando 2 mL de H₂O, salicilaldeído (93,2 mg, 7,6 mol) e ácido de Meldrum (100 mg, 6,9 mol). A irradiação ultrassônica foi aplicada por 30 min e, então o composto foi filtrado e lavado para sua obtenção final (DA SILVEIRA PINTO; DE SOUZA, 2017).

Para síntese do composto COU 9 utilizou-se uma mistura de 4-metoxisalicilaldeído (500 mg, 3,3 mmol) e cianoacetato de etila (373 mg, 3,3 mmol) em etanol absoluto (2 mL) e então, a piperidina (34,5 mg, 0,4 mmol) foi irradiada com ultrassom (20 min). Após resfriamento e recristalização o

composto foi obtido. Para o composto COU 10 foram utilizados salicilaldeído (500 mg, 4,1 mmol), pentano-2,4-diona (451 mg, 4,5 mmol), etanol absoluto (2 mL), piperidina (34,5 mg, 0,4 mmol) e uma quantidade catalítica de ácido acético glacial foi irradiada com ultrassom por 5 min. Após remoção do solvente e cromatografia o composto foi obtido. Finalmente, para o composto COU 11, a síntese foi feita pela adição gota a gota de H₂SO₄ (70%, 4,5 mL) ao longo de 3 min a uma mistura agitada de resorcina (500 mg, 4,5 mmol) e acetoacetato de etila (582 mg, 4,5 mmol) em um banho de gelo. A irradiação ultrassônica foi aplicada por 2 min e após resfriamento, filtração e purificação por recristalização o composto foi obtido (DA SILVEIRA PINTO; DE SOUZA, 2017).

Tabela 1: Estrutura química dos compostos derivados de cumarinas

Código	Estrutura	Massa Molar
COU 1		218,20
COU 2		263,20
COU 3		232,23
COU 4		232,23
COU 5		232,23

COU 6		248,23
COU 7		248,23
COU 8		190,15
COU 9		201,18
COU 10		204,22
COU 11		176,17

4.2 Cultivo de *T. vaginalis*

O cultivo foi feito a partir de isolados de *Trichomonas vaginalis* 30236 da American Type Culture Collection (ATCC). Os trofozoítos foram cultivados axenicamente em meio tripticase-extrato de levedo-maltose (TYM) sem ágar, com pH 6,0, suplementado com 10% de soro bovino adulto estéril inativado por calor (56°C, 30 min) e incubados a 37°C. Foram ainda adicionados 3% de estreptomicina (5 mg/mL) a fim de evitar possíveis contaminações. (DIAMOND, 1957).

Para avaliar a viabilidade mínima de 95% dos trofozoítos para realização dos experimentos, foi utilizado o teste de exclusão por Azul de Tripán (0,4%) analisado por microscopia óptica, a qual foi utilizada ainda para análise da motilidade e morfologia dos parasitos (ALVES et al., 2020).

4.3 Ensaio Anti-*Trichomonas vaginalis*

Para análise do potencial antiparasitário, os compostos COU 1-11 foram testados contra *T. vaginalis* 30236. Todos os compostos foram diluídos em DMSO. Foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços, onde foram incubados trofozoítos a uma densidade inicial de $2,6 \times 10^5$ trofozoítos/mL em meio TYM. Em seguida, os compostos foram adicionados as placas nas concentrações finais de 100 μ M e 200 μ M, com o volume final representando no máximo 0,6% DMSO. Foram utilizados três controles, sendo um controle negativo, contendo apenas os trofozoítos vivos em meio TYM, um controle positivo, contendo metronidazol a 100 μ M e um controle contendo DMSO 0,6%, o qual foi o veículo de diluição dos compostos. As placas foram incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ por 24 h. Após este período, foi realizada a contagem dos trofozoítos com corante Azul de Tripán (0,4%) (1:1, v / v) em câmara de Neubauer, bem como análise de motilidade e morfologia dos trofozoítos.

4.4 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 9.0, utilizando a análise unidirecional de variância (One-Way ANOVA), com valor de probabilidade $p < 0,05$, para os ensaios de rastreamento farmacológico. Realizou-se ainda o pós-teste de Tukey para identificar as diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos.

