

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 13/11/2025

Lígia Rodrigues e Oliveira



LAQ

Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos

**Hidroxichalconas Bioativas contra *Trichomonas vaginalis*: Planejamento,
Síntese, Avaliação Farmacológica e Ancoragem Molecular**

São José do Rio Preto

2023

Lígia Rodrigues e Oliveira

**Hidroxichalconas Bioativas contra *Trichomonas vaginalis*: Planejamento,
Síntese, Avaliação Farmacológica e Ancoragem Molecular**

Tese de Doutorado realizada no Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos e apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Química.

Financiadora: Capes (2019-2020)

Orientador: Prof. Dr. Luis Octavio Regasini

Coorientadora: Profa. Dra. Tiana Tasca

São José do Rio Preto

2023

O48h Oliveira, Lígia Rodrigues e
Hidroxichalconas bioativas contra *Trichomonas vaginalis*: : Planejamento, Síntese,
Avaliação Farmacológica e Ancoragem Molecular / Lígia Rodrigues e Oliveira. -- São
José do Rio Preto, 2023
367 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências
Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto
Orientador: Luis Octavio Regasini
Coorientadora: Tiana Tasca

1. Química Farmacêutica. 2. Chalconas. 3. Antiparasitárias. 4. *Trichomonas*
vaginalis. 5. Modelagem Molecular. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências
Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Lígia Rodrigues e Oliveira

**Hidroxichalconas Bioativas contra *Trichomonas vaginalis*: Planejamento,
Síntese, Avaliação Farmacológica e Ancoragem Molecular**

Tese de Doutorado realizada no Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos e apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Química.

Financiadora: Capes (2019-2020)

Prof. Dr. Luis Octavio Regasini

UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Orientador

Profa. Dra. Tiana Tasca

UFRGS - Faculdade de Farmácia e Centro de Biotecnologia

Coorientadora

Isabele Rodrigues Nascimento

UNESP - Câmpus de Araraquara

Gustavo Henrique Goulart Trossini

USP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Carolina Horta Andrade

UFG - Faculdade de Farmácia

Nelilma Romeiro

UFRJ - Centro Multidisciplinar (Macaé)

São José do Rio Preto

13 de Novembro de 2023

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a **Deus** pela minha vida, por poder estar aqui, pela vida de toda minha família, dos meus amigos, pela vida de todos que estão intimamente ou indiretamente relacionados com esse trabalho, mesmo com as circunstâncias da pandemia.
- Ao meu orientador Prof. Dr. **Luis Octavio Regasini**, por ter sempre estimulado meu crescimento por logo dos seis anos, desde o mestrado, me ajudando a me tornar a minha melhor versão de pesquisadora, professora e pessoa, não permitindo que eu desistisse do sonho de fazer doutorado em química.
- Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (**IBILCE**), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), Pró-Reitoria de Pesquisa da Unesp (**PROPe-Unesp**) e a Pró-Reitoria de Pós Graduação (**PROPG-Unesp**).
- O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.
- À minha querida coorientadora Prof. Dra. **Tiana Tasca** pelo carinho, apoio e correção nos artigos, sempre aberta a perguntas e à disposição para responde-las, juntamente à Dra. **Graziela Vargas Rigo** e à Ms. **Fernanda Gomes Cardoso**, por todo o suporte e apoio na realização dos ensaios biológicos.
- À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (**UFRGS**), especificamente, à Faculdade de Farmácia e Centro de Biotecnologia (**FACFAR - CBiot**), ao Laboratório de Parasitologia, Grupo de Pesquisa em *Trichomonas* (**GPTrico**).
- Aos discentes **Leonardo P. M. Simões** e Ms. **Victor S. Batista** do **LaQMedSOMM**, orientados pelo Prof. **Nailton Monteiro do Nascimento Júnior** nas contribuições com a parte computacional, enriquecendo esse trabalho.
- Aos técnicos Dr. **Fábio Moraes** (IBILCE) e Dr. **Nivaldo Boralle** (IQ UNESP – Araraquara) pela realização dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono e pelo cuidado com as amostras sempre que necessário.
- Aos meus colegas do **Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos (LAQ)** que já me ajudaram no laboratório, Dra. **Julyanna Andrade**, Dra. **Letícia Ribeiro**, Ms. **Maria Beatriz Costa**, Ms. **Reinaldo Theodoro** e Ms. **Vinícius Pianta**. Ao Dr. **Miguel Divino da Rocha**, desde o começo pela paciência, auxílio e atenção nas horas mais desafiadoras.

- Agradeço, especialmente, aos meus primeiros parceiros de rodízio durante a pandemia, meus amigos do LAQ: Ms. **Dinis Kandjamba**, Ms. **Giovana Martinez**, Ms. **Graciele Moraes** e Ms. **Rodrigo Lemos**, agradeço pela assistência nos ensaios de seminário, pela amizade e pelos momentos de descontração no laboratório.
- À minha mãe, **Jurema Rodrigues**, por todo o amor, carinho e apoio aos estudos, desde sempre investiu na minha formação profissional e pessoal.
- Às minhas queridas avós materna e paterna **Isméria Paulina de Souza** e **Alice Clementina de Oliveira**, respectivamente, por sempre terem me incentivado a ser forte intuitiva e preparada para enfrentar as dificuldades, tendo fé e coragem.
- Aos meus queridos: **Bernadete de Oliveira**, **Jussara Rodrigues**, **Nirlei Soares**, **Maria Auxiliadora Brasil**, **Ozeas Vieira Senna** e **Maria de Paula** pela torcida deles e carinho a todo momento.
- Aos meus amigos de longa data, sempre me apoiando e torcendo: **Larissa Franzin**, **José Eduardo Sbroggio**, **Dalila Braga**, **Jéssica Rodrigues**, **Jéssica Pagliusi**, **Paola Lauana Rui**, **Jaqueline Valverde**, **Juliana Valverde** e **Letícia Machado**.
- Ao grupo de oração **GOU – Unidos no Espírito** que frequentei e ao Ministério Universidades Renovadas de São Paulo (**MUR**) - Renovação Carismática Católica (**RCC**).
- Ao **Denis Rafael Vieira** que tive a sorte de conhecer ainda esse ano, pelo carinho, pelos ouvidos e conselhos nessa reta final e por estar junto comigo.

*Que bom viver, como é bom sonhar
E o que ficou pra trás passou e eu não me importei
Foi até melhor, tive que pensar em algo novo que fizesse sentido*

*Ainda vejo o mundo com os olhos de criança
Que só quer brincar e não tanta responsa
Mas a vida cobra sério e realmente não dá pra fugir*

*Livre pra poder sorrir, sim
Livre pra poder buscar o meu lugar ao sol*

Lugar ao Sol - Charlie Brown Jr

RESUMO

A tricomoníase é considerada a Infecção Sexualmente Transmissível (IST) não-viral mais comum no mundo pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Os dados epidemiológicos estimados pela OMS justificam a urgência de novas alternativas para o tratamento da IST e combate ao *Trichomonas vaginalis*. Embora o tratamento mais recomendado seja pela administração *via* oral do fármaco metronidazol (MTZ), este apresenta diversos problemas incluindo mecanismos de resistência e toxicidade. O objetivo do presente trabalho foi a síntese de hidroxichalconas, sua avaliação contra trofozoítos isolados de *T. vaginalis* sensíveis ao MTZ, sendo determinado o valor de concentração capaz de inibir 50% do crescimento (CI₅₀) do parasita, sua avaliação citotóxica em células vaginais, sendo determinado o valor de concentração letal de 50% das células (CL₅₀), e a ancoragem molecular *in silico* na enzima do parasito purina nucleosideo fosforilase (TvPNP). As chalconas foram sintetizadas por meio da condensação aldólica de Claisen-Schmidt em catálise básica. A 4'-hidroxichalcona (**4HC**) foi a mais ativa na primeira quimioteca de 21 chalconas testadas e não-citotóxica contra eritrócitos humanos e larvas de *Galleria mellonella*. Os experimentos de qRT-PCR indicaram que **4HC** não afetou a expressão gênica da piruvato:ferredoxina oxirredutase (PFOR) e β -tubulina. A simulação *in silico* utilizando a enzima TvPNP corroborou para a **4HC** ser considerada como ligante promissora. Na segunda quimioteca de 56 chalconas testadas, quatro se destacaram por apresentar os menores valores de CI₅₀ variando de 11,5 a 15,0 μ M: 2'-hidroxichalcona **29** (anel B = 3-piridila) e as 3'-hidroxichalconas **34** (anel B = 2,6-diclorofenila), **41** (anel B = 4-nitrofenila) e **43** (anel B = 4-piridila). Nos ensaios de citotoxicidade das mais ativas, a 2'-hidroxichalcona **29** não foi tóxica contra células vaginais (linhagem HMVII) e nem contra fibroblastos de pulmão (linhagem MRC-5), obtendo o valor de CL₅₀ > 100 μ M e, portanto, o maior índice de seletividade. A ancoragem molecular mostrou que as chalconas **29**, **34**, **41** e **43** podem ser consideradas como ligantes promissoras da enzima TvPNP, indicando essa enzima como importante chave no mecanismo de ação das hidroxichalconas. Todos os resultados evidenciam a capacidade de hidroxichalconas serem consideradas agentes no tratamento da tricomoníase.

Palavras-chave: *Trichomonas vaginalis*; tricomoníase, antiparasitária, IST, chalconas fenólicas; ancoragem molecular;

ABSTRACT

Trichomoniasis is considered by the World Health Organization (WHO) as the most common non-viral Sexually Transmitted Infection (STI). The WHO estimated epidemiological data justifies the urgency to research new treatment alternatives for trichomoniasis and combat *Trichomonas vaginalis*. Although the most recommended treatment is the oral administration of metronidazole (MTZ), there are several problems including resistance mechanisms and toxicity. The aim of present work was the synthesis of hydroxychalcones, its evaluation against isolated trophozoites of *Trichomonas vaginalis* susceptible to MTZ, the concentration capable of inhibiting 50% of the parasite's growth (IC₅₀) was determined, the cytotoxic evaluation was carried out on vaginal cells and the lethal concentration of 50% of the cells (CL₅₀) was determined, and the *in silico* molecular docking in parasite enzyme purine nucleoside phosphorylase (TvPNP). The chalcones were synthesized by Claisen-Schmidt aldol condensation in basic catalysis. Chalcone **4HC** were the most active in the first chem library of 21 tested chalcones and not cytotoxic against human erythrocytes and *Galleria mellonella* larvae. The qRT-PCR experiments indicated that **4HC** did not affect the gene expression of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (PFOR) and β -tubulin. The *in silico* simulation using TvPNP enzyme corroborated **4HC** as a promising ligand. In the second chem library of 56 tested chalcones, four stood out for having the lowest IC₅₀ values, ranging from 11.5 to 15.0 μ M: 2'-hydroxychalcone **29** (ring B = 3-pyridyl) and 3'-hydroxychalcones **34** (ring B = 2,6-dichlorophenyl), **41** (ring B = 4-nitrophenyl) and **43** (ring B = 4-pyridyl). In the cytotoxicity assays of the most active chalcones, 2'-hydroxychalcone **29** was not toxic against vaginal cells (HMOVII lineage) neither against lung fibroblasts (MRC-5 lineage), displaying CC₅₀ > 100 μ M, and, therefore, the highest selectivity index. Molecular docking showed that chalcones **29**, **34**, **41** and **43** can be considered as promising ligands of enzyme TvPNP, indicating this enzyme as important key in mode of action of hydroxychalcones. All results highlight the ability of hydroxychalcones to be considered agents in the treatment of trichomoniasis.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*; trichomoniasis; antiparasitic; IST; phenolic chalcones; molecular docking;

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1. Estrutura celular de <i>Trichomonas vaginalis</i>	24
Figura 2. Formas endoflagelares de <i>Trichomonas vaginalis</i>	25
Figura 3. Estrutura do metronidazol (MTZ).....	30
Figura 4. Estrutura cristalográfica (código 4JNQ) homóloga à TvTXR.	35
Figura 5. Estrutura cristalográfica da TvLDH (código 4UUN)	36
Figura 6. Estrutura cristalográfica da TvMGL (código 1E5F).	37
Figura 7. Estrutura cristalográfica da TvPNP (código 1Z36).	39
Figura 8. Nitrocompostos ativos em <i>T. vaginalis</i>	40
Figura 9. Aminas ativas em <i>T. vaginalis</i>	41
Figura 10. Produtos Naturais e semissintéticos ativos em <i>T. vaginalis</i>	43
Figura 11. Núcleo chalcônico.....	43
Figura 12. Chalconas ativas em <i>T. vaginalis</i>	45
Figura 13. Árvore de Decisão de Topliss (TOPLISS, 1972).	46
Figura 14. 2'-Hidroxichalconas planejadas pelo método de Topliss ativas contra <i>T. vaginalis</i> (OLIVEIRA, 2017).	48
Figura 15. Hidroxichalconas ativas contra <i>T. vaginalis</i> planejadas utilizando a estratégia de bioisosterismo (OLIVEIRA, 2017).	50
Figura 16. Modelo bidimensional (2D) da ancoragem da chalcona 37 com a TvPNP.	52
Figura 17. Modelo tridimensional e Possíveis Ligantes da TvPNP (SETZER et al., 2017). ..	53
Figura 18. Modelos tridimensionais e bidimensionais do estudo de ancoragem molecular realizado por NEVES e coautores (2020).	54

Capítulo II

Figure 1. Design of chalcones of series I and II	78
Figure 2. Synthesis of chalcones	79
Figure 3. Reactive oxygen species accumulation in <i>Trichomonas vaginalis</i> trophozoites treated with compound 4HC	83
Figure 4. Reactive oxygen species accumulation in neutrophils co-incubated with <i>Trichomonas vaginalis</i> after treatment with compound 4HC . N : neutrophils; Tv : <i>Trichomonas vaginalis</i> . Trophozoites were treated with compound 4HC at its IC ₅₀ value (27.5 µM) and at 100 µM, as described in Material and Methods section. Hydrogen peroxide (5.0 mM) was used as positive control and induced 3154.2 ± 445.3 fluorescence units. Letter a : significant reduction compared to N (neutrophils only) (<i>p</i> < 0.05). Letter b : significant increase compared to N + Tv (<i>p</i> < 0.05).	84
Figure 5. Relative gene expression of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (<i>PFOR</i>) and β -tubulin of <i>Trichomonas vaginalis</i> trophozoites treated with compound 4HC . Results are expressed in bars and values are based on the standardized control 2 ^{-ΔΔCt} value of 1.0; <i>DNaTopII</i> was used as reference gene.	85
Figure 6. Binding mode of formycin A and compound 4HC in catalytic site of purine nucleoside phosphorylase of <i>Trichomonas vaginalis</i> (PDB ID 1Z36).	86

Figure S1. ^1H NMR spectrum of compound 1 (400 MHz; CDCl_3)	88
Figure S2. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 1 (400 MHz; CDCl_3)	88
Figure S3. ^{13}C NMR spectrum of compound 1 (100 MHz, CDCl_3)	89
Figure S4. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 1 (100 MHz, CDCl_3)	89
Figure S5. Mass spectra of compound 1	90
Figure S6. ^1H NMR spectrum of compound 2 (400 MHz, CDCl_3)	91
Figure S7. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 2 (400 MHz; CDCl_3)	91
Figure S8. ^{13}C NMR spectrum of compound 2 (100 MHz, CDCl_3)	92
Figure S9. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 2 (100 MHz, CDCl_3)	92
Figure S10. Mass spectra of compound 2	93
Figure S11. ^1H NMR spectrum of compound 3 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	94
Figure S12. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 3 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	94
Figure S13. ^{13}C NMR spectrum of compound 3 (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	95
Figure S14. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 3 (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	95
Figure S15. Mass spectra of compound 3	96
Figure S16. ^1H NMR spectrum of compound 4HC (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	97
Figure S17. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 4HC (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	97
Figure S18. ^{13}C NMR spectrum of compound 4HC (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	98
Figure S19. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 4HC (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	98
Figure S20. Mass spectra of compound 4HC	99
Figure S21. ^1H NMR spectrum of compound 5 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	100
Figure S22. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 5 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	100
Figure S23. ^{13}C NMR spectrum of compound 5 (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	101
Figure S24. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 5 (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	101
Figure S25. Mass spectra of compound 5	102
Figure S26. ^1H NMR spectrum of compound 6 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	103
Figure S27. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 6 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	103
Figure S28. ^{13}C NMR spectrum of compound 6 (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	104
Figure S29. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 6 (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	104
Figure S30. Mass spectra of compound 6	105
Figure S31. ^1H NMR spectrum of compound 7 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	106
Figure S32. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 7 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	106
Figure S33. ^{13}C NMR spectrum of compound 7 (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	107
Figure S34. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 7 (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	107
Figure S35. Mass spectra of compound 7	108
Figure S36. ^1H NMR spectrum of compound 8 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	109
Figure S37. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 8 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	109
Figure S38. ^{13}C NMR spectrum of compound 8 (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	110
Figure S39. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 8 (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	110
Figure S40. Mass spectra of compound 8	111
Figure S41. ^1H NMR spectrum of compound 9 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	112
Figure S42. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 9 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	112
Figure S43. ^{13}C NMR spectrum of compound 9 (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	113
Figure S44. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 9 (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	113
Figure S45. Mass spectra of compound 9	114
Figure S46. ^1H NMR spectrum of compound 10 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	115
Figure S47. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 10 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	115
Figure S48. ^{13}C NMR spectrum of compound 10 (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	116
Figure S49. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 10 (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	116
Figure S50. Mass spectra of compound 10	117

Figure S51. ^1H NMR spectrum of compound 11 (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	118
Figure S52. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 11 (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	118
Figure S53. ^{13}C NMR spectrum of compound 11 (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	119
Figure S54. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 11 (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	119
Figure S55. Mass spectra of compound 11	120
Figure S56. ^1H NMR spectrum of compound 12 (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	121
Figure S57. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 12 (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	121
Figure S58. ^{13}C NMR spectrum of compound 12 (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	122
Figure S59. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 12 (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	122
Figure S60. Mass spectra of compound 12	123
Figure S61. ^1H NMR spectrum of compound 13 (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	124
Figure S62. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 13 (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	124
Figure S63. ^{13}C NMR spectrum of compound 13 (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	125
Figure S64. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 13 (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	125
Figure S65. Mass spectra of compound 13	126
Figure S66. ^1H NMR spectrum of compound 14 (400 MHz, CDCl_3)	127
Figure S67. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 14 (400 MHz, CDCl_3)	127
Figure S68. ^{13}C NMR spectrum of compound 14 (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	128
Figure S69. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 14 (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	128
Figure S70. Mass spectra of compound 14	129
Figure S71. ^1H NMR spectrum of compound 15 (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	130
Figure S72. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 15 (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	130
Figure S73. ^{13}C NMR spectrum of compound 15 (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	131
Figure S74. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 15 (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	131
Figure S75. Mass spectra of compound 15	132
Figure S76. ^1H NMR spectrum of compound 16 (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	133
Figure S77. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 16 (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	133
Figure S78. ^{13}C NMR spectrum of compound 16 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	134
Figure S79. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 16 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	134
Figure S80. Mass spectra of compound 16	135
Figure S81. ^1H NMR spectrum of compound 17 (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	136
Figure S82. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 17 (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	136
Figure S83. ^{13}C NMR spectrum of compound 17 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	137
Figure S84. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 17 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	137
Figure S85. Mass spectra of compound 17	138
Figure S86. ^1H NMR spectrum of compound 18 (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	139
Figure S87. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 18 (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	139
Figure S88. ^{13}C NMR spectrum of compound 18 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	140
Figure S89. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 18 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	140
Figure S90. Mass spectra of compound 18	141
Figure S91. ^1H NMR spectrum of compound 19 (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	142
Figure S92. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 19 (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	142
Figure S93. ^{13}C NMR spectrum of compound 19 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	143
Figure S94. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 19 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	143
Figure S95. Mass spectra of compound 19	144
Figure S96. ^1H NMR spectrum of compound 20 (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	145
Figure S97. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 20 (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	145
Figure S98. ^{13}C NMR spectrum of compound 20 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	146
Figure S99. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 20 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	146
Figure S100. Mass spectra of compound 20	147

Figure S101. ^1H NMR spectrum of compound 21 (400 MHz, DMSO- d_6).....	148
Figure S102. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 21 (400 MHz, DMSO- d_6)	148
Figure S103. ^{13}C NMR spectrum of compound 21 (150 MHz, DMSO- d_6)	149
Figure S104. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 21 (150 MHz, DMSO- d_6)	149
Figure S105. Mass spectra of compound 21	150
Figure S106. Effect of chalcone 4HC on viability of vaginal epithelial cells lineage HMVII. Control represents cells in medium only, without 4HC . Viability was expressed as percentage compared to control cells (100%). Data are mean $\pm$ SD of at least three different experiments performed in triplicate.	152

