

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



**Tese**

**Avaliação de compostos naturais e sintéticos com ação anti- *Trichomonas vaginalis***

**Ângela Sena Lopes**

**Pelotas, 2018**

**Ângela Sena Lopes**

**Avaliação de compostos naturais e sintéticos com ação anti- *Trichomonas vaginalis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área do conhecimento: Parasitologia).

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sibeles Borsuk  
Coorientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lucielli Savegnago

Pelotas, 2018

Dados de catalogação na fonte:  
Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB-10/1032  
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

L864a

Lopes, Ângela Sena

Avaliação de compostos naturais e sintéticos com ação anti-*Trichomonas vaginalis* / Ângela Sena Lopes. – 222f. – Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2018. – Orientador Sibeles Borsuk; co-orientador Lucielli Savegnago.

1. Parasitologia. 2. Tricomoníase. 3. Tricomonicida. 4. Telúrio. 5. Própolis Vermelha Brasileira. 6. Citotoxicidade. 7. Quinolina. I. Borsuk, Sibeles. II. Savegnago, Lucielli. III. Título.

CDD: 616.951

**Ângela Sena Lopes**

**Avaliação de compostos naturais e sintéticos com ação anti- *Trichomonas vaginalis***

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

**Data da Defesa: 10/04/2018**

**Banca examinadora:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sibeles Borsuk (Orientador)  
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nara Amélia da Rosa Farias  
Doutora em Biologia Parasitária pela Fundação Oswaldo Cruz

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daiane Drawanz Hartwig  
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Fernandes Ramos  
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Camila Belmonte Oliveira  
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

**Dedico este trabalho à minha família,  
por todo incentivo, compreensão e amor.**

## Agradecimentos

A Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, pela oportunidade de realização deste doutorado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por me proporcionar uma bolsa de estudos.

Ao Centro de Biotecnologia e ao Instituto de Biologia, que me deram suporte técnico para poder realizar este trabalho.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Sibeles Borsuk, pela confiança depositada em mim na realização desse trabalho, já que era algo novo para nós duas. Muito obrigada por tornares os meus dias de trabalho prazerosos, produtivos e cheios de conhecimento. Agradeço imensamente por fazeres parte da minha vida, pela tua amizade, companheirismo, carinho, compreensão e orientação, és com certeza pessoa insubstituível em minha formação profissional e em minha vida pessoal. Sabes o quanto és importante para mim.

A minha coorientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Lucielli Savegnago, obrigada por acreditares em mim, pelas oportunidades que surgiram a partir de sua confiança, colaboração e orientação. Tua amizade e incentivo são muito valiosos.

A professora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Tiana Tasca que cedeu os isolados de *Trichomonas vaginalis* e com isso abriu as portas para a realização desse sonho.

Aos professores e colaboradores que contribuíram neste trabalho, obrigada por enriquecerem a minha formação.

Aos colegas do laboratório 03, obrigada por toda parceria, ajuda, descontração, vocês tornaram esse período da minha vida profissional uma experiência maravilhosa!

À “minha” eterna estagiária, Raquel, muito obrigada por toda ajuda, amizade, companheirismo e por acreditar que no final teríamos tantos frutos. Como de fato, tivemos! Muito obrigada!

À minha família pelo apoio incondicional ao longo desses anos de doutorado e ao longo da minha vida acadêmica. Muito obrigada pela compreensão!

E a todos que de alguma forma contribuíram nessa trajetória.

Muito obrigada!

## Lista de Figuras

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45

<b>Figura 1</b>	Vista geral de <i>Trichomonas vaginalis</i> (Tv) em três diferentes formas ....	<b>19</b>
<b>Figura 2</b>	Estrutura química das moléculas RF05, RF07 e RF19 .....	<b>37</b>
<b>Figura 3</b>	Estrutura química das moléculas de 1,3 dioxolanas contendo telúrio (PTeDOX).....	<b>37</b>
<b>Figura 4</b>	Estrutura química das moléculas de compostos enantiômeros de 4-aminoálcool quinolinas .....	<b>39</b>
<b>Figura 5</b>	Estrutura química da piranoquinolina (composto 39) .....	<b>40</b>

## Resumo

SENA-LOPES, Ângela. **Avaliação de compostos naturais e sintéticos com ação anti- *Trichomonas vaginalis***. 2018. 223f. Tese (Doutor em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

*Trichomonas vaginalis* é o protozoário flagelado causador da tricomoníase, doença sexualmente transmissível (DST) de origem não viral mais comum no mundo. A infecção é caracterizada por amplo espectro clínico, desde casos assintomáticos até severa vaginite. Levando em consideração o aumento da prevalência de infecções resistentes ao Metronidazol, a busca por fármacos para o tratamento da tricomoníase se faz necessária. Nesse contexto, o estudo da atividade biológica de compostos naturais, como o óleo essencial da própolis vermelha brasileira (OEP), e sintéticos, como 1,3-dioxolanas contendo telúrio (PTeDOX) e quinolinas-1,2,3-triazol carboxamidas (QTCA), se mostra importante, uma vez que suas propriedades já vem sendo caracterizadas. Sendo assim, nesse estudo foi avaliada a atividade *in vitro* anti-*T. vaginalis* de PTeDOX (PTeDOX 1, PTeDOX 2 e PTeDOX 3), do OEP e de QTCA (QTCA-1, QTCA-2 e QTCA-3). A atividade *in vitro* foi testada contra o isolado ATCC 30236 de *T. vaginalis*. PTeDOX 1, na concentração final de 90 µM (MIC), reduziu a viabilidade dos trofozoítos de *T. vaginalis* em 100% e o valor do IC<sub>50</sub> foi de 60 µM. A curva de crescimento cinético demonstrou que o PTeDOX 1, na concentração de 90 µM, diminuiu o crescimento em 22% no tempo de exposição de 12 h e induziu a morte de 100% dos trofozoítos no tempo de 24 h. A cultura de células CHO-K1 apresentou citotoxicidade de 44% na concentração de 90 µM e nas concentrações 6,25, 12,5 e 45 µM, o PTeDOX 1, demonstrou não ser mais citotóxico do que o fármaco comercial disponível para tricomoníase. Já o OEP na concentração final de 500 µg/mL (MIC), reduziu a viabilidade dos trofozoítos de *T. vaginalis* em 100% e o valor do IC<sub>50</sub> foi de 100 µg/mL. A curva de crescimento cinético do OEP demonstrou uma diminuição do crescimento de trofozoítos em 56% a uma concentração de 500 µg/mL após 12 h de exposição e induziu a morte de 100% dos trofozoítos às 24 h. Observou-se uma citotoxicidade de 92% nas células CHO-K1 quando testada a concentração de 500 µg/mL e não apresentou dano celular a 125 µg/mL. Além disso, a concentração de 200 µg/mL reduziu a viabilidade dos parasitos em 70%, não sendo citotóxica para CHO-K1. Dos compostos QTCA, somente o QTCA-2 na concentração final de 80 µM (MIC), reduziu a viabilidade dos trofozoítos em 100% e o IC<sub>50</sub> foi de 50 µM. A curva de crescimento cinético demonstrou que o composto QTCA-2 na concentração de 80 µM, diminuiu o crescimento em 70% no tempo de exposição de 12 h e induziu a morte de 100% dos trofozoítos no tempo de 24 h e em cultura de células CHO-K1 não apresentaram citotoxicidade. Além disso, não apresentou diferença significativa na expressão dos genes (PFOR A, PFOR B, Hydrogenase, Enzima málica D, β-tubulina) quando comparados com controles negativos, positivos e veículos. Com isso, os compostos PTeDOX 1, OEP e QTCA-2 são alternativas promissoras na busca de novos tratamentos para tricomoníase, e seu mecanismo de ação deve ser investigado.

**Palavras-chave:** Tricomoníase; Tricomonicida; Telúrio; Própolis Vermelha Brasileira; Citotoxicidade, Quinolina



## Abstract

SENA-LOPES, Ângela. **Evaluation of natural and synthetic compounds with anti-*Trichomonas vaginalis* action.** 2018. 223f. Tese (Doutor em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

*Trichomonas vaginalis* is the flagellate protozoan that causes trichomoniasis, the most common non-viral sexually transmitted disease (STD) in the world. The infection is characterized by a broad clinical spectrum, from asymptomatic cases to severe vaginitis. It can cause complications in pregnancy, cervical and prostate cancer, and the parasite acts as a cofactor in the acquisition of HIV virus. Taking into account the increased prevalence of Metronidazole-resistant infections, the search for drugs for the treatment of trichomoniasis is necessary. In this context, the study of the biological activity of natural compounds such as Brazilian red propolis (OEP) and synthetic oils, such as 1,3-dioxolanes containing tellurium (PTeDOX) and quinolines-1,2,3-triazoyl carboxamides (QTCA), is important, since its properties have already been characterized. Thus, in this study, the in vitro anti-*T. vaginalis* activity was evaluated of PTeDOX (PTeDOX 1, PTeDOX 2 and PTeDOX 3), EPO and QTCA (QTCA-1, QTCA-2 and QTCA-3). In vitro activity was tested against ATCC 30236 isolate from *T. vaginalis*. PTeDOX 1, at the final concentration of 90  $\mu\text{M}$  (MIC), reduced the viability of *T. vaginalis* trophozoites by 100% and the IC 50 value was 60  $\mu\text{M}$ . The kinetic growth curve showed that PTeDOX 1 at 90  $\mu\text{M}$  concentration decreased growth by 22% at the exposure time of 12 h and induced death of 100% of the trophozoites in the time of 24 h. The CHO-K1 cell culture showed a cytotoxicity of 44% at the concentration of 90  $\mu\text{M}$  and at the concentrations 6.25, 12.5 and 45  $\mu\text{M}$ , PTeDOX 1 was shown to be no more cytotoxic than the commercial drug available for trichomoniasis. On the other hand, the EPO at the final concentration of 500  $\mu\text{g} / \text{mL}$  (MIC) reduced the viability of *T. vaginalis* trophozoites by 100% and the IC50 value was 100  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . The kinetic growth curve of EPO demonstrated a 56% decrease in trophozoite growth at a concentration of 500  $\mu\text{g} / \text{ml}$  after 12 h of exposure and induced the death of 100% trophozoites at 24 h. A 92% cytotoxicity was observed in CHO-K1 cells when tested at 500  $\mu\text{g} / \text{mL}$  and did not show cell damage at 125  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . In addition, the concentration of 200  $\mu\text{g} / \text{mL}$  reduced the viability of the parasites by 70% and was not cytotoxic to CHO-K1. Of the QTCA compounds, only the final concentration of 80  $\mu\text{M}$  QTCA-2 (MIC) reduced the viability of the trophozoites by 100% and the IC 50 was 50  $\mu\text{M}$ . The kinetic growth curve demonstrated that the 80  $\mu\text{M}$  QTCA-2 compound decreased growth by 70% at the exposure time of 12 h and induced the death of 100% of the trophozoites in the 24 h time in culture of CHO- K1 showed no cytotoxicity. In addition, there was no significant difference in gene expression (PFOR A, PFOR B, Hydrogenase, Enzima malic enzyme D,  $\beta$ -tubuline) when compared to negative, positive controls and vehicles. Thus, PTeDOX 1, OEP and QTCA-2 are promising alternatives in the search for new treatments for trichomoniasis, and its mechanism of action should be investigated.

**Key words:** Trichomoniasis; Trichomonicide; Tellurium; Brazilian Red Propolis; Cytotoxicity, Quinoline

## SUMÁRIO

1		
2		
3		
4	<b>1 Introdução.....</b>	<b>14</b>
5	<b>2 Objetivos .....</b>	<b>17</b>
6	<b>2.1 Objetivos Gerais .....</b>	<b>17</b>
7	<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>17</b>
8	<b>3 Revisão de literatura .....</b>	<b>18</b>
9	<b>3.1 <i>Trichomonas vaginalis</i>.....</b>	<b>18</b>
10	<b>3.2 Tricomoníase .....</b>	<b>20</b>
11	<b>3.3 Diagnóstico Laboratorial .....</b>	<b>25</b>
12	<b>3.4 Tratamento e Resistência medicamentosa .....</b>	<b>27</b>
13	<b>3.5 Compostos Naturais e Sintéticos como novas alternativas no tratamento</b>	
14	<b>da tricomoníase.....</b>	<b>32</b>
15	<b>3.5.1 Óleo Essencial da Própolis Vermelha Brasileira .....</b>	<b>33</b>
16	<b>3.5.2 Moléculas de 1-3 Dioxolanas contendo Telúrio.....</b>	<b>35</b>
17	<b>3.5.3 Moléculas de quinolina-1,2,3-triazoil-carboxamidas .....</b>	<b>38</b>
18	<b>4 Artigo 1. Antiparasitic activity of 1,3-dioxolanes containing tellurium in</b>	
19	<b><i>Trichomonas vaginalis</i>.....</b>	<b>42</b>
20	<b>Abstract.....</b>	<b>43</b>
21	<b>Introduction .....</b>	<b>42</b>
22	<b>Materials and methods .....</b>	<b>45</b>
23	<b>Chemicals .....</b>	<b>45</b>
24	<b>Parasite culture conditions .....</b>	<b>45</b>
25	<b><i>Anti-Trichomonas vaginalis</i> assay .....</b>	<b>46</b>
26	<b>Cytotoxicity assay .....</b>	<b>47</b>
27	<b>Statistical analysis .....</b>	<b>47</b>
28	<b>Results .....</b>	<b>48</b>
29	<b><i>Anti-Trichomonas vaginalis</i> assay .....</b>	<b>48</b>
30	<b>Kinetic growth analysis.....</b>	<b>48</b>
31	<b>Cytotoxicity assay .....</b>	<b>48</b>
32	<b>Discussion .....</b>	<b>49</b>
33	<b>Conclusions .....</b>	<b>49</b>
34	<b>Conflicts of interest .....</b>	<b>49</b>
35	<b>Acknowledgement .....</b>	<b>48</b>

1	<b>References</b> .....	<b>50</b>
2	<b>Figure Legends</b> .....	<b>53</b>
3	<b>Figure 1</b> .....	<b>54</b>
4	<b>Figure 2</b> .....	<b>55</b>
5	<b>Figure 3</b> .....	<b>56</b>
6	<b>Figure 4</b> .....	<b>57</b>
7	<b>Figure 5</b> .....	<b>58</b>
8	<b>5 Artigo 2. Chemical composition, immunostimulatory, cytotoxic and</b>	
9	<b>antiparasitic activities of the essential oil from Brazilian red propolis</b>	
10	.....	<b>59</b>
11	<b>Abstract</b> .....	<b>60</b>
12	<b>1 Introduction</b> .....	<b>61</b>
13	<b>2 Materials and methods</b> .....	<b>63</b>
14	<b>2.1 Red propolis sample collection and essential oil preparation</b> .....	<b>63</b>
15	<b>2.1.1 Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS)</b> .....	<b>64</b>
16	<b>2.2 Anti-<i>Trichomonas vaginalis</i> assay</b> .....	<b>64</b>
17	<b>2.2.1 Cytotoxicity assay</b> .....	<b>66</b>
18	<b>2.3 Adjuvant assay</b> .....	<b>66</b>
19	<b>2.3.1 Experimental animals</b> .....	<b>66</b>
20	<b>2.3.2 Antigen expression and purification</b> .....	<b>67</b>
21	<b>2.3.3 Immunization assay and blood sample collections</b> .....	<b>67</b>
22	<b>2.3.4 Assessment of the antibody production</b> .....	<b>68</b>
23	<b>3 Results</b> .....	<b>69</b>
24	<b>3.1 EOP chemical components</b> .....	<b>69</b>
25	<b>3.2 Anti-<i>Trichomonas vaginalis</i> assay</b> .....	<b>70</b>
26	<b>3.3 Cytotoxicity assay</b> .....	<b>71</b>
27	<b>3.4 Adjuvant assay</b> .....	<b>71</b>
28	<b>5 Discussion</b> .....	<b>72</b>
29	<b>6 Conclusion</b> .....	<b>77</b>
30	<b>Conflicts of interest</b> .....	<b>77</b>
31	<b>Acknowledgement</b> .....	<b>77</b>
32	<b>References</b> .....	<b>78</b>
33	<b>Sena-Lopes et al. Figure 1</b> .....	<b>88</b>
34	<b>Sena-Lopes et al. Figure 2</b> .....	<b>89</b>

1	<b>Sena-Lopes et al. Figure 3</b> .....	90
2	<b>Sena-Lopes et al. Figure 4</b> .....	91
3	<b>6. Manuscrito 1. Antiparasitic and molecular activity of Quinolines-1,2,3-</b>	
4	<b>triazolylcarboxamides in <i>Trichomonas vaginalis</i></b> .....	92
5	<b>Abstract</b> .....	93
6	<b>1 Introduction</b> .....	94
7	<b>2 Materials and methods</b> .....	95
8	<b>2.1 Chemicals</b> .....	95
9	<b>2.2 Parasite Culture Conditions</b> .....	96
10	<b>2.3 Anti- <i>Trichomonas vaginalis</i> Assay</b> .....	96
11	<b>2.4 Cytotoxicity Assay</b> .....	97
12	<b>2.5 Gene expression of <i>T. vaginalis</i></b> .....	98
13	<b>2.6 Statistical Analysis</b> .....	99
14	<b>3 Results</b> .....	99
15	<b>3.1 Anti- <i>Trichomonas vaginalis</i> Assay</b> .....	99
16	<b>3.2 Kinetic Growth Analysis</b> .....	100
17	<b>3.3 Cytotoxicity Assay</b> .....	100
18	<b>3.4 Gene expression of <i>T. vaginalis</i></b> .....	100
19	<b>4 Discussion</b> .....	101
20	<b>5 Conclusions</b> .....	104
21	<b>Conflicts of interest</b> .....	104
22	<b>Acknowledgement</b> .....	104
23	<b>References</b> .....	105
24	<b>Figure Legends</b> .....	110
25	<b>Sena-Lopes et al. Figure 1</b> .....	111
26	<b>Sena-Lopes et al. Figure 2</b> .....	112
27	<b>Sena-Lopes et al. Figure 3</b> .....	113
28	<b>Sena-Lopes et al. Figure 4</b> .....	114
29	<b>Sena-Lopes et al. Figure 5</b> .....	115
30	<b>Sena-Lopes et al. Figure 6</b> .....	116
31	<b>7 Conclusões Gerais</b> .....	117
32	<b>Referências</b> .....	118
33	<b>Anexos</b> .....	129

1	<b>Anexo A - Artigo Publicado na revista Biomedicine &amp; Pharmacotherapy:</b>	
2	<b>Antiparasitic activity of 1,3-dioxolanes containing tellurium in <i>Trichomonas</i></b>	
3	<b><i>vaginalis</i> .....</b>	<b>130</b>
4	<b>Anexo B - Artigo Publicado na revista PLOS ONE: Chemical composition,</b>	
5	<b>immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil</b>	
6	<b>from Brazilian red propolis .....</b>	<b>135</b>
7	<b>Anexo C - Comprovante do depósito da patente: Formulação antiparasitária a</b>	
8	<b>partir de óleo essencial de própolis vermelha brasileira .....</b>	<b>151</b>
9	<b>Anexo D - Comprovante do depósito da patente: Formulação antiparasitária a</b>	
10	<b>partir de 1,3-dioxolanas contendo telúrio .....</b>	<b>163</b>
11	<b>Anexo E - Patente encaminhada para o CIT-UFPel: Formulação antiparasitária a</b>	
12	<b>partir de quinolina-1,2,3-triazoil-carboxamidas .....</b>	<b>173</b>
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		

## 1 1 Introdução Geral

2 *Trichomonas vaginalis* é o protozoário flagelado do trato geniturinário  
3 causador da tricomoníase, doença sexualmente transmissível (DST) de origem  
4 não viral mais comum no mundo. Em 2008, foi estimado que ocorreram 276  
5 milhões de casos por ano, a maioria ocorrendo em mulheres (WHO, 2012). A  
6 infecção por *T. vaginalis* resulta em uma variedade de manifestações clínicas,  
7 na maioria dos casos os pacientes são assintomáticos, mas alguns podem  
8 desenvolver sinais tipicamente associados à doença. Além dos sintomas como:  
9 vaginite, prurido vulvar intenso, ardência nas relações sexuais e ao urinar; a  
10 principal importância da tricomoníase é a sua relação com doenças, tais como  
11 câncer (SUTCLIFFE et al., 2012; VIIKKI et al., 2000; ZHANG; BEGG, 1994),  
12 complicações durante a gravidez (COTCH et al., 1991; COTCH et al., 1997;  
13 KLEBANOFF et al., 2001; SILVER et al., 2014), infertilidade (GIMENES et al.,  
14 2014; GRODSTEIN et al., 1993) transmissão e cofator do HIV (Human  
15 Immunodeficiency Virus) (MCCLELLAND et al., 2007; QUINLIVAN et al., 2012).

16 O tratamento da tricomoníase é feito com os compostos 2-metil-5-  
17 nitroimidazóis, e os únicos fármacos aprovados pelo *Food and Drug*  
18 *Administration* (FDA, EUA), são o Metronidazol e Tinidazol. Embora as taxas  
19 de cura sejam significativas, falhas no tratamento são relatadas, e atribuídas  
20 principalmente à toxicidade dos fármacos utilizados, causando efeitos adversos  
21 e não-adesão ao tratamento ou reinfecção, e também pobre absorção do  
22 fármaco ou biodisponibilidade insuficiente (MENEZES et al., 2016; UPCROFT ;  
23 UPCROFT, 2001). Além disso, a seleção de isolados resistentes de *T. vaginalis*  
24 aos medicamentos utilizados no tratamento da tricomoníase têm sido descrita  
25 em diferentes estudos (LEITSCH et al., 2014; MENEZES et al., 2016; VIEIRA  
26 et al., 2012).

27 Estudos de novas classes de substâncias naturais ou sintéticas vêm  
28 sendo impulsionados pela necessidade de novos fármacos para tratar diversas  
29 infecções. Nesse contexto, os produtos sintéticos, ou derivados de  
30 medicamentos já comercializados, também fornecem uma alternativa para  
31 tratar a tricomoníase (NEWMAN; CRAGG, 2016; NGO et al., 2013; VIEIRA et  
32 al., 2015).

1 Os produtos naturais representam uma fonte rica de moléculas ativas, e  
2 ainda hoje, são usados na busca de novos medicamentos (NEWMAN; CRAGG,  
3 2016). Dentre os produtos naturais, citamos a própolis, que pode apresentar-se  
4 principalmente nas cores marrom, vermelha ou verde, e que tem sido utilizada  
5 na medicina popular devido às suas propriedades terapêuticas (FISCHER et  
6 al., 2008; FREIRES et al., 2016; FROZZA et al., 2013; MARCUCCI, 1996;  
7 SFORCIN; BANKOVA, 2011). Diversos estudos reforçam a importância  
8 farmacológica da própolis, pois comprovam atividades biológicas tais como:  
9 antineoplásica, imunomodulatória, anti-inflamatória, antioxidante,  
10 antimicrobiana, antiviral, antidiabética e antiparasitária (BURDOCK, 1998;  
11 SFORCIN, 2007; SFORCIN; BANKOVA, 2011).

12 Várias classes de compostos orgânicos de telúrio, como as 1,3-  
13 dioxolanas contendo telúrio, com diferentes características e estruturas  
14 químicas, vem sendo estudados quanto as suas propriedades biológicas,  
15 farmacológicas e toxicológicas (NOBRE et al., 2014; ZENI et al., 2006).  
16 Diferentes autores atribuem importantes propriedades biológicas à esses  
17 compostos ativos, tais como: antimicrobianas, antioxidantes,  
18 imunomodulatórias, antitumorais, anti-helmínticas e antiprotozoárias (BA, LA et  
19 al., 2010; CUNHA et al., 2009; MALUF et al., 2016; NOBRE et al., 2014;  
20 SREDNI, 2012; TIEKINK, 2012; URIG; BECKER 2006; WIESLANDER et  
21 al.,1998).

22 Outra classe de compostos orgânicos avaliados são as quinolinas e  
23 seus derivados, entre eles destacamos as quinolinas-1,2,3-triazolil-  
24 carboxamidas. As quinolinas estão presentes em diversas substâncias  
25 naturais, principalmente alcalóides derivados de plantas, mas também podem  
26 ser compostos sintetizados laboratorialmente. Além disso, já demonstraram  
27 atividades biológicas e propriedades farmacológicas, como por exemplo:  
28 antitumorais, antioxidantes, antituberculose, antifúngica, antibacteriana, anti-  
29 inflamatórias, antidepressivas e antiprotozoário (BEGNINI et al., 2017;  
30 CANDÉA et al., 2009; DI PIETRO et al., 2015; DOREY et al., 2000 ; FERRETTI  
31 et al., 2014; MUSIOL et al., 2006; WILHEM et al., 2014).

1           Diante do exposto, o estudo da atividade biológica de compostos  
2 naturais e sintéticos, é importante para o desenvolvimento de novos fármacos  
3 como novas alternativas no tratamento de diferentes parasitoses, como a  
4 tricomoníase.

5           O presente trabalho será apresentado a seguir com a descrição dos  
6 objetivos, revisão de literatura, na qual encontraremos o detalhamento sobre o  
7 protozoário utilizado no estudo, destacando sua biologia, diagnóstico  
8 laboratorial, tratamento e resistência medicamentosa. Além disso, mostraremos  
9 a importância dos compostos naturais e sintéticos como novas alternativas no  
10 tratamento da tricomoníase, tais como: óleo essencial da própolis vermelha  
11 brasileira, derivados sintéticos de moléculas de 1,3-dioxolanas contendo telúrio  
12 e quinolinas-1,2,3-triazol-carboxamidas.

13           Logo após serão apresentados os resultados obtidos compilados em 3  
14 artigos científicos. O primeiro tem como título: Antiparasitic activity of 1,3-  
15 dioxolanes containing tellurium in *Trichomonas vaginalis*, e foi publicado em  
16 2017 na revista **Biomedicine and Pharmacotherapy**.

17           O segundo artigo tem como título: Chemical composition,  
18 immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil from  
19 Brazilian red propolis, e foi publicado em 2018 na revista **PLoS ONE**.

20           O terceiro artigo tem como título: Antiparasitic and molecular activity of  
21 Quinolines-1,2,3-triazolylcarboxamides in *Trichomonas vaginalis*, e será  
22 submetido a revista **Parasitology Research**.

23

24

25

26

27

28

29

30

31



## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade biológica *in vitro* de um composto natural (óleo essencial da própolis vermelha brasileira) e dois compostos sintéticos (1,3-dioxolanas contendo telúrio e quinolina-1,2,3-triazolil-carboxamidas) em *Trichomonas vaginalis*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade anti-*T. vaginalis* do óleo essencial da própolis vermelha brasileira (OEP), 1,3-dioxolanas contendo telúrio (PTeDOX) e quinolina-1,2,3-triazolil-carboxamidas (QTCA) através do rastreamento antiparasitário.
- Determinar o MIC e o IC<sub>50</sub> dos compostos ativos que apresentaram atividade antiparasitária;
- Avaliar a curva cinética do tempo de inibição do crescimento de *T. vaginalis* após tratamento com os compostos ativos que apresentaram atividade antiparasitária;
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos ativos que apresentaram atividade antiparasitária, em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1);
- Avaliar a expressão dos genes: piruvato-ferredoxina oxidoreductase A; piruvato-ferredoxina oxidoreductase B; Enzima málica D; Hydrogenase;  $\beta$ -tubulina de *T. vaginalis*.

### 1 3 Revisão de Literatura

#### 2 3.1 *Trichomonas vaginalis*

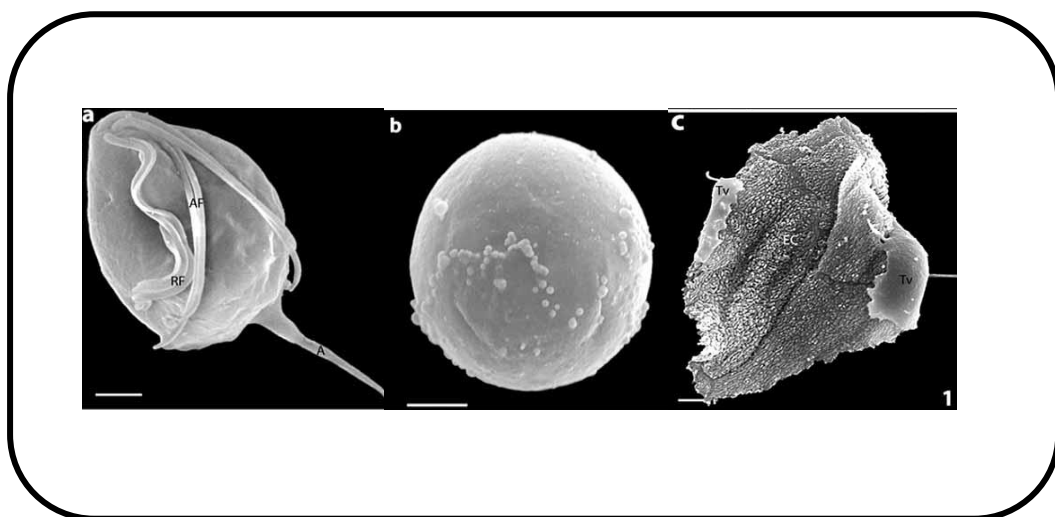
3 O protozoário *Trichomonas vaginalis* pertence ao Filo Zoomastigina, à  
4 classe Parabasalia, à ordem Trichomonadida, à família Trichomonadidae, à  
5 ordem Trichomonadida, sendo descrito pela primeira vez por Alfred François  
6 Donné, em 1836, a partir de secreção vaginal (SCHWEBKE; BURGESS, 2004).  
7 Este parasito tem a capacidade de parasitar o trato geniturinário humano  
8 causando a tricomoníase. Existem outras espécies como *T. tenax* e *T. hominis*  
9 que são encontradas no homem habitando a cavidade bucal e trato intestinal,  
10 respectivamente. Entretanto, a única que tem potencial patogênico é a espécie  
11 *T. vaginalis* (SECOR et al., 2014; SCHWEBKE; BURGESS, 2004).

12 *T. vaginalis* mede cerca de 9,7 µm de comprimento por 7 µm de largura.  
13 Possui cinco flagelos, sendo quatro flagelos livres, com tamanhos desiguais,  
14 localizados na região anterior e o quinto incorporado à membrana ondulante.  
15 As organelas internas incluem um núcleo proeminente que localiza-se próximo  
16 à extremidade anterior, apresentando uma dupla membrana nuclear e uma  
17 estrutura rígida, o axóstilo, que percorre a célula da extremidade anterior à  
18 extremidade posterior, promovendo a sustentação do trofozoíto (BENCHIMOL,  
19 2004; HONIGBERG; KING, 1964).

20 Nos tricomonadídeos ocorre a ausência de mitocôndria, porém, o parasito  
21 apresenta hidrogenossomos. Estes são grânulos densos que possuem função  
22 metabólica semelhante à mitocôndria, sendo que receberam este nome por  
23 produzirem hidrogênio molecular como produto final do metabolismo  
24 (BENCHIMOL, 2009). Os hidrogenossomos são importantes na regulação do  
25 metabolismo, pois são portadores da piruvato ferredoxina-oxidoreductase  
26 (PFOR), enzima capaz de transformar o piruvato em acetato e liberar  
27 adenosina-trifosfato (ATP) e hidrogênio molecular (H<sub>2</sub>) (PETRIN et al., 1998).

28 A morfologia do parasito em cultura é tipicamente piriforme, elipsóide ou  
29 oval como outros tricomonadídeos, *T. vaginalis*, em condições normais  
30 apresenta-se na forma de trofozoíto (**Figura 1a**), na qual as células são em  
31 forma de pêra, os flagelos são externalizados e apresentam movimento

1 intenso. No entanto, mudanças na forma e comportamento das células podem  
2 ocorrer em duas outras situações: (1) quando o parasito está em contato com  
3 uma célula hospedeira e, assim, se torna a forma amebóide (**Figura 1c**); (2)  
4 quando as células são submetidas a condições de estresse, como quando sob  
5 tratamento com drogas ou privação de nutrientes. Neste caso, os flagelos são  
6 parcial ou completamente internalizados, a célula torna-se esférica (**Figura 1b**)  
7 e é denominado pseudocisto. Quando a situação de estresse é removida, os  
8 flagelos são externalizados e a célula retorna ao seu comportamento normal.  
9 Assim, a forma de pseudocisto surge quando o parasito está sob estresse,  
10 permitindo-lhe sobreviver (BENCHIMOL, 2008).



11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24 Figura 1 - Vista geral de *Trichomonas vaginalis* (Tv) em três diferentes formas: (a) como  
25 um trofozoíto (b) como um pseudocisto; (c) como uma ameboide aderido a uma célula  
26 epitelial vaginal humana (EC). Ax, Axóstilo; AF, Flagelos anteriores; RF, flagelo recorrente.  
27 Fonte: BENCHIMOL, 2008, p.873

28  
29 Os trofozoítos colonizam o trato geniturinário de homens e mulheres, onde  
30 provocam infecções e fora deste local não sobrevivem. A multiplicação, como  
31 em todos os tricomonadídeos, ocorre por divisão binária longitudinal, e o  
32 parasito é anaeróbio facultativo. A temperatura ideal de crescimento se dá  
33 entre 20°C a 40°C e pH entre 5 e 7,5 (MENEZES et al., 2016; PETRIN et al.,  
34 1998). Além disso, necessita de diversos nutrientes para sua sobrevivência,  
35 dentre eles carboidratos, lipídeos, nucleotídeos púricos e pirimidínicos, ácidos  
36 graxos, vitaminas e sais inorgânicos. Os carboidratos são a principal fonte de

1 energia, tendo seu metabolismo fermentativo sob duas condições: anaeróbica  
2 e aeróbica, sendo realizadas no citoplasma e nos hidrogenossomos (MACK;  
3 MÜLLER, 1980; MULLER, 1988). Nos casos de limitação de carboidratos, os  
4 aminoácidos realizam a manutenção da sobrevivência e crescimento do  
5 parasito, que necessita principalmente de arginina, havendo, ainda, os  
6 aminoácidos treonina, leucina e metionina que são utilizados na produção de  
7 energia (PETRIN et al., 1998).

8

### 9 **3.2 Tricomoníase**

10 *Trichomonas vaginalis* é o parasita responsável pela tricomoníase,  
11 doença sexualmente transmissível (DST) não viral mais comum no mundo. A  
12 Organização Mundial da Saúde estima que ocorra uma incidência de 276  
13 milhões de casos por ano, e uma prevalência de 187 milhões de indivíduos  
14 infectados com idades entre 15 e 49 anos, com a maioria (89%) ocorrendo em  
15 mulheres (LEITSCH, 2016; WHO, 2012).

16 A tricomoníase é uma doença que apresenta amplo espectro de  
17 manifestações clínicas, os sinais e sintomas dependem das condições  
18 individuais, da virulência e do número de parasitos infectantes. A prevalência  
19 de infecção depende de vários fatores, incluindo a idade, atividade sexual e  
20 número de parceiros sexuais, presença de outras doenças sexualmente  
21 transmissíveis (DSTs), fase do ciclo menstrual, técnicas de diagnóstico e  
22 condições socioeconômicas (MENEZES et al., 2016; PETRIN et al., 1998).  
23 Além disso, há alguns anos, a infecção era tradicionalmente conhecida como  
24 sintomática em mulheres e assintomática em homens. Atualmente, o cenário  
25 está mudando e dados recentes têm mencionado que cerca de 80% das  
26 infecções por *T. vaginalis* são assintomáticas tanto em homens como em  
27 mulheres, sendo ambos considerados carreadores do parasito (ALLSWORTH  
28 et al., 2009; POOLE; MCCLELLAND, 2013; SUTTON et al., 2007). Quando  
29 sintomáticos, a infecção foi detectada e varia nas mulheres entre 50-75%  
30 (LEHKER; ALDERETE, 2000; PETRIN et al., 1998; SPARKS, 1991), enquanto  
31 nos homens entre 15-50% (LEHKER; ALDERETE, 2000; SWYGARD et al.,  
32 2004).

1 O protozoário é transmitido através de relação sexual e as evidências  
2 que classificam a tricomoníase como DST são: (1) alta frequência de infecção  
3 na uretra e / ou próstata de parceiros masculinos de mulheres infectadas; (2) a  
4 prevalência de infecção é maior entre mulheres atendidas em clínicas de DST  
5 e entre profissionais do sexo do que em mulheres pós-menopáusicas e virgens;  
6 e (3) os flagelados morrem fora do corpo humano, a menos que estejam  
7 protegidos da dessecação (MENEZES et al., 2016; PETRIN et al., 1998).

8 Após a transmissão, de acordo com Schwebke e Burgess (2004), o  
9 tempo de incubação é de 4 - 28 dias e embora existam evidências de taxas de  
10 cura espontânea na ordem de 20-25%, após esse período, menos de 50% das  
11 mulheres infectadas apresentarão sintomas em seis meses (MENEZES et al.,  
12 2016; PETRIN et al., 1998). Os demais pacientes, que são assintomáticos,  
13 além do risco de infectar os parceiros sexuais, podem aumentar cerca de 2,7  
14 vezes o risco de transmissão do vírus do HIV (BOWDEN; GARNETT, 2000;  
15 GÓMEZ-BARRIO et al., 2002; VAN DER POL et al., 2008). Estudos recentes  
16 demonstraram que a tricomoníase também está associada à susceptibilidade  
17 aumentada ao papiloma vírus humano (HPV) (FICHOROVA et al., 2012) e a  
18 tipos de câncer de próstata agressivos (SUTCLIFFE et al., 2010).

19 Atualmente, admite-se que a transmissão não-sexual é rara, mas  
20 teoricamente pode ocorrer em casos de duchas contaminadas, espéculos ou  
21 assentos de vasos sanitários, água, urina e sêmen mesmo após algumas horas  
22 de exposição as condições do meio ambiente. A tricomoníase neonatal em  
23 meninas é adquirida durante o parto, a partir da mãe infectada com *T. vaginalis*  
24 durante a passagem pelo canal do parto. Nesses casos, a infecção acontece  
25 porque o epitélio escamoso da vagina da recém-nascida está sendo  
26 influenciado pelos estrogênios maternos, permitindo a colonização pelo  
27 parasito. No entanto, assim que esse efeito hormonal desaparecer, em torno de  
28 poucas semanas após a contaminação, o trato genital torna-se resistente à  
29 ação de *T. vaginalis*, sendo possível eliminar espontaneamente o parasito, o  
30 que torna a infecção autolimitada (PETRIN et al., 1998).

31 A tricomoníase é uma doença de fase reprodutiva e as manifestações  
32 clínicas da infecção raramente são observadas antes da menarca ou após a

1 menopausa. O estabelecimento do protozoário no trato genital feminino inicia-  
2 se com o aumento do pH, que modifica o ambiente vaginal e possibilita o  
3 aumento da proporção de bactérias anaeróbias, e assim, conseqüentemente  
4 ocorre a diminuição dos lactobacilos necessários para manter a homeostase  
5 vaginal (LEHKER; ALDERETE, 2000).

6 Os mecanismos de defesa do hospedeiro na infecção por *T. vaginalis*  
7 dependem dos fatores imunológicos, que demonstram a interferência da  
8 disponibilidade de ferro no trato genital feminino, uma vez que pode facilitar ou  
9 não a síntese de proteínas, a citoaderência, habilidade de resistir à lise do  
10 sistema complemento e expressão de muitos genes de *T. vaginalis*, incluindo  
11 as adesinas e as cisteínas proteases (KUMMER et al, 2008). As respostas  
12 imune celular e humoral são evidentes em pacientes com a infecção,  
13 apresentando um aumento no número de leucócitos polimorfonucleares que  
14 podem ser facilmente detectados nas secreções do trato geniturinário  
15 (KUMMER et al, 2008; TORRES-ROMERO; ARROYO, 2009).

16 O contato inicial entre *T. vaginalis* e os leucócitos resulta na formação de  
17 pseudópodes que vão promover a internalização e degradação das células  
18 imunes nos vacúolos fagocíticos do protozoário. A interação entre *T. vaginalis* e  
19 seu hospedeiro é um processo complexo no qual estão envolvidos  
20 componentes associados à superfície celular do parasito e células epiteliais do  
21 hospedeiro, pois o trofozoíto precisa aderir às células hospedeiras para exercer  
22 seus efeitos patogênicos (LÓPEZ et al., 2000).

23 A aderência e a citotoxicidade exercidas pelo protozoário sobre as  
24 células do hospedeiro são ditadas pelos fatores de virulência, como as  
25 integrinas, *cell-detaching factor* (CDF) e glicosidases, mas principalmente pelas  
26 cisteína-proteinases 39 e 65, que são citotóxicas e hemolíticas, apresentando  
27 capacidade de degradar imunoglobulinas das classes IgM, IgG e IgA presentes  
28 no epitélio vaginal, e também pelas adesinas AP23, AP33, AP51 e AP65, que  
29 são sintetizadas pela ligação a células epiteliais (ALDERETE et al., 1988). A  
30 expressão das adesinas na superfície do parasito é alternada com a expressão  
31 de P270, que é uma proteína altamente imunogênica. Essa alternância na  
32 expressão parece ser um mecanismo utilizado por *T. vaginalis* para evadir o

1 sistema imune (GARCIA et al., 2003), o qual desempenha papel importante na  
2 homeostasia usando mecanismos inatos e adaptativos para lidar com a  
3 constante exposição a microrganismos patogênicos e alérgenos (SCHWEBKE;  
4 BURGESS, 2004).

5 A tricomoníase em homens pode ser classificada em três grupos: estado  
6 assintomático; doença sintomática leve, clinicamente indistinguível de outras  
7 causas de uretrites; estado agudo, caracterizado por uretrite purulenta  
8 (PETRIN et al., 1998). É possível que homens refratários a esta infecção,  
9 possuam quantidades consideráveis de zinco no fluido prostático. Essa  
10 condição deve-se a este metal ser altamente tóxico para *T. vaginalis* e dessa  
11 forma, o exame de rotina utilizado para o diagnóstico de tricomoníase em  
12 homens pode induzir a resultados falso negativo (LÓPEZ et al., 2000). Em  
13 casos sintomáticos, as principais características da infecção são: escasso  
14 corrimento, disúria, prurido uretral, ulceração peniana e sensação de  
15 queimação após relação sexual. Apesar de complicações serem raras, podem  
16 acontecer epididimite, infertilidade e prostatite. (BOWDEN; GARNETT, 2000;  
17 PETRIN et al., 1998).

18 Em mulheres, nos primeiros estágios da infecção, há sintomas, porém,  
19 são menos agressivos. Esses podem apresentar-se na forma de disúria,  
20 dispaurenia e discreto desconforto abdominal (PETRIN et al., 1998). Os sinais  
21 e sintomas clínicos durante a fase aguda da infecção são evidenciados por  
22 vaginite aguda, devido a infiltração por leucócitos e o típico corrimento amarelo,  
23 espumoso e mucopurulento que caracteriza esta fase ocorrendo em somente  
24 20% dos casos. Há também odor vaginal anormal e prurido vulvar. Além disso,  
25 em casos mais graves, a vagina e a cérvix podem apresentar erosões e  
26 pontos hemorrágicos na parede cervical, conhecidos como *colpitis macularis* ou  
27 cérvix com aspecto de morango (MENEZES et al., 2016), sendo observada  
28 em poucos casos (2% a 5%) no exame comum de rotina, mas pode ser  
29 detectado com maior precisão durante o exame de colposcopia. É ressaltado  
30 ainda que os sinais e sintomas são tipicamente intermitentes, podendo agravar  
31 o quadro durante o período menstrual, pois enquanto o número de organismos  
32 no trato geniturinário feminino diminui durante a menstruação, os fatores de

1 virulência mediados pelo ferro contribuem para a exacerbação de sintomas  
2 nesse período (LEITSCH, 2016; PETRIN et al., 1998; ZHANG; BEGG, 1994).

3 Em casos de infecção mais graves, a tricomoníase está relacionada a  
4 sérias complicações. *T. vaginalis* está relacionado com doença inflamatória  
5 pélvica (DIP) pois, infecta o trato urinário superior, causando resposta  
6 inflamatória que destrói a estrutura tubária e danifica as células ciliadas da  
7 mucosa tubária, inibindo a passagem de espermatozoides ou óvulos através da  
8 tuba uterina (CHERPES et al., 2006). Sendo assim, o risco de infertilidade é  
9 quase duas vezes maior em mulheres com história de tricomoníase comparado  
10 com as que nunca tiveram tal infecção (GRODSTEIN et al., 1993). Além disso,  
11 a resposta inflamatória gerada pela infecção por *T. vaginalis* em mulheres  
12 grávidas, pode conduzir direta ou indiretamente a alterações na membrana  
13 fetal ou decídua, fazendo com que exista a associação entre tricomoníase em  
14 grávidas com ruptura espontânea de membrana, parto prematuro, baixo peso  
15 de recém-nascidos, endometrite pós-parto, e morte neonatal (COTCH et al.,  
16 1997).

17 Outra complicação que está relacionada com a infecção por *T. vaginalis*,  
18 é a que a mesma é considerada como um dos cofatores mais importantes na  
19 amplificação da transmissão do HIV. O surgimento de uma resposta imune  
20 celular local com inflamação do epitélio vaginal e exocérvice em mulheres e da  
21 uretra em homens faz com que haja a indução da infiltração de leucócitos,  
22 incluindo células-alvo do HIV, como linfócitos TCD4+ e macrófagos, assim  
23 como pontos hemorrágicos na mucosa, aos quais o HIV pode se ligar e ganhar  
24 acesso a corrente sanguínea. Além disso, um aumento na secreção de  
25 citocinas (interleucinas 1, 6, 8 e 10), conhecidas por aumentar a suscetibilidade  
26 ao HIV também é demonstrada durante a tricomoníase (CU-UVIN et al., 2002;  
27 LEHKER; ALDERETE, 2000; SORVILLO et al., 2001). Segundo Van Der Pol et  
28 al. (2008), a tricomoníase é considerada uma doença bidirecional, onde não  
29 somente aumenta a transmissão do HIV, mas também a infecção por HIV pode  
30 tornar um indivíduo mais susceptível à infecção por *T. vaginalis*.

31 Devido ao fato de a tricomoníase ser transmitida sexualmente, o controle  
32 da mesma é constituído das mesmas medidas preventivas tomadas no controle



1 de outras DSTs. Pode-se citar como exemplo, o uso de preservativos,  
2 abstinência de contatos sexuais com pessoas infectadas e limitação das  
3 complicações patológicas mediante a administração de um tratamento  
4 medicamentoso imediato e eficaz, tanto para os casos sintomáticos como para  
5 os assintomáticos, ou seja, tratamento simultâneo para parceiros sexuais,  
6 mesmo que a doença tenha sido diagnosticada em apenas um dos membros  
7 do casal. Os doentes devem ser aconselhados a absterem-se do sexo, pelo  
8 menos, uma semana e até que eles e seus parceiros tenham concluído o  
9 tratamento (PETRIN et al., 1998).

10

### 11 **3.3 Diagnóstico Laboratorial**

12 O diagnóstico clínico da tricomoníase não pode ser baseado somente na  
13 avaliação clínica, pois pode ser confundido com outras DSTs, tais como  
14 candidíase, gonorréia e clamídia. Devido a isso, se faz necessário e essencial  
15 o diagnóstico laboratorial, onde diversos métodos têm sido utilizados para a  
16 detecção de *T. vaginalis*, variando tanto na sua sensibilidade quanto na  
17 especificidade, uma vez que indica o tratamento adequado facilitando o  
18 controle da propagação da infecção (PETRIN et al., 1998).

19 O método mais utilizado para o diagnóstico é o exame microscópico de  
20 montagens úmidas ou a fresco, que estabelece o diagnóstico através da  
21 detecção de organismos com mobilidade ativa. Embora este seja o método  
22 mais prático e rápido de diagnóstico (permitindo tratamento imediato),  
23 apresenta baixa sensibilidade (WORKOWSKI; BOLAN, 2015). O  
24 imunodiagnóstico, como a coloração direta com anticorpos imunofluorescentes,  
25 é mais sensível do que as montagens úmidas, mas tecnicamente mais  
26 complexo (WORKOWSKI; BOLAN, 2015). O ELISA através da avaliação de  
27 anticorpos apresenta maior sensibilidade do que a microscopia para a detecção  
28 da tricomoníase em população assintomática (TON NU et al., 2015).

29 Dois testes muito sensíveis aprovados pela FDA (EUA) para detectar *T.*  
30 *vaginalis* nas secreções vaginais inclui o Teste Rápido de Trichomonas OSOM  
31 (Sekisui Diagnostics, Framingham, MA), que é um teste de detecção de  
32 antígenos que utiliza tecnologia de varredura de fluxo capilar

1 imunocromatográfico. A sensibilidade e especificidade para o teste OSOM são  
2 82% a 95% e 97% a 100%, respectivamente (CAMPBELL et al., 2008). O outro  
3 teste é o Affirm VP III (Becton Dickinson, Sparks, MD), um teste de sonda de  
4 hibridização de DNA que avalia *T. vaginalis*, *Gardnerella vaginalis* e *Candida*  
5 *albicans*, com sensibilidade e especificidade de 63% e 99,9%, respectivamente  
6 (ANDREA; CHAPIN, 2011).

7 Conforme atualizado pelas Diretrizes de Tratamento de DST dos  
8 Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, EUA), a cultura do  
9 parasito já não é considerada o padrão-ouro para o diagnóstico da infecção por  
10 *T. vaginalis*, uma vez que os métodos de detecção molecular estão disponíveis  
11 e são considerados eficazes (SCHWEBKE et al., 2011). Embora a cultura  
12 apresente uma sensibilidade de 75% a 96% e uma especificidade de até 100%,  
13 mas os resultados estão disponíveis somente após 3 a 7 dias da coleta do  
14 material para diagnóstico laboratorial (SCHWEBKE et al., 2011).

15 Nos testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs), nas mulheres,  
16 o exame deve ser realizado a partir de secreções vaginais e nos homens,  
17 devem ser examinadas secreções uretrais anteriores ou prostáticas, sendo  
18 importante enfatizar que esses são os principais materiais coletados na  
19 pesquisa para o diagnóstico da tricomoníase, independente da técnica de  
20 diagnóstico. Além disso, a urina também pode ser triada para *T. vaginalis* em  
21 ambos os sexos mas tem menor eficácia diagnóstica. O ensaio APTIMA *T.*  
22 *vaginalis* (Hologic Gen-Probe, San Diego, CA) detecta o RNA por amplificação  
23 mediada por transcrição a partir de amostras vaginais, endocervicais ou  
24 urinárias de mulheres, com uma sensibilidade clínica de 95,3% a 100% e  
25 especificidade de 95,2% a 100% (SCHWEBKE et al., 2011).

26 Em geral, ambas as diretrizes dos países da Europa Oriental (DOMEIKA  
27 et al., 2010) e dos CDC (WORKOWSKI; BOLAN, 2015) recomendam os  
28 seguintes procedimentos para o diagnóstico laboratorial de tricomoníase: (1)  
29 realizar testes de diagnóstico em todas as mulheres com corrimento vaginal,  
30 especialmente em locais de alta prevalência (por exemplo, clínicas de DST) e  
31 para pessoas assintomáticas em alto risco de infecção (por exemplo, pessoas  
32 com múltiplos parceiros sexuais, troca de sexo por pagamento, uso de drogas

1 ilícitas ou história de DST); (2) empregar NAATs ou cultura, caso não seja  
2 detectado isolados de *T. vaginalis* no exame microscópico a partir da  
3 montagem a fresco e haja uma forte indicação de infecção.

4 Diante das recomendações descritas, é importante salientar que os  
5 autores ressaltam o conhecimento de que testes altamente sensíveis (por  
6 exemplo, NAATs ou cultura) não são viáveis na maioria dos laboratórios,  
7 especialmente de países em desenvolvimento (MENEZES et al., 2016). Em tais  
8 casos, o exame de montagem a fresco das secreções vaginais e uretrais e o  
9 sedimento urinário com a preservação cuidadosa da amostra e exame  
10 microscópico imediato pode melhorar a sensibilidade diagnóstica. Embora *T.*  
11 *vaginalis* possa ser um achado no teste de Papanicolaou, este método não é  
12 considerado como teste de diagnóstico para tricomoníase, pois falsos-  
13 negativos e falsos positivos podem ocorrer (WORKOWSKI; BOLAN, 2015).  
14 Além disso, esfregaços corados por Giemsa ou Leishman também estão sendo  
15 desencorajados (DOMEIKA et al., 2010).

16

### 17 **3.4 Tratamento e Resistência medicamentosa**

18 Descrito pela primeira vez em 1836, *T. vaginalis* ficou conhecido como  
19 causa de vaginites somente em 1916, e apenas 40 anos depois uma  
20 substância ativa eficiente foi sintetizada para o tratamento dessa infecção. Em  
21 1954, pela triagem de vários antibióticos, antimaláricos e amebicidas foi  
22 descoberta a azomicina (2-nitroimidazol). Através da manipulação da estrutura  
23 química da azomicina, foi sintetizado o metronidazol [1-(2-hidroxietil)-metil-5-  
24 nitroimidazol(FORNA; GÜLMEZOGLU, 2003; LEITSCH, 2016).

25 No final da década de 1970, uma vacina de *T. vaginalis*, sob o nome  
26 comercial SolcoTrichovac ou Gynatren, ficou disponível. A vacina foi derivada  
27 de "cepas anormais de lactobacilos" e inativadas pelo calor, sendo isoladas de  
28 secreções vaginais de mulheres com tricomoníase. Embora SolcoTrichovac  
29 tenha sido inicialmente suposto tanto para curar a infecção existente e fornecer  
30 proteção contra a reinfecção, estudos subsequentes lançaram dúvidas sobre a  
31 efetividade real da vacina contra *T. vaginalis*. Os resultados dos ensaios  
32 clínicos foram positivos, mas os estudos realizados apresentavam falhas, como

1 não ter grupos de controle adequados. A teoria fundamental por trás da vacina  
2 era tênue, uma vez que não havia semelhança antigênica particular entre  
3 lactobacilos e *T. vaginalis*. Dado esses fatos, é improvável que qualquer  
4 atividade tricomonocida de SolcoTrichovac seja o resultado de uma resposta  
5 direta imune. É mais provável que a vacinação estimule um aumento de fatores  
6 imunes inespecíficos capazes de aliviar os sintomas da infecção. Além disso,  
7 nenhum mecanismo do modo de ação da vacina foi experimentalmente  
8 comprovado (CUDMORE, et al., 2004).

9 Já que não existe uma vacina contra infecção por *T. vaginalis* com  
10 eficácia comprovada, a administração de medicamentos em pacientes com  
11 tricomoníase é considerada a única forma de tratamento. Sendo assim, os  
12 fármacos atualmente utilizados contra tricomoníase e aprovados pelo Food and  
13 Drug Administration (FDA, EUA) são o metronidazol (MTZ) e o tinidazol (TNZ)  
14 (FORNA; GÜLMEZOGLU, 2003; LEITSCH, 2016). Apesar de a tricomoníase ser  
15 considerada uma doença negligenciada, para qual não existe um sistema de  
16 vigilância epidemiológica e nem é uma doença de notificação compulsória  
17 (SECOR et al., 2014), estes medicamentos estão disponíveis nos sistemas de  
18 saúde pública e em pontos de venda comerciais, especialmente o MTZ. O TNZ  
19 tem uma meia-vida mais longa e com isso atinge uma maior concentração de  
20 fármaco no aparelho geniturinário quando comparado ao MTZ, mas é um  
21 medicamento mais caro (MEITES, 2013). As abordagens terapêuticas  
22 utilizadas no tratamento da tricomoníase são as aplicações intravaginais locais,  
23 a medicação oral sistêmica e a associação de ambas. Como *T. vaginalis* em  
24 mulheres frequentemente infecta a uretra e glândulas parauretrais, a cura com  
25 medicação local atinge apenas cerca de 50%, o tratamento de medicação oral  
26 é o mais indicado. O tratamento com dose única com qualquer fármaco  
27 nitroimidazol apresentaram eficácia no tratamento em 90% dos casos. Mas os  
28 efeitos colaterais apresentaram ser relativamente comuns e relacionados à  
29 dose do medicamento (FORNA; GULMEZOGLU, 2003; MENEZES et al.,  
30 2016).

31 De acordo com as Diretrizes de Tratamento de DST de 2015 do CDC, as  
32 alternativas recomendadas para tratar a tricomoníase correspondem a 2 g de

1 MTZ ou TNZ oralmente numa dose única. O gel MTZ é descrito menos eficaz  
2 do que o tratamento oral (menos de 50%) uma vez que as preparações tópicas  
3 não podem atingir níveis terapêuticos na uretra ou nas glândulas perivaginais.  
4 Como um regime alternativo, 500 mg dose oral de MTZ pode ser usado duas  
5 vezes por dia durante 7 dias (WORKOWSKI; BOLAN, 2015).