5 Resultados

5.1 Ensaio Anti-*T. vaginalis*

Nos resultados obtidos a partir da utilização dos compostos a 100 μM , os tratamentos que mais diminuíram a viabilidade de trofozoítos foram COU 4 e COU 7 com redução de 16,98% e 23,77% de protozoários, respectivamente. Já os trofozoítos tratados com os compostos COU 1, COU 2, COU 3, COU 5, COU 9 e COU 10 apresentaram 94,33%, 87,39%, 99,28%, 90,52%, 99,64% e 94,49% de viabilidade pós-tratamentos, respectivamente. Finalmente, os compostos COU 6, COU 8 e COU 11 não acarretaram diminuição da viabilidade dos trofozoítos (Figura 1).

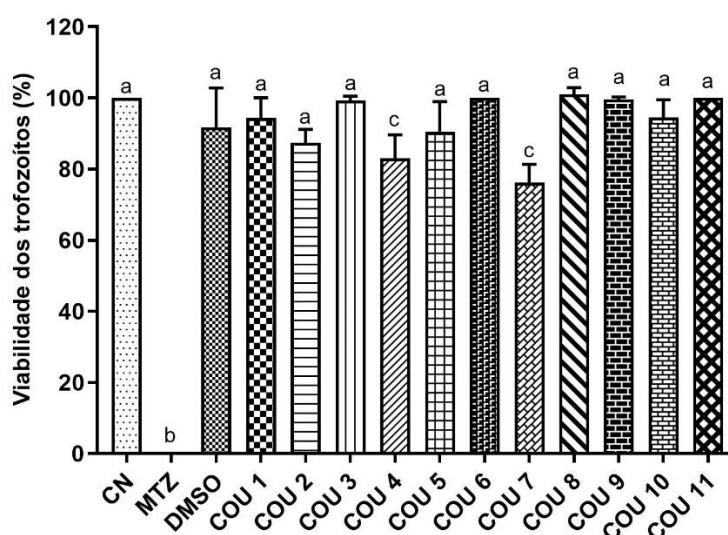


Figura 1: Viabilidade dos trofozoítos após 24 h de incubação com compostos derivados de cumarinas (COU) na concentração de 100 μM . CN: Controle negativo; MTZ: Controle positivo (Metronidazol 100 μM); DMSO: Controle veículo (DMSO 0,6%). Os dados correspondem a média \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes em triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa considerando $p < 0,05$.

Quando avaliada a atividade destes compostos na concentração de 200 μM , os resultados foram parcialmente alterados, contudo não foi demonstrada ação antiparasitária satisfatória destes, mesmo em uma concentração mais alta. Os compostos que mais reduziram a viabilidade dos trofozoítos foram: COU 1, COU 4, COU 7 e COU 9, sendo essa redução de 12,13%, 12,51%, 17,51% e 17,84% da viabilidade, respectivamente. Os tratamentos com os

compostos COU 3, COU 5, COU 6, COU 8, COU 10 e COU 11 resultaram em porcentagens superiores a 90% de viabilidade dos trofozoítos (Figura 2).

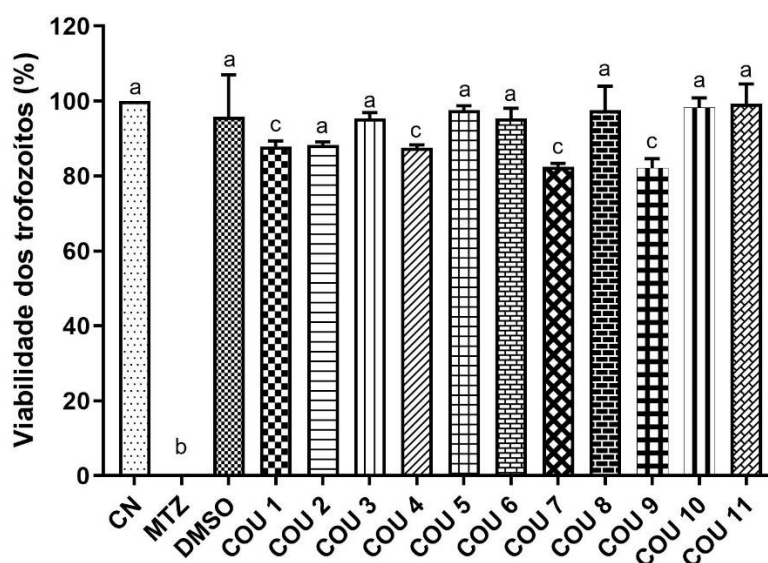


Figura 2: Viabilidade dos trofozoítos após 24 h de incubação com compostos derivados de cumarinas na concentração de 200 μ M. CN: Controle negativo; MTZ: Controle positivo (Metronidazol 100 μ M); DMSO: Controle veículo (DMSO 0,6%). Os dados correspondem a média \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes em triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa considerando $p < 0,05$.

