



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIVIRULÊNCIA DO INIBIDOR DE
TRIPSINA ISOLADO DE *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI) CONTRA
Staphylococcus aureus e *Candida albicans***

JEANDERSON MARCELINO DA SILVA

RECIFE

2022

JEANDERSON MARCELINO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIVIRULÊNCIA DO INIBIDOR DE
TRIPSINA ISOLADO DE *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI) CONTRA
Staphylococcus aureus e *Candida albicans***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Sistemas Biológicos

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientador: Clovis Macêdo Bezerra Filho

RECIFE

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Silva, Jeanderson Marcelino da

Avaliação do potencial antivirulência do inibidor de tripsina isolado de *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI) contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* / Jeanderson Marcelino da Silva. – 2022.

87 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia.

Coorientador: Clovis Macêdo Bezerra Filho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2022.

Inclui referências e anexos.

1. Agentes anti-infecciosos. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. *Candida albicans*. I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orientadora). II. Bezerra filho, Clovis Macêdo (coorientador). III. Título.

616.9

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-120

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Parecer da Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação de Mestrado

JEANDERSON MARCELINO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIVIRULÊNCIA DO INIBIDOR DE
TRIPSINA ISOLADO DE *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI) CONTRA
Staphylococcus aureus e *Candida albicans***

Aprovado em: 21 / 02 / 2022

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia (orientadora)
(Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

Dr. Clovis Macêdo Bezerra Filho (Membro externo)
(Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP)

Dr. Wesley Felix de Oliveira (Membro externo)
(Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

Dedico esse trabalho a minha família, amigos e irmãos na fé por ter acreditado no meu potencial e pelo apoio nos momentos em que mais precisei.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e pelo seu amor inefável. A realização desse sonho só foi possível graças a sua bondade e misericórdia, pois Dele veio a força para que todos os processos fossem concretizados.

À minha família por todo amor, carinho e apoio para a conquista de mais um objetivo. Gratidão aos meus pais Tertulina e Jesseildo por sempre ter ensinado o caminho da verdade e por fazer do seu filho uma pessoa dedicada e sonhadora. Aos meus irmãos Jônatas e Isabel pelas orações e pelo apoio em todos os momentos.

À minha querida esposa Núbia pelo companheirismo e amor. Seu apoio nesses últimos meses foi indispensável para a conclusão dessa etapa, ao mesmo tempo que sua dedicação e foco na conquista do sonho dela também me inspiraram.

Aos meus parentes, especialmente Vó Branca, Tia Huelita, Michel, Tia Danny, Tia Eliane, Tia Lucineia, Paulo, Edson e todos os meus primos pela convivência. Esses entendem a importância de tudo isso na minha vida.

Aos irmãos/amigos da igreja, com menção a Márcio, Aleksandra e Mathias que estiveram presentes em quase todas fases da minha vida. Suas orações e presença significaram muito para mim.

Aos meus caros Alexandre e Rafael pela amizade e companhia nas seleções e concursos. A convivência com pessoas tão inteligentes como vocês, com certeza me influenciaram de forma positiva. O sonho ainda continua vivo!

Aos meus formidáveis colegas João, Gustavo e Renato pelas conversas e risadas que descontraem o estresse da rotina.

A Kleber, pessoa muito acolhedora que me recebeu durante o período de experimentos em Recife.

Ao meu sogro Silveira, à minha sogra Rúbia e à vó Josefa pelo carinho e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos meus queridos mestres da graduação pela participação significativa na minha formação, especialmente a Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior e Carolina Peixoto Magalhães, pessoas tão importantes na minha história científica.

Aos colegas Wesley, Isabel, João, Rafael Arthur, Bárbara e Máisa pela parceria, desde a ajuda com o projeto à realização dos experimentos em seus respectivos laboratórios.

Aos meus orientadores do mestrado, professora Maria Tereza dos Santos Correia e Clovis Macêdo Bezerra Filho pela disponibilidade, acolhida e ajuda em todo o desenvolvimento do trabalho. Mesmo com os desafios durante o trajeto, foram pacientes e relevantes para me orientar nos momentos de maior necessidade. Portanto, minha gratidão e respeito!

RESUMO

A prospecção por novos agentes antimicrobianos visando o tratamento de doenças causadas por patógenos tem aumentado nas últimas décadas, em decorrência do surgimento de cepas resistentes às terapias vigentes, mas também devido aos seus efeitos tóxicos. Bactérias e fungos apresentam vasto repertório de moléculas como as proteases, enzimas catalisadoras de ligações peptídicas que modulam processos como a infectividade e virulência. Esse estudo buscou investigar o potencial antivirulência de um Inibidor de Tripsina isolado de sementes de *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI) contra *Staphylococcus aureus* ATCC 02 e *Candida albicans* ATCC 90025. Executou-se ensaios *in vitro* para determinação de uma possível concentração inibitória mínima (MIC), atividade antibiofilme, inibição do pigmento estafiloxantina e análise anti-hemolítica contra a cepa *S. aureus*. Para avaliar a viabilidade de *C. albicans* na presença do EcTI foram realizados os ensaios anticandida, antibiofilme e de ruptura do biofilme maduro. O EcTI promoveu ação antivirulência contra esses patógenos oportunistas, dificultando a produção estafiloxantina da *S. aureus* em todas as concentrações analisadas (100, 200 e 400 µg/mL), pigmento que uma vez ausente torna a bactéria suscetível à defesa imunológica do hospedeiro. A capacidade de *S. aureus* em causar hemólise também foi significativamente inibida em todas as concentrações. O EcTI ainda prejudicou a formação do biofilme de *C. albicans*, promovendo inclusive a quebra do biofilme maduro na concentração de 400 µg/mL. Esse estudo oportuniza discussões sobre os mecanismos virulentos relacionados às proteases e aos efeitos provocados por inibidores como o EcTI.

Palavras-chave: EcTI; Virulência; *Staphylococcus aureus*; *Candida albicans*.

ABSTRACT

The prospection for new antimicrobial agents for the treatment of diseases caused by pathogens has increased in recent decades, as a result of the emergence of resistant strains to current therapies, but also due to its toxic effects. Bacteria and fungi present a vast repertoire of molecules such as proteases, enzymes that catalyze peptide bonds, essential for infectivity and virulence. This study aimed to investigate the antivirulence potential of a Trypsin Inhibitor isolated from *Enterolobium contortisiliquum* seeds (EcTI) against *Staphylococcus aureus* ATCC 02 and *Candida albicans* ATCC 90025. In vitro assays were performed to determine a possible minimum inhibitory concentration (MIC), antibiofilm activity, staphyloxanthin inhibition and antihemolytic effects against the *S. aureus*. In order to evaluate the viability of *C. albicans* in the presence of EcTI, anticandida, antibiofilm and rupture of mature biofilm assays were performed. EcTI promoted antivirulence action against these opportunistic pathogens, hindering the staphyloxanthin production of *S. aureus* at all concentrations analyzed (100, 200 e 400 µg/mL), pigment which, once absent, makes the bacterium susceptible to the host's immune defense. The ability of *S. aureus* to cause hemolysis was significantly inhibited at all concentrations. The EcTI also impaired the formation of the biofilm of *C. albicans*, even promoting the rupture of the mature biofilm at 400 µg/mL. This study provides opportunities for discussions on the virulent mechanisms related to proteases and the effects caused by inhibitors such as EcTI.

Keywords: EcTI; Virulence; *Staphylococcus aureus*; *Candida albicans*.

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1

Figura 1. Classificação dos complexos de Leishmania e agrupamento de suas respectivas espécies.....	21
Figura 2. Classificação das enzimas proteolíticas (proteases) e os tipos de resíduos de aminoácidos presentes seus sítios catalíticos.	24
Figura 3. Ação da metaloprotease gp63 na adesão de promastigotas ao epitélio intestinal do hospedeiro invertebrado.	34

Artigo 2

Figura 1. <i>S. aureus</i> ATCC 02 cultures untreated and treated with EcTI on the biofilm formation... ..	58
Figura 2. Effects of EcTI on the <i>S. aureus</i> ATCC 02 Staphyloxanthin inhibition.....	59
Figure 3. Effects of EcTI on the <i>S. aureus</i> ATCC 02 hemolysis capacity	60
Figura 4. Qualitative effect of EcTI on the hemolysis capacity of <i>S. aureus</i> ATCC 02	61
Figura 5. Effect of EcTI on the <i>C. albicans</i> biofilm formation.....	63
Figura 6. Effect of EcTI on the <i>C. albicans</i> biofilm disruption.....	64

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1. Relação de compostos sintéticos como potenciais candidatos para formulação de drogas inibitórias das proteases de <i>Leishmania</i> spp.	30
Tabela 2. Relação de compostos naturais como potenciais candidatos para formulação de drogas intentando a inibição das proteases de <i>Leishmania</i> spp.	37

LISTA DE SIGLAS

EcTI	<i>Enterolobium contortisiliquum</i> Trypsin Inhibitor (Inibidor de Tripsina de <i>Enterolobium contortisiliquum</i>)
IC ₅₀	Inhibitory concentration 50% (Concentração inibitória 50%)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
IFN γ	Interferon-gama
IL-12	Interleucina-12
IL-5	Interleucina-5
LC	Leishmaniose cutânea
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LV	Leishmaniose visceral
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
LPG	Lipofosfoglicano
GP63	Glicoproteína 63
NO	Óxido nítrico
ROS	Espécie reativa de oxigênio
DAN	Diazoacetil D-L-norleucina metil éster
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	Ácido egtazico
TDR	Redutase dependente de tiol
Asp	Asparagina
His	Histidina
Ser	Serina
Cys	Cisteína
Thr	Treonina
CPA	Cisteinoprotease A
CPB	Cisteinoprotease B
NaCl	Sodium chloride (Cloreto de sódio)
MIC	Minimum inhibitory concentration (Concentração inibitória mínima)
MHA	Mueller Hinton Agar
MHB	Mueller Hinton Broth
CFU	Colony-forming unit (Unidade formadora de colônia)

OD	Optical density (Densidade óptica)
STX	Staphyloxanthin (Estafiloxantina)
PBS	Phosphate buffered saline (Tampão fosfato salina)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1 Artigo 1 - MECANISMOS BIOLÓGICOS DA <i>LEISHMANIA</i> : PROTEASES COMO ALVO PROMISSOR PARA O CONTROLE DA INFECÇÃO.....	17
4 RESULTADOS	51
4.1 Artigo 2 - TRYPSIN INHIBITOR ISOLATED FROM <i>Enterolobium contortisiliquum</i> SEEDS AFFECTS THE VIRULENCE OF <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Candida albicans</i>	51
5 CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXO A - NORMAS DE SUBMISSÃO DE MANUSCRITOS PARA A REVISTA MICROBIOLOGICAL RESEARCH.....	72
ANEXO B -NORMAS DE SUBMISSÃO DE MANUSCRITOS PARA A REVISTA NATURAL PRODUCT RESEARCH	83

1 INTRODUÇÃO

O enfoque terapêutico baseado na utilização de compostos naturais se intensificou nas últimas décadas, a princípio como fonte inspiradora na bioprospecção por novos padrões moleculares bioativos e em suas possíveis aplicações para tratar complicações clínicas provocadas por agentes infecciosos, mas também em decorrência dos efeitos tóxicos e aumento da resistência de medicamentos sintéticos (BORGES *et al.*, 2017)

Dentre os diversificados compostos identificados a partir das fontes vegetais ganham destaque os inibidores de protease, moléculas capazes de bloquear a ação de enzimas proteolíticas (UPEGUI ZAPATA *et al.*, 2020). Essas proteases são indispensáveis para o desenvolvimento de todos os seres vivos, pela participação significativa na diferenciação de tecidos, degradação de moléculas da matriz extracelular, incluindo os mecanismos virulentos de organismos infecciosos como bactérias, fungos e protozoários (AGBOWURO *et al.*, 2018).

A hidrólise de ligações peptídicas através dessas proteases promove a liberação de peptídeos variados e também aminoácidos livres (MURI, 2014). Como a atividade inapropriada dessas enzimas podem estar associada à processos patológicos e aos fatores de virulência de patógenos, portanto, há a necessidade de regulação por meio de inibidores específicos (KARRAY *et al.*, 2020).

Esse duelo bioquímico entre inibidores e proteases decorre de diferentes maneiras, sendo mais comum a ocorrência de um bloqueio reversível de forte ligação entre os dois compostos. Existem 5 classes de inibidores as quais seguem a classificação de suas proteases específicas: serinoprotease, cisteínoprotease, aspartilprotease, metaloprotease e treoninoprotease, diferenciando-se pela presença de um aminoácido específico no centro da tríade catalítica como a Serina (Ser) nas serinoproteases, o grupo mais abundante, pois são encontrados em diversos tecidos vegetais, principalmente em folhas e sementes (OTLEWSKI *et al.*, 2005; SRIKANTH; CHEN, 2016).

Os inibidores de serinoprotease são também os mais versáteis dentre as 99 famílias descritas de inibidores (MEROPS, 2021). Dentro dessa família, além dos inibidores de elastase, calicreína pancreática, quimiotripsina, encontra-se o inibidor de tripsina, o qual muito dos seus efeitos estão relacionados com a proteção vegetal contra infestação de microrganismos patogênicos (RUAN *et al.*, 2011; SOUTO; BRANQUINHA; SANTOS, 2019).

As leguminosas, por sua vez, são fontes ricas para obtenção de inibidores de tripsina (AVILÉS-GAXIOLA; CHUCK-HERNÁNDEZ; SERNA SALDÍVAR, 2018). A espécie *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong é pertencente a subfamília Mimosoideae e também conhecida popularmente por “timbaúba” e “orelha-de-negro”, devido ao formato recurvado das sementes. *E. contortisiliquum* ainda se destaca pela sua plasticidade ecológica, pois a ocorrência é ampla em todo mundo. Todavia, seu sucesso adaptativo está relacionado majoritariamente às regiões tropicais e neotropicais de clima quente e temperado. No Brasil essa espécie é encontrada principalmente nos domínios fitogeográficos da Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga (BEZERRA; PINHEIRO; LUCENA, 2021; GBIF, 2021).

Das sementes de *E. contortisiliquum* muitos compostos já foram identificados e testados experimentalmente, com destaque para o Inibidor de Tripsina de *E. contortisiliquum* (EcTI, sigla em inglês), já conhecido pela versatilidade em diferentes efeitos biológicos, com repertório consolidado em razão da ação citotóxica em linhagens de células tumorais (BONTURI *et al.*, 2018; NAKAHATA *et al.*, 2011), além do efeito inseticida (DA SILVA FERREIRA *et al.*, 2019) e com capacidade de atenuar a inflamação pulmonar induzida por elastase (THEODORO-JÚNIOR *et al.*, 2017).

Estudos têm registrado o envolvimento da protease tripsina em eventos biológicos relacionados à infecção de patógenos como bactérias e fungos (AGBOWURO *et al.*, 2018; KARRAY *et al.*, 2020). Os desafios na contenção desses microrganismos pela atividade proteolítica da tripsina se concentram principalmente nas ações de virulência, caracterizados como medidas de evasão contra os mecanismos imunológicos do paciente (LYU *et al.*, 2015). Em razão disso, os problemas como a resistência aos antibióticos têm tomado uma atenção devida e por isso, a necessidade de novas opções que coordenem uma terapia eficiente contra esses microrganismos.

Tendo em vista a importância da ação proteolítica da tripsina em mecanismos vitais para microrganismos como *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, em especial, na participação de vias metabólicas relacionadas aos fatores de virulência, o uso de inibidores de tripsina pode ser uma solução a fim de atenuar os efeitos adversos em pacientes infectados, especialmente em razão da crescente resistência desses patógenos às drogas utilizadas na terapia vigente (ALENCAR DE BARROS *et al.*, 2021; ARAÚJO *et al.*, 2019).

Esses fatores de virulência de *S. aureus* prejudicam a ação de fármacos e, portanto, manifestam complicações clínicas severas como sepse e pneumonia, pela capacidade da

bactéria em formar biofilme, uma aglomeração de células embebidas em matriz heterogênea extracelular relevante para a persistência do patógeno. Além disso, a produção de estafiloxantina, um pigmento caroteinoide com propriedades antioxidantes aprimora a invasão e permanência de *S. aureus* em neutrófilos e macrófagos, junto à habilidade de causar hemólise em eritrócitos, devido a presença de uma exotoxina chamada hemolisina (ALENCAR DE BARROS *et al.*, 2021). Os mecanismos virulentos que levam *C. albicans* a driblar as defesas imunológicas do hospedeiro são similares ao de *S. aureus* no que diz respeito à formação de biofilme, habilidade que agrava as infecções mais comuns como a candidíase (AGUIAR *et al.*, 2020).

Nesse sentido, considerando a dificuldade no tratamento antibacteriano e antifúngico, faz-se necessária a busca por novas alternativas terapêuticas. Assim, o uso de compostos derivados de plantas como os inibidores de tripsina pode possibilitar a solução contra fatores de virulência e a viabilidade de microrganismos como *S. aureus* e *C. albicans*, uma vez que esses patógenos apresentam enzimas proteolíticas fundamentais para sobrevivência e patogenicidade.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Investigar o potencial antibacteriano, antifúngico e antivirulência *in vitro* do inibidor de tripsina isolado das sementes de *E. contortisiliquum* (EcTI) contra *S. aureus* e *C. albicans*

2.2 Objetivos Específicos

- Purificar o composto EcTI a partir de sementes de *E. contortisiliquum*;
- Avaliar a atividade antibacteriana do EcTI contra a cepa *S. aureus* ATCC 02;
- Analisar a capacidade inibitória do EcTI na formação de biofilme, contra a produção de estafiloxantina e como agente anti-hemolítico sobre *S. aureus* ATCC 02;
- Determinar a concentração inibitória 50% (IC₅₀) do EcTI contra *C. albicans* ATCC 90025;
- Analisar a ação do EcTI contra formação de biofilme e na ruptura do biofilme maduro de *C. albicans* ATCC 90025.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Artigo 1 - MECANISMOS BIOLÓGICOS DA *LEISHMANIA*: PROTEASES COMO ALVO PROMISSOR PARA O CONTROLE DA INFECÇÃO

Jeanderson Marcelino da Silva¹, Clovis Macêdo Bezerra¹, Meykson Alexandre da Silva¹, Maria Isabel de Assis Lima¹, Maria Luiza Vilela Oliva², Márcia Vanusa da Silva¹, Maria Tereza dos Santos Correia¹

¹Universidade Federal de Pernambuco, UFPE

²Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP

Manuscrito a ser submetido para a Revista Microbiological Research

ISSN: 1618-0623

Impact factor: 5.415

Qualis CAPES: A3 – Área: Ciências Biológicas I

Resumo

As proteases são moléculas que catalisam ligações peptídicas, ação importante para a morfologia, viabilidade, além de albergar fatores de virulência à diversos organismos patogênicos como os protozoários do gênero *Leishmania*. Esses parasitos provocam a leishmaniose, uma doença infecciosa e negligenciada que é responsável por milhares de mortes anualmente. A terapia atual para o controle da infecção se baseia no uso de drogas com diversas desvantagens como a elevada toxicidade e a invasiva administração. Nesse sentido, as proteases podem ser alvos promissores para o desenvolvimento de compostos com capacidade inibitória e com possibilidade de manifestar baixa toxicidade. Drogas de diferentes origens se mostraram eficazes no controle da infecção por intermédio do bloqueio das proteases, modulando ainda reação inflamatória através da produção de citocinas TNF- α , IFN γ e IL-12, essenciais para mediar a resposta imunológica contra microrganismos unicelulares como os parasitos da *Leishmania*. Outros compostos promoveram a ação antileishmania sem causar efeitos tóxicos aos macrófagos do hospedeiro mamífero. Essa revisão oferece recursos para compreensão dos principais mecanismos envolvendo as proteases e encoraja o uso de inibidores como uma abordagem terapêutica para redução dos efeitos clínicos da leishmaniose.

Palavras-chave: *Leishmania*. Inibidores de Protease. Virulência.

Introdução

A leishmaniose é uma doença emergente e negligenciada causada por protozoários do gênero *Leishmania* e se manifesta nas formas clínicas: cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV). A LV é a forma mais grave da enfermidade, causando danos sistêmicos e maior índice de óbitos quando não tratada corretamente, principalmente quando há a ocorrência da coinfeção *Leishmania*-HIV (BRASIL, 2016; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; SOUSA-GOMES *et al.*, 2011). É estimado anualmente 20.000 a 30.000 mortes causadas por leishmaniose, considerando-a assim, uma das seis endemias prioritárias do mundo, pois é um problema de saúde pública em 98 países (WHO, 2022).