6 Com o objetivo de comparar a eficácia de diferentes alternativas  
7 medicamentosas de MTZ e TNZ alguns estudos já foram realizados. O MTZ em  
8 duas doses únicas diferentes (1,5 ou 2,0 g) demonstrou eficácia equivalente no  
9 tratamento da tricomoníase (SPENCE et al., 1997). Uma abordagem diferente  
10 foi avaliada utilizando-se MTZ intravaginal de dose única (2 g) em comparação  
11 com a dose única de MTZ oral (2 g), demonstrando que o uso intravaginal foi  
12 inferior à dose única de MTZ oral, falhando como terapia alternativa (TIDWELL  
13 et al., 1994). O tratamento multidoses (500 mg duas vezes ao dia durante 7  
14 dias) foi mais eficaz do que a dose única (2 g por via oral) para o tratamento da  
15 tricomoníase entre pacientes HIV positivos co-infectados com *T. vaginalis*. Com  
16 isso os autores sugerem que são necessários mais estudos para investigar  
17 regimes de tratamento diferentes, principalmente para populações que  
18 apresentam patógenos co-infectantes. (KISSINGER et al., 2010).

19 O uso de MTZ durante a gravidez não foi relacionado a efeitos  
20 teratogênicos ou mutagênicos em recém-nascidos e lactentes. Mulheres  
21 grávidas sintomáticas devem ser tratadas no momento do diagnóstico, embora  
22 o tratamento possa ser adiado para o segundo trimestre. A utilização do TNZ  
23 de forma segura em mulheres grávidas, ainda não foi confirmada. Mulheres  
24 lactantes que são tratadas com MTZ, devem evitar a amamentação durante o  
25 tratamento e durante 12-24 h após a última dose. Para as mulheres tratadas  
26 com TNZ, recomenda-se interrupção da amamentação durante o tratamento e  
27 durante 3 dias após a última dose (FORNA; GULMEZOGLU, 2003; MENEZES  
28 et al., 2016; SHEEHY et al., 2015).

29 Quando comparadas as taxas de cura global entre os regimes  
30 terapêuticos com MTZ e TNZ, não foram observadas diferenças significativas.  
31 Assim como não foram obtidas diferenças significativas nos efeitos adversos ao  
32 longo do tratamento. A fim de evitar efeitos secundários durante o tratamento,

1 recomenda-se que não seja ingerido álcool durante pelo menos 48 a 72 horas  
2 devido a possíveis efeitos de toxicidade. Em relação as alergias, foram  
3 descritas reações de hipersensibilidade em indivíduos que utilizaram,  
4 concomitantemente, MTZ e TNZ, não sendo confirmado se existe reação  
5 cruzada entre os dois agentes (FORNA; GULMEZOGLU, 2003; MENEZES et  
6 al., 2016). Além disso, não é estabelecido se o tratamento com TNZ é bem  
7 tolerado em paciente com alergia ao MTZ. As reações adversas que podem  
8 ocorrer incluem anafilaxia, erupções cutâneas, erupções pustulares, prurido,  
9 rubor, urticária e febre (PEARLMAN et al., 1996).

10 A dependência de uma única classe terapêutica é problemática, uma  
11 vez que a resistência aos nitroimidazóis está se tornando emergente em  
12 isolados de *T. vaginalis*. (LUMSDEN et al., 1988; VIEIRA et al., 2012). Há  
13 informações muito limitadas sobre a prevalência de resistência ao metronidazol  
14 entre os isolados clínicos de *T. vaginalis*, especialmente sobre as tendências  
15 de resistência. Estima-se que pelo menos 5% de todos os casos clínicos de  
16 tricomoníase são causados por cepas de *T. vaginalis* resistentes ao  
17 metronidazol (CUDMORE et al., 2004; PETRIN et al., 1998). Embora as taxas  
18 de cura sejam expressivas, a resistência acontece devido a reinfeção ou não  
19 adesão correta à terapia. Com isso, a baixa absorção, a distribuição não-efetiva  
20 na região genital ou a inativação do fármaco por bactérias presentes na  
21 microbiota vaginal das pacientes, são fatores que colaboram para o surgimento  
22 de isolados resistentes (GOLDMAN et al., 2009).

23 O metronidazol é um pró-fármaco e apresenta em sua estrutura química  
24 substituintes de nitrogênio, estes são reduzidos dentro das células ou  
25 organelas do parasito por redutases, o que resulta na produção de  
26 intermediários radicais-nitro citotóxicos que quebram as fitas de DNA  
27 conduzindo à morte do organismo suscetível (KULDA, 1999). Considerando a  
28 resistência do parasito aos nitroimidazóis, já foi demonstrado que *T. vaginalis*  
29 apresenta homólogos de nitrorredutases bacterianas e nitroimidazol redutases  
30 que estão ausentes na maioria dos eucariotos e estão relacionados com a  
31 susceptibilidade reduzida ao MTZ em *Helicobacter pylori* e Bacteroides (PAL et  
32 al., 2009). Ainda não está claro se esses genes estão associados à

1 sensibilidade ao nitroimidazol no parasito, mas foi demonstrado que essas  
2 enzimas podem ativar o MTZ no citosol e no hidrogenossomo, opondo-se a  
3 relatos prévios de ativação que ocorrem exclusivamente pelas enzimas  
4 hidrogenossômicas, como piruvato ferredoxina oxido redutase e hidrogenase  
5 (KULDA, 1999; MENEZES et al., 2016).

6 Atualmente, foi demonstrado que a regulação negativa ou até mesmo  
7 ausência de atividade da flavina redutase e álcool desidrogenase em cepas de  
8 *T. vaginalis* com altos níveis de resistência a MTZ, assim como a atividade de  
9 tiorredoxina, foi a mesma em todas as cepas avaliadas, conflitando com dados  
10 anteriores que sugeriam a contribuição dessas enzimas na resistência  
11 (LEITSCH et al., 2009, 2010). Além disso, a resistência clínica ao MTZ em *T.*  
12 *vaginalis*, também conhecida como resistência aeróbia, é fundamentalmente  
13 diferente da resistência a MTZ de alto nível induzida no laboratório,  
14 denominada resistência anaeróbica (CONRAD et al., 2013). A resistência  
15 anaeróbica é induzida na ausência de oxigênio e é uma consequência de uma  
16 perda das vias enzimáticas ativadoras de fármacos que são responsáveis pela  
17 redução do pró-fármaco MTZ em intermediários tóxicos (KULDA, 1999). Por  
18 outro lado, a resistência aeróbia ao MTZ parece estar relacionada a elevadas  
19 concentrações de oxigênio intracelular em consequência da diminuição da  
20 capacidade de eliminação de oxigênio que interfere na ativação dos  
21 nitroimidazóis (LEITSCH et al., 2016; MENEZES et al., 2016).

22 Assim, novos métodos de ensaio de desenvolvimento para detecção e  
23 identificação de mecanismos moleculares de resistência no parasita são  
24 necessários (CONRAD et al., 2013). A caracterização de alvos bioquímicos e  
25 moleculares do parasita como a flavina redutase 1, piruvato-ferredoxina oxido  
26 redutase, ferredoxina e nitrorredutase (LEITSCH et al., 2014; PAULISH-  
27 MILLER et al., 2014) é uma estratégia potencial para novas terapêuticas.  
28 Adicionalmente, a busca de novas alternativas medicamentosas  
29 estruturalmente diferentes dos 5-nitroimidazóis a partir da busca por novas  
30 classes de substâncias e o desenvolvimento de tratamentos tópicos  
31 adjuvantes, sejam originados de compostos naturais ou sintéticos ou até  
32 mesmo derivados de medicamentos já comercializados, também vêm sendo

1 impulsionados pela necessidade de expandir o repertório de tratamento da  
2 tricomoníase.

3

### 4 **3.5 Compostos Naturais e Sintéticos como novas alternativas no** 5 **tratamento da Tricomoníase**

6 Na intensa busca por novos fármacos que possam tratar diferentes  
7 patologias, podemos destacar os produtos naturais, que representam uma  
8 importante fonte de moléculas ativas (NEWMAN; CRAGG, 2012; NEWMAN;  
9 CRAGG, 2016). Na indústria farmacêutica moderna, apesar da grande  
10 variedade de moléculas derivadas da química combinatória, os produtos  
11 naturais desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de  
12 fármacos. As plantas destacam-se por possuírem muitos constituintes e  
13 metabólitos secundários que apresentam atividade contra inúmeras  
14 enfermidades, incluindo doenças infecciosas (NGO et al., 2013). Cerca de 35%  
15 das drogas aprovadas são oriundas de produtos naturais ou derivados  
16 semissintéticos, enquanto 30% são moléculas sintéticas baseadas em produtos  
17 naturais ou apresentam um fármaco desenvolvido a partir de compostos  
18 naturais (NEWMAN; CRAGG, 2012; NEWMAN; CRAGG, 2016).

19 Estudos de novas classes de substâncias sintéticas também vêm sendo  
20 impulsionados pela necessidade de novos fármacos para tratar diversas  
21 infecções. Bibliotecas químicas de moléculas sintéticas são rastreadas para  
22 identificar substâncias com efeito terapêutico desejável, e podem ser  
23 descobertos novos compostos. Além disso, medicamentos já comercializados,  
24 também podem ser rastreados e novos efeitos terapêuticos descobertos.  
25 Dessa forma, os compostos sintéticos exibem uma importante ferramenta para  
26 a descoberta de fármacos sintetizados laboratorialmente, e têm emergido como  
27 fator de interesse na área da biotecnologia médica, devido às suas diversas  
28 propriedades farmacológicas (NEWMAN; CRAGG, 2012; NEWMAN; CRAGG,  
29 2016; NGO et al., 2013; VIEIRA et al., 2015).

30 Newman e Cragg (2016), mostram as limitações e falta de investimentos  
31 na busca de fármacos com ação antiparasitária, já que num total de 326  
32 fármacos descritos para utilização em diferentes doenças infecciosas, somente



1 15 são antiparasitários. Diante do exposto, o estudo da atividade biológica de  
2 compostos naturais e sintéticos, é importante para o desenvolvimento de novos  
3 fármacos como novas alternativas no tratamento de diferentes parasitoses,  
4 como a tricomoníase. Com isso, podemos destacar a própolis vermelha  
5 brasileira e as moléculas de derivados sintéticos 1, 3 – dioxolanas contendo  
6 telúrio e quinolina-1,2,3-triazolil-carboxamidas, ambos já que tiveram a  
7 descrição de diversas atividade biológicas que serão destacadas à seguir.

8

### 9 **3.5.1 Óleo Essencial da Própolis Vermelha Brasileira**

10

11 A própolis é uma substância resinosa coletada pelas abelhas, de  
12 diversas partes da planta, como brotos, botões florais e exsudatos resinosos,  
13 tendo como função principal a proteção da colméia. Sua composição pode  
14 variar de acordo com a origem vegetal e o período de coleta, sendo assim  
15 intimamente relacionada a flora de cada região e da espécie de abelha  
16 produtora, apresentando-se principalmente nas cores marrom, vermelha ou  
17 verde (MARCUCCI, 1996).

18 Variações da composição química estão bastante associadas a  
19 mudanças nas propriedades farmacológicas da própolis, podendo interferir em  
20 sua eficácia terapêutica. Em geral, a própolis é composta de 50% de resina e  
21 bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de  
22 pólen e 5% de várias outras substâncias, incluindo os resíduos orgânicos.  
23 Estes valores se referem à espécie *Apis mellifera L.*, cuja própolis é a mais  
24 estudada entre as abelhas (BURDOCK, 1998).

25 Diversos compostos químicos já foram isolados da própolis, sendo os  
26 flavonóides descritos como os principais compostos responsáveis por suas  
27 atividades biológicas. Os flavonóides são definidos como compostos fenólicos  
28 provenientes de plantas, que agem em diferentes processos fisiológicos,  
29 atuando na ação e absorção de vitaminas, nos processos de cicatrização como  
30 antioxidantes e exercendo função antimicrobiana e moduladora do sistema  
31 imune (PARK et al., 1998).

1 Investigações experimentais e clínicas descreveram propriedades  
2 antiparasitárias com extrato hidroalcoólico de própolis (EEP). Ensaio *in vitro*  
3 com *Toxoplasma gondii* e *Trichomonas vaginalis*, relataram 100% de morte  
4 celular quando expostos a concentração de 150 mg/ml do EEP. Em *Giardia*  
5 *lamblia*, o EEP reduziu o crescimento do parasito em torno de 50 a 60%, em  
6 culturas expostas a 125, 250 e 500 mg/ml do extrato em todos os períodos de  
7 incubação (24, 48, 72 e 96 h), também foi observado alterações morfológicas e  
8 inibição da aderência (DOBROWOLSKI et al.,1991; FREITAS et al., 2006;  
9 STARZYK et al.,1977). Em adição, resultados clínicos indicam que o extrato de  
10 própolis pode ser eficaz no tratamento de coccidioses, tricomoníase e giardíase  
11 (HOLLANDS et al.,1984; MIYARES et al., 1988; PEREZ et al., 1995).

12 Diversos estudos reforçam a importância farmacológica da própolis, pois  
13 comprovam as atividades biológicas tais como: antineoplásica,  
14 imunomodulatória, anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, antiviral,  
15 antidiabética e antiparasitária (BURDOCK, 1998; SFORCIN, 2007; SFORCIN;  
16 BANKOVA, 2011).

17 De acordo com as propriedades físico-químicas (cor, textura,  
18 composição química) e origem geográfica, a própolis brasileira é usualmente  
19 classificada em 12 tipos. Em 2007, um décimo terceiro tipo foi reportado como  
20 própolis vermelha brasileira (PVB) (ALENCAR et al., 2007) As propriedades  
21 biológicas da própolis são atribuídas a uma variedade de importantes  
22 constituintes químicos incorporados na mistura resinosa; no caso da PVB,  
23 alguns componentes ativos foram identificados, e, dentre eles citamos:  
24 isoflavonóides, pterocarpanos, chalconas, flavonóides, benzofenonas  
25 preniladas, terpenos e taninos. Os marcadores químicos de PVB também  
26 foram identificados recentemente, como as isoflavonas, incluindo  
27 formononetina, biochanina - A, pinocembrina e medicarpina. Com isso, várias  
28 atividades biológicas e farmacológicas têm sido descritas para PVB, tais como:  
29 antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, imunomodulatória, antioxidante e  
30 antineoplásica (ALENCAR et al., 2007; FREIRES et al., 2016; FROZZA et al.,  
31 2013).

1 Extratos de própolis vermelha de diferentes regiões geográficas já  
2 demonstraram potencial utilização enquanto substância antiparasitária.  
3 Recentemente foi utilizado o extrato etanólico de própolis vermelha obtido na  
4 Nigéria contra *Trypanosoma brucei*, o estudo confirmou potente atividade  
5 antiparasitária tanto em linhagens sensíveis à drogas como em linhagens  
6 resistentes (OMAR et al., 2016). Em *Leishmania amazonensis*, foram testadas  
7 quatro amostras de extratos etanólicos de própolis, duas amostras de própolis  
8 coletadas no estado brasileiro do Paraná, própolis verde, tipificado como BRG  
9 e BRPG. Própolis coletadas no estado de Minas Gerais, tipificado como BRP-1  
10 (própolis verde) e a amostra coletada no estado de Alagoas como BRV  
11 (própolis vermelha). Todos os extratos etanólicos de própolis, tanto verde  
12 quando vermelha, foram capazes de reduzir a carga parasitária, sendo esta  
13 monitorada pela percentagem de células infectadas e o número de parasitos  
14 intracelulares (AYRES et al., 2007). Estes estudos, demonstram o importante  
15 potencial farmacológico da própolis vermelha brasileira.

16

### 17 **3.5.2 Moléculas de 1-3 Dioxolanas contendo Telúrio**

18

19 O elemento Telúrio (Te) foi descoberto em 1782 e pertence ao grupo  
20 16 da tabela periódica, denominada família dos calcogênios, assim como o  
21 selênio e o enxofre. Pode apresentar-se com diferentes números de oxidação:  
22  $Te^{+6}$  (Telurato),  $Te^{+4}$  (Telurito),  $Te^0$  (Telúrio elementar) e  $Te^{-2}$  (Telureto), sendo  
23 encontrado com maior frequência na forma de Teluretos (SCANSETTI, 1992).  
24 A inclusão desse átomo em moléculas orgânicas ocorreu somente no século  
25 XIX, quando o primeiro composto orgânico de Telúrio foi sintetizado em 1840  
26 por Friedrich Wöhler, mas apenas em 1970 esses compostos começaram a ser  
27 explorados pelos químicos orgânicos, refletindo no crescimento de trabalhos  
28 científicos publicados desde então.

29

30 Assim como o Telúrio elementar e os sais inorgânicos, os compostos  
31 orgânicos de Telúrio podem ser tóxicos, e a intensidade desta toxicidade  
32 depende da estrutura do composto, da dose administrada e do tipo de animal  
testado (NOGUEIRA et al., 2004). Essa ação tóxica parece estar relacionada

1 ao seu estado de oxidação (VAN VLEET; FERRANS, 1982) e o mecanismo  
2 proposto para explicar a toxicidade de alguns compostos contendo Telúrio  
3 envolve a sua capacidade de oxidar grupos –SH de moléculas biologicamente  
4 ativas, inativando enzimas e/ou diminuindo a concentração de moléculas  
5 sulfídricas não-proteicas (BLAIS et al., 1972).

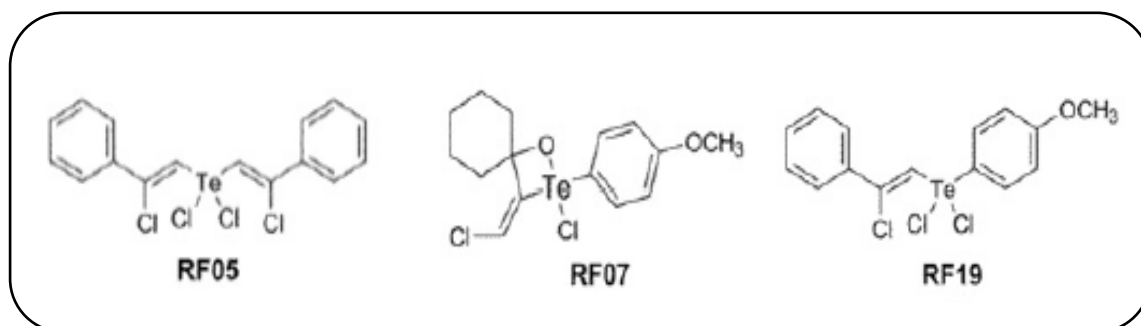
6 Assumiu-se que a toxicidade do Telúrio é consequência das fortes  
7 propriedades oxidantes que levam à formação de espécies reativas de oxigênio  
8 (ROS) (TREMAROLI et al., 2007). Em qualquer caso, os eventos químicos e  
9 bioquímicos que cercam tais compostos contendo Telúrio e sua citotoxicidade  
10 são bastante complexos. Com base em estudos recentes, é possível que os  
11 agentes de Telúrio, tenham a capacidade de regular a atividade de proteínas  
12 de indução de apoptose específicas em células cancerosas, mas também  
13 desencadear uma resposta antioxidante em células normais. As propriedades  
14 antioxidantes desta classe de compostos esta normalmente relacionada a  
15 atividade mimética a glutathione peroxidase (GPx), ou seja, eles podem  
16 decompor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e peróxidos orgânicos (NOBRE et al., 2014).

17 Apesar das propriedades tóxicas atribuídas aos compostos orgânicos de  
18 Telúrio, existem relatos atribuindo importantes propriedades antimicrobianas  
19 (BA, LA et al., 2010; CUNHA et al., 2009), antioxidantes (CUNHA et al., 2009;  
20 NOBRE et al., 2014; WIESLANDER et al., 1998), imunomodulatórias (SREDNI,  
21 2012), antitumorais (SREDNI, 2012; URIG; BECKER, 2006) e antiprotozoários  
22 (MALUF et al., 2016; PIMENTEL et al., 2012; TIEKINK, 2012)

23 A investigação de atividades antiparasitárias de compostos orgânicos  
24 contendo Telúrio ainda está em seu estágio inicial. Recentemente, foi  
25 demonstrado efeito leishmanicida de um composto orgânico contendo Telúrio  
26 (RF07) (**Figura 2**). Ensaio *in vitro* foram realizados em macrófagos derivados  
27 da medula óssea, infectados com *Leishmania chagasi* tratados com diferentes  
28 concentrações de RF07. Em ensaios *in vivo* em que hamsters dourados  
29 infectados com *L. chagasi* foram injetados intraperitonealmente com RF07, o  
30 composto apresentou atividade leishmanicida significativa contra o parasita  
31 intracelular e a droga exibiu 10 vezes menos toxicidade para os macrófagos. A  
32 curva cinética revelou uma crescente ação leishmanicida de RF07 em períodos

1 mais longos de tratamento. Os hamsters infectados com *L. chagasi*  
 2 apresentaram uma redução de 99,6% da carga parasitária quando comparados  
 3 aos controles que receberam PBS. Os presentes resultados demonstram que o  
 4 composto de Telúrio RF07 é capaz de destruir *L. chagasi*, *in vitro* e *in vivo* em  
 5 concentrações que não sejam tóxicas para o hospedeiro (PIMENTEL et al.,  
 6 2012).

7 Além disso, atividade antimalárica de três derivados de compostos  
 8 orgânicos contendo Telúrio foi relatada (RF05, RF07 e RF19) em dois isolados  
 9 de *Plasmodium falciparum* (CQS 3D7 e CQR W2), que demonstraram  
 10 reduções significativas na parasitemia *in vitro* (**Figura 2**). Nenhum dos  
 11 compostos testados causou hemólise ou uma diminuição significativa da  
 12 viabilidade das células endoteliais, na concentração utilizada para o ensaio de  
 13 inibição. Os autores sugerem que os compostos orgânicos contendo Telúrio  
 14 podem ser promissores para o desenvolvimento de drogas antimaláricas  
 15 (MALUF et al., 2016). Estes estudos, demonstram o importante potencial  
 16 farmacológico dos compostos orgânicos de telúrio, como as moléculas de 1,3  
 17 dioxolanas contendo telúrio (PTeDOX) (**Figura 3**).



27  
28  
29  
30

Figura 2 – Estrutura química das moléculas RF05, RF07 e RF19. Fonte: PIMENTEL et al., 2012, p.1 e48780; MALUF et al., 2016, p. 22.

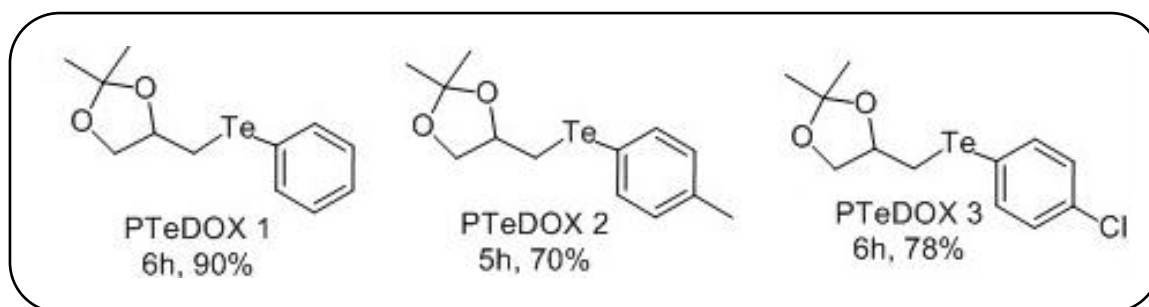


Figura 3 – Estrutura química das moléculas de 1,3 dioxolanas contendo telúrio (PTeDOX)

### 3.5.3 Moléculas de quinolina-1,2,3-triazol-carboxamidas

As quinolinas são moléculas que foram descritas pela primeira vez em 1842 a partir da decomposição da quinina (uma substância extraída de plantas do gênero *Cinchona*) e são caracterizadas como compostos heterocíclicos, aromáticos e nitrogenados. Em sua estrutura, possuem duplo anel benzênico fusionado a piridina, no qual o átomo de carbono da posição 1 é substituído por um átomo de nitrogênio (MANSKE, 1942). As quinolinas e seus derivados representam uma importante classe de moléculas orgânicas, as quais despertam o interesse nas áreas de síntese e química medicinal e estão presentes em diversas substâncias naturais, principalmente alcaloides derivados de plantas, mas também podem ser compostos sintetizados laboratorialmente (WILHEM et al., 2014).

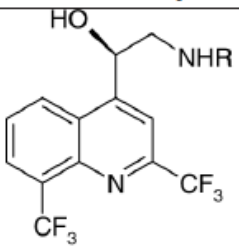
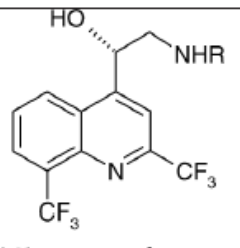
A importância do núcleo quinolínico pode ser evidenciada pelo grande número de fármacos, obtidos por via sintética, comercialmente disponíveis que contêm esse núcleo em sua estrutura, como é o caso de dois derivados clorados: o cloroquinol, fármaco utilizado em diversas infecções fúngicas cutâneas e o cloroquina, antisséptico que apresenta atividade antibacteriana e antifúngica (MAO et al., 2009). Os primeiros derivados quinolínicos foram inicialmente desenvolvidos para substituir a quinina no tratamento da malária, pois a mesma possuía alta toxicidade e ocasionavam inúmeros efeitos colaterais. As pesquisas resultaram então no desenvolvimento dos derivados 4-amino-quinolínicos (cloroquina e a amodiaquina), do derivado piperidínico (mefloquina) e dos derivados 8-aminoquinolínicos (primaquina e a tafenoquina) como potenciais compostos antimaláricos (CUNICO et al., 2008).

Uma série de compostos enantiômeros de 4-aminoálcool quinolinas foram avaliados *in vitro* para a atividade antimalárica. Os seis enantiômeros com configuração S-absoluta [(S)-1 a (S)-6] testados demonstraram forte atividade antimalárica *in vitro* contra as duas cepas de *Plasmodium falciparum* (W2 e 3D7) e apresentaram IC50 mais baixo que os fármacos padrão (cloroquina e mefloquina), tendo sido o composto (S)-2 o melhor para ambas as cepas do parasito, com IC50 de 6,98 e 8,33 nmol/L para as cepas W2 e

1 3D7, respectivamente (**Figura 4**) (MULLIÉ et al., 2012). Os mecanismos de  
 2 ação exatos dos fármacos quinolínicos ainda deve ser elucidado de forma  
 3 específica para cada grupo de derivados, mas acredita-se que no caso da  
 4 atividade antimalárica esse mecanismo baseia-se na inibição da  
 5 biocristalização da hemozoína, o que conduz à liberação do grupo heme, que é  
 6 tóxico ao parasito devido à sua capacidade de gerar espécies reativas de  
 7 oxigênio (MURALEEDHARAN; AVERY, 2007).

8

**Table 1 4-aminoalcohol quinoline derivatives**

R		
	( <i>R</i> )-enantiomer	( <i>S</i> )-enantiomer
Butyl	( <i>R</i> )-1	( <i>S</i> )-1
Pentyl	( <i>R</i> )-2	( <i>S</i> )-2
Hexyl	( <i>R</i> )-3	( <i>S</i> )-3
Heptyl	( <i>R</i> )-4	( <i>S</i> )-4
Octyl	( <i>R</i> )-5	( <i>S</i> )-5
Phenyl	( <i>R</i> )-6	( <i>S</i> )-6

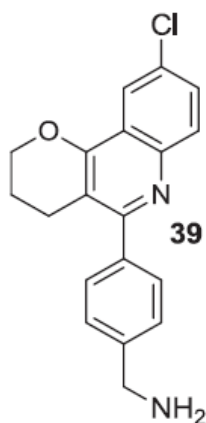
9

10 Figura 4 – Estrutura química das moléculas de compostos enantiômeros de 4-aminoálcool  
 11 quinolinas. Fonte: MULLIÉ et al., 2012, p. 2.

12

12 Além disso, quinolinas que incorporam heterociclos, desempenham  
 13 um papel importante na pesquisa da química medicinal e já demonstraram  
 14 atividades biológicas e propriedades farmacológicas, como por exemplo:  
 15 antitumorais (BEGNINI et al., 2017) , antioxidantes (DOREY et al., 2000) ,  
 16 antituberculose (CANDÉA et al., 2009) , antifúngica (MUSIOL et al., 2006) ,  
 17 antibacteriana (FERRETTI et al., 2014) , anti-inflamatórias (WILHEM et al.,  
 18 2014), antidepressivas (WILHEM et al., 2014) e antiprotozoário (DI PIETRO et  
 19 al., 2015). Um estudo avaliou a atividade tripanossomática e leishmanicida *in*  
 20 *vitro*, de 22 compostos derivados de quinolinas tricíclicas heterofusionadas. A

1 atividade tripanossomacida foi testada nas cepas 221 de *Trypanosoma brucei*  
2 e MHOM/ES/2203/BCN590 (Tcl) de *Trypanosoma cruzi*. Já a atividade  
3 leishmanicida foi testada na cepa MCAN/ES/92/BCN722. Todos os compostos  
4 derivados de quinolinas heterofusionadas contendo um grupo aminometilfenil  
5 protonável no anel B foram mais potentes contra *T. brucei* que o fármaco  
6 padrão. A maior parte dos compostos testados também mostrou-se ativo contra  
7 *T. cruzi* seguindo o mesmo perfil encontrado para *T. brucei*, com destaque para  
8 os compostos derivados de quinolinas heterofusionadas contendo um grupo  
9 aminometilfenil protonável no anel B. Todos os compostos testados  
10 demonstraram atividade leishmanicida com valores de IC50 baixos e com a  
11 maior parte dos compostos demonstrando-se mais potente que o fármaco  
12 padrão. Por fim, a piranoquinolina (composto 39) foi selecionada como  
13 composto com melhor potencial anti múltiplos protozoários baseado em seus  
14 valores de IC50 para os três parasitos (**Figura 5**) (DI PIETRO et al., 2015).



15

16

Figura 5 – Estrutura química da piranoquinolina (composto 39). Fonte:  
DI PIETRO et al., 2015, p. 5.

17

18 Além das quinolinas, as moléculas da classe dos azóis também são  
19 compostos que despertam interesse na química medicinal. Dentre eles,  
20 destacam-se os triazóis, que têm sido muito estudados pelo fato de possuírem  
21 um vasto campo de aplicações. Os triazóis são heterociclos de cinco membros  
22 contendo três átomos de nitrogênio como substituintes e apresentam em sua  
23 estrutura seis elétrons. Como todos os azóis, são compostos exclusivamente  
24 sintéticos, não existindo indicações que eles possam ser encontrados na



1 natureza. Devido a isso, são diversas as rotas sintéticas, clássicas ou mais  
2 atuais, que permitem a obtenção desses compostos (MELO et al., 2006).

3 Moléculas sintéticas contendo unidades de 1,2,3-triazóis já foram  
4 descritas como detentoras de diversas atividades biológicas, incluindo  
5 antituberculose, antibacteriana, anticancerígena e anti-*Leishmania* (AGALAVE  
6 et al., 2011; MASOOD et al., 2017; WILHEM et al., 2014). Um estudo recente  
7 avaliou a atividade de dezoito novos compostos de 1,2,3-triazóis associados a  
8 uma cauda de aminoácidos sobre a forma promastigota da cepa Dd8 de  
9 *Leishmania donovani in vitro*. Três dos compostos testados (40, 43 e 53)  
10 demonstraram atividade leishmanicida promissora, além de não terem  
11 apresentado citotoxicidade sobre células THP-1 de macrófagos. O trabalho  
12 realizou ainda análises de docking destes três compostos e observou que estes  
13 apresentam interações com resíduos do sítio catalítico da enzima tripanotiona  
14 redutase, essencial para manutenção do ambiente redutor e sobrevivência do  
15 parasito, demonstrando assim a potencialidade destes compostos como  
16 antiparasitários (MASOOD et al., 2017). Estes estudos demonstram o potencial  
17 farmacológico dos 1,2,3-triazóis, bem como de seus derivados, e com isso a  
18 adição destes compostos em derivados quinolínicos pode levar a obtenção de  
19 moléculas com atividade biológica, dentre elas atividade antiparasitária.

20 Diante do exposto, o óleo essencial da própolis vermelha brasileira,  
21 moléculas de 1,3-dioxolanas contendo telúrio e moléculas de quinolina-1,2,3-  
22 triazoil-carboxamidas, demonstram ser alternativas medicamentosas  
23 importantes e que devem ser investigadas quanto ao seu potencial biológico.

24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30

**Artigo 1. Antiparasitic activity of 1,3-dioxolanes containing tellurium in  
*Trichomonas vaginalis***

**Artigo publicado na revista: Biomedicine & pharmacotherapy [0753-3322] Sena-Lopes,  
Ângela ano: 2017 vol.: 89 p.: 284-287, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.173>,  
Anexo A.**

1 **4.Artigo 1. Antiparasitic activity of 1,3-dioxolanes containing tellurium in**  
2 ***Trichomonas vaginalis***

3  
4 Ângela Sena-Lopes<sup>1</sup>, Raquel Nascimento das Neves<sup>1</sup>, Francisco Silvestre  
5 Brilhante Bezerra<sup>1</sup>, Mara Thais de Oliveira Silva<sup>1</sup>; Patrick. C. Nobre<sup>2</sup>, Gelson  
6 Perin<sup>2</sup>, Diego Alves<sup>2</sup>, Lucielli Savegnago<sup>3</sup>, Karine Rech Begnini<sup>4</sup>, Fabiana  
7 Kommling Seixas<sup>4</sup>, Tiago Collares<sup>4</sup>, Sibebe Borsuk<sup>1</sup>

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

10 <sup>2</sup>LASOL – CCQFA, Universidade Federal de Pelotas – UFPel, P.O. Box 354 – 96010–900,  
11 Pelotas, RS, Brazi

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

14 <sup>4</sup>Laboratório de Biotecnologia do Câncer, Centro de Desenvolvimento Tecnológico,  
15 Biotecnologia, UFPel, Pelotas, RS, Brazil, 96010–900

16  
17 **Abstract**

18 The increased prevalence of metronidazole-resistant infections has resulted in a  
19 search for alternative drugs for the treatment of trichomoniasis. In the present  
20 study, we report the preparation and *in vitro* activity of three 1,3-dioxolanes that  
21 contain tellurium (PTeDOX 01, PTeDOX 02, and PTeDOX 03) against  
22 *Trichomonas vaginalis*. Six concentrations of these compounds were analyzed  
23 for *in vitro* activity against ATCC 30236 isolate of *T. vaginalis*. PTeDOX 01  
24 reported a cytotoxic effect against 100% of *T. vaginalis* trophozoites at a final  
25 concentration of 90 µM with an IC<sub>50</sub> of 60 µM. The kinetic growth curve of  
26 trophozoites indicated that PTeDOX 01 reduced the growth by 22% at a  
27 concentration of 90 µM after an exposure of 12 h, and induced complete  
28 parasite death at 24 h. It induced cytotoxicity of 44% at 90 µM concentration but  
29 and had no effect in lower concentrations in a culture of CHO-K1 cells. These

1 results confirmed that PTeDOX 01 is an important drug for the treatment of *T.*  
2 *vaginalis*, and should be evaluated in other infectious agents as well.

3  
4 **Keywords:** *Trichomonas vaginalis*; organic tellurium; antiparasitic

#### 5 **Introduction**

6 *Trichomonas vaginalis* is a protozoan infecting genitourinary tract and  
7 causing the most common non-viral, sexually transmitted disease (STD) in the  
8 world. According to World Health Organization [1], an estimated 276 million  
9 cases of trichomoniasis have been reported worldwide, most of them occurring  
10 in women.

11 The drugs of choice for treating trichomoniasis are derived from 5-  
12 nitroimidazoles, metronidazole, and tinidazole, all of which are approved by  
13 Food and Drug Administration [2] Metronidazole is a prodrug, its 5-nitro group is  
14 reduced in the parasite by reductases resulting in the production of cytotoxic  
15 nitro radical intermediates. These radicals act by disrupting the DNA strands  
16 leading to the death of the parasite [3]. Although the cure rates are significant,  
17 treatment failures may be observed and are attributed mainly to non-compliance  
18 with treatment or reinfection, but factors such as poor drug absorption or  
19 insufficient bioavailability are also reported [4].

20 However, the major cause of treatment failure is the development of  
21 resistant isolates of *T. vaginalis* to the drugs in use [5]. In this context, an  
22 intensive search for new molecules as potential drugs with antiparasitic activity  
23 for the treatment of trichomoniasis is required. Here, we highlight the organic  
24 compounds containing tellurium as possible drugs for the treatment of  
25 trichomoniasis. Pharmacological uses of these organic compounds have been  
26 studied including immunomodulatory properties and therefore they may be  
27 utilized as antitumor, anti-inflammatory, antiviral, and antiparasitic drugs [6,7].  
28 Thus, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* anti-*T. vaginalis* activity  
29 of three 1,3-dioxolanes that contain tellurium (PTeDOX).

30  
31  
32

## 1 **Materials and Methods**

2

### 3 **Chemicals**

4 The activity of 1,3-dioxolanes containing tellurium (PTeDOX) diluted in  
5 dimethylsulfoxide (DMSO) was analyzed in *T. vaginalis*. For this, we selected  
6 three compounds: PTeDOX 01, PTeDOX 02, and PTeDOX 03 (**Figure 1**).

7 The 1,3-dioxolanes containing tellurium (PTeDOX) were prepared using a  
8 method previously described [8]. To a solution of ditelluride **2** (0.3 mmol) in  
9 polyethylene glycol (PEG 400) (3 mL) under N<sub>2</sub> atmosphere, NaBH<sub>4</sub> (0.023 g,  
10 0.6 mmol) was added at room temperature and stirred for 30 min. Then,  
11 tosylate **1** (0.5 mmol) was added, and the temperature was slowly raised to  
12 50°C. The progress of the reaction was followed by thin-layer chromatography  
13 (TLC). After 5–6 h, the reaction mixture was washed with a solution of  
14 hexane/ethyl acetate in a ratio of 98:2 (3 × 3 mL). The upper organic phases  
15 were separated from PEG, dried with magnesium sulfate (MgSO<sub>4</sub>), and the  
16 solvent was evaporated under reduced pressure. The product was isolated by  
17 column chromatography using silica gel 60A (0.060–0.200 mm) and hexane or  
18 hexane/ethyl acetate as an eluent. The corresponding PTeDOX compounds  
19 were isolated in 70 to 90% yield (**Figure 1**).

20

### 21 **Parasite Culture Conditions**

22 In this study, *T. vaginalis* 30236 isolate from American Type Culture  
23 Collection (ATCC) was used. Trophozoites were axenically cultured in  
24 trypticase-yeast extract-maltose (TYM) medium without agar (pH 6.0),  
25 supplemented with 10% sterile bovine serum (inactivated at 56°C), and  
26 incubated at 37°C [9]. The culture with 95% viability, confirmed through  
27 observation of motility, morphology, and trypan blue exclusion (0.4%) assay  
28 under the light microscope at 400X magnification was considered alive and  
29 utilized for the evaluation of activity of 1,3-dioxolanes.

30

31

32

## 1 **Anti-Trichomonas vaginalis Assay**

2 Three compounds of 1,3-dioxolanes containing tellurium (PTeDOX)  
3 were screened *in vitro* for activity against *T. vaginalis* (PTeDOX 01, PTeDOX  
4 02, and PTeDOX 03). All assays were performed in 96-well microtiter plates.  
5 The parasites were seeded at an initial density of  $2.6 \times 10^5$  trophozoites/mL of  
6 TYM and incubated with PTeDOX drugs. Three controls were carried out:  
7 parasites only, vehicle for solubilization of the derivatives (0.6% DMSO), and  
8 MTZ 100 $\mu$ M (as positive control, metronidazole - Sigma-Aldrich). The  
9 microculture plates were incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. After that, a  
10 preparation containing trophozoites and trypan blue (0.4%) at a ratio of 1:1 was  
11 counted in a Neubauer chamber and cultures with 95% viability were utilized for  
12 assays.

13 For screening, PTeDOX 01, PTeDOX 02, and PTeDOX 03 were used  
14 at a final concentration of 100  $\mu$ M. Only the compound that reduced the viability  
15 of parasites to 100% was used to determine the minimum inhibitory  
16 concentration (MIC) by considering different concentrations such as 40, 50, 60,  
17 70, 80, 90, and 100  $\mu$ M. The parasite pellets used to establish MIC and the  
18 concentrations below and above as well as controls were inoculated in fresh  
19 TYM medium at 37°C. Parasites were counted in a Neubauer chamber with  
20 trypan blue every 24 h for 96 h to confirm MIC. The viability of trophozoites was  
21 assessed by exclusion of trypan blue dye, motility, and morphology. The IC<sub>50</sub>  
22 was determined (half the maximum inhibitory concentration) at concentrations  
23 of 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100  $\mu$ M as described in the MIC method.

24 A kinetic growth curve was constructed to obtain a more comparable  
25 activity profile of PTeDOX compounds against *T. vaginalis*. The viability of  
26 trophozoites was observed under the light microscope at 96 h after incubation  
27 at respective MIC. Growth analysis was performed at the following times: 1, 6,  
28 12, 24, 48, 72, and 96 h by trypan blue (0.4%) exclusion method and by  
29 determining the motility and morphology. All the assays were performed  
30 independently at least three times in triplicate and the results were expressed  
31 as the percentage of viable trophozoites in comparison with untreated parasites.

32

## 1 Cytotoxicity Assay

2  
3 Chinese Hamster Ovary (CHO-K1) cells were obtained from the Rio de  
4 Janeiro Cell Bank (PABCAM, Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil)  
5 and cultured as a monolayer in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)  
6 (Vitrocell Embriolife), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS)  
7 (Vitrocell Embriolife), 1% L-glutamine, and 1% penicillin/ streptomycin. The cells  
8 were grown at 37°C in an atmosphere of 95% humidified air and 5% CO<sub>2</sub>.

9 The proliferation of the CHO-K1 cell line after treatment with drugs was  
10 determined by measuring the reduction of soluble 3-(4,5-dimethylthiazol- 2-yl)-  
11 2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) to water-insoluble formazan. Cells were  
12 seeded at a density of  $2 \times 10^4$  cells per well in a volume of 100  $\mu$ L in 96-well  
13 plates and grown at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 24 h before using them in  
14 the cell viability assay. The cells were then treated with PTeDOX 01 at  
15 concentrations of 6.25, 12.5, 45, 90, and 180  $\mu$ M for 24 h. DMSO (vehicle  
16 alone) and 100  $\mu$ M of metronidazole were used as negative and positive  
17 controls, respectively. Following incubation, 20  $\mu$ L of MTT (Sigma-Aldrich) was  
18 added to each well, and the cells were incubated for an additional 3 h at 37°C.  
19 The differences in the total cellular metabolism were detected at a wavelength  
20 of 492 nm using a microplate reader. The inhibition (%) of cell proliferation was  
21 determined as follows: inhibitory growth =  $(1 - \text{Abs}_{492 \text{ treated cells}} / \text{Abs}_{492 \text{ control cells}})$   
22  $\times 100\%$ . The CC<sub>50</sub> was calculated using GraphPad Prism 5.0 Software. All  
23 observations were validated by at least three independent experiments in  
24 triplicate.

## 25 26 Statistical Analysis

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

31  
32  
33

## 1 Results

2

### 3 **Anti-*Trichomonas vaginalis* Assay**

4 Analysis of the data obtained from the screening of compounds reported  
5 that the compound PTeDOX 01 reduced the parasite viability by 100% as  
6 compared with the negative control (only trophozoites). The other two  
7 compounds, namely PTeDOX 02 and 03 reduced the parasite viability by 73%  
8 and 97%, respectively (**Figure 2**). As expected, negative controls, only  
9 trophozoites and DMSO exhibited positive motility and negative staining with  
10 trypan blue (0.4%), whereas the positive control, MTZ, completely reduced the  
11 parasite viability. The positive control depicted negative motility and stained  
12 blue in all the assays performed after 24 h exposure. Since a 100% reduction in  
13 parasite viability was observed with PTeDOX 01, it was selected to perform  
14 other tests. PTeDOX 01 demonstrated an optimal anti-*T. vaginalis* activity at a  
15 concentration of 90  $\mu\text{M}$ , which was confirmed by MIC and  $\text{IC}_{50}$  of 60  $\mu\text{M}$ , both at  
16 24 h exposure (**Figure 3**).

17

### 18 **Kinetic Growth Analysis**

19 The analysis of kinetic growth curve of trophozoites treated with PTeDOX  
20 01 displayed a reduction in the growth of trophozoites by 22% at a  
21 concentration of 90  $\mu\text{M}$  after 12 h exposure. In addition, a complete reduction of  
22 proliferation of parasite was observed at 24 h (**Figure 4**).

23

### 24 **Cytotoxic Assay**

25 The MTT assay conducted showed that PTeDOX 01 decreased the cell  
26 viability in a time and dose-dependent manner. However, a significant cell  
27 growth inhibition was observed in CHO-K1 cells after treatment with high doses  
28 (180  $\mu\text{M}$ ) of PTeDOX 01, which inhibited more than 50% of growth. The  $\text{CC}_{50}$   
29 value of PTeDOX 01 in CHO-K1 cells at 24 h was 99.12  $\mu\text{M}$  (**Figure 5**).  
30 Metronidazole (MTZ), reported a cell growth inhibition of 8.5%, which is similar  
31 to the cytotoxicity observed for PTeDOX 01 at 6.25, 12.5, and 45  $\mu\text{M}$ . These



1 results suggested that PTeDOX 01 is no more cytotoxic than the commercially  
2 available drugs for trichomoniasis.

#### 4 **Discussion**

5 The element, tellurium (Te) belongs to the group of chalcogens, which  
6 also includes the elements oxygen, sulfur, selenium, and polonium. Tellurium  
7 compounds possess several biological properties such as antimicrobial,  
8 anthelmintic, antiprotozoal, antioxidant, immunomodulatory, and antitumor  
9 [7,10–15].

10 Herein, we evaluated the *in vitro* anti-*T. vaginalis* activity of three  
11 compounds: 1,3-dioxolanes containing tellurium (PTeDOX) (**Figure 1**). We  
12 observed that only PTeDOX 01 with no extra radical in the structure reduced  
13 the viability of trophozoites to 100%. The selective toxicity against *T. vaginalis* is  
14 attributed to the fact that many tellurium agents are redox-active leading to a  
15 significant level of oxidative stress (OS) and *T. vaginalis* lacks an antioxidant  
16 defense. The organotellurium PTeDOX 01 showed antioxidant activity and was  
17 more effective in inhibition of induced lipid peroxidation. The authors suggest  
18 that PTeDOX 01 is a promising antioxidant and that its activity is influenced by  
19 the presence of the tellurium atom on the structure [8].

20 Studies demonstrated the leishmanicidal effects of an organotellurane  
21 (RF07). The drug RF07 exhibited a significant leishmanicidal activity against the  
22 intracellular parasite and with a ten-fold less toxicity to macrophages. [6] Also,  
23 researchers reported the antimalarial activities of three organotellurane  
24 derivatives (RF05, RF07, and RF19) against two *Plasmodium falciparum* strains  
25 which demonstrated a significant decrease in parasitemia *in vitro*. None of the  
26 compounds tested caused hemolysis or a significant decrease in endothelial  
27 cell viability at the concentration used for inhibition assay suggesting that  
28 organic tellurium compounds may prove to be promising for the development of  
29 antimalarial drugs [7].

30 The cytotoxicity of the organotelluranes was tested against CHO-K1  
31 cells. It is speculated that the toxicity of  
32 tellurium is a consequence of its strong oxidizing properties that lead to the

1 formation of deleterious reactive oxygen species [16]. The chemical and  
2 biochemical events surrounding such tellurium compounds and their cytotoxicity  
3 are complex and considerably more intricate than originally presumed. Based  
4 on recent studies, it is possible that the tellurium-containing compounds in  
5 question regulate the activity of specific apoptosis-inducing proteins in cancer  
6 cells, and also trigger an antioxidant response in normal cells. Despite the  
7 observation of cytotoxic activity of tellurium based organic compounds in this  
8 study, it is speculated that if utilized properly, these compounds may selectively  
9 act against certain microorganisms [13].

10 In the case of trichomoniasis, topical application is preferable due to two  
11 reasons. Firstly, the organic tellurium compounds are relatively less soluble in  
12 water and secondly the topical application allows a higher concentration of drug  
13 to reach the vaginal epithelium at lower treatment doses [17]. Altogether,  
14 organotelluranes are presumed to be a promising candidate for the topical  
15 treatment of trichomoniasis.

16

## 17 **Conclusions**

18 The investigation of antiparasitic activities of tellurium compounds is still  
19 in its early stages. The compound, PTeDOX 01 exhibited a high antiparasitic  
20 activity with little cytotoxicity at higher concentrations. Since topical application  
21 is preferable for the treatment of trichomoniasis, these compounds may prove to  
22 be effective at lower concentrations. The effectiveness of the organotelluranes  
23 determined in the present study offers new perspectives for exploring the  
24 potential of this class of molecules as an additional option for the treatment of  
25 trichomoniasis.

26

## 27 **Conflicts of interest**

28 All authors declare that they have no conflict of interest.

29

## 30 **Acknowledgements**

31 Authors thank the Post-Graduation Program in Pharmaceutical Sciences,  
32 UFRGS, in special: T. Tasca (\*) Laboratório de Pesquisa em Parasitologia,

1 Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto  
2 Alegre 90610-000, RS, Brasil.

3

#### 4 **References**

- 5 [1] WHO, Global incidence and prevalence of selected curable sexually  
6 transmitted infections-2008, World Heal. Organ. (2012) 1–28.
- 7 [2] FDA-EUA, Drug approvals and Databases,  
8 [Http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm). (n.d.).
- 9 [3] J. Kulda, Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance., Int. J.  
10 Parasitol. 29 (1999) 199–212.
- 11 [4] W.H. Lumsden, D.H. Robertson, R. Heyworth, C. Harrison, Treatment  
12 failure in *Trichomonas vaginalis* vaginitis., Genitourin. Med. 64 (1988)  
13 217–8.
- 14 [5] P. de B. Vieira, C.L.C. Brandelli, C. de M. Veríssimo, T. Tasca,  
15 Mecanismos específicos de patogenicidade de protozoários de mucosa,  
16 Clin. Biomed. Res. 32 (2012) 58–70.
- 17 [6] I.A. Salerno Pimentel, C. de S. Paladi, S. Katz, W.A. de Souza Júdice,  
18 R.L.O.R. Cunha, C.L. Barbiéri, In vitro and in vivo activity of an organic  
19 tellurium compound on *Leishmania (Leishmania) chagasi*., PLoS One. 7  
20 (2012) e48780.
- 21 [7] S. El Chamy Maluf, P.M.S. Melo, F.P. Varotti, M.L. Gazarini, R.L.O.R.  
22 Cunha, A.K. Carmona, Hypervalent organotellurium compounds as  
23 inhibitors of *P. falciparum* calcium-dependent cysteine proteases.,  
24 Parasitol. Int. 65 (2016) 20–2.
- 25 [8] P.C. Nobre, E.L. Borges, C.M. Silva, A.M. Casaril, D.M. Martinez, E.J.  
26 Lenardão, D. Alves, L. Savegnago, G. Perin, Organochalcogen  
27 compounds from glycerol: synthesis of new antioxidants., Bioorg. Med.  
28 Chem. 22 (2014) 6242–9.
- 29 [9] L.S. Diamond, The establishment of various trichomonads of animals and  
30 man in axenic cultures., J. Parasitol. 43 (1957) 488–90.
- 31 [10] E. Wieslander, L. Engman, E. Svensjö, M. Erlansson, U. Johansson, M.  
32 Linden, C.M. Andersson, R. Brattsand, Antioxidative properties of

- 1 organotellurium compounds in cell systems., *Biochem. Pharmacol.* 55  
2 (1998) 573–84.
- 3 [11] S. Urig, K. Becker, On the potential of thioredoxin reductase inhibitors for  
4 cancer therapy., *Semin. Cancer Biol.* 16 (2006) 452–65..
- 5 [12] R.L.O.R. Cunha, I.E. Gouvea, L. Juliano, A glimpse on biological activities  
6 of tellurium compounds, *An. Acad. Bras. Cienc.* 81 (2009) 393–407.
- 7 [13] L.A. Ba, M. Döring, V. Jamier, C. Jacob, Tellurium: an element with great  
8 biological potency and potential, *Org. Biomol. Chem.* 8 (2010) 4203.
- 9 [14] B. Sredni, Immunomodulating tellurium compounds as anti-cancer  
10 agents., *Semin. Cancer Biol.* 22 (2012) 60–9.
- 11 [15] E.R.T. Tiekink, Therapeutic potential of selenium and tellurium  
12 compounds: opportunities yet unrealised., *Dalton Trans.* 41 (2012) 6390–  
13 5.
- 14 [16] V. Tremaroli, S. Fedi, D. Zannoni, Evidence for a tellurite-dependent  
15 generation of reactive oxygen species and absence of a tellurite-mediated  
16 adaptive response to oxidative stress in cells of *Pseudomonas*  
17 *pseudoalcaligenes* KF707., *Arch. Microbiol.* 187 (2007) 127–35.
- 18 [17] B. Wachter, M. Syrowatka, A. Obwaller, J. Walochnik, In vitro efficacy of  
19 curcumin on *Trichomonas vaginalis*, *Wien. Klin. Wochenschr.* (2014)  
20 S32–6.
- 21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

## 1 Figure legends

2 **Figure 1:** a) General scheme for the synthesis of PTeDOX; b) Chemical  
3 structure of synthesized PTeDOX. Reactions are performed in the presence of  
4 tosylate **1** (0.5 mmol), ditelluride **2** (0.3 mmol) and NaBH<sub>4</sub> (0.6 mmol) at 50 °C  
5 under N<sub>2</sub> atmosphere.

6  
7 **Figure 2:** Antiparasitic activity of PTeDox 01, PTeDox 02 and PTeDox 03 at  
8 100 µM concentration against *Trichomonas vaginalis* 30236 isolate by trypan  
9 blue assay (0.4%) after 24 h of exposure. The trophozoite growth was  
10 completely inhibited by PTeDox 01 in 24 h of incubation. Vehicle for  
11 solubilization (DMSO 0.6%), metronidazole 100 µM (MTZ), control (untreated  
12 trophozoites). Data represent means ±standard deviation of at least three  
13 experiments in triplicate. Different letters show a significant difference. For all p  
14 < 0.05.

15  
16 **Figure 3:** Determination of MIC and IC<sub>50</sub> of *Trichomonas vaginalis* 30236 isolate  
17 after treatment with PTeDox 01 at 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 µM  
18 concentration and 24 h of exposure. The trophozoite growth was completely  
19 inhibited by PTeDox 01 in 24 h at 90 µM as MIC and 60 µM determining IC<sub>50</sub>.  
20 Vehicle for solubilization (DMSO 0.6%), metronidazole 100 µM (MTZ), control  
21 (untreated trophozoites). Data represent means ±standard deviation of at least  
22 three experiments in triplicate. Different letters show a significant difference. For  
23 all p < 0.05.

24  
25 **Figure 4:** Kinetic growth curve of *Trichomonas vaginalis* 30236 isolate after  
26 treatment with PTeDox 01 at 90 µM and the period of 1, 6, 12, 24, 48, 72, and  
27 96 h. The trophozoite growth was completely inhibited by PTeDox 01 in 24 h of  
28 incubation. Data represent means ±standard deviation of at least three  
29 experiments all in triplicate. Different letters show a significant difference. For all  
30 p < 0.05.

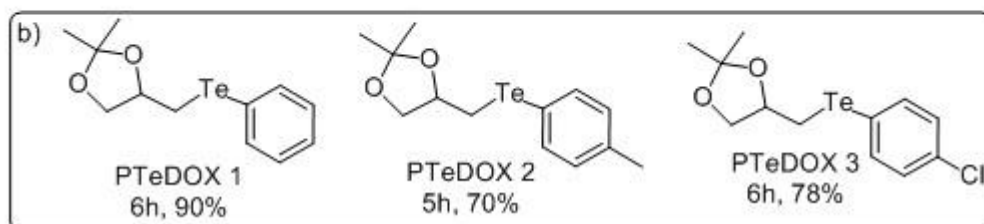
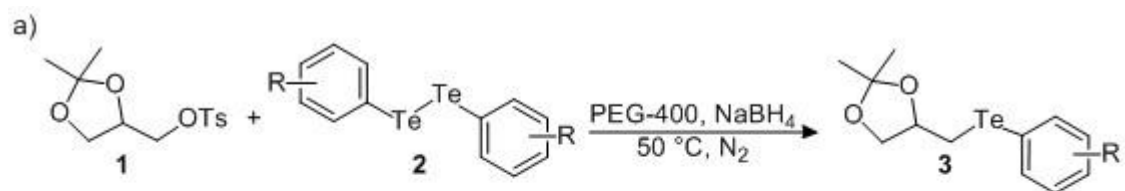
31  
32  
33 **Figure 5:** Cytotoxicity effect of PTeDox 01 in CHO-K1 cells. Cell proliferation in  
34 CHO-K1 was investigated by MTT assay. Data are expressed as means ±SEM  
35 from three independent experiments. Different letters (a, b, c and d) indicate  
36 difference between treatments. The differences were considered significant at P  
37 < 0.05.