Ambos os gráficos demonstraram que não houve diferenças estatísticas ao compararmos o controle veículo com o controle negativo, comprovando que o veículo de diluição (DMSO 0,6%) não interferiu nos resultados gerados. Ademais, o controle positivo (MTZ) reduziu 100% a viabilidade de trofozoítos, fato que permite validar os controles e os testes analisados. Os grupos que apresentaram diferenças significativas em comparação ao controle negativo foram devidamente identificados.

Dos 11 compostos testados, nenhum apresentou diferença estatística significativa quando comparado ao controle negativo. Apesar de alguns compostos terem reduzido a viabilidade dos trofozoítos a ponto de se diferenciarem do controle negativo essa redução não pode ser considerada expressiva, principalmente quando comparado ao controle positivo.

6 Discussão

As abordagens terapêuticas utilizadas para o tratamento de tricomoníase empregadas até os dias de hoje, possuem boas taxas de cura, contudo o aumento de cepas de *T. vaginalis* resistentes em conjunto com a grande lista de efeitos adversos provocados por estes medicamentos, aumentam cada dia mais a necessidade da busca por novas estratégias de tratamento e fármacos mais eficientes. A importância se torna ainda maior por se tratar da IST não-viral mais frequente mundialmente, com crescente aumento de casos em concomitância com a diminuição do interesse das agências de saúde para o rastreamento atualizado desta infecção (MENEZES; FRASSON; TASCA, 2016; VAN GERWEN; MUZNY, 2019).

Neste contexto, compostos sintéticos que se baseiam em farmacóforos de substâncias encontradas na natureza e que possuem atividades biológicas descritas, como no caso de cumarinas, se mostram muito interessantes. Compostos híbridos de ferrocenil cumarina-oxazina demonstraram atividade antiparasitária sobre as cepas 3D7 de *Plasmodium falciparum* e/ou 427 de *Trypanosoma brucei*, dentre estes um composto derivado de cumarina-oxazina anulado por benzeno apresentou IC₅₀ de 1,0 µM contra a cepa de *P. falciparum*, já um composto pertencente às α-aminohidroxycumarinas apresentou IC₅₀ = 1,7 µM (3D7) e 9,4 µM (427) (MBABA et al., 2021), demonstrando o potencial de compostos sintéticos contendo o núcleo das cumarinas.

Gupta et al. (2016) obtiveram resultados promissores para híbridos de cumarina-glioxal, dos 18 compostos com atividade anti-*T. vaginalis*, 5 mostraram excelente atividade tanto em cepas sensíveis como em cepas resistentes ao MTZ. Dentre estes, 2 compostos obtiveram IC₅₀ de 0,0140mM e 0,0136mM, no caso da cepa suscetível ao metronidazol e 0,1122 mM e 0,1091 mM no caso de cepas resistentes ao MTZ, resultados similares ou melhores que o próprio MTZ (0,0189 mM para cepas susceptíveis e 0,365 mM para cepas resistentes).

Esses estudos são indicativos de que as cumarinas podem ser inseridas como boas opções para o rastreamento de novas abordagens de tratamento para tricomoníase, pois além de serem componentes abundantes na natureza, a obtenção de análogos e derivados destas substâncias através de síntese química já é bem estabelecida, assim como seus potenciais farmacológicos (DA SILVEIRA PINTO; DE SOUZA, 2017).

Apesar do potencial da classe das cumarinas previamente citado, os compostos testados nesse trabalho não se mostraram efetivos em nenhuma das concentrações analisadas. Estes resultados, contudo, não descaracterizam essa classe como uma boa opção para novos testes farmacológicos. Diferentes metodologias de síntese química já bem estabelecidas podem ser empregadas para o desenvolvimento de novos derivados de cumarinas que podem vir a ser ativos contra *Trichomonas vaginalis*.