Essa infecção é provocada por mais de 20 espécies de *Leishmania*, transmitida aos mamíferos através da picada de fêmeas de flebotomíneo infectadas, principalmente aquelas espécies presentes nos dois gêneros de grande importância epidemiológica, *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. O ciclo da doença é digenético, pois envolve uma forma

flagelada promastigota residente no intestino do inseto vetor, a qual se transforma na forma não flagelada amastigota e a partir desse evento, continua sua multiplicação dentro de vacúolos digestivos dos macrófagos no hospedeiro vertebrado (OLIVEIRA; DUTHIE; PEREIRA, 2020). No Novo Mundo, a principal espécie causadora da LV é a *L. infantum*, já a LC e LMC são causadas pela *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* (MELO; ROSSONI; TEODORO, 2017).

Segundo Nahidi *et al.* (2021), as atuais opções de tratamento contra as diferentes manifestações da leishmaniose apresentam limitações em decorrência da alta toxicidade, baixa seletividade além das complicações na administração desses fármacos. De fato, a WHO (2022) tem reportado para a dificuldade no uso dos medicamentos anti-leishmania, assim como Lyra *et al.* (2016) e Oliveira-Ribeiro *et al.* (2021) têm demonstrado os efeitos tóxicos de drogas usadas nessa terapia. Nesse sentido, são necessárias alternativas terapêuticas seguras, de fácil manejo e que tenham como alvo, moléculas específicas do parasito.

Por essa razão, essa revisão visa abordar mecanismos de ação de compostos com tais características e que podem ser pleiteados como possíveis fármacos para a terapia antileishmania. Para isso, estudos *in vitro*, *in vivo* e *in situ*, envolvendo moléculas e compostos diversos foram analisados a fim de evidenciar seus potenciais efeitos inibitórios na multiplicação, desenvolvimento e fatores de virulência dos parasitos do gênero *Leishmania*.

Metodologia

A análise de 90 estudos experimentais publicados entre os anos de 1997 e 2021 ocorreu após a seleção nos bancos de dados da PubMed, Science Direct, Bireme e também artigos integrados nas referências dos estudos previamente inclusos. Esses artigos estavam adequados aos descritores de busca, os quais foram definidos a partir da pergunta norteadora “Como é o mecanismo de ação da atividade antileishmania, considerando inibidores contra as específicas proteases do parasito?”. Utilizou-se os seguintes conjuntos de termos para a busca bibliográfica: protease inhibitor, proteinase inhibitor, peptidase inhibitor, serine protease, trypsin inhibitor, cysteine protease, aspartil protease, threonine protease, leishmanicidal effects, antileishmanial, leishmania, leishmanicida.

Caracterizando o gênero *Leishmania*

Mesmo com poucas diferenças morfológicas entre as diversas espécies de *Leishmania*, desde muito tempo tem existido divergências na sua classificação taxonômica. Atualmente a categorização mais aceita desses parasitos, inclusive aqueles de importância médica tem se baseado em critérios fenotípicos e moleculares, propondo o agrupamento em dois subgêneros considerando a localização das formas promastigotas no intestino do vetor invertebrado e através da análise de seus perfis enzimáticos (CUPOLILLO *et al.*, 2003).

O subgênero (L.) *Viannia* é caracterizado pelo desenvolvimento dos protozoários no intestino posterior do hospedeiro intermediário, tendo, portanto, um desenvolvimento peripilário e as análises bioquímicas de suas isoenzimas indicam-no como um grupo monofilético, uma vez que existe uma variedade significativamente pequena entre os membros do mesmo complexo. Já no subgênero (L.) *Leishmania*, o desenvolvimento dos parasitos acontece no intestino médio e anterior do hospedeiro invertebrado e os dados têm apontado para uma diversidade enzimática alta, indicando este grupo como polifilético (CUPOLILLO *et al.*, 2003; GONTIJO; MELO, 2004).

Paralelo a classificação desses protozoários em subgêneros e, portanto, considerando as características clínicas assim como a sua diversidade epidemiológica, as espécies de *Leishmania* podem ser agrupadas em complexos. O complexo *L. braziliensis* e o complexo *L. guyanensis* compreendem os dois conjuntos do subgênero *Viannia*, já os complexos *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major* e *L. mexicana* estão abrangidos no subgênero *Leishmania*, como ilustrado na figura 1 (LAINSON, 2010).

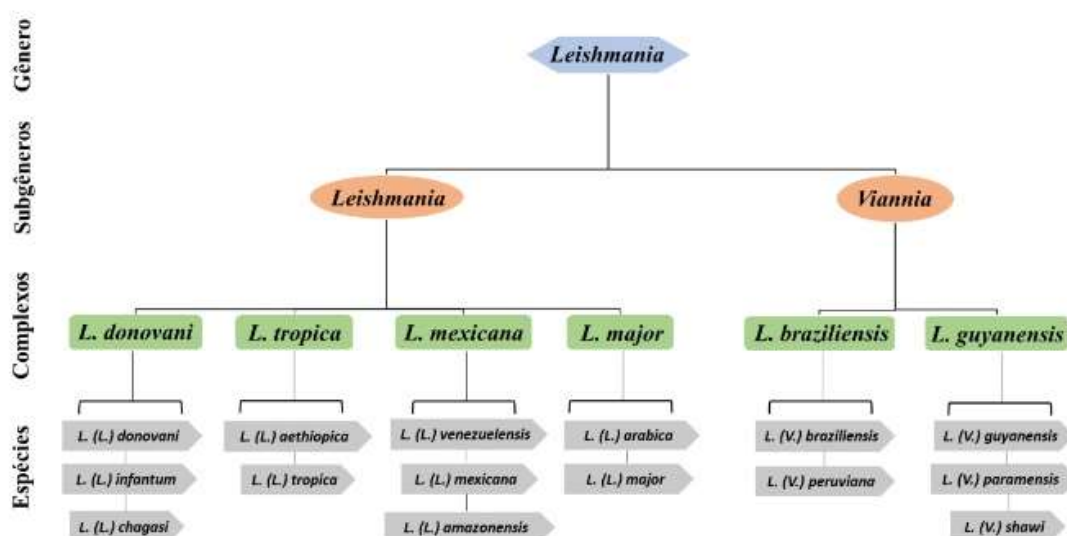


Figura 1. Classificação dos complexos de *Leishmania* e agrupamento de suas respectivas espécies.

Infectividade do protozoário e drogas disponíveis contra a leishmaniose

A infectividade desses microrganismos ocorre inicialmente graças ao lipofosfoglicano (LPG), molécula de superfície presentes nas formas promastigotas metacíclicas. Esse item estrutural propicia a entrada do protozoário nas células fagocíticas, assegurando ainda proteção contra lise provocada pelo sistema complemento, além de retardar a passagem das enzimas dos lisossomos para o vacúolo parasitóforo após a fusão entre as duas membranas, garantindo tempo para o protozoário se adaptar ao novo ambiente (FORESTIER; GAO; BOONS, 2015; MORADIN; DESCOTEAUX, 2012; REAL; MORTARA, 2012). Outras moléculas garantem após a instalação da *Leishmania* sua manutenção e manobras que driblam o sistema de defesa do hospedeiro, por isso são necessárias drogas que atenuem de forma precisa tais mecanismos.

A terapia disponível para o tratamento da leishmaniose apresenta algumas desvantagens por provocar efeitos adversos no organismo humano, principalmente em relação a baixa seletividade e alta toxicidade desses medicamentos. Os fármacos de primeira linha são os mais antigos desenvolvidos para esta finalidade e até hoje de primeira escolha terapêutica, compreendendo o grupo dos antimoniais pentavalentes, sendo: Antimoniato de meglumina e Estibogluconato de sódio (COMANDOLLI-WYREPKOWSKI *et al.*, 2017).

De forma geral, esses antimoniais inibem diversas vias metabólicas do parasito como a glicólise, além de causar inibição na tripanotona redutase, enzima importante do parasito para a proteção contra espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies de nitrogênio (NO) (WYLLIE; CUNNINGHAM; FAIRLAMB, 2004). Os mecanismos de resistência dos protozoários contra esses medicamentos são multifatoriais, envolvendo fatores gênicos como a super expressão do gene da proteína do choque térmico (HSP70) (BROCHU; HAIMEUR; OUELLETTE, 2004). A perda de sensibilidade do parasito ao medicamento também está associada a queda de atividade da redutase dependente de tiol (TDR), enzima essencial para catalisar a conversão de antimoniato pentavalente à antimoniato trivalente, forma ativa da droga (EPHROS *et al.*, 1999).

Os medicamentos de segunda linha como a sitamaquina e pentamidina são utilizados principalmente para o tratamento de pacientes com LV. As vias de entrada da droga no protozoário ocorrem através da interação eletrostática com a cabeça polar do fosfolípido e transportadores de arginina e poliaminas, respectivamente (COIMBRA *et al.*, 2008; KANDPAL; TEKWANI, 1997). Efeitos colaterais da sitamaquina e os mecanismos de resistência da pentamidina são fatores que não os tornam unânimes para o uso terapêutico. A anfotericina B (antibiótico poliênico e também antifúngico), a paromomicina (antibiótico aminoglicosídeo), além da miltefosina (agente anticâncer) também constituem essenciais alternativas de segunda linha para o tratamento da leishmaniose (CROFT; ENGEL, 2006; SHYAN SUNDAR *et al.*, 2007; WINGARD *et al.*, 2000).

A anfotericina B veiculada em lipossomas apresenta alta eficiência terapêutica contra o protozoário ao provocar sua morte através da formação de poros na membrana celular do promastigota. O efeito dessa droga ainda se estende no bloqueio expressivo de ligação entre o *Leishmania* e macrófago, por meio do desarranjo dos colesteróis da membrana do fagócito com o ergosterol da membrana do promastigota (PAILA; SAHA; CHATTOPADHYAY, 2010; TAKEMOTO; YAMAMOTO; UEDA, 2006). A paromomicina atua principalmente na inibição da síntese proteica e interferência da atividade mitocondrial do parasito (MAAROUF *et al.*, 1997). Já a miltefosina, promove a inibição da síntese de LPG e glicoproteína 63 (gp63), induzindo também apoptose (LUX *et al.*, 2000). No entanto, o alto custo da anfotericina B, a natureza teratogênica e abortiva da miltefosina, além dos múltiplos efeitos colaterais da paromomicina destacam a

necessidade de novos alvos terapêuticos (DORLO *et al.*, 2008; PENACK *et al.*, 2007; RAHMAN *et al.*, 2017).

Tendo em vista esse mecanismo de ação da miltefosina, as proteases podem ser alvos promissores, pois são moléculas cruciais para o ciclo infeccioso de organismos patogênicos como os protozoários. Essas moléculas são enzimas que catalisam quebra de ligações peptídicas por hidrólise (hidrolases), as quais são importantes para morfologia, viabilidade, além de albergar fatores de virulência de diversas espécies de *Leishmania*, tornando-as assim, altamente infectantes (PRAMANIK *et al.*, 2019). Inibidores de diferentes origens podem duelar contra essas peptidases através de mecanismos diversos, por isso, podem ser testados quanto a sua atividade antileishmania.

Classificação das Proteases e seus inibidores

Os inibidores de peptidases realizam o bloqueio da hidrólise de ligações peptídicas de determinadas enzimas por meio de processos diferenciados, a depender da categoria específica da enzima, considerando a natureza química do seu sítio catalítico. Os inibidores geralmente são compostos proteicos, no entanto, isto não é uma regra, pois até metabólitos secundários como saponinas e íons como cálcio ou magnésio se mostraram viáveis para conter a hidrólise de ligações peptídicas de proteases da *Leishmania* (SILVA-LOPEZ; GIOVANNI-DE-SIMONE, 2004; UPEGUI ZAPATA *et al.*, 2020).

Estes inibidores interagem com as proteases por meio de arranjos temporários ou permanentes. Dessa forma, podem ser classificados como irreversíveis, aqueles cujas ligações são covalentes às enzimas, gerando uma inibição mais consistente. Já os inibidores reversíveis apresentam interações não covalentes com a estrutura da enzima, mas sim ligações iônicas ou de hidrogênio, podendo se dissociar posteriormente. Neste grupo estão os inibidores que competem com o substrato pelo sítio ativo da enzima (competitivos), também aqueles cuja inativação é promovida diretamente ao complexo enzima-substrato (incompetitivos) e os que inibem a atividade enzimática sem afetar a ligação ao seu respectivo substrato (não-competitivo) (STRELOW *et al.*, 2004).

Tal processo inibitório pode ser realizado sobre as endopeptidases e exopeptidases. Em números, a maioria são endopeptidases, enzimas que promovem a ação catalítica nas regiões internas das cadeias polipeptídicas, já as exopeptidases quebram as ligações peptídicas nas extremidades C terminal (carboxipeptidase) ou N terminal (aminopeptidases) (FLORES; ARISTOY; TOLDRA, 1999). As proteases podem ser organizadas em cinco grupos principais e por consequência, seus inibidores seguem sua respectiva classificação: Inibidores contra serina proteases, cisteína proteases, aspartil proteases, metaloproteases e treonina proteases, conforme ilustra a figura 2.

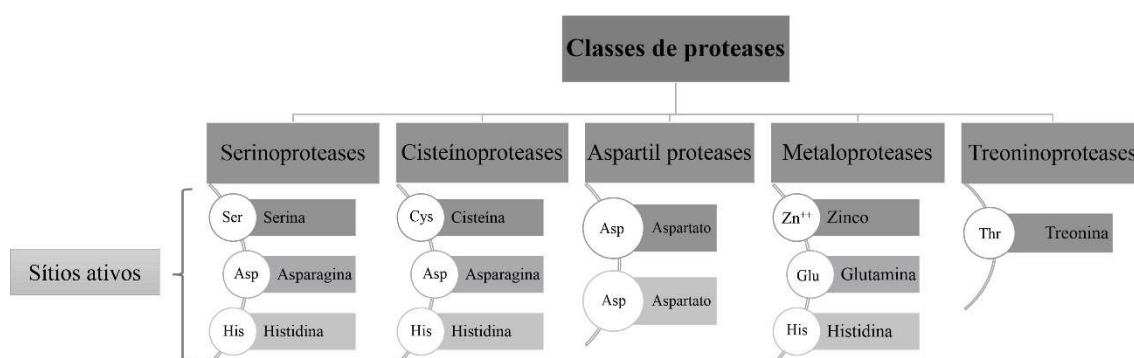


Figura 2. Classificação das enzimas proteolíticas (proteases) e os tipos de resíduos de aminoácidos presentes seus sítios catalíticos.

Os inibidores de serino proteases são considerados os mais versáteis em comparação com os demais grupos e apesar da existência de muitas famílias de inibidores (MEROPS, 2021), destacam-se as famílias Kunitz e Bowman-Birk, pois são as mais caracterizadas e com capacidade de inibição das seguintes proteases: elastase, calicreína pancreática, quimiotripsina, tripsina, subtilisina. Achados apontam que alguns inibidores de serino proteases também são ativos contra cisteino proteases (OLIVA *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Os inibidores da família Kunitz se destacam por serem os mais estudados. Sua massa molecular varia entre 18 e 26 kDa e são caracterizados pela presença de uma ou duas cadeias polipeptídicas (BATISTA *et al.*, 1996). Já os inibidores da família Bowman-Birk apresentam massa molecular de baixo peso, em geral entre 6 e 9 kDa com apenas uma cadeia polipeptídica (MOHANRAJ *et al.*, 2019).

De maneira precisa, os inibidores de serino proteases ligam-se às suas respectivas enzimas por meio de uma fenda catalítica muito específica, formada por uma tríade de sítios ativos, em que estão presentes os resíduos de asparagina (Asp), histidina (His) e

serina (Ser). Esta união acontece de forma semelhante a interação protease-substrato, por isso o modo de inibição é do tipo competitivo (LAU; CHENG, 2006).

Os inibidores de cisteinoproteases desempenham a inativação da ação proteolítica dessa categoria enzimática em vários eventos biológicos, essenciais para a grande maioria dos organismos. São amplamente estudados quanto as suas aplicações em diversas áreas terapêuticas. A inativação decorre sobre as proteases representantes das famílias Papaína e Fitocistatinas. As proteases mais estudadas são: papaína, actinidina e catepsinas (várias análogas), sendo a catepsina B e catepsina L as mais caracterizadas como alvos terapêuticos, inclusive testadas como antígeno para a produção de vacinas atenuadas contra a leishmaniose (ALEXANDER; COOMBS; MOTTRAM, 1998).

O mecanismo de inibição dessas proteases é por meio de uma ação competitiva pelos sítios catalíticos da enzima, formados principalmente pelo resíduo cisteína (Cys), mas também por histidina (His), podendo ter a presença da asparagina (Asp) ou aspartato. Torna-se importante realçar a presença do grupo tiol da cadeia lateral da cisteína como agente nucleofílico no mecanismo de catálise, despertando também esforços em paralelo para desenvolvimento de fármacos para esse alvo (CHANG *et al.*, 2007; NOVINEC *et al.*, 2014).

Os inibidores de aspartilproteases são essenciais para o uso clínico contra microrganismos oportunistas como fungos, bactérias e recentemente descrito, os protozoários (VALDIVIESO; DAGGER; RASCÓN, 2007). Esse grupo de inibidores são capazes de inativar a atividade de proteases como: renina, plasmepsina, catepsina D, Penicilopepsina e Aspartilprotease do HIV. Esta última tem sido um dos alvos mais estudados do grupo para o desenvolvimento de fármacos antirretrovirais, onde o principal arranjo se caracteriza como inibição reversível e competitivo pelo sítio ativo da enzima (REBELLO *et al.*, 2018). O mecanismo catalítico dessas enzimas é caracterizado pela presença de dois resíduos de Aspartato (Asp) (MARTIN *et al.*, 1999).

As metaloproteases se constituem como um grupo bastante homogêneo de enzimas com propriedades de degradação de compostos proteicos, componentes de membranas e moléculas que modulam o processo infeccioso de protozoários em células hospedeiras (CUEVAS; CAZZULO; SÁNCHEZ, 2003; NAVARRO *et al.*, 2006) Esta classe é dependente de metais, sendo indispensável a presença de íons Zn^{++} no sítio catalítico e os íons Ca^{++} para sua estabilidade e atividade (SOUZA; LINE, 2006).

Por isso, vários inibidores são estudados para inativação dos membros dessa classe enzimática de grande importância clínica, onde a principal representante é a metaloprotease de superfície gp63, fator de virulência de diversos tripanossomatídeos. Proteases como Dipeptidylcarboxypeptidase, termolisina e carboxipeptidase A também são alvos para o desenvolvimento de fármacos, cujas propriedades sejam de inibir suas ações catalíticas como os agentes quelantes metálicos. Estes inibidores parecem ser do tipo irreversíveis, uma vez que conseguem interagir de forma covalente à enzima e prejudicar a conformação do seu sítio ativo (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2014; GANGWAR *et al.*, 2012; ILLANES, 2008; SOUZA; LINE, 2006).

As peptidases de treonina ainda são pouco caracterizadas e com escassos relatos de possíveis inibidores específicos, torna-se mais desafiador a descrição com detalhes da sua funcionalidade em muitos organismos. No entanto, foi observada a relação da treonina aspartase 1 com diversas vias de proliferação celular e como alvo promissor para terapia anticâncer (CHEN *et al.*, 2010). As treoninas proteases podem estar relacionadas a formação do proteassoma, um complexo com multissubunidades de função proteolítica de proteínas dependentes ou não de ubiquitina, evento importante para a homeostase intracelular, pois uma vez não contidas, poderiam provocar risco potencial à célula de diversos eucariotos (MORDMÜLLER *et al.*, 2006).

Em geral, essas enzimas apresentam um resíduo de treonina (Thr) na sua extremidade N terminal, comprovadamente indispensável para a clivagem de ligação peptídica. Inibidores como epoxomicina aparenta ser irreversível, pois se liga covalentemente à estrutura interna do proteassoma, gerando inativação consistente e acumulação de proteínas ubiquitinadas. Isso pode ser o início para o desenvolvimento de fármacos no tratamento de várias doenças, inclusive parasitárias, já que diversas subunidades do proteassoma de *Plasmodium* e *Leishmania*, por exemplo, são estruturalmente divergentes daquelas encontradas em células do hospedeiro (MORDMÜLLER *et al.*, 2006; TSCHAN; MORDMÜLLER; KUN, 2011).

Planejamento de novos inibidores

Drogas de origens sintética, natural e também estudos por docking molecular (em português, acoplamento molecular) foram utilizados para elucidação dos diversos duelos bioquímicos existentes entre as conhecidas classes de proteases do parasito e seus inibidores específicos (CARRION; RO; PATTERSON, 2003; GANGWAR *et al.*, 2012).