38  
39  
40  
41  
42  
43  
44

1 **Figure 1**

2

3



4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

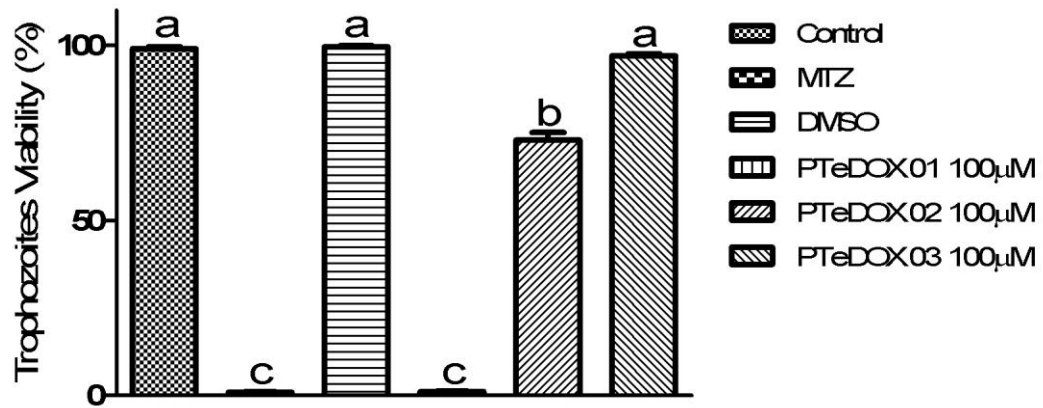
23

24

25

1 **Figure 2**

2



3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

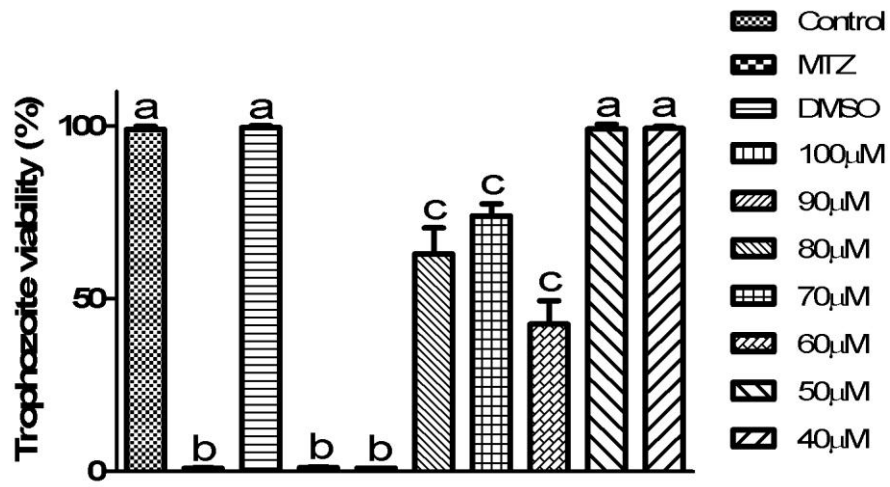
22

23

24

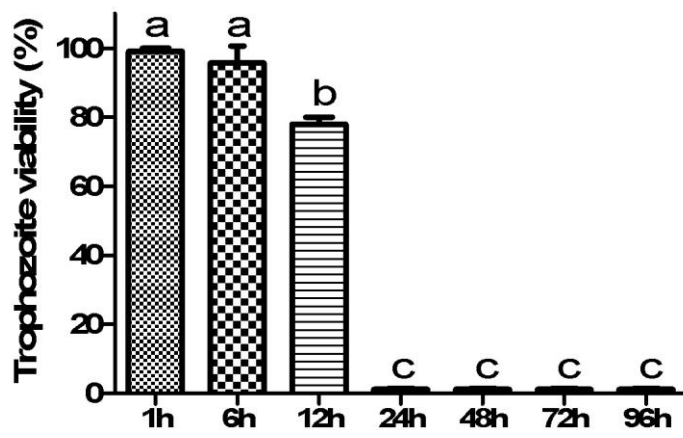
1 **Figure 3**

2

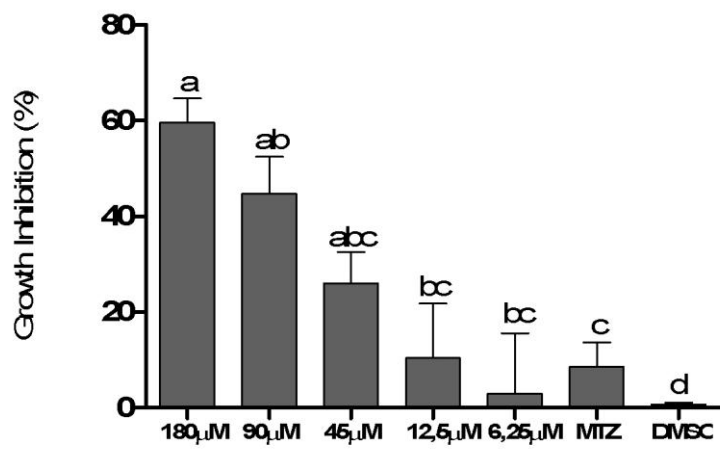




1 Figure 4



- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24

1 **Figure 5**

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28

**Artigo 2. Chemical composition, immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil from Brazilian red propolis**

Artigo publicado na revista: PLoS ONE [0753-3322] Sena-Lopes, Ângela ano: 2018 vol.: 13, n.: 2, p.: e0191797, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191797>, Anexo B.

1 **5. Artigo 2. Chemical composition, immunostimulatory, cytotoxic and**  
2 **antiparasitic activities of the essential oil from Brazilian red propolis**

3

4 Ângela Sena-Lopes<sup>1¶</sup>, Francisco Silvestre Brilhante Bezerra<sup>1¶</sup>, Raquel Nascimento das  
5 Neves<sup>1</sup>, Rodrigo Barros de Pinho<sup>1</sup>, Mara Thais de Oliveira Silva<sup>1</sup>, Lucielli Savegnago<sup>1</sup>,  
6 Tiago Collares<sup>1</sup>, Fabiana Seixas<sup>1</sup>, Karine Begnini<sup>1</sup>; João Antonio Pêgas Henriques<sup>2</sup>,  
7 Mariana Roesch Ely<sup>2</sup>, Luciane C. Rufatto<sup>2</sup>, Sidnei Moura<sup>2</sup>, Thiago Barcellos<sup>2</sup>, Francine  
8 Padilha<sup>3</sup>, Odir Dellagostin<sup>1</sup>, Sibebe Borsuk<sup>1\*</sup>

9 <sup>1</sup> Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTEc), Universidade Federal de Pelotas  
10 (UFPel), Campus Capão do Leão, Capão do Leão, RS, Brazil

11 <sup>2</sup> Departamento de Tecnologia, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do  
12 Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil.

13 <sup>3</sup> Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), Universidade de Tiradente, Aracaju,  
14 Sergipe, Brazil

15 \*Corresponding author

16 E-mail: sibebeborsuk@gmail.com ([SB](mailto:sibebeborsuk@gmail.com))

17 <sup>¶</sup>ASL and FSBB contributed equally.

18 **Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper.

19 **Funding:** This work was supported by Grant #1608/2011 from Coordenação de  
20 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) to João Antonio Pêgas  
21 Henriques. URL: [http:// www.capes.gov.br/](http://www.capes.gov.br/). The funders had no role in study design,  
22 data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

23

24 **Abstract**

25 Most studies of Brazilian red propolis have explored the composition and  
26 biological properties of its ethanolic extracts. In this work, we chemically  
27 extracted and characterized the essential oil of Brazilian red propolis (EOP) and  
28 assessed its adjuvant, antiparasitic and cytotoxic activities. The chemical  
29 composition of EOP was analyzed using gas chromatography with mass

1 spectrometry (GC-MS). EOP was tested for in vitro activity against *Trichomonas*  
2 *vaginalis* (ATCC 30236 isolate); trophozoites were treated with different  
3 concentrations of EOP (ranging from 25 to 500 µg/mL) in order to establish the  
4 MIC and IC<sub>50</sub> values. A cytotoxicity assay was performed in CHO-K1 cells  
5 submitted to different EOP concentrations. BALB/c mice were used to test the  
6 adjuvant effect of EOP. The animals were divided in 3 groups and inoculated as  
7 follows: 0.4 ng/kg BW EOP (G1); 50 µg of rCP40 protein (G2); or a combination  
8 of 0.4 ng/kg BW EOP and 50 µg of rCP40 (G3). Total IgG, IgG1 and IgG2a  
9 levels were assessed by ELISA. The major constituent compounds of EOP  
10 were methyl eugenol (13.1%), (E)-β-farnesene (2.50%), and δ-amorphene  
11 (2.3%). Exposure to EOP inhibited the growth of *T. vaginalis*, with an IC<sub>50</sub> value  
12 of 100 µg/mL of EOP. An EOP concentration of 500 µg/mL was able to kill  
13 100% of the *T. vaginalis* trophozoites. The EOP kinetic growth curve showed a  
14 36% decrease in trophozoite growth after a 12 h exposure to 500 µg/mL of  
15 EOP, while complete parasite death was induced at 24 h. With regard to CHO-  
16 K1 cells, the CC<sub>50</sub> was 266 µg/mL, and 92% cytotoxicity was observed after  
17 exposure to 500 µg/mL of EOP. Otherwise, a concentration of 200 µg/mL of  
18 EOP was able to reduce parasite proliferation by 70% and was not cytotoxic to  
19 CHO-K1 cells. As an adjuvant, a synergistic effect was observed when EOP  
20 was combined with the rCP40 protein (G3) in comparison to the administration  
21 of each component alone (G1 and G2), resulting in higher concentrations of  
22 IgG, IgG1 and IgG2a. EOP is constituted by biologically active components with  
23 promising antiparasitic and immunostimulatory activities and can be  
24 investigated for the formulation of new vaccines or trichomonacidal drugs.

25 **Keywords:** Essential oil; Brazilian red propolis; GC-MS; vaccine adjuvant;  
26 cytotoxicity; trichomonacidal effect.

27

## 28 **Introduction**

29 Currently, the Brazilian propolis is classified in 13 different types,  
30 according to its physical-chemical properties, botanical origin and geographic

1 area where propolis can be collected. Initially, Park et al. [1] classified propolis  
2 samples from different Brazilian regions in 12 groups. Afterwards, a 13<sup>th</sup> type of  
3 propolis with peculiar chemical composition was found in hives located  
4 alongside the coast and mangroves in the Brazilian northeast and was called  
5 Brazilian red propolis (BRP) [2]. In the last decade, the chemical composition of  
6 BRP has been revealed and related to its bioactivities. The main chemical  
7 components found in BRP are classified as isoflavones, flavones, flavonols,  
8 aurones, chalcones, pterocarpans and xanthones groups [3–6]. The botanical  
9 origin of BRP was identified as resinous exudates of *Dalbergia ecastophyllum*  
10 [7], however, likely a second plant species participates as one of the main  
11 sources of resins for BRP [5].

12 Due to the variety of chemical compounds of BRP incorporated within the  
13 resin mixture, especially phenolic compounds, many biological activities have  
14 been reported like antioxidant [2,8], antibacterial [9,10], fungicide [11],  
15 antiparasitic [10,12], antineoplastic [13,14], anti-caries [15], cytotoxic [2,10], anti-  
16 inflammatory [16,17], antinociceptive [18] and was also beneficial to the wound  
17 healing process [19].

18 Several experiments and clinical investigations have shown the  
19 antiparasitic and adjuvant properties of the hydroalcoholic extract of propolis  
20 (HEP). HEP of different types of propolis showed antiparasitary efficacy against  
21 *Giardia lamblia* [20,21], *Toxoplasma gondii* and *Trichomonas vaginalis* [22]. It is  
22 important to highlight that *T. vaginalis* is the etiological agent of trichomoniasis,  
23 the most common non-viral, sexually transmitted disease (STD) in the world  
24 [23]. In addition, metronidazole-resistant *T. vaginalis* has been implicated in an  
25 increasing number of refractory cases, which are usually treated with increased  
26 doses of the drug, leading to an increase in the occurrence of side effects [24].  
27 Clearly, alternative curative therapies are needed, and propolis emerges as a  
28 natural product for alternative drugs.

29 Moreover, HEP has been used to formulate veterinary vaccines against  
30 bacterial or viral diseases, once some phenolic compounds has presented  
31 immunomodulatory activity [25–27]. As adjuvant, propolis confers to the

1 vaccinal formulation desirable properties, such as reduced viscosity, good  
2 stability, low reactogenicity, low toxicity, and is able to induce a robust humoral  
3 and cellular response [26].

4 As aforementioned, most of the previous studies describing the biological  
5 activities of BRP uses ethanol as the extraction solvent, and the extraction  
6 method influences directly the yield and selectivity for some compounds [10,28].  
7 Volatile compounds like those found in essential oils are in low concentrations  
8 in propolis, but play an important role by contributing to propolis pleasant aroma  
9 and its biological activities. Researchers have applied various methods to obtain  
10 propolis volatiles such as distillation-extraction or hydrodistillation [29].

11 On the other hand, studies focusing on essential oils of propolis volatiles  
12 are relatively scarce, most of them dealing with antimicrobial properties against  
13 fungus, Gram-positive and Gram-negative bacteria [29]. Volatiles of propolis  
14 from stingless bees were able to stimulate the immune system of elderly  
15 patients by increasing their natural killer cell activity [30]. Essential oils of  
16 Chinese propolis inhibited the proliferation of human colorectal cancer cells by  
17 inducing cell cycle arrest and apoptosis [31]. However, to the best of our  
18 knowledge, there are no studies describing the chemical composition or the  
19 biological activities of the essential oil derived from the Brazilian red propolis  
20 (EOP). Herein, the chemical composition of the EOP is showed. Still, in vitro  
21 trichomonacidal and cytotoxic activities, and the adjuvant action of EOP in a  
22 recombinant vaccine are assessed.

23

## 24 **Materials and Methods**

### 25 **Red propolis sample collection and essential oil preparation**

26 Red propolis was collected from the municipality of Brejo Grande, located  
27 in the state of Sergipe, in northeastern Brazil (S 10°28'25" and W 36°26'12").  
28 Samples were collected in September 2011 and were maintained frozen at -20  
29 °C until use. For the preparation of the essential oil, conventional  
30 hydrodistillation was carried out using a Clevenger-type apparatus. Briefly, 380

1 g of BRP was transferred to a volumetric flask, and 2 L of distilled water was added. A heating mantle was placed onto the Clevenger apparatus. The essential oil was extracted after boiling the mixture for a time period of one hour. The essential oil obtained was collected in amber vials and stored at 4 °C until use. The total yield obtained was approximately 0.25%.

### 6 **Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS)**

7 Chemical composition analysis was performed using a gas  
8 chromatograph coupled with a mass-selective detector (Hewlett Packard  
9 6890/MSD5973, Palo Alto, USA) equipped with the HP ChemStation software  
10 and the Wiley 275 library. A capillary column composed of HP-INNOWax fused  
11 silica (30 m × 250 µm) of 0.50 µm film thickness (Hewlett-Packard, Palo Alto,  
12 USA) was used for the study. The temperature program used was as follows:  
13 the column temperature started at 40 °C (held for 8 min) and was increased to  
14 180 °C at 3 °C/min and then to 230 °C (held for 20 min) at 20 °C/min; the  
15 injector was at a temperature of 250 °C and the interface at 280 °C. The split  
16 ratio was 1:100, helium was the carrier gas (56 kPa), the flow rate was 1  
17 mL/min, the ionization energy was 70 eV, and the injected volume was 0.4 mL.

### 18 **Anti-*Trichomonas vaginalis* activity assay**

19 The *T. vaginalis* 30236 isolate used for evaluating antiparasitic activity in  
20 this study was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC).  
21 Trophozoites were axenically cultured in trypticase-yeast extract-maltose (TYM)  
22 medium (without agar; pH=6.0) supplemented with 10% sterile bovine serum  
23 (inactivated at 56 °C) and incubated at 37 °C [32]. Cultures with 95% viability,  
24 as confirmed through observation of motility, morphology, and trypan-blue  
25 exclusion (0.4%) assay under the light microscope at 400X magnification, were  
26 considered as alive and were used for evaluating the activity of EOP.

27 All assays were performed in 96-well microtiter plates (Cral®).  
28 Parasites were seeded at an initial density of  $2.6 \times 10^5$  trophozoites/mL of TYM  
29 and incubated in the presence of EOP. Three experimental controls were also  
30 performed: parasites only, the vehicle used for solubilization of EOP (0.6%



1 DMSO) and 100  $\mu$ M MTZ (metronidazole; Sigma-Aldrich) (as a positive control).  
2 The microculture plates were incubated at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> for 24 h.  
3 Subsequent to the incubation, a preparation containing trophozoites and trypan  
4 blue (0.4%) in a 1:1 ratio was prepared and counted in a Neubauer chamber.  
5 Cultures with 95% viability were utilized for the assay.

6 To determine the minimum inhibitory concentration (MIC), different  
7 concentrations of EOP (25, 50, 100, 200, 300, 400, and 500  $\mu$ g/mL) were tested  
8 as described by Hübner et al. [33], with some modification. Parasite pellets  
9 were used to establish the MIC as well as concentrations below and above the  
10 MIC value. Samples used as controls were inoculated in fresh TYM medium at  
11 37 °C. Parasites were counted in a Neubauer chamber with trypan blue every  
12 24 h for 96 h to confirm MIC. The viability of trophozoites was assessed by the  
13 exclusion of the trypan blue dye as well as by motility and morphology. The IC<sub>50</sub>  
14 (half the maximum inhibitory concentration) values were determined at the  
15 same concentrations used for the MIC test.

16 A kinetic growth curve was constructed in order to obtain a more  
17 comparable activity profile of EOP activity against *T. vaginalis*. The viability of  
18 trophozoites was observed under a light microscope 96 h after incubation with  
19 EOP at the required MIC. Growth analysis was performed at 1, 6, 12, 24, 48,  
20 72, and 96 h by the trypan blue (0.4%) exclusion method and by the evaluation  
21 of motility and morphology. All assays were performed independently at least  
22 three times in triplicate, and the results were expressed as the percentage of  
23 viable trophozoites compared to untreated parasites.

24 For the Anti-*Trichomonas vaginalis* activity assay, statistical analysis was  
25 conducted using one-way analysis of variance (ANOVA), and a probability value  
26 of  $p < 0.05$  was considered significant. Tukey's test was utilized to identify  
27 significant differences between the means of different treatments. GraphPad  
28 Prism version 5.0 for Windows (GraphPad Software, USA) was used for  
29 statistical analysis.

30

## 1 **Cytotoxicity assay**

2 Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells were obtained from the Rio de  
3 Janeiro Cell Bank (PABCAM, Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil)  
4 and cultured as a monolayer in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)  
5 (Vitrocell Embriolife) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Vitrocell  
6 Embriolife), 1% L-glutamine, and 1% penicillin/streptomycin. The cells were  
7 grown at 37 °C in an atmosphere of 95% humidified air and 5% CO<sub>2</sub>.

8 The post-treatment proliferation of the CHO-K1 cell line was determined  
9 by measuring the reduction of soluble 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl  
10 tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich) to water-insoluble formazan. Cells  
11 were seeded in 96-well plates at a density of  $2 \times 10^4$  cells per well in 100  $\mu$ L  
12 volumes and grown at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 24 h before they were  
13 used in the cell viability assay. The cells were then treated with 31.25, 62.5,  
14 125, 250 and 500  $\mu$ g of EOP for 24 h. DMSO was used as vehicle control (VC),  
15 untreated cells were used as a negative control and 100  $\mu$ M of metronidazole  
16 (MTZ) was used as a positive control. Following the incubation, 20  $\mu$ L of MTT  
17 (Sigma-Aldrich) was added to each well and the cells were incubated for an  
18 additional period of 3 h at 37 °C. Differences in the total cellular metabolism  
19 were detected at a wavelength of 492 nm by using a microplate reader. The  
20 inhibition (%) of cell proliferation was determined as follows: inhibitory growth =  
21  $(1 - \text{Abs}_{492} \text{ treated cells} / \text{Abs}_{492} \text{ control cells}) \times 100\%$ . The IC<sub>50</sub> was calculated  
22 using GraphPad Prism version 5.0 for Windows (GraphPad Software, USA). All  
23 observations were validated by at least three independent experiments in  
24 triplicate.

## 25 **Adjuvant assay**

## 26 **Experimental animals**

27 Six- to eight-week-old female BALB/c mice were obtained from the  
28 Central Animal Facility of the Federal University of Pelotas, where the  
29 immunization assays were also conducted. All mice were kept in cages

1 containing wood shavings and bedding and had free access to water and a  
2 maintenance diet *ad libitum*. A 12-h light/dark cycle at room temperature ( $21 \pm 2$   
3 °C) was also maintained. All experiments were performed in compliance with  
4 the procedures of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA).  
5 The Ethics Commission on Animal Experimentation (CEEAA) of Pelotas Federal  
6 University (UFPel) approved the project (number 2422). All efforts were made to  
7 minimize animal suffering.

## 8 **Antigen expression and purification**

9 The recombinant endoglycosidase CP40 (rCP40), derived from *C.*  
10 *pseudotuberculosis*, was used as an antigen for the adjuvant assay. The  
11 pAE/*cp40* recombinant plasmid previously constructed by our group [34] was  
12 transformed into the *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star strain by the heat shock  
13 method. The induction of expression was performed by adding 1 mM of IPTG  
14 followed by incubation at 37 °C for 3 h with constant agitation. Western blotting  
15 using a monoclonal anti-6x-His-tag antibody conjugated to peroxidase (Sigma-  
16 Aldrich) was used to confirm rCP40 expression. A sepharose-nickel column,  
17 HisTrap™ (GE Healthcare), was used for purification of the recombinant  
18 protein. Purity was determined by 12% SDS-PAGE, and the concentration was  
19 measured using a BCA kit (PIERCE).

## 20 **Immunization assay and blood sample collection**

21 For the immunization assay, the mice were divided into the following  
22 three groups of six animals each: (a) G1: a negative control group immunized  
23 with 0,4 ng/kg BW EOP; (b) G2: inoculated with only 50 µg of rCP40 protein;  
24 and (c) G3: the test group inoculated with 0,4 ng/kg BW EOP plus 50 µg of  
25 rCP40. All doses were prepared in a final volume of 200 µL using sterile saline  
26 solution (0.9% NaCl) as a vehicle and administered via the intramuscular route.  
27 The animals were immunized with two doses administered 21 days apart.  
28 Animals were bled at days 0, 21, and 42 post-immunization to determine the  
29 antibody levels. Blood was collected from the retro-orbital sinus with Pasteur  
30 pipettes. All blood collections were performed under anesthesia with 10%

1 ketamine (1 mL/kg) and 2% xylazine (0.1 mg/kg) (Agener União Saúde Animal,  
2 Brazil). After coagulation, the blood was centrifuged at 1,500 g for 15 min. The  
3 serum was removed and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 4 **Assessment of antibody production**

5 Serum samples from the immunized mice were used in immunoassays  
6 (indirect ELISA) for the quantification of total IgG, IgG1 and IgG2a anti-rCP40  
7 antibodies. Polystyrene 96-well plates (Maxisorp-Nunc) were coated with 100  
8  $\mu\text{L}$  of a bicarbonate-carbonate buffer (pH 9.8) containing 0.1  $\mu\text{g}/\text{well}$  of rCP40  
9 protein. Plates were incubated for 18 h at  $4^{\circ}\text{C}$  and washed 3 times with PBS-T  
10 (PBS 1X, pH 7.4, 0.1% Tween 20). The plates were then incubated with 200  
11  $\mu\text{L}/\text{well}$  of 5% skim milk in PBS for 2 h at  $37^{\circ}\text{C}$ , for blocking purposes. A three-  
12 step wash was then performed. All serum samples obtained from mice were  
13 diluted in PBS (v/v 1:50), and 100  $\mu\text{L}$  of each diluted sample was added to the  
14 plates in duplicate. Plates were incubated for 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . After washing three  
15 times with PBS-T, 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  of anti-mouse IgG conjugated to horseradish  
16 peroxidase (Sigma-Aldrich) was added (1: 5,000 in PBS-T) to the plates in order  
17 to detect total IgG prior to the revelation step. In plates designated for the  
18 detection of IgG1 and IgG2a, 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  of either goat anti-mouse IgG1 (1:  
19 5,000 in PBS-T) or goat anti-mouse IgG2a (1: 2,000 in PBS-T) was added. The  
20 plates were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 1 h and then washed three times with PBS-T,  
21 subsequent to which 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  of anti-goat IgG conjugated to horseradish  
22 peroxidase (Sigma-Aldrich) was added (1: 5,000 in PBS-T). The plates were re-  
23 incubated for 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$  and then washed five times with PBS-T. The reaction  
24 was developed by the addition of 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  of the substrate-chromogen  
25 solution [*o*-phenylenediamine dihydrochloride; OPD tablets (Sigma-Aldrich) in  
26 0.4 mg/mL phosphate-citrate buffer containing 0.04% of 30% hydrogen  
27 peroxide, pH=5.0] and incubation at room temperature in the dark for 15 min,  
28 and it was stopped by the addition of 50  $\mu\text{L}/\text{well}$  of  $\text{H}_2\text{SO}_4$  solution (4N). Optical  
29 density (OD) was determined using a microtiter-plate reader (Microplate Reader  
30 Mindray MR-96A) set at 492 nm.

1 Data were analyzed using the software GraphPad Prism version 5.0 for  
 2 Windows (GraphPad Software, USA). Differences in IgG levels between the  
 3 groups were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's test for  
 4 multiple comparisons. The results were considered statistically significant if p-  
 5 value <0.05.

6

## 7 Results

### 8 EOP chemical components

9 GC-MS analysis of the red propolis extract enabled the identification of  
 10 certain compounds present in the essential oil. A list of these constituents is  
 11 presented in **Table 1**. GC-MS is a reliable method, indispensable in several  
 12 areas where the analysis of complex mixtures and unambiguous identification is  
 13 required, and since volatile compounds are well identified with GC-MS, this  
 14 method is suitable for analysis of essential oils [35,36]. Using GC-MS, our study  
 15 was able to highlight methyl eugenol (13.1%), (E)- $\beta$ -farnesene (2.5%),  $\delta$ -  
 16 amorphenone (2.3%),  $\alpha$ -cubebene (1.9%), and  $\beta$ -caryophyllene (1.5%) as the  
 17 major components of the extract.

18

19 **Table 1. This is the Table 1 Title:** Volatile compounds identified by gas  
 20 chromatography followed by mass spectrometry (GC-MS) of the Brazilian red  
 21 propolis essential oil.

Compound	Area (%)	LRI obtained	LRI reference
$\alpha$ -Pinene	0.2	908	907 [37]
$\alpha$ -Cubebene	1.9	1351	1351[37,38]
(-)-Cyperene	0.2	1401	1400 [39]
Methyl eugenol	13.1	1407	1408 [40]
$\alpha$ -Gurjunene	0.5	1412	1412 [41]

$\beta$ -Caryophyllene	1.5	1422	1422 [42]
trans- $\alpha$ -Bergamotene	0.6	1438	1438 [43]
(E)- $\beta$ -Farnesene	2.5	1459	1459 [37]
$\gamma$ -Muurolene	0.2	1479	1479 [44]
$\alpha$ -Curcumene	0.1	1485	1484 [45]
Selinene	0.7	1490	1490 [46]
$\beta$ -Bisabolene	0.9	1506	1506 [47]
$\delta$ -Amorphene	2.3	1514	1514 [48]

1

## 2 **Anti-*Trichomonas vaginalis* activity assay**

3 Analysis of the EOP MIC data revealed that at a 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$   
 4 concentration, 100% death of trophozoites was observed. After 24 h of  
 5 exposure, EOP demonstrated optimal anti-*T. vaginalis* activity at a  
 6 concentration of 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  with an  $\text{IC}_{50}$  value of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (**Fig 1**). The  
 7 negative control and DMSO control showed positive motility and did not stain  
 8 with Trypan blue (0.4%), whereas the positive control stained blue and exhibited  
 9 negative motility at the 24 h time point in all assays performed. When the kinetic  
 10 growth curve was analyzed, it was observed that the exposure to 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of  
 11 EOP reduced the growth of trophozoites by 36% at 12 h and induced complete  
 12 parasite death at 24 h (**Fig 2**).

13 **Fig 1. This is the Fig 1 Legend:** *Trichomonas vaginalis* 30236 isolate; MIC and  
 14  $\text{IC}_{50}$  after 24-hour-treatments with EOP at 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500  
 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Data represent mean  $\pm$  standard deviation of at least three experiments,  
 16 all in triplicate. Different letters indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ).

17 **Fig 2. This is the Fig 2 Legend:** Kinetic growth curve of the *Trichomonas*  
 18 *vaginalis* 30236 isolate after exposure to EOP at 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 1 h, 6 h, 12 h,  
 19 24 h, 48 h, 72 h and 96 h. Data represent mean  $\pm$  standard deviation of at least  
 20 three experiments, all in triplicate. Different letters indicate a significant  
 21 difference ( $p < 0.05$ ).

## 1 **Cytotoxicity assay**

2 EOP treatment also inhibited proliferation of the CHO-K1 cell line;  
3 however, this cytotoxicity was only significant at 500 µg/mL. No significant  
4 cytotoxicity was observed up to 250 µg/mL in growth inhibition of CHO-K1 cells  
5 after 24 h of treatment (Fig 3). The in vitro cytotoxicity activity of EOP showed  
6 IC<sub>50</sub> values of 266 and 100 µg/mL in CHO-K1 cells and trophozoites,  
7 respectively, which may indicate selectivity of the EOP treatment at  
8 concentrations up to 250 µg/mL. The results enumerated above demonstrate  
9 that EOP is an important resource for future drug development, and its  
10 therapeutic potential against various infectious entities merits further study and  
11 analysis.

12

13 **Fig 3. This is the Fig 3 Legend:** CHO-K1 cell viability after treatment with  
14 different concentrations of EOP. Cell proliferation in CHO-K1 was investigated  
15 by the MTT assay, and metronidazole was used as a positive control. Data are  
16 expressed as the mean ± SEM of the viabilities of CHO-K1 cells in three  
17 independent experiments. (\*) indicates a difference between the treatments in  
18 CHO-K1 cells. The differences were considered significant at  $p < 0.05$ .  
19 VC=vehicle control; MTZ=metronidazole.

## 20 **Adjuvant assay**

21 Fig 4 illustrates the results obtained from the ELISA assay designed for  
22 analyzing the production of anti-rCP40 total IgG, IgG1, and IgG2a antibodies.  
23 The results demonstrate that animals from group G1 were unable to induce  
24 production of IgG and its isotypes. In group G2, increased total IgG, IgG1, and  
25 IgG2a levels were detected on day 42, subsequent to the administration of two  
26 doses of rCP40. Additionally, it was observed that the association of EOP with  
27 rCP40 (G3) leads to the induction of higher levels of IgG and its isotypes. When  
28 compared with groups G1 and G2, group G3 was observed to present a  
29 significantly higher increase ( $p < 0.05$ ) in total IgG total as well as isotypes IgG1  
30 and IgG2a at days 21 and 42 after the first immunization (Figs 4A, 4B and 4C);

1 this is demonstrative of the adjuvant effect of EOP. The day-42 values clearly  
2 demonstrate that the association of EOP with rCP40 was able to increase the  
3 levels of total IgG, IgG1 and IgG2a by approximately 7.4, 4.4 and 10.8 fold,  
4 respectively, in comparison to the administration of rCP40 alone. Moreover,  
5 group G3 shows more pronounced IgG2a production compared to the  
6 production of IgG1 at day 42.

7

8 **Fig 4. This is the Fig 4 Legend:** Anti-rCP40 total IgG (4A), IgG1 (4B) and  
9 IgG2a (4C) levels in immunized mice treated with EOP and recombinant  
10 endoglycosidase CP40 from *C. pseudotuberculosis* (rCP40), either separately  
11 or together. Measurements were taken on day 0 and then 21 and 42 days post-  
12 immunization. Data represent means  $\pm$  standard deviations of IgG levels in the  
13 sera collected from 6 animals/group. Different letters in the same experimental  
14 day indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ).

15

## 16 Discussion

17 Although some Brazilian propolis essential oils, mainly those derived  
18 from green propolis, have been characterized previously [36,49,50], this is the  
19 first study to undertake the characterization of BRP essential oil. Only the  
20 ethanolic and methanolic extracts of BRP have been tested being isoflavones  
21 the main isolated compounds [18,51,52]. Thus, we hypothesized that the  
22 essential oil (EO) of BRP could provide some volatile compounds with important  
23 biological properties, which are probably lost or eliminated in the other  
24 extraction methods. In fact, methyl eugenol, a phenylpropene, was the major  
25 volatile component isolated from EOP and most of the other isolates were  
26 classified as sesquiterpenes. Along similar lines, it is known that the Brazilian  
27 green propolis also has a predominance of sesquiterpenes. Nerolidol,  $\beta$ -  
28 caryophyllene, spathulenol, and  $\delta$ -cadinene have been identified as other major  
29 volatile components of green propolis [29]. Studies have revealed that EO  
30 constituents make up a diverse family of low-molecular-weight organic



1 compounds with extreme variations in biological activity. Based on their  
2 chemical structure, the active compounds of EOs can be divided into four major  
3 groups: terpenes, terpenoids, phenylpropenes, and “others” [53].

4 Some of the volatile compounds present in EOP have already been  
5 credited with having antiparasitic activity. These chemical entities include  $\beta$ -  
6 caryophyllene,  $\alpha$ -pinene,  $\alpha$ -bergamotene, and (E)- $\beta$ -farnesene [54,55].  
7 Additionally, methyl eugenol isolated from the essential oil extracted from the  
8 plant *Agastache rugosa* showed significant nematicidal activity against  
9 *Meloidogyne incognita* [56]. Methyl eugenol is a specific constituent of Brazilian  
10 red propolis, among another types of propolis, which was revealed for the first  
11 time in 2008 [57]. Therefore, in this work, we hypothesized that methyl eugenol,  
12 a phenylpropene with the major concentration in EOP and the sesquiterpenes  
13 may be responsible for the antiparasitic activity against *T. vaginalis* exhibited  
14 here. However, further studies should be performed with the isolated  
15 constituents of EOP to identify the specific antiparasitic agents.

16 In spite of the anti-*T. vaginalis* activity, a higher cytotoxicity level was  
17 observed at the EOP concentration that presented 0% viability of trophozoites  
18 after 24 h of exposure (500  $\mu\text{g/mL}$ ) compared to a lower concentration (200  
19  $\mu\text{g/mL}$ ), which was not toxic for CHO-K1 cells but reduced parasite proliferation  
20 by 70%. Therefore, it is hypothesized that cytotoxicity could be a limiting factor  
21 for the parenteral use of EOP, but its use in topical forms for the treatment of  
22 trichomoniasis, through topical vaginal application, appears to be an interesting  
23 alternative. It is well known that topical application allows for the delivery of  
24 higher drug concentrations to the vaginal epithelium at lower treatment doses  
25 [58].

26 A previous study has evaluated the effects of compounds with guaiacyl  
27 and syringyl structures (as degradation products of lignin) and natural aromatic  
28 acids and their aldehydes on *T. vaginalis* and found that the tested compounds  
29 exhibited antiparasitic activity with MIC values ranging from 10 to 200  $\mu\text{g/mL}$ .  
30 Isoeugenol, a phenylpropene generated by a propenyl-substituted guaiacol,  
31 was the most potent effector against *T. vaginalis* with a MIC value of 10  $\mu\text{g/mL}$

1 [59], which is much lower than MIC found here for EOP. Since EOP is a  
2 complex mixture containing mainly methyl eugenol, a phenylpropene with  
3 similarities with isoeugenol in chemical structure, and sesquiterpenes in low  
4 concentrations, it is expected a different biological result in comparison to the  
5 use of each isolated compound.

6 In addition, some studies have revealed that red propolis extracts from  
7 different geographical regions have significant potential as antiparasitic agents.  
8 The ethanolic extract of red propolis obtained from Nigeria, when tested against  
9 *Trypanosoma brucei*, demonstrated potent antiparasitic activity in both sensitive  
10 and resistant strains [60]. In another study, four samples of ethanolic extracts of  
11 Brazilian propolis were tested against *Leishmania amazonensis*. Three extracts  
12 of green propolis and one of red propolis were tested, and all of them were  
13 capable of reducing parasite loads in infected macrophages. Nevertheless, the  
14 extract obtained from BRP showed maximal activity against *L. amazonensis*  
15 while being non-toxic to the macrophage cultures [61].

16 Recently, the antiparasitic activity of BRP has attracted the attention of  
17 researchers. Polymeric nanoparticles of the BRP extract and the ethanolic  
18 extract of BRP have demonstrated anti-leishmanial activity against *L. (V.)*  
19 *braziliensis*, with IC<sub>50</sub> values of 31.3 µg/mL and 38.0 µg/mL, respectively,  
20 demonstrating the potential of BRP in the composition of pharmaceuticals for  
21 leishmaniasis therapy [12]. Additionally, when ethanolic extracts from various  
22 types of green, brown and red propolis from different regions of Brazil were  
23 tested against *Trypanosoma cruzi* Y-strain epimastigotes, an inhibitory effect on  
24 parasite growth was observed in the first 24 h for all the types of propolis.  
25 However, only the ethanolic extracts of BRP presented a persistent *T. cruzi*-  
26 inhibitory effect after 96 h, suggesting red propolis as a potential alternative for  
27 the therapeutic treatment of Chagas disease [10].

28 In this study, we also confirmed that EOP has the potential to be used as  
29 an adjuvant in a veterinary vaccine formulation. In our study, a recombinant  
30 endoglycosidase CP40 (rCP40), encoded by the *cp40* gene of *C.*  
31 *pseudotuberculosis*, was used as the antigen as its antigenic properties have

1 been previously confirmed [34,62]. Our results confirmed that association of the  
2 rCP40 protein with EOP improves the immune response to this target compared  
3 to the administration of either of these components alone. We observed that the  
4 combination of the rCP40 with EOP led to IgG absorbances higher than those  
5 found by other researchers using traditional adjuvants such as saponin or  
6 Freund's complete adjuvant [34]. Herein, we used for the first time EOP as an  
7 adjuvant. In fact, this is the first study to evaluate the effect of BRP as a  
8 vaccinal adjuvant.

9         Compared to the administration of rCP40 alone, a combination of the  
10 recombinant protein with EOP was able to induce increases of 7.4-, 4.4- and  
11 10.8-fold higher levels of total IgG, IgG1, and IgG2a, respectively. One of the  
12 most important challenges currently facing adjuvant research is the search for  
13 the 'perfect mix': an optimal, safe formulation whose different components are  
14 not only additive but also synergistic in nature, and whose administration gives  
15 rise to the desired robust immune response [63]. In this study, we observed a  
16 synergistic effect when EOP was associated with rCP40. Along similar lines,  
17 another recent study has reported that the use of 3% palm oil with a bacterin of  
18 recombinant *E. coli* carrying the Omp40 protein resulted in an enhancement of  
19 IgG levels and of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses, while administration of the  
20 bacterin without adjuvant failed to stimulate the humoral and cell-mediated  
21 immunities [64].

22         Until 42 days after immunization, the IgG2a production levels were higher  
23 than those observed for IgG1, which is indicative of a T-helper 1 cell (Th1)  
24 response. In mice, Th1 cells aid in the activation of macrophages and cytotoxic  
25 T-cells and in the production of opsonizing and complement-activator  
26 immunoglobulin isotypes, such as IgG2a. Hence, it is widely believed that the  
27 primary function of Th1 cells is the generation of immunity against intracellular  
28 pathogens [34,65]. Vaccine formulations that enhance Th1 levels and CD8<sup>+</sup> T-  
29 cell responses are highly sought after as they are effective for immunization  
30 against pathogens for which there are no currently licensed vaccines  
31 (examples: HIV-AIDS, malaria, and tuberculosis) [66]. EOP has the potential to

1 serve as an excellent adjuvant for immunization purposes. Once propolis is  
2 considered both safe and non-toxic when administered to animals or humans  
3 [26], EOP could be a good adjuvant to be used in important vaccines, and  
4 further investigations using this substance should be conducted.

5         The immunostimulatory effect of EOP may be attributed to the high levels  
6 of methyl eugenol (13.1%). Eugenol is a phenylpropene that is commonly found  
7 in essential oils; previous studies have established that eugenol stimulates the  
8 immune response in mice by promoting the T-cell response and natural killer  
9 activity [67]. It is also possible that sesquiterpenes could be involved in the  
10 adjuvant effect of BRP essential oil as it is known that they also activate the  
11 immune system by influencing local inflammation and promoting phagocytosis  
12 [68].

13         Most of the studies involving the effect of BRP on the immune system are  
14 recent and have extensively investigated the in vivo and in vitro effects of  
15 hydroalcoholic extracts of BRP on the inflammation process [16–19,69,70]. BRP  
16 reduces nitric oxide levels and diminishes the levels of some pro-inflammatory  
17 cytokines, chemokines and genes associated with inflammatory signaling in  
18 macrophages [16,17]. Additionally, BRP modulates neutrophil migration by  
19 interfering in rolling and adhesion processes through reduction of the levels of  
20 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCL1/KC and CXCL-2/MIP-2 and reduction of calcium influx  
21 [70]. In vivo, BRP has been seen to promote protective effects against  
22 ulcerative colitis in a rat model, reducing gross and histological inflammatory  
23 lesions and decreasing the levels of myeloperoxidase and iNOS in colon tissue  
24 [69]. Moreover, mice treated orally with BRP showed improved cutaneous  
25 wound healing through faster wound closure, reduction of inflammatory  
26 infiltrate, and downregulation of the transcription factor pNF- $\kappa$ B and the  
27 inflammatory cytokines TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 [19]. Antinociceptive activity of  
28 BRP towards neurogenic and inflammatory pain in mice was also observed  
29 without emotional and motor side effects [18].

30         The immunomodulatory properties of propolis seem to be contradictory  
31 since propolis sometimes acts in the inhibition, as in the anti-inflammatory

1 properties, and other times in the stimulation of the immune system, as in the  
2 adjuvant properties. This phenomenon is probably caused by the chemical  
3 complexity of propolis as a result of the synergism among the components,  
4 which can be varied according to the methods of extraction of the bioactive  
5 compounds [71].

6

## 7 **Conclusion**

8 The EOP was observed to exhibit a promisingly high level of antiparasitic  
9 activity, with cytotoxicity seen at higher concentrations of EOP. However, further  
10 studies using lower concentrations of EOP for topical application should be  
11 performed with the aim of reducing cytotoxicity levels and achieving potent  
12 localized action in the treatment of trichomoniasis. Our study also demonstrated  
13 the potential use of EOP as a vaccine adjuvant since the administration of EOP  
14 along with rCP40 was seen to increase IgG production. The results of this study  
15 shed light on several new properties of EOP and underline the importance of  
16 exploring its potential as an additional option for the treatment of trichomoniasis  
17 and as a vaccine adjuvant. Furthermore, studies dedicated to revealing the  
18 potential and the importance of EOP in other biological activities are  
19 encouraged, due to EOP chemical complexity.

20

## 21 **Conflicts of interest**

22 All authors declare no conflict of interest.

23

## 24 **Acknowledgements**

25 Authors thank the Post-Graduation Program in Pharmaceutical Sciences,  
26 UFRGS, especially T. Tasca (\*) from Laboratório de Pesquisa em Parasitologia,  
27 Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto  
28 Alegre, RS, Brazil, for the helping with *T. vaginalis* protocols assays. We are

1 thankful for the financial support from Coordenação de Aperfeiçoamento de  
2 Pessoal de Nível Superior (Capes), Grant #1608/2011.

3

#### 4 **References**

- 5 1. Park YK, Alencar SM, Aguiar CL. Botanical Origin and Chemical  
6 Composition of Brazilian Propolis. *J Agric Food Chem.* 2002;50: 2502–  
7 2506. doi:10.1021/jf011432b
- 8 2. Alencar SM, Oldoni TLC, Castro ML, Cabral ISR, Costa-Neto CM, Cury  
9 JA, et al. Chemical composition and biological activity of a new type of  
10 Brazilian propolis: Red propolis. *J Ethnopharmacol.* 2007;113: 278–283.  
11 doi:10.1016/j.jep.2007.06.005
- 12 3. Awale S, Li F, Onozuka H, Esumi H, Tezuka Y, Kadota S. Constituents of  
13 Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against  
14 human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition.  
15 *Bioorganic Med Chem.* 2008;16: 181–189.  
16 doi:10.1016/j.bmc.2007.10.004
- 17 4. Li F, Awale S, Tezuka Y, Kadota S. Cytotoxic constituents from Brazilian  
18 red propolis and their structure-activity relationship. *Bioorganic Med*  
19 *Chem.* 2008;16: 5434–5440. doi:10.1016/j.bmc.2008.04.016
- 20 5. López BG-C, Schmidt EM, Eberlin MN, Sawaya ACHF. Phytochemical  
21 markers of different types of red propolis. *Food Chem.* 2014;146: 174–  
22 180. doi:10.1016/j.foodchem.2013.09.063
- 23 6. Mendonça ICG, Porto ICCM, Nascimento TG, de Souza NS, Oliveira  
24 JMS, Arruda RES, et al. Brazilian red propolis: phytochemical screening,  
25 antioxidant activity and effect against cancer cells. *BMC Complement*  
26 *Altern Med. BioMed Central;* 2015;15: 357. doi:10.1186/s12906-015-  
27 0888-9
- 28 7. Piccinelli AL, Lotti C, Campone L, Cuesta-Rubio O, Campo Fernandez M,  
29 Rastrelli L. Cuban and brazilian red propolis: botanical origin and

- 1 comparative analysis by high-performance liquid chromatography-  
2 photodiode array detection/ electrospray ionization tandem mass  
3 spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2011;59: 6484–6491.  
4 doi:10.1021/jf201280z
- 5 8. Frozza COS, Garcia CSC, Gambato G, Souza MDO, Salvador M, Moura  
6 S, et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of  
7 Brazilian red propolis. *Food Chem Toxicol.* Elsevier Ltd; 2013;52: 137–42.  
8 doi:10.1016/j.fct.2012.11.013
- 9 9. Regueira MS, Tintino SR, da Silva ARP, Costa MS, Boligon AA, Matias  
10 EFF, et al. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial  
11 activity, synergistic effect and phytochemical screening. *Food Chem*  
12 *Toxicol.* 2017;107: 572–580. doi:10.1016/j.fct.2017.03.052
- 13 10. Silva RPD, Machado BAS, Barreto GA, Costa SS, Andrade LN, Amaral  
14 RG, et al. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties  
15 of various Brazilian propolis extracts. *PLoS One.* 2017;12: e0172585.  
16 doi:10.1371/journal.pone.0172585
- 17 11. Neves MVM, Silva TMS, Lima EO, Cunha EVL, Oliveira EJ. Isoflavone  
18 formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp.  
19 *Brazilian J Microbiol.* 2016;47: 159–166. doi:10.1016/j.bjm.2015.11.009
- 20 12. Nascimento TG, Silva PF, Azevedo LF, Rocha LG, Moraes Porto ICC,  
21 Moura TFAL, et al. Polymeric Nanoparticles of Brazilian red propolis  
22 extract: preparation, characterization, antioxidant and leishmanicidal  
23 activity. *Nanoscale Res Lett.* 2016;11: 301. doi:10.1186/s11671-016-  
24 1517-3
- 25 13. Begnini KR, Moura de Leon PM, Thurow H, Schultze E, Campos VF,  
26 Martins Rodrigues F, et al. Brazilian red propolis induces apoptosis-like  
27 cell death and decreases migration potential in bladder cancer cells.  
28 *Evidence-Based Complement Altern Med.* 2014;2014: 1–13.  
29 doi:10.1155/2014/639856

- 1 14. Frozza COS, Santos DA, Rufatto LC, Minetto L, Scariot FJ,  
2 Echeverrigaray S, et al. Antitumor activity of Brazilian red propolis  
3 fractions against Hep-2 cancer cell line. *Biomed Pharmacother.* 2017;91:  
4 951–963. doi:10.1016/j.biopha.2017.05.027
- 5 15. Bueno-Silva B, Koo H, Falsetta ML, Alencar SM, Ikegaki M, Rosalen PL.  
6 Effect of neovestitol–vestitol containing Brazilian red propolis on  
7 accumulation of biofilm in vitro and development of dental caries in vivo.  
8 *Biofouling.* 2013;29: 1233–1242. doi:10.1080/08927014.2013.834050
- 9 16. Bueno-Silva B, Kawamoto D, Ando-Suguimoto ES, Alencar SM, Rosalen  
10 PL, Mayer MPA. Brazilian red propolis attenuates inflammatory signaling  
11 cascade in Ips-activated macrophages. *PLoS One.* 2015;10: e0144954.  
12 doi:10.1371/journal.pone.0144954
- 13 17. Bueno-Silva B, Kawamoto D, Ando-Suguimoto ES, Casarin RCV, Alencar  
14 SM, Rosalen PL, et al. Brazilian red propolis effects on peritoneal  
15 macrophage activity: nitric oxide, cell viability, pro-inflammatory cytokines  
16 and gene expression. *J Ethnopharmacol.* 2017;207: 100–107.  
17 doi:10.1016/j.jep.2017.06.015
- 18 18. Cavendish RL, Santos JS, Belo Neto R, Paixão AO, Oliveira JV, Araujo  
19 ED, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red  
20 propolis extract and formononetin in rodents. *J Ethnopharmacol.*  
21 2015;173: 127–133. doi:10.1016/j.jep.2015.07.022
- 22 19. Corrêa FRS, Schanuel FS, Moura-Nunes N, Monte-Alto-Costa A,  
23 Daleprane JB. Brazilian red propolis improves cutaneous wound healing  
24 suppressing inflammation-associated transcription factor NFκB. *Biomed*  
25 *Pharmacother.* 2017;86: 162–171. doi:10.1016/j.biopha.2016.12.018
- 26 20. Alday-Provencio S, Diaz G, Rascon L, Quintero J, Alday E, Robles-  
27 Zepeda R, et al. Sonoran propolis and some of its chemical constituents  
28 inhibit in vitro growth of *Giardia lamblia* trophozoites. *Planta Med.*  
29 2015;81: 742–747. doi:10.1055/s-0035-1545982



- 1 21. Freitas SF, Shinohara L, Sforcin JM, Guimarães S. In vitro effects of  
2 propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. *Phytomedicine*. 2006;13:  
3 170–175. doi:10.1016/j.phymed.2004.07.008
- 4 22. Starzyk J, Scheller S, Szaflarski J, Moskwa M, Stojko A. Biological  
5 properties and clinical application of propolis. II. Studies on the  
6 antiprotozoan activity of ethanol extract of propolis. *Arzneimittelforschung*.  
7 1977;27: 1198–9.
- 8 23. Alvarez-Sanchez ME, Villalpando JL, Quintas-Granados LI, Arroyo R.  
9 Polyamine transport and synthesis in *Trichomonas vaginalis*: potential  
10 therapeutic targets. *Curr Pharm Des*. 2017;23.  
11 doi:10.2174/1381612823666170703162754
- 12 24. Cudmore SL, Delgaty KL, Hayward-McClelland SF, Petrin DP, Garber  
13 GE. Treatment of infections caused by metronidazole-resistant  
14 *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17: 783–93, table of  
15 contents. doi:10.1128/CMR.17.4.783-793.2004
- 16 25. Fischer G, Paulino N, Marcucci MC, Siedler BS, Munhoz LS, Finger PF,  
17 et al. Green propolis phenolic compounds act as vaccine adjuvants,  
18 improving humoral and cellular responses in mice inoculated with  
19 inactivated vaccines. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105: 908–913.  
20 doi:10.1590/S0074-02762010000700012
- 21 26. Ashry el SH, Ahmad TA. The use of propolis as vaccine's adjuvant.  
22 *Vaccine*. 2012;31: 31–9. doi:10.1016/j.vaccine.2012.10.095
- 23 27. Sforcin JM, Bankova V. Propolis: is there a potential for the development  
24 of new drugs? *J Ethnopharmacol*. 2011;133: 253–60.  
25 doi:10.1016/j.jep.2010.10.032
- 26 28. Biscaia D, Ferreira SRS. Propolis extracts obtained by low pressure  
27 methods and supercritical fluid extraction. *J Supercrit Fluids*. 2009;51:  
28 17–23. doi:10.1016/J.SUPFLU.2009.07.011

- 1 29. Bankova V, Popova M, Trusheva B. Propolis volatile compounds:  
2 chemical diversity and biological activity: a review. 2014;8: 1–8.  
3 doi:10.1186/1752-153X-8-28
- 4 30. Suzuki S, Kazuhiro Amano, Suzuki K. Effect of propolis volatiles from a  
5 stingless honeybee (Apidae: Meliponinae) on the immune system of  
6 elderly residents in a nursing home. Int J Indust Entomol. 2009;19: 193–  
7 197.
- 8 31. Abikim G, Yimit R, Tursunay A, Aerziguli T, Mutallip A. Effect of essential  
9 oils extracted from Xingjiang propolis on cell proliferation, cell cycle  
10 progression and apoptosis in human colorectal cancer cell line HTC-116.  
11 Shijie Huaren Xiaohua Zazhi. 2011;19: 1469–1475.
- 12 32. Diamond LS. The establishment of various trichomonads of animals and  
13 man in axenic cultures. J Parasitol. 1957;43: 488–90.
- 14 33. Hübner DPG, Vieira PB, Frasson AP, Menezes CB, Senger FR, Silva  
15 GNS, et al. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of betulinic acid  
16 derivatives. Biomed Pharmacother. 2016;84: 476–484.  
17 doi:10.1016/j.biopha.2016.09.064
- 18 34. Droppa-Almeida D, Vivas WLP, Kelly K, Silva O, Rezende AFS,  
19 Simionatto S, et al. Recombinant CP40 from *Corynebacterium*  
20 *pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with a  
21 virulent strain. Vaccine. 2016;34: 1091–1096.  
22 doi:10.1016/j.vaccine.2015.12.064
- 23 35. Lemberkovics E, Kakasy AZ, Héthelyi BE, Simándi B, Böszörményi A,  
24 Balázs A, et al. Gas chromatography for analysis of essential oils.  
25 Characteristics of essential oil of *Dracocephalum* species and the  
26 influence of extraction method on its composition. Acta Pharm Hung.  
27 2007;77: 19–27.
- 28 36. Oliveira A, França H, Kuster R, Teixeira L, Rocha L. Chemical  
29 composition and antibacterial activity of Brazilian propolis essential oil. J

- 1 Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2010;16: 121–130. doi:10.1590/S1678-  
2 91992010005000007
- 3 37. Quijano CE, Salamanca G, Pino JA. Aroma volatile constituents of  
4 Colombian varieties of mango (*Mangifera indica* L.). Flavour Fragr J.  
5 2007;22: 401–406. doi:10.1002/ffj.1812
- 6 38. Shellie RA, Marriott PJ. Comprehensive two-dimensional gas  
7 chromatography-mass spectrometry analysis of *Pelargonium graveolens*  
8 essential oil using rapid scanning quadrupole mass spectrometry.  
9 Analyst. 2003;128: 879. doi:10.1039/b304371a
- 10 39. Yayli N., Yasar A., Gülec C., Usta A., Kolayli S., Coskuncelebi K., et al.  
11 Composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea*  
12 *sessilis* and *Centaurea armena*. Phytochemistry. 2005;66: 1741–1745.  
13 doi:10.1016/J.PHYTOCHEM.2005.04.006
- 14 40. Boussaada O, Ammar S, Saidana D, Chriaa J, Chraif I, Daami M, et al.  
15 Chemical composition and antimicrobial activity of volatile components  
16 from capitula and aerial parts of *Rhaponticum acaule* DC growing wild in  
17 Tunisia. Microbiol Res. 2008;163: 87–95.  
18 doi:10.1016/j.micres.2007.02.010
- 19 41. Isidorov VA., Vinogorova VT., Rafalowski K. HS-SPME analysis of volatile  
20 organic compounds of coniferous needle litter. Atmos Environ. 2003;37:  
21 4645–4650. doi:10.1016/J.ATMOENV.2003.07.005
- 22 42. Yáñez X, Pinzón ML, Solano F, Sánchez LR. Chemical composition of the  
23 essential oil of *Psidium caudatum* McVaugh. Molecules. 2002;7: 712–716.  
24 doi:10.3390/70900712
- 25 43. Tzakou O, Couladis M, Slavkovska V, Mimica-Dukic N, Jancic R. The  
26 essential oil composition of *Salvia brachyodon* Vandas. Flavour Fragr J.  
27 2003;18: 2–4. doi:10.1002/ffj.1132
- 28 44. Fokialakis N, Magiatis P, Mitaku S. Essential oil constituents of *Valeriana*

- 1        *italica* and *Valeriana tuberosa*. Stereochemical and conformational study  
2        of 15-acetoxyvaleranone. Z Naturforsch C. 2002;57: 791–6.
- 3    45. Flach A, Dondon RC, Singer RB, Koehler S, Amaral MDCE, Marsaioli AJ.  
4        The chemistry of pollination in selected Brazilian Maxillariinae orchids:  
5        floral rewards and fragrance. J Chem Ecol. 2004;30: 1045–56.
- 6    46. Flamini G, Cione PL., Morelli I. Composition of the essential oils and in  
7        vivo emission of volatiles of four *Lamium* species from Italy: *L.*  
8        *purpureum*, *L. hybridum*, *L. bifidum* and *L. amplexicaule*. Food Chem.  
9        2005;91: 63–68. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2004.05.047
- 10   47. Aligiannis N, Kalpoutzakis E., I. B. Chinou IB., Mitakou S., Gikas E.,  
11        Tsbopoulos A. Composition and antimicrobial activity of the essential  
12        oils of five taxa of *Sideritis* from greece. American Chemical Society;  
13        2001; doi:10.1021/JF001018W
- 14   48. Hazzit M, Baaliouamer A, Faleiro ML, Miguel MG. Composition of the  
15        essential oils of *Thymus* and *Origanum* species from Algeria and their  
16        antioxidant and antimicrobial activities. J Agric Food Chem. 2006;54:  
17        6314–6321. doi:10.1021/jf0606104
- 18   49. Bankova V, Boudourova-Krasteva G, Popov S, Sforcin JM, Funari SRC.  
19        Seasonal variations in essential oil from brazilian propolis. J Essent Oil  
20        Res. 1998;10: 693–696. doi:10.1080/10412905.1998.9701012
- 21   50. Ioshida MDM, Young MCM, Lago JHG. Chemical composition and  
22        antifungal activity of essential oil from Brazilian propolis. J Essent Oil Bear  
23        Plants. 2010;13: 633–637. doi:10.1080/0972060X.2010.10643873
- 24   51. López BGC, Schmidt EM, Eberlin MN, Sawaya ACHF. Phytochemical  
25        markers of different types of red propolis. Food Chem. 2014;146: 174–  
26        180. doi:10.1016/j.foodchem.2013.09.063
- 27   52. Freires IA, de Alencar SM, Rosalen PL. A pharmacological perspective on  
28        the use of Brazilian red propolis and its isolated compounds against

- 1 human diseases. Eur J Med Chem. 2016;110: 267–279.  
2 doi:10.1016/j.ejmech.2016.01.033
- 3 53. Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. Essential oils in food preservation:  
4 mode of action, synergies, and interactions with food matrix components.  
5 Front Microbiol. 2012;3: 12. doi:10.3389/fmicb.2012.00012
- 6 54. Calleja MA, Vieites JM, Montero-Meterdez T, Torres MI, Faus MJ, Gil A,  
7 et al. The antioxidant effect of  $\beta$ -caryophyllene protects rat liver from  
8 carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell  
9 activation. Br J Nutr. 2013;109: 394–401.  
10 doi:10.1017/S0007114512001298
- 11 55. Palmer-Young EC, Veit D, Gershenzon J, Schuman MC. The  
12 Sesquiterpenes(E)- $\beta$ -Farnesene and (E)- $\alpha$ -Bergamotene quench ozone  
13 but fail to protect the wild tobacco *Nicotiana attenuata* from ozone, UVB,  
14 and Drought Stresses. PLoS One. 2015;10: e0127296.  
15 doi:10.1371/journal.pone.0127296
- 16 56. Li HQ, Liu QZ, Liu ZL, Du SS, Deng ZW. Chemical composition and  
17 nematicidal activity of essential oil of *Agastache rugosa* against  
18 *Meloidogyne incognita*. Molecules. 2013;18: 4170–4180.  
19 doi:10.3390/molecules18044170
- 20 57. Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL,  
21 et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. Evid Based  
22 Complement Alternat Med. 2006;3: 249–54. doi:10.1093/ecam/nel006
- 23 58. Wachter B, Syrowatka M, Obwaller A, Walochnik J. In vitro efficacy of  
24 curcumin on *Trichomonas vaginalis*. Wien Klin Wochenschr. 2014; S32-6.  
25 doi:10.1007/s00508-014-0522-8
- 26 59. Zemek J, Valent M, Pódová M, Kosíková B, Joniak D. Antimicrobial  
27 properties of aromatic compounds of plant origin. Folia Microbiol (Praha).  
28 1987;32: 421–5.