Adicionalmente, o design de núcleos híbridos de cumarinas com os de outras moléculas com atividades biológicas já avaliadas, como por exemplo o imidazol, também se mostrou eficiente e apresentou resultados significativos. Estudos já descreveram a atividade antibacteriana de híbridos de cumarina com imidazol (HU et al., 2018) e com os compostos triazol e pirazol, no qual os testes demonstraram o bloqueio no crescimento de bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (FENG et al., 2020). Outro exemplo é o desenvolvimento de híbridos de cumarinas e chalconas, os quais apresentaram potencial antimalárico em *Plasmodium falciparum* com valores de IC₅₀ na faixa de 1,60 e 13,03 µM e ainda apresentaram atividade antitumoral (PINGAEW et al., 2014).

A partir disto, novos compostos sintéticos derivados de cumarinas devem ser analisados. Tendo em vista os estudos demonstrando que esta classe de compostos, seja com seu núcleo simples ou como híbridos, já apresentaram atividade antiparasitária. A síntese química utilizando novos radicais ou farmacóforos híbridos com classes de moléculas que também possuam potencial farmacológico são metodologias a serem aplicadas. Um estudo utilizando derivados de cumarinas com radicais fenil demonstrou atividade antileishmania sobre isolados de *Leishmania donovani* na forma amastigota com valores de IC₅₀ que variam entre 5,4 e 1,1 µM, resultados

interessantes quando se considera que assim como *T. vaginalis*, *L. donovani* também são protozoários (PIERSON et al., 2010). Por isso, estudos envolvendo estas abordagens podem gerar resultados mais assertivos em relação ao desenvolvimento de novos tratamentos para tricomoníase ou ainda, para outras parasitoses.

Por fim, a avaliação de compostos derivados de cumarinas para o tratamento da tricomoníase ainda não deve ser totalmente excluída, principalmente considerando que já foram descritos compostos derivados com atividade tricomonocida (GUPTA et al., 2016). Além disso, se considerada a quase inexistência de trabalhos analisando a extensa gama de derivados que podem ser, ou já foram sintetizados, a partir dessa classe química, essas moléculas ainda possuem grande potencial para pesquisas com o objetivo de avaliar atividades farmacológicas, mais especificamente a atividade tricomonocida.

7 Conclusão

Baseado nos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que os compostos derivados de cumarinas escolhidos para avaliação de atividade tricomonocida, não apresentaram resultados satisfatórios, pois não reduziram a viabilidade dos trofozoítos o suficiente em comparação com o controle positivo, que é o medicamento de uso comercial atualmente, para serem utilizados em pesquisas futuras.

Contudo, outros derivados dessa classe química devem ser investigados, a síntese de cumarinas com novos radicais ou com farmacóforos híbridos ou até mesmo a sua associação a outros fármacos podem ser abordagens para melhor elucidação desta classe de compostos, tornando possível sua utilização no desenvolvimento de um novo tratamento para tricomoníase.

8 Referências

ADAMSON, P. C.; LOEFFELHOLZ, M. J.; KLAUSNER, J. D. Point-of-care testing for sexually transmitted infections a review of recent developments. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, 2020.

ALVES, M. J. et al. Epidemiologia de *Trichomonas vaginalis* em mulheres. **Revista Portuguesa de Saude Publica**, 2011.

ALVES, M. S. D. et al. Antiparasitic activity of furanyl N-acylhydrazone derivatives against *Trichomonas vaginalis*: In vitro and in silico analyses. **Parasites and Vectors**, 2020.

AMBROZIO, C. L. et al. *Trichomonas vaginalis* prevalence and risk factors for women in southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, 2016.

BOUCHEMAL, K.; BORIES, C.; LOISEAU, P. M. Strategies for prevention and treatment of *Trichomonas vaginalis* infections. **Clinical Microbiology Reviews**. American Society for Microbiology, 2017.

BRITTINGHAM, A.; WILSON, W. A. The antimicrobial effect of boric acid on *trichomonas vaginalis*. **Sexually Transmitted Diseases**, 2014.

BRUNI, M. P. et al. Aptima *Trichomonas vaginalis* assay elucidates significant underdiagnosis of trichomoniasis among women in Brazil according to an observational study. **Sexually Transmitted Infections**, 2019.