Muitos dos estudos denotaram a natureza *in silico*, de caráter teórico, considerando a interação inibidor-protease, por meio de simulações computacionais. Com base na energia de ligação nesse acoplamento inibidor-enzima através dessa biblioteca de peptídeos, foi possível gerar discussões apreciáveis sobre a ocorrência ou não de inibição das referidas enzimas, conduzindo posteriormente estudos de síntese desses compostos para avaliação laboratorial de sua atividade biológica através de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Nesse sentido, as estruturas cristalinas das enzimas de *Leishmania* (alvos) como a Catepsina B são pontos de partida para procura moléculas antileishmania. Essas estruturas podem ser obtidas a partir da Protein Data Bank (PDB) e então submetidas à análise no programa Molegro Virtual Docking (MVD), objetivando a ancoragem de possíveis ligantes à estrutura da protease (OGUNGBE; ERWIN; SETZER, 2014). Paralelamente a atividade farmacológica desses ligantes (cálculo de encaixe molecular e energia de encaixe usando Molegro Virtual Docker), atribui-se à análise diretrizes como a regra proposta por Lipinski *et al.* (1997), a qual evidencia suas propriedades moleculares relacionadas à biodisponibilidade como adsorção, distribuição, metabolismo e excreção.

Tal abordagem por estudos partindo do docking molecular, atentando como alvo a proteína da *Leishmania*, racionaliza os esforços laboratoriais e prevê a otimização para o desenvolvimento de compostos mais seletivos, como por exemplo, os derivados de tiosemicarbazidas, moléculas bastante versáteis e de fácil de obtenção de onde tem observado seu potencial para o combate de várias doenças, inclusive as parasitárias (CHOUDHURY *et al.*, 2009; SCHRÖDER *et al.*, 2013). Uma gama de outras moléculas sintéticas de diferentes grupos químicos e até mesmo íons têm sido testadas quanto à sua atividade antileishmania, podendo gerar novas opções terapêuticas para um futuro uso clínico.

Independentemente de uma análise prévia por docking molecular, esses compostos com potencial inibitório contra as proteases de *Leishmania* são incubados *in vitro* na presença da enzima alvo e também com o substrato de alta atração à protease. Para avaliar, por exemplo, os efeitos dos derivados de benzofenona sobre a papaína, pode ser usado o substrato como carbobenzoxy-Phe-Arg-7-amide-4-methylcoumarin. Com todas as condições experimentais controladas, a hidrólise desse substrato pode ser monitorada pela mensuração de fluorescência para determinação de uma possível IC₅₀ por regressão não linear (DE ALMEIDA *et al.*, 2015).

Já os inibidores naturais são moléculas promissoras por agregar uma terapia eficiente e apresentar baixa toxicidade comparado às drogas convencionais. Por isso, vem sendo alvos para profundas investigações, tendo em vista as várias aplicações clínicas, principalmente contra as proteases de parasitos. Diversos grupos biológicos são fontes de inibidores como os vegetais, em especial, das leguminosas, que a partir de seus extratos ou moléculas isoladas provenientes de tecidos como os tubérculos e sementes, já foram comprovadas inibições frente as proteases. Além disso, moléculas purificadas de origem bacteriana como *Streptomyces* sp e compostos extraídos de animais como o *Stichodactyla helianthus* têm sido usados para inibir as proteases de *Leishmania* (PRAMANIK *et al.*, 2019; SILVA-LOPEZ *et al.*, 2007; SREEDHARAN; BHASKARA RAO, 2017).

Paik *et al.* (2014) descreveu a obtenção de inibidores contra serinoproteases a partir de extratos oriundos de tubérculos de *Solanum tuberosum* L. A presença desses inibidores no extrato foi confirmada pela técnica eletroforética de zimografia reversa. Os géis renaturados sob condições não redutoras contendo o extrato foram incubados em uma mistura contendo tripsina bovina (Sigma-Aldrich). Posteriormente esses géis foram corados com Coomassie Brilhante Azul R-250, sendo possível a visualização dos inibidores de serinoprotease separados nos géis, os quais formaram bandas coradas com Coomassie, bloqueando a atividade gelatinolítica da tripsina. A determinação de uma atividade inibitória como esta pode ainda ser certificada pela atividade hidrolítica residual de um ou mais substratos específicos do composto de interesse (CARRION; RO; PATTERSON, 2003; PEREIRA *et al.*, 2011).

Mecanismos de ação dos principais inibidores contra proteases da *Leishmania*

O entendimento de vias biológicas associadas à virulência da *Leishmania* precisa ser apontado como uma atitude primária, tendo em vista a atenuação da proliferação do parasito e o desagravamento da doença. Estudos como o de Williams *et al.* (2006) demonstraram que ferramentas biológicas como as proteases são cruciais para a manutenção do parasito na célula hospedeira. Essa informação se respalda no fato de, quando deletadas as principais cisteinoproteases (CPA e CPB) ou removidos seus genes, ocorreram interferências na via da autofagia e também nos processos de metaciclogênese e diferenciação celular, eventos ligados às mudanças estruturais e transformação do parasito, os quais estão associadas à sua patogenicidade.

Tendo em vista a importância dessas moléculas para a *Leishmania*, diversos inibidores foram testados. A tabela 1 mostra diferentes mecanismos de ação de bloqueio da capacidade proteolítica da *Leishmania* por docking molecular ou através de ensaios *in vitro* e *in vivo* na presença de compostos sintéticos. Os estudos evidenciaram atividade antileishmania através da diminuição da carga parasitária no hospedeiro em reflexo dos efeitos citostático ou situações que provocaram diretamente a morte dos protozoários.

É crucial esclarecer sobre os eventos que provocam a morte desses parasitos na presença dos inibidores aqui discutidos, pois os mecanismos são distintos daqueles observados com os medicamentos de segunda linha Anfotericina B ou miltefosina, uma vez que não ocorreu a formação de poros na membrana celular ou reações que tenha incitado a apoptose, nem tampouco outros efeitos bruscos como a fragmentação de DNA ou a externalização da fosfatidilserina. Na maioria dos estudos aqui analisados, percebeu-se danos mais brandos como defeitos flagelares junto à danos mitocondriais, se estendendo ainda para um desenvolvimento de resposta imunológica com a produção de fator de necrose tumoral (TNF), formação de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (MACHADO *et al.*, 2021; OLIAEE *et al.*, 2020).

Inibidores de serinoproteases como a Aprotinina podem ser os responsáveis pelos danos flagelares aos parasitos, já que proteases presentes na bolsa flagelar (compartimento formado pela invaginação da membrana plasmática) da *L. donovani* foram excelentes substratos para o referido inibidor (CHOUDHURY; DAS; BHAUMIK; *et al.*, 2010; CHOUDHURY; DAS; DE; *et al.*, 2010). A tripsina é uma protease da classe serino, porém seu papel para o ciclo vital e/ou infeccioso da *Leishmania* ainda não foi claramente elucidado. Entretanto, um inibidor específico para tripsina foi testado, promovendo um bloqueio na capacidade proteolítica, efeito esse também relatado com a utilização de íons, com destaque para inibição de 68% pelo Ca^{++} (CARRION; RO; PATTERSON, 2003; CHOUDHURY *et al.*, 2009).

Tabela 1. Relação de compostos sintéticos como potenciais candidatos para formulação de drogas inibitórias das proteases de *Leishmania* spp.

Droga	<i>Leishmania</i> spp.	Mecanismos de ação	Protease alvo	Referência
PF-429242	<i>L. infantum</i>	Inibiu a subtilisina, promovendo estresse oxidativo e modulação da resposta imunológica.	Serinoprotease	Machado <i>et al.</i> (2021)
Calpain inibitor MDL28170	<i>L. braziliensis</i>	Efeito leishmaniostático e alterações ultraestruturais concebíveis com autofagia	Cisteínoprotease	Ennes-Vidal <i>et al.</i> (2019)
Inibidor de tripsina	<i>L. guyanensis</i>	Capaz de bloquear a proteólise da referida enzima	Serinoprotease	Carrion <i>et al.</i> (2003)
N-metil piperazina-Phe-homoPhe-vinil sulfona	<i>L. mexicana</i>	Inibição de CPA e CPB, interferindo na via de autofagia e evitando a metacicloogênese e transformação de promastigotas em amastigotas.	Cisteínoprotease	Williams <i>et al.</i> (2006)
Dipeptidil-nítrilas	<i>L. infantum</i> <i>L. amazonensis</i>	Mostrou atividade citostática em vez de parasiticida contra as duas espécies	Cisteínoprotease	Quilles <i>et al.</i> (2019)
Diazoacetil D-L-norleucina metil éster (DAN)	<i>L. mexicana</i>	Inibiu completamente a atividade da Catepsina D, provocando efeito antiproliferativo das formas evolutivas promastigotas.	Aspartil protease	Valdivieso <i>et al.</i> (2007)
Aziridine-2,3-dicarboxylates	<i>L. major</i>	Modulou a secreção de citocinas em macrófagos, como aumento de interleucina-12 e fator de necrose tumoral α .	Cisteínoprotease	Ponte-Sucre <i>et al.</i> (2006)
Sulfona de vinil * Inibidor à base de cetona *	<i>L. donovani</i>	Ambos se mostraram competentes para inibição contra cisteínas proteases. A sulfona de vinil promoveu ligação irreversível ao substrato, enquanto o uso do inibidor à base de cetona resultou no bloqueio dos sítios da protease, por meio de um mecanismo reversível.	Cisteínoprotease	Desai <i>et al.</i> (2004)
Aprotinina	<i>L. donovani</i>	A protease secretada pela bolsa flagelar do parasito foi um ótimo substrato para este inibidor.	Serinoprotease	Choudhury <i>et al.</i> (2010a, 2010b)
Ca ²⁺ e Mn ²⁺	<i>L. donovani</i>	Reduziu a atividade da tripsina em 68% e 60% respectivamente.	Serinoprotease	Choudhury <i>et al.</i> (2009)
Anticorpos anti-GP63; Fosfoglicanos; Metais quelantes divalente	<i>L. braziliensis</i> <i>L. infantum</i>	Ambas as abordagens inibiram substancialmente a ligação dos parasitas nos vetores naturais. Os metais quelantes inibiram a ligação do parasito ao intestino de vetores do gênero <i>Lutzomia</i> , assim como na adesão na linhagem celular LL-5, em especial o composto 1,10-fenantrolina.	Metaloprotease	Soares <i>et al.</i> (2017)
Peptídeo MAAKYN *	<i>L. major</i>	Impede a ligação da protease gp63 à célula hospedeira e inibe cinética de crescimento.	Metaloprotease	Rhaiem e Houimel (2016)
Lopinavir	<i>L. amazonensis</i> <i>L. infantum</i>	Inibidor promoveu mudanças ultraestruturais, especialmente em proteases relacionadas à manutenção de compartimentos lipídicos, por isso, reflexo na redução da carga parasitária.	Aspartil protease	Santos <i>et al.</i> (2009)
GNF6702	<i>L. donovani</i> <i>L. major</i>	Diminuiu lesão hepática induzida pela <i>L. donovani</i> , além de reduzir inchaço plantar causada pela <i>L. major</i> . O acúmulo de proteínas ubiquitinadas pode ter causado essa redução na cultura de parasitos.	Treoninoprotease	Khare <i>et al.</i> (2016)

*Estudos de inibição por acoplamento molecular. CPA: Catepsina A; CPB: Catepsina B; gp63: glicoproteína 63

É notório o desafio da imunossupressão causada pelos protozoários. Por isso, drogas com efeitos inibitórios agregada à capacidade de promover o desenvolvimento de uma resposta imunológica se mostram ainda mais formidáveis, a exemplo da PF-429242 (MACHADO *et al.*, 2021), inibidor sobre a serinoprotease subtilisina. Além de uma inibição contundente, a PF-429242 apresentou capacidade significativa de estimular uma resposta imunológica através da produção de mediadores inflamatórios como TNF e NO, em macrófagos infectados com a *L. infantum*.

Além do resultado inibitório sobre as cisteinoproteases, múltiplas drogas mostraram capacidade similar de imuno estimulação, a exemplo da Aziridine-2,3-dicarboxylates (PONTE-SUCRE *et al.*, 2006), a qual modulou a secreção de citocinas em macrófago, como a TNF- α , importante para a gênese de uma reação inflamatória e incitar a produção de interleucina-12, o indutor da imunidade adaptativa contra microrganismos unicelulares como o observado em macrófagos infectadas pela *L. major*.

Em decorrência da propriedade inibitória da droga MDL28170, foi constatado efeito leishmanioestático comprovado pelas disfunções celulares encontradas, especificamente alterações ultraestruturais em mitocôndrias e outras organelas membranosas, repercutindo no bloqueio da multiplicação desses microrganismos (ENNES-VIDAL *et al.*, 2019). Ação semelhante foi vista também pelo inibidor Dipeptidil-nitrilas, suscitando efeito citostático sobre *L. infantum* e *L. amazonensis*, possivelmente por adesão covalente sobre estruturas dessas proteases (QUILLES *et al.*, 2019). O sucesso do protozoário da *L. mexicana* também foi interrompido na utilização de derivados de tiossemicarbazonas, pois ocorreu uma interação covalente ao grupo tiol, um importante pilar da ação catalítica da peptidase cisteína (SCHRÖDER *et al.*, 2013).

Possivelmente a maior virtude das proteases da classe cisteíno está relacionada ao desenvolvimento da infectividade como a autofagia, processo de degradação de componentes da própria célula. Esse fenômeno biológico é muito relevante para a *Leishmania*, pois sucede uma transformação celular da forma evolutiva flagelada promastigota à amastigota no vacúolo parasitóforo do macrófago (REAL; MORTARA, 2012). A utilização de drogas como MDL28170 demonstrou claramente que a inibição das Catepsinas do tipo A e B desses microparasitos são determinantes para que os eventos supracitados fossem interrompidos, com bloqueio adicional da metaciclo gênese, evento correspondente à diferenciação de um promastigota procíclica à um promastigota

metacíclica (infectante ao hospedeiro invertebrado) pelo composto N-metil piperazina-Phe-homoPhe-vinil sulfona (ENNES-VIDAL *et al.*, 2019; WILLIAMS *et al.*, 2006).

A atividade das proteases aspárticas também parece exercer função substancial no metabolismo dos protozoários do gênero *Leishmania*, uma vez que a inibição de algumas representantes da classe aspartil, resultou em prejuízos celulares significativos como a antiproliferação do parasita, mediante o bloqueio da divisão celular e efeitos coadjuvantes como danos ultra estruturais relacionados aos compartimentos lipídicos (SANTOS *et al.*, 2009; VALDIVIESO *et al.*, 2010).

O composto Diazoacetil D-L-norleucina metil éster (DAN) foi um dos responsáveis por alguns dos efeitos mencionados previamente, o qual produziu um espectro inibitório de 99% da atividade de aspartilprotease, por meio de ensaio químico confirmado pelo uso do substrato específico Bz-RGFFL-4MβNA para enzimas dessa classe. O fato de compartimentos lipídicos como lisossomos terem sido deformados com o uso do DAN, explica o crucial papel da catepsina D, uma protease lisossômica central para o metabolismo do protozoário, que quando bloqueada, provocou danos relacionados ao metabolismo lipídico (VALDIVIESO *et al.*, 2010).

Para além de uma tarefa estrutural, a catepsina D ainda pode assegurar comportamentos de evasão que tardam a construção de uma defesa contra o parasito pelo hospedeiro vertebrado. Esse fenômeno virulento é esclarecido durante o processo de maturação do fagossomo, instante em que a protease atua na fusão do fagossomo com as organelas endocíticas, resultando na formação do conhecido vacúolo parasitóforo. Esse evento conseguiu ser bloqueado por intermédio de inibidores específicos como a pepstatina A. Todavia, esse mesmo composto suprimiu a formação de uma resposta imunológica Th1 e Th2 (BANERJEE *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2000).

Grande parte das atividades citadas também foram consequências de fármacos já permitidos no uso clínico, como o Lopinavir, usado na terapia antirretroviral. Estudos correlacionados enfatizaram o sucesso da referida droga ao erradicar ou diminuir culturas de macrófagos coinfectados com HIV/*Leishmania*, cenário causador de muitas mortes em todo o mundo. Tendo em vista os efeitos altamente ativos desse tratamento contra os protozoários e também no combate ao vírus, a possibilidade do uso Lopinavir em outro segmento clínico se consolida pela sua eficácia nos referidos estudos, principalmente para

tratamento de casos severos causados pela infecção simultânea viral e parasitária (REBELLO; *et al.*, 2018; REBELLO *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2009).

Outra peça primordial no ciclo infeccioso da *Leishmania* se refere à gp63, uma metalopeptidase conhecida como leishmanolisina dependente de zinco. Essa enzima facilita a ligação de formas promastigotas metacíclicas aos macrófagos através do receptor CR3 sem incitar uma explosão oxidativa, além de expressar uma batalha bioquímica entre a forma evolutiva amastigota e o meio ácido presente no vacúolo digestivo das células do hospedeiro mamífero, uma vez que consegue degradar as enzimas lisossomais destas células (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012). McGwire, Chang e Engman (2003) observaram a atividade dessa protease na degradação da matriz extracelular no tecido subcutâneo, facilitando o movimento do parasito sob a pele. Esse fator de virulência ainda se estende para a neutralização de componentes da resposta imune inata, como as células natural killers (NK) por meio de inativação direta (LIEKE *et al.*, 2008).

Ainda pouco relatada, a gp63 se mostra essencial também para a fixação do parasito ao intestino do vetor flebotomíneo. A comprovação desse evento ocorreu quando a ligação do parasito ao intestino médio e às células LL-5 derivadas do *Lutzomyia longipalpis*, vetor suscetível a várias espécies de *Leishmania*, foi prejudicada na presença de anticorpos anti-gp63, situação ilustrada na figura 2. No entanto, são necessárias outras moléculas como o LPG, para que a ação junto à gp63 seja potencializada na adesão dos protozoários às células do hospedeiro (SOARES *et al.*, 2017).

Práticas alternativas que atenuam essa ligação parasito – hospedeiro via gp63 podem ser observadas a partir da aplicação de agentes quelantes, compostos que se unem a íons metálicos divalentes como o Zn^{++} . A 1,10-fenantrolina é o exemplo mais sucedido dessa inibição comparado aos compostos EDTA e EGTA, uma vez que sua capacidade quelante sobre o Zn^{++} foi mais eficaz. Um outro composto, o peptídeo de sequência descrita como MAAKYN mostrou energia de interação mínima e complementaridade máxima de formato com o sítio ativo gp63 da *L. major*. Esse evento favoreceu um cenário antileishmania, pois ocorreu inibição da cinética de crescimento do protozoário e redução

das lesões cutâneas nas patas de camundongos (RHADEM; HOUIMEL, 2016; SOARES *et al.*, 2017).

