

EXPLORANDO POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DOS DERIVADOS BENZOFUROXANOS EM *TRICHOMONAS VAGINALIS*

RONYSSA DOS SANTOS RIBEIRO¹; MARJORIE DE GIACOMETI²; FILIPE OBELAR MARTINS³; YAN WAHAST ISLABÃO⁴; JULIA VICTORIA SANTOS DE SOUZA⁵; CAMILIA BELMONTE OLIVEIRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – ronyssaribeiro5742@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – marjorie.giacometi@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – obelar05@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – yanwahast06@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – julia.victoriabji@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – camilabelmontevet@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

As Infecções Sexualmente Transmissíveis (ISTs) causam um impacto significativo na saúde humana a curto e longo prazo (TORRONE et al., 2021). A tricomoníase, causada pelo protozoário *Trichomonas vaginalis*, é considerada a IST não viral, de maior prevalência mundial, com uma incidência de 156 milhões de casos (ROWLEY, 2019).

Esse parasito acomete o sistema gênito-urinário de homens e mulheres. Geralmente a infecção apresenta-se de forma assintomática na maioria dos casos, entretanto podem ser sintomáticos. Em mulheres, os sintomas se manifestam por corrimento vaginal, disúria, dor abdominal e prurido. Os homens geralmente são assintomáticos, mas podem apresentar sintomas que incluem o surgimento de corrimento peniano, uretrite, disúria e prostatite (VAN GERWEN et al., 2021). Atualmente, os medicamentos usados para tratar a infecção, são os 5nitroimidazois, porém a taxa de resistência a medicamentos varia entre 11% e 28%, o que representa um problema em constante crescimento (MTSHALI et al., 2022). Acredita-se que a capacidade da resistência ao metronidazol (MTZ) está relacionada com o genoma do parasito (GRAVES et al., 2023).

Os benzofuroxanos (BZX) são heterociclos de oxigênio importantes por possuírem compostos bioativos sintéticos e naturais (KHANAM; SHAMSUZZAMAN 2015), sendo assim, utilizados como base construtora para diversos medicamentos com propriedades farmacológicas, incluindo antiparasitária (THÉVENIN et al., 2013), oxidantes (KARATAS et al., 2006) e antioxidantes (CHAND et al., 2017). Atualmente, é significativamente importante a busca de novos compostos bioativos tanto na indústria agroquímica quanto na farmacêutica, onde mais de 60% dos principais medicamentos disponíveis no mercado possuem pelo menos um núcleo heterocíclico como parte integrante da estrutura geral do composto (MCGRATH; BRICHACEK; NJARDARSON, 2010; KHANAM; SHAMSUZZAMAN, 2015).

Além disso, a propagação da resistência parasitária e variações na suscetibilidade medicamentosa do parasito, devido aos diversos problemas relacionados a eficácia do tratamento e a cura da enfermidade se faz necessário desenvolver e testar novas substâncias (CERECCETO, GONZÁLEZ, 2007). Este estudo tem como objetivo, avaliar a atividade antiparasitária e antioxidante/oxidante através das técnicas de Ensaio de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), Ensaio de Neutralização do Radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) e Ensaio de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de compostos derivados benzofuroxanos N-óxidos denominados EH1, EH2, EH3 assim como a atividade antioxidante/oxidante em *T. vaginalis*.

2. METODOLOGIA

Os compostos utilizados nesta pesquisa foram sintetizados no laboratório LabSelen-NanoBio, localizado na Universidade Federal de Santa Maria. Eles são denominados de acordo com a nomenclatura IUPAC (DE GIACOMETI et al., 2023). Abaixo, estão listados os compostos juntamente com suas respectivas nomenclaturas:

Composto EH1:

"N-Óxido de 6-(2-(3-(4-fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-carbonil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol"

Composto EH2:

"N-Óxido de 6-(2-(3-(4-metoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-5-carbonil)hidrazina-1-carbonil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol"

Composto EH3:

"N-Óxido de 6-(2-(3-(4-clorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-carbonil)hidrazina-1-carbonil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol"

O protozoário *T. vaginalis* (ATCC 30236, sensível ao MTZ) foi cultivado em meio TYM (pH 6,0) com estreptomicina (5 mg/mL) e 10% de soro bovino inativado, incubado a 37 °C em condições aeróbicas. A viabilidade (>95%) foi confirmada por exclusão com azul de tripano (0,4%).