Capítulo III

Fig 1. Design of chalcones of series I-III	177
Fig 2. Synthesis of chalcones	178
Fig 3. Binding mode of formycin A and compounds 29 , 34 , 41 and 43 in catalytic site of purine nucleoside phosphorylase of <i>Trichomonas vaginalis</i> (PDB ID 1Z36).....	179
Figure SM1. ^1H NMR spectrum of compound 1 (600 MHz; CDCl_3)	184
Figure SM2. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 1 (600 MHz; CDCl_3).....	184
Figure SM3. ^{13}C NMR spectrum of compound 1 (150 MHz, CDCl_3)	185
Figure SM4. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 1 (150 MHz, CDCl_3).....	185
Figure SM5. Mass spectra of compound 1	186
Figure SM6. ^1H NMR spectrum of compound 2 (600 MHz; CDCl_3)	187
Figure SM7. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 2 (600 MHz; CDCl_3).....	187
Figure SM8. ^{13}C NMR spectrum of compound 2 (150 MHz, CDCl_3)	188
Figure SM9. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 2 (150 MHz, CDCl_3).....	188
Figure SM10. Mass spectra of compound 2	189
Figure SM11. ^1H NMR spectrum of compound 3 (400 MHz; DMSO- d_6)	190
Figure SM12. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 3 (400 MHz; DMSO- d_6)	190
Figure SM13. ^{13}C NMR spectrum of compound 3 (100 MHz, DMSO- d_6).....	191
Figure SM14. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 3 (100 MHz, DMSO- d_6)	191
Figure SM15. Mass spectra of compound 3	192
Figure SM16. ^1H NMR spectrum of compound 4 (600 MHz; DMSO- d_6).....	193
Figure SM17. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 4 (600 MHz; DMSO- d_6)	193
Figure SM18. ^{13}C NMR spectrum of compound 4 (150 MHz, DMSO- d_6)	194
Figure SM19. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 4 (150 MHz, DMSO- d_6)	194
Figure SM20. Mass spectra of compound 4	195
Figure SM21. ^1H NMR spectrum of compound 5 (600 MHz; DMSO- d_6)	196
Figure SM22. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 5 (600 MHz; DMSO- d_6)	196
Figure SM23. ^{13}C NMR spectrum of compound 5 (150 MHz, DMSO- d_6)	197
Figure SM24. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 5 (150 MHz, DMSO- d_6)	197
Figure SM25. Mass spectra of compound 5	198
Figure SM26. ^1H NMR spectrum of compound 6 (400 MHz; DMSO- d_6)	199
Figure SM27. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 6 (400 MHz; DMSO- d_6)	199
Figure SM28. ^{13}C NMR spectrum of compound 6 (100 MHz, DMSO- d_6).....	200
Figure SM29. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 6 (100 MHz, DMSO- d_6)	200
Figure SM30. Mass spectra of compound 6	201
Figure SM31. ^1H NMR spectrum of compound 7 (600 MHz; CDCl_3).....	202
Figure SM32. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 7 (600 MHz; CDCl_3).....	202
Figure SM33. ^{13}C NMR spectrum of compound 7 (150 MHz, CDCl_3)	203
Figure SM34. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 7 (150 MHz, CDCl_3).....	203
Figure SM35. Mass spectra of compound 7	204

Figure SM36. ^1H NMR spectrum of compound 8 (600 MHz; CDCl_3).....	205
Figure SM37. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 8 (600 MHz; CDCl_3).....	205
Figure SM38. ^{13}C NMR spectrum of compound 8 (150 MHz, CDCl_3).....	206
Figure SM39. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 8 (150 MHz, CDCl_3).....	206
Figure SM40. Mass spectra of compound 8	207
Figure SM41. ^1H NMR spectrum of compound 9 (600 MHz; $\text{DMSO}-d_6$).....	208
Figure SM42. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 9 (600 MHz; $\text{DMSO}-d_6$)	208
Figure SM43. ^{13}C NMR spectrum of compound 9 (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	209
Figure SM44. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 9 (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	209
Figure SM45. Mass spectra of compound 9	210
Figure SM46. ^1H NMR spectrum of compound 10 (600 MHz; CDCl_3).....	211
Figure SM47. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 10 (600 MHz; CDCl_3).....	211
Figure SM48. ^{13}C NMR spectrum of compound 10 (150 MHz, CDCl_3)	212
Figure SM49. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 10 (150 MHz, CDCl_3).....	212
Figure SM50. Mass spectra of compound 10	213
Figure SM51. ^1H NMR spectrum of compound 11 (600 MHz; CDCl_3).....	214
Figure SM52. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 11 (600 MHz; CDCl_3).....	214
Figure SM53. ^{13}C NMR spectrum of compound 11 (150 MHz, CDCl_3)	215
Figure SM54. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 11 (150 MHz, CDCl_3).....	215
Figure SM55. Mass spectra of compound 11	216
Figure SM56. ^1H NMR spectrum of compound 12 (600 MHz; CDCl_3)	217
Figure SM57. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 12 (600 MHz; CDCl_3).....	217
Figure SM58. ^{13}C NMR spectrum of compound 12 (150 MHz, CDCl_3).....	218
Figure SM59. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 12 (150 MHz, CDCl_3).....	218
Figure SM60. Mass spectra of compound 12	219
Figure SM61. ^1H NMR spectrum of compound 13 (600 MHz; CDCl_3)	220
Figure SM62. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 13 (600 MHz; CDCl_3).....	220
Figure SM63. ^{13}C NMR spectrum of compound 13 (150 MHz, CDCl_3).....	221
Figure SM64. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 13 (150 MHz, CDCl_3).....	221
Figure SM65. Mass spectra of compound 13	222
Figure SM66. ^1H NMR spectrum of compound 14 (600 MHz; CDCl_3)	223
Figure SM67. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 14 (600 MHz; CDCl_3).....	223
Figure SM68. ^{13}C NMR spectrum of compound 14 (150 MHz, CDCl_3).....	224
Figure SM69. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 14 (150 MHz, CDCl_3).....	224
Figure SM70. Mass spectra of compound 14	225
Figure SM71. ^1H NMR spectrum of compound 15 (600 MHz; CDCl_3)	226
Figure SM72. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 15 (600 MHz; CDCl_3).....	226
Figure SM73. ^{13}C NMR spectrum of compound 15 (150 MHz, CDCl_3).....	227
Figure SM74. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 15 (150 MHz, CDCl_3).....	227
Figure SM75. Mass spectra of compound 15	228
Figure SM76. ^1H NMR spectrum of compound 16 (600 MHz; CDCl_3).....	229
Figure SM77. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 16 (600 MHz; CDCl_3).....	229
Figure SM78. ^{13}C NMR spectrum of compound 16 (150 MHz, CDCl_3).....	230
Figure SM79. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 16 (150 MHz, CDCl_3).....	230
Figure SM80. Mass spectra of compound 16	231
Figure SM81. ^1H NMR spectrum of compound 17 (600 MHz; $\text{DMSO}-d_6$)	232
Figure SM82. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 17 (600 MHz; $\text{DMSO}-d_6$) ...	232
Figure SM83. ^{13}C NMR spectrum of compound 17 (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	233
Figure SM84. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 17 (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) ..	233
Figure SM85. Mass spectra of compound 17	234

Figure SM86. ^1H NMR spectrum of compound 18 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)	235
Figure SM87. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 18 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) ...	235
Figure SM88. ^{13}C NMR spectrum of compound 18 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	236
Figure SM89. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 18 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) ..	236
Figure SM90. Mass spectra of compound 18	237
Figure SM91. ^1H NMR spectrum of compound 19 (600 MHz; CDCl_3)	238
Figure SM92. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 19 (600 MHz; CDCl_3)	238
Figure SM93. ^{13}C NMR spectrum of compound 19 (150 MHz, CDCl_3)	239
Figure SM94. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 19 (150 MHz, CDCl_3)	239
Figure SM95. Mass spectra of compound 19	240
Figure SM96. ^1H NMR spectrum of compound 20 (600 MHz; CDCl_3)	241
Figure SM97. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 20 (600 MHz; CDCl_3)	241
Figure SM98. ^{13}C NMR spectrum of compound 20 (150 MHz, CDCl_3)	242
Figure SM99. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 20 (150 MHz, CDCl_3)	242
Figure SM100. Mass spectra of compound 20	243
Figure SM101. ^1H NMR spectrum of compound 21 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)	244
Figure SM102. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 21 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) ..	244
Figure SM103. ^{13}C NMR spectrum of compound 21 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	245
Figure SM104. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 21 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) ..	245
Figure SM105. Mass spectra of compound 21	246
Figure SM106. ^1H NMR spectrum of compound 22 (600 MHz; CDCl_3)	247
Figure SM107. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 22 (600 MHz; CDCl_3)	247
Figure SM108. ^{13}C NMR spectrum of compound 22 (150 MHz, CDCl_3)	248
Figure SM109. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 22 (150 MHz, CDCl_3)	248
Figure SM110. ^1H NMR spectrum of compound 23 (600 MHz; CDCl_3)	250
Figure SM111. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 23 (600 MHz; CDCl_3)	250
Figure SM112. ^{13}C NMR spectrum of compound 23 (150 MHz, CDCl_3)	251
Figure SM113. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 23 (150 MHz, CDCl_3)	251
Figure SM114. Mass spectra of compound 23	252
Figure SM115. ^1H NMR spectrum of compound 24 (600 MHz; CDCl_3)	253
Figure SM116. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 24 (600 MHz; CDCl_3)	253
Figure SM117. ^{13}C NMR spectrum of compound 24 (150 MHz, CDCl_3)	254
Figure SM118. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 24 (150 MHz, CDCl_3)	254
Figure SM119. Mass spectra of compound 24	255
Figure SM120. ^1H NMR spectrum of compound 25 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)	256
Figure SM121. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 25 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) ..	256
Figure SM122. ^{13}C NMR spectrum of compound 25 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	257
Figure SM123. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 25 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) ..	257
Figure SM124. Mass spectra of compound 25	258
Figure SM125. ^1H NMR spectrum of compound 26 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)	259
Figure SM 126. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 26 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) ..	259
Figure SM127. ^{13}C NMR spectrum of compound 26 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	260
Figure SM128. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 26 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) ..	260
Figure SM129. Mass spectra of compound 26	261
Figure SM130. ^1H NMR spectrum of compound 27 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)	262
Figure SM131. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 27 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) ..	262
Figure SM132. ^{13}C NMR spectrum of compound 27 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	263
Figure SM133. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 27 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) ..	263
Figure SM134. Mass spectra of compound 27	264
Figure SM135. ^1H NMR spectrum of compound 28 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)	265

Figure SM136. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 28 (600 MHz; DMSO- d_6)	265
Figure SM137. ^{13}C NMR spectrum of compound 28 (150 MHz, DMSO- d_6)	266
Figure SM138. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 28 (150 MHz, DMSO- d_6)	266
Figure SM139. Mass spectra of compound 28	267
Figure SM140. ^1H NMR spectrum of compound 29 (600 MHz; CDCl_3)	268
Figure SM141. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 29 (600 MHz; CDCl_3)	268
Figure SM142. ^{13}C NMR spectrum of compound 29 (150 MHz, CDCl_3)	269
Figure SM143. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 29 (150 MHz, CDCl_3)	269
Figure SM144. Mass spectra of compound 29	270
Figure SM145. ^1H NMR spectrum of compound 30 (600 MHz; CDCl_3)	271
Figure SM146. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 30 (600 MHz; CDCl_3)	271
Figure SM147. ^{13}C NMR spectrum of compound 30 (150 MHz, CDCl_3)	272
Figure SM148. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 30 (150 MHz, CDCl_3)	272
Figure SM149. Mass spectra of compound 30	273
Figure SM150. ^1H NMR spectrum of compound 31 (600 MHz; DMSO- d_6)	274
Figure SM151. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 31 (600 MHz; DMSO- d_6)	274
Figure SM152. ^{13}C NMR spectrum of compound 31 (150 MHz, DMSO- d_6)	275
Figure SM153. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 31 (150 MHz, DMSO- d_6)	275
Figure SM154. Mass spectra of compound 31	276
Figure SM155. ^1H NMR spectrum of compound 32 (600 MHz; DMSO- d_6)	277
Figure SM156. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 32 (600 MHz; DMSO- d_6)	277
Figure SM157. ^{13}C NMR spectrum of compound 32 (150 MHz, DMSO- d_6)	278
Figure SM158. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 32 (150 MHz, DMSO- d_6)	278
Figure SM159. Mass spectra of compound 32	279
Figure SM160. ^1H NMR spectrum of compound 33 (600 MHz; DMSO- d_6)	280
Figure SM161. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 33 (600 MHz; DMSO- d_6)	280
Figure SM162. ^{13}C NMR spectrum of compound 33 (150 MHz, DMSO- d_6)	281
Figure SM163. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 33 (150 MHz, DMSO- d_6)	281
Figure SM164. Mass spectra of compound 33	282
Figure SM165. ^1H NMR spectrum of compound 34 (600 MHz; DMSO- d_6)	283
Figure SM166. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 34 (600 MHz; DMSO- d_6)	283
Figure SM167. ^{13}C NMR spectrum of compound 34 (150 MHz, DMSO- d_6)	284
Figure SM168. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 34 (150 MHz, DMSO- d_6)	284
Figure SM169. Mass spectra of compound 34	285
Figure SM170. ^1H NMR spectrum of compound 35 (600 MHz; DMSO- d_6)	286
Figure SM171. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 35 (600 MHz; DMSO- d_6)	286
Figure SM172. ^{13}C NMR spectrum of compound 35 (150 MHz, DMSO- d_6)	287
Figure SM173. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 35 (150 MHz, DMSO- d_6)	287
Figure SM174. Mass spectra of compound 35	288
Figure SM175. ^1H NMR spectrum of compound 36 (600 MHz; DMSO- d_6)	289
Figure SM176. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 36 (600 MHz; DMSO- d_6)	289
Figure SM177. ^{13}C NMR spectrum of compound 36 (150 MHz, DMSO- d_6)	290
Figure SM178. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 36 (150 MHz, DMSO- d_6)	290
Figure SM179. ^1H NMR spectrum of compound 37 (600 MHz; DMSO- d_6)	292
Figure SM180. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 37 (600 MHz; DMSO- d_6)	292
Figure SM181. ^{13}C NMR spectrum of compound 37 (150 MHz, DMSO- d_6)	293
Figure SM182. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 37 (150 MHz, DMSO- d_6)	293
Figure SM183. ^1H NMR spectrum of compound 38 (600 MHz; DMSO- d_6)	295
Figure SM184. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 38 (600 MHz; DMSO- d_6)	295
Figure SM185. ^{13}C NMR spectrum of compound 38 (150 MHz, DMSO- d_6)	296

Figure SM186.	Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 38 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	296
Figure SM187.	^1H NMR spectrum of compound 39 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)	298
Figure SM188.	Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 39 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)	298
Figure SM189.	^{13}C NMR spectrum of compound 39 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	299
Figure SM190.	Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 39 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	299
Figure SM191.	^1H NMR spectrum of compound 40 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)	301
Figure SM192.	Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 40 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)	301
Figure SM193.	^{13}C NMR spectrum of compound 40 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	302
Figure SM194.	Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 40 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	302
Figure SM195.	^1H NMR spectrum of compound 41 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)	304
Figure SM196.	Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 41 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)	304
Figure SM197.	^{13}C NMR spectrum of compound 41 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	305
Figure SM198.	Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 41 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	305
Figure SM199.	Mass spectra of compound 41	306
Figure SM200.	^1H NMR spectrum of compound 42 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)	307
Figure SM201.	Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 42 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)	307
Figure SM202.	^{13}C NMR spectrum of compound 42 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	308
Figure SM203.	Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 42 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	308
Figure SM204.	Mass spectra of compound 42	309
Figure SM205.	^1H NMR spectrum of compound 43 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)	310
Figure SM206.	Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 43 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)	310
Figure SM207.	^{13}C NMR spectrum of compound 43 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	311
Figure SM208.	Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 43 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	311
Figure SM209.	Mass spectra of compound 43	312
Figure SM210.	^1H NMR spectrum of compound 44 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)	313
Figure SM211.	Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 44 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)	313
Figure SM212.	^{13}C NMR spectrum of compound 44 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	314
Figure SM213.	Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 44 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	314
Figure SM214.	Mass spectra of compound 44	315
Figure SM 215.	^1H NMR spectrum of compound 45 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)	316
Figure SM216.	Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 45 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)	316
Figure SM217.	^{13}C NMR spectrum of compound 45 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	317
Figure SM218.	Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 45 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	317
Figure SM219.	Mass spectra of compound 45	318
Figure SM220.	^1H NMR spectrum of compound 46 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)	319
Figure SM221.	Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 46 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)	319
Figure SM222.	^{13}C NMR spectrum of compound 46 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	320
Figure SM223.	Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 46 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	320
Figure SM224.	^1H NMR spectrum of compound 47 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)	322
Figure SM225.	Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 47 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)	322
Figure SM226.	^{13}C NMR spectrum of compound 47 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	323
Figure SM227.	Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 47 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	323
Figure SM228.	Mass spectra of compound 47	324
Figure SM229.	^1H NMR spectrum of compound 48 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)	325
Figure SM230.	Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 48 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)	325
Figure SM231.	^{13}C NMR spectrum of compound 48 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	326
Figure SM232.	Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 48 (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	326
Figure SM233.	Mass spectra of compound 48	327
Figure SM234.	^1H NMR spectrum of compound 49 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)	328
Figure SM235.	Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 49 (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)	328

Figure SM236. ^{13}C NMR spectrum of compound 49 (150 MHz, DMSO- d_6)	329
Figure SM237. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 49 (150 MHz, DMSO- d_6)	329
Figure SM238. ^1H NMR spectrum of compound 50 (600 MHz; DMSO- d_6)	331
Figure SM239. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 50 (600 MHz; DMSO- d_6)	331
Figure SM240. ^{13}C NMR spectrum of compound 50 (150 MHz, DMSO- d_6)	332
Figure SM241. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 50 (150 MHz, DMSO- d_6)	332
Figure SM242. ^1H NMR spectrum of compound 51 (600 MHz; DMSO- d_6)	334
Figure SM243. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 51 (600 MHz; DMSO- d_6)	334
Figure SM244. ^{13}C NMR spectrum of compound 51 (150 MHz, DMSO- d_6)	335
Figure SM245. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 51 (150 MHz, DMSO- d_6)	335
Figure SM246. ^1H NMR spectrum of compound 52 (600 MHz; DMSO- d_6)	337
Figure SM247. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 52 (600 MHz; DMSO- d_6)	337
Figure SM248. ^{13}C NMR spectrum of compound 52 (150 MHz, DMSO- d_6)	338
Figure SM249. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 52 (150 MHz, DMSO- d_6)	338
Figure SM250. ^1H NMR spectrum of compound 53 (600 MHz; DMSO- d_6)	340
Figure SM251. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 53 (600 MHz; DMSO- d_6)	340
Figure SM252. ^{13}C NMR spectrum of compound 53 (150 MHz, DMSO- d_6)	341
Figure SM253. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 53 (150 MHz, DMSO- d_6)	341
Figure SM254. ^1H NMR spectrum of compound 54 (600 MHz; DMSO- d_6)	343
Figure SM255. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 54 (600 MHz; DMSO- d_6)	343
Figure SM256. ^{13}C NMR spectrum of compound 54 (150 MHz, DMSO- d_6)	344
Figure SM257. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 54 (150 MHz, DMSO- d_6)	344
Figure SM258. ^1H NMR spectrum of compound 55 (600 MHz; DMSO- d_6)	346
Figure SM259. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 55 (600 MHz; DMSO- d_6)	346
Figure SM260. ^{13}C NMR spectrum of compound 55 (150 MHz, DMSO- d_6)	347
Figure SM261. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 55 (150 MHz, DMSO- d_6)	347
Figure SM262. Mass spectra of compound 55	348
Figure SM263. ^1H NMR spectrum of compound 56 (600 MHz; DMSO- d_6)	349
Figure SM264. Expansion of ^1H NMR spectrum of compound 56 (600 MHz; DMSO- d_6)	349
Figure SM265. ^{13}C NMR spectrum of compound 56 (150 MHz, DMSO- d_6)	350
Figure SM266. Expansion of ^{13}C NMR spectrum of compound 56 (150 MHz, DMSO- d_6)	350
Figure SM267. Mass spectra of compound 56	351

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Metabolismo Energético de <i>Trichomonas vaginalis</i>	27
Esquema 2. Ativação do MTZ nos Hidrogenossomos	30
Esquema 3. Biorredução do Metronidazol em Condições Anaeróbias	31
Esquema 4. Formação de Espécies Reativas de Oxigênio em Condições de Aerobiose	32
Esquema 5. Mecanismo de ação da enzima lactato desidrogenase (LDH)	35
Esquema 6. A ação da enzima TvMGL no metabolismo energético para a geração de ATP.	36
Esquema 7. Proposta de mecanismo de reação da α,γ -eliminação da metionina pela TvMGL.	37
Esquema 8. Rotas enzimáticas o metabolismo de purina.	38
Esquema 9. Bioisosterismo Clássico e Não-Clássico (BURGUER, 1991).	49