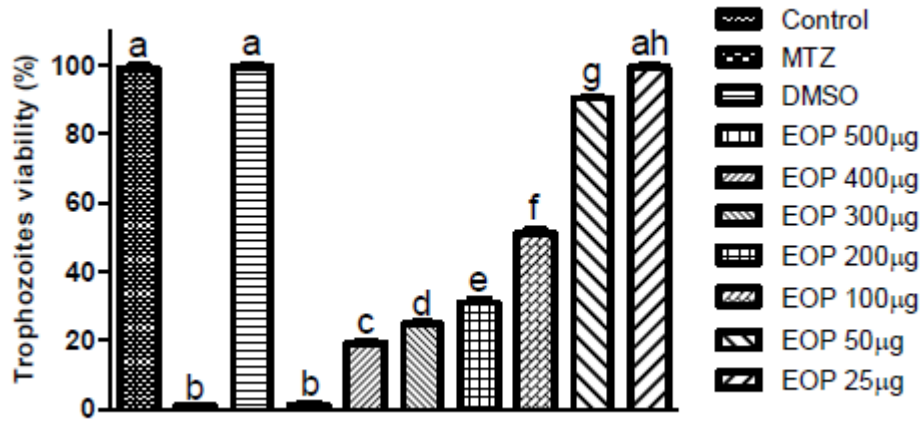
- 1 60. Omar RMK, Igoli J, Gray AI, Ebiloma GU, Clements C, Fearnley J, et al.  
2 Chemical characterisation of Nigerian red propolis and its biological  
3 activity against *Trypanosoma brucei*. *Phytochem Anal.* 2016;27: 107–115.  
4 doi:10.1002/pca.2605
- 5 61. Ayres DC, Marcucci MC, Giorgio S. Effects of Brazilian propolis on  
6 *Leishmania amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102: 215–220.  
7 doi:10.1590/S0074-02762007005000020
- 8 62. Silva JW, Droppa-Almeida D, Borsuk S, Azevedo V, Portela RW, Miyoshi  
9 A, et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* cp09 mutant and cp40  
10 recombinant protein partially protect mice against caseous lymphadenitis.  
11 *BMC Vet Res.* 2014;10: 965. doi:10.1186/s12917-014-0304-6
- 12 63. Guy B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat Rev*  
13 *Microbiol.* 2007;5: 505–17. doi:10.1038/nrmicro1681
- 14 64. Roslindawani MN, Syafiqah AS, Jesse FFA, Effendy AW, Zamri-Saad M.  
15 Recombinant caseous lymphadenitis vaccine with palm oil as adjuvant  
16 enhances the humoral and cell-mediated immune responses in rat model.  
17 *J Anim Heal Prod.* 2016;4: 23. doi:10.14737/journal.jahp/2016/4.1.22.25
- 18 65. Dong C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of  
19 IL-17-producing cells. *Nat Rev Immunol.* 2006;6: 329–33.  
20 doi:10.1038/nri1807
- 21 66. Gause KT, Wheatley AK, Cui J, Yan Y, Kent SJ, Caruso F. Immunological  
22 principles guiding the rational design of particles for vaccine delivery. *ACS*  
23 *Nano.* 2017;11: 54–68. doi:10.1021/acsnano.6b07343
- 24 67. Vishteh A, Thomas I, Imamura T. Eugenol modulation of the immune  
25 response in mice. *Immunopharmacology.* 1986;12: 187–92. Available:  
26 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3546191>
- 27 68. López-Antón N, Hermann C, Murillo R, Merfort I, Wanner G, Vollmar AM,  
28 et al. Sesquiterpene lactones induce distinct forms of cell death that

- 1 modulate human monocyte-derived macrophage responses. *Apoptosis*.  
2 2007;12: 141–153. doi:10.1007/s10495-006-0331-2
- 3 69. Bezerra GB, Souza LM, Santos AS, Almeida GKM, Souza MTS, Santos  
4 SL, et al. Hydroalcoholic extract of Brazilian red propolis exerts protective  
5 effects on acetic acid-induced ulcerative colitis in a rodent model. *Biomed*  
6 *Pharmacother*. 2017;85: 687–696. doi:10.1016/j.biopha.2016.11.080
- 7 70. Bueno-Silva B, Franchin M, Alves C de F, Denny C, Colón DF, Cunha  
8 TM, et al. Main pathways of action of Brazilian red propolis on the  
9 modulation of neutrophils migration in the inflammatory process.  
10 *Phytomedicine*. 2016;23: 1583–1590. doi:10.1016/j.phymed.2016.09.009
- 11 71. Fischer G, Hübner SO, Vargas GD, Vidor T. Imunomodulação pela  
12 própolis. *Arq Inst Biol*. 2008;75: 247–253.
- 13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26

1 Sena-Lopes et al. Figure 1:

2

3



4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

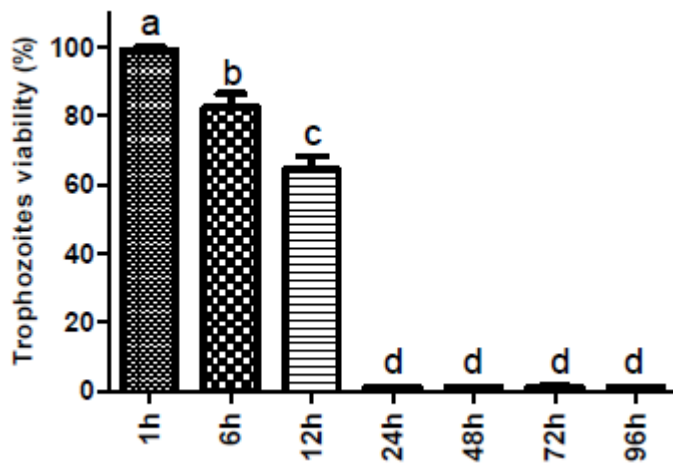
25

26



1 Sena-Lopes et al. Figure 2:

2



3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

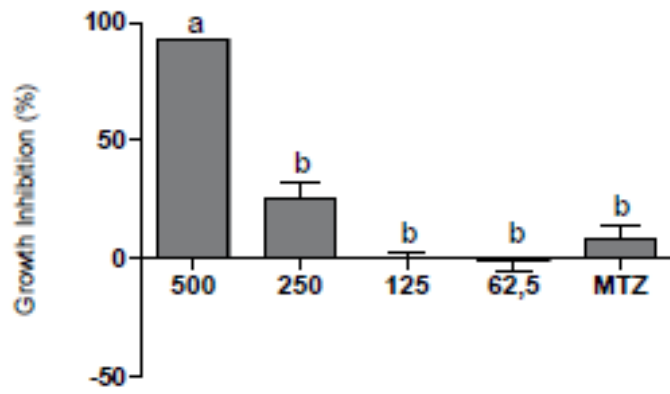
22

23

24

1 Sena-Lopes et al. Figure 3:

2



3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

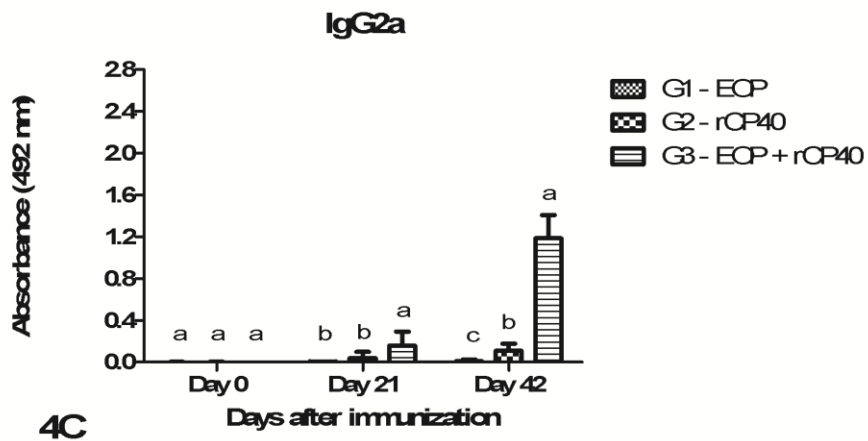
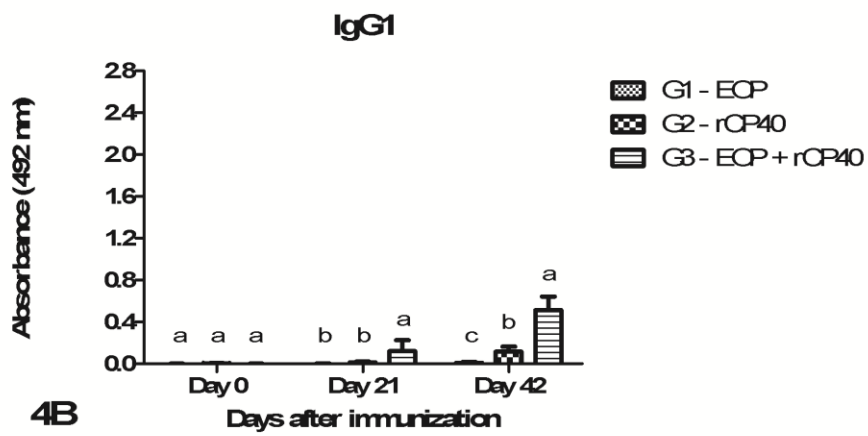
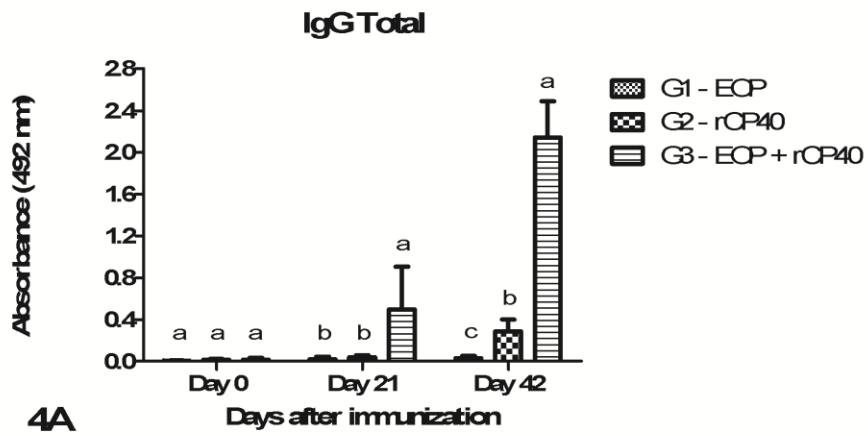
24

25

26

1 Sena-Lopes et al. Figure 4:

2



3

4

5

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27

**Manuscrito 1. Antiparasitic and molecular activity of Quinolines-1,2,3-  
triazolylcarboxamides in *Trichomonas vaginalis***

**Artigo será submetido na revista Parasitology Research, INSS 432-1955.**

Link normas da revista:

[http://www.springer.com/biomed/medical+microbiology/journal/436?detailsPage=pltdci\\_1060604](http://www.springer.com/biomed/medical+microbiology/journal/436?detailsPage=pltdci_1060604)

1 **6. Manuscrito 1. Antiparasitic activity of Quinolines-1,2,3-**  
2 **triazolylcarboxamides in *Trichomonas vaginalis***

3  
4 Ângela Sena-Lopes<sup>1</sup>, Raquel Nascimento das Neves<sup>1</sup>, Mirna Samara Dié  
5 Alves<sup>1</sup>, Francisco Silvestre Brilhante Bezerra<sup>1</sup>, Mara Thais de Oliveira Silva<sup>1</sup>;  
6 Manoela do Sacramento<sup>2</sup>, Gelson Perin<sup>2</sup>, Diego Alves<sup>2</sup>, Lucielli Savegnago<sup>3</sup>,  
7 Karine Rech Begnini<sup>4</sup>, Fabiana Kommling Seixas<sup>4</sup>, Tiago Collares<sup>4</sup>, Sibeles  
8 Borsuk<sup>1</sup>

9  
10 <sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia Infecto-parasitária, Centro de Desenvolvimento  
11 Tecnológico, Biotecnologia, UFPel, Pelotas, RS, Brazil, 96010–900

12 <sup>2</sup>LASOL – CCQFA, Universidade Federal de Pelotas – UFPel, P.O. Box 354 – 96010–  
13 900, Pelotas, RS, Brazil

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

16 <sup>4</sup>Laboratório de Biotecnologia do Câncer, Centro de Desenvolvimento Tecnológico,  
17 Biotecnologia, UFPel, Pelotas, RS, Brazil, 96010–900

18  
19 **Abstract**

20 Increased prevalence of metronidazole-resistant infections has resulted in a  
21 search for alternative drugs for the treatment of trichomoniasis. In the present  
22 study, we report the evaluation of *in vitro* activity of three Quinolines-1,2,3-  
23 triazolylcarboxamides (QTCA-1, QTCA-2 and QTCA-3) against *Trichomonas*  
24 *vaginalis*, evaluation of cytotoxicity in CHO cells and expression of genes related  
25 to hydrogenosome by Real Time PCR. Nine concentrations (6.25, 12.5, 25, 50,  
26 60, 70, 80, 90, and 100 µM) of these compounds were analyzed for *in vitro*  
27 activity against ATCC 30236 isolate of *T. vaginalis*. QTCA-2 reported a  
28 cytotoxic effect against 100% of *T. vaginalis* trophozoites at a final  
29 concentration of 80 µM with an IC<sub>50</sub> of 50 µM. The kinetic growth curve of  
30 trophozoites indicated that QTCA-2 reduced the growth by 70% at a

1 concentration of 80  $\mu$ M after an exposure of 12 h, and induced complete  
2 parasite death at 24 h. QTCA-2 induced less than 30% of cytotoxicity at 80  $\mu$ M  
3 concentration in CHO-K1 cells and do not had effect in lower concentrations.  
4 There were no significant difference in gene expression (pyruvate-ferredoxin  
5 oxidoreductase A and B; Malic enzyme D; Hydrogenase;  $\beta$ -tubulin) when  
6 compared to control and MTZ. More studies should be conducted to better  
7 identify the mechanism of action of the quinolines .The present study offers new  
8 perspectives for exploring the potential of this class of molecules as an  
9 additional option for the treatment of trichomoniasis.

10  
11 **Keywords:** Trichomoniasis; Quinolines; Antiparasitic; qRT-PCR

## 12 13 **Introduction**

14  
15 *Trichomonas vaginalis* is a protozoan infecting genitourinary tract and  
16 causing the most common non-viral, sexually transmitted disease (STD) in the  
17 world. According to World Health Organization (WHO 2012), an estimated 276  
18 million cases of trichomoniasis have been reported worldwide, most of them  
19 occurring in women.

20 Drugs of choice for treating trichomoniasis are derived from 5-  
21 nitroimidazoles, metronidazole and tinidazole, all of which are approved by  
22 Food and Drug Administration (FDA-EUA). The 5-nitroimidazoles, especially  
23 metronidazole, are the most widely used antimicrobial agents for the treatment  
24 of trichomoniasis. However, metronidazole resistance is an increasingly  
25 recognized problem in treating patients infected with trichomoniasis (Lumsden  
26 et al. 1988; Vieira et al. 2012). Metronidazole enters the parasite by passive  
27 diffusion as a nonlethal prodrug. Once inside the cell, metronidazole is reduced,  
28 resulting in the generation of nitro radicals, which lead to DNA damage and cell  
29 death. *T. vaginalis* cells use pyruvate–ferredoxin oxidoreductase (PFOR) and  
30 ferredoxin-linked enzymes to metabolize pyruvate to acetate via acetyl  
31 coenzyme A to gain ATP. When a nitroimidazole is present, its nitro groups

1 capture electrons from ferredoxin, and the nitro radicals are generated (Kulda,  
2 1999). Although the cure rates are significant, treatment failures maybe  
3 observed and are attributed mainly to non-compliance with treatment or  
4 reinfection, but factors such as poor drug absorption or insufficient  
5 bioavailability are also reported (Lumsden et al. 1988).

6 For this, an intensive search for new molecules as potential drugs with  
7 antiparasitic activity for the treatment of trichomoniasis is required. Here, we  
8 highlight the organic compounds of quinolines as possible drugs for the  
9 treatment of trichomoniasis. Pharmacological uses of these organic compounds  
10 have been studied for different biological properties such as antitumor (Begnini  
11 et al. 2017), anti-oxidants (Dorey et al. 2000), anti-tuberculosis (Candéa et al.  
12 2009), anti-fungal (Musiol et al. 2006), antibacterial (Ferretti et al. 2014), anti-  
13 inflammatory and antinociceptive (Wilhelm et al. 2014), antiprotozoal (Di Pietro  
14 et al. 2015). Thus, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* anti-*T.*  
15 *vaginalis* activity of three Quinolines-1,2,3-triazolylicarboxamides (QTCA).

16

## 17 **Materials and Methods**

18

### 19 **Chemicals**

20 The activity of Quinolines-1,2,3-triazolylicarboxamides (QTCA) diluted in  
21 dimethylsulfoxide (DMSO) was analyzed in *T. vaginalis*. For this, we selected  
22 three compounds: QTCA-1, QTCA-2, and QTCA-3. The QTCA were  
23 synthesized by organocatalytic synthesis as described by Begnini et al. (2017).  
24 The same compounds synthesized by Begnini et al. (2017) were used in the  
25 present study. . Briefly, the compounds were synthesized in high yields by the  
26 reaction of 4-azido-7-chloroquinoline with a range of  $\beta$ -oxoamides in the  
27 presence of a catalytic amount of pyrrolidine using DMSO as solvent at room  
28 temperature. The following quinoline derivative compounds were evaluated in  
29 this study: 1- (7-Chloroquinolin-4-yl)-5-methyl-N-phenyl-1H-1,2,3-triazole-4-  
30 carboxamide (QTCA-1); 1-(7-Chloroquinolin-4-yl)-N,5-diphenyl- 1H-1,2,3-  
31 triazole-4-carboxamide (QTCA-2) and 1-(7-Chloroquinolin-4-yl)-N-phenyl-5-  
32 (trifluoromethyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxamide (QTCA-3) (**Figure 1**).

## 1 **Parasite Culture Conditions**

2 In this study, *T. vaginalis* 30236 isolate from American Type Culture  
3 Collection (ATCC) was used. Trophozoites were axenically cultured in  
4 trypticase-yeast extract-maltose (TYM) medium without agar (pH 6.0),  
5 supplemented with 10% sterile bovine serum (inactivated at 56°C), and  
6 incubated at 37°C (Diamond 1957). The culture with 95% viability, confirmed  
7 through observation of motility, morphology, and trypan blue exclusion (0.4%)  
8 assay under the light microscope at 400X magnification was considered alive  
9 and utilized for the evaluation of activity of Quinolines-1,2,3-  
10 triazolylcarboxamides (QTCA).

11

## 12 ***Anti-Trichomonas vaginalis* Assay**

13 The three compounds of QTCA (QTCA-1, QTCA-2, and QTCA-3).  
14 were tested *in vitro* for activity against *T. vaginalis*, according Brandelli Clara et  
15 al. (2013) and Sena-Lopes et al. (2017). All assays were performed in 96-well  
16 microtiter plates (TPP). The parasites were seeded at an initial density of  $2.6 \times$   
17  $10^5$  trophozoites/mL of TYM and incubated with QTCA drugs. Three controls  
18 were carried out: trophozoites only, vehicle for solubilization of the derivatives  
19 (0.6% DMSO), and MTZ 100 $\mu$ M (as positive control, metronidazole - Sigma-  
20 Aldrich). The microculture plates were incubated at 37°C with 5 % CO<sub>2</sub> for 24 h.  
21 After that, a preparation containing trophozoites and trypan blue (0.4%) at a  
22 ratio of 1:1 was counted in a Neubauer chamber and cultures with 95 % viability  
23 were utilized for assays.

24 For screening, QTCA-1, QTCA-2, and QTCA-3 were used at a final  
25 concentration of 100  $\mu$ M. Only the compound that reduced the viability of  
26 parasites to 100 % was used to determine the minimum inhibitory concentration  
27 (MIC) by considering different concentrations such as 6.25, 12.5, 25, 50, 60, 70,  
28 80, 90, and 100  $\mu$ M. The parasite pellets used to establish MIC and the  
29 concentrations bellow and above as well as controls were inoculated in fresh  
30 TYM medium at 37°C. Parasites were counted in a Neubauer chamber with  
31 trypan blue every 24 h for 96 h to confirm MIC. The viability of trophozoites  
32 was assessed by exclusion of trypan blue dye, motility, and morphology. The



1 IC<sub>50</sub> was determined (half the maximum inhibitory concentration) at  
2 concentrations of 6.25, 12.5, 25, 50, 60, 70, 80, 90, and 100 µM as described in  
3 the MIC method.

4 A kinetic growth curve was constructed to obtain a more comparable  
5 activity profile of QTCA compounds against *T. vaginalis*. The viability of  
6 trophozoites was observed under the light microscope at 96 h after incubation  
7 at respective MIC. Growth analysis was performed at the following times: 1, 6,  
8 12, 24, 48, 72, and 96 h by trypan blue (0.4%) exclusion method and by  
9 determining the motility and morphology. All the assays were performed  
10 independently at least three times in triplicate and the results were expressed  
11 as the percentage of viable trophozoites in comparison with untreated parasites.

12  
13

#### 14 **Cytotoxicity Assay**

15  
16

17 Chinese Hamster Ovary (CHO-K1) cells were obtained from the Rio de  
18 Janeiro Cell Bank (PABCAM, Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil)  
19 and cultured as a monolayer in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)  
20 (Vitrocell Embriolife), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS)  
21 (Vitrocell Embriolife), 1% L-glutamine, and 1% penicillin/ streptomycin. The cells  
22 were grown at 37°C in an atmosphere of 95% humidified air and 5% CO<sub>2</sub>.

23 The viability of CHO-K1 cell line after treatment with QTCA-2 was  
24 determined by measuring the reduction of soluble 3-(4,5-dimethylthiazol- 2-yl)-  
25 2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) to water-insoluble formazan. Cells were  
26 seeded at a density of  $2 \times 10^4$  cells per well in a volume of 100 µL in 96-well  
27 plates and grown at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 24 h before using them in  
28 the assay. The cells were then treated with 2.5, 5, 20, 40 and 80 µM of QTCA -2  
29 compound for 24 h. DMSO 0,6% (VC) were used as vehicle control,  
30 metronidazole (MTZ) were used as positive control and no treated cells were  
31 used as negative controls (Control), respectively. Following incubation, 20 µL of  
32 MTT (Sigma-Aldrich) in a concentration of 5 mg/mL was added to each well,  
33 and the cells were incubated for an additional 3 h at 37°C. The differences in  
the total cellular metabolism were detected at a wavelength of 492 nm using a

1 microplate reader. The inhibition (%) of cell proliferation was determined  
2 comparing treated cells and control cells as follows: inhibitory growth =  $(1 -$   
3  $Abs_{492 \text{ treated cells}} / Abs_{492 \text{ control cells}}) \times 100\%$ . The IC<sub>50</sub> was calculated using  
4 GraphPad Prism 5.0 Software. All observations were validated by at least three  
5 independent experiments in triplicate.

6

### 7 **Gene expression of *T. vaginalis***

8 Total RNA from *T. vaginalis* trophozoites ( $10^7$  cells/sample) was isolated  
9 using Trizol Reagent kit (In vitrogen) according to the manufacturer's  
10 instructions. First-strand cDNA synthesis was performed with 0.5µg of RNA  
11 using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems,  
12 UK) following the manufacturer's protocol. PCR mixtures (20 µL) containing 10  
13 µl of SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, UK), 300 nm of  
14 primers, 1 µl of cDNA, and RNase-DNase-free water were subjected to 95 °C  
15 for 5 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 10 sec and 60 °C for 30 sec. A  
16 melting curve analysis was performed at 95 °C for 15 sec, 55 °C for 15 sec, and  
17 95 °C for 15 sec. Realtime PCR reactions were run on a Stratagene Mx3005P  
18 Real-Time PCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using  
19 the primers described in **Table 1**, (pyruvate-ferredoxin oxidoreductase A (PFOR  
20 A) and pyruvate-ferredoxin oxidoreductase B (PFOR B); Malic enzyme D;  
21 Hydrogenase; β-tubulin) (Mead et al. 2006; Dos Santos et al. 2015). These  
22 genes were selected because they are related to parasite metabolism. The  
23 primer sets were designed and optimized using the Primer 3 Plus program ([http:](http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi)  
24 [// www.bioinformatics.nl / cgi-bin / primer3plus / primer3plus.cgi](http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi)), based on  
25 predefined parameters. B-tubulin gene was used as normalizer in all analyses.

26

27

28

29

30

31

32

1 **Table 1: Primers used in qRT-PCR.**

2

Gene	Primer	Sequence ( 5' – 3')	GenBank access number	Reference
PFOR A	F R	CGGCTACGGTATGTTCAAGG TCCTTGTCTGATCCCAAAC	U16822	Mead et al. (2006)
PFOR B	F R	CTGCAAGCTCCTTACACAGC AAGAGGGAGTTAGCCCAAG C	U16823	Mead et al. (2006)
Malic enzyme (D)	F R	CATCTGTTAGCCTCCCAGTC C ACGAGCAGCTTGTTTCATCCT	U16839	Mead et al. (2006)
Hydrogenase	F R	TGCACACGAAAGAAGGATGA TCGCATGGTGTATCTGGTAA	U19897	Mead et al. (2006)
$\beta$ -tubulin (tub2)	F R	TACTCCATCGTCCCA TCTCC CCGGACATAACCATGGAAAC	L05469	Dos Santos et al. (2015)

3

4 **Statistical Analysis**

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

9

10 **Results**

11

12 ***Anti-Trichomonas vaginalis* Assay**

13 Analysis of the data obtained from the screening of compounds reported  
14 that the compound QTCA-2 reduced the parasite viability by 100% as compared  
15 with the negative control (only trophozoites). The other two compounds, namely  
16 QTCA 1 and 3 reduced the parasite viability by 60% and 80%, respectively  
17 **(Figure 2)**. As expected, negative controls, only trophozoites and DMSO

1 exhibited positive motility and negative staining with trypan blue (0.4%),  
2 whereas the positive control, MTZ, completely reduced the parasite viability.  
3 The positive control depicted negative motility and stained blue in all the assays  
4 performed after 24 h exposure. Since a 100% reduction in parasite viability was  
5 observed with QTCA-2, it was selected to perform other tests. QTCA-2  
6 demonstrated an optimal anti-*T. vaginalis* activity at a concentration of 80  $\mu$ M,  
7 which was confirmed by MIC and IC<sub>50</sub> of 50  $\mu$ M, both at 24 h exposure (**Figure**  
8 **3**).

### 10 **Kinetic Growth Analysis**

11 The analysis of kinetic growth curve of trophozoites treated with QTCA-2  
12 displayed a reduction in the growth of trophozoites by 70% at a concentration of  
13 80  $\mu$ M after 12 h exposure. In addition, a complete reduction of proliferation of  
14 parasite was observed at 24 h (**Figure 4**).

### 16 **Cytotoxic Assay**

17 The MTT assay showed that QTCA-2 have no cytotoxic activity when  
18 exposed to CHO-K1 cell lines for 24 h. None of five doses tested were able to  
19 decrease viability more than 30% and no statistic differences were observed  
20 compared to negative, VC and positive controls (**Figure 5**). Metronidazole  
21 (MTZ), reported a cell growth inhibition of 8.5%, which is similar to the  
22 cytotoxicity observed for QTCA-2 compound. These results suggested that  
23 QTCA-2 is no more cytotoxic than the commercially available drugs for  
24 trichomoniasis.

### 26 **Gene expression of *T. vaginalis***

27 The expression level of PFOR A, PFOR B, hydrogenase and malic  
28 enzyme genes after treatment with 80  $\mu$ M of QTCA-2 was evaluated by qRT-  
29 PCR. No significant difference was observed in the expression of these genes  
30 when compared to negative, positive and vehicle controls.

## 1 Discussion

2

3 The quinolines and their derivatives represent an important class of  
4 organic molecules, which constantly arouse interest in the areas of synthesis  
5 and medicinal chemistry, are present in several natural substances, mainly  
6 alkaloids derived from plants, but can also be compounds synthesized  
7 laboratorily (Wilhelm et al. 2014).

8 In addition to the quinolines, the molecules of the azole class are also  
9 compounds that arouse interest in medicinal chemistry. Triazoles are five  
10 membered heterocycles containing three nitrogen atoms as substituents and  
11 have six electrons in their structure. Like all azoles, they are exclusively  
12 synthetic compounds, and there are no indications that they can be found in  
13 nature (Melo et al. 2006). Synthetic molecules containing 1,2,3-triazole units  
14 have already been described as having various biological activities, including  
15 antituberculosis, antibacterial, anticancer and anti-Leishmania (Agalave et al.  
16 2011; Wilhelm et al. 2014; Masood et al. 2017).

17 In this study we evaluated the *in vitro* anti-*T. vaginalis* activity of three  
18 Quinolines-1,2,3-triazolylcarboxamides (QTCA) (**Figure 1**). We observed that  
19 only QTCA-2 with extra radical fenil in the structure reduced the viability of  
20 trophozoites to 100%. The low selective toxicity against *T. vaginalis* is attributed  
21 to the fact that many quinolines compounds have an antioxidant activity and *T.*  
22 *vaginalis* lacks an antioxidant defense. The exact mechanisms of action of  
23 quinoline drugs should still be better elucidated specifically for each group of  
24 derivatives, but it is believed that in the case of antimalarial activity this  
25 mechanism is based on the inhibition of hemozoin biocrystallization, which  
26 leads to the release of heme group, which is toxic to the parasite because of its  
27 ability to generate reactive oxygen species (Muraleedharan and Avery 2007).

28 The same compounds evaluated in this studied were used in breast  
29 cancer cells (MCF-7 and MDA-MB-231). Results showed significantly  
30 decreased in a dose dependent manner after treatment with 7-chloroquinoline  
31 derivatives QTCA-1, QTCA-2 and QTCA- 3. QTCA-1 displayed the highest  
32 cytotoxic activity and apoptosis induction was also significantly higher in the

1 hormonal-independent breast cancer cells (MDA-MB-231) (Begnini et al. 2017).  
2 However, in our study the QTCA-1 do not present anti-*T. vaginalis* activity

3           A study evaluated in vitro activity against *T. brucei*, *T. cruzi*, and  
4 *Leishmania infantum* of twenty one compounds derived from Tricyclic  
5 heterofused quinolones. All the novel heterofused quinoline derivatives  
6 featuring a protonatable aminomethylphenyl group at the B-ring, were more  
7 potent against *T. brucei* than the standard drug and also demonstrated  
8 leishmanicidal activity. Most of the compounds tested also showed to be active  
9 against *T. cruzi* following the same profile found for *T. brucei*. The  
10 pyranquinoline was selected as the compound with the best anti-protozoal  
11 potential for the three parasites (Di Pietro et al. 2015).

12           The quinoline class composes a wide range of antimalarial agents,  
13 which are widely employed, and inhibit the formation of  $\beta$ -hematin (malaria  
14 pigment), which is lethal to the parasite. More specifically, the 4-aminoquinoline  
15 derivatives represent potential sources of antimalarials, such as the example of  
16 chloroquine, the most widely used antimalarial in the world. To evaluate  
17 antimalarial activity, twelve drugs derived from 4-aminoquinoline were obtained  
18 and some of these derivatives were used to obtain platinum (II). These  
19 compounds were tested in vivo in murine model and showed remarkable  
20 inhibition of the parasite multiplication values, most of which ranged from 50 to  
21 80%. In addition, they were not cytotoxic. Thus, they may be the subject of  
22 further research for new antiparasitic agents (De Souza et al. 2011).

23           Resistance to nitroimidazoles have been observed in vitro-derived  
24 isolates (Lumsden et al. 1988; Upcroft and Upcroft 2001). Anaerobic resistance  
25 is associated with a decrease in PFOR and hydrogenase activity, thus resulting  
26 in less activation of metronidazole (Kulda 1999; Conrad et al. 2013). In contrast,  
27 aerobic resistance is thought to be due to impaired oxygen scavenging possibly  
28 because of decreased oxidase activity (Leitsch 2016; Menezes et al. 2016).

29           Considering parasite resistance to nitroimidazoles, *T. vaginalis* has been  
30 shown to have homologs of bacterial nitroreductase and nitroimidazole  
31 reductases that are absent in most eukaryotes and are related to the reduced  
32 susceptibility to MTZ in *Helicobacter pylori* and *Bacteroides* (Pal et al. 2009). It

1 is still unclear whether these genes are associated with sensitivity to  
2 nitroimidazole in the parasite, but it has been shown that these enzymes can  
3 activate MTZ in the cytosol and in the hydrogenosome, opposing previous  
4 reports of activation that occur exclusively by the hydrogenosome enzymes  
5 such as pyruvate ferredoxin oxidase reductase and hydrogenase (Kulda 1999;  
6 Menezes et al. 2016).

7         Here we investigated the gene expression of enzymes associated with  
8 mechanism of action to MTZ (PFOR A, PFOR B, Malic enzyme D;  
9 Hydrogenase;  $\beta$ -tubulin) in *T. vaginalis* 30236 cultured with QTCA-2. No  
10 significant differences were observed in the mRNA levels of the enzymes by  
11 resistance or susceptibility to metronidazole or QTCA-2. The lack of correlation  
12 between gene expression and resistance or susceptibility may be the result of  
13 differences in expression at the protein level or because the mechanism of  
14 action of QTCA-2 is by other biochemical pathways or genes.

15         The negative regulation or even absence of flavin reductase and alcohol  
16 dehydrogenase activity in strains of *T. vaginalis* with high levels of MTZ  
17 resistance, as well as thioredoxin activity, has been shown to be the same in all  
18 strains evaluated (Leitsch et al. 2009; Leitsch et al. 2010). In addition, the  
19 clinical resistance to MTZ in *T. vaginalis*, also known as aerobic resistance, is  
20 fundamentally different from the resistance to high level MTZ induced in the  
21 laboratory, called anaerobic resistance (Conrad et al. 2013). Anaerobic  
22 resistance is induced in the absence of oxygen and is a consequence of a loss  
23 of the drug-activating enzymatic pathways that are responsible for the reduction  
24 of the MTZ prodrug in toxic intermediates (Kulda 1999). On the other hand, the  
25 aerobic resistance to MTZ seems to be related to high concentrations of  
26 intracellular oxygen as a consequence of the decrease of the oxygen  
27 elimination capacity that interferes with the activation of the nitroimidazoles  
28 (Leitsch 2016; Menezes et al. 2016).

29         Therefore, new developmental testing methods for detection and  
30 identification of molecular mechanisms of resistance in the parasite are urgent  
31 (Conrad et al. 2013). The characterization of biochemical and molecular targets  
32 of the parasite such as flavin reductase 1, pyruvate-ferredoxin oxidase

1 reductase, ferredoxin and nitroreductase (Leitsch et al., 2014) is a potential  
2 strategy for novel therapeutics.

3

#### 4 **Conclusions**

5

6 The investigation of antiparasitic activities of quinolines compounds is still  
7 in its early stages. The compound, QTCA-2 exhibited high antiparasitic activity  
8 with little cytotoxicity at higher concentrations. The characterization of  
9 biochemical and molecular targets of the parasite is a potential strategy for new  
10 therapies. In addition, the development of adjuvant topical treatments, the  
11 search for new classes of substances, originated from natural or synthetic  
12 compounds or even derivatives of already commercialized drugs, have also  
13 been driven by the need to expand the repertoire of trichomoniasis treatment.  
14 More studies should be conducted to better identify the mechanism of action of  
15 new drugs and the effectiveness of the quinolones compounds in the present  
16 study offers new perspectives for exploring the potential of this class of  
17 molecules as an additional option for the treatment of trichomoniasis.

18

#### 19 **Conflicts of interest**

20

21 All authors declare that they have no conflict of interest.

22

#### 23 **Acknowledgements**

24

25 Authors thank the Post-Graduation Program in Pharmaceutical Sciences,  
26 UFRGS, in special: T. Tasca (\*) Laboratório de Pesquisa em Parasitologia,  
27 Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto  
28 Alegre 90610-000, RS, Brasil.

29

30

31

32



## 1 **References**

- 2 Agalave SG, Maujan SR, Pore VS (2011) Click chemistry: 1,2,3-triazoles as  
3 pharmacophores. *Chem - An Asian J* 6:2696–2718. doi:  
4 10.1002/asia.201100432
- 5 Begnini KR, Duarte WR, da Silva LP, et al (2017) Apoptosis induction by 7-  
6 chloroquinoline-1,2,3-triazoyl carboxamides in triple negative breast cancer  
7 cells. *Biomed Pharmacother* 91:510–516. doi:  
8 10.1016/j.biopha.2017.04.098
- 9 Brandelli Clara LC, Vieira Patricia de B, Macedo AJ, Tasca T (2013)  
10 Remarkable anti-trichomonas vaginalis activity of plants traditionally used  
11 by the Mbya-Guarani indigenous group in Brazil. *Biomed Res Int*  
12 2013:826370.
- 13 Candéa ALP, Ferreira M de L, Pais KC, et al (2009) Synthesis and  
14 antitubercular activity of 7-chloro-4-quinolinyldrazones derivatives.  
15 *Bioorganic Med Chem Lett* 19:6272–6274. doi: 10.1016/j.bmcl.2009.09.098
- 16 Conrad MD, Bradic M, Warring SD, et al (2013) NIH Public Access. 29:17–25.  
17 doi: 10.1016/j.pt.2012.10.004.Getting
- 18 De Souza NB, Carmo AML, Lagatta DC, et al (2011) 4-aminoquinoline  
19 analogues and its platinum (II) complexes as antimalarial agents. *Biomed*  
20 *Pharmacother* 65:313–316. doi: 10.1016/j.biopha.2011.03.003
- 21 Di Pietro O, Vicente-García E, Taylor MC, et al (2015) Multicomponent reaction-  
22 based synthesis and biological evaluation of tricyclic heterofused quinolines  
23 with multi-trypanosomatid activity. *Eur J Med Chem* 105:120–137. doi:  
24 10.1016/j.ejmech.2015.10.007

- 1 Diamond LS (1957) The establishment of various trichomonads of animals and  
2 man in axenic cultures. *J Parasitol* 43:488–90.
- 3 Dorey G, Lockhart B, Lestage P, Casara P (2000) New quinolinic derivatives as  
4 centrally active antioxidants. *Bioorganic Med Chem Lett* 10:935–939. doi:  
5 10.1016/S0960-894X(00)00122-0
- 6 Dos Santos O, De Vargas Rigo G, Frasson AP, et al (2015) Optimal reference  
7 genes for gene expression normalization in *Trichomonas vaginalis*. *PLoS*  
8 *One* 10:1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0138331
- 9 El Chamy Maluf S, Melo PMS, Varotti FP, et al (2016) Hypervalent  
10 organotellurium compounds as inhibitors of *P. falciparum* calcium-  
11 dependent cysteine proteases. *Parasitol Int* 65:20–2. doi:  
12 10.1016/j.parint.2015.09.006
- 13 FDA-EUA Drug approvals and Databases. In:  
14 <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm>.
- 15 Ferretti MD, Neto AT, Morel AF, et al (2014) Synthesis of symmetrically  
16 substituted 3,3-dibenzyl-4-hydroxy-3,4-dihydro- 1H-quinolin-2-ones, as  
17 novel quinoline derivatives with antibacterial activity. *Eur J Med Chem*  
18 81:253–266. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.05.024
- 19 Kulda J (1999) Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *Int J*  
20 *Parasitol* 29:199–212.
- 21 Leitsch D (2016) Recent Advances in the *Trichomonas vaginalis* Field.  
22 *F1000Research* 5:1–7. doi: 10.12688/f1000research.7594.1
- 23 Leitsch D, Kolarich D, Binder M, et al (2009) *Trichomonas vaginalis*:  
24 Metronidazole and other nitroimidazole drugs are reduced by the flavin

- 1 enzyme thioredoxin reductase and disrupt the cellular redox system.  
2 Implications for nitroimidazole toxicity and resistance. *Mol Microbiol*  
3 72:518–536. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06675.x
- 4 Leitsch D, Kolarich D, Duchêne M (2010) The flavin inhibitor  
5 diphenyleneiodonium renders *Trichomonas vaginalis* resistant to  
6 metronidazole, inhibits thioredoxin reductase and flavin reductase, and  
7 shuts off hydrogenosomal enzymatic pathways. *Mol Biochem Parasitol*  
8 171:17–24. doi: 10.1016/j.molbiopara.2010.01.001
- 9 Lumsden WH, Robertson DH, Heyworth R, Harrison C (1988) Treatment failure  
10 in *Trichomonas vaginalis* vaginitis. *Genitourin Med* 64:217–8.
- 11 Masood MM, Hasan P, Tabrez S, et al (2017) Anti-leishmanial and cytotoxic  
12 activities of amino acid-triazole hybrids: Synthesis, biological evaluation,  
13 molecular docking and in silico physico-chemical properties. *Bioorganic*  
14 *Med Chem Lett* 27:1886–1891. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.03.049
- 15 Mead AJR, Fernandez M, Romagnoli PA, et al Use of *Trichomonas vaginalis*  
16 Clinical Isolates to Evaluate Correlation of Gene Expression and  
17 Metronidazole Resistance Effects of High-Pressure Processing on  
18 *Toxoplasma gondii* Tissue Cysts in Ground Pork. 92:196–199.
- 19 Melo JOF, Donnici CL, Augusti R, et al (2006) Heterociclos 1,2,3-triazólicos:  
20 Histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas.  
21 *Quim Nova* 29:569–579. doi: 10.1590/S0100-40422006000300028
- 22 Menezes CB, Amanda Piccoli Frasson AP, Tasca T (2016) Trichomoniasis –  
23 are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually  
24 transmitted disease worldwide? *Microb Cell* 3:404–418. doi:

- 1        10.15698/mic2016.09.526
- 2        Muraleedharan M A. KMA (2007) Advances in the Discovery of  
3        New Antimalarials. Elsevier Ltd 804. doi: 10.1016/B978-0-12-800167-  
4        7.00009-2
- 5        Musiol R, Jampilek J, Buchta V, et al (2006) Antifungal properties of new series  
6        of quinoline derivatives. *Bioorganic Med Chem* 14:3592–3598. doi:  
7        10.1016/j.bmc.2006.01.016
- 8        Pal D, Banerjee S, Cui J, et al (2009) Giardia, Entamoeba, and Trichomonas  
9        enzymes activate metronidazole (nitroreductases) and inactivate  
10        metronidazole (nitroimidazole reductases). *Antimicrob Agents Chemother*  
11        53:458–464. doi: 10.1128/AAC.00909-08
- 12        Sena-Lopes Â, das Neves RN, Bezerra FSB, et al (2017) Antiparasitic activity of  
13        1,3-dioxolanes containing tellurium in *Trichomonas vaginalis*. *Biomed*  
14        *Pharmacother*. doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.173
- 15        Upcroft P, Upcroft J a (2001) Drug Targets and Mechanisms of Resistance in  
16        the Anaerobic Protozoa Drug Targets and Mechanisms of Resistance in  
17        the Anaerobic Protozoa. *Clin Microbiol Rev* 14:150–164. doi:  
18        10.1128/CMR.14.1.150
- 19        Vieira P de B, Brandelli CLC, Veríssimo C de M, Tasca T (2012) Mecanismos  
20        específicos de patogenicidade de protozoários de mucosa. *Clin Biomed*  
21        *Res* 32:58–70.
- 22        WHO (2012) Global incidence and prevalence of selected curable sexually  
23        transmitted infections-2008. In: World Heal. Organ.  
24        [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75181/1/9789241503839\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75181/1/9789241503839_eng.pdf).

1 Wilhelm EA, Machado NC, Pedroso AB, et al (2014) Organocatalytic synthesis  
2 and evaluation of 7-chloroquinoline-1,2,3-triazoyl carboxamides as  
3 potential antinociceptive, anti-inflammatory and anticonvulsant agent. RSC  
4 Adv 4:41437–41445. doi: 10.1039/C4RA07002J

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

## 1 Figure legends

2 **Figure 1:** Chemical structure and yields isolated from the compounds of QTCA-  
3 1, QTCA-2 and QTCA-3 synthesized through the cycloaddition enamide azide  
4 between  $\beta$ -ketoamides and 4-azido-7-chloroquinoline.

5  
6 **Figure 2:** Antiparasitic activity of QTCA-1, QTCA-2 and QTCA-3 at 100  $\mu$ M  
7 concentration against *Trichomonas vaginalis* 30236 isolate by trypan blue assay  
8 (0.4%) after 24 h of exposure. The trophozoite growth was completely inhibited  
9 by QTCA-2 in 24 h of incubation. Vehicle for solubilization (DMSO 0.6%),  
10 metronidazole 100  $\mu$ M (MTZ), control (untreated trophozoites). Data represent  
11 means  $\pm$ standard deviation of at least three experiments in triplicate. Different  
12 letters show a significant difference. For all  $p < 0.05$ .

13  
14 **Figure 3:** Determination of MIC and IC<sub>50</sub> of *Trichomonas vaginalis* 30236 isolate  
15 after treatment with QTCA-2 at 6,25, 12,5, 25, 50, 60, 70, 80, 90 and 100  $\mu$ M  
16 concentration and 24 h of exposure. The trophozoite growth was completely  
17 inhibited by QTCA-2 in 24 h at 80  $\mu$ M as MIC and 50  $\mu$ M determining IC<sub>50</sub>.  
18 Vehicle for solubilization (DMSO 0.6%), metronidazole 100  $\mu$ M (MTZ), control  
19 (untreated trophozoites). Data represent means  $\pm$ standard deviation of at least  
20 three experiments in triplicate. Different letters show a significant difference. For  
21 all  $p < 0.05$ .

22  
23 **Figure 4:** Kinetic growth curve of *Trichomonas vaginalis* 30236 isolate after  
24 treatment with QTCA-2 at 80  $\mu$ M and the period of 1, 6, 12, 24, 48, 72, and 96  
25 h. The trophozoite growth was completely inhibited by QTCA-2 in 24 h of  
26 incubation. Data represent means  $\pm$ standard deviation of at least three  
27 experiments all in triplicate. Different letters show a significant difference. For all  
28  $p < 0.05$ .

29  
30 **Figure 5:** Cytotoxicity effect of QTCA-2 in CHO-K1 cells. Cell proliferation in  
31 CHO-K1 was investigated by MTT assay. Data are expressed as means  $\pm$ SEM  
32 from three independent experiments. Different letters (a, b, c and d) indicate  
33 difference between treatments. The differences were considered significant at  $p$   
34  $< 0.05$ .

35  
36

37

38

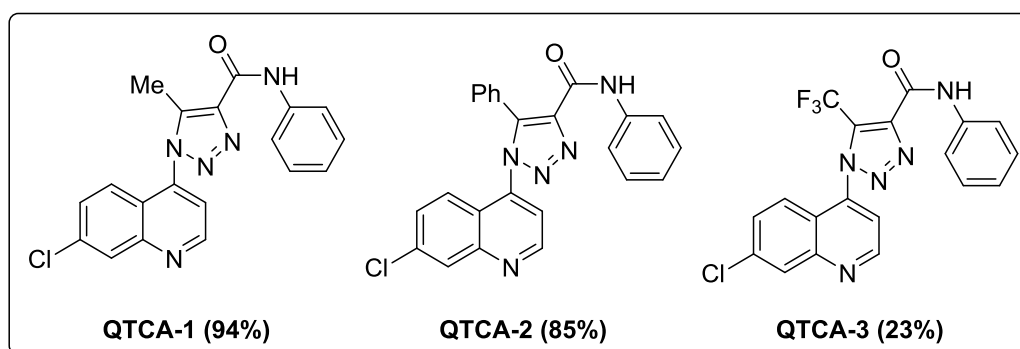
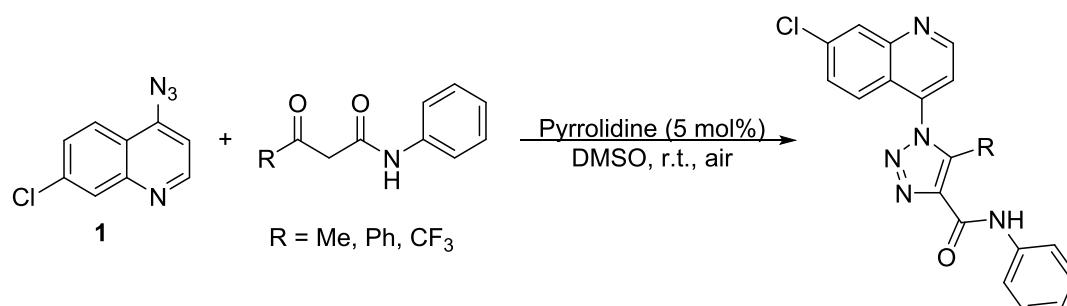
39

40

41

## 1 Sena-Lopes Figure 1.

2



3

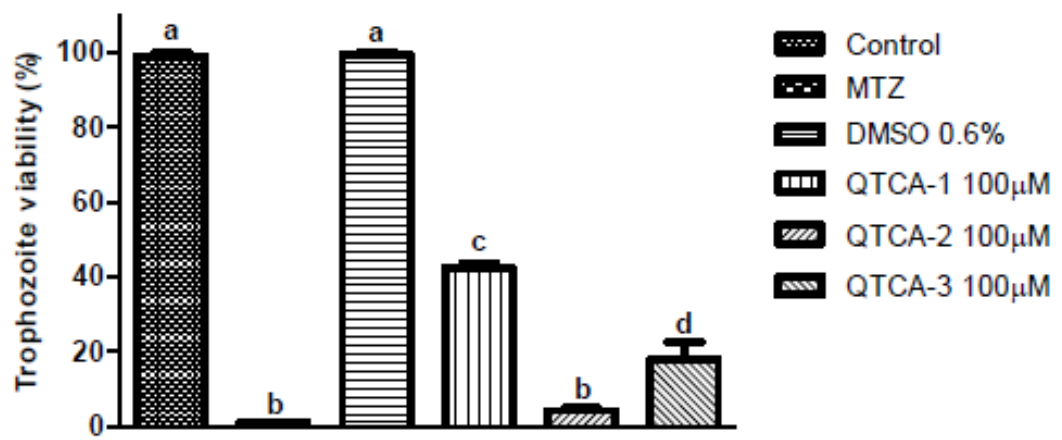
4

5

6

7

## 1 Sena-Lopes Figure 2.



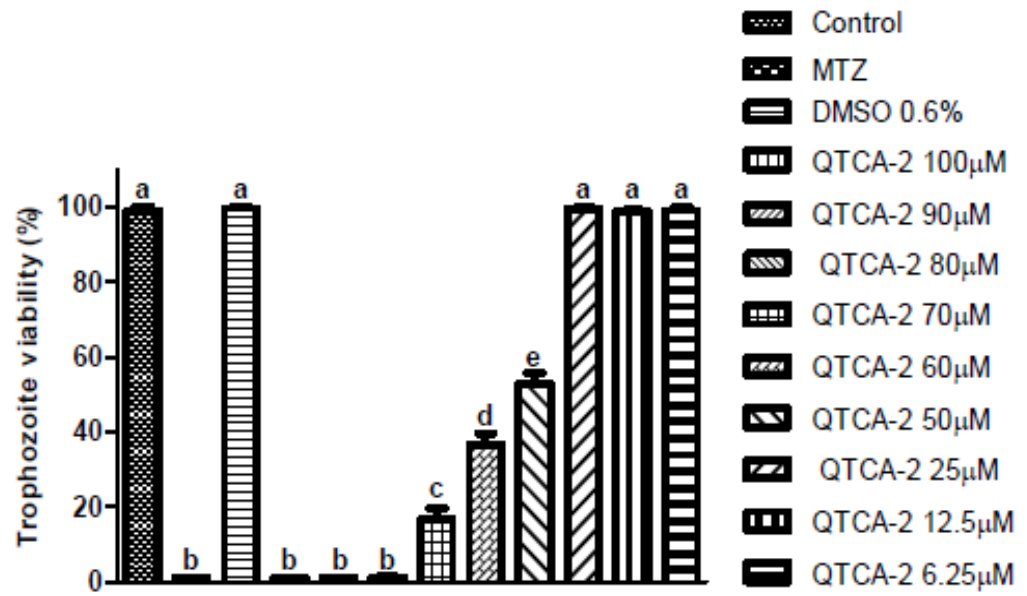
2

3



## 1 Sena-Lopes Figure 3.

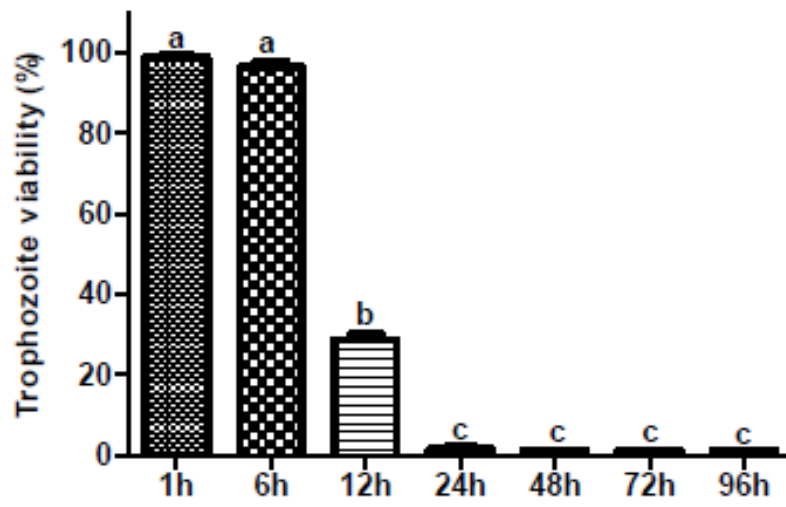
2



3

4

## 1 Sena-Lopes Figure 4.



2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

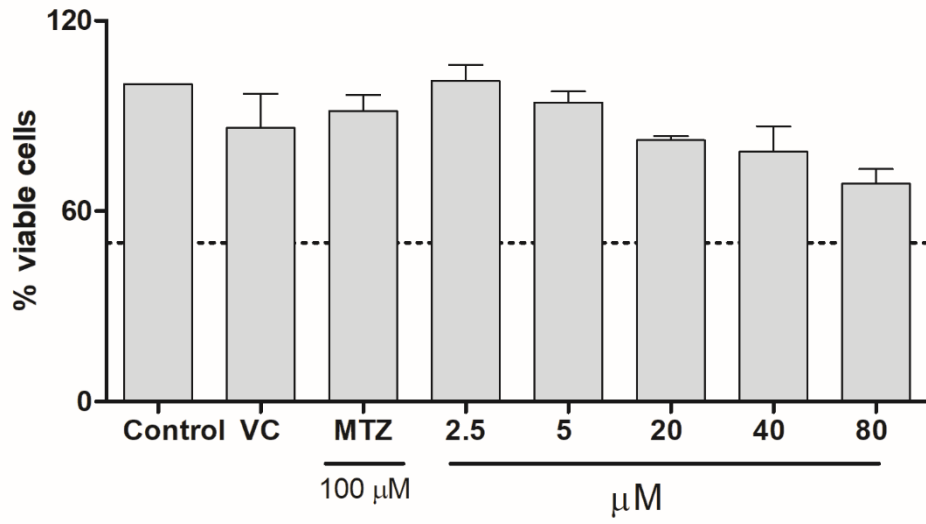
21

22

23

## 1 Sena-Lopes Figure 5

2



3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

## 7. Conclusões Gerais

Levando-se em consideração os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- PTeDOX 01, OEP e QTCA-2 exibiram atividade anti- *Trichomonas vaginalis*
- PTeDOX 1, OEP e QTCA-2 exibiram eficácia em concentrações que não foram tóxicas para CHO-K1.
- *T. vaginalis* exposto a QTCA-2 não promoveu uma diferença significativa na expressão gênica (piruvato-ferredoxina oxidoreductase A e B; enzima málica D; hidrogenase;  $\beta$ -tubulina) quando comparada ao controle e MTZ.
- A caracterização de alvos bioquímicos e moleculares de *Trichomonas vaginalis* é uma estratégia potencial para novas terapias.
- A eficácia do PTeDOX 1, OEP e QTCA-2 determinados no presente estudo oferece novas perspectivas para explorar o potencial destas classes de moléculas como uma opção adicional para o tratamento de diferentes doenças, como tricomoníase.