Para o ensaio *in vitro* com *T. vaginalis* (2×10^6 trofozoítos/mL) em placas de 96 poços, incubado com compostos EH1, EH2, EH3 em diferentes concentrações (25 µM, 55 µM, 65 µM, 75 µM, 100 µM), diluídos com dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,6% e os grupos controles, com DMSO, controle negativo com meio de cultivo com o parasito e o controle positivo com metronidazol MTZ (100 µM) por 24h a 37 °C e 5% CO₂. A viabilidade foi avaliada por azul de tripano (0,4%) em câmara de Neubauer e o IC₅₀ calculada no GraphPad Prism 8.0.1.

Para o ensaio de atividade antioxidante/oxidante foi realizado o ROS em *T. vaginalis* (2×10^6 trofozoítos) tratado com EH1, EH2, EH3 (55 µM, 75 µM e 100 µM) e avaliados por 24 h, 48 h, 72 h e 96 h (55 µM também em 5 h) juntamente com os grupos controles. Após incubação, adicionou-se DCF-DA (10 µM) por 1h a 37 °C. Posteriormente, as amostras foram transferidas para um tampão Tris-HCl com pH 7,4 a uma concentração de 10 mM, seguido de leitura da fluorescência (excitação/emissão 480/520nm). Os níveis de ROS foram quantificados em termos de unidades arbitrárias de fluorescência e os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência.

A atividade antioxidante foi avaliada pelo ensaio com o radical estável (DPPH), baseado em reação de transferência de elétron único e remoção de átomo de hidrogênio. Os compostos (55 µM, 75 µM e 100 µM) foram incubados em solução etanólica de DPPH (50 µL), mantidos no escuro por 30 minutos, e a absorbância foi registrada a 517 nm. Utilizou-se como controle positivo o ácido ascórbico e Trolox (100 µM), como controle negativo a solução de DPPH com água destilada e como controle veículo o DMSO 0,6%. Os resultados foram expressos como porcentagem de neutralização do radical em comparação com o controle negativo (CHOI et al., 2002).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ensaio *in vitro*, os compostos EH1, EH2 e EH3 apresentaram atividade tricomonicida, inibindo 100% dos trofozoítos a 100 µM. Nas concentrações menores, EH2 e EH3 mantiveram 100% de inibição a 55 µM e 75 µM. EH1 teve desempenho inferior nessa concentração, mas ainda inibiu mais de 90% a 75 µM. Controles negativo e DMSO não afetaram os trofozoítos, enquanto MTZ, controle positivo, inibiu completamente os trofozoítos (100%). A eficácia de compostos benzofuroxanos confirma o potencial antiprotozoário, como relatado em outros estudos realizados com *Trypanosoma cruzi* (PETRY et al., 2021).

A avaliação da atividade oxidante e antioxidante reforça o caráter dual dos benzofuroxanos, que podem tanto gerar estresse oxidativo para danificar o parasita quanto neutralizar radicais livres, um aspecto importante para seu potencial terapêutico e toxicidade controlada (CHAND et al., 2017; CHUGUNOVA et al., 2023). No ensaio ROS, os compostos induziram a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em diferentes tempos e concentrações, com exceção de 55 µM aos 5h, onde não houve diferença. No composto, EH1 foi observado um aumento a partir de 72h, EH2 e EH3 após 96h. O mecanismo provavelmente envolve a interação com a membrana celular e a liberação de espécies reativas (RNS e ROS), como observado em estudos prévios (GUTIERREZ et al., 2009). Os ensaios TBARS indicaram que EH1, EH2 e EH3 causaram danos significativos à integridade da membrana lipídica do parasita. A peroxidação pode estar relacionada ao desequilíbrio oxidativo provocado pela geração de ROS, que foi demonstrada nos ensaios, reforçando que o estresse oxidativo é um possível mecanismo da atividade antiparasitária (GROTTO et al., 2009).

O estresse oxidativo causa danos celulares ao parasita, como por exemplo, a peroxidação lipídica da membrana (TBARS). Também a ausência de glutatona e catalase relatada em *T. vaginalis* limitando a formação de espécies reativas de oxigênio, o que favorece o dano oxidativo provocado pelos compostos (MAYER et al., 2009).