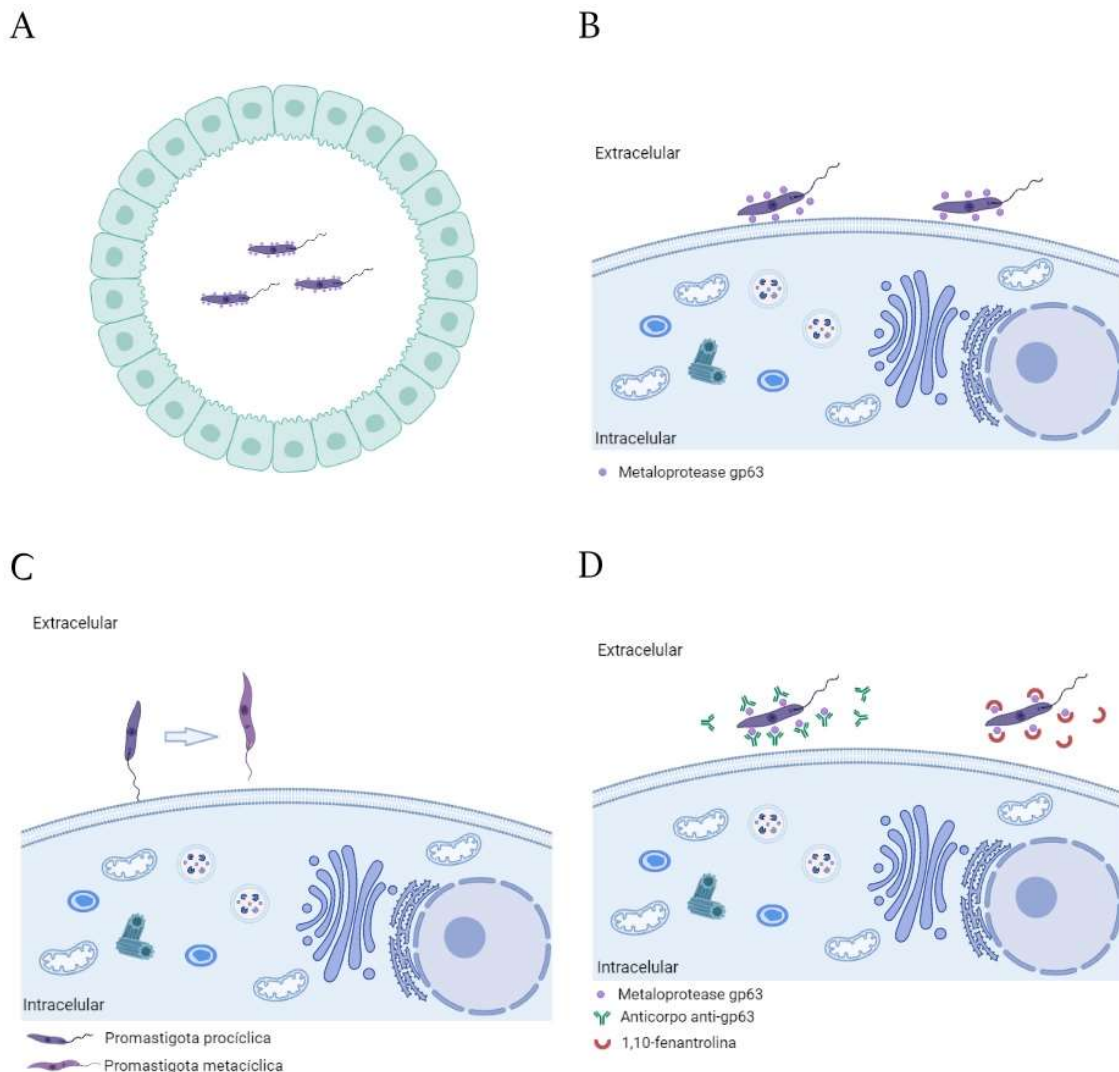


Figura 3. Ação da metaloprotease gp63 na adesão de promastigotas ao epitélio intestinal do hospedeiro invertebrado. (A) Após a intensa multiplicação das formas promastigotas procíclicas e a posterior degradação da membrana peritrófica (estrutura ao redor do bolo alimentar) do vetor invertebrado, os parasitas precisam se aderir ao epitélio intestinal para não serem excretados com o sangue residual. (B) Através da gp63, a adesão ao epitélio ocorre e assim, outros estágios de desenvolvimento no ciclo do protozoário são sucedidos, como a metacirculação (C). A aplicação de anticorpos anti-gp63 e o uso de substâncias como a 1,10-fenantrolina inibem a ação da metaloprotease e por consequência, é observado o insucesso dos promastigotas na adesão às células do hospedeiro, esclarecendo a relevância da gp63 para a infectividade da *Leishmania* (D).

Considerando os eventos supracitados, os mecanismos relacionados à gp63 favorecem uma possível e futura abordagem para enriquecimento terapêutico contra a leishmaniose provocada por cepas distintas, pois essa metaloprotease é uma chave indispensável para a infectividade do protozoário, a qual mesmo exibindo diferenças sutis em seu padrão genômico, esse glicoconjugado ainda apresenta alta identidade de sequência e similar expressão entre diferentes espécies de *Leishmania* (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2014).

Já os eventos biológicos relacionados às treoninas, peptidases que se integram como subunidades de complexos multiproteicos conhecidos como proteassomos, também merecem uma atenção devida. Isso porque além de estruturar o proteassomo, as treoninas parecem exercer função substancial para a ativação de todo o complexo, já que substituição de resíduos de Thr por Cys interrompeu interações com outras subunidades e inativou toda a atividade enzimática (HUBER *et al.*, 2016).

Em vista disso, o inibidor reportado como GNF6702 se associou especificamente aos proteassomos de cepas causadoras de LV e LC como *L. donovani* e *L. major* respectivamente. O composto causou ainda o declínio de crescimento das culturas axênicas de amastigota em macrófagos, refletindo em redução da lesão hepática e diminuição do inchaço plantar em camundongos previamente infectados com essas cepas. O argumento de que os proteassomos são cruciais para o ciclo vital dessas espécies e que, sua atenuação pode ter provocado redução no crescimento dessas culturas é reforçado graças às observações partindo de avaliações bioquímicas, nas quais evidenciaram o acúmulo de proteínas ubiquitinadas, cenário marcado como desordem intracelular pela insatisfatória ou ausente ação dos proteassomos (KHARE *et al.*, 2016).

Abordagens atuais inserem também compostos naturais na discussão, prospectando seus possíveis efeitos inibitórios sobre o desenvolvimento e infectividade da *Leishmania*. O levantamento de comparações com as substâncias sintéticas já consolidadas no uso clínico se mostra válido, haja vista a potencial capacidade terapêutica desses biofármacos e os possíveis efeitos colaterais reduzidos devido a origem natural, cenário motivador frente a limitação da terapia vigente.

A concepção de que os compostos de origem biológica sinalizam outras vantagens diante das substâncias sintéticas, precisou ser testada, por exemplo, no desempenho de bloqueio das proteases. Esse princípio se confirmou quando inibidores oriundos de

sementes vegetais exibiram um amplo espectro inibitório, ou seja, a capacidade de suprimir a atividade catalítica de diferentes classes de peptidases como as serinas e cisteínas (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Arbitrariamente a falta de especificidade de um inibidor também pode ser considerada uma desvantagem quando o resultado do bloqueio das proteases é tardio e não regular, já que o arcabouço molecular de cada classe apresenta resíduos únicos e dinâmica de acoplamento distinta.

No cenário antileishmania, a pesquisa visando compostos com as características relatadas é pertinente, pois dentre as alternativas terapêuticas, são inexistentes abordagens que albergam inibidores contra moléculas tão relevantes como as proteases, e ainda menor o uso de substâncias oriundas de fontes biológicas. Atentando propostas dessa natureza, compostos naturais com potencial de bloqueio da capacidade catalítica dessas enzimas foram testadas através do uso de extratos, peptídeos isolados ou por acoplamento molecular, como ilustra a tabela 2.

Os vegetais são os principais organismos de onde muitos inibidores são obtidos, a exemplo da espécie *Garcinia brasiliensis*, uma árvore nativa brasileira. O extrato de acetato de etila do pericarpo de seus frutos promoveu efeitos inibitórios consideráveis sobre tripsina e papaína, proteases de diferentes classes. O grau de bloqueio dessas duas enzimas foi ainda mais significativo quando a fukugentina, um metabólico secundário da classe dos flavonoides obtido do mesmo extrato foi testado, confirmando sua capacidade antileishmania sem provocar toxicidade às células de mamífero (PEREIRA *et al.*, 2011).

Tabela 2. Relação de compostos naturais como potenciais candidatos para formulação de drogas intentando a inibição das proteases de *Leishmania* spp.

Droga	<i>Leishmania</i> spp.	Mecanismos de ação	Protease alvo	Referência
<i>Streptomyces</i> sp BVK2 (Bactéria)	<i>L. donovani</i>	Redução drástica no crescimento do parasita	Serinoprotease	Sreedhara e Rao (2017)
Extrato do tubérculo da batata (PTEx)	<i>L. donovani</i>	Produção de ROS e NO	Serinoprotease	Paik <i>et al.</i> (2014, 2016)
Extrato de <i>Coccinia grandis</i> (L.) Voight	<i>L. donovani</i>	Redução da carga parasitária e produção de NO e NOS e efeito imunomodulador na produção de citocinas Th1 e supressão de citocinas Th2.	Serinoprotease	Pramanik <i>et al.</i> (2017, 2019)
Fitoquímicos fenólicos*	<i>L. major</i> <i>L. donovani</i>	Nenhum dos compostos mostrou atração pela CPB, mas conseguiu bloquear a atividade da protease oligopeptidase B da <i>L. major</i> .	Cisteínoprotease; Serinoprotease	Ogungbe, Erwin e Setzer (2014)
Inibidor obtida da <i>Stichodactyla helianthus</i> (Animal)	<i>L. amazonensis</i>	Alterações estruturais drásticas em promastigotas em decorrência da inibição das proteases serino localizadas na bolsa flagelar.	Serinoprotease	Silva-Lopez <i>et al.</i> (2007)
Morelloflavone isolados da <i>Garcinia brasiliensis</i>	<i>L. amazonensis</i> <i>L. mexicana</i>	Forte ação inibitória contra diferentes isoformas de proteases cisteínas, além de suprimir cinética de crescimento das formas promastigotas e amastigotas.	Cisteínoprotease	Gontijo <i>et al.</i> (2012)
Extratos etil acetato e Bioflavonoide Fukugetina obtidos do pericarpo dos frutos da <i>G. brasiliensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	Inibição das proteases papaína e tripsina pelo extrato e mais significativamente pelo bioflavonoide. Não houve efeitos tóxicos às células de mamíferos.	Cisteínoprotease; Serinoprotease	Pereira <i>et al.</i> (2011)
Extratos de <i>Miconia willdenowii</i>	<i>L. amazonensis</i>	Atividade inibitória de 99.7% das formas promastigotas através do metabólito bioativo 2-methoxy-6-pentylbenzoquinone.	Aspartilprotease	Viegas <i>et al.</i> (2019)
Extrato hexânico da <i>Arrabidaea chica</i>	<i>L. amazonensis</i> <i>L. infantum</i>	A atividade catalítica foi drasticamente inibida, sucedendo perdas de conteúdo em várias organelas e prejudicando a infecção dos protozoários em macrófagos.	Cisteínoprotease	Rodrigues <i>et al.</i> (2014)

*Estudo de inibição por acoplamento molecular. CPB: Catepsina B.

Da mesma espécie vegetal, outros bioflavonoides como moreloflavona foram isolados, propiciando também que alguns derivados fossem semissintetizados. O ensaio realizado bloqueou a capacidade catalítica de *L. amazonensis* e *L. mexicana*, sendo os alvos proteicos correspondentes à classe cisteína. Por essa razão, efeitos prejudiciais já previstos como a redução da cinética de crescimento dos parasitas foi confirmada pela morte das formas evolutivas promastigotas e amastigotas, em especial pelos derivados semissintetizados (GONTIJO *et al.*, 2012).

Em algumas situações de uso de produtos naturais são necessárias intervenções na estrutura molecular com o objetivo de estabilizá-lo, potenciá-lo ou solucionar problemas de toxicidade, necessidade imposta pela degradação rápida e/ou pela complexidade molecular das biomoléculas (DAHER *et al.*, 2020). Essa tática é comum e, portanto, eficaz na exploração de drogas com potencial terapêutico, cenário possivelmente similar com os derivados de bioflavonoides semissintetizados, devido ao seu maior sucesso quando comparado com os compostos isolados, os quais foram usados diretamente sem modificação química em sua estrutura.

Representantes fenólicos da classe dos flavonoides aparecem como alternativa paralela tentando igualmente a erradicação da *Leishmania*, via bloqueio das proteases. Chalconas e isoflavonoides, por meio de análises *in silico* encaixaram-se quimicamente na estrutura da oligopeptidase B da *L. major*, uma enzima da classe serino de alta relevância na virulência do gênero (OGUNGBE; ERWIN; SETZER, 2014).

Outras espécies vegetais exibiram também capacidade de inibir o crescimento *in vitro* de *Leishmania* spp. O crescimento das formas promastigotas da *L. amazonensis*, por exemplo, foi inibida em contato com o metabólito bioativo 2-methoxy-6-pentylbenzoquinone, oriundo de folhas da *Miconia willdenowii* (VIEGAS *et al.*, 2019). Testes bioguiados anteriores demonstraram que extratos de algumas espécies de plantas do gênero *Miconia* conferem elevados graus inibitórios sobre culturas diversas de microrganismos em razão da presença de inibidores de proteases aspárticas (LI *et al.*, 2001).

O extrato da *Arrabidaea chica* se mostrou competente para bloqueio de crescimento das culturas de *L. amazonensis* e *L. infantum*. A ação catalítica de peptidases cisteínas foi comprovadamente bloqueada em contato com uma das frações do extrato hexânico das folhas da espécie (1:1 n-hexano/acetato de etila). Efeitos drásticos no

conteúdo intracelular dos parasitas foram demonstrados como alterações no complexo de Golgi, danos mitocondriais severos além de formato anormal das promastigotas. Conjuntamente, o inibidor de protease ainda provocou o insucesso dos protozoários ao infectarem os macrófagos. Mesmo com redução da atividade de metaloproteases, as frações a partir do extrato hexânico de *A. chica* foram menos efetivas quando comparadas com as cisteínoproteases (RODRIGUES *et al.*, 2014).

É necessário evidenciar que os efeitos sobre as cisteínoprotease até aqui apreciados contribuíram no esclarecimento de como a ação de seus inibidores afetam as vias celulares do parasito. Logo, os danos causados pelo inibidor oriundo da *A. chica*, combinam com aqueles provocados pelo composto sintético MDL28170, em que ambos ocasionaram danos ultraestruturais nas mitocôndrias (ENNES-VIDAL *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2014).

O mecanismo mais comum para que estes efeitos tenham sido orquestrados envolve a dissipação ou disfunção do potencial elétrico transmembrana da mitocôndria, o que resultou em transições anormais da membrana, provocando inchaço intenso e danos mitocondriais mais intensificados como o rompimento da organela (MARINHO *et al.*, 2014; MONZOTE *et al.*, 2014).

Assim como alguns compostos sintéticos, produtos derivados de plantas ainda propiciaram por meio da inibição de proteases da classe serina, a modulação de uma resposta imunológica. Extrato das folhas de *Coccinia grandis* (L.) Voight induziram uma resposta protetiva em camundongos imunodeficientes infectados previamente com a *L. donovani*. A carga parasitária em fígado e baço foi reduzida em decorrência da produção de ROS e NOS (PRAMANIK *et al.*, 2019). Adjunto a esses efeitos, ensaios anteriores exibiram a capacidade dos inibidores proteicos presentes no extrato, de aumentarem a produção de citocinas Th1, supressores da multiplicação parasitária (IL-12, TNF- α), ao mesmo tempo que regularam negativamente citocinas Th2 (IL-10, TGF- β), relacionadas à suscetibilidade e incapacidade de controle parasitário (PRAMANIK *et al.*, 2017).

O uso de frações preparados com bissulfito de sódio a partir do extrato bruto de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* L.) bloquearam a ação das enzimas tripsina e quimiotripsina que parecem exercer assim como outras proteases um papel favorável no desenvolvimento e multiplicação dos protozoários de *L. donovani*, já que a viabilidade parasitária foi suprimida e os macrófagos infectados ficaram significativamente livres da

carga de parasitos. Esses resultados decorreram da geração exacerbada de ROS e NOS e não houve efeitos citotóxicos. Uma resposta inflamatória protetiva ainda foi gerada pela supressão de diversas citocinas Th2 e produção substancial de citocinas Th1 (TNF- α , IFN γ e IL-12) que permitem ao hospedeiro o controle eficaz da infecção (PAIK *et al.*, 2014, 2016).

Outras fontes naturais podem ser ricas em inibidores de proteases como os microrganismos. Actinobactérias marinhas são Gram-positivas e desempenham um papel simbiótico com outros organismos. Os produtos derivados dessas bactérias já são aplicados nos segmentos clínicos, agrícolas e farmacológicos. Uma inibição de 87% sobre a protease tripsina foi detectada a partir de seu extrato bruto, provocando um número significativo de morte das formas amastigotas infectantes de macrófagos (SREEDHARAN; BHASKARA RAO, 2017). Mesmo com poucos relatos sobre os inibidores de proteases provenientes de microrganismos, a análise desses produtos naturais para um possível uso clínico contra a leishmaniose é fundamental.

Conclusão e perspectivas

Mesmo com os altos progressos envolvendo o tratamento da leishmaniose, essa doença ainda é considerada negligenciada em razão de um número limitado de pesquisas direcionadas a esse contexto. Os protozoários da *Leishmania* apresentam vasto repertório de moléculas importantes para seu crescimento, desenvolvimento e patogenicidade. Assim, torna lógico e, portanto, encorajador os esforços científicos para atenuar o crescimento do parasito através desses alvos moleculares.

A abordagem das proteases e seus inibidores realizadas por esse estudo pode oferecer recursos para compreensão desses mecanismos biológicos e desta forma, motivar o surgimento de uma perspectiva terapêutica considerando o uso de inibidores mesmo que conjugado a drogas já permitidas no uso clínico. Os resultados apreciados por esta revisão podem ainda fomentar a pesquisa de outras doenças infecciosas, cujos os mecanismos sejam intermediados pelas proteases.

Referências

ALEXANDER, J.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Leishmania mexicana cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 161, n. 12, p. 6794–801, 1998.

BANERJEE, S.; BOSE, D.; CHATTERJEE, N.; DAS, S.; CHAKRABORTY, S.; DAS, T.; SAHA, K. Das. Attenuated Leishmania induce pro-inflammatory mediators and influence leishmanicidal activity by p38 MAPK dependent phagosome maturation in Leishmania donovani co-infected macrophages. **Scientific Reports**, v. 6, n. September 2015, p. 1–14, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep22335>

BATISTA, I. F. .; OLIVA, M. L. V; ARAUJO, M. S.; SAMPAIO, M. U.; RICHARDSON, M.; FRITZ, H.; SAMPAIO, C. A. . Primary structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from Enterolobium contortisiliquum seeds. **Phytochemistry**, v. 41, n. 4, p. 1017–1022, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00710-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00710-5)

BRASIL. Ministério da Saúde. *In*: 2016, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de vigilância em saúde. Brasília**. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços: Brasília, 2016.

BROCHU, C.; HAIMEUR, A.; OUELLETTE, M. The heat shock protein HSP70 and heat shock cognate protein HSC70 contribute to antimony tolerance in the protozoan parasite Leishmania. **Cell Stress & Chaperones**, v. 9, n. 3, p. 294, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1379/CSC-15R1.1>

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)

CARRION, R.; RO, Y.-T.; PATTERSON, J. L. Purification, Identification, and Biochemical Characterization of a Host-Encoded Cysteine Protease That Cleaves a Leishmanivirus Gag-Pol Polyprotein . **Journal of Virology**, v. 77, n. 19, p. 10448–10455, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jvi.77.19.10448-10455.2003>

CHANG, W.-S. W.; WU, H.-R.; YEH, C.-T.; WU, C.-W.; CHANG, J.-Y. Lysosomal Cysteine Proteinase Cathepsin S as a Potential Target for Anti-Cancer Therapy. **Journal of Cancer Molecules**, v. 3, n. 1, p. 5–14, 2007.

CHEN, D. Y.; LIU, H.; TAKEDA, S.; TU, H.-C.; SASAGAWA, S.; VAN TINE, B. A.; LU, D.; CHENG, E. H.-Y.; HSIEH, J. J.-D. Taspase1 Functions as a Non-Oncogene Addiction Protease that Coordinates Cancer Cell Proliferation and Apoptosis. **Cancer Research**, v. 70, n. 13, p. 5358–5367, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0027>

CHOUDHURY, R.; BHAUMIK, S. K.; DE, T.; CHAKRABORTI, T. Identification, purification, and characterization of a secretory serine protease in an Indian strain of Leishmania donovani. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 320, n. 1–2, p. 1–14, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11010-008-9849-7>

CHOUDHURY, R.; DAS, P.; BHAUMIK, S. K.; DE, T.; CHAKRABORTI, T. In situ immunolocalization and stage-dependent expression of a secretory serine protease in leishmania donovani and its role as a vaccine candidate. **Clinical and Vaccine**

Immunology, v. 17, n. 4, p. 660–667, 2010 a. Disponível em:
<https://doi.org/10.1128/CVI.00358-09>

CHOUDHURY, R.; DAS, P.; DE, T.; CHAKRABORTI, T. Immunolocalization and characterization of two novel proteases in *Leishmania donovani*: Putative roles in host invasion and parasite development. **Biochimie**, v. 92, n. 10, p. 1274–1286, 2010 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.05.015>

COIMBRA, E. S.; GONÇALVES-DA-COSTA, S. C.; COSTA, B. L. S.; GIAROLA, N. L. L.; REZENDE-SOARES, F. A.; FESSEL, M. R.; FERREIRA, A. P.; SOUZA, C. S. F.; ABREU-SILVA, A. L.; VASCONCELOS, E. G. A *Leishmania* (L.) *amazonensis* ATP diphosphohydrolase isoform and potato apyrase share epitopes: antigenicity and correlation with disease progression. **Parasitology**, v. 135, n. 3, p. 327–335, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0031182007003927>

COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D.; GRAFOVA, I.; NAIFF, M. de F.; AVELLA, M.; GENTILE, G.; GRAFOV, A.; FRANCO, A. M. R. Topical treatment of experimental cutaneous leishmaniasis in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) with formulations containing pentamidine. **Acta Amazonica**, v. 47, n. 1, p. 39–46, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1809-4392201601333>

COUTINHO DE OLIVEIRA, B.; DUTHIE, M. S.; ALVES PEREIRA, V. R. Vaccines for leishmaniasis and the implications of their development for American tegumentary leishmaniasis. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 16, n. 4, p. 919–930, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1678998>

CROFT, S. L.; ENGEL, J. Miltefosine – discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. S4–S8, 2006. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.03.009>

CUEVAS, I. C.; CAZZULO, J. J.; SÁNCHEZ, D. O. gp63 Homologues in *Trypanosoma cruzi*: Surface Antigens with Metalloprotease Activity and a Possible Role in Host Cell Infection. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 10, p. 5739–5749, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.71.10.5739-5749.2003>

CUPOLILLO, E.; BRAHIM, L. R.; TOALDO, C. B.; DE OLIVEIRA-NETO, M. P.; DE BRITO, M. E. F.; FALQUETO, A.; DE FARIAS NAIFF, M.; GRIMALDI, G. Genetic Polymorphism and Molecular Epidemiology of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* from Different Hosts and Geographic Areas in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 3126–3132, 2003. Disponível em:
<https://doi.org/10.1128/JCM.41.7.3126-3132.2003>

D'AVILA-LEVY, C. M.; ALTOÉ, E. C. F.; UEHARA, L. A.; BRANQUINHA, M. H.; SANTOS, A. L. S. GP63 Function in the Interaction of Trypanosomatids with the Invertebrate Host: Facts and Prospects. *In: [S. l.: s. n.]*. p. 253–270. Disponível em:
https://doi.org/10.1007/978-94-007-7305-9_11

DA SILVA-LOPEZ, R. E.; GIOVANNI-DE-SIMONE, S. *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*: Purification and characterization of a promastigote serine protease. **Experimental Parasitology**, v. 107, n. 3–4, p. 173–182, 2004. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2004.05.002>

DAHER, S. S.; FRANKLIN, K. P.; SCHERZI, T.; DUNMAN, P. M.; ANDRADE, R.