CARAPINA DA SILVA, C. et al. Antiparasitic activity of synthetic curcumin monocarbonyl analogues against *Trichomonas vaginalis*. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2019.

CHERPES, T. L. et al. The associations between pelvic inflammatory disease, *Trichomonas vaginalis* infection, and positive herpes simplex virus type 2 serology. **Sexually Transmitted Diseases**, 2006.

CHOUGALA, B. M. et al. Green, unexpected synthesis of bis-coumarin derivatives as potent anti-bacterial and anti-inflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2018.

CUDMORE, S. L. et al. Treatment of Infections Caused by Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis*. **Clinical Microbiology Reviews**, 2004.

DA SILVEIRA PINTO, L. S.; DE SOUZA, M. V. N. Sonochemistry as a General Procedure for the Synthesis of Coumarins, Including Multigram Synthesis. **Synthesis (Germany)**, 2017.

DAS NEVES, R. N. et al. 2'-Hydroxychalcones as an alternative treatment for trichomoniasis in association with metronidazole. **Parasitology Research**, 2020.

DE BRUM VIEIRA, P. et al. Natural and synthetic compound anti-*Trichomonas vaginalis*: an update review. **Parasitology Research**. Springer Verlag, 2015.

DIAMOND, L. S. The Establishment of Various Trichomonads of Animals and Man in Axenic Cultures. **The Journal of Parasitology**, 1957.

DOMEIKA, M. et al. Guidelines for the laboratory diagnosis of trichomoniasis in East European countries. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, 2010.

EDWARDS, T. et al. *Trichomonas vaginalis*: Clinical relevance, pathogenicity and diagnosis. **Critical Reviews in Microbiology**, 2014.

FENG, D. et al. Coumarin-containing hybrids and their antibacterial activities. **Archiv der Pharmazie**. Wiley-VCH Verlag, 2020.

FÜRNKRANZ, U. et al. In vitro activity of N-chlorotaurine (NCT) in combination with NH₄Cl against *Trichomonas vaginalis*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2010.

GAYDOS, C. A. et al. Rapid and point-of-care tests for the diagnosis of *Trichomonas vaginalis* in women and men. **BMJ**, 2017.

GRAVES, K. J. et al. A systematic review of the literature on mechanisms of 5-nitroimidazole resistance in *Trichomonas vaginalis*. **Parasitology**, 2020.

GUENTHNER, P. C.; SECOR, W. E.; DEZZUTTI, C. S. *Trichomonas vaginalis*-induced epithelial monolayer disruption and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication: Implications for the sexual transmission of HIV-1.

Infection and Immunity, 2005.

GUPTA, S. et al. Design and synthesis of coumarin-glyoxal hybrids for spermicidal and antimicrobial actions: A dual approach to contraception. **RSC Advances**, 2016.

HELMS, D. J. et al. Management of *Trichomonas vaginalis* in women with suspected metronidazole hypersensitivity. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, 2008.

HERNÁNDEZ, H. M.; MARCET, R.; SARRACENT, J. Biological roles of cysteine proteinases in the pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. **Parasite**, 2014.

HU, Y. et al. Synthesis and biological evaluation of coumarin derivatives containing imidazole skeleton as potential antibacterial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**,. 2018.

KISSINGER, P. *Trichomonas vaginalis*: A review of epidemiologic, clinical and treatment issues. **BMC Infectious Diseases**, 2015.

KOSTOVA, I. et al. Structure-activity relationships of synthetic coumarins as HIV-1 inhibitors. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, 2006.

KRANZLER, M. et al. Pentamycin shows high efficacy against *Trichomonas vaginalis*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2015.

LEITSCH, D. Recent Advances in the *Trichomonas vaginalis* Field. **F1000Research**, 2016.

MA, J. et al. Design, Synthesis, Biological Activity and Molecular Docking Study of Coumarin Derivatives Bearing 2-Methylbiphenyl Moiety. **Chemical Research in Chinese Universities**, 2019.

MACIEL, G. DE P.; TASCA, T.; DE CARLI, G. A. Aspectos clínicos, patogênese e diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 2004.

MALLO, N.; LAMAS, J.; LEIRO, J. M. Hydrogenosome metabolism is the key target for antiparasitic activity of resveratrol against *trichomonas vaginalis*.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2013.