## 1 Referências

- 2 AGALAVE, S.G., MAUJAN, S.R., PORE, V.S. Click chemistry: 1,2,3-triazoles as  
3 pharmacophores. **Chem. Asian J.**, v. 6, p. 2696–2718, 2011.
- 4
- 5 ALDERETE, J. F. Does lactobacillus vaccine for trichomoniasis, Solco  
6 Trichovac, induce antibody reactive with *Trichomonas vaginalis*? **Genitourin  
7 Med**, v. 64, n. 2, p.118-123, 1988.
- 8
- 9 ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L. et al. Chemical  
10 composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red  
11 propolis. **J. Ethnopharmacol**, v. 113, p. 278–283, 2007.
- 12
- 13 ALLSWORTH, J. E.; RATNER, J. A.; PEIPERT, J. F. Trichomoniasis and other  
14 sexually transmitted infections: results from the 2001-2004 National Health and  
15 Nutrition Examination Surveys. **Sex Transm Dis**, v. 36, n. 12, p. 738-744, 2009.
- 16
- 17 ANDREA, S. B.; CHAPIN, K. C. Comparison of Aptima *Trichomonas vaginalis*  
18 transcription-mediated amplification assay and BD affirm VPIII for detection of  
19 *T. vaginalis* in symptomatic women: performance parameters and  
20 epidemiological implications. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 3, p. 866-869, 2011.
- 21
- 22 AYRES, C.D.; MARCUCCI, M.C.; GIORGIO, S. Effects of Brazilian propolis on  
23 *Leishmania amazonensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102 n.2, p. 215-220,  
24 2007.
- 25
- 26 BA, L. A.; DO RING, M.; JAMIER, V., JACOB, C. Tellurium: an element with  
27 great biological potency and potential. **Org Biomol Chem**, v.8, p.4203–4216,  
28 2010.
- 29
- 30 BEGNINI, K. R., DUARTE, W. R., DA SILVA, L. P., BUSS, J. H., GOLDANI, B.  
31 S., FRONZA, M., ... & COLLARES, T. Apoptosis induction by 7-chloroquinoline-  
32 1, 2, 3-triazoyl carboxamides in triple negative breast cancer  
33 cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, p. 510-516, 2017
- 34
- 35
- 36 BENCHIMOL, M. Trichomonads under Microscopy. **Microsc Microanal**, v. 10,  
37 n. 5, p. 528-50, 2004.
- 38
- 39 BENCHIMOL, M. The Hydrogenosome as a Drug Target. **Current  
40 Pharmaceutical Design**, v.14, p. 872-881, 2008.
- 41
- 42 BENCHIMOL, M. Hydrogenosomes under microscopy. **Tissue Cell**, v. 41, n. 3,  
43 p. 151-168, 2009.
- 44
- 45 BLAIS, F. X.; ONISCHUK, R. T.; DEMEIO, R. H. Hemolysis by tellurite. I. The  
46 tellurite test for hemolysis. **The Journal of the American Osteopathic  
47 Association**, v. 72, n. 2, p. 207, 1972.

- 1 BOWDEN, F. J.; GARNETT, G. P. *Trichomonas vaginalis* epidemiology:  
2 parameterising and analysing a model of treatment interventions. **Sexually**  
3 **transmitted infections**, v. 76, p. 248–256, 2000.
- 4
- 5 BURDOCK, G.A. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee  
6 Propolis. Propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 347-363, 1998.
- 7
- 8 CAMPBELL, L.; WOODS, V.; LLOYD, T.; ELSAYED, S.; CHURCH, D.L.  
9 Evaluation of the OSOM *Trichomonas* rapid test versus wet preparation  
10 examination for detection of *Trichomonas vaginalis* vaginitis in specimens from  
11 women with a low prevalence of infection. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 10, p.  
12 3467-3469, 2008.
- 13
- 14 CANDÉA, A. L., FERREIRA, M. D. L., PAIS, K. C., CARDOSO, L. N. D. F.,  
15 KAISER, C. R., MARIA DAS GRAÇAS, M. D. O., ... DE SOUZA, M. V.  
16 Synthesis and antitubercular activity of 7-chloro-4-quinolinyhydrazones  
17 derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 22, p.  
18 6272-6274, 2009.
- 19
- 20 CHERPES, T. L.; WIESENFELD, H.C.; MELAN, M. A.; KANT, J. A.;  
21 COSENTINO, L. A.; MEYN, L. A.; HILLIER, S. L. The associations between  
22 pelvic inflammatory disease, *Trichomonas vaginalis* infection, and positive  
23 Herpes simplex virus type 2 serology. **Sex Transm Dis**, v. 33, n. 12, p. 747-  
24 752, 2006.
- 25
- 26 CONRAD, M. D.; BRADIC, M.; WARRING, S. D.; GORMAN, A. W.; CARLTON,  
27 J. M. Getting trichy: tools and approaches to interrogating *Trichomonas*  
28 *vaginalis* in a post-genome world. **Trends Parasitol**, v. 29, n. 1, p. 17-25, 2013.
- 29
- 30 COTCH, M. F.; PASTOREK, J. G.; NUGENT, R. P.; YERG, D. E. ; MARTIN, D.  
31 H.; ESCHENBACH, D. A. Demographic and behavioral predictors of  
32 *Trichomonas vaginalis* infection among pregnant women. The Vaginal  
33 Infections and Prematurity Study Group. **Obstet Gynecol**, v. 78, n. 6, p. 1087-  
34 1092, 1991.
- 35
- 36 COTCH, M. F.; PASTOREK, J. G.; NUGENT, R. P.; HILLIER, S. L.; GIBBS, R.  
37 S.; MARTIN, D. H.; ESCHENBACH; D. A.; EDELMAN, R.; CAREY, J. C.;  
38 REGAN, J. A.; KROHN, M. A.; KLEBANOFF, M. A.; RAO, A. V.; RHOADS, G.  
39 G. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm  
40 delivery. The vaginal infections and prematurity study group. **Sex Transm Dis**,  
41 v. 24, n. 6, p. 353-360, 1997.
- 42
- 43 CUDMORE, S.L.; DELGATY, K.L ; HAYWARD-MCCLELLAND, S. F.;  
44 PETRIN, D. P.; GARBER, G.E. Treatment of Infections Caused by  
45 Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis*. **Clinical Microbiology**  
46 **Reviews**. Vol. 17, No. 4, p. 783–793, 2004.

- 1 CUNHA, R.L.O.R.; GOUVEA, I.E.; JULIANO, L. A glimpse on biological  
2 activities of tellurium compounds. **An Acad Bras Cienc**, v. 81, p. 393–407,  
3 2009.
- 4
- 5 CUNICO, W.; CARVALHO, S. A.; GOMES, C. R.; & MARQUES, G. H.  
6 Fármacos antimalariais - História e perspectivas. *Rev. Bras. Farm*, v. 89, n. 1,  
7 p. 49-55, 2008).
- 8
- 9 CU-UVIN, S.; KO, H.; JAMIESON, D. J.; et al. Prevalence, incidence, and  
10 persistence or recurrence of trichomoniasis among human immunodeficiency  
11 virus (HIV)-positive women and among HIV-negative women at high risk for HIV  
12 infection. **Clin Infect Dis**, v.34, p. 1406–11, 2002.
- 13
- 14 DI PIETRO, O., VICENTE-GARCÍA, E., TAYLOR, M. C., BERENGUER, D.,  
15 VIAYNA, E., LANZONI, A., SOLA, I., SAYAGO, H., RIERA, C., FISA, R.,  
16 CLOS., M. V., PÉREZ, B., KELLY, J. M., LAVILLA, R., MUNOZ-TORRERO, D.  
17 Multicomponent reaction-based synthesis and biological evaluation of tricyclic  
18 heterofused quinolines with multi-trypanosomatid activity. **European Journal of**  
19 **Medicinal Chemistry**, v. 105, p. 120-137, 2015.
- 20
- 21 DOBROWOLSKI, J.W.; VOHORA, S.B.; SHARMA, K. et al. Antibacterial,  
22 antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis  
23 bee products. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 35, p. 77-82, 1991.
- 24
- 25 DOMEIKA, M.; ZHURAUSSKAYA, L.; SAVICHEVA, A.; FRIGO, N.;  
26 SOKOLOVSKIY, E.; HALLEN, A.; UNEMO, M.; BALLARD, R. C. Guidelines for  
27 the laboratory diagnosis of trichomoniasis in East European countries. **J Eur**  
28 **Acad Dermatol Venereol**, v. 24, n. 10, p.1125-1134, 2010.
- 29
- 30 DOREY, G., LOCKHART, B., LESTAGE, P., CASARA, P. New quinolinic  
31 derivatives as centrally active antioxidants, **Bioorgan. Med. Chem. Lett.**, v. 10,  
32 p. 935–939, 2000.
- 33
- 34 FERRETTI, M. D., NETO, A. T., MOREL, A. F., KAUFMAN, T. S., LARGHI, E.  
35 L. Synthesis of symmetrically substituted 3,3—dibenzyl-4-hydroxy-3,4dihydro-  
36 1H-quinolin-2-ones, as novel quinoline derivatives with antibacterial activity.  
37 **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 81, p. 253-266, 2014.
- 38
- 39 FICHOROVA, R. N.; LEE, Y.; YAMAMOTO, H.S.; TAKAGI, Y.; HAYES, G. R.;  
40 GOODMAN, R. P.; CHEPA-LOTREA, X.; BUCK, O. R.; MURRAY, R.; KULA,  
41 T.; BEACH, D. H.; SINGH, B. N.; NIBERT, M. L. Endobiont viruses sensed by  
42 the human host - beyond conventional antiparasitic therapy. **PloS one**, v. 7, n.  
43 11, p. e48418, 2012.
- 44
- 45 FISCHER, G.; HÜBNER, S.O.; VARGAS, G.D.; VIDOR, T. Imunomodulação  
46 pela própolis. **Arq. Inst. Biol.**, v. 75, n. 2, p. 247-253, 2008.
- 47

- 1 FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA, EUA). Drug Approvals and Data  
2 bases. Disponível em:  
3 <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm>>. Acesso  
4 em: 17 maio 2017.
- 5
- 6 FORNA, F.; GULMEZOGLU, A. M. Interventions for treating trichomoniasis in  
7 women. **Cochrane Database Syst Rev** , v. 2, p. Cd000218, 2003.
- 8
- 9 FREIRES, I.A.; de ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. A pharmacological  
10 perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds  
11 against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.110,  
12 p. 267-279, 2016.
- 13
- 14 FREITAS, S.F.; SHINOHARAA, L.; SFORCIN, J.M. et al. In vitro effects of  
15 propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. **Phytomedicine**, v.13, p. 170–175,  
16 2006.
- 17
- 18 FROZZA, C.O.D.S.; GARCIA, C.S.C.; GAMBATO, G. et al. Chemical  
19 characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis.  
20 **Food Chem. Toxicol.**,v. 52, p. 137–42, 2013.
- 21
- 22 GARCIA, Ana F. et al. Iron and contact with host cells induce expression of  
23 adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. **Molecular microbiology**, v. 47,  
24 n. 5, p. 1207-1224, 2003.
- 25
- 26 GIMENES, F.; SOUZA, R. P.; BENTO, J. C.; TEIXEIRA, J. J. ; MARIA-  
27 ENGLER, S. S.; BONINI. M. G.; CONSOLARO, M. E. Male infertility: a public  
28 health issue caused by sexually transmitted pathogens. **Nat Rev Urol** , v. 11, n.  
29 12, p. 672- 687, 2014.
- 30
- 31 GOLDMAN, Linda M. et al. Treatment of metronidazole-resistant *Trichomonas*  
32 *vaginalis*. **Sexual health**, v. 6, n. 4, p. 345-347, 2009.
- 33
- 34 GÓMEZ-BARRIO, A. et al. Biological variability in clinical isolates of  
35 *Trichomonas vaginalis*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 6, p.  
36 893–896, 2002.
- 37
- 38 GRODSTEIN, F.; GOLDMAN, M. B.; CRAMER, D. W. Relation of tubal infertility  
39 to history of sexually transmitted diseases. **American journal of**  
40 **epidemiology**, v. 137, n. 5, p. 577–84, 1993.
- 41
- 42 HOLLANDS, I., MIYARES, C., SIGARROA, A. et al. Accion del propoleo sobre  
43 la intensidad de parasitacion en conejos afectados por eimerias intestinales.  
44 **Rev. Cubana. Cienc. Vet.** , v. 15, p. 157–163, 1984.
- 45
- 46 HONIGBERG, B.; KING, V. M. Structure of *Trichomonas vaginalis* Donne. **J.**  
47 **Parasitol**, v. 50, p. 345–364. 1964.



- 1 KISSINGER, P.; MENA, L.; LEVISON, J. ; CLARK, R. A. ; GATSKI, M.;  
2 HENDERSON, H.; SCHMIDT, N.; ROSENTHAL, S. L.; MYERS, L.; MARTIN, D.  
3 H. A randomized treatment trial: single versus 7-day dose of metronidazole for  
4 the treatment of *Trichomonas vaginalis* among HIV-infected women. **J Acquir**  
5 **Immune Defic Syndr**, v. 55, n. 5, p. 565-571, 2010.
- 6  
7 KLEBANOFF, J. C. CAREY, J. C. HAUTH et al., "Failure of metronidazole to  
8 prevent preterm delivery among pregnant women with asymptomatic  
9 *Trichomonas vaginalis* infection" .**The New England Journal of Medicine**, v.  
10 345, n. 7, p. 487–493, 2001.
- 11  
12 KUMMER, S. et al. Induction of human host cell apoptosis by *Trichomonas*  
13 *vaginalis* cysteine proteases is modulated by parasite exposure to  
14 iron. **Microbial pathogenesis**, v. 44, n. 3, p. 197-203, 2008.
- 15  
16 KULDA, J. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. **Int J**  
17 **Parasitol**, v. 29, n. 2, p. 199-212, 1999.
- 18  
19 LEHKER, M. W.; ALDERETE, J. F. Biology of trichomonosis. **Curr Opin Infect**  
20 **Dis**, v.13, n. 1, p. 37-45, 2000.
- 21  
22 LEITSCH, D.; KOLARICH, D.; BINDER, M.; STADLMANN, J.; ALTMANN, F.;  
23 DUCHENE, M. *Trichomonas vaginalis*: metronidazole and other nitroimidazole  
24 drugs are reduced by the flavin enzyme thioredoxin reductase and disrupt the  
25 cellular redox system. Implications for nitroimidazole toxicity and resistance.  
26 **Mol Microbiol**, v. 72, n. 2, p. 518-536, 2009.
- 27  
28 LEITSCH, D.; KOLARICH, D.; DUCHENE, M. The flavin inhibitor  
29 diphenyleneiodonium renders *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole,  
30 inhibits thioredoxin reductase and flavin reductase, and shuts off  
31 hydrogenosomal enzymatic pathways. **Mol Biochem Parasitol**, v. 171, n. 1, p.  
32 17-24, 2010.
- 33  
34 LEITSCH, D.; JANSSEN, B. D.; KOLARICH, D.; JOHNSON, P. J.; DUCHENE,  
35 M. *Trichomonas vaginalis* flavin reductase 1 and its role in metronidazole  
36 resistance. **Mol Microbiol**, v. 91, n.1, p. 198-208, 2014.
- 37  
38 LEITSCH, D. Recent Advances in the *Trichomonas vaginalis* Field. **F1000**  
39 **Research**, v. 5, p. 1–7, 2016
- 40  
41 LÓPEZ, L. B. et al. Strategies by which some pathogenic trichomonads  
42 integrate diverse signals in the decision-making process. **Anais da Academia**  
43 **Brasileira de Ciências**, v. 72, n. 2, p. 173–186, 2000.
- 44  
45 LUMSDEN, W. H. et al. Treatment failure in *Trichomonas vaginalis*  
46 vaginitis. **Genitourinary medicine**, v. 64, n. 4, p. 217, 1988.

- 1 MACK, S. R.; MÜLLER, M. End products of carbohydrate metabolism in  
2 *Trichomonas vaginalis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 67, n.  
3 2, p. 213-216, 1980.
- 4
- 5 MALUF, S.E.C., MELO, P.M.S., VAROTTI, F.P., GAZARINI, M.L., CUNHA,  
6 R.L.O.R, CARMONA, A.K. Hypervalent organotellurium compounds as  
7 inhibitors of *P. falciparum* calcium-dependent cysteine proteases. **Parasitology**  
8 **International**, v. 65, p. 20–22, 2016.
- 9
- 10 MANSKE, R.H. The Chemistry of Quinlines. **Chemical Reviews**, v. 30, p.113-  
11 144, 1942.
- 12
- 13 MAO, J., YUAN, H., WANG, Y., WAN, B., PIERONI, M., HUANG, Q., ... &  
14 FRANZBLAU, S. G. From serendipity to rational antituberculosis drug discovery  
15 of mefloquine-isoxazole carboxylic acid esters. **Journal of medicinal**  
16 **chemistry**, v. 52, n. 22, p. 6966-6978, 2009.
- 17
- 18 MARCUCCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes  
19 químicos da própolis. **Quim. Nova**, v. 19, p. 529-536, 1996
- 20
- 21 MASOOD, M. M., HASAN, P., TABREZ, S., AHMAD, M. D., YADAVA, U.,  
22 DANILIU, C. G., SONAWANE, Y. A., AZAM, A., RUB, A., ABID, M. Anti-  
23 leishmanial and cytotoxic activities of amino acid-triazole hybrids: Synthesis,  
24 biological evaluation, molecular docking and *in silico* physico-chemical  
25 properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 2017.
- 26
- 27 MCCLELLAND, R. S.; SANGARE, L.; HASSAN, W. M. ; LAVREYS, L.;  
28 MANDALIYA, K.; KIARIE, J.; NDINYA-ACHOLA, J.; JAOKO, W.; BAETEN, J.M.  
29 Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. **J**  
30 **Infect Dis**, v. 195, n. 5, p. 698-702, 2007.
- 31
- 32 MEITES, E. Trichomoniasis: the "neglected" sexually transmitted disease.  
33 **Infect Dis Clin North Am**, v. 27, n. 4, p.755-764, 2013.
- 34
- 35 MELO, J., DONNICI, C. L., AUGUSTI, R., FERREIRA, V. F., SOUZA, M.,  
36 FERREIRA, M. Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de  
37 preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Química Nova**, v. 29, p.  
38 569-579, 2006.
- 39
- 40 MENEZES, C.B.; FRASSON, A.P.,TASCA, T. Trichomoniasis - are we giving  
41 the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted  
42 disease worldwide? **Microb Cell**, v. 3, n. 9, p. 404–419. 2016
- 43
- 44 MIYARES, C., HOLLANDS, I., CASTANEDA, C. Ensayo terapeutico con un  
45 preparado a base de propoleo "propolisina" em la giardiasis del humano. **Acta**  
46 **Gastroenterol. Latinoam**, v. 18, p. 195–201, 1988
- 47

- 1 MULLER, M. Energy metabolism of protozoa without mitochondria. **Annu Rev**  
2 **Microbiol**, v. 42, p. 465-88, 1988.
- 3
- 4 MULLIÉ, C., JONET, A., DESGROUAS, C., TAUDON, N., SONNET, P.  
5 Differences in anti-malarial activity of 4-aminoalcohol quinoline enantiomers and  
6 investigation of the presumed underlying mechanism of action. **Malaria**  
7 **Journal**, v. 11, n. 1, p. 65-71, 2012.
- 8 MURALEEDHARAN, K. M., & AVERY, M. A. Advances in the discovery of new  
9 antimalarials. **Compr. Med. Chem. II**, v. 7, p. 765-814, 2007.
- 10
- 11 MUSIOL, R., JAMPILEK, J., BUCHTA, V., SILVA, L., NIEDBALA, H.,  
12 PODESZWA, B., ... & POLANSKI, J. Antifungal properties of new series of  
13 quinoline derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 14, p.3592-3598,  
14 2006
- 15
- 16 NEWMAN, D. J.; CRAGGG, M. Natural products as sources of new drugs over  
17 the 30 years from 1981 to 2010. **J Nat Prod** , v. 75, p. 311–335, 2012.
- 18
- 19 NEWMAN, D. J.; CRAGGG, M. Natural Products as Sources of New Drugs  
20 from 1981 to 2014. **J. Nat. Prod.**, v. 79, p. 629–661, 2016.
- 21
- 22 NGO, L. T.; OKOGUN, J. I.; FOLK, W. R. 21st century natural product research  
23 and drug development and traditional medicines. **Nat Prod Rep** , v. 30, p. 584–  
24 592. (2013)
- 25
- 26 NOBRE, P. C., BORGES, E. L., SILVA, C. M., CASARIL, A. M., MARTINEZ, D.  
27 B., LENARDÃO, E. J., ALVES, D., SAVEGNAGO, L., PERIN, G.  
28 Organochalcogen compounds from glycerol: Synthesis of new antioxidants,  
29 **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.22, p.6242-6249, 2014
- 30
- 31 NOGUEIRA, C. W., ZENI, G., ROCHA, J. B. T. Organoselenium and  
32 organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. *Chemical Reviews*,  
33 v. 104, n. 12, p. 6255–6285, 2004.
- 34
- 35 OMAR, R.M. K., IGOLI, J., GRAY, A. I. et al. Chemical characterisation of  
36 Nigerian red propolis and its biological activity against *Trypanosoma Brucei*.  
37 **Phytochem. Anal**, v. 27, p. 107–115, 2016.
- 38
- 39 PAL, D.; BANERJEE, S.; CUI, J.; SCHWARTZ, A.; GHOSH, S.K.;  
40 SAMUELSON, J. Giardia, Entamoeba, and Trichomonas enzymes activate  
41 metronidazole (nitroreductases) and inactivate metronidazole (nitroimidazole  
42 reductases). **Antimicrob Agents Chemother**. v. 53, n. 2, p. 458-464, 2009.
- 43
- 44 PARK, Y.K, IKEGAKI, M., ABREU, J.A.S. et al. Estudo da preparação dos  
45 extratos de própolis e suas aplicações. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. v. 18, n. 3, p.  
46 313-8, 1998.
- 47

- 1 PAULISH-MILLER, T. E.; AUGOSTINI, P.; SCHUYLER, J. A.; SMITH, W. L.;  
2 MORDECHAI, E.; ADELSON, M. E.; GYGAX, S. E.; SECOR, W. E.; HILBERT,  
3 D. W. *Trichomonas vaginalis* metronidazole resistance is associated with single  
4 nucleotide polymorphisms in the nitroreductase genes ntr4Tv and ntr6Tv.  
5 **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 5, p. 2938-2943, 2014.
- 6  
7 PEARLMAN, M. D.; YASHAR, C.; ERNST, S.; SOLOMON, W. An incremental  
8 dosing protocol for women with severe vaginal trichomoniasis and adverse  
9 reaction to metronidazole. **Am J Obstet Gynecol** , v.174, n. 3, p. 934-936,  
10 1996.
- 11  
12 PEREZ, E.S., BOTELL, M.L., STUART, O.P. et al. Vaginal parasites and acute  
13 cervicitis: local treatment with propolis. Preliminary report. **Rev. Cubana. Enfer.**  
14 v. 11, p. 51–56, 1995.
- 15  
16 PETRIN, D. et al. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*.  
17 **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 2, p. 300-17, 1998.
- 18  
19 PIMENTEL, I.S.A., PALADI, C.S., KATZ, S., JÚDICE, W.A.S., CUNHA,  
20 R.L.O.R., BARBIÉRI, C.L. In Vitro and In Vivo Activity of an Organic Tellurium  
21 Compound on *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **PLOS ONE**, v.7, n. 11, p.  
22 e48780, 2012.
- 23  
24 POOLE, D. N.; MCCLELLAND, R. S. Global epidemiology of *Trichomonas*  
25 *vaginalis*. **Sex Transm Infect**, v. 89, n. 6, p. 418-22, 2013.
- 26  
27 QUINLIVAN, E. B.; PATEL, S. N.; GRODENSKY, C. A.; GOLIN, C. E.; TIEN, H.  
28 C.; HOBBS, M. M. Modeling the impact of *Trichomonas vaginalis* infection on  
29 HIV transmission in HIV-infected individuals in medical care. **Sex Transm Dis** ,  
30 v. 39, n. 9, p. 671-677, 2012.
- 31  
32 SCANSETTI, G. Exposure to metals that have recently come into use. **Science**  
33 **of the total environment**, v. 120, n. 1-2, p. 85-91, 1992
- 34  
35 SECOR, W. E.; MEITES, E.; STARR, M. C.; WORKOWSKI, K. A. Neglected  
36 parasitic infections in the United States: trichomoniasis. **The American Journal**  
37 **of Tropical Medicine and Hygiene**, v.90, n.5, p.800-804, 2014.
- 38  
39 SHEEHY, O.; SANTOS, F.; FERREIRA, E.; BERARD, A. The use of  
40 metronidazole during pregnancy: a review of evidence. **Curr Drug Saf** , v. 10,  
41 n. 2, p. 170-179, 2015.
- 42  
43 SCHWEBKE, J. R.; HOBBS, M. M.; TAYLOR, S. N.; SENA, A. C.; CATANIA, M.  
44 G.; WEINBAUM, B. S.; JOHNSON, A. D.; GETMAN, D. K.; GAYDOS, C. A.  
45 Molecular testing for *Trichomonas vaginalis* in women: results from a  
46 prospective U.S. clinical trial. **J Clin Microbiol** , v. 49, n. 12, p. 4106-4111,  
47 2011.
- 48

- 1 SCHWEBKE, J. R.; BURGESS, D. Trichomoniasis. **Clin Microbiol Rev**, v. 17,  
2 n. 4, p. 794-803, 2004.
- 3
- 4 SFORCIN, J.M. Propolis and the immune system: a review. **J.**  
5 **Ethnopharmacol**, v. 113, p. 1-14, 2007.
- 6
- 7 SFORCIN, J.M., BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the  
8 development of new drugs? **J. Ethnopharmacol**, v. 133, p. 253-260, 2011.
- 9 SILVER, B. J.; GUY, R. J.; KALDOR, J. M.; JAMIL, M. S.; RUMBOLD, A. R.  
10 *Trichomonas vaginalis* as a cause of perinatal morbidity: a systematic review  
11 and meta-analysis. **Sex Transm Dis**, v. 41, n. 6, p. 369-376, 2014.
- 12
- 13 SORVILLO, F.; SMITH, L.; KERNDT, P.; ASH, L. *Trichomonas vaginalis*, HIV,  
14 and African-Americans. **Emerg Infect Dis**, v. 7, n. 6, p. 927-932, 2001.
- 15
- 16 SPARKS, J. M. Vaginitis. **J Reprod Med**, v. 36, n. 10, p. 745-752, 1991.
- 17
- 18 SPENCE, M. R.; HARWELL, T. S.; DAVIES, M. C.; SMITH, J. L. The minimum  
19 single oral metronidazole dose for treating trichomoniasis: a randomized,  
20 blinded study. **Obstet Gynecol**, v. 89 (5 Pt 1), p. 699-703, 1997.
- 21
- 22 SREDNI, B. Immunomodulating tellurium compounds as anti-cancer, *Semin*  
23 *Cancer Biol.*, v. 22, n. 1, p. 60-9, 2012.
- 24
- 25 STARZYK, J., SCHELLER, S., SZAFIARSKI, J. et al. Biological properties and  
26 clinical application of propolis. II. Studies on the on the antiprotozoan activity of  
27 ethanol extract of propolis. **Arzneimittel-Forschung**, v. 27, p. 1198-1199,  
28 1977.
- 29
- 30 SUTCLIFFE, S.; NEWMAN, S. B.; HARDICK, A.; GAYDOS, C. A. Prevalence  
31 and correlates of *Trichomonas vaginalis* infection among female US federal  
32 prison inmates. **Sex Transm Dis**, v. 37, p. 585-90, 2010.
- 33
- 34 SUTCLIFFE, S.; NEACE, C.; MAGNUSON, N. S.; REEVES, R.; ALDERETE, J.  
35 F. Trichomonosis, a common curable STI, and prostate carcinogenesis – a  
36 proposed molecular mechanism. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 8, p. e1002801, 2012.
- 37
- 38 SUTTON, M.; STERNBERG, M.; KOUMANS, E. H.; MCQUILLAN, G.;  
39 BERMAN, S.; MARKOWITZ, L. The prevalence of *Trichomonas vaginalis*  
40 infection among reproductive-age women in the United States, 2001-2004.  
41 **Clinical Infectious Dis**, v. 45, n. 10, p. 1319-1326, 2007.
- 42
- 43 SWYGARD, H.; SENA, A. C.; HOBBS, M. M.; COHEN, M. S. Trichomoniasis:  
44 clinical manifestations, diagnosis and management. **Sex Transm Infect**, v. 80,  
45 n. 2, p. 91-95, 2004.
- 46

- 1 TIDWELL, B. H.; LUSHBAUGH, W. B.; LAUGHLIN, M. D.; CLEARY, J. D.;  
2 FINLEY, R. W. A double-blind placebo-controlled trial of single-dose  
3 intravaginal versus single-dose oral metronidazole in the treatment of  
4 trichomonal vaginitis. **J Infect Dis**, v. 170, n. 1, p. 242-246, 1994.
- 5  
6 TIEKINK, E.R. Therapeutic potential of selenium and tellurium compounds:  
7 Opportunities yet unrealised. **Dalton Trans**, v. 41, p. 6390–6395, 2012.
- 8  
9 TON NU, P.A.; NGUYEN, V. Q.; CAO, N. T.; DESSI, D.; RAPPELLI, P.; FIORI,  
10 P. L. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection in symptomatic and  
11 asymptomatic women in Central Vietnam. **J Infect Dev Ctries**, v. 9, n. 6, p.  
12 655-660, 2015.
- 13  
14 TORRES-ROMERO, J. C.; ARROYO, R. Responsiveness of *Trichomonas*  
15 *vaginalis* to iron concentrations: Evidence for a post-transcriptional iron  
16 regulation by an IRE/IRP-like system. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9,  
17 n. 6, p. 1065–1074, 2009.
- 18  
19 TREMAROLI, V., FEDI, S., ZANNONI, D. Evidence for a tellurite dependent  
20 generation of reactive oxygen species and absence of a tellurite mediated  
21 adaptive response to oxidative stress in cells of *Pseudomonas*  
22 *pseudoalcaligenes* KF707. **Arch Microbiol**, v.187, p. 127–135, 2007.
- 23  
24 UPCROFT, P.; UPCROFT, J. A. Drug Targets and Mechanisms of Resistance  
25 in the Anaerobic Protozoa Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the  
26 Anaerobic Protozoa. **Clin Microbiol Rev**, v. 14, n. 1, p. 150–164, 2001.
- 27  
28 URIG, S., BECKER K. On the potential of thioredoxin reductase inhibitors for  
29 cancer therapy. **Seminars Cancer Biol**, v. 16, p. 452–465, 2006.
- 30  
31 VAN DER POL, B.; KWOK, C.; PIERRE-LOUIS, B.; RINALDI, A.; SALATA, R.  
32 A.; CHEN, P. L.; VAN DE WIJGERT, J.; MMIRO, F.; MUGERWA, R.;  
33 CHIPATO, T.; MORRISON, C. S. *Trichomonas vaginalis* infection and human  
34 immunodeficiency virus acquisition in African women. **J Infect Dis**, v. 197, n. 4,  
35 p. 548-554, 2008.
- 36  
37 VAN VLEET, J. F., FERRANS, V. J. Myocardial ultrastructural alterations in  
38 ducklings fed tellurium. **American journal of veterinary research**, v. 43, n. 11,  
39 p. 2000-2009, 1982.
- 40  
41 VIEIRA, P. DE B. et al. Mecanismos específicos de patogenicidade de  
42 protozoários de mucosa. **Clinical & Biomedical Research**, v. 32, n. 1, p. 58–  
43 70, 2012.
- 44  
45 VIEIRA, P. B.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J.; TASCA, T. Natural and  
46 synthetic compound anti-*Trichomonas vaginalis*: an update review. **Parasitol**  
47 **Res**, v. 114, n. 4, p.1249-1261, 2015.
- 48

- 1 VIIKKI, M., PUKKALA, E., NIEMINEN, P., HAKAMA, M. Gynaecological  
2 infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. **Acta**  
3 **Oncologica**. v.39, p.71–75, 2000.  
4
- 5 ZHANG, Z. F.; BEGG, C. B. Is trichomonas vaginalis a cause of cervical  
6 neoplasia? results from a combined analysis of 24 studies. **International**  
7 **Journal of Epidemiology**, v. 23, n. 4, p. 682–690, 1994.  
8
- 9 ZENI, G., LUDTKE, D., PANATIERI, R.B, BRAGA, A.L. Vinylic tellurides: from  
10 preparation to their applicability in organic synthesis. **Chemical reviews**, v. 106,  
11 n. 3, p. 1032-1076, 2006  
12
- 13 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global Prevalence and Incidence of  
14 Selected Curable Sexually Transmitted Infections: 2008: World Health  
15 Organization, Department of Reproductive Health and Research, 2012 ISBN  
16 978 92 4 150383 9. Reproductive health matters, v.20, n.40, p.207-209, 2012.  
17
- 18 WIESLANDER, E., ENGMAN, L., SVENSJO, E., ERLANSSON, M.,  
19 JOHANSSON, U., LINDEN, M., ANDERSSON, C.M., BRATTSAND, R.  
20 Antioxidative properties of organotellurium compounds in cell systems.  
21 **Biochem Pharmacol**,v. 55, p. 573–584, 1998).  
22
- 23 WILHEM, E. A., MACHADO, N. C., PEDROSO, A. B., GOLDANI, B. S., SEUS,  
24 N., MOURA, S., ... & ALVES, D. Organocatalytic synthesis and evaluation of 7-  
25 chloroquinoline-1,2,3-triazoyl carboxamides as potential antinociceptive, anti-  
26 inflammatory and anticonvulsant agent. **RSC Adv.**, v. 4, p.41437-41445, 2014.  
27
- 28 WORKOWSKI, K. A.; BOLAN, G. A. Sexually transmitted diseases treatment  
29 guidelines, 2015. **MMWR Recommen Rep**, v. 64 (Rr-03), p. 1-137, 2015.  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36

# Anexos



**Anexo A - Artigo Publicado na revista Biomedicine & Pharmacotherapy:  
Antiparasitic activity of 1,3-dioxolanes containing tellurium in *Trichomonas  
vaginalis***



Available online at  
**ScienceDirect**  
[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Elsevier Masson France  
**EM|consulte**  
[www.em-consulte.com/en](http://www.em-consulte.com/en)



## Antiparasitic activity of 1,3-dioxolanes containing tellurium in *Trichomonas vaginalis*



Ângela Sena-Lopes<sup>a,\*</sup>, Raquel Nascimento das Neves<sup>a</sup>,  
 Francisco Silvestre Brilhante Bezerra<sup>a</sup>, Mara Thais de Oliveira Silva<sup>a</sup>, Patrick C. Nobre<sup>b</sup>,  
 Gelson Perin<sup>b</sup>, Diego Alves<sup>b</sup>, Lucielli Savegnago<sup>c</sup>, Karine Rech Begnini<sup>d</sup>,  
 Fabiana Kommling Seixas<sup>d</sup>, Tiago Collares<sup>d</sup>, Sibeles Borsuk<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Biotecnologia Infecto-parasitária, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia, UFPel, Pelotas, RS 96010-900, Brazil

<sup>b</sup> LASOL—CCQFA, Universidade Federal de Pelotas—UFPel, P.O. Box 354, Pelotas, RS 96010-900, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Neurobiotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia, UFPel, Pelotas, RS 96010-900, Brazil

<sup>d</sup> Laboratório de Biotecnologia do Câncer, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia, UFPel, Pelotas, RS 96010-900, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 November 2016

Received in revised form 11 January 2017

Accepted 16 January 2017

#### Keywords:

*Trichomonas vaginalis*

Organic tellurium

Antiparasitic

### ABSTRACT

The increased prevalence of metronidazole-resistant infections has resulted in a search for alternative drugs for the treatment of trichomoniasis. In the present study, we report the preparation and *in vitro* activity of three 1,3-dioxolanes that contain tellurium (PTeDOX 01, PTeDOX 02, and PTeDOX 03) against *Trichomonas vaginalis*. Six concentrations of these compounds were analyzed for *in vitro* activity against ATCC 30236 isolate of *T. vaginalis*. PTeDOX 01 reported a cytotoxic effect against 100% of *T. vaginalis* trophozoites at a final concentration of 90  $\mu$ M with an IC<sub>50</sub> of 60  $\mu$ M. The kinetic growth curve of trophozoites indicated that PTeDOX 01 reduced the growth by 22% at a concentration of 90  $\mu$ M after an exposure of 12 h, and induced complete parasite death at 24 h. It induced cytotoxicity of 44% at 90  $\mu$ M concentration but had no effect in lower concentrations in a culture of CHO-K1 cells. These results confirmed that PTeDOX 01 is an important drug for the treatment of *T. vaginalis*, and should be evaluated in other infectious agents as well.

© 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Trichomonas vaginalis* is a protozoan infecting genitourinary tract and causing the most common non-viral, sexually transmitted disease (STD) in the world. According to World Health Organization [1], an estimated 276 million cases of trichomoniasis have been reported worldwide, most of them occurring in women.

The drugs of choice for treating trichomoniasis are derived from 5-nitroimidazoles, metronidazole, and tinidazole, all of which are approved by Food and Drug Administration [2]. Metronidazole is a prodrug, its 5-nitro group is reduced in the parasite by reductases resulting in the production of cytotoxic nitro radical intermediates. These radicals act by disrupting the DNA strands leading to the death of the parasite [3]. Although the cure rates are significant, treatment failures may be observed and are attributed mainly to

non-compliance with treatment or reinfection, but factors such as poor drug absorption or insufficient bioavailability are also reported [4].

However, the major cause of treatment failure is the development of resistant isolates of *T. vaginalis* to the drugs in use [5]. In this context, an intensive search for new molecules as potential drugs with antiparasitic activity for the treatment of trichomoniasis is required. Here, we highlight the organic compounds containing tellurium as possible drugs for the treatment of trichomoniasis. Pharmacological uses of these organic compounds have been studied including immunomodulatory properties and therefore they may be utilized as antitumor, anti-inflammatory, antiviral, and antiparasitic drugs [6,7]. Thus, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* anti-*T. vaginalis* activity of three 1,3-dioxolanes that contain tellurium (PTeDOX).

\* Corresponding author.

E-mail address: [angelasena@gmail.com](mailto:angelasena@gmail.com) (Â. Sena-Lopes).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

The activity of 1,3-dioxolanes containing tellurium (PTeDOX) diluted in dimethylsulfoxide (DMSO) was analyzed in *T. vaginalis*. For this, we selected three compounds: PTeDOX 01, PTeDOX 02, and PTeDOX 03 (Fig. 1).

The 1,3-dioxolanes containing tellurium (PTeDOX) were prepared using a method previously described [8]. To a solution of ditelluride **2** (0.3 mmol) in polyethylene glycol (PEG 400) (3 mL) under N<sub>2</sub> atmosphere, NaBH<sub>4</sub> (0.023 g, 0.6 mmol) was added at room temperature and stirred for 30 min. Then, tosylate **1** (0.5 mmol) was added, and the temperature was slowly raised to 50 °C. The progress of the reaction was followed by thin-layer chromatography (TLC). After 5–6 h, the reaction mixture was washed with a solution of hexane/ethyl acetate in a ratio of 98:2 (3 × 3 mL). The upper organic phases were separated from PEG, dried with magnesium sulfate (MgSO<sub>4</sub>), and the solvent was evaporated under reduced pressure. The product was isolated by column chromatography using silica gel 60A (0.060–0.200 mm) and hexane or hexane/ethyl acetate as an eluent. The corresponding PTeDOX compounds were isolated in 70–90% yield (Fig. 1).

### 2.2. Parasite culture conditions

In this study, *T. vaginalis* 30236 isolate from American Type Culture Collection (ATCC) was used. Trophozoites were axenically cultured in trypticase-yeast extract-maltose (TYM) medium without agar (pH 6.0), supplemented with 10% sterile bovine serum (inactivated at 56 °C), and incubated at 37 °C [9]. The culture with 95% viability, confirmed through observation of motility, morphology, and trypan blue exclusion (0.4%) assay under the light microscope at 400× magnification was considered alive and utilized for the evaluation of activity of 1,3-dioxolanes.

### 2.3. Anti-Trichomonas vaginalis assay

Three compounds of 1,3-dioxolanes containing tellurium (PTeDOX) were screened *in vitro* for activity against *T. vaginalis* (PTeDOX 01, PTeDOX 02, and PTeDOX 03). All assays were performed in 96-well microtiter plates. The parasites were seeded at an initial density of  $2.6 \times 10^5$  trophozoites/mL of TYM and incubated with PTeDOX drugs. Three controls were carried out: parasites only, vehicle for solubilization of the derivatives (0.6% DMSO), and MTZ 100 μM (as positive control, metronidazole – Sigma-Aldrich). The microculture plates were incubated at 37 °C

with 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. After that, a preparation containing trophozoites and trypan blue (0.4%) at a ratio of 1:1 was counted in a Neubauer chamber and cultures with 95% viability were utilized for assays.

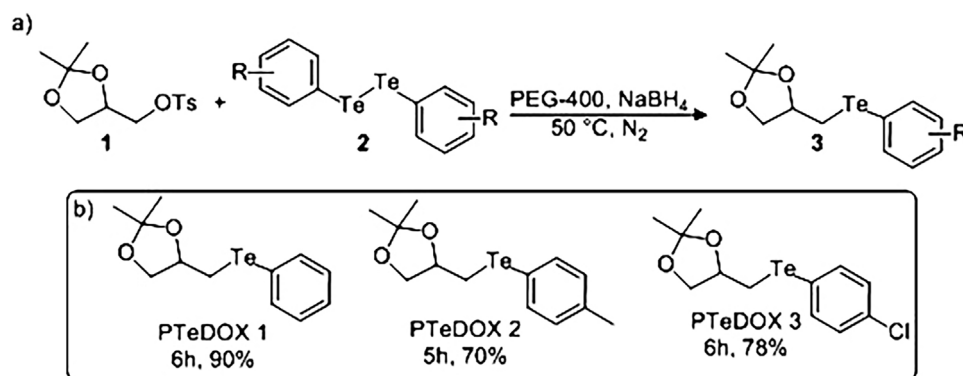
For screening, PTeDOX 01, PTeDOX 02, and PTeDOX 03 were used at a final concentration of 100 μM. Only the compound that reduced the viability of parasites to 100% was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) by considering different concentrations such as 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100 μM. The parasite pellets used to establish MIC and the concentrations below and above as well as controls were inoculated in fresh TYM medium at 37 °C. Parasites were counted in a Neubauer chamber with trypan blue every 24 h for 96 h to confirm MIC. The viability of trophozoites was assessed by exclusion of trypan blue dye, motility, and morphology. The IC<sub>50</sub> was determined (half the maximum inhibitory concentration) at concentrations of 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100 μM as described in the MIC method.

A kinetic growth curve was constructed to obtain a more comparable activity profile of PTeDOX compounds against *T. vaginalis*. The viability of trophozoites was observed under the light microscope at 96 h after incubation at respective MIC. Growth analysis was performed at the following times: 1, 6, 12, 24, 48, 72, and 96 h by trypan blue (0.4%) exclusion method and by determining the motility and morphology. All the assays were performed independently at least three times in triplicate and the results were expressed as the percentage of viable trophozoites in comparison with untreated parasites.

### 2.4. Cytotoxicity assay

Chinese Hamster Ovary (CHO-K1) cells were obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (PABCAM, Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and cultured as a monolayer in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Vitrocell Embriolife), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Vitrocell Embriolife), 1% L-glutamine, and 1% penicillin/streptomycin. The cells were grown at 37 °C in an atmosphere of 95% humidified air and 5% CO<sub>2</sub>.

The proliferation of the CHO-K1 cell line after treatment with drugs was determined by measuring the reduction of soluble 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) to water-insoluble formazan. Cells were seeded at a density of  $2 \times 10^4$  cells per well in a volume of 100 μL in 96-well plates and grown at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 24 h before using them in the cell viability assay. The cells were then treated with PTeDOX 01 at concentrations of 6.25, 12.5, 45, 90, and 180 μM for 24 h. DMSO (vehicle alone) and 100 μM of metronidazole were used as



**Fig. 1.** (a) General scheme for the synthesis of PTeDOX; (b) Chemical structure of synthesized PTeDOX. Reactions are performed in the presence of tosylate **1** (0.5 mmol), ditelluride **2** (0.3 mmol) and NaBH<sub>4</sub> (0.6 mmol) at 50 °C under N<sub>2</sub> atmosphere.

negative and positive controls, respectively. Following incubation, 20  $\mu$ L of MTT (Sigma-Aldrich) was added to each well, and the cells were incubated for an additional 3 h at 37 °C. The differences in the total cellular metabolism were detected at a wavelength of 492 nm using a microplate reader. The inhibition (%) of cell proliferation was determined as follows: inhibitory growth =  $(1 - \text{Abs}_{492} \text{ treated cells} / \text{Abs}_{492} \text{ control cells}) \times 100\%$ . The  $\text{CC}_{50}$  was calculated using GraphPad Prism 5.0 Software. All observations were validated by at least three independent experiments in triplicate.

### 2.5. Statistical analysis

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

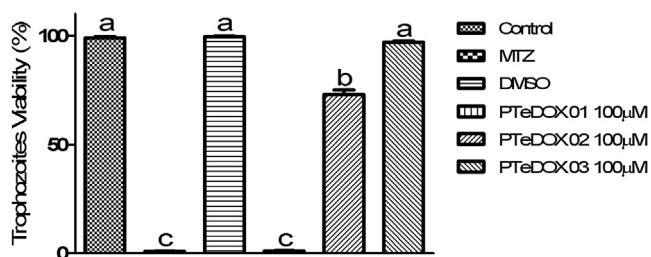
## 3. Results

### 3.1. Anti-Trichomonas vaginalis assay

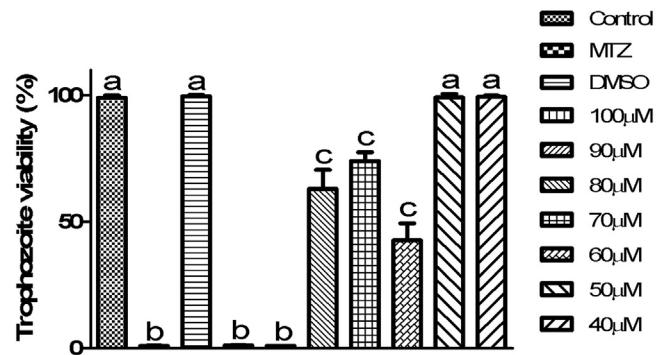
Analysis of the data obtained from the screening of compounds reported that the compound PTeDOX 01 reduced the parasite viability by 100% as compared with the negative control (only trophozoites). The other two compounds, namely PTeDOX 02 and 03 reduced the parasite viability by 73% and 97%, respectively (Fig. 2). As expected, negative controls, only trophozoites and DMSO exhibited positive motility and negative staining with trypan blue (0.4%), whereas the positive control, MTZ, completely reduced the parasite viability. The positive control depicted negative motility and stained blue in all the assays performed after 24 h exposure. Since a 100% reduction in parasite viability was observed with PTeDOX 01, it was selected to perform other tests. PTeDOX 01 demonstrated an optimal anti-*T. vaginalis* activity at a concentration of 90  $\mu$ M, which was confirmed by MIC and  $\text{IC}_{50}$  of 60  $\mu$ M, both at 24 h exposure (Fig. 3).

### 3.2. Kinetic growth analysis

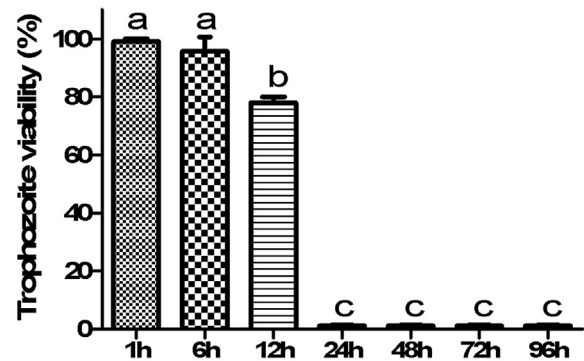
The analysis of kinetic growth curve of trophozoites treated with PTeDOX 01 displayed a reduction in the growth of trophozoites by 22% at a concentration of 90  $\mu$ M after 12 h exposure. In addition, a complete reduction of proliferation of parasite was observed at 24 h (Fig. 4).



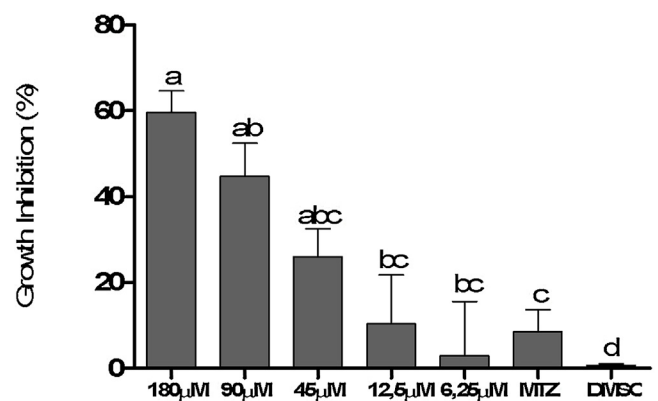
**Fig. 2.** Antiparasitic activity of PTeDox 01, PTeDox 02 and PTeDox 03 at 100  $\mu$ M concentration against *Trichomonas vaginalis* 30236 isolate by trypan blue assay (0.4%) after 24 h of exposure. The trophozoite growth was completely inhibited by PTeDox 01 in 24 h of incubation. Vehicle for solubilization (DMSO 0.6%), metronidazole 100  $\mu$ M (MTZ), control (untreated trophozoites). Data represent means  $\pm$  standard deviation of at least three experiments in triplicate. Different letters show a significant difference. For all  $p < 0.05$ .



**Fig. 3.** Determination of MIC and  $\text{IC}_{50}$  of *Trichomonas vaginalis* 30236 isolate after treatment with PTeDox 01 at 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100  $\mu$ M concentration and 24 h of exposure. The trophozoite growth was completely inhibited by PTeDox 01 in 24 h at 90  $\mu$ M as MIC and 60  $\mu$ M determining  $\text{IC}_{50}$ . Vehicle for solubilization (DMSO 0.6%), metronidazole 100  $\mu$ M (MTZ), control (untreated trophozoites). Data represent means  $\pm$  standard deviation of at least three experiments in triplicate. Different letters show a significant difference. For all  $p < 0.05$ .



**Fig. 4.** Kinetic growth curve of *Trichomonas vaginalis* 30236 isolate after treatment with PTeDox 01 at 90  $\mu$ M and the period of 1, 6, 12, 24, 48, 72, and 96 h. The trophozoite growth was completely inhibited by PTeDox 01 in 24 h of incubation. Data represent means  $\pm$  standard deviation of at least three experiments in triplicate. Different letters show a significant difference. For all  $p < 0.05$ .



**Fig. 5.** Cytotoxicity effect of PTeDox 01 in CHO-K1 cells. Cell proliferation in CHO-K1 was investigated by MTT assay. Data are expressed as means  $\pm$  SEM from three independent experiments. Different letters (a, b, c and d) indicate difference between treatments. The differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

### 3.3. Cytotoxic assay

The MTT assay conducted showed that PTeDOX 01 decreased the cell viability in a time and dose-dependent manner. However, a significant cell growth inhibition was observed in CHO-K1 cells

after treatment with high doses (180  $\mu\text{M}$ ) of PTeDOX 01, which inhibited more than 50% of growth. The  $\text{CC}_{50}$  value of PTeDOX 01 in CHO-K1 cells at 24 h was 99.12  $\mu\text{M}$  (Fig. 5). Metronidazole (MTZ), reported a cell growth inhibition of 8.5%, which is similar to the cytotoxicity observed for PTeDOX 01 at 6.25, 12.5, and 45  $\mu\text{M}$ . These results suggested that PTeDOX 01 is no more cytotoxic than the commercially available drugs for trichomoniasis.

#### 4. Discussion

The element, tellurium (Te) belongs to the group of chalcogens, which also includes the elements oxygen, sulfur, selenium, and polonium. Tellurium compounds possess several biological properties such as antimicrobial, anthelmintic, antiprotozoal, antioxidant, immunomodulatory, and antitumor [7,10–15].

