

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 15/06/2024.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”**  
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

LEANDRO DA COSTA CLEMENTINO

Identificação e caracterização de derivados furoxanos e seus mecanismos de ação para o tratamento oral da leishmaniose visceral e malária: uma contribuição para a agenda 2030-UNESP dentro dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da Organização das Nações Unidas

ARARAQUARA

2022

**LEANDRO DA COSTA CLEMENTINO**

**Identificação e caracterização de derivados furoxanos e seus mecanismos de ação para o tratamento oral da leishmaniose visceral e malária: uma contribuição para a agenda 2030-UNESP dentro dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da Organização das Nações Unidas**

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marcia A. S. Graminha  
Co-orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Jean Leandro dos Santos

Araraquara  
2022

C626i

Clementino, Leandro da Costa

Identificação e caracterização de derivados furoxanos e seus mecanismos de ação para o tratamento oral da leishmaniose visceral e malária : uma contribuição para a agenda 2030-UNESP dentro dos objetivos de desenvolvimento sustentável da Organização das Nações Unidas / Leandro da Costa Clementino. -- Araraquara, 2022  
131 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara

Orientadora: Márcia Aparecida Silva Graminha

Coorientador: Jean Leandro dos Santos

1. Doenças negligenciadas. 2. Óxido nítrico. 3. Mecanismo de ação (Bioquímica). 4. Malária. 5. Cálcio - Metabolismo. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE:

"Identificação e caracterização de derivados furoxanos e seus mecanismos de ação para o tratamento oral da leishmaniose visceral e malária: uma contribuição para a agenda 2030-UNESP dentro dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da Organização das Nações Unidas"

**AUTOR: LEANDRO DA COSTA CLEMENTINO**

**ORIENTADORA: MARCIA APARECIDA SILVA GRAMINHA**

**COORDENADOR: JEAN LEANDRO DOS SANTOS**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. MARCIA APARECIDA SILVA GRAMINHA (Participação Virtual)  
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. ANDRÉ GUSTAVO TEMPONE CARDOSO (Participação Virtual)  
Centro de Parasitologia e Micologia / Instituto Adolfo Lutz - IAL - São Paulo



Prof. Dr. RICARDO SCHER (Participação Virtual)  
Departamento de Morfologia / Universidade Federal de Sergipe - UFS - São Cristóvão



Prof. Dr. OTAVIO HENRIQUE THIEMANN (Participação Virtual)  
Departamento de Física e Ciência Interdisciplinar / Instituto de Física de São Carlos - USP - São Carlos



Profa. Dra. CHUNG MAN CHIN (Participação Virtual)  
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 15 de junho de 2022

## **DADOS CURRICULARES**

**Nome:** Leandro da Costa Clementino

**Filiação:** Maria de Lourdes da Costa Clementino e Severino Alves Clementino

**Nascimento:** 20/03/1992 - Campina Grande - PB

### **Endereço Profissional:**

Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Tripanossomatídeos (LabBioqBioMolTrip), Departamento de Análises Clínicas da FCF-UNESP.

Endereço: Rodovia Araraquara-Jaú, Km 01, Campus Ville, S/N, Araraquara SP.

CEP: 14800-903

email: leandrocostabiotec@gmail.com

### **Formação Acadêmica:**

#### **2009 - 2014**

Graduação: Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Instituição: Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA) - Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Sumé - PB.

TCC: Bioprospecção de Antibióticos produzidos por fungos da Caatinga.

Orientador: Profº Drº Jean César Farias de Queiroz.

Bolsa: REUNI

#### **2015 - 2017**

Mestrado: Biotecnologia, Área de concentração: Biotecnologia Celular e Molecular

Instituição: Instituto de Química (IQ) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Araraquara - SP.

Dissertação: Leishmanioses e a busca de metabólitos secundários de origem marinha: uma abordagem química e biológica.

Orientadora: Profª Drª Marcia A. S. Graminha.

Bolsa: CAPES

#### **2017- 2022**

Doutorado: Biotecnologia, Área de concentração: Biotecnologia Celular e Molecular

Instituição: Instituto de Química (IQ) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Araraquara - SP.