MANDLIK, V. et al. Biological activity of coumarin derivatives as anti-leishmanial agents. **PLoS ONE**, 2016.

MARITZ, J. M. et al. What is the importance of zoonotic trichomonads for human health?. **Trends in Parasitology. Elsevier Ltd**, 2014.

MBABA, M. et al. Coumarin-Annulated Ferrocenyl 1,3-Oxazine Derivatives Possessing In Vitro Antimalarial and Antitrypanosomal Potency. **Molecules (Basel, Switzerland)**, 2021.

MEDINA, F. G. et al. Coumarin heterocyclic derivatives: Chemical synthesis and biological activity. **Natural Product Reports**, 2015.

MEITES, E. et al. A Review of Evidence-Based Care of Symptomatic Trichomoniasis and Asymptomatic *Trichomonas vaginalis* Infections. **Clinical Infectious Diseases**, 2015.

MENEZES, C. B.; FRASSON, A. P.; TASCA, T. Trichomoniasis – are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide? **Microbial Cell**, 2016.

MOON, H. I. et al. Antiplasmodial and cytotoxic activity of coumarin derivatives from dried roots of *Angelica gigas* Nakai in vitro. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, 2011.

NANDA, N. et al. Trichomoniasis and its treatment. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, 2006.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**. 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, 2016.

NGO, L. T.; OKOGUN, J. I.; FOLK, W. R. 21st Century natural product research and drug development and traditional medicines. **Natural Product Reports**, 2013.

PATIL, A. D. et al. The Inophyllums, Novel Inhibitors of HIV-1 Reverse

Transcriptase Isolated from the Malaysian Tree, *Calophyllum inophyllum* Linn. **Journal of Medicinal Chemistry**, 1993.

PETRIN, D. et al. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. **Clinical Microbiology Reviews**, 1998.

PIERSON, J. T. et al. Synthesis and antiprotozoal activity of 4-arylcoumarins. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2010.

PINGAEW, R. et al. Synthesis, biological evaluation and molecular docking of novel chalcone-coumarin hybrids as anticancer and antimalarial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2014.

POOLE, D. N.; MCCLELLAND, R. S. Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. **Sexually Transmitted Infections**, 2013.

SENA-LOPES, Â. et al. Quinolines-1,2,3-triazolyloxycarboxamides exhibits antiparasitic activity in *Trichomonas vaginalis*. **Biotechnology Research and Innovation**, 2019.

SETZER, M. S. et al. Natural products as new treatment options for trichomoniasis: A molecular docking investigation. **Scientia Pharmaceutica**, 2017.

SUTCLIFFE, S. et al. Trichomonosis, a Common Curable STI, and Prostate Carcinogenesis-A Proposed Molecular Mechanism. **PLoS Pathogens**, 2012.

UPADHYAY, K. et al. Synthesis and biological evaluation of 4-styrylcoumarin derivatives as inhibitors of TNF- α and IL-6 with anti-tubercular activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 2011.

VAN DER POL, B. et al. *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. **Journal of Infectious Diseases**, 2008.

VAN GERWEN, O. T.; MUZNY, C. A. Recent advances in the epidemiology, diagnosis, and management of *Trichomonas vaginalis* infection. **F1000 Research**, 2019.

VENUGOPALA, K. N.; RASHMI, V.; ODHAV, B. Review on natural coumarin

lead compounds for their pharmacological activity. **BioMed Research International**, 2013.

WANG, C. M. et al. Efficacy of osthol, a potent coumarin compound, in controlling powdery mildew caused by *Sphaerotheca fuliginea*. **Journal of Asian Natural Products Research**, 2009.

WHO. **Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections - 2008**, 2012.

WHO. **Report on global sexually transmitted infection surveillance**, 2018.

WORKOWSKI, K. A.; BOLAN, G. A. **Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines**, 2015.

YADAV, M.; GUPTA, I.; MALLA, N. Kinetics of immunoglobulin G , M , A and IgG subclass responses in experimental intravaginal trichomoniasis: prominence of IgG1 response. **Parasite Immunology**, 2005.

YANG, M. et al. Co-infection with *trichomonas vaginalis* increases the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2-3 among HPV16 positive female: A large population-based study. **BMC Infectious Diseases**, 2020.