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Ordem de potência para cinco primeiros congêneres do Método Manual de Topliss (TOPLISS, 1977).....	47
Tabela 2. Seleção de novos substituintes presentes nos congêneres posteriores do Método Manual de Topliss (TOPLISS, 1977).....	47

Capítulo II

Table 1. Activity of chalcones against <i>Trichomonas vaginalis</i> trophozoites	80
Table 2. Hemolytic activity of compound 4HC on human erythrocytes.....	81
Table 3. Mortality (%) of <i>Galleria mellonella</i> larvae treated with compound 4HC	82
Table S1. Medium values of root mean square deviation (RMSD) with the best pose of formycin A in binding site of purine nucleoside phosphorylase of <i>Trichomonas vaginalis</i> (PDB ID 1Z36).....	151

Capítulo III

Tab 1. Activity of chalcones against <i>Trichomonas vaginalis</i> trophozoites	180
Tab 2. Cytotoxicity of 29 , 34 , 41 and 43 against MRC-5 and HMVII cells and selectivity index (SI) values.....	182
Tab SM1. Medium values of root mean square deviation (RMSD) with the best pose of formycin A in binding site of purine nucleoside phosphorylase of <i>Trichomonas vaginalis</i> (PDB ID 1Z36).....	352

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATCC	American Type Culture Collection
CC-FN	Cromatografia em Coluna de Fase Normal
IC₅₀	Concentração Capaz de Inibir em 50% o Crescimento de <i>Trichomonas vaginalis</i>
CC₅₀	Concentração capaz de inibir o crescimento de 50% das células HMV-II
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
d₆	Hexadeuterado
E	Configuração trans
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
HMV-II	Human vaginal malignant melanoma
IS	Índice de Seletividade
ISTs	Infecções Sexualmente Transmissíveis
STIs	Sexually Transmitted Infections
J	Constante de Acoplamento
MTT	(Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio)
MTZ	Metronidazol
Mult	Multiplicidade
M	Multipleto
OAA	Oxaloacetato
Ox	Oxidado
PEP	Fosfoenolpiruvato

PFOR	Piruvato-ferredoxina-oxirredutase
Red	Reduzido
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
S	Simpleto
SBA	Soro Bovino Adulto
TYM	Trypticase-extrato de levedo-maltose
σ	Efeito Eletrônico
π	Hidrofobicidade
Es	Efeito Estérico
δ	Deslocamento Químico

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO	23
1.1. <i>Trichomonas vaginalis</i>	23
1.2. Metronidazol (MTZ)	29
1.3. Enzimas do <i>T. vaginalis</i> como Possíveis Alvos Moleculares	33
1.3.1. Tiorredoxina redutase (TvTXR)	33
1.3.2. Lactato Desidrogenase (TvLDH).....	35
1.3.3. Metionina Gamma-Liase (TvMGL)	36
1.3.4. Purina Nucleosideo-Fosforilase (TvPNP).....	38
1.4. Levantamento de Substâncias Ativas contra <i>T. vaginalis</i>	39
1.4.1. Nitro-imidazóis	39
1.4.2. Aminas.....	40
1.4.3. Produtos Naturais e Semissintéticos.....	41
1.5. Chalconas Ativas contra <i>T. vaginalis</i>	43
1.6. Estratégias no Planejamento de Modificação Molecular.....	45
1.7. Bioisosterismo	49
1.8. A Ancoragem Molecular como Ferramenta para a Descoberta de Fármacos contra <i>Trichomonas vaginalis</i>	50
2. OBJETIVOS	55
2.1. Objetivo Geral	55
2.2. Objetivos Específicos.....	55

CAPÍTULO II

Phenolic chalcones as agents against <i>Trichomonas vaginalis</i>	57
ABSTRACT	58
1. Introduction	59
2. Results and discussion	60
2.1. Design and synthesis.....	60
2.2. Anti- <i>Trichomonas vaginalis</i> activity.....	61
2.3. Toxicity evaluations.....	62
2.4. Mode of action studies.....	63
3. Conclusions	66
4.1. Design.....	66
4.2. General chemical procedures	67
4.3. Synthesis	67
4.4. Anti- <i>Trichomonas vaginalis</i> activity.....	67
4.5. Toxicity against human erythrocytes.....	68

4.6. Toxicity against human vaginal cells	68
4.7. Toxicity against <i>Galleria mellonella</i> larvae.....	69
4.8. Reactive oxygen species production in <i>Trichomonas vaginalis</i>	69
4.9. Reactive oxygen species production in human neutrophils	69
4.10. Real-time quantitative reverse transcription PCR.....	70
4.11. Statistical analysis.....	71
4.12. Molecular docking	71
References.....	72
SUPPLEMENTARY MATERIAL	87
GRAPHICAL ABSTRACT	153

CAPÍTULO III

Antiparasitic activity of synthetic hydroxychalcones against <i>Trichomonas vaginalis</i>	155
ABSTRACT	156
1. Introduction	157
2. Results and discussion	158
2.2. Design and synthesis.....	158
2.2. Anti- <i>Trichomonas vaginalis</i> activity.....	159
2.3. Toxicity and selectivity	160
2.4. Molecular docking	161
3. Conclusions	163
4. Material and Methods.....	163
4.1. Design.....	163
4.2. General chemical procedures	164
4.3. Synthesis	164
4.4. Anti- <i>Trichomonas vaginalis</i> activity.....	165
4.5. Cytotoxicity assays.....	165
4.7. Molecular docking	166
References.....	167
SUPPLEMENTARY MATERIAL	183
GRAPHICAL ABSTRACT	353

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES	355
REFERÊNCIAS	356

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1.1. *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis foi isolado e descrito por Donné (1836), em uma paciente com vaginite, e caracterizado com um eucarioto. O mesmo é considerado por alguns autores como um eucarioto primitivo, porém há uma crescente demanda por estudos moleculares e genéticos que apontam o *T. vaginalis* como um organismo evoluído e especializado para seus ambientes específicos (DACKS, WALKER & FIELD, 2008).

Existem diversas classificações taxonômicas dos protozoários e uma delas é a utilização de supergrupos. Em uma classificação geral, *T. vaginalis* pertence ao Reino Protista, filo Parabasalia, classe Zoomastigophorea, ordem Trichomonadida, família Trichomonadidae, subfamília Trichomonadinae (NEVES & FILIPPIS, 2010).

O filo Parabasalia foi descrito por HONIGBERG (1973) como sendo composto por organismos unicelulares, quase que exclusivamente simbióticos, com flagelos múltiplos, um ou mais núcleos, complexo parabasal, porém sem mitocôndria. A classe Trichomonadea e a ordem Trichomonadida foram descritas por KIRBY, em 1951, sendo a classe composta, em geral, por trofozoítos com quatro a seis flagelos, membrana ondulante associada a flagelo recorrente e a ordem designada por trofozoítos piriformes ou ameboides. Além disso, a família Trichomonadidae foi definida por Wenyon, em 1926, pelo conjunto de trofozoítos com único núcleo, número de flagelos variáveis com o gênero, sendo um desses sustentado por membrana ondulante e axóstilo único (PESSÔA & MARTINS, 1982).

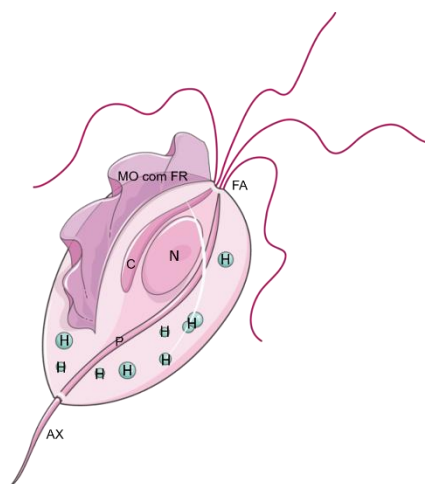
CAVALIER-SMITH (2013) fundamentou outra proposta de classificação para o *T. vaginalis*, segundo o qual o gênero *Trichomonas* pertence ao filo Louksozoa, ao subfilo Metamonada, à superclasse Parabasalia, à classe Trichomonadea, à ordem Trichomonadida e à família Trichomonadidae. Esta proposta de classificação defende o fato de que os organismos do grupo Metamonada são anaeróbicos que evoluíram de um ancestral aeróbico. Nesse contexto, os hidrogenossomos seriam mitocôndrias que perderam DNA e citocromos, responsáveis por parte do metabolismo energético (LINDMARK & MÜLLER, 1973). A célula de *T. vaginalis* também não apresenta peroxissomos e, sim, ribossomos 70S (CHAMPNEY et al., 1992).

Além do *Trichomonas vaginalis*, agente etiológico da tricomoníase, tem-se, como outros exemplos de tricomonadídeos: *Tritrichomonas foetus*, responsável pela tricomoníase

bovina (ŠLAPETA et al., 2010); *Trichomonas gallinae* o qual causa a tricomoníase aviária (AMIN et al., 2014). Os tricomonadídeos apresentam ciclo de vida na forma de trofozoíto sem um verdadeiro estágio cístico. Dentre as exceções estão algumas espécies: *Trichomitus batrachorum*, *Trichomitus sanguisuga* e *Ditrichomonas honigbergii*, que possuem cistos verdadeiros (MATTERN et al., 1973; BRUGEROLLE, 1975; FARMER, 1993).

T. vaginalis apresenta estruturas de citoesqueleto como flagelos, costa, corpo parabasal e complexo pelta-axóstilo, formado principalmente por microtúbulos estáveis (Figura 1). O axóstilo tem como função o suporte, se projetando até a parte posterior da célula e também participa da divisão celular comprimindo o núcleo. Já a pelta tem como função a sustentação da parede do canal periflagelar (BENCHIMOL 2005; RIBEIRO et al., 2002; PETRIN et al., 1998).

Figura 1. Estrutura celular de *Trichomonas vaginalis*.



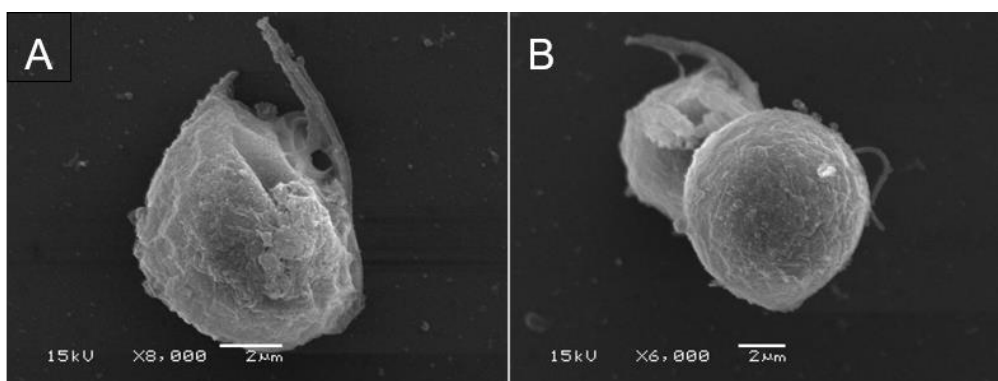
Elemento gráfico obtido do site <https://smart.servier.com> / Autoria própria

No geral, a célula do *T. vaginalis* (Figura 1) compreende as seguintes partes: flagelos anteriores (FA), membrana ondulante (MO) com flagelo recorrente (RF), pelta (P), axóstilo (AX), hidrogenossomos (H), costa (C) e núcleo (N). Desse modo, a célula de *T. vaginalis* é considerada polimorfa, de modo que é possível visualizar diferentes dimensões, com comprimentos de 4,5–19,0 μm e larguras de 2,5–12,5 μm , bem como variáveis formas: piriforme, elipsoides, ovais e esféricas. Também é capaz de emitir pseudópodes para a captura de nutrientes por fagocitose e fixação de partículas sólidas (DE CARLI, 2000).

Cultivados em meio axênico, os trofozoítos de *T. vaginalis* apresentam formato elipsoide, possuindo tamanho de aproximadamente 10 e 7 μm de comprimento e largura, respectivamente, quando corados (PETRIN et al., 1998). Também é possível encontrar os

trofozoítos na forma endoflagelar, porém em baixa proporção (Figura 2). Por outro lado, em amostras a fresco, o tamanho observado das células pode ser até duas vezes maior. Diversas características morfológicas dos trofozoítos de isolados clínicos frescos são reduzidas quando cultivados por longos períodos *in vitro*, tais como adesão às células epiteliais, transformação morfológica, citotoxicidade e fagocitose (CUERVO et al., 2008).

Figura 2. Formas endoflagelares de *Trichomonas vaginalis*.



Microscopia eletrônica de varredura (MEV). A) Trofozoíto em processo de internalização de membrana ondulante e flagelos. B) Trofozoíto em forma esférica com todos os flagelos internalizados. Fotomicrografias de Graziela Vargas Rigo, GPTrico, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Além disso, a presença de formas esféricas com flagelos internalizados, denominados pseudocistos ou formas endoflagelares, foram comumente reportada nesses parasitos (LIPMAN et al., 1999; GRANGER et al., 2000; PEREIRA-NEVES et al., 2003; MADEIRO DA COSTA & BENCHIMOL, 2004).

O termo pseudocisto refere-se à forma arredondada, sem motilidade, e que apresenta todos os flagelos internalizados. No início do século XX, a designação destas formas “aflageladas” era controversa. Alguns autores as consideravam artefatos, outros não as reconheciam como forma dos tricomonadídeos, e outros ainda as descreviam como espécimes em degeneração (PEREIRA-NEVES et al., 2012).

A forma "aflagelada" foi designada pseudocisto, uma vez que apresentava características semelhantes às de cistos de outros protozoários, porém não apresentava a parede cística, sendo considerada irreversível e degenerativa. À medida que o papel da forma pseudocística foi sendo relatado como importante na infecção, o termo passou a ser aceito. Posteriormente, a utilização do termo “formas endoflagelares” foi recomendada por PEREIRA-NEVES e colaboradores (2012), visto que os flagelos continuam presentes dentro da célula, e

sendo esta forma a ativa (PEREIRA-NEVES et al., 2012). As formas endoflagelares são observadas, principalmente em condições hostis ao parasito (escassez de nutrientes, choque térmico e tratamento com fármacos) (LIPMAN et al., 1999; GRANGER et al., 2000; PEREIRA-NEVES et al., 2003; MADEIRO DA COSTA & BENCHIMOL, 2004).

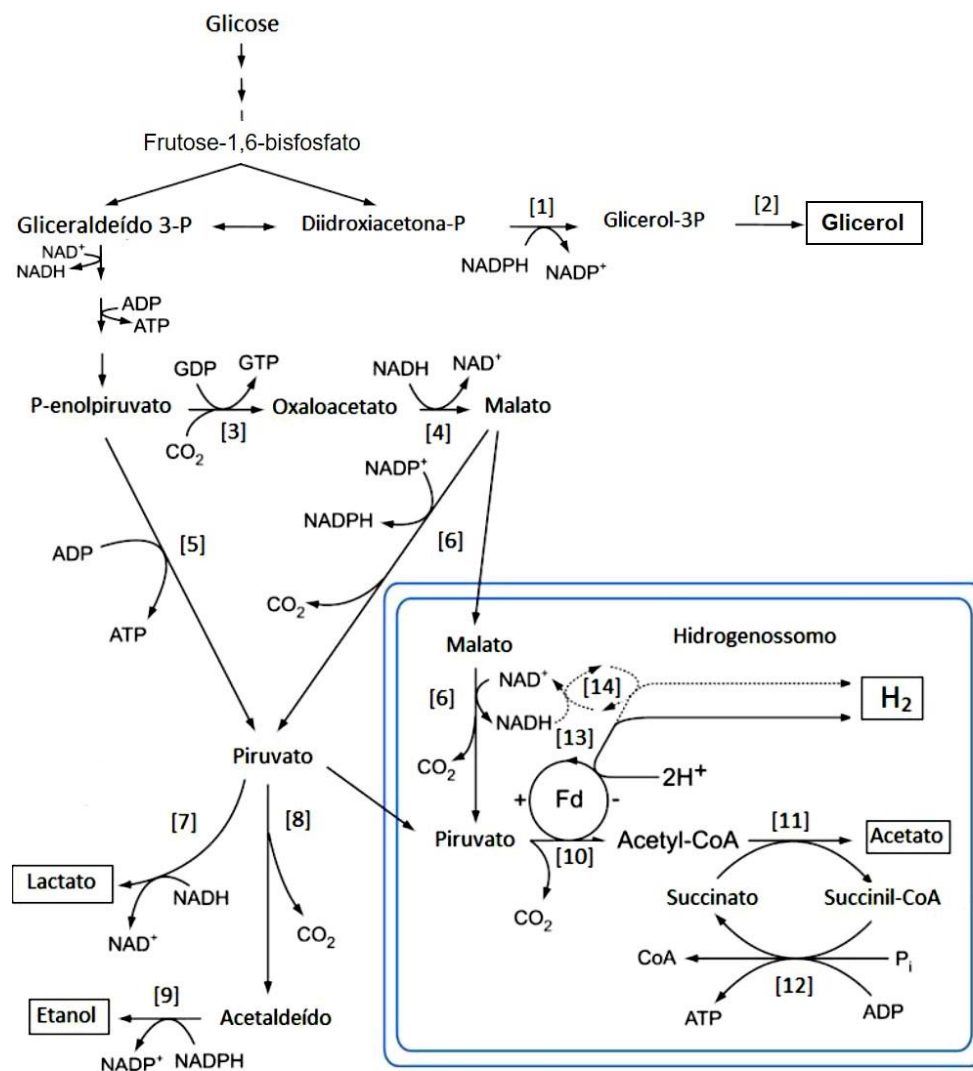
Como observado nos tricomonadídeos, a reprodução do *T. vaginalis* ocorre por fissão binária longitudinal, sendo a divisão nuclear classificada como mitose fechada com fuso extranuclear, em que o envelope nuclear permanece e por isso, não há contato entre os cromossomos e os microtúbulos. As estruturas do citoesqueleto como o sistema pelta-axóstilo, corpos basais, costa e flagelos são duplicados em uma fase pré-mitótica (RIBEIRO et al., 2002; DE CARLI, 2000).

Os hidrogenossomos são organelas de dupla membrana e com diâmetro de 0,3–0,6 µm e estão distribuídos principalmente na região perinuclear e próximos ao axóstilo e costa, apresentam uma ou mais vesículas periféricas ricas em Mg^{2+} , Ca^{2+} e P (CHAPMAN et al., 1985). Além disso, os hidrogenossomos são caracterizados principalmente pela produção de hidrogênio molecular, síntese de ATP apenas por fosforilação ao nível de substrato, ausência da cadeia transportadora de elétrons e de material genético (MULLER et al., 2012).

Fisiologicamente, o *T. vaginalis* é descrito como um organismo anaeróbio facultativo, capaz de crescer na ausência de oxigênio, em pH de 5–7,5, em temperaturas entre 20–40 °C. Como fonte de energia utiliza a glicose, maltose e a galactose, porém na ausência desses carboidratos, torna-se essencial o uso de aminoácidos como: arginina, treonina e leucina, bem como é capaz de armazenar glicogênio. Dessa forma, o metabolismo é considerado como fermentativo tanto em condições anaeróbias como aeróbias, devido à incompleta da glicose, a qual ocorre no citoplasma e nos hidrogenossomos (MACIEL, TASCA & DE CAR, 2004).

No citoplasma de *T. vaginalis*, a glicose é convertida em piruvato por diversas reações enzimáticas via mecanismo clássico de Embden-Meyerhoff-Parnas (Esquema 1). Após essa conversão, o piruvato é transportado para o interior dos hidrogenossomos. Outra possibilidade é a conversão de PEP em oxaloacetato (OAA), o qual é transformado em malato, sendo posteriormente convertido em piruvato nos hidrogenossomos. As enzimas responsáveis nessa etapa são: glicerol-3-fosfato desidrogenase (1); glicerol-3-fosfatase (2); fosfoenolpiruvato carboxiquinase (3); malato desidrogenase (4); piruvato quinase (5); enzima málica (6); lactato desidrogenase (7); piruvato descarboxilase (8); álcool desidrogenase, dependente de NADPH (9) (KULDA, 1999).

Esquema 1. Metabolismo Energético de *Trichomonas vaginalis*



Adaptado de KULDA (1999)

O metabolismo que ocorre nos hidrogenossomos (Esquema 1) envolve a piruvato-ferredoxina-oxirredutase (PFOR), a qual converte o piruvato, produto da glicólise, em acetato, pela oxidação fermentativa, liberando acetato, ATP, CO₂ e H₂ (PETRIN et al., 1998; MACIEL, TASCA & DE CARLI, 2004). As enzimas que participam nessa etapa do metabolismo nos hidrogenossomos são: malato desidrogenase (6); PFOR (10); acetato:succinato CoA-transferase (11); succinil-CoA sintetase (12); hidrogenase (13); ferredoxina (14) (KULDA, 1999).