Neste estudo, foi observado no ensaio de neutralização do radical (DPPH), apenas o composto EH3 apresentou atividade antioxidante consistente, neutralizando o radical de forma dose-dependente em todas as concentrações testadas (55, 75 e 100 µM). O composto EH1 apresentou atividade apenas em 100 µM. Já o EH2 não demonstrou capacidade de neutralização em nenhuma das concentrações, não exibindo potencial antioxidante frente ao radical (DPPH).

4. CONCLUSÕES

Concluímos que os compostos BZX (EH1, EH2 e EH3) apresentam atividade antiparasitária *in vitro* contra *T. vaginalis* nas diferentes concentrações testadas. Sugere-se que os possíveis mecanismos de ação estejam relacionados a alterações de membrana dos trofozoítos, com a geração de reativas de oxigênio, o que pode ter influenciado na morte do protozoário *in vitro*. Também pode-se sugerir que os BZX são promissores agentes antioxidantes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M. Benzofuroxan and furoxan: chemistry and biology. In: BLIAS, T. (Ed.). Bioactive Heterocycles IV. [S.I.]: Springer, 2007. p.265-308.

CHAND, K.; RAJESHWARI; HIREMATHAD, A.; SINGH, M.; SANTOS, M.A.; KERI, R.S. A review on antioxidant potential of bioactive heterocycle benzofuran: Natural and synthetic derivatives. *Pharmacological Reports*, [S.I.], v.69, n.2, p.281-295, 2017. doi:10.1016/j.pharep.2016.11.007.

CHUGUNOVA, E.; GIBADULLINA, E.; MATYLITSKY, K.; BAZARBAYEV, B.; NEGANOVA, M.; VOLCHO, K.; et al. Diverse Biological Activity of Benzofuroxan/Sterically Hindered Phenols Hybrids. *Pharmaceuticals*, [S.I.], v.16, n.4, p.499, 2023.

MEYER, Y.; BUCHANAN, B.B.; VIGNOLS, F.; REICHHELD, J.-P. Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. *Annual Review of Genetics*, Palo Alto, v.43, p.335-367, 2009. doi:10.1146/annurev-genet-102108-134201.

GROTTO, D.; MARIA, L.S.; VALENTINI, J.; PANIZ, C.; SCHMITT, G.; GARCIA, S.C.; et al. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Química Nova*, São Paulo, v.32, p.169-174, 2009.

GUTIERREZ, F.R.; MINEO, T.W.; PAVANELLI, W.R.; GUEDES, P.M.; SILVA, J.S. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.104, p.236-245, 2009. doi:10.1590/S0074-02762009000900030.

PETRY, D.S.L.; MAYER, J.C.P.; DE GIACOMETTI, M.; OLIVEIRA, D.T.; GARZON, L.R.; ENGELMANN, A.M.; MATOS, A.F.I.M.; BALDISSERA, M.D.; DORNELLES, L.; ANDRADE, C.M.; MONTEIRO, S.G. In vitro and in vivo trypanocidal activity of a benzofuroxan derivative against *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, [S.I.], v.226-227, p.108125, 2021. doi:10.1016/j.exppara.2021.108125.

ROWLEY, J.; VANDER HOORN, S.; KORENROMP, E.; LOW, N.; UNEMO, M.; ABU-RADDAD, L.J.; CHICO, R.M.; SMOLAK, A.; NEWMAN, L.; GOTTLIEB, S.; THWIN, S.S.; BROUTET, N.; TAYLOR, M.M. Global and regional estimates of sexually transmitted infections: prevalence and incidence of four curable infections—Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis, 2016. *Bulletin of the World Health Organization*, Geneva, v.97, n.8, p.548-562, 2019. doi:10.2471/BLT.18.228486.

TORRONE, E.A.; LEWIS, F.M.T.; KIRKCALDY, R.D.; BERNSTEIN, K.T.; RYERSON, A.B.; DE VOUX, A.; OLIVER, S.E.; QUILTER, L.A.S.; WEINSTOCK, H.S. Genital mycoplasma, shigellosis, zika, pubic lice, and other sexually transmitted infections: neither gone nor forgotten. *Sexually Transmitted Diseases*, Philadelphia, v.48, n.4, p.310-314, 2021. doi:10.1097/OLQ.0000000000001367.