Herein, we evaluated the *in vitro* anti-*T. vaginalis* activity of three compounds: 1,3-dioxolanes containing tellurium (PTeDOX) (Fig. 1). We observed that only PTeDOX 01 with no extra radical in the structure reduced the viability of trophozoites to 100%. The selective toxicity against *T. vaginalis* is attributed to the fact that many tellurium agents are redox-active leading to a significant level of oxidative stress (OS) and *T. vaginalis* lacks an antioxidant defense. The organotellurium PTeDOX 01 showed antioxidant activity and was more effective in inhibition of induced lipid peroxidation. The authors suggest that PTeDOX 01 is a promising antioxidant and that its activity is influenced by the presence of the tellurium atom on the structure [8].

Studies demonstrated the leishmanicidal effects of an organotellurane (RF07). The drug RF07 exhibited a significant leishmanicidal activity against the intracellular parasite and with a ten-fold less toxicity to macrophages [6]. Also, researchers reported the antimalarial activities of three organotellurane derivatives (RF05, RF07, and RF19) against two *Plasmodium falciparum* strains which demonstrated a significant decrease in parasitemia *in vitro*. None of the compounds tested caused hemolysis or a significant decrease in endothelial cell viability at the concentration used for inhibition assay suggesting that organic tellurium compounds may prove to be promising for the development of antimalarial drugs [7].

The cytotoxicity of the organotelluranes was tested against CHO-K1 cells. It is speculated that the toxicity of tellurium is a consequence of its strong oxidizing properties that lead to the formation of deleterious reactive oxygen species [16]. The chemical and biochemical events surrounding such tellurium compounds and their cytotoxicity are complex and considerably more intricate than originally presumed. Based on recent studies, it is possible that the tellurium-containing compounds in question regulate the activity of specific apoptosis-inducing proteins in cancer cells, and also trigger an antioxidant response in normal cells. Despite the observation of cytotoxic activity of tellurium based organic compounds in this study, it is speculated that if utilized properly, these compounds may selectively act against certain microorganisms [13].

In the case of trichomoniasis, topical application is preferable due to two reasons. Firstly, the organic tellurium compounds are relatively less soluble in water and secondly the topical application allows a higher concentration of drug to reach the vaginal epithelium at lower treatment doses [17]. Altogether, organotelluranes are presumed to be a promising candidate for the topical treatment of trichomoniasis.

#### 5. Conclusions

The investigation of antiparasitic activities of tellurium compounds is still in its early stages. The compound, PTeDOX 01 exhibited a high antiparasitic activity with little cytotoxicity at higher concentrations. Since topical application is preferable for the treatment of trichomoniasis, these compounds may prove to be effective at lower concentrations. The effectiveness of the organotelluranes determined in the present study offers new perspectives for exploring the potential of this class of molecules as an additional option for the treatment of trichomoniasis.

#### Conflicts of interest

All authors declare that they have no conflict of interest.

#### Acknowledgement

Authors thank the Post-Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, UFRGS, in special: T. Tasca (\*) Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90610-000, RS, Brasil.

#### References

- [1] WHO, Global Incidence and Prevalence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections-2008, World Heal Organ., 2012, pp. 1–28.
- [2] FDA-EUA, Drug approvals and databases. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm>.
- [3] J. Kulda, Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance, *Int. J. Parasitol.* 29 (1999) 199–212.
- [4] W.H. Lumsden, D.H. Robertson, R. Heyworth, C. Harrison, Treatment failure in *Trichomonas vaginalis* vaginitis, *Genitourin. Med.* 64 (1988) 217–218.
- [5] P. de B. Vieira, C.L.C. Brandelli, C. de M. Veríssimo, T. Tasca, Mecanismos específicos de patogenicidade de protozoários de mucosa, *Clin. Biomed. Res.* 32 (2012) 58–70.
- [6] I.A. Salerno Pimentel, C. de S. Paladi, S. Katz, W.A. de Souza Júdice, R.L.O.R. Cunha, C.L. Barbiéri, In vitro and in vivo activity of an organic tellurium compound on *Leishmania (Leishmania) chagasi*, *PLoS One* 7 (2012) e48780.
- [7] S. El Chamy Maluf, P.M.S. Melo, F.P. Varotti, M.L. Gazarini, R.L.O.R. Cunha, A.K. Carmona, Hypervalent organotellurium compounds as inhibitors of *P. falciparum* calcium-dependent cysteine proteases, *Parasitol. Int.* 65 (2016) 20–22.
- [8] P.C. Nobre, E.L. Borges, C.M. Silva, A.M. Casaril, D.M. Martinez, E.J. Lenardão, D. Alves, L. Savegnago, G. Perin, Organochalcogen compounds from glycerol: synthesis of new antioxidants, *Bioorg. Med. Chem.* 22 (2014) 6242–6249.
- [9] L.S. Diamond, The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures, *J. Parasitol.* 43 (1957) 488–490.
- [10] E. Wieslander, L. Engman, E. Svensjö, M. Erlansson, U. Johansson, M. Linden, C. M. Andersson, R. Brattsand, Antioxidative properties of organotellurium compounds in cell systems, *Biochem. Pharmacol.* 55 (1998) 573–584.
- [11] S. Urig, K. Becker, On the potential of thioredoxin reductase inhibitors for cancer therapy, *Semin. Cancer Biol.* 16 (2006) 452–465.
- [12] R.L.O.R. Cunha, I.E. Gouvea, L. Juliano, A glimpse on biological activities of tellurium compounds, *An. Acad. Bras. Cienc.* 81 (2009) 393–407.
- [13] L.A. Ba, M. Döring, V. Jamier, C. Jacob, Tellurium: an element with great biological potency and potential, *Org. Biomol. Chem.* 8 (2010) 4203.
- [14] B. Sredni, Immunomodulating tellurium compounds as anti-cancer agents, *Semin. Cancer Biol.* 22 (2012) 60–69.
- [15] E.R.T. Tiekink, Therapeutic potential of selenium and tellurium compounds: opportunities yet unrealised, *Dalton Trans.* 41 (2012) 6390–6395.
- [16] V. Tremaroli, S. Fedi, D. Zannoni, Evidence for a tellurite-dependent generation of reactive oxygen species and absence of a tellurite-mediated adaptive response to oxidative stress in cells of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707, *Arch. Microbiol.* 187 (2007) 127–135.
- [17] B. Wachter, M. Syrowatka, A. Obwaller, J. Walochnik, In vitro efficacy of curcumin on *Trichomonas vaginalis*, *Wien. Klin. Wochenschr.* (2014) S32–S36.

**Anexo B - Artigo Publicado na revista PLOS ONE: Chemical composition, immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil from Brazilian red propolis**



RESEARCH ARTICLE

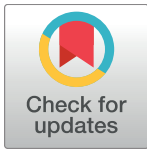
# Chemical composition, immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil from Brazilian red propolis

Ângela Sena-Lopes<sup>1</sup>\*, Francisco Silvestre Brilhante Bezerra<sup>1</sup>\*, Raquel Nascimento das Neves<sup>1</sup>, Rodrigo Barros de Pinho<sup>1</sup>, Mara Thais de Oliveira Silva<sup>1</sup>, Lucielli Savegnago<sup>1</sup>, Tiago Collares<sup>1</sup>, Fabiana Seixas<sup>1</sup>, Karine Begnini<sup>1</sup>, João Antonio Pêgas Henriques<sup>2</sup>, Mariana Roesch Ely<sup>2</sup>, Luciane C. Rufatto<sup>2</sup>, Sidnei Moura<sup>2</sup>, Thiago Barcellos<sup>2</sup>, Francine Padilha<sup>3</sup>, Odir Dellagostin<sup>1</sup>, Sibeles Borsuk<sup>1</sup>\*

**1** Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTEc), Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Campus Capão do Leão, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brazil, **2** Departamento de Tecnologia, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil, **3** Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), Universidade de Tiradente, Aracaju, Sergipe, Brazil

\* These authors contributed equally to this work.

\* [sibeleborsuk@gmail.com](mailto:sibeleborsuk@gmail.com)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Sena-Lopes Â, Bezerra FSB, das Neves RN, de Pinho RB, Silva MTdO, Savegnago L, et al. (2018) Chemical composition, immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil from Brazilian red propolis. PLoS ONE 13(2): e0191797. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191797>

**Editor:** Ing-Feng Chang, National Taiwan University, TAIWAN

**Received:** August 1, 2017

**Accepted:** January 11, 2018

**Published:** February 1, 2018

**Copyright:** © 2018 Sena-Lopes et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper.

**Funding:** This work was supported by Grant #1608/2011 from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) to João Antonio Pêgas Henriques. URL: <http://www.capes.gov.br/>. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Abstract

Most studies of Brazilian red propolis have explored the composition and biological properties of its ethanolic extracts. In this work, we chemically extracted and characterized the essential oil of Brazilian red propolis (EOP) and assessed its adjuvant, antiparasitic and cytotoxic activities. The chemical composition of EOP was analyzed using gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS). EOP was tested for in vitro activity against *Trichomonas vaginalis* (ATCC 30236 isolate); trophozoites were treated with different concentrations of EOP (ranging from 25 to 500 µg/mL) in order to establish the MIC and IC<sub>50</sub> values. A cytotoxicity assay was performed in CHO-K1 cells submitted to different EOP concentrations. BALB/c mice were used to test the adjuvant effect of EOP. The animals were divided in 3 groups and inoculated as follows: 0.4 ng/kg BW EOP (G1); 50 µg of rCP40 protein (G2); or a combination of 0.4 ng/kg BW EOP and 50 µg of rCP40 (G3). Total IgG, IgG1 and IgG2a levels were assessed by ELISA. The major constituent compounds of EOP were methyl eugenol (13.1%), (E)-β-farnesene (2.50%), and δ-amorphene (2.3%). Exposure to EOP inhibited the growth of *T. vaginalis*, with an IC<sub>50</sub> value of 100 µg/mL of EOP. An EOP concentration of 500 µg/mL was able to kill 100% of the *T. vaginalis* trophozoites. The EOP kinetic growth curve showed a 36% decrease in trophozoite growth after a 12 h exposure to 500 µg/mL of EOP, while complete parasite death was induced at 24 h. With regard to CHO-K1 cells, the CC<sub>50</sub> was 266 µg/mL, and 92% cytotoxicity was observed after exposure to 500 µg/mL of EOP. Otherwise, a concentration of 200 µg/mL of EOP was able to reduce parasite proliferation by 70% and was not cytotoxic to CHO-K1 cells. As an adjuvant, a synergistic effect was observed when EOP was combined with the rCP40 protein (G3) in comparison to the administration of each component alone (G1 and G2), resulting in higher concentrations of IgG, IgG1 and IgG2a. EOP is constituted by biologically active components with promising antiparasitic and

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

immunostimulatory activities and can be investigated for the formulation of new vaccines or trichomonacidal drugs.

## Introduction

Currently, the Brazilian propolis is classified in 13 different types, according to its physical-chemical properties, botanical origin and geographic area where propolis can be collected. Initially, Park et al. [1] classified propolis samples from different Brazilian regions in 12 groups. Afterwards, a 13<sup>th</sup> type of propolis with peculiar chemical composition was found in hives located alongside the coast and mangroves in the Brazilian northeast and was called Brazilian red propolis (BRP) [2]. In the last decade, the chemical composition of BRP has been revealed and related to its bioactivities. The main chemical components found in BRP are classified as isoflavones, flavones, flavonols, aurones, chalcones, pterocarpanes and xanthenes groups [3–6]. The botanical origin of BRP was identified as resinous exudates of *Dalbergia ecastophyllum* [7], however, likely a second plant species participates as one of the main sources of resins for BRP [5].

Due to the variety of chemical compounds of BRP incorporated within the resin mixture, especially phenolic compounds, many biological activities have been reported like antioxidant [2,8], antibacterial [9,10], fungicide [11], antiparasitic [10,12], antineoplastic [13,14], anti-caries [15], cytotoxic [2,10], anti-inflammatory [16,17], antinociceptive [18] and was also beneficial to the wound healing process [19].

Several experiments and clinical investigations have shown the antiparasitic and adjuvant properties of the hydroalcoholic extract of propolis (HEP). HEP of different types of propolis showed antiparasitary efficacy against *Giardia lamblia* [20,21], *Toxoplasma gondii* and *Trichomonas vaginalis* [22]. It is important to highlight that *T. vaginalis* is the etiological agent of trichomoniasis, the most common non-viral, sexually transmitted disease (STD) in the world [23]. In addition, metronidazole-resistant *T. vaginalis* has been implicated in an increasing number of refractory cases, which are usually treated with increased doses of the drug, leading to an increase in the occurrence of side effects [24]. Clearly, alternative curative therapies are needed, and propolis emerges as a natural product for alternative drugs.

Moreover, HEP has been used to formulate veterinary vaccines against bacterial or viral diseases, once some phenolic compounds has presented immunomodulatory activity [25–27]. As adjuvant, propolis confers to the vaccinal formulation desirable properties, such as reduced viscosity, good stability, low reactogenicity, low toxicity, and is able to induce a robust humoral and cellular response [26].

As aforementioned, most of the previous studies describing the biological activities of BRP uses ethanol as the extraction solvent, and the extraction method influences directly the yield and selectivity for some compounds [10,28]. Volatile compounds like those found in essential oils are in low concentrations in propolis, but play an important role by contributing to propolis pleasant aroma and its biological activities. Researchers have applied various methods to obtain propolis volatiles such as distillation-extraction or hydrodistillation [29].

On the other hand, studies focusing on essential oils of propolis volatiles are relatively scarce, most of them dealing with antimicrobial properties against fungus, Gram-positive and Gram-negative bacteria [29]. Volatiles of propolis from stingless bees were able to stimulate the immune system of elderly patients by increasing their natural killer cell activity [30]. Essential oils of Chinese propolis inhibited the proliferation of human colorectal cancer cells by



inducing cell cycle arrest and apoptosis [31]. However, to the best of our knowledge, there are no studies describing the chemical composition or the biological activities of the essential oil derived from the Brazilian red propolis (EOP). Herein, the chemical composition of the EOP is showed. Still, *in vitro* trichomonocidal and cytotoxic activities, and the adjuvant action of EOP in a recombinant vaccine are assessed.

## Materials and methods

### Red propolis sample collection and essential oil preparation

Red propolis was collected from the municipality of Brejo Grande, located in the state of Sergipe, in northeastern Brazil (S 10°28'25" and W 36°26'12"). Samples were collected in September 2011 and were maintained frozen at -20 °C until use. For the preparation of the essential oil, conventional hydrodistillation was carried out using a Clevenger-type apparatus. Briefly, 380 g of BRP was transferred to a volumetric flask, and 2 L of distilled water was added. A heating mantle was placed onto the Clevenger apparatus. The essential oil was extracted after boiling the mixture for a time period of one hour. The essential oil obtained was collected in amber vials and stored at 4 °C until use. The total yield obtained was approximately 0.25%.

**Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS).** Chemical composition analysis was performed using a gas chromatograph coupled with a mass-selective detector (Hewlett Packard 6890/MSD5973, Palo Alto, USA) equipped with the HP ChemStation software and the Wiley 275 library. A capillary column composed of HP-INNOWax fused silica (30 m × 250 μm) of 0.50 μm film thickness (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) was used for the study. The temperature program used was as follows: the column temperature started at 40 °C (held for 8 min) and was increased to 180 °C at 3 °C/min and then to 230 °C (held for 20 min) at 20 °C/min; the injector was at a temperature of 250 °C and the interface at 280 °C. The split ratio was 1:100, helium was the carrier gas (56 kPa), the flow rate was 1 mL/min, the ionization energy was 70 eV, and the injected volume was 0.4 mL.

### Anti-*Trichomonas vaginalis* activity assay

The *T. vaginalis* 30236 isolate used for evaluating antiparasitic activity in this study was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Trophozoites were axenically cultured in trypticase-yeast extract-maltose (TYM) medium (without agar; pH = 6.0) supplemented with 10% sterile bovine serum (inactivated at 56 °C) and incubated at 37 °C [32]. Cultures with 95% viability, as confirmed through observation of motility, morphology, and trypan-blue exclusion (0.4%) assay under the light microscope at 400X magnification, were considered as alive and were used for evaluating the activity of EOP.

All assays were performed in 96-well microtiter plates (Cral<sup>®</sup>). Parasites were seeded at an initial density of  $2.6 \times 10^5$  trophozoites/mL of TYM and incubated in the presence of EOP. Three experimental controls were also performed: parasites only, the vehicle used for solubilization of EOP (0.6% DMSO) and 100 μM MTZ (metronidazole; Sigma-Aldrich) (as a positive control). The microculture plates were incubated at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. Subsequent to the incubation, a preparation containing trophozoites and trypan blue (0.4%) in a 1:1 ratio was prepared and counted in a Neubauer chamber. Cultures with 95% viability were utilized for the assay.

To determine the minimum inhibitory concentration (MIC), different concentrations of EOP (25, 50, 100, 200, 300, 400, and 500 μg/mL) were tested as described by Hübner et al. [33], with some modification. Parasite pellets were used to establish the MIC as well as concentrations below and above the MIC value. Samples used as controls were inoculated in fresh TYM medium at 37 °C. Parasites were counted in a Neubauer chamber with trypan blue every 24 h

for 96 h to confirm MIC. The viability of trophozoites was assessed by the exclusion of the trypan blue dye as well as by motility and morphology. The IC<sub>50</sub> (half the maximum inhibitory concentration) values were determined at the same concentrations used for the MIC test.

A kinetic growth curve was constructed in order to obtain a more comparable activity profile of EOP activity against *T. vaginalis*. The viability of trophozoites was observed under a light microscope 96 h after incubation with EOP at the required MIC. Growth analysis was performed at 1, 6, 12, 24, 48, 72, and 96 h by the trypan blue (0.4%) exclusion method and by the evaluation of motility and morphology. All assays were performed independently at least three times in triplicate, and the results were expressed as the percentage of viable trophozoites compared to untreated parasites.

For the Anti-*Trichomonas vaginalis* activity assay, statistical analysis was conducted using one-way analysis of variance (ANOVA), and a probability value of  $p < 0.05$  was considered significant. Tukey's test was utilized to identify significant differences between the means of different treatments. GraphPad Prism version 5.0 for Windows (GraphPad Software, USA) was used for statistical analysis.

**Cytotoxicity assay.** Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells were obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (PABCAM, Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and cultured as a monolayer in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Vitrocell Embriolife) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Vitrocell Embriolife), 1% L-glutamine, and 1% penicillin/streptomycin. The cells were grown at 37 °C in an atmosphere of 95% humidified air and 5% CO<sub>2</sub>.

The post-treatment proliferation of the CHO-K1 cell line was determined by measuring the reduction of soluble 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich) to water-insoluble formazan. Cells were seeded in 96-well plates at a density of  $2 \times 10^4$  cells per well in 100  $\mu$ L volumes and grown at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 24 h before they were used in the cell viability assay. The cells were then treated with 31.25, 62.5, 125, 250 and 500  $\mu$ g of EOP for 24 h. DMSO was used as vehicle control (VC), untreated cells were used as a negative control and 100  $\mu$ M of metronidazole (MTZ) was used as a positive control. Following the incubation, 20  $\mu$ L of MTT (Sigma-Aldrich) was added to each well and the cells were incubated for an additional period of 3 h at 37 °C. Differences in the total cellular metabolism were detected at a wavelength of 492 nm by using a microplate reader. The inhibition (%) of cell proliferation was determined as follows: inhibitory growth =  $(1 - \text{Abs}_{492} \text{ treated cells} / \text{Abs}_{492} \text{ control cells}) \times 100\%$ . The IC<sub>50</sub> was calculated using GraphPad Prism version 5.0 for Windows (GraphPad Software, USA). All observations were validated by at least three independent experiments in triplicate.

## Adjuvant assay

**Experimental animals.** Six- to eight-week-old female BALB/c mice were obtained from the Central Animal Facility of the Federal University of Pelotas, where the immunization assays were also conducted. All mice were kept in cages containing wood shavings and bedding and had free access to water and a maintenance diet *ad libitum*. A 12-h light/dark cycle at room temperature ( $21 \pm 2$  °C) was also maintained. All experiments were performed in compliance with the procedures of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). The Ethics Commission on Animal Experimentation (CEEA) of Pelotas Federal University (UFPel) approved the project (number 2422). All efforts were made to minimize animal suffering.

**Antigen expression and purification.** The recombinant endoglycosidase CP40 (rCP40), derived from *C. pseudotuberculosis*, was used as an antigen for the adjuvant assay. The pAE/*cp40* recombinant plasmid previously constructed by our group [34] was transformed into the

*Escherichia coli* BL21 (DE3) Star strain by the heat shock method. The induction of expression was performed by adding 1 mM of IPTG followed by incubation at 37 °C for 3 h with constant agitation. Western blotting using a monoclonal anti-6x-His-tag antibody conjugated to peroxidase (Sigma-Aldrich) was used to confirm rCP40 expression. A sepharose-nickel column, His-Trap™ (GE Healthcare), was used for purification of the recombinant protein. Purity was determined by 12% SDS-PAGE, and the concentration was measured using a BCA kit (PIERCE).

**Immunization assay and blood sample collection.** For the immunization assay, the mice were divided into the following three groups of six animals each: (a) G1: a negative control group immunized with 0,4 ng/kg BW EOP; (b) G2: inoculated with only 50 µg of rCP40 protein; and (c) G3: the test group inoculated with 0,4 ng/kg BW EOP plus 50 µg of rCP40. All doses were prepared in a final volume of 200 µL using sterile saline solution (0.9% NaCl) as a vehicle and administered via the intramuscular route. The animals were immunized with two doses administered 21 days apart. Animals were bled at days 0, 21, and 42 post-immunization to determine the antibody levels. Blood was collected from the retro-orbital sinus with Pasteur pipettes. All blood collections were performed under anesthesia with 10% ketamine (1 mL/kg) and 2% xylazine (0.1 mg/kg) (Agener União Saúde Animal, Brazil). After coagulation, the blood was centrifuged at 1,500 g for 15 min. The serum was removed and stored at -20 °C.

**Assessment of antibody production.** Serum samples from the immunized mice were used in immunoassays (indirect ELISA) for the quantification of total IgG, IgG1 and IgG2a anti-rCP40 antibodies. Polystyrene 96-well plates (Maxisorp-Nunc) were coated with 100 µL of a bicarbonate-carbonate buffer (pH 9.8) containing 0.1 µg/well of rCP40 protein. Plates were incubated for 18 h at 4 °C and washed 3 times with PBS-T (PBS 1X, pH 7.4, 0.1% Tween 20). The plates were then incubated with 200 µL/well of 5% skim milk in PBS for 2 h at 37 °C, for blocking purposes. A three-step wash was then performed. All serum samples obtained from mice were diluted in PBS (v/v 1:50), and 100 µL of each diluted sample was added to the plates in duplicate. Plates were incubated for 1 h at 37 °C. After washing three times with PBS-T, 100 µL/well of anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich) was added (1: 5,000 in PBS-T) to the plates in order to detect total IgG prior to the revelation step. In plates designated for the detection of IgG1 and IgG2a, 100 µL/well of either goat anti-mouse IgG1 (1: 5,000 in PBS-T) or goat anti-mouse IgG2a (1: 2,000 in PBS-T) was added. The plates were incubated at 37 °C for 1 h and then washed three times with PBS-T, subsequent to which 100 µL/well of anti-goat IgG conjugated to horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich) was added (1: 5,000 in PBS-T). The plates were re-incubated for 1 h at 37 °C and then washed five times with PBS-T. The reaction was developed by the addition of 100 µL/well of the substrate-chromogen solution [*o*-phenylenediamine dihydrochloride; OPD tablets (Sigma-Aldrich) in 0.4 mg/mL phosphate-citrate buffer containing 0.04% of 30% hydrogen peroxide, pH = 5.0] and incubation at room temperature in the dark for 15 min, and it was stopped by the addition of 50 µL/well of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution (4N). Optical density (OD) was determined using a microtiter-plate reader (Microplate Reader Mindray MR-96A) set at 492 nm.

Data were analyzed using the software GraphPad Prism version 5.0 for Windows (GraphPad Software, USA). Differences in IgG levels between the groups were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's test for multiple comparisons. The results were considered statistically significant if p-value < 0.05.

## Results

### EOP chemical components

GC-MS analysis of the red propolis extract enabled the identification of certain compounds present in the essential oil. A list of these constituents is presented in [Table 1](#). GC-MS is a

**Table 1. Volatile compounds identified by gas chromatography followed by mass spectrometry (GC-MS) of the Brazilian red propolis essential oil.**

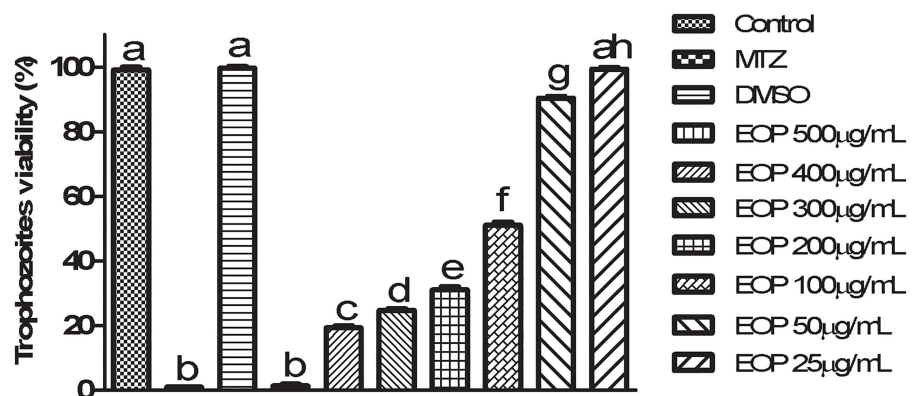
Compound	Area (%)	LRI obtained	LRI reference
$\alpha$ -Pinene	0.2	908	907 [37]
$\alpha$ -Cubebene	1.9	1351	1351[37,38]
(-)-Cyperene	0.2	1401	1400 [39]
Methyl eugenol	13.1	1407	1408 [40]
$\alpha$ -Gurjunene	0.5	1412	1412 [41]
$\beta$ -Caryophyllene	1.5	1422	1422 [42]
trans- $\alpha$ -Bergamotene	0.6	1438	1438 [43]
(E)- $\beta$ -Farnesene	2.5	1459	1459 [37]
$\gamma$ -Murolene	0.2	1479	1479 [44]
$\alpha$ -Curcumene	0.1	1485	1484 [45]
Selinene	0.7	1490	1490 [46]
$\beta$ -Bisabolene	0.9	1506	1506 [47]
$\delta$ -Amorphene	2.3	1514	1514 [48]

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191797.t001>

reliable method, indispensable in several areas where the analysis of complex mixtures and unambiguous identification is required, and since volatile compounds are well identified with GC-MS, this method is suitable for analysis of essential oils [35,36]. Using GC-MS, our study was able to highlight methyl eugenol (13.1%), (E)- $\beta$ -farnesene (2.5%),  $\delta$ -amorphene (2.3%),  $\alpha$ -cubebene (1.9%), and  $\beta$ -caryophyllene (1.5%) as the major components of the extract.

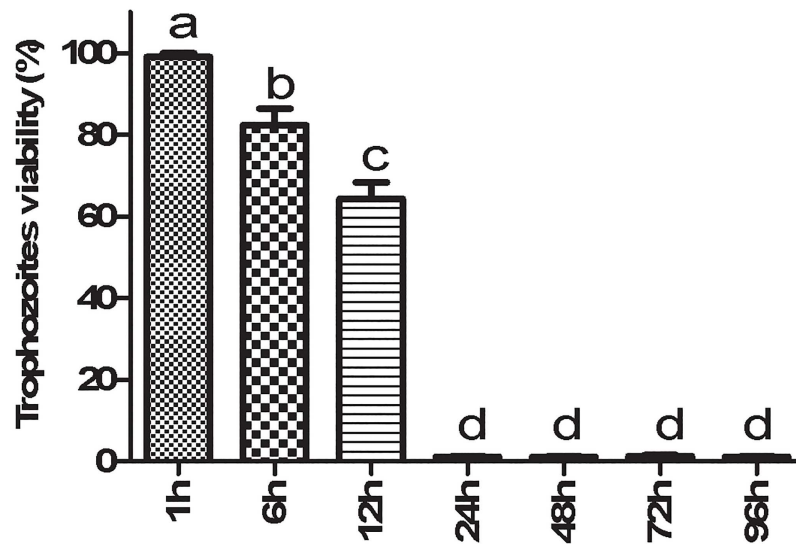
### Anti-*Trichomonas vaginalis* activity assay

Analysis of the EOP MIC data revealed that at a 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentration, 100% death of trophozoites was observed. After 24 h of exposure, EOP demonstrated optimal anti-*T. vaginalis* activity at a concentration of 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  with an  $\text{IC}_{50}$  value of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Fig 1). The negative control and DMSO control showed positive motility and did not stain with Trypan blue (0.4%), whereas the positive control stained blue and exhibited negative motility at the 24 h time point in all assays performed. When the kinetic growth curve was analyzed, it was



**Fig 1. *Trichomonas vaginalis* 30236 isolate; MIC and  $\text{IC}_{50}$  after 24-hour-treatments with EOP at 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .** Data represent mean  $\pm$  standard deviation of at least three experiments, all in triplicate. Different letters indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191797.g001>



**Fig 2. Kinetic growth curve of the *Trichomonas vaginalis* 30236 isolate after exposure to EOP at 500 µg/mL for 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h and 96 h.** Data represent mean  $\pm$  standard deviation of at least three experiments, all in triplicate. Different letters indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191797.g002>

observed that the exposure to 500 µg/mL of EOP reduced the growth of trophozoites by 36% at 12 h and induced complete parasite death at 24 h (Fig 2).

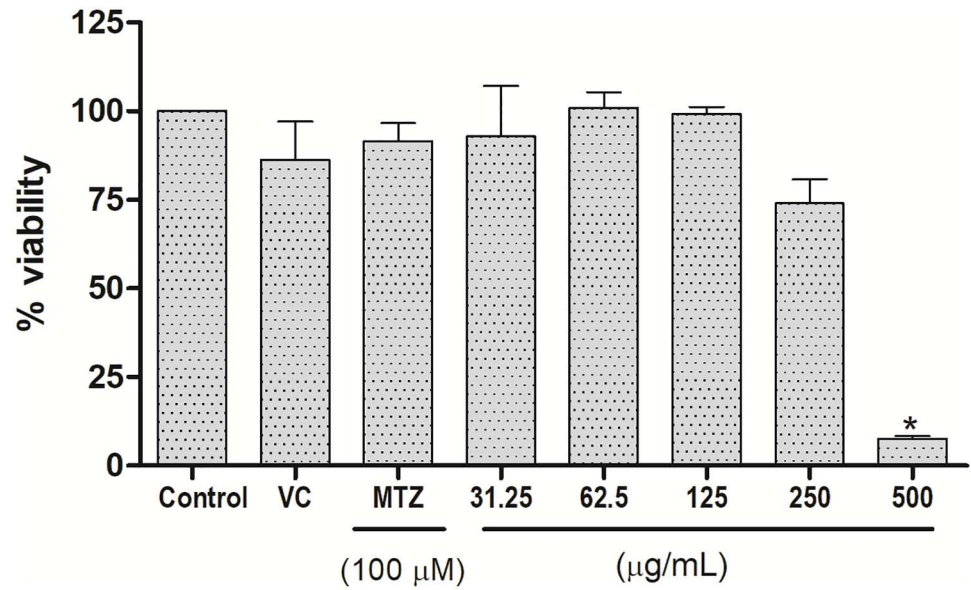
### Cytotoxicity assay

EOP treatment also inhibited proliferation of the CHO-K1 cell line; however, this cytotoxicity was only significant at 500 µg/mL. No significant cytotoxicity was observed up to 250 µg/mL in growth inhibition of CHO-K1 cells after 24 h of treatment (Fig 3). The in vitro cytotoxicity activity of EOP showed  $IC_{50}$  values of 266 and 100 µg/mL in CHO-K1 cells and trophozoites, respectively, which may indicate selectivity of the EOP treatment at concentrations up to 250 µg/mL. The results enumerated above demonstrate that EOP is an important resource for future drug development, and its therapeutic potential against various infectious entities merits further study and analysis.

### Adjuvant assay

Fig 4 illustrates the results obtained from the ELISA assay designed for analyzing the production of anti-rCP40 total IgG, IgG1, and IgG2a antibodies. The results demonstrate that animals from group G1 were unable to induce production of IgG and its isotypes. In group G2, increased total IgG, IgG1, and IgG2a levels were detected on day 42, subsequent to the administration of two doses of rCP40. Additionally, it was observed that the association of EOP with rCP40 (G3) leads to the induction of higher levels of IgG and its isotypes. When compared with groups G1 and G2, group G3 was observed to present a significantly higher increase ( $p < 0.05$ ) in total IgG total as well as isotypes IgG1 and IgG2a at days 21 and 42 after the first immunization (Fig 4A, 4B and 4C); this is demonstrative of the adjuvant effect of EOP. The day-42 values clearly demonstrate that the association of EOP with rCP40 was able to increase the levels of total IgG, IgG1 and IgG2a by approximately 7.4, 4.4 and 10.8 fold, respectively, in comparison to the administration of rCP40 alone. Moreover, group G3 shows more pronounced IgG2a production compared to the production of IgG1 at day 42.





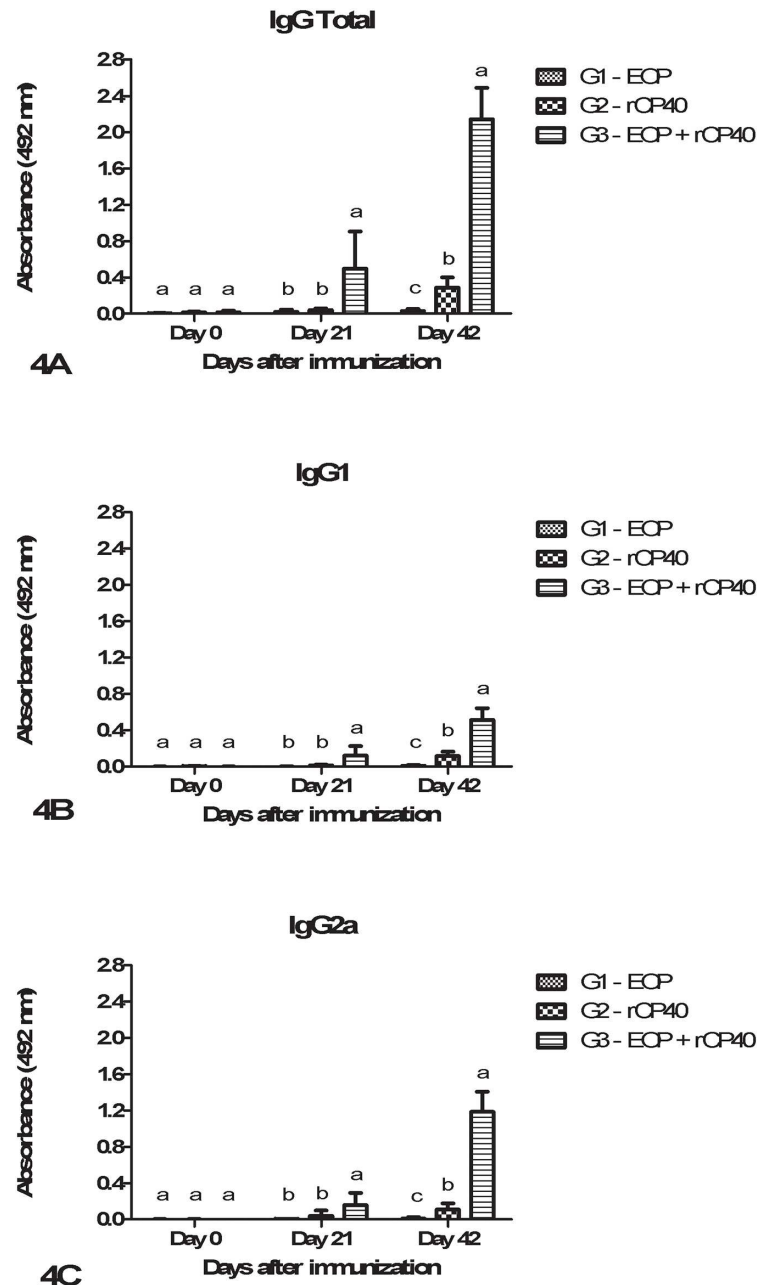
**Fig 3. CHO-K1 cell viability after treatment with different concentrations of EOP.** Cell proliferation in CHO-K1 was investigated by the MTT assay, and metronidazole was used as a positive control. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of the viabilities of CHO-K1 cells in three independent experiments. (\*) indicates a difference between the treatments in CHO-K1 cells. The differences were considered significant at  $p < 0.05$ . VC = vehicle control; MTZ = metronidazole.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191797.g003>

## Discussion

Although some Brazilian propolis essential oils, mainly those derived from green propolis, have been characterized previously [36,49,50], this is the first study to undertake the characterization of BRP essential oil. Only the ethanolic and methanolic extracts of BRP have been tested being isoflavones the main isolated compounds [18,51,52]. Thus, we hypothesized that the essential oil (EO) of BRP could provide some volatile compounds with important biological properties, which are probably lost or eliminated in the other extraction methods. In fact, methyl eugenol, a phenylpropene, was the major volatile component isolated from EOP and most of the other isolates were classified as sesquiterpenes. Along similar lines, it is known that the Brazilian green propolis also has a predominance of sesquiterpenes. Nerolidol,  $\beta$ -caryophyllene, spathulenol, and  $\delta$ -cadinene have been identified as other major volatile components of green propolis [29]. Studies have revealed that EO constituents make up a diverse family of low-molecular-weight organic compounds with extreme variations in biological activity. Based on their chemical structure, the active compounds of EOs can be divided into four major groups: terpenes, terpenoids, phenylpropenes, and “others” [53].

Some of the volatile compounds present in EOP have already been credited with having antiparasitic activity. These chemical entities include  $\beta$ -caryophyllene,  $\alpha$ -pinene,  $\alpha$ -bergamotene, and (E)- $\beta$ -farnesene [54,55]. Additionally, methyl eugenol isolated from the essential oil extracted from the plant *Agastache rugosa* showed significant nematocidal activity against *Meloidogyne incognita* [56]. Methyl eugenol is a specific constituent of Brazilian red propolis, among another types of propolis, which was revealed for the first time in 2008 [57]. Therefore, in this work, we hypothesized that methyl eugenol, a phenylpropene with the major concentration in EOP and the sesquiterpenes may be responsible for the antiparasitic activity against



**Fig 4.** Anti-rCP40 total IgG (4A), IgG1 (4B) and IgG2a (4C) levels in immunized mice treated with EOP and recombinant endoglycosidase CP40 from *C. pseudotuberculosis* (rCP40), either separately or together. Measurements were taken on day 0 and then 21 and 42 days post-immunization. Data represent means  $\pm$  standard deviations of IgG levels in the sera collected from 6 animals/group. Different letters in the same experimental day indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191797.g004>

*T. vaginalis* exhibited here. However, further studies should be performed with the isolated constituents of EOP to identify the specific antiparasitic agents.

In spite of the anti-*T. vaginalis* activity, a higher cytotoxicity level was observed at the EOP concentration that presented 0% viability of trophozoites after 24 h of exposure (500  $\mu\text{g/mL}$ ) compared to a lower concentration (200  $\mu\text{g/mL}$ ), which was not toxic for CHO-K1 cells but reduced parasite proliferation by 70%. Therefore, it is hypothesized that cytotoxicity could be a

limiting factor for the parenteral use of EOP, but its use in topical forms for the treatment of trichomoniasis, through topical vaginal application, appears to be an interesting alternative. It is well known that topical application allows for the delivery of higher drug concentrations to the vaginal epithelium at lower treatment doses [58].

A previous study has evaluated the effects of compounds with guaiacyl and syringyl structures (as degradation products of lignin) and natural aromatic acids and their aldehydes on *T. vaginalis* and found that the tested compounds exhibited antiparasitic activity with MIC values ranging from 10 to 200 µg/mL. Isoeugenol, a phenylpropene generated by a propenyl-substituted guaiacol, was the most potent effector against *T. vaginalis* with a MIC value of 10 µg/mL [59], which is much lower than MIC found here for EOP. Since EOP is a complex mixture containing mainly methyl eugenol, a phenylpropene with similarities with isoeugenol in chemical structure, and sesquiterpenes in low concentrations, it is expected a different biological result in comparison to the use of each isolated compound.

In addition, some studies have revealed that red propolis extracts from different geographical regions have significant potential as antiparasitic agents. The ethanolic extract of red propolis obtained from Nigeria, when tested against *Trypanosoma brucei*, demonstrated potent antiparasitic activity in both sensitive and resistant strains [60]. In another study, four samples of ethanolic extracts of Brazilian propolis were tested against *Leishmania amazonensis*. Three extracts of green propolis and one of red propolis were tested, and all of them were capable of reducing parasite loads in infected macrophages. Nevertheless, the extract obtained from BRP showed maximal activity against *L. amazonensis* while being non-toxic to the macrophage cultures [61].

Recently, the antiparasitic activity of BRP has attracted the attention of researchers. Polymeric nanoparticles of the BRP extract and the ethanolic extract of BRP have demonstrated anti-leishmanial activity against *L. (V.) braziliensis*, with IC<sub>50</sub> values of 31.3 µg/mL and 38.0 µg/mL, respectively, demonstrating the potential of BRP in the composition of pharmaceuticals for leishmaniasis therapy [12]. Additionally, when ethanolic extracts from various types of green, brown and red propolis from different regions of Brazil were tested against *Trypanosoma cruzi* Y-strain epimastigotes, an inhibitory effect on parasite growth was observed in the first 24 h for all the types of propolis. However, only the ethanolic extracts of BRP presented a persistent *T. cruzi*-inhibitory effect after 96 h, suggesting red propolis as a potential alternative for the therapeutic treatment of Chagas disease [10].

In this study, we also confirmed that EOP has the potential to be used as an adjuvant in a veterinary vaccine formulation. In our study, a recombinant endoglycosidase CP40 (rCP40), encoded by the *cp40* gene of *C. pseudotuberculosis*, was used as the antigen as its antigenic properties have been previously confirmed [34,62]. Our results confirmed that association of the rCP40 protein with EOP improves the immune response to this target compared to the administration of either of these components alone. We observed that the combination of the rCP40 with EOP led to IgG absorbances higher than those found by other researchers using traditional adjuvants such as saponin or Freund's complete adjuvant [34]. Herein, we used for the first time EOP as an adjuvant. In fact, this is the first study to evaluate the effect of BRP as a vaccinal adjuvant.

Compared to the administration of rCP40 alone, a combination of the recombinant protein with EOP was able to induce increases of 7.4-, 4.4- and 10.8-fold higher levels of total IgG, IgG1, and IgG2a, respectively. One of the most important challenges currently facing adjuvant research is the search for the 'perfect mix': an optimal, safe formulation whose different components are not only additive but also synergistic in nature, and whose administration gives rise to the desired robust immune response [63]. In this study, we observed a synergistic effect when EOP was associated with rCP40. Along similar lines, another recent study has reported



that the use of 3% palm oil with a bacterin of recombinant *E. coli* carrying the Omp40 protein resulted in an enhancement of IgG levels and of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses, while administration of the bacterin without adjuvant failed to stimulate the humoral and cell-mediated immunities [64].

Until 42 days after immunization, the IgG2a production levels were higher than those observed for IgG1, which is indicative of a T-helper 1 cell (Th1) response. In mice, Th1 cells aid in the activation of macrophages and cytotoxic T-cells and in the production of opsonizing and complement-activator immunoglobulin isotypes, such as IgG2a. Hence, it is widely believed that the primary function of Th1 cells is the generation of immunity against intracellular pathogens [34,65]. Vaccine formulations that enhance Th1 levels and CD8<sup>+</sup> T-cell responses are highly sought after as they are effective for immunization against pathogens for which there are no currently licensed vaccines (examples: HIV-AIDS, malaria, and tuberculosis) [66]. EOP has the potential to serve as an excellent adjuvant for immunization purposes. Once propolis is considered both safe and non-toxic when administered to animals or humans [26], EOP could be a good adjuvant to be used in important vaccines, and further investigations using this substance should be conducted.

The immunostimulatory effect of EOP may be attributed to the high levels of methyl eugenol (13.1%). Eugenol is a phenylpropene that is commonly found in essential oils; previous studies have established that eugenol stimulates the immune response in mice by promoting the T-cell response and natural killer activity [67]. It is also possible that sesquiterpenes could be involved in the adjuvant effect of BRP essential oil as it is known that they also activate the immune system by influencing local inflammation and promoting phagocytosis [68].

Most of the studies involving the effect of BRP on the immune system are recent and have extensively investigated the *in vivo* and *in vitro* effects of hydroalcoholic extracts of BRP on the inflammation process [16–19,69,70]. BRP reduces nitric oxide levels and diminishes the levels of some pro-inflammatory cytokines, chemokines and genes associated with inflammatory signaling in macrophages [16,17]. Additionally, BRP modulates neutrophil migration by interfering in rolling and adhesion processes through reduction of the levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCL1/KC and CXCL-2/MIP-2 and reduction of calcium influx [70]. *In vivo*, BRP has been seen to promote protective effects against ulcerative colitis in a rat model, reducing gross and histological inflammatory lesions and decreasing the levels of myeloperoxidase and iNOS in colon tissue [69]. Moreover, mice treated orally with BRP showed improved cutaneous wound healing through faster wound closure, reduction of inflammatory infiltrate, and downregulation of the transcription factor pNF- $\kappa$ B and the inflammatory cytokines TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 [19]. Antinociceptive activity of BRP towards neurogenic and inflammatory pain in mice was also observed without emotional and motor side effects [18].

The immunomodulatory properties of propolis seem to be contradictory since propolis sometimes acts in the inhibition, as in the anti-inflammatory properties, and other times in the stimulation of the immune system, as in the adjuvant properties. This phenomenon is probably caused by the chemical complexity of propolis as a result of the synergism among the components, which can be varied according to the methods of extraction of the bioactive compounds [71].

## Conclusion

The EOP was observed to exhibit a promisingly high level of antiparasitic activity, with cytotoxicity seen at higher concentrations of EOP. However, further studies using lower concentrations of EOP for topical application should be performed with the aim of reducing cytotoxicity levels and achieving potent localized action in the treatment of trichomoniasis. Our study also

demonstrated the potential use of EOP as a vaccine adjuvant since the administration of EOP along with rCP40 was seen to increase IgG production. The results of this study shed light on several new properties of EOP and underline the importance of exploring its potential as an additional option for the treatment of trichomoniasis and as a vaccine adjuvant. Furthermore, studies dedicated to revealing the potential and the importance of EOP in other biological activities are encouraged, due to EOP chemical complexity.

## Acknowledgments

Authors thank the Post-Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, UFRGS, especially T. Tasca (\*) from Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil, for the helping with *T. vaginalis* protocols assays. We are thankful for the financial support from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Grant #1608/2011.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Sibebe Borsuk.

**Data curation:** Lucielli Savegnago, Sidnei Moura.

**Formal analysis:** Odir Dellagostin.

**Funding acquisition:** Francine Padilha.

**Investigation:** Ângela Sena-Lopes, Francisco Silvestre Brilhante Bezerra, Raquel Nascimento das Neves, Rodrigo Barros de Pinho, Mara Thais de Oliveira Silva, Tiago Collares, Fabiana Seixas, Karine Begnini, João Antonio Pêgas Henriques, Mariana Roesch Ely, Luciane C. Rufatto, Thiago Barcellos.

**Methodology:** Ângela Sena-Lopes, Francisco Silvestre Brilhante Bezerra, Raquel Nascimento das Neves, Rodrigo Barros de Pinho, Mara Thais de Oliveira Silva, Karine Begnini, Mariana Roesch Ely, Luciane C. Rufatto, Sidnei Moura, Thiago Barcellos.

**Project administration:** João Antonio Pêgas Henriques, Sidnei Moura, Sibebe Borsuk.

**Supervision:** Tiago Collares, Fabiana Seixas, João Antonio Pêgas Henriques, Sibebe Borsuk.

**Writing – original draft:** Ângela Sena-Lopes, Francisco Silvestre Brilhante Bezerra.

**Writing – review & editing:** Lucielli Savegnago, Sibebe Borsuk.

## References

1. Park YK, Alencar SM, Aguiar CL. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. *J Agric Food Chem.* 2002; 50: 2502–2506. <https://doi.org/10.1021/jf011432b> PMID: 11958612
2. Alencar SM, Oldoni TLC, Castro ML, Cabral ISR, Costa-Neto CM, Cury JA, et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *J Ethnopharmacol.* 2007; 113: 278–283. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.06.005> PMID: 17656055
3. Awale S, Li F, Onozuka H, Esumi H, Tezuka Y, Kadota S. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. *Bioorganic Med Chem.* 2008; 16: 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.10.004> PMID: 17950610
4. Li F, Awale S, Tezuka Y, Kadota S. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. *Bioorganic Med Chem.* 2008; 16: 5434–5440. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.04.016> PMID: 18440233
5. López BG-C, Schmidt EM, Eberlin MN, Sawaya ACHF. Phytochemical markers of different types of red propolis. *Food Chem.* 2014; 146: 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.063> PMID: 24176329

6. Mendonça ICG, Porto ICCM, Nascimento TG, de Souza NS, Oliveira JMS, Arruda RES, et al. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. *BMC Complement Altern Med. BioMed Central*; 2015; 15: 357. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0888-9> PMID: [26467757](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26467757/)
7. Piccinelli AL, Lotti C, Campone L, Cuesta-Rubio O, Campo Fernandez M, Rastrelli L. Cuban and brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/ electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2011; 59: 6484–6491. <https://doi.org/10.1021/jf201280z> PMID: [21598949](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21598949/)
8. Frozza COS, Garcia CSC, Gambato G, Souza MDO, Salvador M, Moura S, et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food Chem Toxicol. Elsevier Ltd*; 2013; 52: 137–42. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.013> PMID: [23174518](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23174518/)
9. Regueira MS, Tintino SR, da Silva ARP, Costa MS, Boligon AA, Matias EFF, et al. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. *Food Chem Toxicol.* 2017; 107: 572–580. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.052> PMID: [28359875](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28359875/)
10. Silva RPD, Machado BAS, Barreto GA, Costa SS, Andrade LN, Amaral RG, et al. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *PLoS One.* 2017; 12: e0172585. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172585> PMID: [28358806](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28358806/)
11. Neves MVM, Silva TMS, Lima EO, Cunha EVL, Oliveira EJ. Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. *Brazilian J Microbiol.* 2016; 47: 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.009> PMID: [26887239](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26887239/)
12. Nascimento TG, Silva PF, Azevedo LF, Rocha LG, Moraes Porto ICC, Moura TFAL, et al. Polymeric Nanoparticles of Brazilian red propolis extract: preparation, characterization, antioxidant and leishmanicidal activity. *Nanoscale Res Lett.* 2016; 11: 301. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1517-3> PMID: [27316742](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27316742/)
13. Begnini KR, Moura de Leon PM, Thurow H, Schultze E, Campos VF, Martins Rodrigues F, et al. Brazilian red propolis induces apoptosis-like cell death and decreases migration potential in bladder cancer cells. *Evidence-Based Complement Altern Med.* 2014; 2014: 1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/639856> PMID: [25530785](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25530785/)
14. Frozza COS, Santos DA, Rufatto LC, Minetto L, Scariot FJ, Echeverrigaray S, et al. Antitumor activity of Brazilian red propolis fractions against Hep-2 cancer cell line. *Biomed Pharmacother.* 2017; 91: 951–963. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.027> PMID: [28514834](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28514834/)
15. Bueno-Silva B, Koo H, Falsetta ML, Alencar SM, Ikegaki M, Rosalen PL. Effect of neovestitol—vestitol containing Brazilian red propolis on accumulation of biofilm in vitro and development of dental caries in vivo. *Biofouling.* 2013; 29: 1233–1242. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.834050> PMID: [24099330](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24099330/)
16. Bueno-Silva B, Kawamoto D, Ando-Suguimoto ES, Alencar SM, Rosalen PL, Mayer MPA. Brazilian red propolis attenuates inflammatory signaling cascade in lps-activated macrophages. *PLoS One.* 2015; 10: e0144954. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144954> PMID: [26660901](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26660901/)
17. Bueno-Silva B, Kawamoto D, Ando-Suguimoto ES, Casarin RCV, Alencar SM, Rosalen PL, et al. Brazilian red propolis effects on peritoneal macrophage activity: nitric oxide, cell viability, pro-inflammatory cytokines and gene expression. *J Ethnopharmacol.* 2017; 207: 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.06.015> PMID: [28624363](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28624363/)
18. Cavendish RL, Santos JS, Belo Neto R, Paixão AO, Oliveira JV, Araujo ED, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. *J Ethnopharmacol.* 2015; 173: 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.07.022> PMID: [26192808](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26192808/)
19. Corrêa FRS, Schanuel FS, Moura-Nunes N, Monte-Alto-Costa A, Daleprane JB. Brazilian red propolis improves cutaneous wound healing suppressing inflammation-associated transcription factor NFκB. *Biomed Pharmacother.* 2017; 86: 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.018> PMID: [27978495](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27978495/)
20. Alday-Provencio S, Diaz G, Rascon L, Quintero J, Alday E, Robles-Zepeda R, et al. Sonoran propolis and some of its chemical constituents inhibit in vitro growth of *Giardia lamblia* trophozoites. *Planta Med.* 2015; 81: 742–747. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1545982> PMID: [26008200](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26008200/)
21. Freitas SF, Shinohara L, Sforcin JM, Guimarães S. In vitro effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. *Phytomedicine.* 2006; 13: 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2004.07.008> PMID: [16428024](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16428024/)
22. Starzyk J, Scheller S, Szaflarski J, Moskwa M, Stojko A. Biological properties and clinical application of propolis. II. Studies on the antiprotozoan activity of ethanol extract of propolis. *Arzneimittelforschung.* 1977; 27: 1198–9. PMID: [302709](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/302709/)

23. Alvarez-Sanchez ME, Villalpando JL, Quintas-Granados LI, Arroyo R. Polyamine transport and synthesis in *Trichomonas vaginalis*: potential therapeutic targets. *Curr Pharm Des*. 2017; 23. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170703162754> PMID: 28671057
24. Cudmore SL, Delgaty KL, Hayward-McClelland SF, Petrin DP, Garber GE. Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev*. 2004; 17: 783–93, table of contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.783-793.2004> PMID: 15489348
25. Fischer G, Paulino N, Marcucci MC, Siedler BS, Munhoz LS, Finger PF, et al. Green propolis phenolic compounds act as vaccine adjuvants, improving humoral and cellular responses in mice inoculated with inactivated vaccines. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010; 105: 908–913. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000700012> PMID: 21120362
26. Ashry el SH, Ahmad TA. The use of propolis as vaccine's adjuvant. *Vaccine*. 2012; 31: 31–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.095> PMID: 23137844
27. Sforcin JM, Bankova V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol*. 2011; 133: 253–60. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.032> PMID: 20970490
28. Biscaia D, Ferreira SRS. Propolis extracts obtained by low pressure methods and supercritical fluid extraction. *J Supercrit Fluids*. 2009; 51: 17–23. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2009.07.011>
29. Bankova V, Popova M, Trusheva B. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. 2014; 8: 1–8. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-8-28> PMID: 24812573
30. Suzuki S, Kazuhiro Amano, Suzuki K. Effect of propolis volatiles from a stingless honeybee (Apidae: Meliponinae) on the immune system of elderly residents in a nursing home. *Int J Indust Entomol*. 2009; 19: 193–197.
31. Abikim G, Yimit R, Tursunay A, Aerziguli T, Mutallip A. Effect of essential oils extracted from Xingjiang propolis on cell proliferation, cell cycle progression and apoptosis in human colorectal cancer cell line HTC-116. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi*. 2011; 19: 1469–1475.
32. Diamond LS. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J Parasitol*. 1957; 43: 488–90.
33. Hübner DPG, Vieira PB, Frasson AP, Menezes CB, Senger FR, Silva GNS, et al. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of betulinic acid derivatives. *Biomed Pharmacother*. 2016; 84: 476–484. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.09.064> PMID: 27685791
34. Droppa-Almeida D, Vivas WLP, Kelly K, Silva O, Rezende AFS, Simionatto S, et al. Recombinant CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with a virulent strain. *Vaccine*. 2016; 34: 1091–1096. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.12.064> PMID: 26796140
35. Lemberkovics E, Kakasy AZ, Héthelyi BE, Simándi B, Böszörményi A, Balázs A, et al. Gas chromatography for analysis of essential oils. Characteristics of essential oil of *Dracocephalum* species and the influence of extraction method on its composition. *Acta Pharm Hung*. 2007; 77: 19–27. PMID: 17518109
36. Oliveira A, França H, Kuster R, Teixeira L, Rocha L. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis essential oil. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2010; 16: 121–130. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992010005000007>
37. Quijano CE, Salamanca G, Pino JA. Aroma volatile constituents of Colombian varieties of mango (*Mangifera indica* L.). *Flavour Fragr J*. 2007; 22: 401–406. <https://doi.org/10.1002/ffj.1812>
38. Shellie RA, Marriott PJ. Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry analysis of *Pelargonium graveolens* essential oil using rapid scanning quadrupole mass spectrometry. *Analyst*. 2003; 128: 879. <https://doi.org/10.1039/b304371a>
39. Yayli N., Yasar A., Gülec C., Usta A., Kolayli S., Coskuncelebi K., et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea sessilis* and *Centaurea armena*. *Phytochemistry*. 2005; 66: 1741–1745. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.04.006> PMID: 16050993
40. Boussaada O, Ammar S, Saidana D, Chriaa J, Chraif I, Daami M, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of volatile components from capitula and aerial parts of *Rhaponticum acaule* DC growing wild in Tunisia. *Microbiol Res*. 2008; 163: 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.02.010> PMID: 17482441
41. Isidorov VA, Vinogorova VT, Rafalowski K. HS-SPME analysis of volatile organic compounds of coniferous needle litter. *Atmos Environ*. 2003; 37: 4645–4650. <https://doi.org/10.1016/J.ATMOSENV.2003.07.005>
42. Yáñez X, Pinzón ML, Solano F, Sánchez LR. Chemical composition of the essential oil of *Psidium caudatum* McVaugh. *Molecules*. 2002; 7: 712–716. <https://doi.org/10.3390/70900712>
43. Tzakou O, Couladis M, Slavkovska V, Mimica-Dukic N, Jancic R. The essential oil composition of *Salvia brachyodon* Vandas. *Flavour Fragr J*. 2003; 18: 2–4. <https://doi.org/10.1002/ffj.1132>

44. Fokialakis N, Magiatis P, Mitaku S. Essential oil constituents of *Valeriana italica* and *Valeriana tuberosa*. Stereochemical and conformational study of 15-acetoxyvalerone. *Z Naturforsch C*. 2002; 57: 791–6. PMID: [12440713](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12440713/)
45. Flach A, Dondon RC, Singer RB, Koehler S, Amaral MDCE, Marsaioli AJ. The chemistry of pollination in selected Brazilian Maxillariinae orchids: floral rewards and fragrance. *J Chem Ecol*. 2004; 30: 1045–56. PMID: [15274447](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15274447/)
46. Flamini G, Cione PL, Morelli I. Composition of the essential oils and in vivo emission of volatiles of four *Lamium* species from Italy: *L. purpureum*, *L. hybridum*, *L. bifidum* and *L. amplexicaule*. *Food Chem*. 2005; 91: 63–68. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2004.05.047>
47. Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Chinou IB, Mitakou S, Gikas E, Tsaibopoulos A. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of five taxa of *Sideritis* from Greece. *American Chemical Society*; 2001; <https://doi.org/10.1021/JF001018W>
48. Hazzit M, Baaliouamer A, Faleiro ML, Miguel MG. Composition of the essential oils of *Thymus* and *Origanum* species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities. *J Agric Food Chem*. 2006; 54: 6314–6321. <https://doi.org/10.1021/jf0606104> PMID: [16910725](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16910725/)
49. Bankova V, Boudourova-Krasteva G, Popov S, Sforcin JM, Funari SRC. Seasonal variations in essential oil from Brazilian propolis. *J Essent Oil Res*. 1998; 10: 693–696. <https://doi.org/10.1080/10412905.1998.9701012>
50. Ioshida MDM, Young MCM, Lago JHG. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from Brazilian propolis. *J Essent Oil Bear Plants*. 2010; 13: 633–637. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2010.10643873>
51. López BGC, Schmidt EM, Eberlin MN, Sawaya ACHF. Phytochemical markers of different types of red propolis. *Food Chem*. 2014; 146: 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.063> PMID: [24176329](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24176329/)
52. Freires IA, de Alencar SM, Rosalen PL. A pharmacological perspective on the use of Brazilian red propolis and its isolated compounds against human diseases. *Eur J Med Chem*. 2016; 110: 267–279. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.01.033> PMID: [26840367](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26840367/)
53. Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front Microbiol*. 2012; 3: 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012> PMID: [22291693](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22291693/)
54. Calleja MA, Vieites JM, Montero-Meterdez T, Torres MI, Faus MJ, Gil A, et al. The antioxidant effect of  $\beta$ -caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. *Br J Nutr*. 2013; 109: 394–401. <https://doi.org/10.1017/S0007114512001298> PMID: [22717234](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22717234/)
55. Palmer-Young EC, Veit D, Gershenzon J, Schuman MC. The Sesquiterpenes(E)- $\beta$ -Farnesene and (E)- $\alpha$ -Bergamotene quench ozone but fail to protect the wild tobacco *Nicotiana attenuata* from ozone, UVB, and Drought Stresses. *PLoS One*. 2015; 10: e0127296. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127296> PMID: [26030663](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26030663/)
56. Li HQ, Liu QZ, Liu ZL, Du SS, Deng ZW. Chemical composition and nematocidal activity of essential oil of *Agastache rugosa* against *Meloidogyne incognita*. *Molecules*. 2013; 18: 4170–4180. <https://doi.org/10.3390/molecules18044170> PMID: [23571530](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23571530/)
57. Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL, et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2006; 3: 249–54. <https://doi.org/10.1093/ecam/nel006> PMID: [16786055](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16786055/)
58. Wachter B, Syrowatka M, Obwaller A, Walochnik J. In vitro efficacy of curcumin on *Trichomonas vaginalis*. *Wien Klin Wochenschr*. 2014; S32–6. <https://doi.org/10.1007/s00508-014-0522-8> PMID: [24619489](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24619489/)
59. Zemek J, Valent M, Pódová M, Kosíková B, Joniak D. Antimicrobial properties of aromatic compounds of plant origin. *Folia Microbiol (Praha)*. 1987; 32: 421–5.
60. Omar RMK, Igoli J, Gray AI, Ebiloma GU, Clements C, Fearnley J, et al. Chemical characterisation of Nigerian red propolis and its biological activity against *Trypanosoma brucei*. *Phytochem Anal*. 2016; 27: 107–115. <https://doi.org/10.1002/pca.2605> PMID: [26662866](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26662866/)
61. Ayres DC, Marcucci MC, Giorgio S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102: 215–220. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007005000020> PMID: [17426888](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17426888/)
62. Silva JW, Droppa-Almeida D, Borsuk S, Azevedo V, Portela RW, Miyoshi A, et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* cp09 mutant and cp40 recombinant protein partially protect mice against caseous lymphadenitis. *BMC Vet Res*. 2014; 10: 965. <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0304-6> PMID: [25527190](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25527190/)



63. Guy B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat Rev Microbiol.* 2007; 5: 505–17. PMID: [17558426](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17558426/)
64. Roslindawani MN, Syafiqah AS, Jesse FFA, Effendy AW, Zamri-Saad M. Recombinant caseous lymphadenitis vaccine with palm oil as adjuvant enhances the humoral and cell-mediated immune responses in rat model. *J Anim Heal Prod.* 2016; 4: 23.
65. Dong C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6: 329–33. <https://doi.org/10.1038/nri1807> PMID: [16557264](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16557264/)
66. Gause KT, Wheatley AK, Cui J, Yan Y, Kent SJ, Caruso F. Immunological principles guiding the rational design of particles for vaccine delivery. *ACS Nano.* 2017; 11: 54–68. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b07343> PMID: [28075558](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28075558/)
67. Vishteh A, Thomas I, Imamura T. Eugenol modulation of the immune response in mice. *Immunopharmacology.* 1986; 12: 187–92. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3546191> PMID: [3546191](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3546191/)
68. López-Antón N, Hermann C, Murillo R, Merfort I, Wanner G, Vollmar AM, et al. Sesquiterpene lactones induce distinct forms of cell death that modulate human monocyte-derived macrophage responses. *Apoptosis.* 2007; 12: 141–153. <https://doi.org/10.1007/s10495-006-0331-2> PMID: [17080325](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17080325/)
69. Bezerra GB, Souza LM, Santos AS, Almeida GKM, Souza MTS, Santos SL, et al. Hydroalcoholic extract of Brazilian red propolis exerts protective effects on acetic acid-induced ulcerative colitis in a rodent model. *Biomed Pharmacother.* 2017; 85: 687–696. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.080> PMID: [27955827](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27955827/)
70. Bueno-Silva B, Franchin M, Alves de C F, Denny C, Colón DF, Cunha TM, et al. Main pathways of action of Brazilian red propolis on the modulation of neutrophils migration in the inflammatory process. *Phytomedicine.* 2016; 23: 1583–1590. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.09.009> PMID: [27823622](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27823622/)
71. Fischer G, Hübner SO, Vargas GD, Vidor T. Imunomodulação pela própolis. *Arq Inst Biol.* 2008; 75: 247–253.