Devido à incapacidade de sintetizar os nutrientes necessários ao seu metabolismo, *T. vaginalis* capta estas substâncias das secreções vaginais, células hospedeiras e bactérias, por

meio de fagocitose. Dentre esses nutrientes, o ferro é necessário para manter níveis máximos de ferredoxina ($[2\text{Fe} - 2\text{S}]$), proteína transportadora de elétrons, bem como de PFOR (GORRELL, 1985).

O ferro é um metal de grande importância para muitos protozoários, mas principalmente para *T. vaginalis*, que tem expressado múltiplos sistemas de captação, como receptores para as seguintes proteínas consideradas fontes de ferro: holo-lactoferrina, hemoglobina e as adesinas que se ligam aos eritrócitos e às células epiteliais (MORENO-BRITO et al., 2005; ARDALAN et al., 2009). Consequentemente, após a captação de ferro pelo *T. vaginalis*, manifestações clínicas podem ser acentuadas, como: secreção vaginal com cor anormal e mau odor, irritação e queimadura vaginal, vaginite e um aumento de pH vaginal acima de 5. Esses sintomas iniciam a partir da interação com o hospedeiro, considerada complexa, de modo que envolve os componentes associados à superfície celular do parasito, células epiteliais e componentes solúveis encontrados nas secreções vaginal e uretral (MENEZES et al., 2016).

A virulência tem como pré-requisito a cito-aderência do parasito, etapa essencial para a estabilização e manutenção de uma infecção crônica no trato urogenital humano. Em seguida, ocorrem os mecanismos de citotoxicidade que são: citólise, fagocitose e desintegração das monocamadas celulares (MENEZES et al., 2016). A citoaderência envolve proteínas de superfície denominadas de adesinas, sendo que sua biossíntese é regulada principalmente pelo ferro, além de glicoconjugados, proteínas do citoesqueleto (microtúbulos e microfilamentos), receptores para as proteínas da matriz extracelular e processos de transdução de sinal e autofagia (MORENO-BRITO et al., 2005).

Após a aderência do parasito, são iniciados os mecanismos de citotoxicidade, os quais incluem: hemólise, fagocitose e desintegração das monocamadas epiteliais. A hemólise é importante para aquisição dos nutrientes necessários para o parasito, principalmente o ferro, aminoácidos e ácidos graxos. Em seguida, o ferro e outros nutrientes se encontram disponíveis para o metabolismo parasitário (FIGUEROA-ÂNGULO et al., 2012).

Embora os aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos tenham sido descritos para *T. vaginalis*, pode-se observar a necessidade de estudos mais específicos, pois pouco se conhece sobre a sua variabilidade biológica, a qual merece destaque por ser um dos principais patógenos associado a sérias complicações de saúde, como por exemplo, facilitar a transmissão do vírus HIV; por ser a causa de baixo peso em recém-nascidos, bem como de nascimentos prematuros; pela predisposição das mulheres a doença inflamatória pélvica atípica, câncer

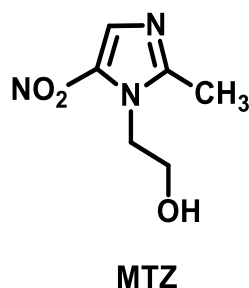
cervical e infertilidade (POOLE & MCCLELLAND, 2013; EDWARDS, 2016; MENEZES et al., 2016).

A tricomoníase, doença causada pelo *T. vaginalis*, é uma doença negligenciada apesar de ser considerada a Infecção Sexualmente Transmissível (IST) não-viral mais comum no mundo pela Organização Mundial da Saúde (OMS). A estimativa mais recente da OMS (2016) constatou 156 milhões de novos casos e 110 milhões de casos já existentes (ROWLEY et al., 2019).

Apesar das manifestações clínicas serem bem conhecidas, cerca de 80% dos casos de tricomoníase são assintomáticos, incluindo mulheres e homens, levando a infecções crônicas (POOLE, 2013). Contudo, a prevalência da infecção é 10 vezes maior na mulher do que no homem (ROWLEY et al., 2019).

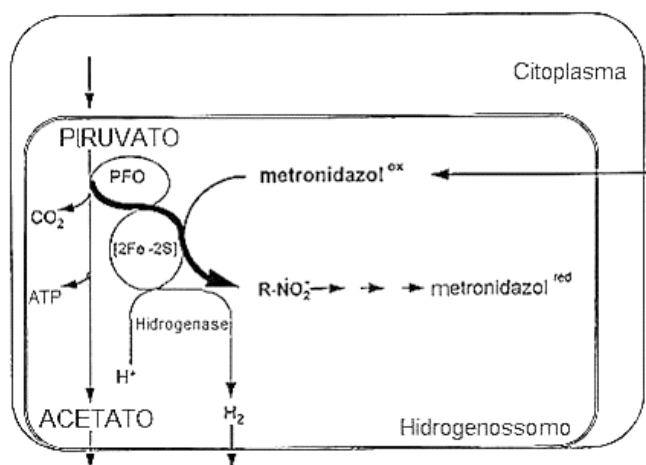
1.2. Metronidazol (MTZ)

Em 1957, Anon, no laboratório Rhône- Poulenc em Paris sintetizou o metronidazol (MTZ) (figura 3), o qual foi recomendado por Cosar e Julou, em 1959, para o tratamento da tricomoníase urogenital humana (COSAR & JULOU, 1959; KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988). O MTZ também é prescrito no tratamento de infecções causadas por outros microrganismos anaeróbicos, como os protozoários *Tritrichomonas*, *Giardia* e *Entamoeba*; bem como as bactérias: *Helicobacter*, *Bacteroides* e *Clostridium*. A seletividade do MTZ apresentada para organismos anaeróbios é justificada pela presença de enzimas ativas em baixas pressões de oxigênio molecular, as quais reduzem o grupo nitroimidazólico, gerando metabólitos reativos conhecidos por sua toxicidade (LAND, CLEMENS & JOHNSON, 2001).

Figura 3. Estrutura do metronidazol (MTZ)

Adaptado de (LEMKE, 2008)

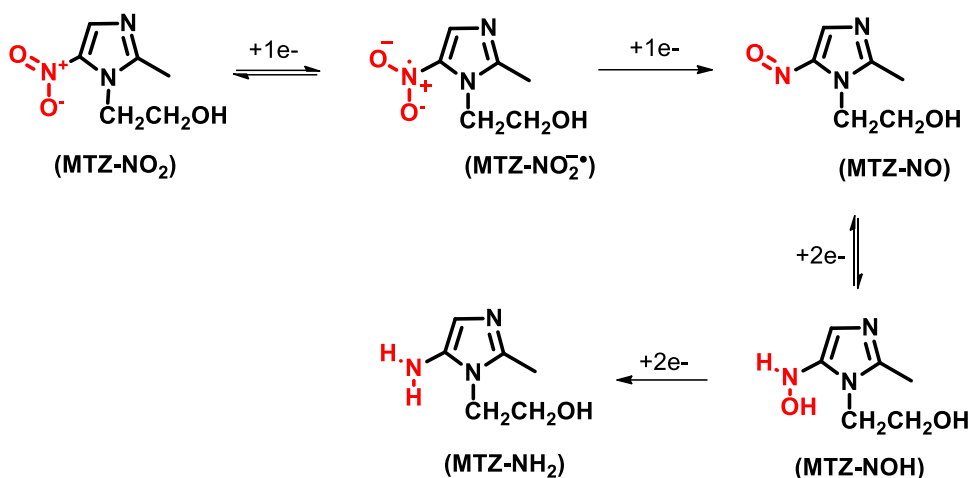
O mecanismo de ação do MTZ envolve transformações em condições anaeróbicas no interior dos hidrogenossomos (Esquema 2) as quais consistem em biorreduções do grupo nitro a amino com produção de espécies radicalares e não-radicalares, ambas altamente reativas e tóxicas ao *T. vaginalis*.

Esquema 2. Ativação do MTZ nos Hidrogenossomos

Adaptado de KULDA (1999)

O grupo nitro do MTZ (MTZ—NO₂) é reduzido pela PFOR e outras redutases, como a tiorredoxina redutase (Esquema 2 e 3) por apresentar um potencial redox negativo o suficiente para doar elétrons, formando o derivado hidroxilamínico (MTZ—NOH), o qual, posteriormente, também sofrerá redução gerando o aminoderivado (MTZ—NH₂) (PAULAI et al., 2009; LAND, CLEMENS & JOHNSON, 2001; LEMKE, 2008). Dessa forma, os intermediários incluindo o MTZ-NOH e o aminoderivado são capazes de interagir com macromoléculas como o DNA, proteínas e membranas (LEHKER & ALDERETE, 1991).

Esquema 3. Biorredução do Metronidazol em Condições Anaeróbias



(PAULAI et al., 2009; LEMKE, 2008)

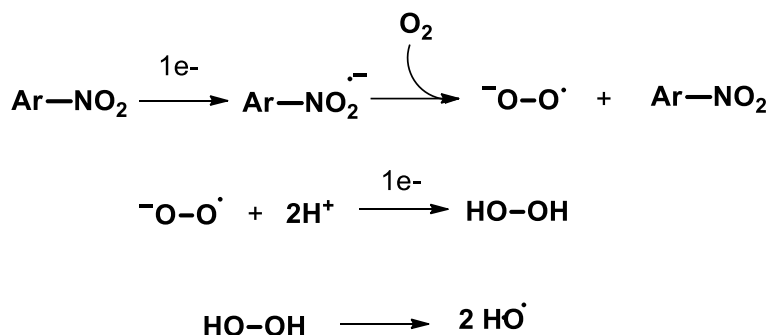
Outra via de ativação do metronidazol também foi sugerida nos hidrogenossomos, a qual ocorre por meio da redução de ferredoxina via NAD: ferredoxina oxido redutase, utilizando o NADH gerado pela malato desidrogenase na descarboxilação hidrogenossomal (HRDÝ et al., 2005). Em outros organismos, o mecanismo de ativação do metronidazol sem o envolvimento da ferredoxina tem sido descrito como, por exemplo, a redução pela enzima tiorredoxina redutase em *E. histolytica* (LEITSCH et al., 2007), uma enzima homóloga à presente em *T. vaginalis* (COOMBS et al., 2004). Além disso, em *Helicobacter pylori*, a redução do metronidazol tem sido atribuída às nitro redutases RdxA e FrxA (GOODWIN et al., 1998; KWON et al., 2000), assim como a redução do metronidazol por íons ferro e tióis (WILLSON & SEARLE, 1975) sem a participação de enzimas, também foi descrita. Com base no modo de ação do metronidazol, ainda há incertezas consideráveis, especialmente relacionadas à toxicidade do ânion nitroradical e seu metabólito reduzido, por exemplo, o metabólito MTZ-NO ou MTZ-NHOH.

Em diversos estudos *in vitro*, ânions nitroradicaís gerados eletroquimicamente foram observados por causarem única e/ou dupla quebra de cadeia do DNA (ZAHOOOR et al., 1987; TOCHER & EDWARDS, 1992). De fato, a ligação dos metabólitos do MTZ com as proteínas e DNA é admitido como o modo de ação do metronidazol em *T. vaginalis* (INGS et al., 1974), mas outros alvos específicos nunca foram pesquisados para esse parasito ou outro microaerófilo, devido à reatividade indiscriminada já conhecida dos metabólitos do MTZ. Uma pesquisa realizada por LEITSCH e colaboradores (2007) em *E. histolytica* revelou apenas cinco proteínas que formam adutos covalentes com o MTZ e outros nitro-imidazóis, incluindo a tiorredoxina e tiorredoxina redutase.

Da mesma forma que foi apresentada a atividade de nitroredutases com MTZ e a ligação com outras duas proteínas, também conhecidas por estarem envolvidas na regulação mediada por tiorredoxina, LEITSCH e coautores (2009) sugeriram que a tiorredoxina redutase é atingida pelos metabólitos do MTZ por estar localizada em proximidade espacial à fonte dos metabólitos. Da mesma forma que há a formação de adutos covalentes do MTZ com a tiorredoxina redutase e tiorredoxina, também há o efeito negativo na função da proteína e no tratamento com o fármaco, por diminuir, significativamente, a captação não-proteica de tiol intracelular. Sendo assim, os nitro-imidazóis exercem toxicidade pelo desequilíbrio do balanço redox celular de *T. vaginalis* (LEITSCH et al., 2007).

Durante o processo de biorredução do metronidazol (MTZ-NO₂), os intermediários como o nitro-radical aniônico (MTZ-NO₂•) e o MTZ—NOH possuem a capacidade de se ligar covalentemente com o DNA celular do parasito. Além disso, a redução do MTZ-NO₂ em MTZ-NO₂• em meio aeróbio culmina na formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), esquema 4, as quais inibem o metabolismo e replicação, causando a morte celular do parasito (LAND, CLEMENS & JOHNSON, 2001). Esse conjunto de reações de biorredução corroboram a classificação do MTZ como um pró-fármaco, da subclasse dos bioprecursores.

Esquema 4. Formação de Espécies Reativas de Oxigênio em Condições de Aerobiose



(LEMKE, 2008)

Embora o MTZ seja o fármaco de primeira escolha para o tratamento da tricomoníase (WENDEL & WORKOWSKI, 2007), isolados de *T. vaginalis* têm demonstrado resistência e o mecanismo permanece em controvérsia. Estudos de TACHEZY, KULDA & TOMKOVÁ (1993) relataram que a resistência em meio aeróbico é causada pela competição do oxigênio com o MTZ, de forma que a eliminação do oxigênio tenha sido debilitada e que esse oxigênio intracelular interfira na via de ativação, reoxidando a molécula de MTZ e, portanto, limitando a capacidade de ativação. Por outro lado, em meio anaeróbico, a resistência pode ser causada pela perda da atividade catalítica da PFOR, inibindo assim a ativação do MTZ (LAND,

CLEMENS & JOHNSON, 2001). O papel da PFOR na resistência ao MTZ é contraditório, uma vez que a diminuição da atividade não está presente em todos os isolados de *T. vaginalis* com resistência anaeróbia. Isso ocorre por meio da enzima málica, uma vez que existe uma via alternativa NAD-dependente no hidrogenossomo que é capaz de doar elétrons para ferredoxina e, conseqüentemente, ativar o MTZ (RIGO & TASCA, 2020).

Outra grande complicação terapêutica da administração do MTZ são as reações adversas incluindo: náuseas, urticária, vermelhidão cutânea, febre, choque anafilático, diarreia e desordens no sistema nervoso central (HELMS et al., 2008).

Devido a essas desvantagens do MTZ e a complexidade sobre esse alvo celular, *T. vaginalis*, instiga-se a necessidade de estudos que apontam enzimas importantes para esse parasito levando a pesquisa por novos alvos moleculares para a descoberta de novas alternativas no combate a esse parasito.

1.3. Enzimas do *T. vaginalis* como Possíveis Alvos Moleculares

As enzimas são conhecidas por executar processos biológicos importantes em protozoários e, por isso, são potenciais alvos terapêuticos e estão envolvidas nas etapas de virulência do *T. vaginalis* como nutrição, hemólise e apoptose das células do epitélio vaginal humano (HIRT et al., 2011; CARLTON et al., 2007). As enzimas do *T. vaginalis* a serem consideradas e selecionadas como possíveis alvos moleculares são: tiorredoxina redutase, lactato desidrogenase, metionina gamma-liase e purina nucleosídeo fosforilase.

1.3.1. Tiorredoxina redutase (TvTXR)

A tiorredoxina redutase do *T. vaginalis* (TvTXR) tem baixa homologia com a tiorredoxina redutase humana, e é responsável por catalisar a redução da tiorredoxina, exercendo o papel de defesa do parasito, por ser fortemente antioxidante, impede o estresse oxidativo por meio do metabolismo energético e a sinalização redox (MEYER et al., 2009; HIRT et al., 2002). A TvTXR foi identificada por HUANG e coautores (2008) como sendo um alvo para o tratamento quimioterápico, sendo assim, o alvo do MTZ e outros fármacos nitroimidazóis (LEITSCH et al, 2009).

Estudos apontam a importância da enzima tiorredoxina redutase para organismos anaeróbios, sendo as tiorredoxinas redutases de baixo peso molecular (L-TrxRs) mencionadas

como excelentes alvos terapêuticos. Em *T. vaginalis*, a enzima do tipo flavina, tiorredoxina redutase, apresenta atividade similar a nitro redutase com 5-nitro-imidazóis, como o pró-fármaco MTZ. Metabólitos reativos de metronidazol formam adutos covalentes com várias proteínas conhecidas por serem associadas com a regulação redox da tiorredoxina, incluindo a própria tiorredoxina redutase, ribonucleotídeo redutase, tiorredoxina peroxidase e a enzima malato desidrogenase (LEITSCH et al, 2009).

Segundo LEITSCH e coautores (2009), a atividade redutora do grupo dissulfeto da tiorredoxina redutase foi atenuada em extratos contendo trofozoítos tratados com MTZ e os níveis de tiol intracelular também foi diminuído. Nesse estudo, foi gerada uma linhagem mutante de trofozoítos altamente resistentes ao MTZ, a qual mostrou uma pequena atividade da tiorredoxina redutase, não devido à expressão reduzida dessa enzima, mas devido à ausência do cofator FAD.

A redução de flavinas livres, já observada em trofozoítos suscetíveis ao metronidazol, ainda não foi observada nas células resistentes. Por outro lado, as células do *T. vaginalis* desprovidas de ferro, expressando apenas quantidades mínimas de piruvato: ferredoxina oxirredutase e malato desidrogenase hidrogenossomal permanecem completamente suscetíveis ao metronidazol. Portanto, o estudo de LEITSCH e coautores (2009) sugere um mecanismo de ativação do metronidazol baseado nas enzimas do tipo flavina e consequente mudança no atual modelo de ativação hidrogenossomal de fármacos nitro-imidazóis.

O modelo de homologia para a sequência da enzima tiorredoxina redutase do *T. vaginalis* (TvTXR) (código de acesso CAD47837.1) foi gerado por meio do molde correspondente encontrado no Banco de Dados de Proteínas ou *Protein Data Bank* (www.rcsb.org/), uma tiorredoxina redutase da bactéria *Brucella melitensis*, figura 4 (código 4JNQ, 69,1% similar na sequência FASTA, 81,5% similar no sítio ativo, $E = 2 \times 10^{-89}$, RMSD = 1,27 Å, site RMSD = 0,94 Å) (EDWARDS & ARAKAKI, a ser publicado). A sequência FASTA é uma sequência de DNA simplificada. A análise é feita utilizando uma amostra de DNA previamente cadastrada na base de dados (MACHADO et al., 2013).

Figura 4. Estrutura cristalográfica (código 4JNQ) homóloga à TvTXR.

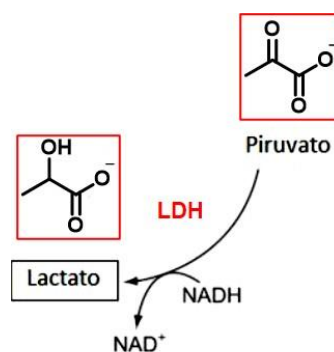


Fonte: <https://www.rcsb.org/structure/4JNQ>

1.3.2. Lactato Desidrogenase (TvLDH)

A enzima lactato desidrogenase de *T. vaginalis* (TvLDH) catalisa a interconversão do lactato em piruvato simultaneamente com a interconversão do NAD^+ para NADH, esquema 5. A enzima TvLDH é essencial na glicólise e necessária a sobrevivência do parasito. Diferente da LDH humana, a TvLDH pode ser considerada como alvo para a descoberta de fármacos com ação anti-*T. vaginalis* (DECK et al, 1998; WU et al, 1999).

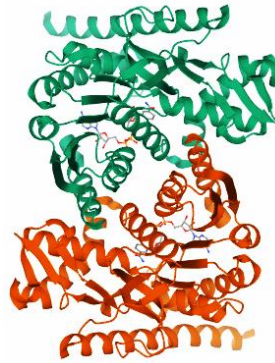
Esquema 5. Mecanismo de ação da enzima lactato desidrogenase (LDH)



Adaptado de KULDA (1999); DECK et al (1998); WU et al (1999).

A estrutura cristalográfica da TvLDH foi caracterizada e depositada por STEINDEL e coautores (2016) no Banco de Dados de Proteínas ou *Protein Data Bank* (www.rcsb.org/), figura 5 (código 4UUN, estrutura da enzima complexada com NADH).