Tese: Identificação e caracterização de derivados furoxanos e seus mecanismos de ação para o tratamento oral da leishmaniose visceral e malária: uma contribuição para

a agenda 2030-UNESP dentro dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da Organização das Nações Unidas

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marcia A. S. Graminha.

Co-orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Jean Leandro dos Santos.

Bolsa: CNPq

Período sanduíche: (2021-2022) 6 meses na Rutgers Medical School – The State University of New Jersey, Newark – Nova Jersey, Estados Unidos.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Andrew Philip Thomas.

Co-orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paula J. Barlett.

Bolsa: CAPES-PrInt

### **Produção bibliográfica:**

#### **Trabalhos publicados no período**

1. KUNII, GABRIELA KINUE WATASE; FALCONE, ROSSANA; **CLEMENTINO, LEANDRO DA COSTA**; ROSA, JOÃO ARISTEU DA; NASCIMENTO, JULIANA DAMIELI; BELINTANI, TIAGO; OLIVEIRA, JADER DE; RIBEIRO, ALINE RIMOLDI. Growth Curve, Morphological and Molecular Characterization of Two Strains of *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isolated from *Triatoma sherlocki* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 55, p. 1-5, 2022.
2. **CLEMENTINO, L. C.**; FERNANDES, G. F. S. ; PROKOPCZYK, I. M.; LAURINDO, W. C.; TOYAMA, D.; MOTA, B. P.; BAVIERA, A. M.; HENRIQUE-SILVA, F.; SANTOS, J. L.; GRAMINHA, M. A. S. Design, synthesis and biological evaluation of *N*-oxide derivatives with potent *in vivo* antileishmanial activity. *PLoS One*, v. 14, p. x, 2021.
3. SAHID, E. D. N; CLAUDINO, J. C.; ODA, F. B.; CARVALHO, F. A.; SANTOS, A. G.; GRAMINHA, MARCIA A.S.; **CLEMENTINO, L. C.** *Baccharis trimera* (Less.) DC leaf derivatives and eupatorin activities against *Leishmania amazonensis*. *NATURAL PRODUCT RESEARCH*, v. xx, p. xx, 2021.
4. COSTA, NATALIA C. S.; PICCOLI, JULIA P.; SANTOS-FILHO, NORIVAL A.; CLEMENTINO, **LEANDRO C.**; FUSCO-ALMEIDA, ANA M. ; DE ANNUNZIO, SARAH R. ; FONTANA, CARLA R. ; VERGA, JULIANE B. M. ; ETO, SILAS F. ; PIZAURO-JUNIOR, JOÃO M.; GRAMINHA, MARCIA A. S.; CILLI, EDUARDO M. Antimicrobial activity of RP-1 peptide conjugate with ferrocene group. *PLoS One*, v. 15, p. e0228740, 2020.

**5. CLEMENTINO, LEANDRO DA COSTA;** ODA, FERNANDO BOMBARDA; TEIXEIRA, THAIZ RODRIGUES; TAVARES, RENATA SPAGOLLA NAPOLEÃO; COLEPICOLO, PIO; SANTOS, ANDRÉ GONZAGA DOS; DEBONSI, HOSANA MARIA; GRAMINHA, MÁRCIA A. S. The antileishmanial activity of the antarctic brown alga *Ascoseira mirabilis* Skottsberg. NATURAL PRODUCT RESEARCH, v. 34, p. 1-5, 2020.

**6. DOS SANTOS, GUSTAVO SOUZA;** DEBONSI, HOSANA MARIA; COLEPICOLONETO, PIO; RANGEL, KAREN CRISTINA; TEIXEIRA, THAIZ RODRIGUES; GASPAR, LORENA RIGO; ABREU-FILHO, PÉRICLES GAMA; PEREIRA, LUÍZ MIGUEL; YATSUDA, ANA PATRÍCIA ; GALLON, MARÍLIA ELIAS; GOBBO-NETO, LEONARDO; **DA COSTA CLEMENTINO, LEANDRO;** GRAMINHA, MÁRCIA APARECIDA SILVA; JORDÃO, LAÍS GARCIA; POHLIT, ADRIAN MARTIN . GC-MS Analysis, Bioactivity-based Molecular Networking and Antiparasitic Potential of the Antarctic Alga *Desmarestia antarctica*. Planta Medica International Open, v. 07, p. e122-e132, 2020.