B. Synthesis and biological evaluation of semi-synthetic albocycline analogs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 30, n. 21, p. 127509, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127509>

DE ALMEIDA, L.; ALVES, K. F.; MACIEL-REZENDE, C. M.; JESUS, L. de O. P.; PIRES, F. R.; JUNIOR, C. V.; IZIDORO, M. A.; JÚDICE, W. A. de S.; DOS SANTOS, M. H.; MARQUES, M. J. Benzophenone derivatives as cysteine protease inhibitors and biological activity against *Leishmania(L.) amazonensis* amastigotes. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 75, p. 93–99, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.08.030>

DESAI, P. V.; PATNY, A.; SABNIS, Y.; TEKWANI, B.; GUT, J.; ROSENTHAL, P.; SRIVASTAVA, A.; AVERY, M. Identification of novel parasitic cysteine protease inhibitors using virtual screening. 1. The ChemBridge database. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 26, p. 6609–6615, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm0493717>

DORLO, T. P. C.; VAN THIEL, P. P. A. M.; HUITEMA, A. D. R.; KEIZER, R. J.; DE VRIES, H. J. C.; BEIJNEN, J. H.; DE VRIES, P. J. Pharmacokinetics of Miltefosine in Old World Cutaneous Leishmaniasis Patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2855–2860, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.00014-08>

ENNES-VIDAL, V.; VITÓRIO, B. S.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; PITALUGA, A. N.; DA-SILVA, S. A. G.; BRANQUINHA, M. H.; SANTOS, A. L. S.; D'AVILA-LEVY, C. M. Calpains of *leishmania Braziliensis*: Genome analysis, differential expression in metacyclogenesis and effects of MDL28170. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, n. 7, p. 1–12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0074-02760190147>

EPHROS, M, BITNUN A, SHAKAD P, WALDMAN E, Z. D. Stage-Specific Activity of Pentavalent Antimony against. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 43, n. 2, p. 278–282, 1999.

FLORES, M.; ARISTOY, M.-C.; TOLDRÁ, F. Hydrolysis of alanine oligopeptides by porcine muscle alanyl aminopeptidase. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A**, v. 208, n. 4, p. 264–266, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s002170050414>

FORESTIER, C.-L.; GAO, Q.; BOONS, G.-J. *Leishmania* lipophosphoglycan: how to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00193>

GANGWAR, S.; BAIG, M. S.; SHAH, P.; BISWAS, S.; BATRA, S.; SIDDIQI, M. I.; GOYAL, N. Identification of Novel Inhibitors of Dipeptidylcarboxypeptidase of *Leishmania donovani* via Ligand-Based Virtual Screening and Biological Evaluation. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 79, n. 2, p. 149–156, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2011.01262.x>

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338–349, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1415-790X2004000300011>

- GONTIJO, V. S. *et al.* Leishmanicidal, antiproteolytic and antioxidant evaluation of natural biflavonoids isolated from *Garcinia brasiliensis* and their semisynthetic derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p. 613–623, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.06.021>
- HUBER, E. M.; HEINEMEYER, W.; LI, X.; ARENDT, C. S.; HOCHSTRASSER, M.; GROLL, M. A unified mechanism for proteolysis and autocatalytic activation in the 20S proteasome. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 10900, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms10900>
- ILLANES, A. Enzyme biocatalysis: Principles and applications. In: **Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications**. [S. l.: s. n.]. p. 1–391. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8361-7>
- KANDPAL, M.; TEKWANI, B. L. Polyamine transport systems of *Leishmania donovani* promastigotes. **Life Sciences**, v. 60, n. 20, p. 1793–1801, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(97\)00139-2](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(97)00139-2)
- KHARE, S. *et al.* Proteasome inhibition for treatment of leishmaniasis, Chagas disease and sleeping sickness. **Nature**, v. 537, n. 7619, p. 229–233, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature19339>
- LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.5123/S2176-62232010000200002>
- LAU, J. K.-C.; CHENG, Y.-K. SER-HIS-ASP catalytic triad in model non-aqueous solvent environment: A computational study. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 22, p. 5797–5800, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.08.083>
- LI, X.-C.; JACOB, M. R.; PASCO, D. S.; ELSOHLY, H. N.; NIMROD, A. C.; WALKER, L. A.; CLARK, A. M. Phenolic Compounds from *Miconia yriantha* Inhibiting *Candida* Aspartic Proteases. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 10, p. 1282–1285, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/np010172p>
- LIEKE, T.; NYLÉN, S.; EIDSMO, L.; MCMASTER, W. R.; MOHAMMADI, A. M.; KHAMESIPOUR, A.; BERG, L.; AKUFFO, H. *Leishmania* surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 153, n. 2, p. 221–230, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03687.x>
- LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1–3, p. 3–25, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1)
- LUX, H.; HEISE, N.; KLENNER, T.; HART, D.; OPPERDOES, F. R. Ether–lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether–lipid analogues in *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 111, n. 1, p. 1–14, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(00\)00278-4](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(00)00278-4)
- LYRA, M. R. *et al.* PANCREATIC TOXICITY AS AN ADVERSE EFFECT INDUCED BY MEGLUMINE ANTIMONIATE THERAPY IN A CLINICAL TRIAL FOR CUTANEOUS LEISHMANIASIS. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**

de São Paulo, v. 58, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658068>

MAAROUF, M.; DE KOUCHKOVSKY, Y.; BROWN, S.; PETIT, P. X.; ROBERT-GERO, M. In Vivo Interference of Paromomycin with Mitochondrial Activity of Leishmania. **Experimental Cell Research**, v. 232, n. 2, p. 339–348, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3500>

MACHADO, P. de A.; GOMES, P. S.; MIDDLEJ, V.; COIMBRA, E. S.; DE MATOS GUEDES, H. L. PF-429242, a Subtilisin Inhibitor, Is Effective in vitro Against Leishmania infantum. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. January, p. 1–17, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.583834>

MARINHO, F. A. *et al.* The calpain inhibitor MDL28170 induces the expression of apoptotic markers in leishmania amazonensis promastigotes. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087659>

MARTIN, J. L. *et al.* Molecular Recognition of Macrocyclic Peptidomimetic Inhibitors by HIV-1 Protease. **Biochemistry**, v. 38, n. 25, p. 7978–7988, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi990174x>

MCGWIRE, B. S.; CHANG, K.-P.; ENGMAN, D. M. Migration through the Extracellular Matrix by the Parasitic Protozoan Leishmania Is Enhanced by Surface Metalloprotease gp63. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 2, p. 1008–1010, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.71.2.1008-1010.2003>

MELO, H. A.; ROSSONI, D. F.; TEODORO, U. Spatial distribution of cutaneous leishmaniasis in the state of Paraná, Brazil. **PLOS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0185401, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185401>

MEROPS. **MEROPS: The peptidase database**. [s. l.], 2021. Disponível em: https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/family_index?type=I. Acesso em: 9 jan. 2022.

MOHANRAJ, S. S.; GUJJARLAPUDI, M.; LOKYA, V.; MALLIKARJUNA, N.; DUTTA-GUPTA, A.; PADMASREE, K. Purification and characterization of Bowman-Birk and Kunitz isoinhibitors from the seeds of Rhynchosia sublobata (Schumach.) Meikle, a wild relative of pigeonpea. **Phytochemistry**, v. 159, p. 159–171, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.12.018>

MONZOTE, L.; GARCÍA, M.; PASTOR, J.; GIL, L.; SCULL, R.; MAES, L.; COS, P.; GILLE, L. Essential oil from Chenopodium ambrosioides and main components: Activity against Leishmania, their mitochondria and other microorganisms. **Experimental Parasitology**, v. 136, p. 20–26, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.10.007>

MORADIN, N.; DESCOTEAUX, A. Leishmania promastigotes: building a safe niche within macrophages. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00121>

MORDMÜLLER, B.; FENDEL, R.; KREIDENWEISS, A.; GILLE, C.; HURWITZ, R.; METZGER, W. G.; KUN, J. F. J.; LAMKEMEYER, T.; NORDHEIM, A.; KREMSNER, P. G. Plasmodia express two threonine-peptidase complexes during asexual development. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 148, n. 1, p. 79–85, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.03.001>

- NAHIDI, Y.; MASHAYEKHI GOYONLO, V.; LAYEGH, P.; TAGHAVI, F.; NAJAF NAJAFI, M. Immunomodulatory effects of topical diphencyprone for the treatment of acute urban cutaneous leishmaniasis. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 32, n. 2, p. 220–226, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09546634.2019.1642997>
- NAVARRO, V. P.; NELSON-FILHO, P.; SILVA, L. A. B.; FREITAS, A. C. A participação das metaloproteinases da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 35, n. 4, p. 233–238, 2006.
- NOVINEC, M.; KORENČ, M.; CAFLISCH, A.; RANGANATHAN, R.; LENARČIČ, B.; BAICI, A. A novel allosteric mechanism in the cysteine peptidase cathepsin K discovered by computational methods. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 3287, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms4287>
- OGUNGBE, I. V.; ERWIN, W. R.; SETZER, W. N. Antileishmanial phytochemical phenolics: Molecular docking to potential protein targets. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 48, p. 105–117, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2013.12.010>
- OLIAEE, R. T.; SHARIFI, I.; BAMOROVAT, M.; KEYHANI, A.; BABAEI, Z.; SALARKIA, E.; TAVAKOLY, R.; KHOSRAVI, A.; MOSTAFAVI, M.; SHARIFI, F.; MOUSAVI, S. M. The potential role of nicotinamide on *Leishmania tropica*: An assessment of inhibitory effect, cytokines gene expression and arginase profiling. **International Immunopharmacology**, v. 86, n. May, p. 106704, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106704>
- OLIVA, M. L. V.; SOUZA-PINTO, J. C.; BATISTA, I. F. .; ARAUJO, M. S.; SILVEIRA, V. F.; AUERSWALD, E. A.; MENTELE, R.; ECKERSKORN, C.; SAMPAIO, M. U.; SAMPAIO, C. A. . Leucaena leucocephala serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1477, n. 1–2, p. 64–74, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00285-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00285-X)
- OLIVEIRA-RIBEIRO, C. *et al.* An old drug and different ways to treat cutaneous leishmaniasis: Intralesional and intramuscular meglumine antimoniate in a reference center, Rio de Janeiro, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 9, p. e0009734, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009734>
- OLIVEIRA, A. S.; MIGLIOLO, L.; AQUINO, R. O.; RIBEIRO, J. K. C.; MACEDO, L. L. P.; ANDRADE, L. B. S.; BEMQUERER, M. P.; SANTOS, E. A.; KIYOTA, S.; DE SALES, M. P. Purification and characterization of a trypsin–papain inhibitor from *Pithecellobium dumosum* seeds and its in vitro effects towards digestive enzymes from insect pests. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, n. 10–11, p. 858–865, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.08.002>
- PAIK, D.; DAS, P.; DE, T.; CHAKRABORTI, T. In vitro anti-leishmanial efficacy of potato tuber extract (PTE_x): Leishmanial serine protease(s) as putative target. **Experimental Parasitology**, v. 146, n. August, p. 11–19, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.08.009>
- PAIK, D.; DAS, P.; NASKAR, K.; PRAMANIK, P. K.; CHAKRABORTI, T. Protective inflammatory response against visceral leishmaniasis with potato tuber extract: A new approach of successful therapy. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.

83, p. 1295–1302, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.08.046>

PAILA, Y. D.; SAHA, B.; CHATTOPADHYAY, A. Amphotericin B inhibits entry of *Leishmania donovani* into primary macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 399, n. 3, p. 429–433, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.099>

PENACK, O.; REINHOLD, T.; THIEL, E.; BLAU, I. W. Cost-Benefit Assessment of Antifungal Prophylaxis with Liposomal Amphotericin B in Neutropenic Patients. **Oncology Research and Treatment**, v. 30, n. 12, p. 621–626, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000110070>

PEREIRA, I. O.; ASSIS, D. M.; JULIANO, M. A.; CUNHA, R. L. O. R.; BARBIERI, C. L.; DO SACRAMENTO, L. V. S.; MARQUES, M. J.; DOS SANTOS, M. H. Natural products from *Garcinia brasiliensis* as *Leishmania* protease inhibitors. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 6, p. 557–562, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0018>

PONTE-SUCRE, A.; VICIK, R.; SCHULTHEIS, M.; SCHIRMEISTER, T.; MOLL, H. Aziridine-2,3-dicarboxylates, peptidomimetic cysteine protease inhibitors with antileishmanial activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 7, p. 2439–2447, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.01430-05>

PRAMANIK, A.; PAIK, D.; NASKAR, K.; CHAKRABORTI, T. *Coccinia grandis* (L.) Voigt Leaf Extract Exhibits Antileishmanial Effect Through Pro-inflammatory Response: An In Vitro Study. **Current Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 59–67, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1151-4>

PRAMANIK, A.; PAIK, D.; PRAMANIK, P. K.; CHAKRABORTI, T. Serine protease inhibitors rich *Coccinia grandis* (L.) Voigt leaf extract induces protective immune responses in murine visceral leishmaniasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 224–235, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.053>

QUILLES, J. C.; TEZUKA, D. Y.; LOPES, C. D.; RIBEIRO, F. L.; LAUGHTON, C. A.; DE ALBUQUERQUE, S.; MONTANARI, C. A.; LEITÃO, A. Dipeptidyl nitrile derivatives have cytostatic effects against *Leishmania* spp. promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 200, n. January 2018, p. 84–91, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.04.001>

RAHMAN, R. *et al.* Safety and efficacy of short course combination regimens with AmBisome, miltefosine and paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis (VL) in Bangladesh. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 5, p. e0005635, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005635>

REAL, F.; MORTARA, R. A. The Diverse and Dynamic Nature of *Leishmania* Parasitophorous Vacuoles Studied by Multidimensional Imaging. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, p. e1518, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001518>

REBELLO, K. M.; ANDRADE-NETO, V. V.; GOMES, C. R. B.; DE SOUZA, M. V. N.; BRANQUINHA, M. H.; SANTOS, A. L. S.; TORRES-SANTOS, E. C.; D'AVILA-LEVY, C. M. Miltefosine-lopinavir combination therapy against *leishmania infantum* infection: In vitro and in vivo approaches. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. JUN, p. 1–8, 2019. Disponível em:

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00229>

REBELLO, K. M.; ANDRADE-NETO, V. V.; ZUMA, A. A.; MOTTA, M. C. M.; GOMES, C. R. B.; DE SOUZA, M. V. N.; ATELLA, G. C.; BRANQUINHA, M. H.; SANTOS, A. L. S.; TORRES-SANTOS, E. C.; D'AVILA-LEVY, C. M. Lopinavir, an HIV-1 peptidase inhibitor, induces alteration on the lipid metabolism of *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Parasitology**, v. 145, n. 10, p. 1304–1310, 2018.

Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0031182018000823>

RHAIEM, R. Ben; HOUIMEL, M. Targeting *Leishmania* major parasite with peptides derived from a combinatorial phage display library. **Acta Tropica**, v. 159, p. 11–19, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.03.018>

RODRIGUES, I. A.; AZEVEDO, M. M. B.; CHAVES, F. C. M.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S.; VERMELHO, A. B. Arrabidaea chica hexanic extract induces mitochondrion damage and peptidase inhibition on *Leishmania* spp. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/985171>

SANTOS, L. O.; MARINHO, F. A.; ALTOÉ, E. F.; VITÓRIO, B. S.; ALVES, C. R.; BRITTO, C.; MOTTA, M. C. M.; BRANQUINHA, M. H.; SANTOS, A. L. S.; D'AVILA-LEVY, C. M. HIV aspartyl peptidase inhibitors interfere with cellular proliferation, ultrastructure and macrophage infection of *Leishmania amazonensis*. **PLoS ONE**, v. 4, n. 3, 2009. Disponível em:

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004918>

SCHRÖDER, J.; NOACK, S.; MARHÖFER, R. J.; MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H.; SELZER, P. M. Identification of Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Triazine Nitriles as Inhibitors of *Leishmania mexicana* Cysteine Protease CPB. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–12, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077460>

SHYAM SUNDAR, M.D., T.K. JHA, M.D., CHANDRESHWAR P. THAKUR, M.D., PRABHAT K. SINHA, M.D., AND SUJIT K. BHATTACHARYA, M. . Injectable Paromomycin for Visceral Leishmaniasis in India. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 25, p. 2571–2581, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa066536>

SILVA-LOPEZ, R. E.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; CHÁVEZ, M. A.; GIOVANNI-DE-SIMONE, S. Effects of serine protease inhibitors on viability and morphology of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes. **Parasitology Research**, v. 101, n. 6, p. 1627–1635, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0706-5>

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 485–497, 2012. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60084-4](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60084-4)

SOARES, R. P.; ALTOÉ, E. C. F.; ENNES-VIDAL, V.; DA COSTA, S. M.; RANGEL, E. F.; DE SOUZA, N. A.; DA SILVA, V. C.; VOLF, P.; D'AVILA-LEVY, C. M. In Vitro Inhibition of *Leishmania* Attachment to Sandfly Midguts and LL-5 Cells by Divalent Metal Chelators, Anti-gp63 and Phosphoglycans. **Protist**, v. 168, n. 3, p. 326–334, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.protis.2017.03.004>

SOUSA-GOMES, M. L.; MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; PELISSARI, D. M.; LIMA JUNIOR, F. E. F.; SENA, J. M.; CECHINEL, M. P. Coinfecção *Leishmania*-HIV no

Brasil: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 4, p. 519–526, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.5123/S1679-49742011000400011>

SOUZA, A. P.; LINE, S. R. P. The biology of matrix metalloproteinases. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru**, v. 10, n. 1, p. 1–6, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2006.08.017>

SREEDHARAN, V.; BHASKARA RAO, K. V. Efficacy of protease inhibitor from marine *Streptomyces* sp. VITBVK2 against *Leishmania donovani* – An in vitro study. **Experimental Parasitology**, v. 174, p. 45–51, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.02.007>

STRELOW, J.; DEWE, W.; IVERSEN, P. W.; BROOKS, H. B.; RADDING, J. A.; MCGEE, J.; WEIDNER, J. Mechanism of Action Assays for Enzymes. In: **Assay Guidance Manual**. [S. l.: s. n.].