Figura 5. Estrutura cristalográfica da TvLDH (código 4UUN)

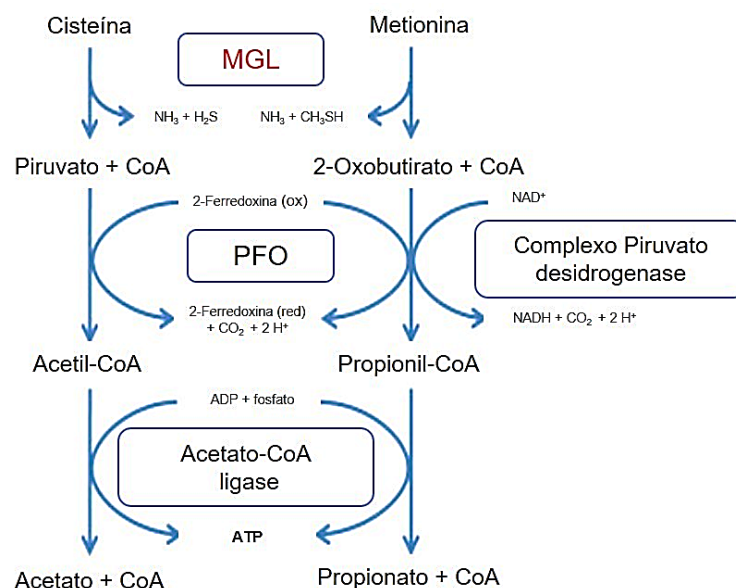


Fonte: <https://www.rcsb.org/structure/4UUN>

1.3.3. Metionina Gamma-Liase (TvMGL)

A enzima metionina gamma-liase (MGL) tem sido caracterizada em várias espécies de bactérias assim como em protozoários como *Trichomonas vaginalis*. A enzima TvMGL é importante no metabolismo energético por degradar aminoácidos que contêm enxofre a ácidos α -cetônicos, produzindo amônia, tióis e participa da geração de ATP (esquema 6). Mamíferos não apresentam MGL, logo a enzima TvMGL pode ser um alvo molecular em potencial para o tratamento da tricomoníase (SATO & NOZAKI, 2009).

Esquema 6. A ação da enzima TvMGL no metabolismo energético para a geração de ATP.

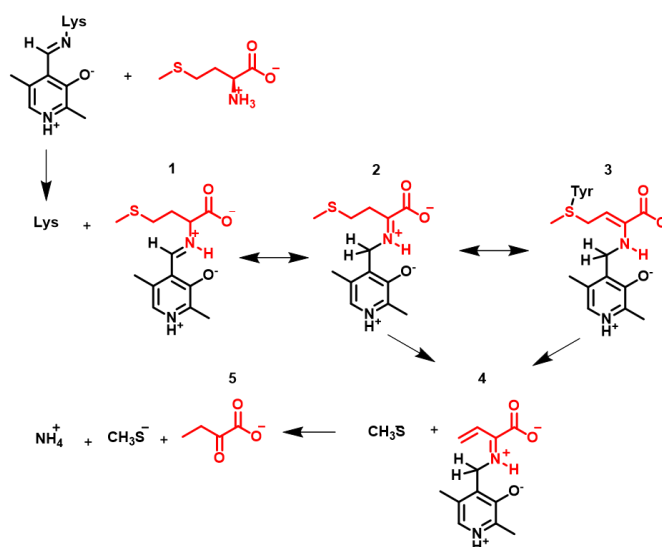


Adaptado de SATO e NOZAKI (2009)

A enzima TvMGL também é categorizada como componente da família gamma (γ) de enzimas dependentes de piridoxal 5'- fosfato (PLP). O sítio ativo é formado na interface de

duas subunidades vizinhas e cada subunidade contém um grupo PLP como cofator. Baseado no mecanismo de reação de enzimas da família γ de enzimas dependentes de PLP, é sugerido que o mecanismo de reação da MGL, esquema 7, siga as seguintes etapas: (1) a ligação entre a base de Schiff e o resíduo de lisina desloca a ligação do grupo amino primário do substrato e PLP para formar uma aldimina; (2) α - e β -hidrogênios do substrato são deslocados para PLP; (3) o grupo fenólico do resíduo de tirosina adjacente ataca a posição γ do substrato como um catalisador ácido; (4) o grupo tiol é eliminado do substrato e (5) ácido α -ketônico e amônia são liberados do PLP (TANAKA, ESAKI & SODA, 1985; ALEXANDER et al., 1994; INOUE et al., 2000; TONEY, 2005).

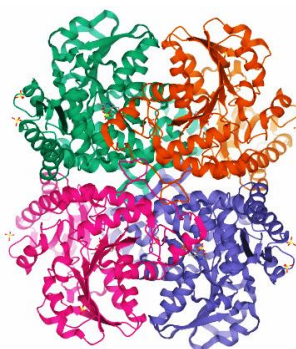
Esquema 7. Proposta de mecanismo de reação da α,γ -eliminação da metionina pela TvMGL.



Adaptado de SATO e NOZAKI (2009)

A estrutura cristalográfica da TvMGL foi depositada por GOODALL, MOTTRAM, COOMBS & LAPTHORN no PDB, cujo artigo está para ser publicado, figura 6 (código 1E5F).

Figura 6. Estrutura cristalográfica da TvMGL (código 1E5F).

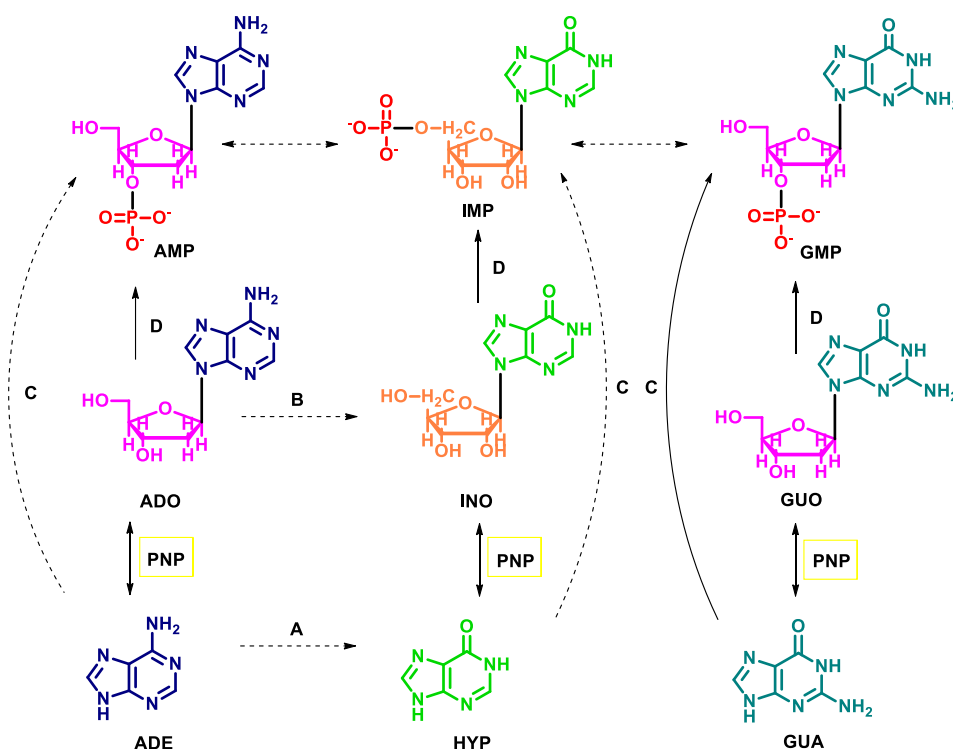


Fonte: <https://www.rcsb.org/structure/1E5F>

1.3.4. Purina Nucleosideo-Fosforilase (TvPNP)

A enzima purina nucleosideo-fosforilase do *T. vaginalis* (TvPNP) catalisa a reação de interconversão entre bases purinas e nucleosídeos correspondentes, sendo essencial para o protozoário. *T. vaginalis* não realiza síntese *de novo* do anel púrico, dependendo, principalmente, dessa enzima para incorporar adenina (**ADE**), hipoxantina (**HYP**) e guanina (**GUA**) para a síntese de nucleotídeos, uma das vias metabólicas essenciais para a sua sobrevivência, esquema 8. Portanto, a TvPNP tende a ser um alvo atrativo para a investigação de novos fármacos para o tratamento da tricomoníase (ZANG et al., 2005; HEYWORTH, GUTTERIDGE & GINGER, 1982; MILLER & LINDSTEAD, 1983; HARRIS et al., 1988).

Esquema 8. Rotas enzimáticas do metabolismo de purina.



Setas completas significam reações enzimáticas que ocorrem no parasito *T. vaginalis* e setas tracejadas, reações ausentes no metabolismo de purina no *T. vaginalis*. **PNP** - purina nucleosideo fosforilase; **A** - adenina deaminase; **B** - adenosina deaminase; **C** - purina fosforibosil transferase; **D** - purina nucleosideo cinase. **AMP** – adenosina monofosfato; **IMP** – inosina monofosfato; **GMP** – guanosina monofosfato; **ADO** – adenosina; **INO** – inosina; **GUO** - guanosina. Adaptado de HEYWORTH, GUTTERIDGE & GINGER (1982); MILLER & LINDSTEAD (1983).

A enzima TvPNP recombinante se assemelha a enzima purina nucleosídeo fosforilase (PNP) encontrada nas bactérias e difere, significativamente, da enzima PNP humana em termos

de estruturas primárias e quaternárias como também de especificidades de substrato e inibitórias (ZANG et al., 2005). Além disso, a PNP bacteriana e a TvPNP reconhecem a adenina e adenosina como os substratos mais eficientes enquanto a PNP presente em mamíferos não reconhece nenhum como substrato (BZOWSKA, KULIKOWSKA & SHUGAR, 1990; JENSEN & NYGAARD, 1975; TAKEHARA et al., 1995).

A estrutura cristalográfica da enzima TvPNP foi depositada por ZANG e coautores (2005) no PDB, figura 6 (código 1Z36).

Figura 7. Estrutura cristalográfica da TvPNP (código 1Z36).



Fonte: <https://www.rcsb.org/structure/1Z36>

1.4. Levantamento de Substâncias Ativas contra *T. vaginalis*

1.4.1. Nitro-imidazóis

A maior parte das substâncias testadas e ativas contra *T. vaginalis* apresentam um ou mais grupos nitro ($-\text{NO}_2$) em sua estrutura. Existem vários estudos na literatura sobre a ação dos nitroimidazóis contra os dois tipos de células do *T. vaginalis* sensíveis e resistentes ao fármaco MTZ.

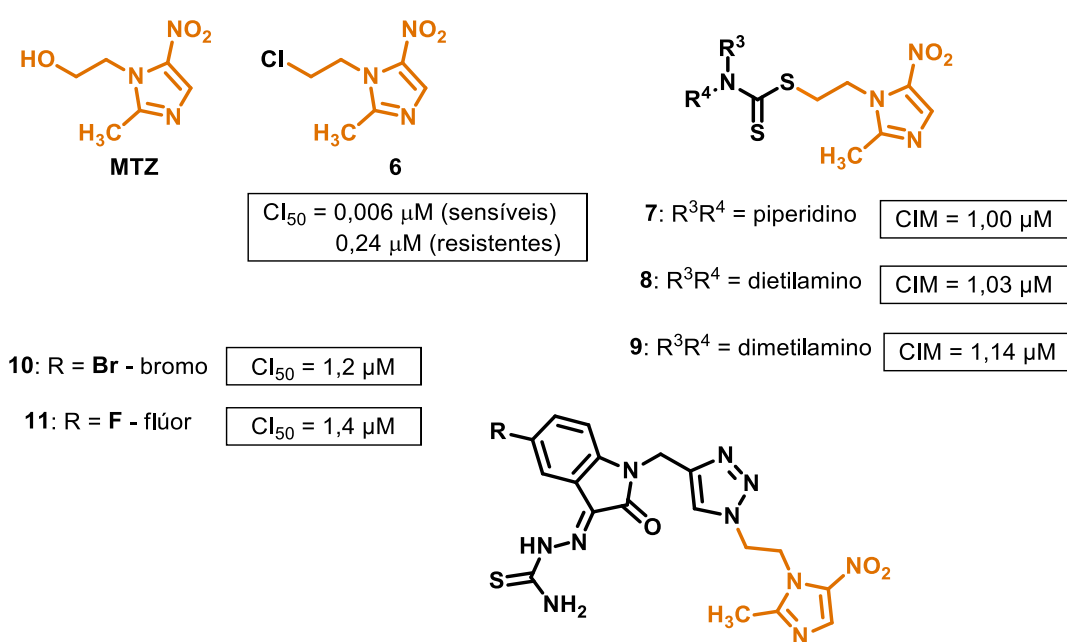
CHACON e colegas, em 2018, sintetizaram o análogo clorado (**6**) do MTZ, figura 8, o qual apresentou valor de concentração capaz de inibir 50% do crescimento (CI_{50}) igual a $0,006 \mu\text{M}$, testado *in vitro* contra isolado clínico sensível ao MTZ (JT), mais ativo que o MTZ ($\text{CI}_{50} = 0,068 \mu\text{M}$). Também foi testado em isolados resistentes (CDC 085 – ATCC 50143), apresentando $\text{CI}_{50} = 0,24 \mu\text{M}$.

L. KUMAR e colaboradores, em 2010, sintetizaram e avaliaram outras séries de derivados nitroimidazóis quanto à atividade anti-*T. vaginalis*. Dentre os quais os derivados nitroimidazólicos **7** ($\text{NR}^3\text{R}^4 = \text{piperidino}$), **8** ($\text{NR}^3\text{R}^4 = \text{dietilamino}$) e **9** ($\text{NR}^3\text{R}^4 = \text{dimetilamino}$),

figura 8, testados em isolados sensíveis, os quais obtiveram os valores de CIM = 1,00, 1,03 e 1,14 μM , respectivamente, mais ativos que o MTZ, o qual obteve CIM = 11,70 μM .

S. KUMAR e colegas, em 2018, investigaram a potência de conjugados isatina-triazol-MTZ contra isolados de *T. vaginalis* sensíveis a MTZ, entre os quais os nitroimidazóis sintetizados, utilizando também tiosemicarbazida como padrão molecular, **10** (R = bromo) e **11** (R = flúor), figura 8, os quais foram os mais potentes contra o parasito, obtendo valores de CI_{50} = 1,2 e 1,4 μM , perdendo apenas para o MTZ (CI_{50} = 0,72 μM).

Figura 8. Nitrocompostos ativos em *T. vaginalis*.



Autoria própria.

1.4.2. Aminas

Recentemente, diversos compostos que apresentam grupamento amina também foram avaliados quanto à atividade tricomonocida ou inibição do crescimento de trofozoítos.

BALA e outros autores, em 2014, planejaram e sintetizaram carbamoditioatos substituídos por morfolina e piperidila, em que o sal sódico **12**, o derivado **13** (etil pirrolidila) e o **14** (etilpiperidila), figura 9, se destacaram por apresentar CIM = 0,070 mM, 0,056 mM e 0,054 mM, respectivamente. Em contrapartida, o fármaco MTZ mostrou CIM de 0,019 mM.

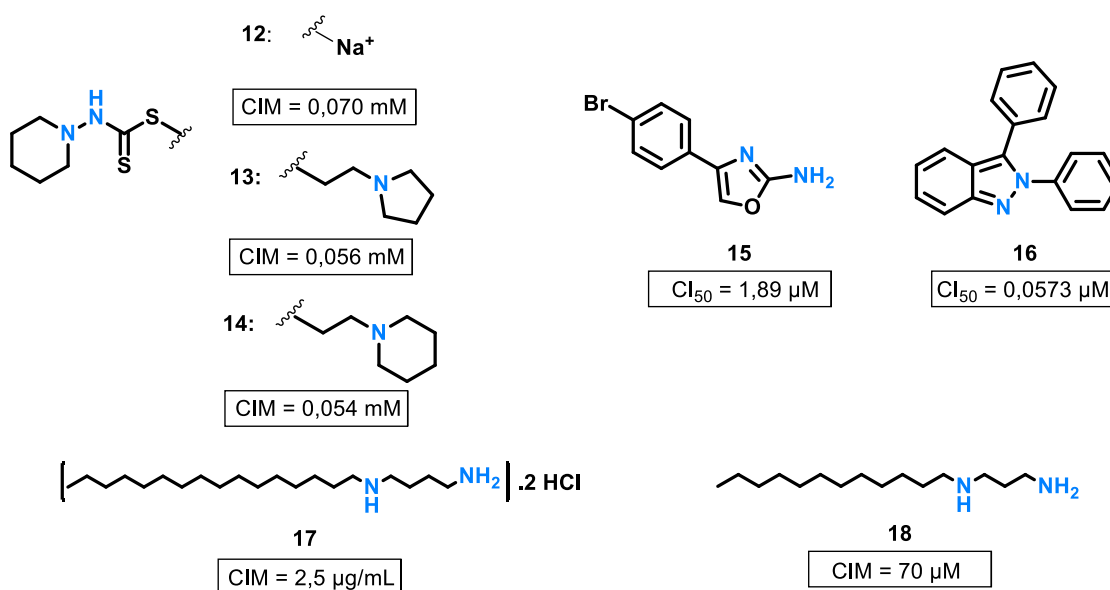
CARBALLO e coautores, em 2017, reportaram a síntese e atividade anti-*T. vaginalis* de derivados 2-amino-4-fenil-oxazóis, dentre os quais o derivado **15** (com o grupo substituinte 4-bromofenil), figura 9, se destacou pela potência, exibindo CI_{50} = 1,89 μM , embora menos ativo que o MTZ (CI_{50} = 0,72 μM).

PÉREZ-VILLANUEVA e colaboradores (2017) investigaram a atividade anti-*T. vaginalis* de derivados 2-fenil-2*H*-indazóis e 2,3-difenil-2*H*-indazóis. A maior parte dos compostos foram mais ativos que o MTZ (CI₅₀ = 0,2360 µM), com destaque para o derivado 2,3-difenil-2*H*-indazol **16**, figura 9, o mais potente apresentado CI₅₀ = 0,0573 µM.

GIORDANI e colaboradores, em 2011, relataram a atividade anti-*T. vaginalis* de sais clorados de diaminas sintéticas, dos quais o sal da diamina (**17**), figura 9, com cadeia carbônica de 16 átomos de carbono foi o mais ativo obtendo CIM = 2,5 µg/mL, enquanto o MTZ obteve um CIM = 5 µg/mL.

RIGO e coautores (2017) sintetizaram derivados diaminícos e testaram os mesmos em *T. vaginalis* e *T. foetus*. Em *T. vaginalis*, esses derivados apresentaram valores de CIM entre 70 e 100 µM, sendo **18**, figura 9, o composto mais ativo apresentando CIM = 70 µM. os resultados desse estudo apontaram que a diamina **19** foi potente contra *T. vaginalis* e *T. foetus* devido ao efeito no metabolismo de poliaminas e atraso no ciclo celular de ambos os parasitos.

Figura 9. Aminas ativas em *T. vaginalis*.



Autoria própria.

1.4.3. Produtos Naturais e Semissintéticos

Além dos nitrocompostos e aminas, os produtos naturais ou semissintéticos vêm sendo bastante explorados e investigados sobre a atividade antiparasitária em *T. vaginalis*.

VIEIRA e coautores (2016) investigaram a ação contra *T. vaginalis* de compostos naturais e semissintéticos provenientes de plantas do bioma brasileiro caatinga. As substâncias α-amirin, β-amirin e lupeol foram extraídas de folhas e galhos das plantas: *Croton nummularius*,

Manilkara rufula e *Senna lechriosperma*. Essas substâncias naturais serviram como modelo para síntese de outros triterpenóis pentacíclicos. Dentre os produtos naturais, o ácido ursólico **19**, figura 10, foi o único composto capaz de inibir 100% a viabilidade celular de *T. vaginalis*, obteve CIM = 50,0 μ M, CI₅₀ = 35,3 μ M (isolados sensíveis) e CIM = 12,5 μ M (isolado clínico resistente).