**Anexo C – Comprovante do depósito da patente: Formulação antiparasitária a partir de óleo essencial de própolis vermelha brasileira**



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

Número do Processo: BR 10 2016 016995 0

### Dados do Depositante (71)

---

Depositante 1 de 1

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 92242080000100

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

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

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96010-610

**País:** Brasil

**Telefone:** (53) 3921 1225

**Fax:**

**Email:** cit@ufpel.edu.br



## Dados do Pedido

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

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

**Utilidade (54):** ESSENCIAL DE PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA

**Resumo:** Setor técnico: A61K 39/00, A61K 39/39, A61K 35/644, A61K 39/05, A61P 33/00, A61P 33/02, A61P 33/10

A presente invenção apresenta o uso do óleo essencial de própolis vermelha brasileira (OEPV), em formulações farmacêuticas com atividade antiparasitária. A presente invenção compreende ainda o desenvolvimento de fármacos e medicamentos contendo OEPV em sua composição. Adicionalmente, o presente pedido trata de composições farmacêuticas contendo as frações ativas do OEPV e seu uso em formulações com atividade antiparasitárias. Até o momento o OEPV, objeto alvo da presente patente, ainda não havia sido descrito ou avaliada sua atividade antiparasitária. Para cada atividade biológica, utiliza-se diferentes concentrações eficazes deste OEPV. A ação antiparasitária foi observada quando testado o OEPV em *Toxocara canis* e *Trichomonas vaginalis*, os parasitos demonstraram alterações de motilidade e morfologia indicando morte parasitária. Esses resultados confirmam que o OEPV é uma fonte farmacológica e que pode ser utilizada na composição de diversas formas farmacêuticas.

**Figura a publicar:** 1

## Dados do Inventor (72)

---

### Inventor 1 de 16

**Nome:** SIBELE BORSUK

**CPF:** 95168192068

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Av. Vinte e Cinco de Julho, nº 755, casa 270, Três Vendas

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96065-620

**País:** BRASIL

**Telefone:** (53) 814 16888

**Fax:**

**Email:** sibeleborsuk@gmail.com

### Inventor 2 de 16

**Nome:** ÂNGELA SENA LOPES

**CPF:** 82639205072

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

**Endereço:** Rua Gonçalves Chaves, nº 3960, apto 202, Edifício Mariah, Bairro  
Centro

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96015-560

**País:** BRASIL

**Telefone:** (53) 813 41252

**Fax:**

**Email:** angelasena@gmail.com

### Inventor 3 de 16

**Nome:** FRANCISCO SILVESTRE BRILHANTE BEZERRA

**CPF:** 05093063495

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Veterinário, patologista (veterinário) e zootecnista

**Endereço:** Av. Vinte e Cinco de Julho, nº 755, casa 287, Bairro Três Vendas

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96065-620

**País:** BRASIL

**Telefone:** (53) 998 38863

**Fax:**

**Email:** silvestrebrilhante@gmail.com

**Inventor 4 de 16**

**Nome:** MARA THAIS DE OLIVEIRA SILVA

**CPF:** 05802823330

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Outras ocupações não especificadas anteriormente

**Endereço:** Rua Gomes Carneiro, nº 1643, Bairro Centro

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96010-610

**País:** BRASIL

**Telefone:** (53) 811 35476

**Fax:**

**Email:** marathaisos@gmail.com

**Inventor 5 de 16**

**Nome:** ANDRÉA DE FÁTIMA SILVA REZENDE

**CPF:** 94283940500

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Biólogo, biomédico e afins

**Endereço:** Rua Joao Geniton da Costa, nº 246, apto 202, bloco 06, Condomínio  
Caminho das Águas, Bairro Jabotiana

**Cidade:** Aracaju

**Estado:** SE

**CEP:** 49096-796

**País:** BRASIL

**Telefone:** (83) 811 84188

**Fax:**

**Email:** andreabiomedica@hotmail.com

**Inventor 6 de 16**

**Nome:** RAQUEL NASCIMENTO DAS NEVES

**CPF:** 03369203006

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Outras ocupações não especificadas anteriormente

**Endereço:** Rua Doutor João Pessoa, nº 159, apto 201, Bairro Porto

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96010-470

**País:** BRASIL

**Telefone:** (53) 911 74242

**Fax:**

**Email:** raquelneves@hotmail.com

**Inventor 7 de 16**

**Nome:** RODRIGO BARROS DE PINHO

**CPF:** 83176900082

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Outras ocupações não especificadas anteriormente

**Endereço:** Rua Marechal Deodoro, 1282

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96020-220

**País:** BRASIL

**Telefone:** (53) 914 51810

**Fax:**

**Email:** rodrigobpinho@hotmail.com

**Inventor 8 de 16**

**Nome:** MARA ANDRADE COLARES MAIA

**CPF:** 04953603338

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Outras ocupações não especificadas anteriormente

**Endereço:** Rua Gomes Carneiro, nº 1643, Centro

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96010-610

**País:** BRASIL

**Telefone:** (53) 998 045006

**Fax:**

**Email:** maracamaia@hotmail.com

**Inventor 9 de 16**

**Nome:** FABIANA KOMMLING SEIXAS

**CPF:** 82364508053

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Rua Gonçalves Chaves, nº 3878, apto 201, Bairro Centro

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96015-560

**País:** BRASIL

**Telefone:** (53) 998 22979

**Fax:**

**Email:** seixas.fk@gmail.com

**Inventor 10 de 16**

**Nome:** TIAGO VEIRAS COLLARES

**CPF:** 92045715000

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Rua Gonçalves Chaves, nº 3878, apto 201, Bairro Centro

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96015-560

**País:** BRASIL

**Telefone:** (53) 998 25787

**Fax:**

**Email:** collares.t@gmail.com

**Inventor 11 de 16**

**Nome:** : LUCIELLI SAVEGNAGO

**CPF:** 81485115000

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Parque Imigrantes, nº 271, Bairro Três Vendas

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96055-810

**País:** BRASIL

**Telefone:**

**Fax:**

**Email:** luciellisavegnago@yahoo.com.br

**Inventor 12 de 16**

**Nome:** ODIR ANTÔNIO DELLAGOSTIN

**CPF:** 42251850015

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Rua São José do Norte, 554, Bairro Laranjal

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96090-690

**País:** BRASIL

**Telefone:** (53) 998 88392

**Fax:**

**Email:** odir@ufpel.edu.br

**Inventor 13 de 16**

**Nome:** FRANCINE FERREIRA PADILHA

**CPF:** 69094845091

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Biólogo, biomédico e afins

**Endereço:** Av. Maria Vasconcelos de Andrade 1720, bloco 2 apto 101, Aruana

**Cidade:** Aracaju

**Estado:** SE

**CEP:** 49000-626

**País:** BRASIL

**Telefone:** (79) 999 192575

**Fax:**

**Email:** fpadilha@yahoo.com

**Inventor 14 de 16**

**Nome:** MARIANA ROESCH ELY

**CPF:** 64088812034

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Odontólogo

**Endereço:** Rua Andrade Neves, nº 1010, apto 701, Bairro Exposição

**Cidade:** Caxias do Sul

**Estado:** RS

**CEP:** 95084-200

**País:** BRASIL

**Telefone:** (54) 812 16804

**Fax:**

**Email:** mrely@ucs.br

**Inventor 15 de 16**



**Nome:** SIDNEI MOURA E SILVA

**CPF:** 80238378004

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Outras ocupações não especificadas anteriormente

**Endereço:** Rua Pinheiro Machado, nº 234, apto 1104

**Cidade:** Caxias do Sul

**Estado:** RS

**CEP:** 95020-172

**País:** BRASIL

**Telefone:** (54) 991 20520

**Fax:**

**Email:** sidmoura@gmail.com

**Inventor 16 de 16**

**Nome:** JOÃO ANTONIO PÊGAS HENRIQUES

**CPF:** 08229813000

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

**Endereço:** Rua Fernandes Vieira, nº 181, apto 702, Bairro Bom Fim

**Cidade:** Porto Alegre

**Estado:** RS

**CEP:** 90035-091

**País:** BRASIL

**Telefone:** (51) 996 79156

**Fax:**

**Email:** pegas.henriques@gmail.com

## Documentos anexados

---

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprov pgto tx depósito 04.07 (015B).pdf
Desenho	Figuras - Formulação antiparasitária OEPV.pdf
Portaria	Decreto de Nomeação do Reitor_UFPel.pdf
Procuração	PROCURACAO.pdf
Reivindicação	Reinvindicações - Formulação antiparasitária OEPV.pdf
Relatório Descritivo	Relatório descritivo - Formulação antiparasitária OEPV.pdf
Resumo	Resumo - Formulação antiparasitária.pdf
Documento de Cessão	Cessão Francine.pdf
Documento de Cessão	cessão João.pdf
Documento de Cessão	cessão Mariana.pdf
Documento de Cessão	Cessão Sidnei.pdf
Declaração de período de graça	Divulgação não prejudicial.pdf

### Acesso ao Patrimônio Genético

---

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

### Declaração de Divulgação Anterior Não Prejudicial

---

- Artigo 12 da LPI - Período de Graça.

### Declaração de veracidade

---

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

Obrigado por acessar o Peticionamento Eletrônico

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Este pedido foi enviado pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 21/07/2016 às 18:24

**Anexo D – Comprovante do depósito da patente: Formulação antiparasitária a partir de 1,3-dioxolanas contendo telúrio**



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

Número do Processo: BR 10 2017 015887 0

### Dados do Depositante (71)

---

Depositante 1 de 1

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 92242080000100

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

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

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96010-610

**País:** Brasil

**Telefone:** (53) 3284 4086

**Fax:**

**Email:** cit@ufpel.edu.br

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** FORMULAÇÃO ANTIPARASITÁRIA A PARTIR DE 1,3-DIOXOLANAS CONTENDO TELÚRIO

**Resumo:** A presente invenção apresenta o uso de derivados de 1,3-dioxolanas contendo telúrio (PTeDOX), em formulações farmacêuticas com atividade antiparasitária. A presente invenção compreende o desenvolvimento de fármacos e medicamentos contendo PTeDOX em sua composição. Até o momento as PTeDOX, objeto alvo da presente patente, ainda não haviam sido descritas ou avaliadas quanto às suas atividades antiparasitárias. A ação antiparasitária foi observada quando testado as PTeDOX em *Trichomonas vaginalis*, os parasitos demonstraram alterações de motilidade e morfologia indicando morte parasitária. Esses resultados confirmam que as PTeDOX é uma fonte farmacológica e que pode ser utilizada na composição de diversas formas farmacêuticas. Setor técnico: A61K 39/00, A61K 39/39, A61K 35/644, A61K 39/05, A61P 33/00, A61P 33/02, A61P 33/10.

**Figura a publicar:** 1

## Dados do Inventor (72)

---

### Inventor 1 de 12

**Nome:** SIBELE BORSUK

**CPF:** 95168192068

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Av. Vinte e Cinco de Julho, nº755, casa 270, Três Vendas

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96065-620

**País:** BRASIL

**Telefone:** (53) 981 416888

**Fax:**

**Email:** sibeleborsuk@gmail.com

### Inventor 2 de 12

**Nome:** ÂNGELA SENA LOPES

**CPF:** 82639205072

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Doutorando

**Endereço:** Rua Gonçalves Chaves, nº 3960, apto 202, Edifício Mariah, Centro

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96015-560

**País:** BRASIL

**Telefone:** (53) 981 341252

**Fax:**

**Email:** angelasena@ymail.com

### Inventor 3 de 12

**Nome:** RAQUEL NASCIMENTO DAS NEVES

**CPF:** 03369203006

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Mestrando

**Endereço:** Rua Doutor João Pessoa, nº159, apto 201, Porto

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96010-470

**País:** BRASIL

**Telefone:** (53) 991 174242

**Fax:**

**Email:** raquelneeves@hotmail.com

**Inventor 4 de 12**

**Nome:** LUCIELLI SAVEGNAGO

**CPF:** 81485115000

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Parque Imigrantes, nº 271, Bairro Três Vendas

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96055-810

**País:** BRASIL

**Telefone:** (53) 327 57350

**Fax:**

**Email:** luciellisavegnago@yahoo.com.br

**Inventor 5 de 12**

**Nome:** DIEGO DA SILVA ALVES

**CPF:** 82400776091

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Rua Um, Residencial Parque Imigrantes, Casa 261

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96020-098

**País:** BRASIL

**Telefone:** (53) 999 560307

**Fax:**

**Email:** diego.alves@ufpel.edu.br

**Inventor 6 de 12**

**Nome:** GELSON PERIN

**CPF:** 53846338087

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Rua Dr. Ferreira Soares 100, casa 8

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96020-160

**País:** BRASIL

**Telefone:** (53) 998 115965

**Fax:**

**Email:** gelsonperin@yahoo.com.br

**Inventor 7 de 12**



**Nome:** RAQUEL GUIMARÃES JACOB

**CPF:** 82826803700

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Rua Dr. Ferreira Soares, nº 100, casa 08

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96020-160

**País:** BRASIL

**Telefone:** (53) 981 159651

**Fax:**

**Email:** raquel.jacob@ufpel.edu.br

**Inventor 8 de 12**

**Nome:** EDER JOÃO LENARDÃO

**CPF:** 67366686972

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Rua Vitor Valpirio, 289, Centro

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96020-250

**País:** BRASIL

**Telefone:** (53) 981 414567

**Fax:**

**Email:** elenardao@uol.com.br

**Inventor 9 de 12**

**Nome:** PATRICK CARVALHO NOBRE

**CPF:** 03039985043

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Doutorando

**Endereço:** Rua quinze, nº 469, Navegantes II

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96076-200

**País:** BRASIL

**Telefone:** (53) 981 290401

**Fax:**

**Email:** patricknobre92@gmail.com

**Inventor 10 de 12**

**Nome:** MARA THAIS DE OLIVEIRA SILVA

**CPF:** 05802823330

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Doutorando

**Endereço:** Rua Gomes Carneiro, nº1643, Centro

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96010-610

**País:** BRASIL

**Telefone:** (88) 999 662229

**Fax:**

**Email:** marathaisos@gmail.com

**Inventor 11 de 12**

**Nome:** FRANCISCO SILVESTRE BRILHANTE BEZERRA

**CPF:** 05093063495

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Doutorando

**Endereço:** Av. Vinte e Cinco de Julho, nº755, casa 287, Três Vendas

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96065-620

**País:** BRASIL

**Telefone:** (53) 334 29299

**Fax:**

**Email:** silvestrebrilhante@gmail.com

**Inventor 12 de 12**

**Nome:** RODRIGO BARROS DE PINHO

**CPF:** 83176900082

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Mestrando

**Endereço:** Rua Marechal Deodoro, nº1282

**Cidade:** Pelotas

**Estado:** RS

**CEP:** 96020-220

**País:** BRASIL

**Telefone:** (53) 991 451810

**Fax:**

**Email:** rodrigobpinho@hotmail.com

## Documentos anexados

---

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante pgmto GRU 00.000.2.2.17.0005685.3.pdf
Declaração de período de graça	artigo telúrio publicado.pdf
Declaração de período de graça	certificado biotecsul.pdf
Declaração de período de graça	CIC 2016 RESUMO.pdf
Declaração de período de graça	CIC2016 Certificado.pdf
Desenho	Figuras - Patente. TELÚRIO.pdf
Nomeação reitor	DOU_DECRETO_REITOR_2017_2020.pdf
Procuração	PROCURACAO_2017_2020.pdf
Reivindicação	Reivindicações Telúrio.pdf
Relatório Descritivo	Relatório descritivo.Telúrio.pdf
Resumo	18.04.17 Resumo TELÚRIO.pdf
Declaração de período de graça	biotecsul. pág.171.pdf

### Acesso ao Patrimônio Genético

---

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

### Declaração de Divulgação Anterior Não Prejudicial

---

- Artigo 12 da LPI - Período de Graça.

### Declaração de veracidade

---

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

**ANEXO E – Patente encaminhada para o CIT-UFPEI: Formulação antiparasitária  
a partir de quinolina-1,2,3-triazol-carboxamidas**



## INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA

Data: 10 / 09 / 2017

**Seção 1: Informações sobre o Inventor**

Enviar os dados completos de todos os inventores, inclusive daqueles que não tem vínculo com a UFPEL.

**Observações:**

- Inventores são aquelas pessoas físicas que contribuíram intelectualmente para a invenção, praticando ATO INVENTIVO (por exemplo, não são inventores os colaboradores que apenas coletaram dados, fizeram relatórios, realizaram experimentos ou emprestaram equipamentos para a realização de experimentos);
- No caso de existir mais de um inventor, solicitamos que seja utilizado o formulário de Continuação, em anexo, com as informações da tabela abaixo de cada um dos inventores adicionais;
- O inventor cujos dados forem inseridos no quadro abaixo será considerado o responsável pela tecnologia para fins de contato com a CIT, somente para ele serão encaminhadas notificações e outras informações sobre o processo de análise e patenteamento.
- Todos os inventores deverão encaminhar em anexo **Termo de Autorização e Cessão**, com assinatura reconhecida em cartório, dando seu aceite e concordância com o depósito pela UFPEL.
- PROCURE OCUPAR APENAS OS ESPAÇOS DISPONIBILIZADOS PARA RESPOSTA, SEJA SUSCINTO E RESUMIDO.

INVENTOR 1		
<b>Nome Completo:</b> Sibebe Borsuk		
<b>CPF:</b> 951.681.920-68	<b>Identidade nº:</b> 5060983731	<b>Órgão expedidor:</b> SJS
<b>Estado Civil:</b> Solteira	<b>Profissão:</b> Professor Universitário	<b>Nacionalidade:</b> Brasileira
<b>Tel. residencial / institucional:</b>	<b>Celular:</b> +55(53)81416888	<b>E-mail:</b> sibebeborsuk@gmail.com
<b>Endereço residencial completo:</b> Av. Vinte e Cinco de Julho, nº755, casa 270, Três Vendas, Pelotas, RS, Brasil.		
<b>CEP:</b> 96065-620		
<b>Titulação máxima à época do desenvolvimento da Tecnologia:</b> ( x ) Doutor ( ) Mestre ( ) Especialista ( ) Graduado ( ) Outro:		
<b>À época do desenvolvimento da Tecnologia, possuía vínculo com a UFPEL?</b>		
<b>( x ) Sim.</b> Unidade/Departamento: ( x ) Professor ( ) Aluno Doutorado ou Pós-Doutorado ( ) Aluno Mestrado ( ) Aluno Especialização ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:	<b>( ) Não</b> Instituição à qual estava vinculado: Tipo de vínculo: ( ) Professor ( ) Aluno Pós-Graduação ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:	



**UFPEL**

INVENTOR 2		
<b>Nome Completo:</b> Ângela Sena Lopes		
<b>CPF:</b> 826.392.050-72	<b>Identidade nº:</b> 1057599134	<b>Órgão expedidor:</b> SSP/RS
<b>Estado Civil:</b> Casada	<b>Profissão:</b> Farmacêutica-Bioquímica	<b>Nacionalidade:</b> Brasileira
<b>Tel. residencial / institucional:</b>	<b>Celular:</b> +55(53)81341252	<b>E-mail:</b> angelasena@ymail.com
<b>Endereço residencial completo:</b> Rua Frontino Vieira, nº 848, Fragata, Pelotas, RS, Brasil. <b>CEP:</b> 96040-700		
<b>Titulação máxima à época do desenvolvimento da Tecnologia:</b> ( ) Doutor ( x ) Mestre ( ) Especialista ( ) Graduado ( ) Outro:		
<b>À época do desenvolvimento da Tecnologia, possuía vínculo com a UFPEL?</b>		
<p><b>( x ) Sim.</b></p> <p>Unidade/Departamento: _____ :</p> <p>( ) Professor</p> <p>( x ) Aluno Doutorado ou Pós-Doutorado</p> <p>( ) Aluno Mestrado</p> <p>( ) Aluno Especialização</p> <p>( ) Aluno Graduação</p> <p>( ) Técnico-administrativo</p> <p>( ) Outro:</p> <p><b>( ) Não</b></p> <p>Instituição à qual estava vinculado: _____</p> <p>Tipo de vínculo:</p> <p>( ) Professor</p> <p>( ) Aluno Pós-Graduação</p> <p>( ) Aluno Graduação</p> <p>( ) Técnico-administrativo</p> <p>( ) Outro</p>		



INVENTOR 3		
<b>Nome Completo:</b> Raquel Nascimento das Neves		
<b>CPF:</b> 033.692.030-06	<b>Identidade nº:</b> 2109918819	<b>Órgão expedidor:</b> SSP/RS
<b>Estado Civil:</b> Solteira	<b>Profissão:</b> Estudante	<b>Nacionalidade:</b> Brasileira
<b>Tel. residencial / institucional:</b> +55(53)3027-2550	<b>Celular:</b> +55(53)9117-4242	<b>E-mail:</b> raquelneeves@hotmail.com
<b>Endereço residencial completo:</b> Rua Doutor João Pessoa, nº159, apto 201, Porto, Pelotas, RS, Brasil.		
<b>CEP:</b> 96010-470		
<b>Titulação máxima à época do desenvolvimento da Tecnologia:</b> ( ) Doutor ( ) Mestre ( ) Especialista ( x ) Graduado ( ) Outro: Ensino Médio		
<b>À época do desenvolvimento da Tecnologia, possuía vínculo com a UFPEL?</b>		
<b>( x ) Sim.</b> Unidade/Departamento: ( ) Professor ( ) Aluno Doutorado ou Pós-Doutorado ( X ) Aluno Mestrado ( ) Aluno Especialização ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:	<b>( ) Não</b> Instituição à qual estava vinculado: Tipo de vínculo: ( ) Professor ( ) Aluno Pós-Graduação ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:	





**UFPEL**

INVENTOR 4		
<b>Nome Completo:</b> Lucielli Savegnago		
<b>CPF:</b> 814.851.150 00	<b>Identidade nº:</b> 403542585	<b>Órgão expedidor:</b> SJS
<b>Estado Civil:</b> Casada	<b>Profissão:</b> Professora universitária	<b>Nacionalidade:</b> Brasileira
<b>Tel. residencial / institucional:</b> +55(53)32757350	<b>Celular:</b> +55(53)9950305	<b>E-mail:</b> luciellisavegnago@yahoo.com.br
<b>Endereço residencial completo:</b> Parque Imigrantes, nº 271, Bairro Três Vendas, Pelotas, RS.		
<b>CEP:</b> 96055-810		
<b>Titulação máxima à época do desenvolvimento da Tecnologia:</b> ( x ) Doutor ( ) Mestre ( ) Especialista ( ) Graduado ( ) Outro:		
<b>À época do desenvolvimento da Tecnologia, possuía vínculo com a UFPEL?</b>		
<b>( x ) Sim.</b> Unidade/Departamento: ( x ) Professor ( ) Aluno Doutorado ou Pós-Doutorado ( ) Aluno Mestrado ( ) Aluno Especialização ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:	<b>( ) Não</b> Instituição à qual estava vinculado: Tipo de vínculo: ( ) Professor ( ) Aluno Pós-Graduação ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:	



**UFPEL**

INVENTOR 5		
<b>Nome Completo:</b> Diego da Silva Alves		
<b>CPF:</b> 82400776091	<b>Identidade nº:</b> 1056934217	<b>Órgão expedidor:</b> SSP - RS
<b>Estado Civil:</b> Casado	<b>Profissão:</b> Professor	<b>Nacionalidade:</b> Brasileiro
<b>Tel. residencial / institucional:</b>	<b>Celular:</b> (53) 99560307 (53) 32757357	<b>E-mail:</b> diego.alves@ufpel.edu.br
<b>Endereço residencial completo:</b> Rua Um, Residencial Parque Imigrantes, Casa 261		
<b>CEP:</b> 96020-098		
<b>Titulação máxima à época do desenvolvimento da Tecnologia:</b> ( x ) Doutor ( ) Mestre ( ) Especialista ( ) Graduado ( ) Outro:		
<b>À época do desenvolvimento da Tecnologia, possuía vínculo com a UFPEL?</b>		
<b>( x ) Sim.</b> Unidade/Departamento: CCQFA ( x ) Professor ( ) Aluno Doutorado ou Pós-Doutorado ( ) Aluno Mestrado ( ) Aluno Especialização ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:	<b>( ) Não</b> Instituição à qual estava vinculado: Tipo de vínculo: ( ) Professor ( ) Aluno Pós-Graduação ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:	



**UFPEL**

INVENTOR 6				
<b>Nome Completo:</b> Gelson Perin				
<b>CPF:</b> 53846338087	<b>Identidade nº:</b> 7035512503	<b>Órgão expedidor:</b> SJS		
<b>Estado Civil:</b> Solteiro	<b>Profissão:</b> Professor	<b>Nacionalidade:</b> Brasileira		
<b>Tel. residencial:</b> 32735379	<b>Celular:</b> 981159651	<b>E-mail:</b> gelsonperin@yahoo.com.br		
<b>Endereço residencial completo:</b> Rua Dr. Ferreira Soares 100, casa 8 – Pelotas/RS.				
<b>CEP:</b> 96020-160				
<b>Titulação máxima à época do desenvolvimento da Tecnologia:</b> ( x ) Doutor ( ) Mestre ( ) Especialista ( ) Graduado ( ) Outro:				
<b>À época do desenvolvimento da Tecnologia, possuía vínculo com a UFPEL?</b>				
<table border="0"><tr><td style="vertical-align: top;"><b>( x ) Sim.</b> Unidade/Departamento: CCQFA ( x ) Professor ( ) Aluno Doutorado ou Pós-Doutorado ( ) Aluno Mestrado ( ) Aluno Especialização ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:</td><td style="vertical-align: top;"><b>( ) Não</b> Instituição à qual estava vinculado: Tipo de vínculo: ( ) Professor ( ) Aluno Pós-Graduação ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:</td></tr></table>			<b>( x ) Sim.</b> Unidade/Departamento: CCQFA ( x ) Professor ( ) Aluno Doutorado ou Pós-Doutorado ( ) Aluno Mestrado ( ) Aluno Especialização ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:	<b>( ) Não</b> Instituição à qual estava vinculado: Tipo de vínculo: ( ) Professor ( ) Aluno Pós-Graduação ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:
<b>( x ) Sim.</b> Unidade/Departamento: CCQFA ( x ) Professor ( ) Aluno Doutorado ou Pós-Doutorado ( ) Aluno Mestrado ( ) Aluno Especialização ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:	<b>( ) Não</b> Instituição à qual estava vinculado: Tipo de vínculo: ( ) Professor ( ) Aluno Pós-Graduação ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:			



UFPEL

INVENTOR 7		
<b>Nome Completo:</b> Raquel Guimarães Jacob		
<b>CPF:</b> 828268037-00	<b>Identidade nº:</b> 1105770984	<b>Órgão expedidor:</b> SJS
<b>Estado Civil:</b> Solteira	<b>Profissão:</b> Professora Universitária	<b>Nacionalidade:</b> Brasileira
<b>Tel. residencial / institucional:</b> (53)32735379 / (53)3275-7354	<b>Celular:</b> 53-981159651	<b>E-mail:</b> raquel.jacob@ufpel.edu.br raquelgjacob@yahoo.com.br
<b>Endereço residencial completo:</b> Rua Dr. Ferreira Soares, nº 100, casa 08, Centro, Pelotas, RS		
<b>CEP:</b> 96020-160		
<b>Titulação máxima à época do desenvolvimento da Tecnologia:</b> ( x ) Doutor ( ) Mestre ( ) Especialista ( ) Graduado ( ) Outro:		
<b>À época do desenvolvimento da Tecnologia, possuía vínculo com a UFPEL?</b>		
<b>( x ) Sim.</b> Unidade/Departamento: ( x ) Professor ( ) Aluno Doutorado ou Pós-Doutorado ( ) Aluno Mestrado ( ) Aluno Especialização ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:	<b>( ) Não</b> Instituição à qual estava vinculado: Tipo de vínculo: ( ) Professor ( ) Aluno Pós-Graduação ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:	



INVENTOR 8				
<b>Nome Completo:</b> Eder João Lenardão				
<b>CPF:</b> 67366686972	<b>Identidade nº:</b> 15177005	<b>Órgão expedidor:</b> SSP-SP		
<b>Estado Civil:</b> Casado	<b>Profissão:</b> Professor Universitário	<b>Nacionalidade:</b> Brasileira		
<b>Tel. residencial / institucional:</b> 53-32757356	<b>Celular:</b> 53-981414567	<b>E-mail:</b> elenardao@uol.com.br		
<b>Endereço residencial completo:</b> Rua Vitor Valpirio, 289, Centro, Pelotas, RS <b>CEP:</b> 96020-250				
<b>Titulação máxima à época do desenvolvimento da Tecnologia:</b> ( x ) Doutor ( ) Mestre ( ) Especialista ( ) Graduado ( ) Outro:				
<b>À época do desenvolvimento da Tecnologia, possuía vínculo com a UFPEL?</b>				
<table border="0"><tr><td style="vertical-align: top;"><b>( x ) Sim.</b> Unidade/Departamento: ( x ) Professor ( ) Aluno Doutorado ou Pós-Doutorado ( ) Aluno Mestrado ( ) Aluno Especialização ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:</td><td style="vertical-align: top; border-left: 1px solid black;"><b>( ) Não</b> Instituição à qual estava vinculado: Tipo de vínculo: ( ) Professor ( ) Aluno Pós-Graduação ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:</td></tr></table>			<b>( x ) Sim.</b> Unidade/Departamento: ( x ) Professor ( ) Aluno Doutorado ou Pós-Doutorado ( ) Aluno Mestrado ( ) Aluno Especialização ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:	<b>( ) Não</b> Instituição à qual estava vinculado: Tipo de vínculo: ( ) Professor ( ) Aluno Pós-Graduação ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:
<b>( x ) Sim.</b> Unidade/Departamento: ( x ) Professor ( ) Aluno Doutorado ou Pós-Doutorado ( ) Aluno Mestrado ( ) Aluno Especialização ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:	<b>( ) Não</b> Instituição à qual estava vinculado: Tipo de vínculo: ( ) Professor ( ) Aluno Pós-Graduação ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:			



INVENTOR 9				
<b>Nome Completo:</b> Manoela do Sacramento				
<b>CPF:</b> 027.282.370-85	<b>Identidade nº:</b> 9104420816	<b>Órgão expedidor:</b> SSP		
<b>Estado Civil:</b> Solteira	<b>Profissão:</b> Estudante	<b>Nacionalidade:</b> Brasileira		
<b>Tel. residencial / institucional:</b>	<b>Celular:</b> +55(53)-984388907	<b>E-mail:</b> <a href="mailto:manoelasacramento@hotmail.com">manoelasacramento@hotmail.com</a>		
<b>Endereço residencial completo:</b> Avenida Juscelino Kubitschek de Oliveira, 2200/204, bloco 4A, Pelotas, RS, Brasil <b>CEP:</b> 96075-810				
<b>Titulação máxima à época do desenvolvimento da Tecnologia:</b> ( ) Doutor ( ) Mestre ( ) Especialista (x) Graduado ( ) Outro:				
<b>À época do desenvolvimento da Tecnologia, possuía vínculo com a UFPEL?</b>				
<table border="0"><tr><td style="vertical-align: top;"><b>( ) Sim.</b> Unidade/Departamento: ( ) Professor ( ) Aluno Doutorado ou Pós-Doutorado (x) Aluno Mestrado ( ) Aluno Especialização ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:</td><td style="vertical-align: top;"><b>( ) Não</b> Instituição à qual estava vinculado: Tipo de vínculo: ( ) Professor ( ) Aluno Pós-Graduação ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:</td></tr></table>			<b>( ) Sim.</b> Unidade/Departamento: ( ) Professor ( ) Aluno Doutorado ou Pós-Doutorado (x) Aluno Mestrado ( ) Aluno Especialização ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:	<b>( ) Não</b> Instituição à qual estava vinculado: Tipo de vínculo: ( ) Professor ( ) Aluno Pós-Graduação ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:
<b>( ) Sim.</b> Unidade/Departamento: ( ) Professor ( ) Aluno Doutorado ou Pós-Doutorado (x) Aluno Mestrado ( ) Aluno Especialização ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:	<b>( ) Não</b> Instituição à qual estava vinculado: Tipo de vínculo: ( ) Professor ( ) Aluno Pós-Graduação ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:			



INVENTOR 10		
<b>Nome Completo:</b> Mara Thais de Oliveira Silva		
<b>CPF:</b> 058.028.233-30	<b>Identidade nº:</b> 2007590906-0	<b>Órgão expedidor:</b> SSP/CE
<b>Estado Civil:</b> Solteira	<b>Profissão:</b> Estudante	<b>Nacionalidade:</b> Brasileira
<b>Tel. residencial / institucional:</b>	<b>Celular:</b> +55(88)99966-2229	<b>E-mail:</b> marathaisos@gmail.com
<b>Endereço residencial completo:</b> Rua Gomes Carneiro, nº1643, Centro, Pelotas, RS, Brasil.		
<b>CEP:</b> 96010-610		
<b>Titulação máxima à época do desenvolvimento da Tecnologia:</b> ( ) Doutor (x ) Mestre ( ) Especialista ( ) Graduado ( ) Outro:		
<b>À época do desenvolvimento da Tecnologia, possuía vínculo com a UFPEL?</b>		
<b>( x ) Sim.</b> Unidade/Departamento: ( ) Professor ( x ) Aluno Doutorado ou Pós-Doutorado ( ) Aluno Mestrado ( ) Aluno Especialização ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:	<b>( ) Não</b> Instituição à qual estava vinculado: Tipo de vínculo: ( ) Professor ( ) Aluno Pós-Graduação ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:	



INVENTOR 11		
<b>Nome Completo:</b> Francisco Silvestre Brilhante Bezerra		
<b>CPF:</b> 050.930.634-95	<b>Identidade nº:</b> 1.766.266	<b>Órgão expedidor:</b> SSP/RN
<b>Estado Civil:</b> Casado	<b>Profissão:</b> Médico Veterinário	<b>Nacionalidade:</b> Brasileira
<b>Tel. residencial / institucional:</b> +55(53)33429299	<b>Celular:</b> +55(53)33429299	<b>E-mail:</b> silvestrebrilhante@gmail.com
<b>Endereço residencial completo:</b> Av. Vinte e Cinco de Julho, nº755, casa 287, Três Vendas, Pelotas, RS, Brasil.		
<b>CEP:</b> 96065-620		
<b>Titulação máxima à época do desenvolvimento da Tecnologia:</b> ( ) Doutor ( x ) Mestre ( ) Especialista ( ) Graduado ( ) Outro:		
<b>À época do desenvolvimento da Tecnologia, possuía vínculo com a UFPEL?</b>		
<b>( x ) Sim.</b> Unidade/Departamento: ( ) Professor ( x ) Aluno Doutorado ou Pós-Doutorado ( ) Aluno Mestrado ( ) Aluno Especialização ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:	<b>( ) Não</b> Instituição à qual estava vinculado: Tipo de vínculo: ( ) Professor ( ) Aluno Pós-Graduação ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:	





**UFPEL**

INVENTOR 12		
<b>Nome Completo:</b> Rodrigo Barros de Pinho		
<b>CPF:</b> 831.769.000-82	<b>Identidade nº:</b> 3076187263	<b>Órgão expedidor:</b> SSP/RS
<b>Estado Civil:</b> Solteiro	<b>Profissão:</b> Estudante	<b>Nacionalidade:</b> Brasileira
<b>Tel. residencial / institucional:</b> +55(53)32225837	<b>Celular:</b> +55(53)9145-1810	<b>E-mail:</b> rodrigobpinho@hotmail.com
<b>Endereço residencial completo:</b> Rua Marechal Deodoro, nº1282, Pelotas, RS, Brasil.		
<b>CEP:</b> 96020-220		
<b>Titulação máxima à época do desenvolvimento da Tecnologia:</b> ( ) Doutor ( ) Mestre ( ) Especialista (x) Graduado ( ) Outro: Ensino Médio		
<b>À época do desenvolvimento da Tecnologia, possuía vínculo com a UFPEL?</b>		
<b>( x ) Sim.</b> Unidade/Departamento: ( ) Professor ( ) Aluno Doutorado ou Pós-Doutorado ( x ) Aluno Mestrado ( ) Aluno Especialização ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:	<b>( ) Não</b> Instituição à qual estava vinculado: Tipo de vínculo: ( ) Professor ( ) Aluno Pós-Graduação ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:	



**UFPEL**

INVENTOR 13		
<b>Nome Completo:</b> Mirna Samara Dié Alves		
<b>CPF:</b> 044.952.943-69	<b>Identidade nº:</b> 2007450334-5	<b>Órgão expedidor:</b> SSP/CE
<b>Estado Civil:</b> Solteiro	<b>Profissão:</b> Estudante	<b>Nacionalidade:</b> Brasileira
<b>Tel. residencial / institucional:</b>	<b>Celular:</b> +55(88)98123-2725	<b>E-mail:</b> mirnadie@gmail.com
<b>Endereço residencial completo:</b> Rua Tiradentes, 2085 – Edifício Thebas – Apartamento 401, Centro, Pelotas, Rio Grande do Sul		
<b>CEP:</b> 96010-165		
<b>Titulação máxima à época do desenvolvimento da Tecnologia:</b> ( ) Doutor ( ) Mestre ( ) Especialista (x) Graduado ( ) Outro: Ensino Médio		
<b>À época do desenvolvimento da Tecnologia, possuía vínculo com a UFPEL?</b>		
<b>( x ) Sim.</b> Unidade/Departamento: ( ) Professor ( ) Aluno Doutorado ou Pós-Doutorado (x) Aluno Mestrado ( ) Aluno Especialização ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:	<b>( ) Não</b> Instituição à qual estava vinculado: Tipo de vínculo: ( ) Professor ( ) Aluno Pós-Graduação ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:	



**UFPEL**

INVENTOR 14		
<b>Nome Completo:</b> Bárbara da Rocha Fonseca		
<b>CPF:</b> 015.742.150-35	<b>Identidade nº:</b> 9102934313	<b>Órgão expedidor:</b> SSP/RS
<b>Estado Civil:</b> Solteiro	<b>Profissão:</b> Estudante	<b>Nacionalidade:</b> Brasileira
<b>Tel. residencial / institucional:</b>	<b>Celular:</b> +55(53)98423-6236	<b>E-mail:</b> barbfonseca@hotmail.com
<b>Endereço residencial completo:</b> Rua Francisco Carlos Silva dos Santos, 51, Fragata, Pelotas, Rio Grande do Sul <b>CEP:</b> 96030-070		
<b>Titulação máxima à época do desenvolvimento da Tecnologia:</b> ( ) Doutor ( ) Mestre ( ) Especialista ( ) Graduado (X) Outro: Ensino Médio		
<b>À época do desenvolvimento da Tecnologia, possuía vínculo com a UFPEL?</b>		
<b>( x ) Sim.</b> Unidade/Departamento: ( ) Professor ( ) Aluno Doutorado ou Pós-Doutorado ( ) Aluno Mestrado ( ) Aluno Especialização (X) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:	<b>( ) Não</b> Instituição à qual estava vinculado: Tipo de vínculo: ( ) Professor ( ) Aluno Pós-Graduação ( ) Aluno Graduação ( ) Técnico-administrativo ( ) Outro:	



## Seção 2: Informações sobre a Invenção

### Área predominante da Tecnologia:

Biotecnologia    Engenharia    Química    Farmácia    Outra:

### A invenção ou parte dela já foi divulgada por algum meio?

Não.

Sim. Por qual meio?

**Monografia(s), dissertação(ões) ou tese(s)** - Data da apresentação:

Título:

**Artigo(s) / Resumo(s)** - Data da submissão:      Data da publicação:

Título:

Periódico:

**Congresso(s)** –

Data:

Nome Congresso: Título:

Forma de divulgação:  Apresentação Oral    Apresentação de Pôster

Publicação em Anais:

Data:

Nome Congresso:

Título:

Forma de divulgação:  Apresentação Oral    Apresentação de Pôster

Publicação em Anais:

**Demais apresentações(s) / Outros meio(s) de comunicação** - Data: / /

Qual:

Local:

**Pedido de Patente de autoria de um ou mais Inventores** - Data do depósito: / /

Número do Pedido:

Título:

Encaminhar em anexo cópia de todos os documentos informados acima e demais publicações relacionadas à tecnologia, de autoria dos inventores.

### Título proposto para a Invenção:

**“Formulação antiparasitária a partir de quinolina-1,2,3-triazol carboxamidas”**



**Palavras chave relativas à Invenção (no mínimo cinco, em inglês e português):**

Quinolina-1,2,3-triazol carboxamidas (quinoline-1,2,3-triazol carboxamides), atividade farmacológica (pharmaceutical activity), fármacos (drugs), *Trichomonas vaginalis* (*Trichomonas vaginalis*), antiparasitário (Antiparasitic).

*Ressalta-se que a descrição de sinônimos é de grande importância na busca por anterioridade, procedimento essencial para a avaliação da patenteabilidade da tecnologia. Dessa forma, quanto mais palavras melhor.*

**Descrever resumidamente sobre o problema que se pretende resolver e a solução proposta pela nova tecnologia, seus diferenciais e vantagens em relação ao estado da técnica (não revele detalhes técnicos/reivindicações):**

A presente invenção apresenta o uso de derivados de quinolina-1,2,3-triazol carboxamidas (QTCA), em formulações farmacêuticas. Até o momento as QTCA, objeto alvo da presente patente, ainda não haviam sido descritas ou avaliadas quanto às suas atividades antiparasitárias. Adicionalmente o presente pedido trata de composições farmacêuticas contendo esses fármacos e seu uso em formulações farmacêuticas. A ação antiparasitária foi observada através da exposição de *Trichomonas vaginalis* as QTCA, pois os parasitos demonstraram alterações morfológicas indicadoras de morte parasitária. Esses resultados confirmam que as QTCA são moléculas com potencial farmacológico, o qual deve ser avaliado em diferentes patógenos, intra ou extracelulares.

*Por exemplo: objetivo, problema a ser resolvido, se todo o processo é novo ou se tem apenas etapa(s) nova(s) (reagente/solvente nunca antes utilizado para o mesmo fim); condições operacionais diferenciadas; se todo o equipamento é novo ou apenas parte dele; o que é novo na composição/formulação etc.*

**Aplicações da Tecnologia:**

**a) Qual é a principal aplicação da tecnologia (uso comercial/industrial)?**

A tecnologia apresenta grande potencial para uso industrial e comercial, uma vez que pode ser inserida na composição de medicamentos que visem obter atividades antiparasitárias.

**b) Descrever outras possíveis aplicações da tecnologia.**



### Seção 3: Informações sobre Parcerias

#### Houve o envolvimento de outra instituição para desenvolvimento da invenção?

Obs: Se constarem inventores de outras instituições ou empresas, estas instituições ou empresas são consideradas parceiras.

**Não.** Ir para a Seção 4.

**Sim\*.**

Agência(s) de Fomento:

Instituições ou empresas:

\*Enviar cópia da documentação que comprova a parceria:

Exemplo: Termo de Outorga, Convênio, Contrato de Parceria, Projeto de Pesquisa, Dissertação de Mestrado, Tese de Doutorado, Edital de Incubação, etc.

### Seção 4: Acesso ao Patrimônio Genético e ao Conhecimento Tradicional Associado

#### Para o desenvolvimento da tecnologia houve pesquisa com:

Material biológico proveniente de microrganismos ou organismos da flora ou fauna brasileira, mesmo que a partir de banco de dados ou informações de artigos científicos.

Conhecimento Tradicional Associado à Biodiversidade\*.

Nenhum

Em caso afirmativo, especificar: \_\_\_\_\_

**Obs.:** Em caso de acesso, juntar cópia da autorização do CEGEN (acesso autorizado junto ao CNPq tem por finalidade apenas a pesquisa acadêmica, não habilita ao patenteamento).

*\*Acesso a conhecimento tradicional associado à biodiversidade: obtenção de informação sobre conhecimento ou prática individual ou coletiva, associada ao patrimônio genético, de comunidade indígena ou de comunidade local ou tradicional, para fins de pesquisa científica, desenvolvimento tecnológico ou bioprospecção, visando sua aplicação industrial ou de outra natureza.*



## Seção 5: Participação nos resultados

É assegurada ao conjunto dos inventores e demais colaboradores, a participação de 1/3 (um terço) nos ganhos econômicos líquidos auferidos pela **UFPEL**, resultantes de contratos de transferência de tecnologia e de licenciamento para outorga de direito de uso ou de exploração da criação protegida da qual tenham sido inventores. Podem ser incluídos neste conjunto os inventores e demais membros da equipe de pesquisa e desenvolvimento tecnológico que tenham contribuído para a criação.

No quadro abaixo, relacione os inventores e outros colaboradores que dividirão, entre si, a participação de 1/3 acima descrita, incluindo o nome completo, CPF, e-mail e sua participação percentual no conjunto, cujo somatório deve totalizar 100%.

<b>NOME</b>	<b>CPF</b>	<b>E-mail</b>	<b>%</b>
<b>Sibele Borsuk</b>	<b>951.681.920-68</b>	<b><a href="mailto:sibeleborsuk@gmail.com">sibeleborsuk@gmail.com</a></b>	<b>25%</b>
<b>Ângela Sena Lopes</b>	<b>826.392.050-72</b>	<b><a href="mailto:angelasena@ymail.com">angelasena@ymail.com</a></b>	<b>10%</b>
<b>Raquel Nascimento das Neves</b>	<b>033.692.030-06</b>	<b><a href="mailto:raquelneeves@hotmail.com">raquelneeves@hotmail.com</a></b>	<b>10%</b>
<b>Francisco Silvestre Brilhante</b>	<b>050.930.634-95</b>	<b><a href="mailto:silvestrebrilhante@gmail.com">silvestrebrilhante@gmail.com</a></b>	<b>5%</b>
<b>Mara Thais de Oliveira Silva</b>	<b>058.028.233-30</b>	<b><a href="mailto:marathaisos@gmail.com">marathaisos@gmail.com</a></b>	<b>5%</b>
<b>Rodrigo Barros de Pinho</b>	<b>831.769.000-82</b>	<b><a href="mailto:rodrigobpinho@hotmail.com">rodrigobpinho@hotmail.com</a></b>	<b>5%</b>
<b>Mirna Samara Dié Alves</b>	<b>044.952.943-69</b>	<b><a href="mailto:mirnadie@gmail.com">mirnadie@gmail.com</a></b>	<b>5%</b>
<b>Bárbara da Rocha Fonseca</b>	<b>015.742.150-35</b>	<b><a href="mailto:barbfonseca@hotmail.com">barbfonseca@hotmail.com</a></b>	<b>5%</b>
<b>Lucielli Savegnago</b>	<b>814.851.150-00</b>	<b><a href="mailto:lucielisavegnago@yahoo.com.br">lucielisavegnago@yahoo.com.br</a></b>	<b>5%</b>
<b>Diego Alves</b>	<b>824.007.760-91</b>	<b><a href="mailto:diego.alves@ufpel.edu.br">diego.alves@ufpel.edu.br</a></b>	<b>5%</b>
<b>Gelson Perin</b>	<b>538.463.380-87</b>	<b><a href="mailto:gelsonperin@yahoo.com.br">gelsonperin@yahoo.com.br</a></b>	<b>5%</b>
<b>Raquel Guimarães Jacob</b>	<b>828.268.037-00</b>	<b><a href="mailto:raquelgjacob@yahoo.com.br">raquelgjacob@yahoo.com.br</a></b>	<b>5%</b>
<b>Eder João Lenardão</b>	<b>673.666.869-72</b>	<b><a href="mailto:elenardao@uol.com.br">elenardao@uol.com.br</a></b>	<b>5%</b>
<b>Manoela do Sacramento</b>	<b>027.282.370-85</b>	<b><a href="mailto:manoelasacramento@hotmail.com">manoelasacramento@hotmail.com</a></b>	<b>5%</b>



**UFPEL**

## **Envio do formulário**

Este formulário, juntamente com o Formulário de Busca de Anterioridade e o Termo de Autorização e Cessão, deve ser completamente preenchido, impresso e protocolado, com seus eventuais anexos, junto à **Secretaria da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação**.