TAKEMOTO, K.; YAMAMOTO, Y.; UEDA, Y. Evaluation of Antifungal Pharmacodynamic Characteristics of AmBisome against *Candida albicans*. **Microbiology and Immunology**, v. 50, n. 8, p. 579–586, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2006.tb03832.x>

TSCHAN, S.; MORDMÜLLER, B.; KUN, J. F. Threonine peptidases as drug targets against malaria. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 15, n. 4, p. 365–378, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1517/14728222.2011.555399>

UPEGUI ZAPATA, Y. A. *et al.* Mode of action of a formulation containing hydrazones and saponins against leishmania spp. Role in mitochondria, proteases and reinfection process. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 13, n. February, p. 94–106, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.06.004>

VALDIVIESO, E.; DAGGER, F.; RASCÓN, A. *Leishmania mexicana*: Identification and characterization of an aspartyl proteinase activity. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 1, p. 77–82, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.10.006>

VALDIVIESO, E.; RANGEL, A.; MORENO, J.; SAUGAR, J. M.; CAÑAVATE, C.; ALVAR, J.; DAGGER, F. Effects of HIV aspartyl-proteinase inhibitors on *Leishmania* sp. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 4, p. 557–563, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.06.002>

VIEGAS, F. P. D.; ESPURI, P. F.; OLIVER, J. C.; SILVA, N. C.; DIAS, A. L. T.; MARQUES, M. J.; SOARES, M. G. Leishmanicidal and antimicrobial activity of primin and primin-containing extracts from *Miconia willdenowii*. **Fitoterapia**, v. 138, n. August, p. 104297, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104297>

WHO. **Leishmaniasis**. [s. l.], 2022. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 14 jun. 2022.

WILLIAMS, R. A.; TETLEY, L.; MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H. Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 655–674, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05274.x>

WINGARD, J. R.; WHITE, M. H.; ANAISSIE, E.; RAFFALLI, J.; GOODMAN, J.;

ARRIETA, A. A Randomized, Double-Blind Comparative Trial Evaluating the Safety of Liposomal Amphotericin B versus Amphotericin B Lipid Complex in the Empirical Treatment of Febrile Neutropenia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. 5, p. 1155–1163, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/317451>

WYLLIE, S.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H. Dual Action of Antimonial Drugs on Thiol Redox Metabolism in the Human Pathogen *Leishmania donovani*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 38, p. 39925–39932, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M405635200>

ZHANG, T.; MAEKAWA, Y.; HANBA, J.; DAINICHI, T.; NASHED, B. F.; HISAEDA, H.; SAKAI, T.; ASAO, T.; HIMENO, K.; GOOD, R. A.; KATUNUMA, N. Lysosomal cathepsin B plays an important role in antigen processing, while cathepsin D is involved in degradation of the invariant chain in ovalbumin-immunized mice. **Immunology**, v. 100, n. 1, p. 13–20, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2000.00000.x>

4 RESULTADOS

4.1 Artigo 2 - TRYPSIN INHIBITOR ISOLATED FROM *Enterolobium contortisiliquum* SEEDS AFFECTS THE VIRULENCE OF *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*

Jeanderson Marcelino da Silva¹, Clovis Macêdo Bezerra Filho¹, Wesley Felix de Oliveira¹, João Victor de Oliveira Alves¹, Rafael Artur de Queiroz Cavalcanti de Sá¹, Maisa Fernanda dos Santos Barbosa¹, Bárbara de Azevedo Ramos¹, Maria Luiza Vilela Oliva², Márcia Vanusa da Silva¹, Maria Tereza dos Santos Correia¹

¹Universidade Federal de Pernambuco, UFPE

²Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP

Manuscript to be submitted to the Natural Product Research

ISSN: 1478-6419

Impact factor: 2.861

Qualis CAPES: A4 – Área: Ciências Biológicas I

Abstract

Bioactive compounds intended to inhibit proteases of pathogenic microorganisms, one of main molecule promoting resistance factors in *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, have been intensively studied. This work aimed to evaluate a trypsin inhibitor isolated from *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI) against virulence factors of *S. aureus* and *C. albicans*. This compound did not demonstrate bactericidal activity at concentrations of 4 to 2.048 µg/mL, but proved to be a potential antivirulent agent, since it was shown to block expressively the formation of the staphyloxanthin pigment in many concentrations (400, 200 and 100 µg/mL). The EcTI showed significantly reduced percentage of hemolysis, mainly at 400 µg/mL when compared with *S. aureus* untreated and impaired its biofilm formation subtly. Although the effects of EcTI on the viability of *C. albicans* cells has not been successful, this inhibitor also proved to be a great agent against fungi virulence, by significantly inhibiting biofilm formation, at 400 µg/mL. The EcTI also incited the rupture of the mature biofilm of *C. albicans* even if dose-dependently. It was concluded that EcTI was a excellent antivirulence agent and emphasizes the importance of also evaluating the effect of EcTI in multidrug-resistant strains.

Keywords: *Staphylococcus aureus*. *Candida albicans*. Virulence. EcTI.

Introduction

Infectious diseases caused by opportunistic pathogens such as *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* have become major threats to global public health due to clinical complications that cause high mortality in humans (GUO *et al.*, 2020). These species colonize surfaces of healthy individuals as skin and mucous membranes, under normal conditions. However, opportune situations as immunosuppression can cause invasive infections such as sepsis and candidiasis, clinical manifestations caused by the bacteria and fungi respectively (RUNGELRATH; DELEO, 2021).

Most of these problems caused by *S. aureus* and *C. albicans* occur due to virulent mechanisms such as biofilm formation, which is an essential resource for pathogen colonization and resistance to drugs commonly used. This resistant strains to their respective therapies have caused immense health concern at a global level, and there is a strong exploration for new drugs, targeting proteases, the main virulence factors (WU *et al.*, 2021).

Proteases show catalytic capacity on peptide bonds and are associated with bacterial and fungal virulence actions against host defenses, being a promising target for drug development, for example the serine proteases, which are present in *S. aureus* and *C. albicans*, exhibiting an important role in biofilm formation (ALENCAR DE BARROS *et al.*, 2021; STANISZEWSKA *et al.*, 2017). In possession of this information, protease inhibitors are seen as possible solutions against the virulence factors of these microorganisms.

The pharmacological potential of several plant species has been explored, including their impacts on protease blockade. *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong is a leguminosae with wide ecological plasticity and it occurs in the South America. In Brazil, this species is found mainly in Atlantic Forest, Cerrado and Caatinga phytogeographic domains. Their seeds are rich sources of bioactive compounds, as the Kunitz – type inhibitor, molecular weight 19,63 kDa known as EcTI (*E. contortisiliquum* Trypsin inhibitor), capable to inhibit trypsin, chymotrypsin, plasma kallikrein and plasmin (BATISTA *et al.*, 1996). EcTI is already known for its versatility in biological effects, as insecticidal activities and cytotoxic action on tumor cell lines (BONTURI *et al.*, 2018; DA SILVA FERREIRA *et al.*, 2019).

There are still no reports about the effects of EcTI on the attenuation of the virulence of pathogenic microorganisms. For this reason, this study investigates the effects of EcTI against *S. aureus* and *C. albicans* virulence factors in *in vitro* assays.

Materials and Methods

Purification of EcTI

The purification of EcTI was performed as described previously (Batista *et al.*, 1996). The seed proteins were extracted by swelling 30 g of the seed with 300 ml 0.15 M NaCl. After homogenization, the material was centrifuged at 3000 rpm and the supernatant was taken as the starting material (crude extract), which was initially precipitated with 80% (v/v) acetone. The resulting precipitate was redissolved in 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 and applied to a DEAE-Sepharose ion-exchange chromatography column which was equilibrated in the same buffer and eluted using a linear gradient of NaCl from 0 to 0.5 M, EcTI being eluted at a concentration of approximately 0.15 M NaCl.

Strains

The antivirulence activity of EcTI was further analyzed against a collection of isolates of *S. aureus* and *C. albicans* deposited in the Microbial Collection of Antibiotics Department from Federal University of Pernambuco (UFPEDA). The standard strains *S. aureus* ATCC 02 and *C. albicans* ATCC 90025 were used, corresponding to the assays against the virulence factors of the bacterial and fungal, respectively.

Antibacterial Assay

Minimal inhibitory concentration (MIC) was determined by broth microdilution method. Initially, overnight bacterial culture was prepared on Mueller Hinton Agar (MHA) plates. Then a bacterial suspension at 1.0×10^6 CFU/mL was prepared in saline solution (0.9% NaCl). EcTI (4–2.048 μ g/mL) was serially diluted in microplates containing 100 μ L of Mueller Hinton Broth (MHB). Each well received 100 μ L of bacterial suspension, except the wells used as sterility control. In negative control, it was saline solution (0.9% NaCl). The plates were incubated at 37 °C and, after 24h, wells received 20 μ L of 0.01% (w/v) resazurin solution to follow bacterial growth. MIC was determined as the concentration of the last well where there was no change from purple to pink (BEZERRA FILHO *et al.*, 2020).

S. aureus Biofilm Formation

S. aureus ATCC 02 strains are capable of forming biofilms, so they were tested in the presence of EcTI concentrations (400, 200, 100 and 50 μ g/mL), according to the methodology described by Trentin *et al.* (2011). The assay was performed in microplates containing 20 μ L of inoculum adjusted to 1.0×10^6 CFU/mL, 160 μ L of MHB and 20 μ L of EcTI, in the wells corresponding to the treated groups. After incubation for 24h at 37 °C, the contents were removed and the wells were washed three times with sterile saline (0.9% NaCl). Adhered cells were fixed at 60°C for 1h. The biofilm layer formed was stained with 0.4% crystal violet for 15 min at room temperature. Subsequently, the wells were washed three times and then methanol (100%) was added. Optical density (OD) was visualized at 600 nm.

Staphyloxanthin (STX) Inhibition

Overnight cultures of *S. aureus* ATCC 02 were diluted (1:100) in Lysogeny broth (LB) medium and samples (1 mL) of this suspension were incubated with final

concentrations of EcTI (400, 200 and 100 $\mu\text{g/mL}$). After overnight incubation at 37°C, the eppendorf tubes were centrifuged (10,000 r/min for 10 min), suspended with 1 mL of phosphate-buffered saline (PBS), and re-centrifuged. Following the total carotenoid pigments [including staphyloxanthin (STX)] in each pellet were extracted using in methanol (0.2 mL) and incubated for 3 min at 55°C. The methanol phase (supernatant) and cell debris were separated by centrifugation (10,000 r/min for 10 min) and the pellets were submitted to entire pigment extraction procedure three more times. Finally, the absorbance was determined at 465 nm (SILVA *et al.*, 2017).

Antihemolytic Analyse

S. aureus ATCC 02 overnight cultures were diluted at 1:100 in fresh LB and cultured with concentrations of EcTI (400, 200 and 100 $\mu\text{g/mL}$) at 37°C. After 16h (to guarantee a constant number of bacteria present in experiment), 50 μL of culture supernatant was added to 1 mL of 3% human erythrocytes solution from a healthy donor. The mixture was incubated at 37°C for 1h with 250 r/min shaking. The supernatant was collected by centrifugation at 10,000 r/min for 10 min. The solution were then photographed and the OD was measured at 540 nm.

Anticandida Assay

For determination of Inhibitory Concentration 50% (IC_{50}), the *C. albicans* ATCC 90025 was cultured in RPMI 1640 medium. For use in the assays, the density of the cultures was adjusted turbidimetrically at a wavelength of 600 nm to 1.0×10^7 CFU/mL. EcTI (12,5–800 $\mu\text{g/mL}$) was serially diluted in microplates containing RPMI 1640 medium. Next, all wells (except the first) were inoculated with 100 μL of the fungal culture. The first well contained only the RPMI 1640 medium and corresponded to the sterility control. The second well corresponded to the 100% growth control (negative control) and fluconazole at 500 $\mu\text{g/mL}$ was used as positive controle. The OD at 600 nm was measured (0h) and then the assay was incubated at 37 °C for 24h. After this period, the OD was recorded again. The IC_{50} was determined as the maximal EcTI concentration able to promote a reduction higher to 50% in comparison with the 100% growth control.

***C. albicans* Biofilm Formation**

C. albicans overnight cultures were diluted (1:100) in RPMI 1640 medium. For the biofilm formation, the *C. albicans* suspended (1.0×10^7 CFU/mL) was incubated in

96-well microplates at 37°C for 90 min with 75 rpm gentle shaking. After this cell adhesion step, the wells were washed twice with 200 µL of PBS and received concentrations of EcTI (800, 400 e 200 µg/mL). One well (containing microorganisms in the absence of the EcTI) corresponded to the 100% growth control (negative control). Each well received 100 µL of fungal suspension and for the positive control used the fluconazole and amphotericin B at 500 µg/mL. Thus, the microplate was incubated for 48h. After this period, the wells were washed three times with 200 µL of PBS and then 100 µL of crystal violet was added, incubating again for 20 min. Subsequently, the wells were washed three times with 200 µL of distilled water and after drying for 2 h, 200 µL of methanol P.A. was added. At the end, 100 µL of each well were transferred to a new microplate and biofilm formation was evaluated using the OD difference between the biofilms formed in the presence of EcTI and the other groups, reading the absorbance in a spectrophotometer adjusted at 595 nm (SANTOS *et al.*, 2020).

***C. albicans* Biofilm Disruption**

After 48h of incubation, the microplates with the formed biofilms were washed twice with 200 µL of PBS. Then, EcTI was added at concentrations (800, 400 and 200 µg/mL) and incubated for 48h. After this period, the wells were washed twice with 200 µL of PBS and then added 100 µL of crystal violet, incubating again for 20 minutes. The wells were washed with 200 µL of distilled water. After drying for 2 h, 200 µL of methanol P.A. was added. At the end, 100 µL of each well were transferred to a new microplate for reading and analysis of the absorbance in a spectrophotometer adjusted at 595 nm.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the software GraphPad Prism version 8.0. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). Dunnett's multiple comparisons test was used following the ANOVA for comparisons. In all cases differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results and Discussion

Bactericidal Assay

The proteases of many microorganisms are key to the mechanisms not only to their survival, but also to the actions against the host defenses. In this way, it is important

to invest in the attenuation of target molecules, which provides substantial alternatives in terms of blocking the proliferation of the pathogen, just like in overcoming the existing problems regarding the resistance of drugs used in current therapy. Here, the analyzes using the serine protease inhibitor EcTI, through a microtiter assay to determine a possible MIC, according to the methodology proposed by Bezerra Filho *et al.* (2020), demonstrated no bactericidal or even inhibitory effect on the growth of strain *S. aureus* ATCC 02 (data not shown).

However, earlier works the study by Shahat *et al.* (2008) showed that *S. aureus* expressed high sensitivity to essential oil from *E. contortisiliquum* seeds. In general, essential oils present in their composition several organic compounds of different chemical groups, as terpenes and phenylpropanoids which are responsible for the known biological activities (EL-SAID *et al.*, 2021). Therefore, the presence of secondary metabolites such as carvone and estragole present in this essential oil of *E. contortisiliquum* may have managed a synergistic action, causing the bactericidal effect (SHAHAT *et al.*, 2008).

***S. aureus* Biofilm Formation**

Biofilm formation was subtly impaired when *S. aureus* ATCC 02 was incubated in the presence of EcTI concentrations (400, 200, 100 and 50 µg/mL). The figure 1 shows the relation biofilm formation/concentrations of EcTI quantitatively, when even at higher concentration as 400 µg/mL, the trypsin inhibitor was able to significantly inhibit this virulence factor of *S. aureus*.

Biofilm formation is a necessary behavior for bacteria such as *S. aureus*, since this agglomeration of cells embedded in extracellular heterogeneous matrix helps in the exchange of nutrients and acts to protect against harmful agents, as antibiotics (ALENCAR DE BARROS *et al.*, 2021). Therefore, bacteria with the ability to form biofilms present an arduous challenge in combating the persistence of the pathogen, because these bacteria are less susceptible to bactericidal agents than planktonic cells (ROY *et al.*, 2018).

The formation of the *S. aureus* biofilm, crucial for the adaptation and development of chronic infections, occurs due to the proteolytic action of proteases as trypsin, which are synthesized as a result of various gene-mediated regulatory complexes (TUCHSCHERR *et al.*, 2015; XUE *et al.*, 2019). It is known that most antibiotics have

cationic sites that are easily destroyed by trypsin of the pathogen, for this reason, the logical intention of testing inhibitors against this protease to provide new therapeutic perspectives (LI *et al.*, 2007). Even without complete inhibition of the biofilm, EcTI impaired the stability of this virulence factor.

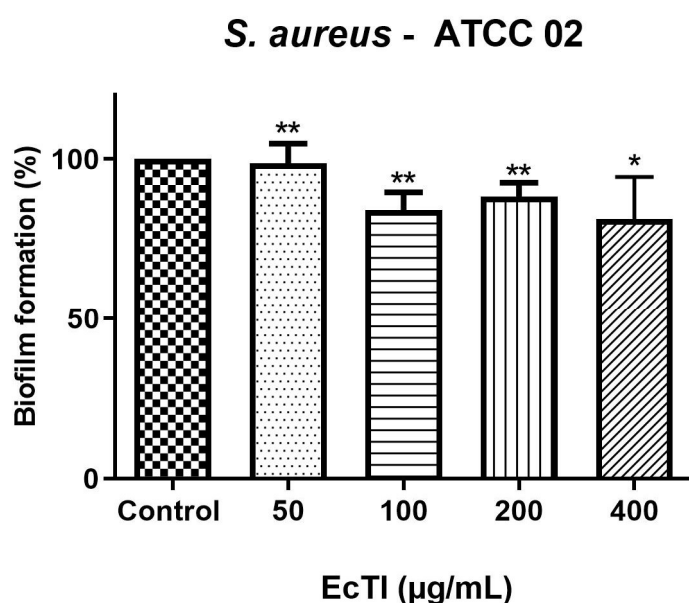


Figure 1. Bacterial suspension with 1.0×10^6 CFU/mL treated with (A) culture medium (control), (B) EcTI at 50 µg/mL, (C) EcTI at 100 µg/mL, (D) EcTI at 200 µg/mL and (E) EcTI at 400 µg/mL. The percentage represent the mean $\pm$ standard deviation of experiments performed in triplicate. The symbols “*” and “**” indicate the experimental systems were considered statistically significant when compared to control with ($p=0,0149$) and ($p= 0,0015$) respectively.

Staphyloxanthin (STX) Inhibition

Although the absence of an bactericidal effect of EcTI on the growth of *S. aureus*, this inhibitor proved to be a potential antivirulent agent, since it was shown to block expressively the formation of the STX, as shown in figure 2. This effect is evident in all EcTI concentrations, with a more significant impact at 200 µg/mL.

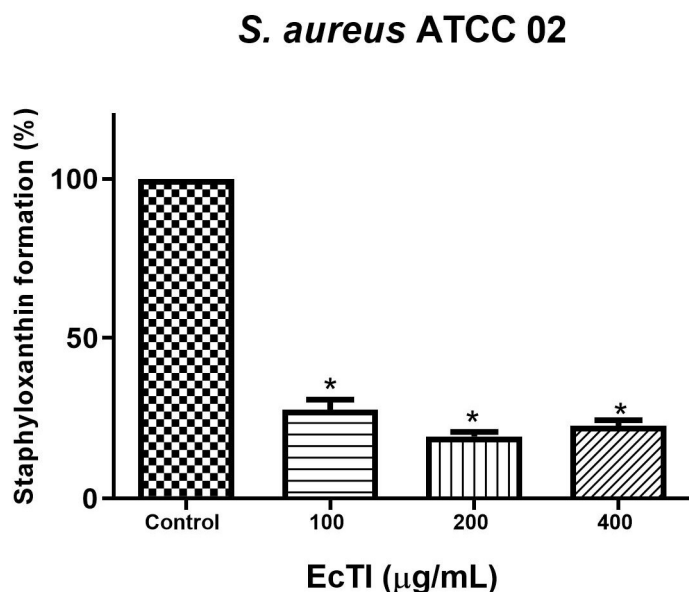


Figure 2. Bacterial suspension with 1.0×10^6 CFU/mL treated with (A) culture medium (control), (B) EcTI at 100 µg/mL, (C) EcTI at 200 µg/mL, (D) EcTI at 400 µg/mL. The percentage represent the mean $\pm$ standard deviation of experiments performed in triplicate. Symbol “*” indicate significant differences between untreated group and EcTI treatment in all concentration ($p < 0,0001$).

The STX is golden yellow carotenoid pigment produced by 90% of *S. aureus* isolated from human infections and is characterized as a promoter of favorable environmental conditions during the infectious process, since its antioxidant properties improve the invasion and permanence in neutrophils and macrophages, ensuring longer survival time than those that non-pigmented strains. The fact that this pathogen evades the host phagocyte defenses such as reactive oxygen species (ROS), highlights it as an essential virulence factor for *S. aureus* (XUE *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2018).

Taking into account the critical role of this pigment for the persistence of infection, the STX inhibition by natural compounds as EcTI clarified by this study, opens the way to further investigations especially to antibiotic resistant bacteria.

Antihemolytic Analyse

Along with the already known pathogenicity mechanisms of *S. aureus*, the ability to cause hemolysis stands out, due to the presence of exotoxins such as hemolysin (KIM *et al.*, 2021). This behavior is essential for bacterial intracellular invasion to occur. Due to this hemolytic action, there is an increase in the sensitivity of many host cells to *S.*

aureus, which delays the healing process and relates it to more severe implications such as sepsis and pneumonia (LEE *et al.*, 2014; PUTRA *et al.*, 2019).