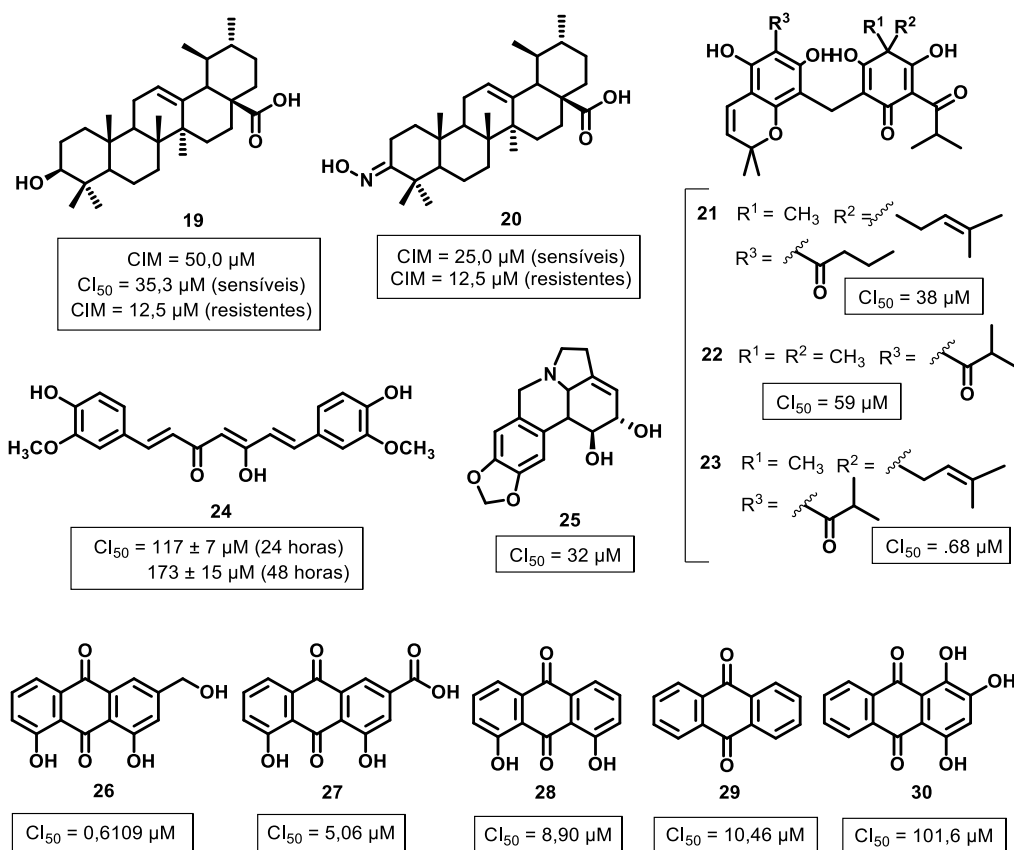
BITENCOURT e colaboradores (2018) investigaram a atividade de derivados do ácido ursólico frente ao *T. vaginalis*. O derivado **20**, figura 10, apresentou CIM = 25 μ M para isolados clínicos sensíveis e CIM = 12,5 μ M em isolado clínico resistente.

MENEZES e colaboradores, em 2017, isolaram derivados do floroglucinol de plantas do gênero *Hypericum* (*H. austrobrasiliense*, *H. caprifoliatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum*). Os compostos isoaustróbrasilol B **21**, isouliginosin B **22** e isohyperbrasilol B **23**, figura 10, extraídos com *n*-hexano foram ativos em isolados sensíveis ao MTZ, tendo valores de CI₅₀ = 38, 59 e 68 μ M, respectivamente.

MALLO e coautores, em 2020, realizaram um estudo sobre a atividade anti-*T. vaginalis* da curcumina **24**, figura 10, um polifenol extraído do rizoma da *Curcuma longa* (Zingiberaceae). Nesse estudo, a curcumina foi avaliada *in vitro* exibindo CI₅₀ = 117 $\pm$ 7 μ M (após 24 horas) e 173 $\pm$ 15 μ M (após 48 horas), tendo sido também constatado que a curcumina aumentou a expressão da enzima hidrogenossomal PFOR e inibiu a atividade proteolítica de enzimas peptidases do parasito.

PETRÓ-SILVEIRA e coautores (2020) avaliaram o efeito do alcaloide licorina **25**, figura 10, extraído de bulbos da erva *Hippeastrum aulicum glaucophyllum*, na inibição na enzima NTPDase de *T. vaginalis*. Esse alcaloide também mostrou atividade *in vitro*, exibindo valor de CI₅₀ = 32 μ M. Nesse estudo, também está reportado que a licorina modula as ectonucleotidases e estimula os neutrófilos a secretar EROs.

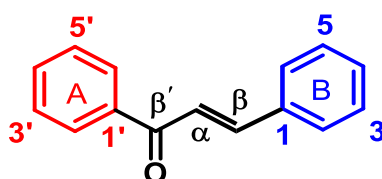
FRIEDMAN, entre outros pesquisadores, em 2020, investigaram a ação anti-*T. vaginalis* de antraquinonas, aloe-emodin **26**, rhein **27**, chrysazin **28**, antraquinona **29** e purpurin **30**, figura 10, em que **26** se destacou por exibir CI₅₀ = 0,6109 μ M em isolado clínico. Enquanto as demais substâncias testadas **27**, **28**, **29** e **30** foram menos ativas por exibirem CI₅₀ = 5,06, 8,90, 10,43 e 101,6 μ M.

Figura 10. Produtos Naturais e semissintéticos ativos em *T. vaginalis*.

Autoria própria

1.5. Chalconas Ativas contra *T. vaginalis*

Chalconas são flavonoides de cadeia aberta e possuem, como características específicas, dois anéis aromáticos interligados por um sistema carbonílico α,β -insaturado de três carbonos sem apresentar um terceiro anel C. O núcleo chalcônico se apresenta como esqueleto 1,3-diaril-2-propen-1-ona, figura 11, e a numeração do anel A utiliza números ordinários seguidos de uma linha ('), enquanto a numeração do anel B emprega números ordinários (KOZLOWSKI et al, 2007; NOWAKOWSKA, 2007).

Figura 11. Núcleo chalcônico

Autoria própria.

ANTHWAL e coautores, em 2014, sintetizaram uma série de híbridos chalcona-MTZ e avaliaram contra *T. vaginalis*. Os híbridos **31** (Ar = 3,5-difluorofenila) e **32** (Ar = 3-clorofenila), figura 12, apresentaram valores de CIM (1,56 µg/mL) equivalentes ao MTZ em isolados sensíveis, porém, em isolados resistentes, **31** e **32** apresentaram CIM = 3,125 µg/mL, quatro vezes mais ativos que o MTZ (CIM = 12,5 µg/mL).

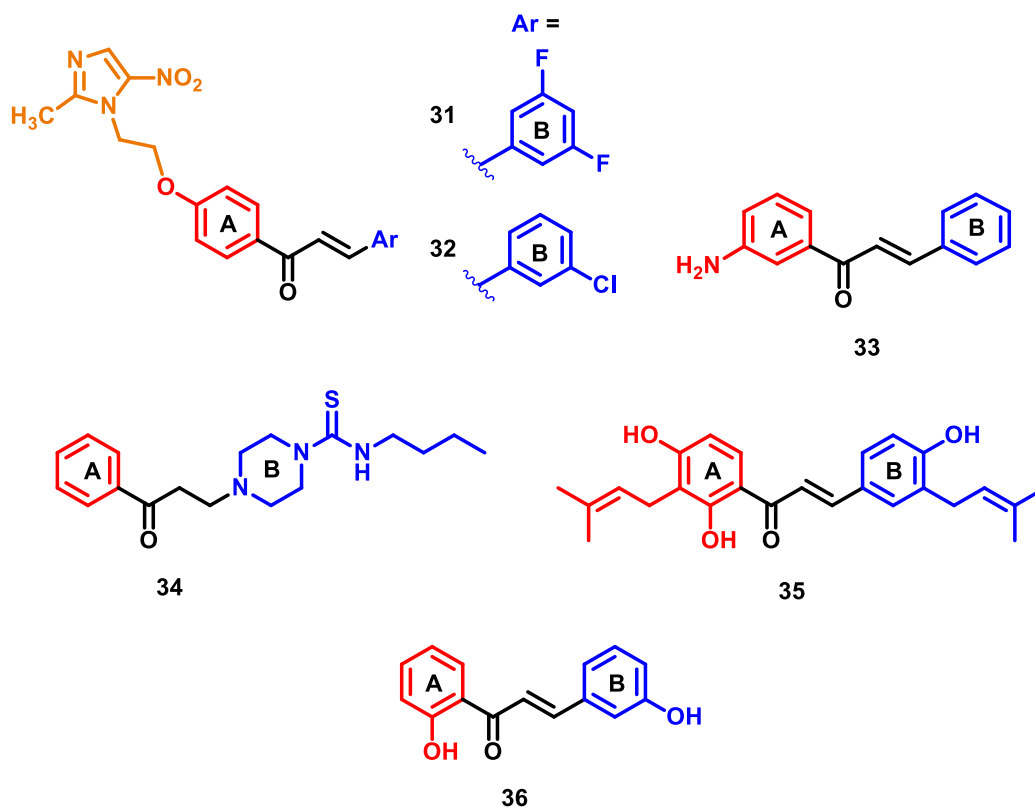
TREIN e colaboradores (2019) avaliaram o efeito de amino análogos de chalconas em *T. vaginalis*. O análogo **33**, figura 12, com 3-amino foi o mais potente apresentando CI₅₀ = 29,0 µM. Resultados preliminares quanto ao mecanismo de ação mostraram que a chalcona **33** não induziu a produção de EROs e não alterou a expressão gênica da enzima PFOR, portanto, o mesmo não atua pela mesma via do MTZ.

V. BALA e colegas, em 2015, realizaram um estudo sobre a avaliação farmacológica de carbotoamidas substituídas por n-alkil ou n-aryl-4-(3-fenilpropil) piperazina, em que a dihidrochalcona **34**, figura 12, cuja estrutura química consiste em uma cetona não insaturada, se mostrou potente contra *T. vaginalis*, exibindo valor de CIM = 46,72 µM em isolados sensíveis.

Em virtude do amplo espectro de bioatividades, as chalconas, em especial as hidroxiladas, promovem a pesquisa científica por substâncias análogas com ação antimalárica, antibacteriana, antitumoral, antioxidante, antiparasitária e anti-HIV (NOWAKOWSKA, 2007).

SETZER e colaboradores (2017) realizaram uma triagem *in silico* de produtos naturais e, investigaram a interação desses com proteínas consideradas alvos moleculares de *T. vaginalis*, por meio de ancoragem molecular. Foram considerados como potentes ligantes à purina-nucleosídeo-fosforilase diversos compostos polifenólicos, destacando-se a 2',4,4'-trihidroxi-3',5'-diprenilchalcona **35**, figura 12.

NEVES e colegas (2020) avaliaram a atividade *in vitro* anti-*T. vaginalis* de 2'-hidroxichalconas, em que a hidroxichalcona **36**, figura 12, foi a mais ativa desse estudo por apresentar valor de CI₅₀ = 50,64 µM em isolados sensíveis ao MTZ. Também avaliaram e destacaram o efeito sinérgico da **36** (12,5 µM) associada com o fármaco (40 µM).

Figura 12. Chalconas ativas em *T. vaginalis*.

Autoria própria.

1.6. Estratégias no Planejamento de Modificação Molecular

PATCHETT & NARGUND (2000) aperfeiçoaram o conceito de estruturas privilegiadas definidas como subunidades estruturais comuns aptas a interagirem com mais de um tipo de biorreceptor. Essas subunidades estruturais são ditas privilegiadas por apresentarem propriedades físico-químicas que potencializam sua capacidade como ligantes às biomacromoléculas. A partir da identificação da estrutura privilegiada, é possível modificar a subunidade estrutural a fim de garantir mais potência e seletividade.

Os métodos de Topliss consiste na modificação molecular de uma subunidade estrutural direcionada por parâmetros físico-químicos como o efeito eletrônico por grupos doadores e aceptores de elétrons, hidrofobicidade/hidrofilicidade por grupos hidrofóbicos/hidrofilicos e efeitos estéricos conferidos por substituintes de menor ou maior tamanho. Esses parâmetros se

Por outro lado, o Método Manual de Topliss (Tabelas 1 e 2) relaciona, inicialmente, as propriedades físico-químicas π , σ e Es de cinco congêneres, sendo um análogo não-substituído (H), três análogos *para*-substituídos: por Cl (eletroatrator), OMe e Me (eletrodoadores) e um análogo *meta,para*-dissubstituído por Cl. Esses cinco congêneres são avaliados simultaneamente, sendo classificados em ordem de potência biológica (TOPLISS, 1977). Posteriormente, a ordem de potência biológica será categorizada em 10 grupos (π , $2\pi - \pi^2$, σ , $-\sigma$, $\pi + \sigma$, $2\pi - \sigma$, $\pi - \sigma$, $\pi - 2\sigma$, $\pi - 3\sigma$ e Es). A classificação da série dos congêneres em um destes 10 grupos indicará os próximos substituintes que deverão ser utilizados.

Tabela 1. Ordem de potência para cinco primeiros congêneres do Método Manual de Topliss (TOPLISS, 1977).

Cinco congêneres iniciais	π	$2\pi-\pi^2$	σ	$-\sigma$	$\pi + \sigma$	$2\pi-\sigma$	$\pi-\sigma$	$\pi-2\sigma$	$\pi-3\sigma$	E_4^a
3,4-diCl	1	1-2	1	5	1	1	1-2	3-4	5	2-5
4-Cl	2	1-2	2	4	2	2-3	3	3-4	3-4	2-5
4-Me	3	3	4	2	3	2-3	1-2	1	1	2-5
4-OMe	4-5	4-5	5	1	5	4	4	2	2	2-5
H	4-5	4-5	3	3	4	5	5	5	3-4	1

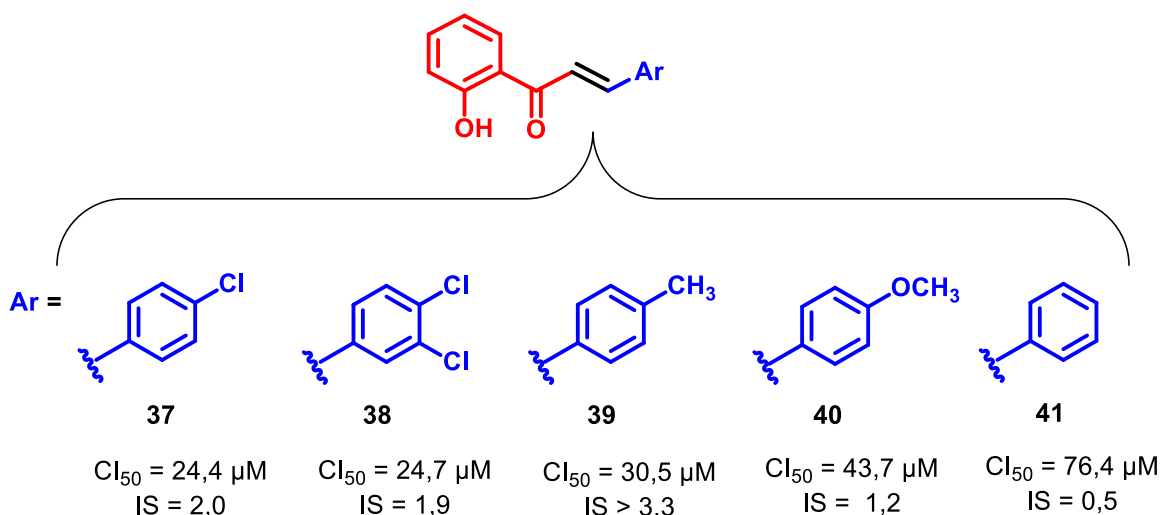
(a) efeito estérico desfavorável dos substituintes *para*-posicionados.**Tabela 2.** Seleção de novos substituintes presentes nos congêneres posteriores do Método Manual de Topliss (TOPLISS, 1977).

Possíveis Parâmetros	Seleção de Novos Substituintes após avaliação dos cinco congêneres iniciais
$\pi, \pi + \sigma, \sigma$	3-CF ₃ ; 4-Cl; 4-NO ₂ ; 4-CF ₃ ; 2,4-di-Cl; 4-C ₆ H ₉ ; 4-C ₆ H ₁₁
$\pi, 2\pi - \sigma, \pi - \sigma$	4-CH(CH ₃) ₂ ; 4-C(CH ₃) ₃ ; 3,4 -(CH ₃) ₂ ; 4-O(CH ₂) ₃ CH ₃ ; 4-OCH ₂ Ph; 4-N(C ₂ H ₅) ₂ ;
$\pi - 2\sigma, \pi - 3\sigma, -\sigma,$	4-N(C ₂ H ₅) ₂ ; 4-N(CH ₃) ₂ ; 4-NH ₂ ; 4-NHC ₄ H ₉ ;
	4-OCH(CH ₃) ₂ ; 4-CH ₃ ; 4-OCH ₃
$2\pi - \pi^2$	4-Br; 3-CF ₃ ; 3,4-diCH ₃ ; 4-C ₂ H ₅ ; 3-Cl; 3-CH ₃ ; 3-N(CH ₃) ₂ ; 3,5-di-Cl
Efeito <i>orto</i>	2-Cl; 2-CH ₃ ; 2-OCH ₃ ; 2-F;
Outro	4-F; 4-NHCOCH ₃ ; 4-NHSO ₂ CH ₃ ; 4-NO ₂ ;

Comparando os dois métodos de Topliss, Figura 13 e tabelas 1 e 2, o Método Manual apresenta como vantagem a possibilidade de sintetizar os primeiros cinco compostos sem a necessidade inicial de comprovar suas atividades biológicas. Destaca-se que a seleção pelos congêneres não-substituídos e substituídos (4-Cl, 4-OMe, 4-Me, 3,4-diCl) deve-se à alta acessibilidade sintética, isto é, os reagentes com esses substituintes são comercialmente disponíveis e, em geral, de baixo custo econômico (TOPLISS, 1977; TOPLISS, 1972).

No estudo anterior, realizado por OLIVEIRA (2017), foi descrito que, para as 2'-hidroxichalconas (figura 14), o método manual de Topliss foi esclarecedor para iniciar a construção do estudo de Relação Estrutura-Atividade (SAR, do inglês *Structure-Activity Relationship*), em que a ordem de potência foi estabelecida como **37** (4-Cl) $\approx$ **38** (3,4-diCl) > **39** (4-OMe) > **40** (4-Me) > **41** (não-substituído), figura 14, semelhante a ordem dos parâmetros π e $2\pi - \pi^2$ para a atividade anti-*T. vaginalis*, tabela 1. A aplicação do método manual de Topliss como estratégia para modificação molecular foi ainda mais relevante para a otimização da seletividade, na figura 14, os índices de seletividade (IS) são maiores para os análogos substituídos (**37–40**) em relação ao análogo não-substituído **41**.

Figura 14. 2'-Hidroxichalconas planejadas pelo método de Topliss ativas contra *T. vaginalis* (OLIVEIRA, 2017).



Autoria própria

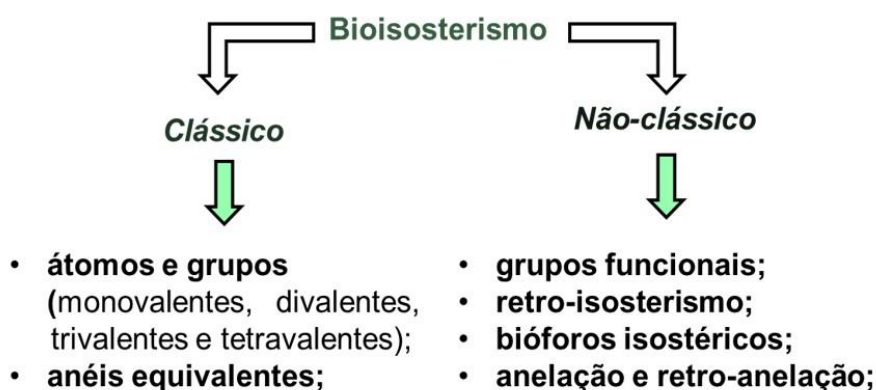
Os próximos análogos a serem sintetizados e avaliados, aplicando o Método Manual (TOPLISS, 1977) pela influência do parâmetro de hidrofobicidade (grupos π e $2\pi - \pi^2$), têm como substituintes grupos hidrofóbicos doadores e aceptores de elétrons.

1.7. Bioisosterismo

O bioisosterismo pode ser definido como uma estratégia de modificação molecular em que fragmentos moleculares são permutados por subunidades estruturais similares em volumes, formas, distribuições eletrônicas e propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, capazes de apresentar propriedades biológicas semelhantes (BARREIRO & FRAGA, 2008).

Em 1970, o bioisosterismo foi classificado e subdividido por Alfred Burger em duas categorias: clássico e não-clássico, Esquema 9. O bioisosterismo clássico consiste na permuta de átomos de mesma valência, grupos ou substituintes, incluindo nesta categoria anéis aromáticos equivalentes, e o não-clássico abrange as demais possibilidades (BURGER, 1991).

Esquema 9. Bioisosterismo Clássico e Não-Clássico (BURGUER, 1991).