[ Pesquisa em documentos de patentes e outras publicações técnicas ]

NOMEDO PESQUISADOR (Gestor do Projeto): Sibeles Borsuk

Nº DO PROJETO: Código COCEPE 6326

UNIDADE / ÁREA: Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTEC/Biotecnologia

DATA: 10/08/17

**OBJETO DA PESQUISA:** Formulação antiparasitária a partir de quinolina-1,2,3-triazol carboxamidas**PROJETO:** Estudo dos efeitos farmacológicos e moleculares de compostos orgânicos derivados de quinolina-1,2,3-triazol carboxamidas em *Trichomonas vaginalis***CLASSIFICAÇÕES:**

- IPC: A61P 33/00, A61P 33/02, A61P 33/10
- CPC:

**BANCO E BASE DE DADOS: INPI - (<http://www.inpi.gov.br/>)**

"Atividade antiparasitária" "7-cloroquinolinas" / 0 documentos localizados

"Atividade antiparasitária" "1,2,3-triazóis" / 0 documentos localizados

"Atividade antiparasitária" "7-cloroquinolino-1,2,3-triazol carboxamidas" / 0 documentos localizados

"Antiparasitic activity" "7-chloroquinoline" / 0 documentos localizados

"Antiparasitic activity" "1,2,3-triazoles" / 0 documentos localizados

"Antiparasitic activity" "7-chloroquinoline-1,2,3-triazoyl carboxamides" / 0 documentos localizados

"*Trichomonas vaginalis*" "7-cloroquinolinas" / 0 documentos localizados"*Trichomonas vaginalis*" "1,2,3-triazóis" / 0 documentos localizados"*Trichomonas vaginalis*" "7-cloroquinolino-1,2,3-triazol carboxamidas" / 0 documentos localizados"*Trichomonas vaginalis*" "7-chloroquinoline" / 0 documentos localizados"*Trichomonas vaginalis*" "1,2,3-triazoles" / 0 documentos localizados"*Trichomonas vaginalis*" "7-chloroquinoline-1,2,3-triazoyl carboxamides" / 0 documentos localizados

**BANCO E BASE DE DADOS: Google Patents - ([www.google.com/patents](http://www.google.com/patents))**

“Atividade antiparasitária” “7-cloroquinolinas” / 0 documentos localizados  
“Atividade antiparasitária” “1,2,3-triazóis” / 0 documentos localizados  
“Atividade antiparasitária” “7-cloroquinolino-1,2,3-triazoil carboxamidas” / 0 documentos localizados

"Antiparasitic activity" "7-chloroquinoline" / 0 documentos localizados  
"Antiparasitic activity" "1,2,3-triazoles" / 4 documentos localizados  
"Antiparasitic activity" "7-chloroquinoline-1,2,3-triazoyl carboxamides" / 0 documentos localizados

*Trichomonas vaginalis* “7-cloroquinolinas” / 0 documentos localizados  
*Trichomonas vaginalis* “1,2,3-triazóis” / 0 documentos localizados  
*Trichomonas vaginalis* “7-cloroquinolino-1,2,3-triazoil carboxamidas” / 0 documentos localizados

*Trichomonas vaginalis* “7-chloroquinoline” / 0 documentos localizados  
*Trichomonas vaginalis* “1,2,3-triazoles” / 0 documentos localizados  
*Trichomonas vaginalis* “7-chloroquinoline-1,2,3-triazoyl carboxamides” / 0 documentos localizados

**BANCO E BASE DE DADOS: PORTAL CAPES - (<http://www.periodicos.capes.gov.br>)**

“Atividade antiparasitária” “7-cloroquinolinas” / 0 documentos localizados  
“Atividade antiparasitária” “1,2,3-triazóis” / 0 documentos localizados  
“Atividade antiparasitária” “7-cloroquinolino-1,2,3-triazoil carboxamidas” / 0 documentos localizados

"Antiparasitic activity" "7-chloroquinoline" / 22 documentos localizados  
"Antiparasitic activity" "1,2,3-triazoles" / 13 documentos localizados  
"Antiparasitic activity" "7-chloroquinoline-1,2,3-triazoyl carboxamides" / 0 documentos localizados

*Trichomonas vaginalis* “7-cloroquinolinas” / 0 documentos localizados  
*Trichomonas vaginalis* “1,2,3-triazóis” / 0 documentos localizados  
*Trichomonas vaginalis* “7-cloroquinolino-1,2,3-triazoil carboxamidas” / 0 documentos localizados

*Trichomonas vaginalis* “7-chloroquinoline” / 13 documentos localizados  
*Trichomonas vaginalis* “1,2,3-triazoles” / 5 documentos localizados  
*Trichomonas vaginalis* “7-chloroquinoline-1,2,3-triazoyl carboxamides” / 0 documentos localizados

**BANCO E BASE DE DADOS: USPTO (EUA) - (<http://patft.uspto.gov/>)**

"Antiparasitic activity" "7-chloroquinoline" / 0 documentos localizados

"Antiparasitic activity" "1,2,3-triazoles" / 2 documentos localizados

"Antiparasitic activity" "7-chloroquinoline-1,2,3-triazoyl carboxamides" / 0 documentos localizados

"*Trichomonas vaginalis*" "7-chloroquinoline" / 0 documentos localizados

"*Trichomonas vaginalis*" "1,2,3-triazoles" / 1 documento localizado

"*Trichomonas vaginalis*" "7-chloroquinoline-1,2,3-triazoyl carboxamides" / 0 documentos localizados

**BANCO E BASE DE DADOS: ESPACENET (EUROPA)-(<http://worldwide.espacenet.com/>)**

"Antiparasitic activity" "7-chloroquinoline" / 0 documentos localizados

"Antiparasitic activity" "1,2,3-triazoles" / 0 documentos localizados

"Antiparasitic activity" "7-chloroquinoline-1,2,3-triazoyl carboxamides" / 0 documentos localizados

"*Trichomonas vaginalis*" "7-chloroquinoline" / 0 documentos localizados

"*Trichomonas vaginalis*" "1,2,3-triazoles" / 0 documento localizado

"*Trichomonas vaginalis*" "7-chloroquinoline-1,2,3-triazoyl carboxamides" / 0 documentos localizados

**OUTROS BANCOS E BASES DE DADOS: (Identificar)**

PALAVRAS-CHAVE 01 / Nº DE DOCUMENTOS LOCALIZADOS

... / ...

... / ...

PALAVRAS-CHAVE n n / Nº DE DOCUMENTOS LOCALIZADOS

**AVISO IMPORTANTE**

A busca prévia de anterioridade é uma amostragem e não verifica os documentos de patentes que estão em período de sigilo a partir da data de pedido de depósito, nos escritórios oficiais, que é de 18 meses. Portanto se algum documento similar ou igual estiver no período de sigilo, vale o recurso para o primeiro depositante. Além do que foi exposto anteriormente, a busca prévia não garante a abrangência do campo de pesquisa bibliográfica na totalidade da literatura técnica publicada no mundo.

**RESULTADO DAS PESQUISAS**

Segundo sua pesquisa, foram encontradas anterioridades? [ ] Não [ X ] Sim

Caso tenham sido encontradas anterioridades, preencha a tabela a seguir com as informações solicitadas.

Nºda Patente	Descrição	Base	Classificação Internacional
US20150025042A1	Compounds for treating proliferative disorders	USPTO	A61K 31/15 C07C 261/04 C07C 281/06 C07C 307/04 C07C 311/49 C07C 311/51 C07C 337/06 C07D 207/34 C07D 207/36 C07D 233/74 C07D 263/48 C07D 271/10 C07D 271/113 C07D 307/66 C07F 9/44 A61K 31/16 A61K 31/166 A61K 31/18 C07C 257/22 C07C 255/66 C07C 243/28 C07C 327/56 C07C 243/42 C07C 243/14 A61K 31/277 C07F 9/46 C07F 9/22 C07C 311/55 C07C 243/34 A61K 31/664 A61K 31/4245 A61K 31/40 A61K 31/341
US20120101096A1	Compounds and methods for treating mammalian gastrointestinal microbial infections	USPTO	A61K 31/535
US20050159493A1	Methods for modulating macrophage proliferation using polyamine analogs	USPTO	A61K 31/155



WO201010818 7A2	Compounds and methods for treating mammalian gastrointestinal microbial infections	Google Patents	C07D 401/12 C07C 233/15 C07C 235/24 C07C 235/38 C07C 237/20 C07C 255/60 C07C 275/28 C07C 275/30 C07C 275/42 C07C 309/15 C07D 209/08 C07D 209/12 C07D 209/30 C07D 215/38 C07D 235/26 C07D 237/32 C07D 249/06 C07D 263/56 C07D 263/57 C07D 295/192 C07D 401/04 C07D 401/14 C07D 409/04 C07D 413/04 C07D 417/04 C07D 417/14 C07D 471/08 C07D 491/052
CA2574335C	Veterinary composition comprising an arylpyrazole and a nitroenamine with antiparasitic activity	Google Patents	A01N 43/08 A01N 43/40 A01N 43/56 A01N 43/647 A01N 43/707 A01N 43/74 A01N 43/78 A61K 31/4178 A61K 31/4192 A61K 31/44
US200302038 59A1	Anthelmintic compounds	Google Patents	A61K 31/415 A61K 31/41 A61K 31/395 A61K 31/33 A61K 31/00 A61K A61 A
WO200504195 0A1	Ectoparasitocidal formulations of spinosyns and azole pesticides	Google Patents	A61K 31/365 A61K 31/366 A61K 31/415 A61K 31/4164 A61K 31/4192
WO201515107 9A2	Auristatin analogues and their conjugates with cell-biding molecules	Google Patents	A61K 47/48638 A61K 47/48384 A61K 47/48584 C07D 403/12 C07D 405/14

Você teve orientação para realizar a pesquisa de anterioridade?  Sim  Não  
Especificar: \_\_\_\_\_

A unidade ou inventor tem interesse em patentear o invento?  Sim  Não

Existe alguma empresa interessada no projeto?  Sim  Não

### NOTA EXPLICATIVA DO RESULTADO DA PESQUISA:

Os resultados encontrados nos bancos de dados de depósitos de patentes permitem entender o panorama da utilização que compostos químicos semelhantes ao dos compostos apresentado nesta patente e a análise e descrição dos documentos de patente permite um maior entendimento de suas aplicações biológicas, farmacêuticas e/ou clínicas. Por fim, as patentes descritas a seguir compõem, pelo menos em parte, o estado da técnica do uso dos compostos derivados de quinolina-1,2,3-triazol-carboxamidas como compostos antiparasitários.

A patente US20150025042A1, trata de compostos análogos de Taxol®, bem como de um polímero contendo o Taxol®, seus sais e pró-fármacos, os quais induzem proteção celular através do aumento dos níveis citoplasmáticos e de superfície celular da proteína do choque térmico 70 (Hsp 70) e a aplicação destes no tratamento de desordens proliferativas. A patente trata ainda de compostos citotóxicos a linhagens celulares de câncer, inclusive multirresistentes, e capazes de aumentar a atividade antiproliferativa e apoptóticas dos análogos de Taxol® e taxano. Os compostos derivados de 1,2,3-triazóis são citados apenas nas referências e como radicais orgânicos a serem adicionados no composto padrão para testes relacionados ao tratamento das desordens proliferativas. A patente não faz menção aos compostos derivados de quinolina-1,2,3-triazol-carboxamidas e também não trata de suas aplicações biológicas.

A patente US20120101096A1, reivindica compostos derivados de triazóis e 1,2,3-triazóis, amidas, ésteres, cetonas, pirazóis, ureia e ftalazinonas como inibidores da enzima inosina-5-monofosfato desidrogenase, a qual está envolvida na biossíntese de nucleotídeos do tipo guanina. Os compostos foram reivindicados como um método de inibição do crescimento celular e indução de morte para uso em diversos gêneros de bactérias, fungos e protozoários, dentre eles, os gêneros *Trichomonas* e *Tritrichomonas*. Porém, nenhum dos compostos derivados de triazóis descritos, representa os compostos derivados de quinolina-1,2,3-triazol-carboxamidas, compostos a serem descritos no presente pedido de patente.

A patente US20050159493A1, refere-se a compostos análogos de poliaminas, bem como seus sais e outros derivados, contendo mitoguazona e/ou sais de mitoguazona dicloridrato como moduladores da proliferação de macrófagos para o tratamento de doenças associadas a macrófagos, tais como demência associada a HIV, linfoma non-Hodgkin's associado a HIV e doença de Alzheimer. Além disso, os compostos descritos podem ser usados como métodos para desacelerar o desenvolvimento, auxiliar o diagnóstico e monitorar o tratamento dessas doenças. Os compostos derivados de 1,2,3-triazóis são citados apenas na seção de fundamentos da invenção e estado da técnica, porém os derivados de quinolina-1,2,3-triazol-carboxamidas e suas utilizações não são descritos.

A patente WO2010108187A2, trata-se de um documento depositado no banco de dados mundial de patentes o qual refere-se aos inventos, e suas aplicações, contidos na patente US20120101096A1, previamente descrita. A patente WO2010108187A2 foi escrita e depositada primeiro e conta com um maior número de reivindicações e de figuras, enquanto a patente US20120101096A1 é mais específica quanto as aplicações dos compostos derivados de triazóis e 1,2,3-triazóis, amidas, ésteres, cetonas, pirazóis, ureia e ftalazinonas como inibidores da enzima inosina-5-monofosfato desidrogenase.

A patente CA2574335C, reivindica composições antiparasitárias contendo uma combinação de compostos de arilpirazóis e nitroenaminas, mais especificamente para formulação de kits com essas combinações e o uso das respectivas combinações e kits no controle de infestações de animais por insetos e ácaros parasitas e ainda, na produção de medicamentos inseticidas e acaricidas. Os compostos derivados de 1,2,3-triazóis são citados apenas na seção de fundamentos da invenção e estado da técnica como detentores de potencial pesticida, mas não há nenhuma descrição relacionadas aos os derivados de quinolina-1,2,3-triazol-carboxamidas e suas utilizações.

A patente US20030203859A1, refere-se à combinação de avermectinas e milbemicinas, em composições sinérgicas, e seus derivados contendo compostos diaril e sua aplicação no controle de parasitas, principalmente no combate a helmintos. Os compostos triazóis, derivados de N-fenil-pirazóis, são citados apenas na seção de fundamentos da invenção e estado da técnica como detentores de potencial antihelmíntico, antiprotozoário e artropodocida, mas não se faz nenhuma citação quanto aos compostos derivados de quinolina-1,2,3-triazol-carboxamidas e suas aplicações.

A patente WO2005041950A1 trata de formulações a partir da combinação de pesticidas azólicos com espinosinas como componentes ativos para o controle de ectoparasitas, tais como, carrapatos e moscas. Além disso, a aplicação simultânea ou sequencial da combinação ou dos ingredientes ativos separadamente pode ser usada como diferentes métodos de tratamento de infestações por ectoparasitas. Os compostos derivados de 1,2,3-triazóis são citados apenas na seção de fundamentos da invenção e estado da técnica como detentores de potencial pesticida, porém os não a patente não faz referência aos compostos derivados de quinolina-1,2,3-triazol-carboxamidas e suas aplicações.

A patente WO2015151079A2, reivindica compostos análogos de auristatinas, principalmente a monometil auristatina F, como agentes citotóxicos, a conjugação desses agentes citotóxicos com agentes de ligação celular, a preparação e as utilizações terapêuticas dessas moléculas e seus conjugados para a interrupção e retardamento do crescimento celular anormal e/ou proliferação celular. A patente reivindica ainda que os compostos descritos podem ser usados para o tratamento de doenças infecciosas como a tricomoníase, causada por *Trichomonas vaginalis*, parasita que pode ser reconhecido pelos agentes de ligação celular supracitados, segundo descrito na patente. Os derivados de triazóis são reivindicados na patente como ligantes, mas os compostos derivados de quinolina-1,2,3-triazol-carboxamidas, compostos a serem descritos no presente pedido de patente, não são descritos.



A busca no Portal Capes resultou em um total de 53 documentos encontrados, para as quatro diferentes associações de palavras-chave, como previamente descrito. Após uma análise de todos os documentos, verificou-se que estes representavam artigos científicos e resenhas, não tendo sido encontrado entre eles nenhum documento de pedido e/ou concessão de patente, por este motivo os resultados da busca não foram adicionados a tabela de resultados das pesquisas.

Diante dos resultados encontrados após a busca nos bancos de dados de depósitos de patentes, é possível afirmar que apesar de compostos derivados de triazóis, um dos compostos orgânicos presentes na composição dos compostos presentes neste pedido de patente, terem sido testados contra *Trichomonas vaginalis*, não há descrição de testes realizados com os compostos derivados de quinolina-1,2,3-triazolil-carboxamidas.

Considerando ainda que todas as outras patentes encontradas demonstram aplicações diferentes da proposta e também em muitos casos descrevem compostos diferentes, o objetivo da presente patente intitulada: "Formulação antiparasitária a partir de quinolina-1,2,3-triazolil-carboxamidas", se mostra altamente relevante.

<hr/> Responsável pela Busca	<hr/> Responsável pelo Projeto
---------------------------------	-----------------------------------



**REIVINDICAÇÕES**

1. Derivados sintéticos de quinolina-1,2,3-triazoil carboxamidas caracterizado por 1-(7-Cloroquinolino-4-il)-5-metil-N-fenil-1H-1,2,3-triazoil-4-carboxamida; 1-(7-Cloroquinolino-4-il)-N,5-difenil-1H-1,2,3-triazoil-4-carboxamida; 1-(7-Cloroquinolino-4-il)-N-fenil-5-(trifluorometil)-1H-1,2,3-triazoil-4-carboxamida.
2. Formulação farmacêutica antiparasitária caracterizado por conter o composto conforme reivindicação 1.
3. Formulação farmacêutica antiparasitária caracterizado por conter o composto conforme reivindicação 1, associados à fármacos de uso padrão com atividade anti-*Trichomonas vaginalis*, tais como Metronidazol e Tinidazol.
4. Formulação farmacêutica antiparasitária contendo quinolina-1,2,3-triazoil carboxamidas, associados ou não à fármacos de uso padrão de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado por possuir as seguintes vias de administração: via oral, sublingual, parenteral, cutânea, nasal, oftálmica, auricular, pulmonar, vaginal e retal.
5. Formulação farmacêutica antiparasitária contendo quinolina-1,2,3-triazoil carboxamidas, de acordo com as reivindicações de 1, 2, 3 e 4, caracterizado por possuir as seguintes formas farmacêuticas: comprimido, cápsula, pastilhas, drágeas, pós para reconstituição, gotas, xarope, solução oral, suspensão, soluções e suspensões injetáveis, soluções tópicas, pomadas, cremes, loção, gel, adesivos, spray e gotas nasais, colírios e pomadas oftálmicas, gotas auriculares ou otológicas e pomadas auriculares, aerossol, comprimidos vaginais, cremes, pomadas, óvulos, supositórios e enemas.
6. Formulação farmacêutica, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3 caracterizado por compreender em especial atividade anti-*Trichomonas vaginalis* na faixa de 6,25-200µM/mL.

**FORMULAÇÃO ANTIPARASITÁRIA A PARTIR DE QUINOLINA-1,2,3-  
TRIAZOIL CARBOXAMIDAS**

**RESUMO**

A presente invenção apresenta o uso de derivados de quinolina-1,2,3-triazoil-carboxaminas (QTCA), em formulações farmacêuticas com atividade antiparasitária. A presente invenção compreende o desenvolvimento de fármacos e medicamentos contendo QTCA em sua composição. Até o momento as QTCA, objeto alvo da presente patente, ainda não haviam sido descritas ou avaliadas quanto às suas atividades antiparasitárias. A ação antiparasitária foi observada quando testadas as QTCA em *Trichomonas vaginalis*. Os parasitos demonstraram alterações de motilidade e morfologia indicadoras de morte parasitária. Esses resultados confirmam que as QTCA são moléculas com potencial farmacológico e que podem ser utilizadas na composição de diversas formas farmacêuticas. Setor técnico: A61P 33/00, A61P 33/02, A61P 33/10.

**FORMULAÇÃO ANTIPARASITÁRIA A PARTIR DE QUINOLINA-1,2,3-  
TRIAZOIL-CARBOXAMIDAS**

**CAMPO DA INVENÇÃO**

[001] A presente invenção refere-se ao uso de derivados sintéticos de quinolina-1,2,3-triazoil carboxamidas, em formulações farmacêuticas com atividade antiparasitária. A presente invenção compreende ainda o desenvolvimento de fármacos e medicamentos contendo derivados de quinolina-1,2,3-triazoil carboxamidas em sua composição. Está enquadrada dentro da classificação internacional de patentes nos campos de invenção A61P 33/00, A61P 33/02, A61P 33/10.

**FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO E ESTADO DA TÉCNICA**

[002] As quinolinas são moléculas descobertas em 1842 a partir da decomposição da quinina (uma substância extraída de plantas do gênero *Cinchona*) e são caracterizadas como compostos heterocíclicos, aromáticos e nitrogenados. Em sua estrutura, possuem duplo anel benzênico fusionado a piridina, no qual o átomo de carbono da posição 1 é substituído por um átomo de nitrogênio (**Manske, R.H. The Chemistry of Quinolines. Chemical Reviews, v. 30, p.113-144, 1942**). As quinolinas e seus derivados representam uma importante classe de moléculas orgânicas, as quais constantemente despertam o interesse nas áreas de síntese e química medicinal, estão presentes em diversas substâncias naturais, principalmente alcaloides derivados de plantas, mas também podem ser compostos sintetizados laboratorialmente (**Wilhem, E. A., Machado, N. C., Pedroso, A. B., Goldani, B. S., Seus, N., Moura, S., ... & Alves, D. Organocatalytic synthesis and evaluation of 7-chloroquinoline-1,2,3-triazoyl carboxamides as potential antinociceptive, anti-inflammatory and anticonvulsant agent. RSC Adv., v. 4, p.41437-41445, 2014**).

[003] A importância do núcleo quinolínico pode ser evidenciada pelo grande número de fármacos, obtidos por via sintética, comercialmente disponíveis que contêm esse núcleo em sua estrutura, como é o caso de dois derivados clorados: o clioquinol, fármaco utilizado em diversas infecções fúngicas cutâneas e o cloroquina, antisséptico que apresenta atividade antibacteriana e antifúngica (Mao, J., Yuan, H., Wang, Y., Wan, B., Pieroni, M., Huang, Q., ... & Franzblau, S. G. **From serendipity to rational antituberculosis drug discovery of mefloquine-isoxazole carboxylic acid esters. Journal of medicinal chemistry, v. 52, n. 22, p. 6966-6978, 2009**). Os primeiros derivados quinolínicos foram inicialmente desenvolvidos para substituir a quinina no tratamento da malária, pois a mesma possuía alta toxicidade e ocasionavam inúmeros efeitos colaterais. As pesquisas resultaram então no desenvolvimento dos derivados 4-amino-quinolínicos (cloroquina e a amodiaquina), do derivado piperidínico (mefloquina) e dos derivados 8-aminoquinolínicos (primaquina e a tafenoquina) como potenciais compostos antimaláricos (Cunico, W., Carvalho, S. A., Gomes, C. R., & Marques, G. H. **Fármacos antimalaríais - História e perspectivas. Rev. Bras. Farm, v. 89, n. 1, p. 49-55, 2008**).

[004] Em estudo recente, uma série de compostos enantiômeros de 4-aminoálcool quinolinas foram testados *in vitro* para a atividade antimalárica. Os seis enantiômeros com configuração S-absoluta [(S)-1 a (S)-6] testados demonstraram forte atividade antimalárica *in vitro* contra as duas cepas de *Plasmodium falciparum* (W2 e 3D7) e apresentaram IC50 mais baixo que os fármacos padrão (cloroquina e mefloquina), tendo sido o composto (S)-2 o melhor para ambas as cepas do parasito, com IC50 de 6,98 e 8,33 nmol/L para as cepas W2 e 3D7, respectivamente. Ao mesmo tempo, todos os derivados de 4-aminoálcool quinolinas testados levaram a inibição da formação de  $\beta$ -hematina maior do que a mefloquina porém menor do que a cloroquina (Mullié, C., Jonet, A., Desgrouas, C., Taudon, N., Sonnet, P. **Differences in anti-malarial activity of 4-aminoalcohol quinoline enantiomers and investigation of the presumed underlying**

**mechanism of action. Malaria Journal, v. 11, n. 1, p. 65-71, 2012).** Os mecanismos de ação exatos dos fármacos quinolínicos ainda deve ser melhor elucidado de forma específica para cada grupo de derivados, mas acredita-se que no caso da atividade antimalárica esse mecanismo baseia-se na inibição da biocristalização da hemozoína, o que conduz à liberação do grupo heme, que é tóxico ao parasito devido à sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio **(Muraleedharan, K. M., & Avery, M. A. Advances in the discovery of new antimalarials. Compr. Med. Chem. II, v. 7, p. 765-814, 2007).**

[005] Além disso, quinolinas que incorporam heterociclos, desempenham um papel importante na pesquisa da química medicinal e já demonstraram atividades biológicas e propriedades farmacológicas, como por exemplo: antitumorais, antioxidantes, antituberculose, antifúngica, antibacteriana, anti-inflamatórias, antidepressivas e antiprotozoário **(Begnini, K. R., Duarte, W. R., da Silva, L. P., Buss, J. H., Goldani, B. S., Fronza, M., ... & Collares, T. Apoptosis induction by 7-chloroquinoline-1, 2, 3-triazoyl carboxamides in triple negative breast cancer cells. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 91, p. 510-516, 2017; Dorey, G., Lockhart, B., Lestage, P., Casara, P. New quinolinic derivatives as centrally active antioxidants, Bioorgan. Med. Chem. Lett., v. 10, p. 935-939, 2000; Candéa, A. L., Ferreira, M. D. L., Pais, K. C., Cardoso, L. N. D. F., Kaiser, C. R., Maria das Graças, M. D. O., ... de Souza, M. V. Synthesis and antitubercular activity of 7-chloro-4-quinolinyldrazones derivatives. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, v. 19, n. 22, p. 6272-6274, 2009; Musiol, R., Jampilek, J., Buchta, V., Silva, L., Niedbala, H., Podeszwa, B., ... & Polanski, J. Antifungal properties of new series of quinoline derivatives. Bioorganic & medicinal chemistry, v. 14, p.3592-3598, 2006; Ferretti, M. D., Neto, A. T., Morel, A. F., Kaufman, T. S., Larghi, E. L. Synthesis of symmetrically substituted 3,3-dibenzyl-4-hydroxy-3,4-dihydro-1H-quinolin-2-ones, as novel quinoline derivatives with antibacterial activity. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 81, p. 253-266, 2014;**

Wilhem, E. A., Machado, N. C., Pedroso, A. B., Goldani, B. S., Seus, N., Moura, S., ... & Alves, D. Organocatalytic synthesis and evaluation of 7-chloroquinoline-1,2,3-triazoyl carboxamides as potential antinociceptive, anti-inflammatory and anticonvulsant agent. *RSC Adv.*, v. 4, p.41437-41445, 2014; Di Pietro, O., Vicente-García, E., Taylor, M. C., Berenguer, D., Viayna, E., Lanzoni, A., Sola, I., Sayago, H., Riera, C., Fisa, R., Clos., M. V., Pérez, B., Kelly. J. M., Lavilla, R., Munoz-Torrero, D. Multicomponent reaction-based synthesis and biological evaluation of tricyclic heterofused quinolines with multi-trypanosomatid activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 105, p. 120-137, 2015).

Um estudo avaliou a atividade tripanossomática e leishmanicida *in vitro*, a permeabilidade cerebral, a citotoxicidade contra células L6 de fibroblasto de rato e a atividade inibitória de acetilcolinesterase de 22 compostos derivados de quinolinas tricíclicas heterofusionadas. A atividade tripanossomática foi testada nas cepas 221 de *Trypanosoma brucei* e MHOM/ES/2203/BCN590 (Tcl) de *Trypanosoma cruzi*. Já a atividade leishmanicida foi testada na cepa MCAN/ES/92/BCN722. Todos os compostos derivados de quinolinas heterofusionadas contendo um grupo aminometilfenil protonável no anel B foram mais potentes contra *T. brucei* que o fármaco padrão. A maior parte dos compostos testados também mostrou-se ativo contra *T. cruzi* seguindo o mesmo perfil encontrado para *T. brucei*, com destaque para os compostos derivados de quinolinas heterofusionadas contendo um grupo aminometilfenil protonável no anel B. Todos os compostos testados demonstraram atividade leishmanicida com valores de IC50 baixos e com a maior parte dos compostos demonstrando-se mais potente que o fármaco padrão. Por fim, a piranoquinolina (composto 39) foi selecionada como composto com melhor potencial anti múltiplos protozoários baseado em seus valores de IC50 para os três parasitos, em sua permeabilidade cerebral, na sua atividade inibitória de acetilcolinesterase e em suas propriedades gerais (Di Pietro, O., Vicente-García, E., Taylor, M. C., Berenguer, D., Viayna, E., Lanzoni, A., Sola, I., Sayago, H., Riera, C., Fisa, R., Clos., M.

V., Pérez, B., Kelly. J. M., Lavilla, R., Munoz-Torrero, D. **Multicomponent reaction-based synthesis and biological evaluation of tricyclic heterofused quinolines with multi-trypanosomatid activity. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 105, p. 120-137, 2015**). Os exemplos e estudos citados demonstram então a potencialidade do uso dos derivados quinolínicos e a necessidade do estudo de outras atividades biológicas ou até mesmo da atividade sobre outros parasitas.

[006] Além das quinolinas, as moléculas da classe dos azóis também são compostos que despertam interesse na química medicinal. Dentre eles, destacam-se os triazóis, que têm sido muito estudados pelo fato de possuírem um vasto campo de aplicações. Os triazóis são heterociclos de cinco membros contendo três átomos de nitrogênio como substituintes e apresentam em sua estrutura seis elétrons  $\pi$ . Como todos os azóis, são compostos exclusivamente sintéticos, não existindo indicações que eles possam ser encontrados na natureza. Devido a isso, são diversas as rotas sintéticas, clássicas ou mais atuais, que permitem a obtenção desses compostos (**Mello, J., Donnici, C. L., Augusti, R., Ferreira, V. F., Souza, M., Ferreira, M. Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. Química Nova, v. 29, p. 569-579, 2006**). Dentre as vias sintéticas de produção desses compostos está a cicloadição 1,3-dipolar de azidas, porém por utilizar metais de transição essa tecnologia possui restrições, pois os metais podem ocasionar danos biológicos. Sendo assim, uma metodologia alternativa que tem sido aplicada é a síntese organocatalítica, a qual produz triazóis funcionalizados a partir da cicloadição enamida-azida de azidas orgânicas e/ou compostos carbonílicos (**Wilhem, E. A., Machado, N. C., Pedroso, A. B., Goldani, B. S., Seus, N., Moura, S., ... & Alves, D. Organocatalytic synthesis and evaluation of 7-chloroquinoline-1,2,3-triazoyl carboxamides as potential antinociceptive, anti-inflammatory and anticonvulsant agent. RSC Adv., v. 4, p.41437-41445, 2014**). A síntese organocatalítica tem sido aplicada para produção de moléculas da classe dos triazóis, dentre as quais

destacam-se os compostos de 1,2,3-triazóis, que são moléculas atraentes para conectar unidades pois são estáveis à degradação metabólica e capazes de ligação de hidrogênio, o que pode ser favorável na união de alvos biomoleculares e pode melhorar a solubilidade. Moléculas sintéticas contendo unidades de 1,2,3-triazóis já foram descritas como detentoras de diversas atividades biológicas, incluindo antituberculose, antibacteriana, anticancerígena e anti-*Leishmania* (Wilhem, E. A., Machado, N. C., Pedroso, A. B., Goldani, B. S., Seus, N., Moura, S., ... & Alves, D. Organocatalytic synthesis and evaluation of 7-chloroquinoline-1,2,3-triazoyl carboxamides as potential antinociceptive, anti-inflammatory and anticonvulsant agent. RSC Adv., v. 4, p.41437-41445, 2014; Agalave, S.G., Maujan, S.R., Pore, V.S. Click chemistry: 1,2,3-triazoles as pharmacophores. Chem. Asian J., v. 6, p. 2696-2718, 2011; Masood, M. M., Hasan, P., Tabrez, S., Ahmad, M. D., Yadava, U., Daniliue, C. G., Sonawane, Y. A., Azam, A., Rub, A., Abid, M. Anti-leishmanial and citotoxic activities of amino acid-triazole hybrids: Synthesis, biological evaluation, molecular docking and *in silico* physico-chemical properties. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2017).

[007] Um estudo recente avaliou a atividade de dezoito novos compostos de 1,2,3-triazóis associados a uma cauda de aminoácidos sobre a forma promastigota da cepa Dd8 de *Leishmania donovani in vitro*. Três dos compostos testados (40, 43 e 53) demonstraram atividade leishmanicida promissora, além de não terem apresentado citotoxicidade sobre células THP-1 de macrófagos. O trabalho realizou ainda análises de docking destes três compostos e observou que estes apresentam interações com resíduos do sítio catalítico da enzima tripanotiona redutase, essencial para manutenção do ambiente redutor e sobrevivência do parasita, demonstrando assim a potencialidade destes compostos como antiparasitários (Masood, M. M., Hasan, P., Tabrez, S., Ahmad, M. D., Yadava, U., Daniliue, C. G., Sonawane, Y. A., Azam, A., Rub, A., Abid, M. Anti-leishmanial and citotoxic activities of amino acid-triazole hybrids: Synthesis, biological evaluation, molecular docking and



***in silico* physico-chemical properties. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2017).** Em um outro estudo, analisou-se a atividade antituberculose *in vitro* de dezessete novos análogos de 1,4-di-substituídos 1,2,3-triazóis derivados de 4-fenilfenol. Seis desses compostos demonstraram atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (isolado ATCC 25177), com concentração inibitória mínima (MIC) variando entre 0,78 a 3,12 µg/mL, e apresentaram melhor atividade quando comparados aos medicamentos antituberculose convencionais. Além disso, esses compostos não apresentaram citotoxicidade em células de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos (MBMDMQs) (Ali, A. A., Gogoi, D., Chaliha, A. K., Buragohain, A. K., Trivedi, P., Saikia, P. J., Gehlot, P. S., Kumar, A., Chaturvedi, V., Sarma, D. **Synthesis and biological evaluation of novel 1,2,3-triazole derivatives as anti-tubercular agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 27, p. 3098-3703, 2017).** Os exemplos citados demonstram o potencial biológico dos 1,2,3-triazóis, bem como de seus derivados e sugerem que adição destes compostos em derivados quinolínicos pode levar a obtenção de moléculas com alto potencial biológico, inclusive para pesquisa e possível utilização como fármacos antiparasitários.

[008] Em adição aos artigos científicos, os bancos de dados de depósitos de patentes são uma importante fonte de informações para o entendimento da produção científica e tecnológica relacionada aos compostos derivados de quinolina-1,2,3-triazol carboxamidas e as suas aplicações farmacológicas. O estado da técnica destes compostos se torna mais claro a partir dos dados encontrados nas patentes descritas a seguir.

[009] A patente US20150025042A1, trata de compostos análogos de Taxol®, bem como de um polímero contendo o Taxol®, seus sais e pró-fármacos, os quais induzem proteção celular através do aumento dos níveis citoplasmáticos e de superfície celular da proteína do choque térmico 70 (Hsp 70) e a aplicação destes no tratamento de desordens proliferativas. A patente trata ainda de compostos citotóxicos a linhagens celulares de câncer,

inclusive multirresistentes, e capazes de aumentar a atividade antiproliferativa e apoptóticas dos análogos de Taxol® e taxano. Os compostos derivados de 1,2,3-triazóis são citados apenas nas referências e como radicais orgânicos a serem adicionados no composto padrão para testes relacionados ao tratamento das desordens proliferativas. A patente não faz menção aos compostos derivados de quinolina-1,2,3-triazol-carboxamidas e também não trata de suas aplicações biológicas.

[010] A patente US20120101096A1, reivindica compostos derivados de triazóis e 1,2,3-triazóis, amidas, ésteres, cetonas, pirazóis, ureia e ftalazinonas como inibidores da enzima inosina-5-monofosfato desidrogenase, a qual está envolvida na biossíntese de nucleotídeos do tipo guanina. Os compostos foram reivindicados como um método de inibição do crescimento celular e indução de morte para uso em diversos gêneros de bactérias, fungos e protozoários, dentre eles, os gêneros *Trichomonas* e *Tritrichomonas*. Porém, nenhum dos compostos derivados de triazóis descritos, representa os compostos derivados de quinolina-1,2,3-triazol-carboxamidas, compostos a serem descritos no presente pedido de patente.

[011] A patente WO2010108187A2, trata-se de um documento depositado no banco de dados mundial de patentes o qual refere-se aos inventos, e suas aplicações, contidos na patente US20120101096A1, previamente descrita. A patente WO2010108187A2 foi escrita e depositada primeiro e conta com um maior número de reivindicações e de figuras, enquanto a patente US20120101096A1 é mais específica quanto as aplicações dos compostos derivados de triazóis e 1,2,3-triazóis, amidas, ésteres, cetonas, pirazóis, ureia e ftalazinonas como inibidores da enzima inosina-5-monofosfato desidrogenase.

[012] A patente US20050159493A1, refere-se a compostos análogos de poliaminas, bem como seus sais e outros derivados, contendo mitoguazona e/ou sais de mitoguazona dicloridrato como moduladores da proliferação de macrófagos para o tratamento de doenças associadas a macrófagos, tais como demência associada a

HIV, linfoma non-Hodgkin's associado a HIV e doença de Alzheimer. Além disso, os compostos descritos podem ser usados como métodos para desacelerar o desenvolvimento, auxiliar o diagnóstico e monitorar o tratamento dessas doenças. Os compostos derivados de 1,2,3-triazóis são citados apenas na seção de fundamentos da invenção e estado da técnica, porém os derivados de quinolina-1,2,3-triazol-carboxamidas e suas utilizações não são descritos.

[013] A patente CA2574335C, reivindica composições antiparasitárias contendo uma combinação de compostos de arilpirazóis e nitroenaminas, mais especificamente para formulação de kits com essas combinações e o uso das respectivas combinações e kits no controle de infestações de animais por insetos e ácaros parasitas e ainda, na produção de medicamentos inseticidas e acaricidas. Os compostos derivados de 1,2,3-triazóis são citados apenas na seção de fundamentos da invenção e estado da técnica como detentores de potencial pesticida, mas não há nenhuma descrição relacionadas aos os derivados de quinolina-1,2,3-triazol-carboxamidas e suas utilizações.

[014] A patente US20030203859A1, refere-se à combinação de avermectinas e milbemicinas, em composições sinérgicas, e seus derivados contendo compostos diaril e sua aplicação no controle de parasitas, principalmente no combate a helmintoses. Os compostos triazóis, derivados de N-fenil-pirazóis, são citados apenas na seção de fundamentos da invenção e estado da técnica como detentores de potencial antihelmíntico, antiprotozoário e artropodicida, mas não se faz nenhuma citação quanto aos compostos derivados de quinolina-1,2,3-triazol-carboxamidas e suas aplicações.

[015] A patente WO2005041950A1 trata de formulações a partir da combinação de pesticidas azólicos com espinosinas como componentes ativos para o controle de ectoparasitas, tais como, carrapatos e moscas. Além disso, a aplicação simultânea ou sequencial da combinação ou dos ingredientes ativos separadamente pode ser usada como diferentes métodos de

tratamento de infestações por ectoparasitas. Os compostos derivados de 1,2,3-triazóis são citados apenas na seção de fundamentos da invenção e estado da técnica como detentores de potencial pesticida, porém a patente não faz referência aos compostos derivados de quinolina-1,2,3-triazolil-carboxamidas e suas aplicações.

[016] A patente WO2015151079A2, reivindica compostos análogos de auristatinas, principalmente a monometil auristatina F, como agentes citotóxicos, a conjugação desses agentes citotóxicos com agentes de ligação celular, a preparação e as utilizações terapêuticas dessas moléculas e seus conjugados para a interrupção e retardamento do crescimento celular anormal e/ou proliferação celular. A patente reivindica ainda que os compostos descritos podem ser usados para o tratamento de doenças infecciosas como a tricomoníase, causada por *Trichomonas vaginalis*, parasita que pode ser reconhecido pelos agentes de ligação celular supracitados, segundo descrito na patente. Os derivados de triazóis são reivindicados na patente como ligantes, mas os compostos derivados de quinolina-1,2,3-triazolil-carboxamidas, compostos a serem descritos no presente pedido de patente, não são descritos.

[017] Diante dos resultados encontrados após a busca nos bancos de dados de depósitos de patentes, é possível afirmar que apesar de compostos derivados de triazóis, um dos compostos orgânicos presentes na composição dos compostos presentes neste pedido de patente, terem sido testados contra *Trichomonas vaginalis*, não há descrição de testes realizados com os compostos derivados de quinolina-1,2,3-triazolil-carboxamidas.

[018] Considerando ainda que todas as outras patentes encontradas demonstram aplicações diferentes da proposta e também em muitos casos descrevem compostos diferentes, o objetivo da presente patente intitulada: "Formulação antiparasitária a partir de quinolina-1,2,3-triazolil-carboxamidas", se mostra altamente relevante.

## SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[019] A presente invenção se refere ao uso de derivados de quinolina-1,2,3-triazoil carboxamidas, com o objetivo de obter formulações farmacêuticas com atividade antiparasitária.

[020] A ação antiparasitária foi observada através da exposição de *Trichomonas vaginalis* aos derivados de quinolina-1,2,3-triazoil carboxamidas, pois os parasitos demonstraram alterações morfológicas indicadoras de morte parasitária na concentração de 80  $\mu$ M, de acordo com o composto apresentado no exemplo 1 (**Figura 2, 3 e 4**).

## DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

[021] A presente invenção destina-se ao uso de derivados sintéticos de quinolina-1,2,3-triazoil carboxamidas (QTCA). Adicionalmente o presente pedido trata de composições farmacêuticas contendo os componentes e seu uso em formulações antiparasitárias.

[022] Os compostos utilizados no presente invento foram sintetizados no Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL) da Universidade Federal de Pelotas, onde foram obtidos com rendimentos isolados de 23 a 94% (**Figura 1**).

[023] Para referida patente, foram selecionados três compostos: 1-(7-Cloroquinolino-4-il)-5-metil-N-fenil-1H-1,2,3-triazoil-4-carboxamida (QTCA-1); 1-(7-Cloroquinolino-4-il)-N,5-difenil-1H-1,2,3-triazoil-4-carboxamida (QTCA-2); 1-(7-Cloroquinolino-4-il)-N-fenil-5-(trifluorometil)-1H-1,2,3-triazoil-4-carboxamida (QTCA-3) (Figura 1), os quais foram sintetizados por síntese organocatalítica pela reação de 4-azido-7-cloroquinolina com uma gama de  $\beta$ -oxoamidas na presença de uma quantidade catalítica de pirrolidina utilizando DMSO como solvente à temperatura ambiente, como descrito em um estudo anterior (**E.A. Wilhelm, N.C. Machado, A.B. Pedroso, B.S. Goldani, N. Seus, S. Moura, L. Savegnago, R.G. Jacob, D. Alves, Organocatalytic synthesis and evaluation of 7-chloroquinoline-1,2,3-triazoyl carboxamides as potential**

**antinociceptive, anti-inflammatory and anticonvulsant agent, RSC Adv. 4 (2014) 41437-41445,).**

[024] Para utilização como antiparasitário, as QTCA foram utilizadas na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , sendo diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) e testadas contra trofozoítos de *Trichomonas vaginalis*. A fim de confirmar a atividade das QTCA além dos controles negativo (somente trofozoítos de *T. vaginalis*) e positivo (100  $\mu\text{M}$  Metronidazol-Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), utilizou-se também de um controle com DMSO, não podendo este exceder a concentração de 0,6% em cada cavidade.

[025] Os exemplos a seguir demonstram que a QTCA teve eficaz ação antiparasitária "in vitro".

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

**Figura 1:** Estrutura química e rendimentos isolados dos compostos de QTCA-1, QTCA-2 e QTCA-3 sintetizados através da cicloadição enamida-azida entre  $\beta$ -cetoamidas e a 4-azido-7-cloroquinolina.

**Figura 2:** Rastreamento farmacológico da atividade antiparasitária dos compostos QTCA-1, QTCA-2 e QTCA-3, na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , contra isolado de *Trichomonas vaginalis*, ATCC 30236, através do ensaio com Azul de Trypan (0,4%) após 24 h de exposição. O crescimento de trofozoítos foi significativamente inibido pelo composto QTCA-2 em 24 h de incubação. Veículo para solubilização (DMSO 0,6%), metronidazol 100  $\mu\text{M}$  (MTZ), controle negativo (trofozoítos não tratados). Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos três experiências em triplicata. Letras diferentes indicam diferença significativa. Para todos  $p < 0,05$ .

**Figure 3:** Determinação MIC e  $\text{IC}_{50}$  de isolados de *Trichomonas vaginalis*, ATCC 30236, após tratamento com a QTCA-2 nas concentrações de 6,25, 12,5, 25, 50, 60, 70, 80, 90 e 100  $\mu\text{M}$  após 24 h de exposição. O crescimento de trofozoítos foi completamente inibido pelo composto QTCA-2 em 24 h de exposição, determinando a concentração de 80  $\mu\text{M}$  como MIC e 50  $\mu\text{M}$  como  $\text{IC}_{50}$ . Veículo para solubilização (DMSO 0,6%), metronidazol 100  $\mu\text{M}$  (MTZ), controle negativo (trofozoítos não tratados). Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos três experiências em triplicata. Letras diferentes indicam diferença significativa. Para todos  $p < 0,05$ .

**Figure 4:** Curva cinética de crescimento de *Trichomonas vaginalis* isolado ATCC 30236 após tratamento com QTCA-2 a 80 µM por períodos de 1, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h. O crescimento dos trofozoítos foi completamente inibido pela QTCA-2 em 24 h de incubação. Os dados representam a média ± desvio padrão de pelo menos três experiências em triplicata. Letras diferentes indicam diferença significativa. Para todos  $p < 0,05$ .

#### EXEMPLO

##### EXEMPLO 1 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*Trichomonas vaginalis* DE QUINOLINA-1,2,3-TRIAZOIL CARBOXAMIDAS (QTCA)

[026] Para avaliar a atividade tricomonocida *in vitro* dos derivados de quinolina-1,2,3-triazoil carboxamidas (QTCA), foram utilizados isolados de *Trichomonas vaginalis*, ATCC 30236, cultivados em meio Trypticase-extrato de levedo maltose (TYM) (**DIAMOND, L.S. The establishment of various *Trichomonas* of animals and man in axenic cultures. J Parasitol, v. 43, p. 488-490,1957**), sem ágar, pH 6,0, suplementado com 10% de soro bovino estéril, inativado a 56°C (**POLAT, Z.A., CETIN, A., SAVAGE, P.B. Evaluation of the *in vitro* activity of ceragenins against *Trichomonas vaginalis*. Acta Parasitologica, v. 61, n. 2, p. 376-81,2016**). Somente foram utilizadas nos ensaios, culturas que apresentaram 95% de viabilidade, comprovada através da exclusão por corante Azul de Trypan (0,4%), e análise da motilidade e morfologia dos trofozoítos, sendo considerados vivos aqueles que apresentavam motilidade positiva e ausência de coloração pelo corante. A observação foi realizada através de contagens em Câmara de Neubauer, em microscópio óptico (ampliação × 400).

[027] O rastreamento farmacológico da atividade antiparasitária das QTCA foi realizado em microplaca (96 cavidades, fundo chato - Cral®), onde os trofozoítos foram adicionados a cada cavidade na densidade inicial de  $2,6 \times 10^5$  trof/mL de TYM e incubados com os compostos em concentração final de 100 µM. No momento dos ensaios foi utilizado Dimetilsulfóxido (DMSO) como veículo de diluição dos compostos. A fim de confirmar a atividade dos QTCA, além dos controles negativo (somente trofozoítos) e positivo (100 µM Metronidazol-Sigma Aldrich), também foi avaliado um controle com

DMSO, não podendo este exceder a concentração de 0,6% de DMSO em cada cavidade. As placas ficaram armazenadas à 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h.

[028] Para determinar a concentração inibitória mínima (MIC), o ensaio foi realizado em microplacas (96 cavidades, fundo chato - Cral®), onde os trofozoítos foram adicionados na densidade inicial de  $2,6 \times 10^5$  trof/mL de TYM, incubados com os compostos. Inicialmente foi utilizada a técnica de diluição seriada, e se a atividade antiparasitária dos compostos ficasse entre intervalos maiores de concentrações na diluição seriada, era determinado o MIC em intervalos menores de concentrações, onde os mesmos seriam incubados com a concentração final de 6,25 µM até 100 µM, junto com os controles. As placas ficaram armazenadas à 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h.

[029] Após 24 h dos ensaios, os trofozoítos foram homogeneizados com Azul de Trypan (4%) na proporção 1:1. O preparado foi contado em Câmara de Neubauer, observado em microscópio óptico (ampliação × 400) e também foram observados parâmetros como motilidade e morfologia dos trofozoítos, sendo considerados vivos aqueles que apresentavam motilidade positiva e ausência de coloração pelo corante.

[030] Para confirmar o MIC, foram coletadas todas as cavidades contendo a concentração do MIC e as cavidades com concentrações acima e abaixo deste, além dos controles positivo, negativo e controle com DMSO. O conteúdo foi transferido para tubos de 2 mL tipo eppendorf e acrescido de 1,5 mL de meio TYM. Após, os tubos foram incubados em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 24, 48, 72 e 96 h. Para confirmar os resultados, a viabilidade dos trofozoítos foi avaliada pelo método de exclusão por Azul de Trypan (0,4%), além da análise da motilidade e morfologia, em cada um dos tempos citados. Após a confirmação do MIC, foi avaliado o IC<sub>50</sub> (metade da concentração inibitória máxima) nas concentrações de 6,25, 12,5, 25, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 µM.

[031] A fim de investigar o efeito da QTCA no crescimento de *T. vaginalis*, uma curva de crescimento cinético foi gerada utilizando



o isolado de ATCC 30236. O ensaio foi realizado em placas de microcultivo (96 cavidades, fundo chato - Cral®) e os parasitos na densidade inicial de  $2,6 \times 10^5$  trofozoítos/mL de TYM foram incubados com os compostos no valor do MIC, e também com os controles, à 37 °C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> até 24 h. A análise do crescimento foi realizada pelo método de exclusão por Azul de Trypan (0,4%) e a análise da motilidade e morfologia, foi realizada nos seguintes tempos: 1, 6, 12, 24, 48, 72 E 96 h.

[032] Foram realizados pelo menos três ensaios independentes em triplicata para todos os experimentos e os resultados foram expressos como a percentagem de trofozoítos viáveis em comparação com os parasitos não tratados. Os dados foram submetidos à análise unidirecional da variância (ANOVA), utilizando um valor de probabilidade de p 0,05. O teste de Tukey foi utilizado para identificar diferenças significativas entre as médias e entre os diferentes tratamentos (SPSS software).

[033] Ao analisar os dados obtidos no rastreamento farmacológico, o composto QTCA-2 reduziu a viabilidade dos parasitos em 100%, já os compostos QTCA-1 e QTCA-3 reduziram a viabilidade em 60% e 80%, respectivamente (**Figura 2**). Na determinação do MIC o composto QTCA-2 demonstrou ideal atividade anti-*T. vaginalis* na concentração de 80 µM, com indução de toxicidade completa (100% dos trofozoítos mortos. Também pode-se observar que a QTCA-2 na concentração de 50 µM, no período de exposição de 24 h, induziu perda de viabilidade em 50% dos trofozoítos, determinando-se assim o IC<sub>50</sub>. Os controles, negativo e com DMSO, apresentaram motilidade positiva e os trofozoítos não foram corados após exposição ao Azul de Trypan (0,4%). Já no controle positivo, os trofozoítos apresentaram coloração azul e motilidade negativa em todos os ensaios realizados, em 24 h de exposição (**Figuras 2 e 3**). Ao analisar a curva de crescimento cinético, percebe-se que QTCA-2 reduziu a viabilidade de crescimento do trofozoítos em 70% na concentração de 80 µM após 12 h de exposição e induziu toxicidade completa após 24 h (**Figura 4**).

[034] Esses resultados confirmam que as quinolina-1,2,3-triazol-carboxamidas são moléculas de alto potencial farmacológico, e que o seu potencial deve ser avaliado em diferentes agentes infecciosos.

## FIGURAS

Figura 1.

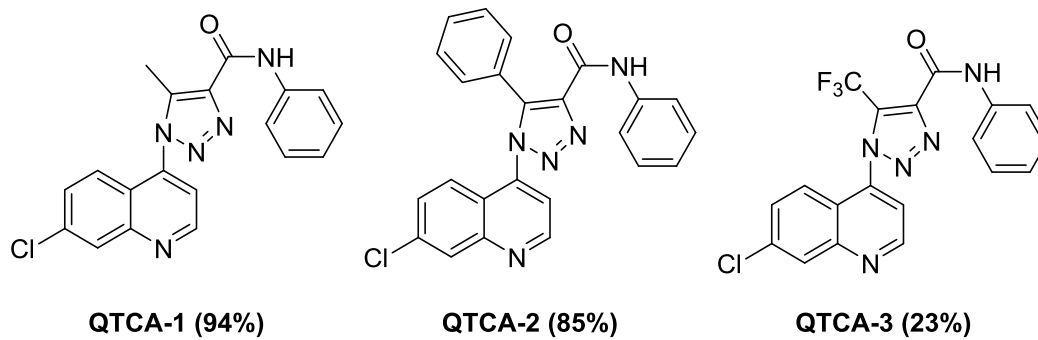


Figura 2.

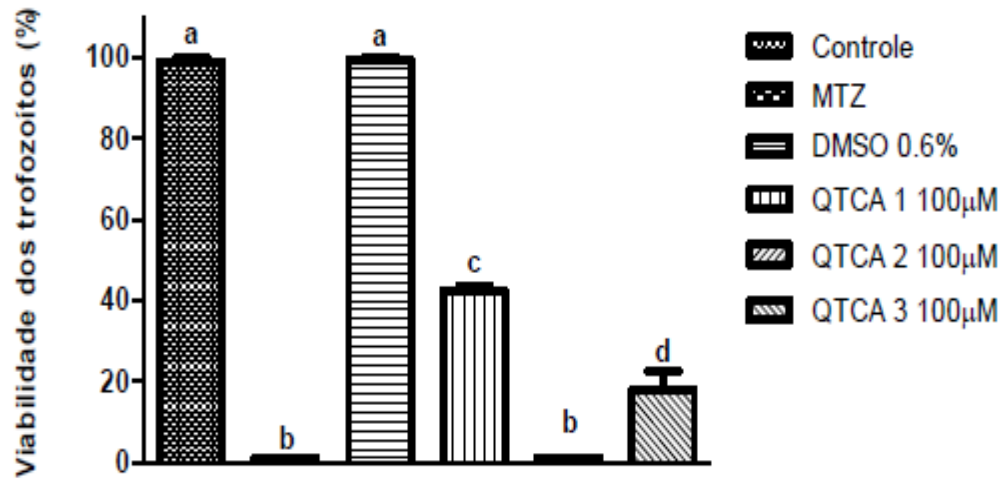


Figura 3.

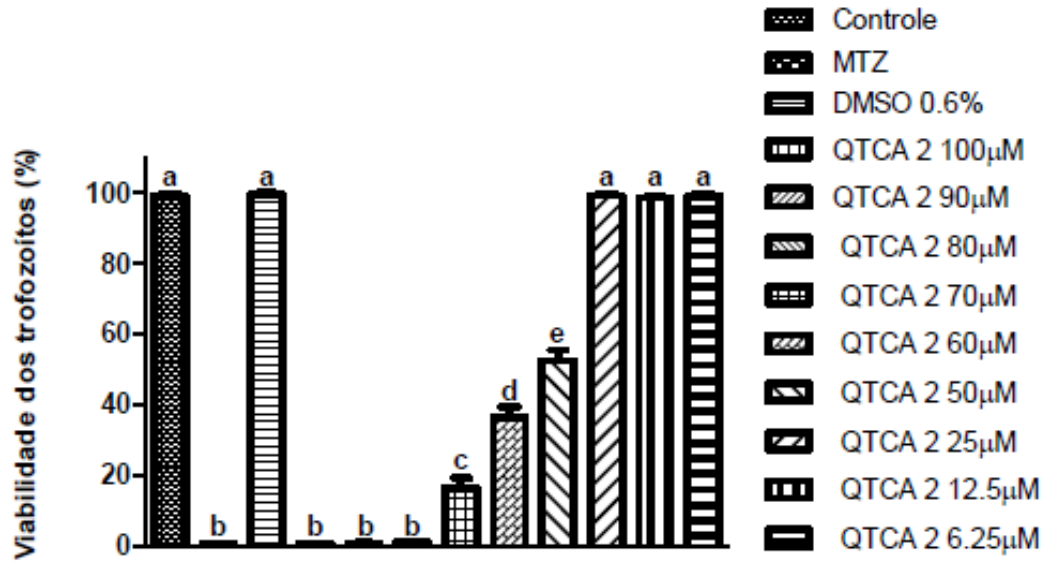


Figura 4.