The overnight culture treated with EcTI concentrations, showed significantly reduced percentage of hemolysis when compared with to overnigh culture *S. aureus* ATCC 02 without EcTI (Figure 3). This finding supports EcTI as a promising antivirulent agent against clinically important strains, even though this serine protease inhibitor did not have any effect on bacterial growth. The figure 4 qualitatively demonstrates the effect of this trypsin inhibitor on the ability to hemolysis.

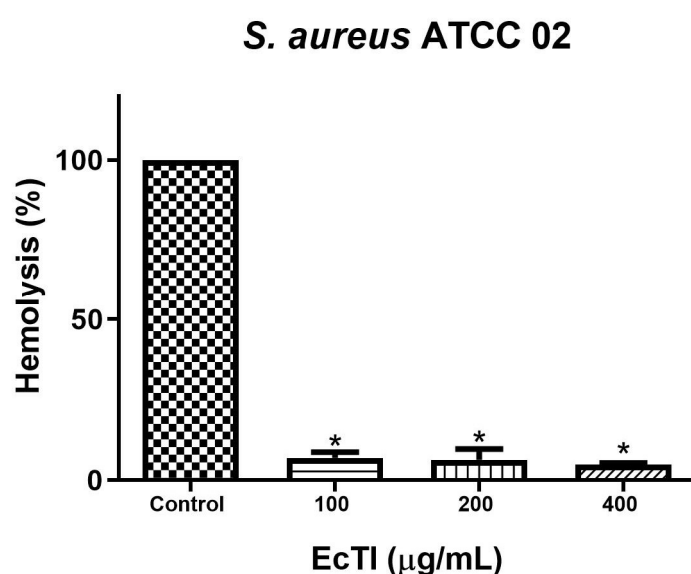


Figure 3. Bacterial suspension with 1.0×10^6 CFU/mL treated with (A) culture medium (control), (B) EcTI at 100 µg/mL, (C) EcTI at 200 µg/mL, (D) EcTI at 400 µg/mL. The percentage represent the mean $\pm$ standard deviation of experiments performed in triplicate. Symbol “*” indicate significant differences between untreated group and EcTI treatment in all concentration ($p < 0,0001$).

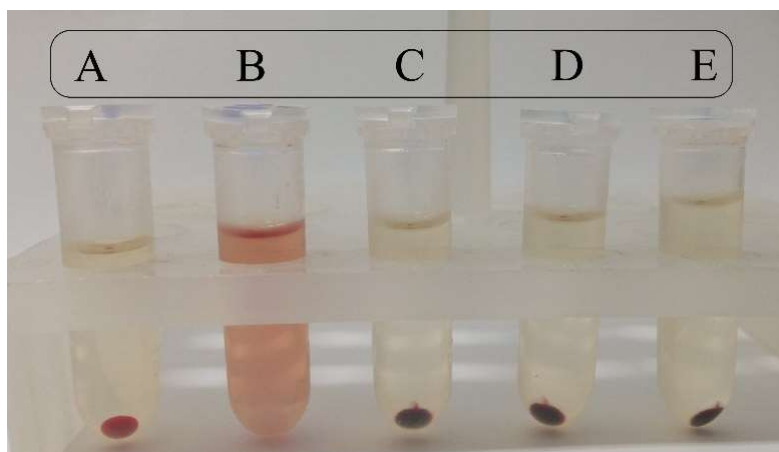


Figure 4. Qualitative effect of EcTI on the hemolysis capacity of *S. aureus* ATCC 02 (A) eppendorf without overnight culture (negative control), (B) overnight culture adjusted to 1.5×10^6 CFU/mL untreated (positive control), (C) overnight culture treated with EcTI at 400 $\mu\text{g/mL}$, (D) overnight culture treated with EcTI at 200 $\mu\text{g/mL}$ and (E) overnight culture treated with EcTI at 100 $\mu\text{g/mL}$.

Natural compounds have induced similar effects of EcTI by exhibiting antivirulent potential without bactericidal activity. This characteristic is considered, by the way, as preferable in the current circumstance of multidrug-resistant strains, since the intention to reach very specific targets decreases the possibility of developing resistance to these drugs (LEE *et al.*, 2012; YIN *et al.*, 2022). Thus, peptides from various biological sources can provide more favorable pharmacodynamic properties compared to conventional antibiotics, because they are more refractory to the evolution of resistance (LAZZARO; ZASLOFF; ROLFF, 2020). In this sense, the EcTI fits these conditions.

Due to the serious problem that is bacterial resistance, a viable alternative is the combination of antibiotics with compounds that exhibit activity against specific targets of multidrug-resistant strains, like the protease inhibitor (OLIVEIRA *et al.*, 2020). The combination of antibiotics against resistant bacterial infections has already been proven to reduce the mechanisms important for resistance, but the incidence of acute kidney injury has been highly prevalent (COATES *et al.*, 2020). This resistance problem and the challenge on side effects propose the protease inhibitors of natural origin as an attractive for possible combinations in antimicrobial therapy and against virulence factors.

Anticandida Assay

The infections caused by *C. albicans* also constitute serious public health problems due to the increase in cases that lead to mortality, mainly due to the existence of virulence factors of many strains against the host defenses and also to the indices of resistance to antifungal drugs such as fluconazole. (ANJOS *et al.*, 2020). The fluconazole is a fungistatic agent that exerts an inhibitory effect on enzymes that participate in ergosterol metabolism, compromising cell membrane integrity (NIVOIX; LEDOUX; HERBRECHT, 2020).

These problems highlight the imperative of evaluating new molecular targets of these microorganisms such as trypsin-type proteases, based on the fact that many plants are resistant to fungal infection due to the natural production of trypsin inhibitors. In this way, the EcTI was tested to prove possible effects on *C. albicans* growth and, therefore, to determine the IC₅₀. The analysis using the serine protease inhibitor EcTI in an attempt to obtain IC₅₀ against fungal suspension did not show significant effects (data not shown).

***C. albicans* Biofilm Formation**

Although IC₅₀ on *C. albicans* cell growth do not show satisfactory effects, the EcTI proved to be a viable agent by significantly impairing *C. albicans* ATCC 90025 biofilm formation. The Figure 5 shows the action on biofilm formation of different EcTI concentrations (200, 400 and 800 µg/mL) compared to the group without the presence of this trypsin inhibitor (negative control), in addition to fluconazole and amphotericin B (positive control).

It was possible to observe an inhibitory spectrum of the *C. albicans* biofilm at all concentrations. Wells of 400 µg/mL showed even more promising results, since it provided a lower biofilm formation (%) compared to the positive control fluconazole (500 µg/mL). Although of the existence of a higher concentration, wells with EcTI at 800 µg/mL did not provide less biofilm formation (%).

Even as other pathogenic microorganisms, *C. albicans* manifests indispensable strategies to evade the host defenses. These virulence factors materialize with the biofilm formation, due to intense protease activity to effect the production of this fungal community, since the secretion of proteolytic enzymes is increased when colonies grow in the form of a biofilm (STANISZEWSKA *et al.*, 2017).

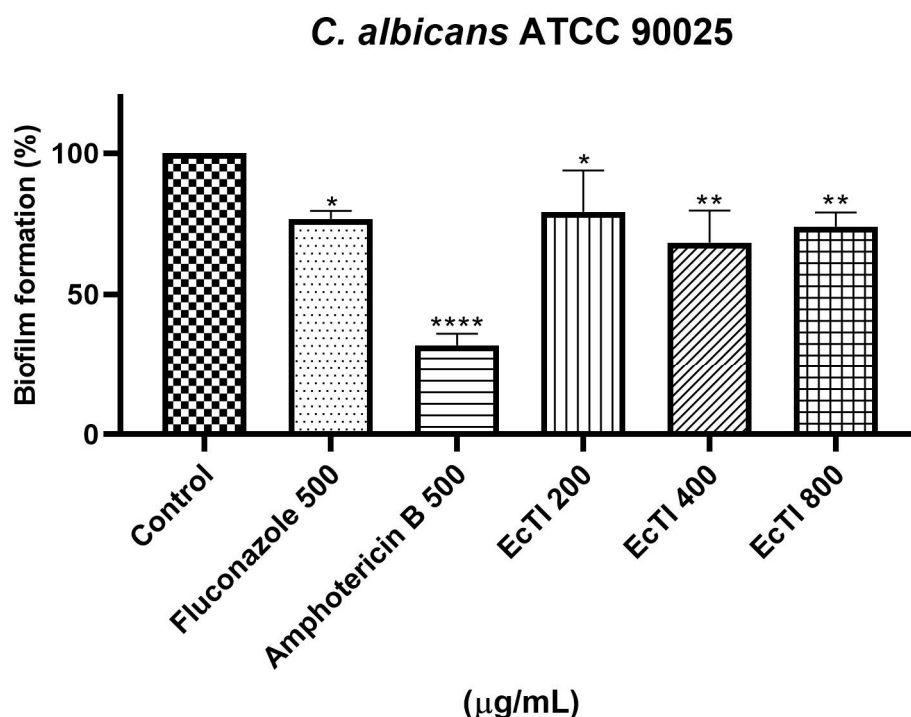


Figure 5. Effect of EcTI on the *C. albicans* biofilm formation. (A) culture adjusted to 1.5×10^7 CFU/mL untreated (negative control), (B) culture treated with EcTI at 200 μg/mL, (C) culture treated with EcTI at 400 μg/mL, (D) culture treated with EcTI at 800 μg/mL, (E) culture treated with Fluconazole at 500 μg/mL (positive control) (F) culture treated with Amphotericin B at 500 μg/mL (positive control). Percentage are expressed as the mean $\pm$ standard deviation of experiments performed in triplicates. Symbols indicate significant differences between untreated group with EcTI treatment and positive control. In all the cases, p value was < 0.05 .

Fluconazole and amphotericin B used as positive controls in the present assay proved to be effective, as expected, in impairing the construction of the *C. albicans* biofilm. Although their respective and known fungistatic and fungicidal action, fungal resistance has occurred against these drugs already used in current therapy due to ineffective action on the pathogen target. In addition, the existence of severe side effects, mainly from amphotericin B, makes it important to search for new perspectives for an effective therapy (NIVOIX; LEDOUX; HERBRECHT, 2020).

EcTI generated satisfactory effects by significantly inhibiting biofilm formation, even more than fluconazole. Thus, these results suggest that the proteolytic action of *C.*

albicans is indispensable for the construction of biofilms and the use of protease inhibitors such as EcTI may contribute to block this fungal mechanism.

***C. albicans* Biofilm Disruption**

The EcTI also incited the rupture of the mature biofilm even if dose-dependently. Figure 6 reveals that EcTI at 800 µg/mL was possible to observe a significant disruption of this biofilm, at a similar rate to fluconazole at 500 µg/mL. Even with the unexpected finding that the present compound did not enable an effective activity in inhibiting the growth of *C. albicans* cells, but has been able to exhibit a drastic effect against the already consolidated biofilm, it is essential that protease inhibitors are on the radar in order to propose new solutions against this virulence factor.

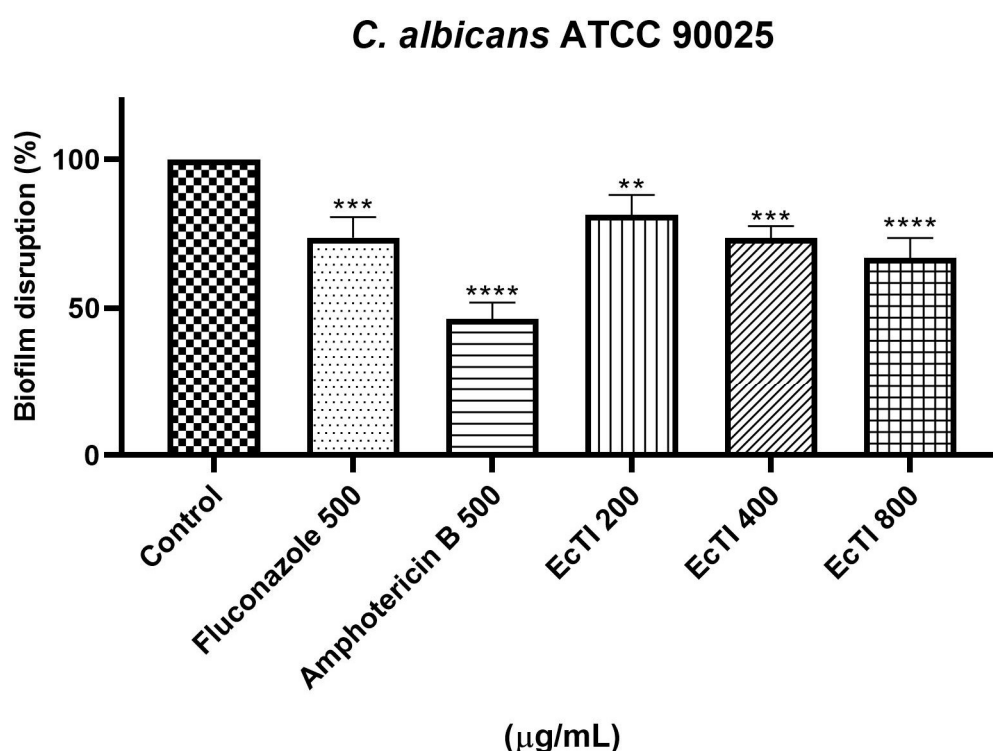


Figure 6. Effect of EcTI on the *C. albicans* biofilm disruption. (A) culture adjusted to 1.5×10^7 CFU/mL untreated (negative control), (B) culture treated with EcTI at 200 µg/mL, (C) culture treated with EcTI at 400 µg/mL, (D) culture treated with EcTI at 800 µg/mL, (E) culture treated with Fluconazole at 500 µg/mL (positive control) (F) culture treated with Amphotericin B at 500 µg/mL (positive control). Percentages are expressed as the mean $\pm$ standard deviation of experiments performed in triplicates.

Symbols indicate significant differences between untreated group with EcTI treatment and positive control. In all the cases, p value was < 0.05 .

Inhibitors of other classes such as those against aspartyl proteases have also been intensively tested for their antifungal and antibiofilm effects and although the success in the activities presented by Santos *et al.* (2021) as a decrease in planktonic cell growth, in addition to blocking adhesion in epithelial cells together with the negative influence on biofilm formation, is still evident the challenge of dismantling a mature biofilm, as the EcTI did. Therefore, this trypsin inhibitor isolated from *E. contortisiliquum* seeds presents itself as a potential agent against *C. albicans* virulence factors.

Conclusion

This study provides the first report about the effects of EcTI against virulence factors of microorganisms of great clinical importance. Although it does not show bactericidal activity against *S. aureus* and is not effective in inhibiting the *C. albicans* growth, the tests performed showed the potential of this trypsin inhibitor against the invasive mechanisms of *S. aureus* (biofilm formation, STX and hemolysis action) and *C. albicans* (biofilm formation and biofilm disruption), due to the specific target reached such as trypsin protease, key molecule that substantially influences the virulence of these strains. In this sense, it emphasizes the importance of also evaluating the effect of EcTI in multidrug-resistant strains as well as combining this inhibitor with compounds that exhibit known bactericidal and antifungal activity, in order to further observe its pharmacodynamic potential and thus propose a therapeutic perspective attempting to control severe clinical complications.

References

- ALENCAR DE BARROS, K. M.; SARDI, J. de C. O.; MARIA-NETO, S.; MACEDO, A. J.; RAMALHO, S. R.; LOURENÇO DE OLIVEIRA, D. G.; PONTES, G. S.; WEBER, S. S.; RAMALHO DE OLIVEIRA, C. F.; MACEDO, M. L. R. A new Kunitz trypsin inhibitor from *Erythrina poeppigiana* exhibits antimicrobial and antibiofilm properties against bacteria. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 144, p. 112198, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112198>
- ANJOS, M. N. V. *et al.* Ocotea glomerata (Nees) Mez Extract and Fractions: Chemical Characterization, Anti-Candida Activity and Related Mechanism of Action. **Antibiotics**, v. 9, n. 7, p. 394, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9070394>
- BATISTA, I. F. .; OLIVA, M. L. V; ARAUJO, M. S.; SAMPAIO, M. U.; RICHARDSON, M.; FRITZ, H.; SAMPAIO, C. A. . Primary structure of a Kunitz-type

trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. **Phytochemistry**, v. 41, n. 4, p. 1017–1022, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00710-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00710-5)

BEZERRA FILHO, C. M.; DA SILVA, L. C. N.; DA SILVA, M. V.; LØBNER-OLESEN, A.; STRUVE, C.; KROGFELT, K. A.; CORREIA, M. T. dos S.; VILELA OLIVA, M. L. Antimicrobial and Antivirulence Action of *Eugenia brejoensis* Essential Oil in vitro and in vivo Invertebrate Models. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00424>

BONTURI, C. R.; MOTALN, H.; SILVA, M. C. C.; SALU, B. R.; DE BRITO, M. V.; DE ANDRADE LUZ COSTA, L.; TORQUATO, H. F. V.; NUNES, N. N. dos S.; PAREDES-GAMERO, E. J.; TURNŠEK, T. L.; OLIVA, M. L. V. Could a plant derived protein potentiate the anticancer effects of a stem cell in brain cancer? **Oncotarget**, v. 9, n. 30, p. 21296–21312, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25090>

COATES, A. R. M.; HU, Y.; HOLT, J.; YEH, P. Antibiotic combination therapy against resistant bacterial infections: synergy, rejuvenation and resistance reduction. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 18, n. 1, p. 5–15, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1705155>

DA SILVA FERREIRA, R.; NAPOLEÃO, T. H.; SILVA-LUCCA, R. A.; SILVA, M. C. C.; PAIVA, P. M. G.; OLIVA, M. L. V. The effects of *Enterolobium contortisiliquum* serine protease inhibitor on the survival of the termite *Nasutitermes corniger*, and its use as affinity adsorbent to purify termite proteases. **Pest Management Science**, v. 75, n. 3, p. 632–638, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.5154>

EL-SAID, H.; ASHGAR, S. S.; BADER, A.; ALQATHAMA, A.; HALWANI, M.; ASCRIZZI, R.; FLAMINI, G. Essential Oil Analysis and Antimicrobial Evaluation of Three Aromatic Plant Species Growing in Saudi Arabia. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 959, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules26040959>

GUO, Y.; SONG, G.; SUN, M.; WANG, J.; WANG, Y. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00107>

KIM, Y.-G.; LEE, J.-H.; LEE, S.; LEE, Y.-K.; HWANG, B. S.; LEE, J. Antibiofilm Activity of Phorbaketals from the Marine Sponge *Phorbasp. sp.* against *Staphylococcus aureus*. **Marine Drugs**, v. 19, n. 6, p. 301, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md19060301>

LAZZARO, B. P.; ZASLOFF, M.; ROLFF, J. Antimicrobial peptides: Application informed by evolution. **Science**, v. 368, n. 6490, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.aau5480>

LEE, J.-H.; PARK, J.-H.; CHO, M. H.; LEE, J. Flavone Reduces the Production of Virulence Factors, Staphyloxanthin and α -Hemolysin, in *Staphylococcus aureus*. **Current Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 726–732, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0229-x>

LEE, K.; LEE, J.-H.; RYU, S. Y.; CHO, M. H.; LEE, J. Stilbenes Reduce *Staphylococcus aureus* Hemolysis, Biofilm Formation, and Virulence. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, n. 9, p. 710–717, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1758>