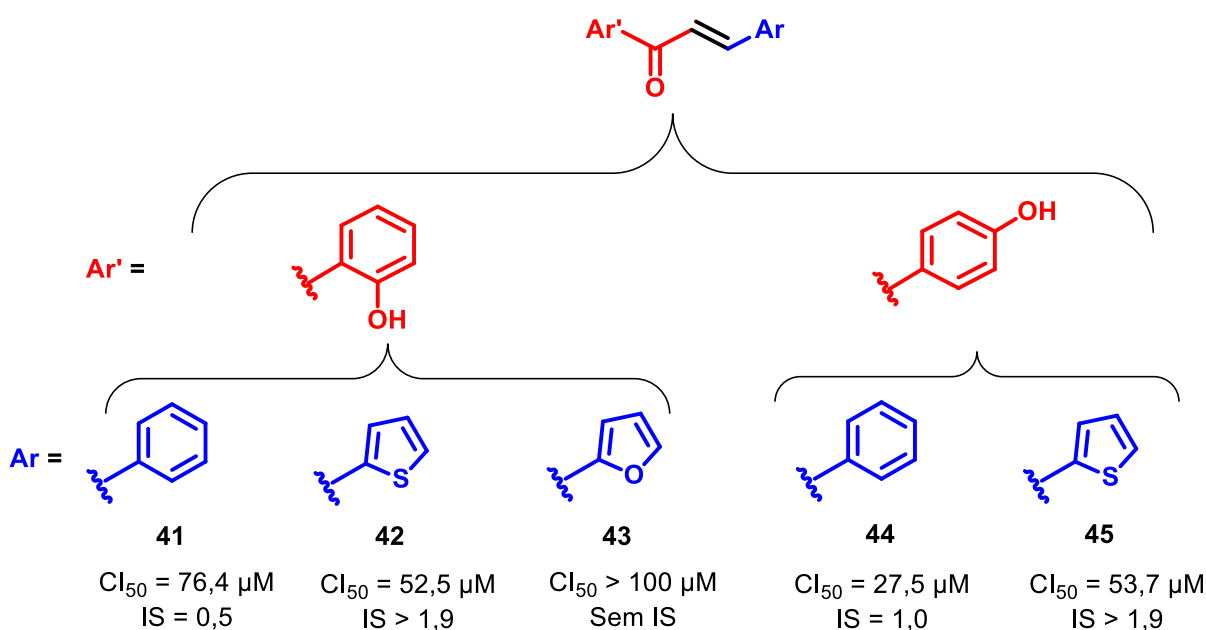
Autoria própria.

O bioisosterismo clássico de anéis equivalentes é empregado para o planejamento de séries congêneras de compostos líderes, visando investigações detalhadas sobre as diferentes contribuições físico-químicas resultantes da permutação de anéis equivalentes e por essa ser ferramenta fundamental no desenvolvimento de fármacos *me-too* (LIMA & BARREIRO, 2005).

O uso do bioisosterismo clássico de anéis equivalentes também foi importante na atividade anti-*T. vaginalis* no estudo de OLIVEIRA (2017), pois a 2'-hidroxichalcona **41** com o anel fenila, figura 15, foi menos ativa do que o análogo 2'-hidroxilado **42** com o anel heterocíclico 2-tiofenila enquanto a 2'-hidroxichalcona com o anel 2-furanila **43** não apresentou atividade. Além da otimização da potência, também foi possível otimizar a seletividade, como no caso da 4'-hidroxichalcona **44** com anel fenílico e o análogo **45** com 2-tiofenila. Portanto, o

bioisosterismo clássico de anéis equivalentes, nesse estudo, se mostrou excelente como estratégia de modificação molecular para o planejamento de análogos chalcônicos.

Figura 15. Hidroxichalconas ativas contra *T. vaginalis* planejadas utilizando a estratégia de bioisosterismo (OLIVEIRA, 2017).



Autoria própria.

Como uma alternativa de anel π -isoeletrônico e isóstero do anel fenila, os anéis 3- e 4-piridila não foram contemplados no planejamento estrutural de OLIVEIRA (2017).

1.8. A Ancoragem Molecular como Ferramenta para a Descoberta de Fármacos contra *Trichomonas vaginalis*

Os estudos computacionais pioneiros tiveram início em 1970, por meio de análises da Relação Quantitativa entre Estrutura e Atividade (QSAR, do inglês...) por parâmetros definidos por HANSCH (1969), no tempo em que era possível considerar moléculas apenas em forma bidimensional e suas propriedades biológicas correspondiam às propriedades físico-químicas e funções matemáticas (HANSCH, 1993; HEAD-GORDON, 1996).

Segundo BATISTA e coautores (2021), a ancoragem ou docagem molecular é uma metodologia *in silico* que fornece o prognóstico dos modos de ligação de micromoléculas (ou

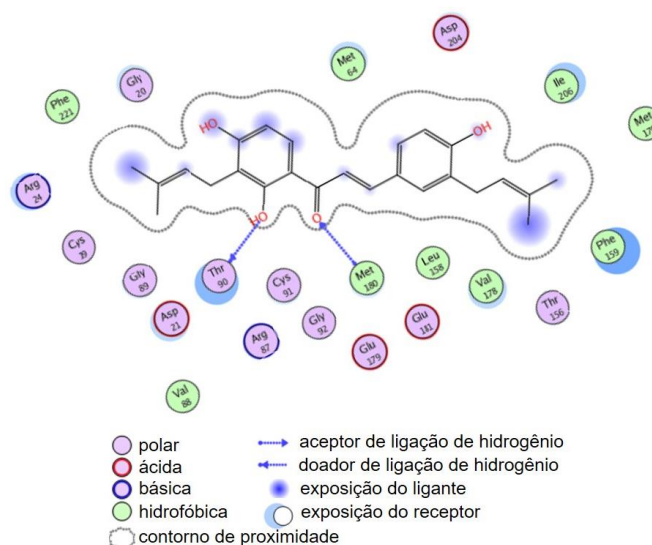
macromoléculas) ao interagirem com um sítio receptor. Além de prever as interações entre os possíveis ligantes e o alvo molecular selecionado, a ancoragem molecular é utilizada como ferramenta e acelera o desenvolvimento de pesquisas relevantes diante do maior desafio que é o tempo necessário para a descoberta de fármacos.

Segundo BARREIRO & FRAGA (2008), a associação de dados experimentais a estudos de ancoragem molecular pode prever a potência de uma subunidade estrutural e correlacionar às suas propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas, relacionadas a Absorção, Distribuição, Metabolismo e Eliminação (ADME).

A complexidade do sistema em estudo é um dos principais parâmetros para a realização de estudos de ancoragem molecular, além da acurácia e o tempo gasto na pesquisa (BARREIRO & FRAGA, 2008). Devido à complexidade e ao número restrito de estudos científicos relacionados com a tricomoníase, principalmente, a existência de poucos estudos computacionais, torna-se relevante a busca por alvos terapêuticos para o tratamento da tricomoníase visando combater o agente etiológico *T. vaginalis*.

SETZER e colaboradores (2017), em seu estudo, apontaram quatro enzimas de *T. vaginalis* que desempenham papéis importantes no metabolismo celular: tiorredoxina redutase (TvTXR), lactato desidrogenase (TvLDH), metionina- γ -liase (TvMGL) e purina-nucleosideo-fosforilase (TvPNP). Os resultados preliminares desse estudo teórico indicaram que a chalcona tri-hidroxilada diprenilada 35, figura 16, atuou como melhor potencial ligante (Pontuação de docagem ou *Docking Score* [DS] = $-141,3$ kJ/mol) para a proteína TvPNP (purina nucleosideo-fosforilase do *T. vaginalis*), apresentando seletividade *in silico* superior à enzima homóloga humana (*Homo sapiens*), HsPNP (DS = $-105,9$ kJ/mol).

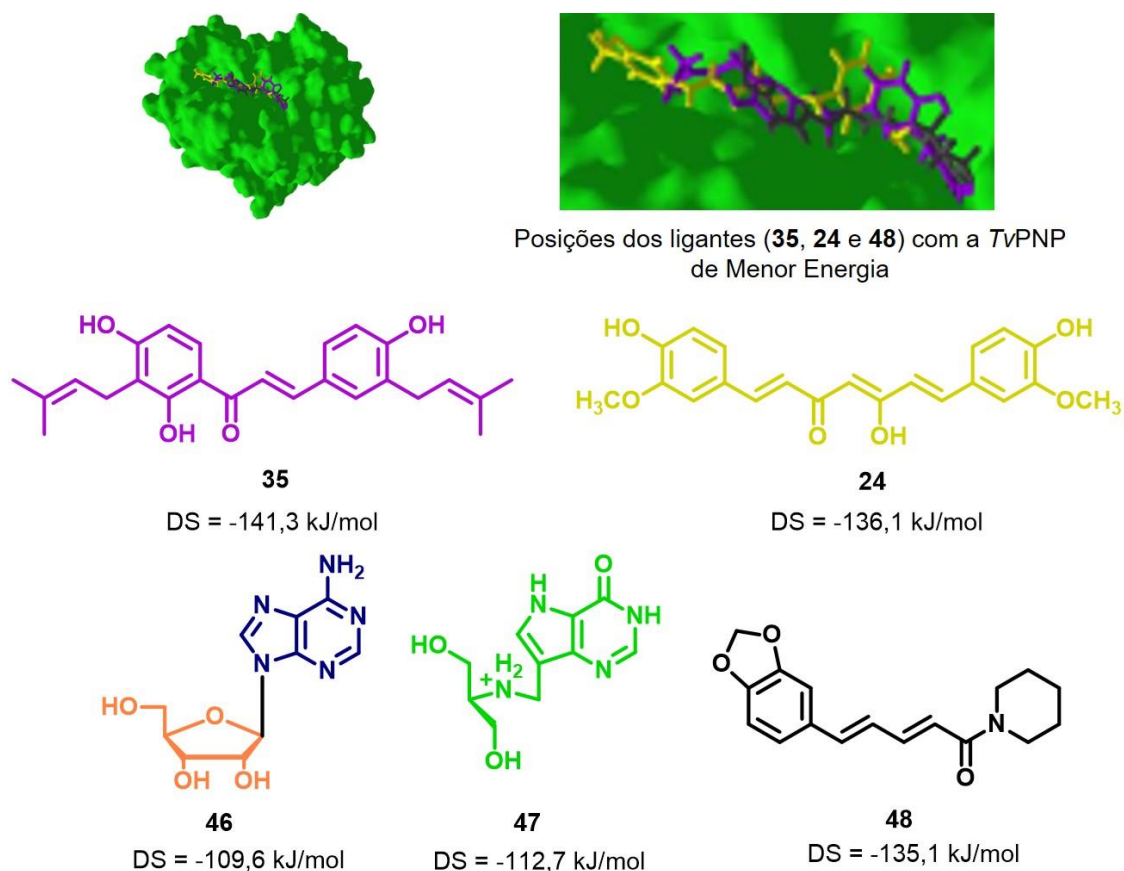
Figura 16. Modelo bidimensional (2D) da ancoragem da chalcona **35** com a TvPNP.



Adaptado de SETZER et al., 2017.

É relevante destacar que a chalcona **35**, figura 16, interagiu mais com a TvPNP do que seu ligante co-cristalizado formicina A **46** ($DS = -109,6$ kJ/mol), figura 17, mais do que o inibidor sintético SerMe-imucilina **47** ($DS = -112,7$ kJ/mol) e teve uma interação maior do que a curcumina **24** ($DS = -136,1$ kJ/mol) e o alcaloide piperina **48** ($DS = -135,1$ kJ/mol). As principais interações entre os ligantes (chalcona **35**, curcumina **24** e piperina **48**) e a TvPNP foram com os resíduos dos aminoácidos treonina (Thr90), fenilalanina (Phe159), valina (Val178), metionina (Met180) e glutamina (Glu179), sendo considerado o sítio da enzima.

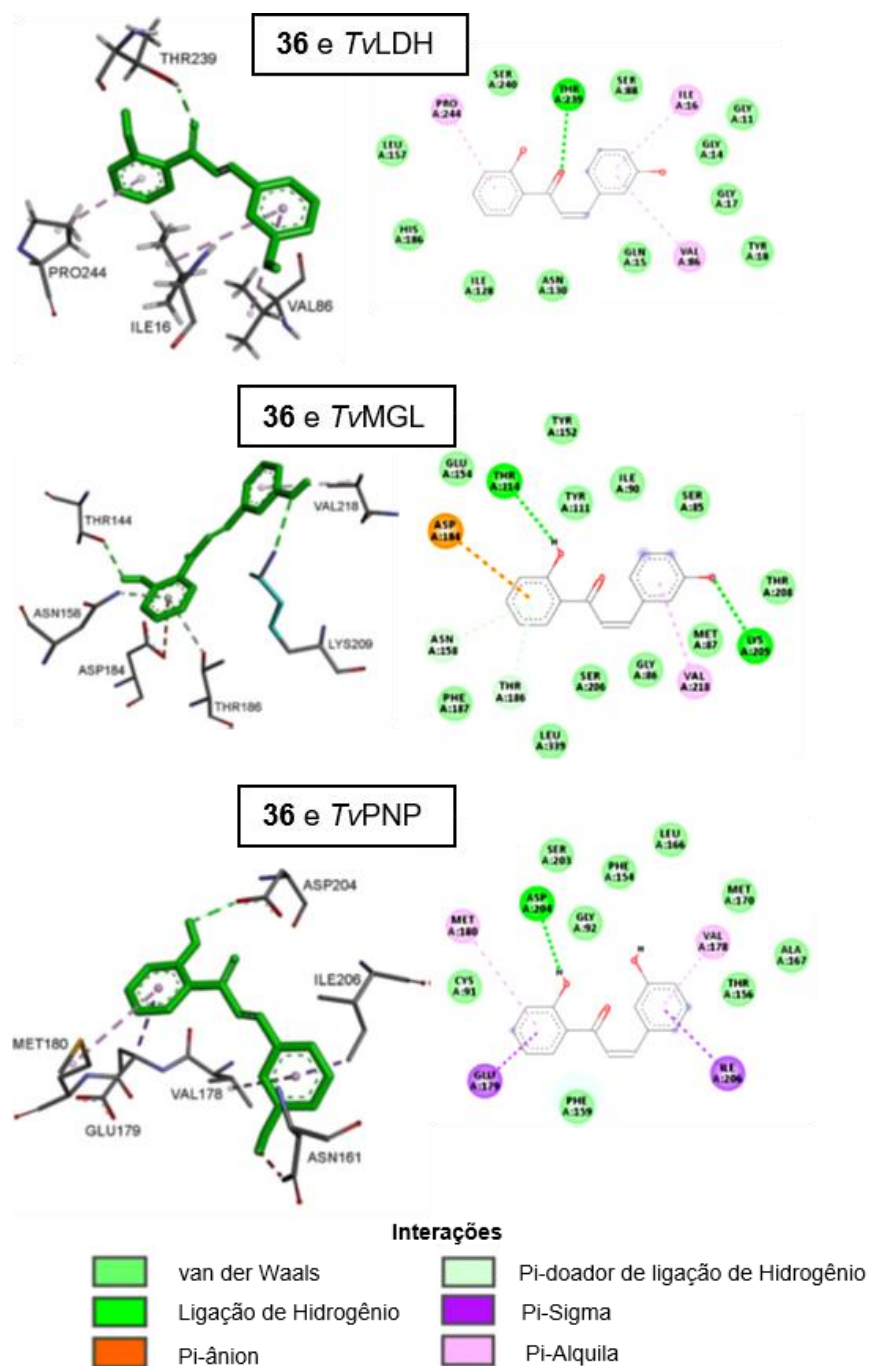
Figura 17. Modelo tridimensional e Possíveis Ligantes da TvPNP (SETZER et al., 2017).



Adaptado de SETZER et al., 2017.

NEVES e colaboradores, 2020, baseado no estudo de SETZER e colegas (2017), também realizaram a síntese de 2'-hidroxichalconas e testaram a atividade contra trofozoítos de *T. vaginalis*. A 2'-hidroxichalcona **36** (figura 12, como potencial ligante potente das) se destacou por ser a mais ativa em associação com MTZ e foi selecionada para avaliar *in silico* sua afinidade com as enzimas lactato desidrogenase (TvLDH), metionina gamma-liase (TvMGL) e purina nucleosídeo fosforilase (TvPNP), em que se mostrou ligante promissora, figura 18.

Figura 18. Modelos tridimensionais e bidimensionais do estudo de ancoragem molecular realizado por NEVES e coautores (2020).



Adaptado/Autoria própria.

CONCLUSÕES

Esse trabalho buscou evidenciar a atividade antiparasitária de 77 hidroxichalconas contra *Trichomonas vaginalis*, contemplando o planejamento, síntese, purificação e confirmação estrutural das chalconas para posterior avaliação contra trofozoítos isolados de *T. vaginalis* sensíveis ao metronidazol (ATCC).

Os primeiros resultados obtidos com 21 chalconas protagonizaram a maior potência de **4HC**, pelo valor de $CI_{50} = 27.5 \mu M$ dentre as hidroxichalconas avaliadas quanto à atividade antiparasitária, indicando a importância da hidroxila no anel A chalcônico na posição 4'. Devido ao seu destaque como mais ativa, a **4HC** foi selecionada para os ensaios de avaliação farmacológica, os quais apontaram que a mesma não é tóxica, nos ensaios de toxicidade *in vitro* contra eritrócitos humanos e *in vivo* em larvas de *Galleria mellonella*. Trofozoítos de *T. vaginalis* foram tratados com **4HC** e não apresentaram o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), no entanto, a **4HC** foi capaz de aumentar o acúmulo de ROS em neutrófilos coincubados com *T. vaginalis*. Os experimentos de qRT-PCR indicaram que **4HC** não afetaram a expressão genética da piruvato:ferredoxina oxirredutase (*PFOR*) e *β -tubulina*. Perante a isso, foram realizadas simulações *in silico* utilizando a enzima purina nucleosídeo fosforilase de *T. vaginalis*, corroborando para que a **4HC** seja considerada como ligante promissora, estabelecendo interações (hidrofóbicas e ligações de hidrogênio) com os resíduos de aminoácidos D21, G20, M180, R24, R87 e T90. Dessa forma, os resultados de **4HC** salientam o potencial de chalconas fenólicas para combater a infecção parasitária negligenciada tricomoniase.

Em um outro painel de 56 chalconas fenólicas testadas contra trofozoítos isolados de *T. vaginalis*, quatro hidroxichalconas se destacaram por apresentar os menores valores de CI_{50} variando de 11,5 a 15,0 μM : 2'-hidroxichalcona **29** (anel B = 3-piridila) e as 3'-hidroxichalconas **34** (anel B = 2,6-diclorofenila), **41** (anel B = 4-nitrofenila) e **43** (anel B = 4-piridila). Nos ensaios de citotoxicidade das mais ativas, a 2'-hidroxichalcona **29** não foi tóxica contra células vaginais (linhagem HMVII) e nem contra fibroblastos do pulmão (linhagem MRC-5), obtendo o valor de $CC_{50} > 100 \mu M$ e, portanto, o maior índice de seletividade. O estudo de ancoragem molecular mostrou que as chalconas **29**, **34**, **41** e **43** podem ser consideradas como ligantes promissoras da enzima TvPNP, indicando essa peptidase como importante chave no mecanismo de ação das hidroxichalconas.

Juntos, todos os resultados abrem novas possibilidades para as hidroxichalconas atuarem como substâncias anti-*Trichomonas vaginalis*.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, F. W. et al. Evolutionary relationships among pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. Regio-specific alpha, beta, and gamma families. **European Journal of Biochemistry**, v. 219, p. 953–960, 1994. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18577.x>
- AMIN, A. et al. Trichomonads in birds - a review. **Parasitology**, v. 141, 733–747, 2014. <https://doi.org/10.1017/S0031182013002096>
- ANTHWAL, A. et al. Novel metronidazole-chalcone conjugates with potential to counter drug resistance in *Trichomonas vaginalis*, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 79, p. 89–94, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.03.076>
- ARDALAN, S. et al. *Trichomonas vaginalis*: the adhesins AP51 and AP65 bind heme and hemoglobin. **Experimental Parasitology**, v. 121, p. 300–306, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.11.012>
- BALA, V. et al. Design and synthesis of substituted morpholine/piperidin-1-yl-carbamodithioates as promising vaginal microbicides with spermicidal potential. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 5782–5786, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.10.040>
- BALA, V. et al. N-Alkyl/aryl-4-(3-substituted-3-phenylpropyl)piperazine-carbothioamide as dual-action vaginal microbicides with reverse transcriptase inhibition. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 640–650, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.07.021>
- BARREIRO, E. J. & FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: bases moleculares da ação dos fármacos**. 2ª edição. Editora Artmed, Porto Alegre, 608 p., 2008.
- BATISTA, V. S. et al. Construção, Otimização e Ancoragem Molecular de Substâncias Bioativas em Biomacromoléculas: Um Tutorial Prático. **Química Nova**, v. 15, p. 1–12, 2021. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170821>
- BENCHIMOL, M. New ultrastructural observations on the skeletal matrix of *Tritrichomonas foetus*. **Parasitology Research**, v. 97, p. 408–416, 2005. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1480-x>

BENCHIMOL, M. The Mastigont System in Trichomonads. In: de Souza W. (eds) Structures and Organelles in Pathogenic Protists. **Microbiology Monographs**, Springer, Berlin, Heidelberg, vol 17, 26 p., 2010. https://doi.org/10.1007/978-3-642-12863-9_1

BITENCOURT, F. G. et al. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of ursolic acid derivative: a promising alternative. **Parasitology Research**, v. 117, p. 1573–1580, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5839-1>

BRUGEROLLE, G. Étude de la cryptopleuromitose et de la morphogenèse de division chez plusieurs genres de la trichomonadines primitive. **Protistologica**, v. 4, p. 457–68, 1975.