- LI, J.; ZHANG, C.; XU, X.; WANG, J.; YU, H.; LAI, R.; GONG, W. Trypsin inhibitory loop is an excellent lead structure to design serine protease inhibitors and antimicrobial peptides. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 10, p. 2466–2473, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1096/fj.06-7966com>
- NIVOIX, Y.; LEDOUX, M.-P.; HERBRECHT, R. Antifungal Therapy: New and Evolving Therapies. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 41, n. 01, p. 158–174, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0039-3400291>
- OLIVEIRA, M. T. A.; MOURA, G. M. M.; DA CRUZ, J. I. O.; LIMA, R. V. C.; DOS SANTOS, E. A.; ANDRADE, J. C.; ALENCAR, M. V. O. B.; LANDIM, V. P. A.; COUTINHO, H. D. M.; UCHOA, A. F. Serine protease inhibition and modulatory-antibiotic activity of the proteic extract and fractions from *Amburana cearensis*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 135, p. 110946, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110946>
- PUTRA, I. *et al.* Staphylococcus aureus alpha-hemolysin impairs corneal epithelial wound healing and promotes intracellular bacterial invasion. **Experimental Eye Research**, v. 181, p. 263–270, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.02.019>
- ROY, R.; TIWARI, M.; DONELLI, G.; TIWARI, V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 522–554, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1313372>
- RUNGELRATH, V.; DELEO, F. R. Staphylococcus aureus , Antibiotic Resistance, and the Interaction with Human Neutrophils. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 34, n. 6, p. 452–470, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8127>
- SANTOS, A. L. S. *et al.* Repositioning Lopinavir, an HIV Protease Inhibitor, as a Promising Antifungal Drug: Lessons Learned from *Candida albicans*—In Silico, In Vitro and In Vivo Approaches. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 6, p. 424, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof7060424>
- SANTOS, F. de A. G. dos *et al.* Anti-biofilm effect by the combined action of fluconazole and acetylsalicylic acid against species of *Candida parapsilosis* complex. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 84, p. 104378, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104378>
- SHAHAT, A. A.; EL-BAROUTY, G.; HASSAN, R. A.; HAMMOUDA, F. M.; ABDEL-RAHMAN, F. H.; SALEH, M. A. Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oil from the seeds of *Enterolobium contortisiliquum* (leguminosae). **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 43, n. 6, p. 519–525, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03601230802174714>
- SILVA, L. N.; DA HORA, G. C. A.; SOARES, T. A.; BOJER, M. S.; INGMER, H.; MACEDO, A. J.; TRENTIN, D. S. Myricetin protects *Galleria mellonella* against *Staphylococcus aureus* infection and inhibits multiple virulence factors. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 2823, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02712-1>
- STANISZEWSKA, M.; BONDARYK, M.; KAZEK, M.; GLINIEWICZ, A.; BRAUNSDORF, C.; SCHALLER, M.; MORA-MONTES, H. M.; OCHAL, Z. Effect of

serine protease KEX2 on *Candida albicans* virulence under halogenated methyl sulfones. **Future Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 285–306, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0141>

TRENTIN, D. da S.; GIORDANI, R. B.; ZIMMER, K. R.; DA SILVA, A. G.; DA SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. dos S.; BAUMVOL, I. J. R.; MACEDO, A. J. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 327–335, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.05.030>

TUCHSCHERR, L. *et al.* Sigma Factor SigB Is Crucial to Mediate *Staphylococcus aureus* Adaptation during Chronic Infections. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 4, p. e1004870, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004870>

WU, S.; ZHANG, J.; PENG, Q.; LIU, Y.; LEI, L.; ZHANG, H. The Role of *Staphylococcus aureus* YycFG in Gene Regulation, Biofilm Organization and Drug Resistance. **Antibiotics**, v. 10, n. 12, p. 1555, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121555>

XUE, L.; CHEN, Y. Y.; YAN, Z.; LU, W.; WAN, D.; ZHU, H. Staphyloxanthin: a potential target for antivirulence therapy. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 12, p. 2151–2160, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/IDR.S193649>

YIN, N.; YANG, X.; WANG, L.; ZHANG, C.; GUAN, J.; TAO, Y.; GUO, X.; ZHAO, Y.; SONG, W.; WANG, B.; TANG, Y. Kaempferol inhibits the expression of α -hemolysin and protects mice from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced lethal pneumonia. **Microbial Pathogenesis**, v. 162, p. 105336, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105336>

ZHANG, J.; SUO, Y.; ZHANG, D.; JIN, F.; ZHAO, H.; SHI, C. Genetic and Virulent Difference Between Pigmented and Non-pigmented *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00598>

5 CONCLUSÃO

- O EcTI não apresenta efeito bactericida;
- Os importantes mecanismos virulentos de *S. aureus* ATCC 02 como produção de estafiloxantina e capacidade de causar hemólise foram significativamente reduzidos na presença desse inibidor de tripsina;
- O inibidor, apesar de não exercer uma efetiva ação sobre o crescimento de *C. albicans* ATCC 90025, foi um excelente agente antivirulento ao inibir a atividade da tripsina, e, portanto, prejudicar a formação de biofilme e provocar a quebra do biofilme maduro;
- O uso de inibidores de tripsina tal como o EcTI propõe uma perspectiva terapêutica formidável pela disfunção de fatores de virulência desses microrganismos.

REFERÊNCIAS

- AGBOWURO, A. A.; HUSTON, W. M.; GAMBLE, A. B.; TYNDALL, J. D. A. Proteases and protease inhibitors in infectious diseases. **Medicinal Research Reviews**, v. 38, n. 4, p. 1295–1331, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/med.21475>
- AGUIAR, F. L. L. de; SANTOS, N. C.; DE PAULA CAVALCANTE, C. S.; ANDREU, D.; BAPTISTA, G. R.; GONÇALVES, S. Antibiofilm Activity on *Candida albicans* and Mechanism of Action on Biomembrane Models of the Antimicrobial Peptide Ctn[15–34]. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 8339, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21218339>
- ALENCAR DE BARROS, K. M.; SARDI, J. de C. O.; MARIA-NETO, S.; MACEDO, A. J.; RAMALHO, S. R.; LOURENÇO DE OLIVEIRA, D. G.; PONTES, G. S.; WEBER, S. S.; RAMALHO DE OLIVEIRA, C. F.; MACEDO, M. L. R. A new Kunitz trypsin inhibitor from *Erythrina poeppigiana* exhibits antimicrobial and antibiofilm properties against bacteria. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 144, p. 112198, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112198>
- ARAÚJO, N. M. S.; DIAS, L. P.; COSTA, H. P. S.; SOUSA, D. O. B.; VASCONCELOS, I. M.; DE MORAIS, G. A.; OLIVEIRA, J. T. A. CITI, a Kunitz trypsin inhibitor purified from *Cassia leiandra* Benth. seeds, exerts a candidicidal effect on *Candida albicans* by inducing oxidative stress and necrosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1861, n. 11, p. 183032, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.183032>
- AVILÉS-GAXIOLA, S.; CHUCK-HERNÁNDEZ, C.; SERNA SALDÍVAR, S. O. Inactivation Methods of Trypsin Inhibitor in Legumes: A Review. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 1, p. 17–29, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13985>
- BEZERRA, J. J. L.; PINHEIRO, A. A. V.; LUCENA, R. B. Phytochemistry and poisoning in ruminants by *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (Fabaceae): A systematic review. **Toxicon**, v. 201, p. 46–53, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.08.008>
- BONTURI, C. R.; MOTALN, H.; SILVA, M. C. C.; SALU, B. R.; DE BRITO, M. V.; DE ANDRADE LUZ COSTA, L.; TORQUATO, H. F. V.; NUNES, N. N. dos S.; PAREDES-GAMERO, E. J.; TURNŠEK, T. L.; OLIVA, M. L. V. Could a plant derived protein potentiate the anticancer effects of a stem cell in brain cancer? **Oncotarget**, v. 9, n. 30, p. 21296–21312, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25090>
- BORGES, W. de S.; BERLINCK, R. G. S.; SCOTTI, M. T.; VIEIRA, P. C. A Química de Produtos Naturais do Brasil no Século XXI. **Química Nova**, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170070>
- DA SILVA FERREIRA, R.; NAPOLEÃO, T. H.; SILVA-LUCCA, R. A.; SILVA, M. C. C.; PAIVA, P. M. G.; OLIVA, M. L. V. The effects of *Enterolobium contortisiliquum* serine protease inhibitor on the survival of the termite *Nasutitermes corniger*, and its use as affinity adsorbent to purify termite proteases. **Pest Management Science**, v. 75, n. 3, p. 632–638, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.5154>

GBIF. **Global Biodiversity Information Facility**. [s. l.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://www.gbif.org/>. Acesso em: 7 fev. 2022.

KARRAY, A.; ALONAZI, M.; SMAOUI, S.; MICHAUD, P.; SOLIMAN, D.; BEN BACHA, A. Purification and Biochemical Characterization of a New Protease Inhibitor from *Conyza dioscoridis* with Antimicrobial, Antifungal and Cytotoxic Effects. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5452, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25225452>

LYU, J.; LIU, Y.; AN, T.; LIU, Y.; WANG, M.; SONG, Y.; ZHENG, F.; WU, D.; ZHANG, Y.; DENG, S. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from the seeds of *Artocarpus heterophyllus* Lam. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 47, n. 5, p. 376–382, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/abbs/gmv022>

MEROPS. **MEROPS: The peptidase database**. [s. l.], 2021. Disponível em: https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/family_index?type=I. Acesso em: 9 jan. 2022.

MURI, E. M. F. Viral proteases: important targets of peptidemimetic compounds. **Química Nova**, v. 37, n. 2, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140052>

NAKAHATA, A. M.; MAYER, B.; RIES, C.; DE PAULA, C. A. A.; KAROW, M.; NETH, P.; SAMPAIO, M. U.; JOCHUM, M.; OLIVA, M. L. V. The effects of a plant proteinase inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* on human tumor cell lines. **Biological Chemistry**, v. 392, n. 4, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/bc.2011.031>

OTLEWSKI, J.; JELEN, F.; ZAKRZEWSKA, M.; OLEKSY, A. The many faces of protease–protein inhibitor interaction. **The EMBO Journal**, v. 24, n. 7, p. 1303–1310, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600611>

RUAN, J.-J.; CHEN, H.; SHAO, J.-R.; WU, Q.; HAN, X.-Y. An antifungal peptide from *Fagopyrum tataricum* seeds. **Peptides**, v. 32, n. 6, p. 1151–1158, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.03.015>

SOUTO, X. M.; BRANQUINHA, M. H.; SANTOS, A. L. S. Chymotrypsin- and trypsin-like activities secreted by the multidrug-resistant yeasts forming the *Candida haemulonii* complex. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 3, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920180735>

SRIKANTH, S.; CHEN, Z. Plant Protease Inhibitors in Therapeutics-Focus on Cancer Therapy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00470>

THEODORO-JÚNIOR, O. *et al.* A Plant Proteinase Inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* Attenuates Pulmonary Mechanics, Inflammation and Remodeling Induced by Elastase in Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, p. 403, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms18020403>

UPEGUI ZAPATA, Y. A. *et al.* Mode of action of a formulation containing hydrazones and saponins against leishmania spp. Role in mitochondria, proteases and reinfection process. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 13, p. 94–106, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.06.004>

ANEXO A - NORMAS DE SUBMISSÃO DE MANUSCRITOS PARA A REVISTA MICROBIOLOGICAL RESEARCH



MICROBIOLOGICAL RESEARCH

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 0944-5013

DESCRIPTION

Microbiological Research is devoted to publishing reports on prokaryotic and eukaryotic microorganisms such as yeasts, fungi, bacteria, archaea, and protozoa. Research on interactions between pathogenic microorganisms and their environment or hosts are also covered. The research should be original and include molecular aspects to generate a significant contribution of broad interest. Papers of rather specialised or of preliminary and descriptive content will normally not be considered. Studies in the following sections are included:

Reviews/Minireviews on all aspects Microbiology and Genetics Molecular and Cell Biology Metabolism and Physiology Signal transduction and Development Biotechnology Phytopathology Environmental Microbiology and Ecology

AUDIENCE

Microbiologists, biotechnologists, phytopathologists, researchers in molecular biology, researchers in agricultural and environmental sciences, biochemists, cellbiologists, biotechnologists, geneticists, ecologists, forest scientists, limnologists, agriculturists, specialists in plant cultivation

IMPACT FACTOR

2020: 5.415 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2021

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Microbiological Research is devoted to publishing reports on prokaryotic and eukaryotic microorganisms such as yeasts, fungi, bacteria, archaea, and protozoa. Research on interactions between pathogenic microorganisms and their environment or hosts are also covered. The research should be original and include molecular aspects to generate a significant contribution of broad interest. Papers of very specialised or of preliminary and descriptive content will normally not be considered.

Studies in the following sections are included:

- Reviews/Minireviews on all aspects
- Microbiology and Genetics
- Molecular and Cell Biology
- Metabolism and Physiology
- Signal transduction and Development
- Biotechnology
- Phytopathology
- Environmental Microbiology and Ecology

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent

applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double anonymized) or the manuscript file (if single anonymized). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <https://www.editorialmanager.com/micres/>.

Suggesting reviewers

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential reviewers.

You should not suggest reviewers who are colleagues, or who have co-authored or collaborated with you during the last three years. Editors do not invite reviewers who have potential competing interests with the authors. Further, in order to provide a broad and balanced assessment of the work, and ensure scientific rigor, please suggest diverse candidate reviewers who are located in different countries/regions from the author group. Also consider other diversity attributes e.g. gender, race and ethnicity, career stage, etc. Finally, you should not include existing members of the journal's editorial team, of whom the journal are already aware.

Note: the editor decides whether or not to invite your suggested reviewers.

PREPARATION

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review](#).

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor. Number pages and lines consecutively throughout the manuscript.

Article structure

Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

• **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

• **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.
 TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Illustration services

[Elsevier's Author Services](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999)... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to software:

Coon, E., Berndt, M., Jan, A., Svyatsky, D., Atchley, A., Kikinzon, E., Harp, D., Manzini, G., Shelef, E., Lipnikov, K., Garimella, R., Xu, C., Moulton, D., Karra, S., Painter, S., Jafarov, E., & Molins, S., 2020. Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88). Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to Mendeley Data. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into a data article published in *Data in Brief*. A data article is a new kind of article that ensures that your data are actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and made publicly available to all upon publication (watch this [video](#) describing the benefits of publishing your data in *Data in Brief*). You are encouraged to submit your data article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed, published open access and linked to your research article on ScienceDirect. Please note an [open access fee](#) is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your *Data in Brief* data article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Availability of accepted article

This Journal makes articles available online as soon as possible after acceptance. This concerns the Journal Pre-proofs (both in HTML and PDF format), which have undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but are not yet the definitive versions of record. A Digital Object Identifier (DOI) is allocated, thereby making it fully citable and searchable by title, author name(s) and the full text. The article's PDF also carries a disclaimer stating that it is an unedited article. Subsequent production stages will simply replace this version.

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

ANEXO B -NORMAS DE SUBMISSÃO DE MANUSCRITOS PARA A REVISTA MICROBIOLOGICAL RESEARCH NATURAL PRODUCT RESEARCH



About the Journal

Natural Product Research is an international, peer-reviewed journal publishing high-quality, original research. Please see the journal's Aims & Scope for information about its focus and peer-review policy.

Please note that this journal only publishes manuscripts in English.

Natural Product Research accepts the following types of article:

- Research article
- Short Communication
- Review
- Letter

Open Access

You have the option to publish open access in this journal via our Open Select publishing program. Publishing open access means that your article will be free to access online immediately on publication, increasing the visibility, readership and impact of your research. Articles published Open Select with Taylor & Francis typically receive 95% more citations* and over 7 times as many downloads** compared to those that are not published Open Select.

Your research funder or your institution may require you to publish your article open access. Visit our [Author Services](#) website to find out more about open access policies and how you can comply with these.

You will be asked to pay an article publishing charge (APC) to make your article open access and this cost can often be covered by your institution or funder. Use our [APC finder](#) to view the APC for this journal.

Peer Review and Ethics

Taylor & Francis is committed to peer-review integrity and upholding the highest standards of review. Once your paper has been assessed for suitability by the editor, it will then be double blind peer reviewed by independent, anonymous expert referees. If you have shared an earlier version of your Author's Original Manuscript on a preprint server, please be aware that anonymity cannot be guaranteed. Further information on our preprints policy and citation requirements can be found on our [Preprints Author Services](#) page. Find out more about [what to expect during peer review](#) and read our [guidance on publishing ethics](#).

Preparing Your Paper

Article Types

Review

- Should be written with the following elements in the following order: Title page; Abstract; Keywords; 1. Introduction; 2. Results and Discussion; 3. Experimental; 4. Conclusions; Acknowledgments; Declaration of Interest statement; References; appendices (as appropriate); table(s) with caption(s) (on individual pages); figures; figure captions (as a list)
- Should be no more than 20 pages, inclusive of:
 - Tables
 - References
 - Figure or table captions

Please send a Review proposal to the Editor-in-Chief before submission

Style Guidelines

Please refer to these [quick style guidelines](#) when preparing your paper, rather than any published articles or a sample copy.

Please use British (-ise) spelling style consistently throughout your manuscript.

Please use single quotation marks, except where 'a quotation is "within" a quotation'.

Please note that long quotations should be indented without quotation marks.

Formatting and Templates

Papers may be submitted in Word or LaTeX formats. Figures should be saved separately from the text. To assist you in preparing your paper, we provide formatting template(s).

[Word templates](#) are available for this journal. Please save the template to your hard drive, ready for use.

A [LaTeX template](#) is available for this journal. Please save the LaTeX template to your hard drive and open it, ready for use, by clicking on the icon in Windows Explorer.

If you are not able to use the template via the links (or if you have any other template queries) please contact us [here](#).

References

Please use this [reference guide](#) when preparing your paper. An EndNote output style is also available to assist you.

Taylor & Francis Editing Services

To help you improve your manuscript and prepare it for submission, Taylor & Francis provides a range of editing services. Choose from options such as English Language Editing, which will ensure that your article is free of spelling and grammar errors, Translation, and Artwork Preparation. For more information, including pricing, visit [this website](#).

Checklist: What to Include

1. **Author details.** Please ensure all listed authors meet the Taylor & Francis authorship criteria. All authors of a manuscript should include their full name and affiliation on the cover page of the manuscript. Where available, please also include ORCiDs and social media handles (Facebook, Twitter or LinkedIn). One author will need to be identified as the corresponding author, with their email address normally displayed in the article PDF (depending on the journal) and the online article. Authors' affiliations are the affiliations where the research was conducted. If any of the named co-authors moves affiliation during the peer-review process, the new affiliation can be given as a footnote. Please note that no changes to affiliation can be made after your paper is accepted. [Read more on authorship.](#)
2. **Graphical abstract** (mandatory). This is an image to give readers a clear idea of the content of your article. It should be a maximum width of 525 pixels. If your image is narrower than 525 pixels, please place it on a white background 525 pixels wide to ensure the dimensions are maintained. Save the graphical abstract as a .jpg, .png, or .tiff. Please do not embed it in the manuscript file but save it as a separate file, labelled GraphicalAbstract1.
3. You can opt to include a **video abstract** with your article. [Find out how these can help your work reach a wider audience, and what to think about when filming.](#)
4. **Funding details.** Please supply all details required by your funding and grant-awarding bodies as follows:
For single agency grants
 This work was supported by the [Funding Agency] under Grant [number xxxx].
For multiple agency grants
 This work was supported by the [Funding Agency #1] under Grant [number xxxx]; [Funding Agency #2] under Grant [number xxxx]; and [Funding Agency #3] under Grant [number xxxx].
5. **Disclosure statement.** This is to acknowledge any financial or non-financial interest that has arisen from the direct applications of your research. If there are no relevant competing interests to declare please state this within the article, for example: *The authors report there are no competing interests to declare.* [Further guidance on what is a conflict of interest and how to disclose it.](#)

6. **Data availability statement.** If there is a data set associated with the paper, please provide information about where the data supporting the results or analyses presented in the paper can be found. Where applicable, this should include the hyperlink, DOI or other persistent identifier associated with the data set(s). [Templates](#) are also available to support authors.
7. **Data deposition.** If you choose to share or make the data underlying the study open, please deposit your data in a [recognized data repository](#) prior to or at the time of submission. You will be asked to provide the DOI, pre-reserved DOI, or other persistent identifier for the data set.
8. **Geolocation information.** Submitting a geolocation information section, as a separate paragraph before your acknowledgements, means we can index your paper's study area accurately in JournalMap's geographic literature database and make your article more discoverable to others. [More information.](#)
9. **Supplemental online material.** Supplemental material can be a video, dataset, fileset, sound file or anything which supports (and is pertinent to) your paper. We publish supplemental material online via Figshare. Find out more about [supplemental material](#) and how to submit it with your article.
10. **Figures.** Figures should be high quality (1200 dpi for line art, 600 dpi for grayscale and 300 dpi for colour, at the correct size). Figures should be supplied in one of our preferred file formats: EPS, PS, JPEG, TIFF, or Microsoft Word (DOC or DOCX) files are acceptable for figures that have been drawn in Word. For information relating to other file types, please consult our [Submission of electronic artwork](#) document.
11. **Tables.** Tables should present new information rather than duplicating what is in the text. Readers should be able to interpret the table without reference to the text. Please supply editable files.
12. **Equations.** If you are submitting your manuscript as a Word document, please ensure that equations are editable. More information about [mathematical symbols and equations](#).
13. **Units.** Please use SI units (non-italicized).

Using Third-Party Material

You must obtain the necessary permission to reuse third-party material in your article. The use of short extracts of text and some other types of material is usually permitted, on a limited basis, for the purposes of criticism and review without securing formal permission. If you wish to include any material in your paper for which you do not hold copyright, and which is not covered by this informal agreement, you will need to obtain written permission from the copyright owner prior to submission. More information on [requesting permission to reproduce work\(s\) under copyright](#).