BZOWSKA, A., KULIKOWSKA, E. & SHUGAR, D. Properties of Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP) of Mammalian and Bacterial Origin. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 45, p. 59–70, 1990. <https://doi.org/10.1515/znc-1990-1-211>.

CARBALLO, R. M. et al. Synthesis and in vitro antiprotozoal activity of some 2-amino-4-phenyloxazole derivatives. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 16, p.1951–1956, 2017. <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v16i8.27>

CARLTON, J. M. et al. Draft Genome Sequence of the Sexually Transmitted Pathogen *Trichomonas vaginalis*. **Science**, v. 315, p. 207–212, 2007. <https://doi.org/10.1126/science.1132894>

CAVALIER-SMITH, T. Early evolution of eukaryote feeding modes, cell structural diversity, and classification of the protozoan phyla Louksozoa, Sulcozoa, and Choanozoa. **European Journal of Protistology**, 49, p. 115–78. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2012.06.001>

CHACON, M.O. et al. Chlorinated metronidazole is a promising alternative for treating trichomoniasis. **Parasitology Research**, v. 117, p. 1333–1340, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5813-y>

CHAMPNEY, W. S. et al. Ribosomes from trichomonad protozoa have prokaryotic characteristics. **International Journal of Biochemistry**, v. 24, p. 1125–1133, 1992. [https://doi.org/10.1016/0020-711X\(92\)90383-C](https://doi.org/10.1016/0020-711X(92)90383-C)

CHAPMAN, A. et al. The generation of metronidazole radicals in hydrogenosomes isolated from *Trichomonas vaginalis*. **Microbiology**, v. 131, p. 2141–2144, 1985. <https://doi.org/10.1099/00221287-131-9-2141>

COOMBS, G. H. et al. The Amitochondriate Eukaryote *Trichomonas vaginalis* Contains a Divergent Thioredoxin-linked Peroxiredoxin Antioxidant System. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 5249–5256, 2004. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304359200>

COSAR, C. & JULOU, L., The activity of 1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole (R. P. 8823) against experimental *Trichomonas vaginalis* infections, **Annals of Journal of Institute Pasteur (Paris)**, v. 96, p. 238–241, 1959.

CUERVO, P. et al. Differential soluble protein expression between *Trichomonas vaginalis* isolates exhibiting low and high virulence phenotypes. **Journal of Proteomics**, v. 71, p. 109–122, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2008.01.010>

DACKS J. B., WALKER, G. & FIELD, M. C. Implications of the new eukaryotic systematics for parasitologists. **Parasitology International**, v. 57, p. 97–104, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2007.11.004>

DE CARLI, G. A., *Trichomonas*. In: NEVES, D. P., **Parasitologia Humana**, 10^a Edição, São Paulo: Editora Atheneu, 2000.

DECK, L.M. et al. Selective Inhibitors of Human Lactate Dehydrogenases and Lactate Dehydrogenase from the Malarial Parasite *Plasmodium falciparum*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 3879–3887, 1998. <https://doi.org/10.1021/jm980334n>

DE JESUS, J. B. et al. *Trichomonas vaginalis* virulence against epithelial cells and morphological variability: the comparison between a well-established strain and a fresh isolate. **Parasitology Research**, v. 93, p. 369–377, 2004. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1134-4>

EDWARDS, T.E. & ARAKAKI, T.L. Crystal structure of a thioredoxin reductase from *Brucella melitensis*, **Seattle Structural Genomics Center for Infectious Disease (SSGCID)**, DOI: 10.2210/pdb4jnp/pdb

EDWARDS, T. et al. *Trichomonas vaginalis*: Clinical relevance, pathogenicity and diagnosis. **Critical reviews in microbiology**, v. 42, p. 406–417, 2016. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.958050>

FARMER, M. A. Ultrastructure of *Ditrichomonas honigbergii* n. g., n. sp. (Parabasalia) and its relationships to amitochondrial protists. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 40, p. 619–626, 1993. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1993.tb06119.x>

FIGUEROA-ÂNGULO, E. E. et al. The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. **Microbes and Infection**, v. 14, p. 1411–1427, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.09.004>

FRIEDMAN, M. et al, The Inhibitory Activity of Anthraquinones against Pathogenic Protozoa, Bacteria, and Fungi and the Relationship to Structure. **Molecules**, v. 25, 3101, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25133101>

GIORDANI, R. B. et al. Anti-protozoal activity of diamine derivatives. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 65, p. 60–62, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2010.10.006>

GOODALL, G., MOTTRAM, J. C., COOMBS, G. H. & LAPTHORN, A. J. The structure and proposed catalytic mechanism of methionine gamma-lyase, DOI: 10.2210/pdb1e5f/pdb

GOODWIN, A. et al. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (rdxA) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. **Molecular Microbiology**, v. 28, p. 383–393, 1998. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00806.x>

GORRELL, T. E. Effect of Culture Medium Iron Content on the Biochemical Composition and Metabolism of *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Bacteriology**, v. 161, p. 1228–1230, 1985. <https://doi.org/10.1128/JB.161.3.1228-1230.1985>

GRANGER, B. L. et al. Transient invagination of flagella by *Tritrichomonas foetus*. **Parasitology Research**, v. 86, p. 699–709, 2000. <https://doi.org/10.1007/PL00008555>

HANSCH, C. Quantitative approach to biochemical structure-activity relationships. **Accounts of Chemical Research**, v. 2, p. 232–239, 1969. <https://doi.org/10.1021/ar50020a002>

HANSCH, C. Quantitative structure-activity relationships and the unnamed science. **Accounts of Chemical Research**, v. 26, p. 147–153, 1993. <https://doi.org/10.1021/ar00028a003>

HARRIS, D. I. et al. Nucleoside uptake by *Trichomonas vaginalis*. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 29, p. 105–116, 1988. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(88\)90065-5](https://doi.org/10.1016/0166-6851(88)90065-5).

HEAD-GORDON, M. Quantum Chemistry and Molecular Processes. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 100, 13213–13225, 1996. <https://doi.org/10.1021/jp953665+>

HELMS, D. J. et al. Management of *Trichomonas vaginalis* in women with suspected metronidazole hypersensitivity. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 198, p. 370–377, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2007.10.795>

HEYWORTH, P. G., GUTTERIDGE, W. E. & GINGER, C. D. Purine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. **FEBS Letters**, v. 141, 106–110, 1982. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(82\)80026-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(82)80026-4).

HIRT, R.P. et al. The diversity and evolution of thioredoxin reductase: new perspectives. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 302–308, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02293-6](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02293-6)

HIRT, R.P. et al. Chapter 2 - *Trichomonas vaginalis* Pathobiology: New Insights from the Genome Sequence, in: **Advances in Parasitology**, v. 77, p. 87–140, 2011. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391429-3.00006-X>

HONIGBERG, B. M. Remarks upon trichomonad affinities of certain parasitic protozoa. **In Progress in Protozoology: Abstracts of Papers Read at the 4th International Congress of Protozoology**, p. 187, 1973.

HRDÝ, I. et al. Alternative Pathway of Metronidazole Activation in *Trichomonas vaginalis* Hydrogenosomes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 5033–5036, 2005. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.12.5033-5036.2005>

HUANG, K.-Y. et al. A proteome reference map of *Trichomonas vaginalis*. **Parasitology Research**, v. 104, p. 927–933, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1274-z>

INGS, R.M.J. et al. The mode of action of metronidazole in *Trichomonas vaginalis* and other micro-organisms. **Biochemical Pharmacology**, v. 23, p. 1421–1429, 1974. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(74\)90362-1](https://doi.org/10.1016/0006-2952(74)90362-1)

INOUE, H. et al. Role of Tyrosine 114 of L-methionine γ -lyase from *Pseudomonas putida*. **Bioscience, Biotechnology & Biochemistry**, v. 64, p. 2336–2343, 2000. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.2336>

JENSEN, K.F. & NYGAARD, P. Purine Nucleoside Phosphorylase from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **European Journal of Biochemistry**, v. 51, p. 253–265, 1975. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1975.tb03925.x>

KIRAN KUMAR, S.T.V.S. et al. Carbodithioic acid esters of fluoxetine, a novel class of dual-function spermicides. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 2247–2256, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.10.024>

KIRBY, B. Observation of the trichomonad flagellates of the reproductive organs of cattle. **Journal of Parasitology**, v. 37, p. 445–459, 1951. <https://doi.org/10.2307/3273552>

KOROLKOVAS, A. & BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 783 p., 1988.

KOZLOWSKI, D. et al. Density Functional Theory Study of the Conformational, Electronic, and Antioxidant Properties of Natural Chalcones. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 111, p. 1138–1145, 2007. <https://doi.org/10.1021/jp066496+>

KULDA, J. Trichomonad, hydrogenosomes and drug resistance. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 199–212, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00155-6](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00155-6)

KUMAR, L. et al, Imidazole derivatives as possible microbicides with dual protection. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 817–824, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.10.021>

KUMAR, S. et al. Highly Potent 1*H*-1,2,3-Triazole-Tethered Isatin-Metronidazole Conjugates Against Anaerobic Foodborne, Waterborne, and Sexually-Transmitted Protozoal Parasites. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 1–9, 2018. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00380>

KWON, D.-H. et al. Analysis of rdxA and Involvement of Additional Genes Encoding NAD(P)H Flavin Oxidoreductase (FrxA) and Ferredoxin-Like Protein (FdxB) in Metronidazole Resistance of *Helicobacter pylori*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 2133–2142, 2000. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.8.2133-2142.2000>

LAND, K. M., CLEMENS, D. L. & JOHNSON, P.J., Loss of multiple hydrogenosomal proteins associated with organelle metabolism and high-level drug resistance in trichomonads. **Experimental Parasitology**, v. 97, p. 102–111, 2001. <https://doi.org/10.1006/expr.2001.4587>

LECKE, S. B. et al. Perspective of a New Diagnostic for Human Trichomonosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 273–276, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000200018>

LEHKER, M. W.; ALDERETE, J. F. Iron regulates growth of *Trichomonas vaginalis* and the expression of immunogenic trichomonad proteins. *Molecular Microbiology*, v. 6, p. 123–132, 1991.

LEITSCH, D. et al. Nitroimidazole Action in *Entamoeba histolytica*: A Central Role for Thioredoxin Reductase. **PLOS Biology**, v. 5, p. 1820–1834, 2007. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050211>

LEITSCH, D. et al. *Trichomonas vaginalis*: metronidazole and other nitroimidazole drugs are reduced by the flavin enzyme thioredoxin reductase, disrupting the cellular redox system. Implications for nitroimidazole toxicity and resistance. **Molecular Microbiology**, v. 72, p. 518–536, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06675.x>

LEMKE, T. L. Antiparasitic Agents. In: LEMKE, T. L., WILLIAMS, D. A., **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**, Editora Lippincott Williams & Wilkins, 1377 p., 2008.

LIMA, L. M. & BARREIRO, E. J. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design, **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 23–49, 2005. <https://doi.org/10.2174/0929867053363540>

LINDMARK, D.G. & MÜLLER, M. Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate, *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 248, p. 7724–7728, 1973. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)43249-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)43249-3)

LIPMAN, N. S. et al. Identification of pseudocysts of *Tritrichomonas muris* in Armenian hamsters and their transmission to mice. **Laboratory Animal Science**, v. 49, p. 313–315, 1999.

MACHADO, A. C. et al. Detecção de Genes e Proteínas. **REVISTA CIENTIFICA DA UNIFENAS**, v. 7, p. 1–22, 2013. <https://revistas.unifenas.br/index.php/RE3C/article/view/9>

MADEIRO DA COSTA, R. F. & BENCHIMOL, M. The effect of drugs on cell structure of *Tritrichomonas foetus*. **Parasitology Research**, v. 92, p.159–170, 2004. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-1023-2>

MAEDA, K. et al. A new antibiotic, azomycin. **Journal of Antibiotic (Tokyo)**, v. 6, p. 182, 1953.

MALLO, N. et al. Molecular Targets Implicated in the Antiparasitic and Anti-Inflammatory Activity of the Phytochemical Curcumin in Trichomoniasis. **Molecules**, v. 25, 5321, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25225321>

MATTERN, C. F. et al. Fine-Structural changes associated with pseudocyst formation in *Trichomitus batrachorum*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 20, p. 222–229, 1973. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1973.tb00869.x>

MENEZES et al. Trichomoniasis – are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide? **Microbial Cell**, v. 3, p. 404–419, 2016. <https://doi.org/10.15698/mic2016.09.526>

MENEZES, C. B. et al, The anti-*Trichomonas vaginalis* phloroglucinol derivative isoaustralobasilol B modulates extracellular nucleotide hydrolysis. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 90, p. 811–819, 2017. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13002>

MEYER, Y. et al. Thioredoxins and Glutaredoxins: Unifying Elements in Redox Biology. **Annual Review of Genetics**, v. 43, p. 335–367, 2009. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134201>

MILLER, R. L. & LINDSTEAD, D. Purine and pyrimidine metabolizing activities in *Trichomonas vaginalis* extracts. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 7, p. 41–51, 1983. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(83\)90115-9](https://doi.org/10.1016/0166-6851(83)90115-9).

MORENO-BRITO, V. et al. *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate: ferredoxin oxidoreductases a surface adhesin induced by iron. **Cellular Microbiology**, v. 2, p. 245–258, 2005.

MÜLLER, M. et al. Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, p. 444–495, 2012. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05024-11>

NEVES, D. P. & FILIPPIS, T. **Parasitologia Básica**. 2ª edição. Editora Atheneu, 224 p., 2010.

NEVES, R. N. et al. 2'-Hydroxychalcones as an alternative treatment for trichomoniasis in association with metronidazole. **Parasitology Research**, v. 119, p. 725–736, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06568-4>

NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 125–137, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.09.019>

OLIVEIRA, L. R. **Planejamento, Síntese e Atividade contra *Trichomonas vaginalis* de Hidroxichalconas e Ferrocenilchalconas**. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 131 p., 2017.

PATCHETT, A. A. & NARGUND, R. P. Chapter 26. Privileged structures - An update. **Annual Reports in Medicinal Chemistry**, v. 35, p. 289–298, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0065-7743\(00\)35027-8](https://doi.org/10.1016/S0065-7743(00)35027-8)

PAULAI, F. R. et al. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Química Nova**, v. 32, p. 1013–1020, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000400032>

PEREIRA-NEVES, A. et al. Pseudocysts in trichomonads—new insights. **Protist**, v. 154, p. 313–329, 2003. <https://doi.org/10.1078/143446103322454095>

PEREIRA-NEVES, A. et al. Cytotoxic effects exerted by *Tritrichomonas foetus* pseudocysts. **Protist**, v. 163, p. 529–543, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2011.11.005>

PÉREZ-VILLANUEVA, J. et al. Synthesis and Biological Evaluation of 2*H*-Indazole Derivatives: Towards Antimicrobial and Anti-Inflammatory Dual Agents. **Molecules**, v. 22, p. 1–15, 2017. <https://doi.org/10.3390/molecules22111864>

PESSÔA, S. B. & MARTINS, A. V. **Parasitologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 872 p., 1982.

PETRIN, D. et al. Clinical and Microbiological Aspects of *Trichomonas vaginalis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 300–317, 1998. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.2.300>

PETRÓ-SILVEIRA, B. et al. *Trichomonas vaginalis* NTPDase inhibited by lycorine modulates the parasite-neutrophil interaction. **Parasitology Research**, v. 119, p. 2587–2595, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06739-8>

POOLE, D. N. & MCCLELLAND, R. S. Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. **Sexually Transmitted Infections**, v. 89, p. 418-422, 2013.

REY, L. **As Bases da Parasitologia Médica**. 3ª edição. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 391 p., 2010.

RIBEIRO, K. C. et al. The mitotic spindle and associated membranes in the closed mitosis of trichomonads. **Biology of the Cell**, v. 94, p. 157–72, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0248-4900\(02\)01191-7](https://doi.org/10.1016/S0248-4900(02)01191-7)

RIGO, G. V. et al. Diamine derivative anti-*Trichomonas vaginalis* and anti-*Tritrichomonas foetus* activities by effect on polyamine metabolism, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 95, p. 847–855, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.007>

RIGO, G. V. & TASCA, T. Vaginitis: Review on Drug Resistance. **Current Drug Targets**, v. 21, p. 1–15, 2020. <https://doi.org/10.2174/1389450121666200804112340>

ROWLEY, J. et al. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: Global prevalence and incidence estimates, 2016. **Bulletin World Health Organization**, v. 97, p. 548–562, 2019. <https://doi.org/10.2471/BLT.18.228486>

SATO, D. & NOZAKI, T. Methionine gamma-lyase: The unique reaction mechanism, physiological roles, and therapeutic applications against infectious diseases and cancers. **IUBMB Life**, v. 61, p. 1019–1028, 2009. <https://doi.org/10.1002/iub.255>

SETZER, M.S. et al. Natural Products as New Treatment Options for Trichomoniasis: A Molecular Docking Investigation. **Scientia Pharmaceutica**, v. 85, p. 1–28, 2017. <https://doi.org/10.3390/scipharm85010005>

ŠLAPETA, J. et al. *Tritrichomonas foetus* from domestic cats and cattle are genetically distinct. **Experimental Parasitology**, v. 126, p. 209–213, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.04.024>

STEINDEL, P.A. et al. Gradual neofunctionalization in the convergent evolution of trichomonad lactate and malate dehydrogenases. **Protein Science**, v. 25, p. 1319–1331, 2016. <https://doi.org/10.1002/pro.2904>

TACHEZY, J., KULDA, J., & TOMKOVÁ, E. Aerobic resistance of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole induced *in vitro*. **Parasitology**, v. 106, p. 31–37, 1993. <https://doi.org/10.1017/S0031182000074783>

TANAKA, H., ESAKI, N. & SODA, K. A versatile bacterial enzyme: L-methionine γ -lyase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, p. 530–537, 1985. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(85\)90094-8](https://doi.org/10.1016/0141-0229(85)90094-8)

TAKEHARA, M. et al. Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of Purine Nucleoside Phosphorylase and Uridine Phosphorylase Genes from *Klebsiella* sp. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, p. 1987–1990, 1995. <https://doi.org/10.1271/bbb.59.1987>

TOCHER, J.H. & EDWARDS, D.I. The interaction of reduced metronidazole with DNA bases and nucleosides. **International Journal of Radiation Oncology*Biophysics**, v. 22, p. 661–663, 1992. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(92\)90498-7](https://doi.org/10.1016/0360-3016(92)90498-7)

TONEY, M. D. Reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 433, p. 279–287, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.09.037>

TOPLISS, J. G. Utilization of operational schemes for analog synthesis in drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 1006–1011, 1972. <https://doi.org/10.1021/jm00280a002>

TOPLISS, J. G., A manual method for applying the Hansch approach to drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 463–469, 1977. <https://doi.org/10.1021/jm00214a001>

TREIN, M. R. et al. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of chalcone and amino-analogues, **Parasitology Research**, v. 118, p. 607–615, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6164-4>

VIEIRA, P. B. et al. Caatinga plants: natural and semi-synthetic compounds potentially active against *Trichomonas vaginalis*. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v, 26, p. 2229–2236, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.03.061>

ZAHOOR, A. et al. DNA damage induced by reduced nitroimidazole drugs. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, p. 3299–3304, 1987. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(87\)90648-4](https://doi.org/10.1016/0006-2952(87)90648-4).

ZANG, Y. et al. Identification of a subversive substrate of *Trichomonas vaginalis* purine nucleoside phosphorylase and the crystal structure of the enzyme-substrate complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 22318–22325, 2005. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501843200>.

WENDEL, K.A. & WORKOWSKI K.A., Trichomoniasis: challenges to appropriate management, **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, p.123–129, 2007. <https://doi.org/10.1086/511425>

WERMUTH, C. G., **The Practice of Medicinal Chemistry**, editora C. G. Wermuth, Academic Press, London, 2^a Edição, 219 p., 2003.

WILLSON, R.L. & SEARLE, A.J.F. Metronidazole (Flagyl): iron catalysed reaction with sulphhydryl groups and tumor radiosensitization. **Nature**, v. 225, p. 498–500, 1975. <https://doi.org/10.1038/255498a0>

WU, G. et al. Convergent evolution of *Trichomonas vaginalis* lactate dehydrogenase from malate dehydrogenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, 6285–6290, 1999. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6285>