**7. LEANDRO COSTA, CLEMENTINO;** FABIO AURELIO ESTEVES, TORRES; ANGELA MARIA ARENAS, VELASQUEZ; LEONARDO, VILLELA; TOYOTA FUJII, MUTUE; PIO, COLEPICOLO; MARCIA A. S., GRAMINHA. Bioguided study of the Antarctic alga *Himantothallus grandifolius* (A. Geep & E.S.Geep) indicates 13E-Docosenamide as potential antileishmanial agent. JOURNAL OF APPLIED PHARMACEUTICAL SCIENCE, v. 10, p. 98-103, 2020.

**8. DO ESPÍRITO SANTO, RAFAEL DIAS;** VELÁSQUEZ, ÁNGELA MARÍA ARENAS; PASSIANOTO, LUANA VITORINO GUSHIKEN; SEPULVEDA, ALEX ARBEY LOPERA; **DA COSTA CLEMENTINO, LEANDRO;** ASSIS, RENATA PIRES; BAVIERA, AMANDA MARTINS; KALABA, PREDRAG; DOS SANTOS, FÁBIO NEVES ; ÉBERLIN, MARCOS NOGUEIRA; DA SILVA, GIL VALDO JOSÉ; ZEHL, MARTIN; LUBEC, GERT; GRAMINHA, MÁRCIA APARECIDA SILVA; GONZÁLEZ, EDUARDO RENÉ PÉREZ. N, N-, N--trisubstituted guanidines: Synthesis, characterization and evaluation of their leishmanicidal activity. EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, v. 171, p. 116-128, 2019.

**9. LOPERA, A.A.;** VELÁSQUEZ, A.M.A.; **CLEMENTINO, L.C.;** ROBLEDO, S.; MONTOYA, A.; DE FREITAS, L.M.; BEZZON, V.D.N.; FONTANA, C.R.; GARCIA, C.; GRAMINHA, M.A.S. Solution-combustion synthesis of doped TiO<sub>2</sub> compounds and

its potential antileishmanial activity mediated by photodynamic therapy. JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B-BIOLOGY, v. 183, p. 64-74, 2018.

**10. CLEMENTINO, LEANDRO DA COSTA;** VÉLASQUEZ, ANGELA MARIA ARENAS; PASSALACQUA, THAIS GABAN; DE ALMEIDA, LETICIA; GRAMINHA, MARCIA A.S.; MARTINS, GILMARCIO Z.; SALGUEIRO, LÍGIA; CAVALEIRO, CARLOS; SOUSA, MARIA DO CÉU; MOREIRA, RAQUEL R.D. In vitro activities of glycoalkaloids from the *Solanum lycocarpum* against *Leishmania infantum*. Revista Brasileira de Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 28, p. 673-677, 2018.

**11. RANGEL, KAREN C.;** DEBONSI, HOSANA M.; **CLEMENTINO, LEANDRO C.;** GRAMINHA, MÁRCIA A. S.; VILELA, LEONARDO Z.; COLEPICOLO, PIO; GASPAR, LORENA R. Antileishmanial activity of the Antarctic red algae *Iridaea cordata* (Gigartinales; Rhodophyta). JOURNAL OF APPLIED PHYCOLOGY, v. 31, p. 825-834, 2018.

#### **Trabalhos publicados em eventos**

**1. CLEMENTINO, L. C.;** FERNANDES, G. F. S.; MARTINS, J. W. L.; PAVAN, A. R.; SANTOS, J. L.; GRAMINHA, M. A. S. Avaliação de novos derivados furoxanos contra *Leishmania infantum*. In: 55º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical e XXVI Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2019, Belo Horizonte. Anais do Medtrop 2019, 2019.

**2. AMBROZINI, L. M.;** FALCONE, R.; KUNII, G. K. W.; OLIVEIRA, J.; BELINTANI, T.; **CLEMENTINO, L. C.;** GRAMINHA, M. A. S.; ROSA, J. A. Estudo de duas cepas de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida Trypanosomatidae) isoladas de *Triatoma melanica* e *Triatoma sherlocki* (Hemiptera, Reduvidae, Triatominae). In: XIX Congresso Farmacêutico da UNESP e V Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2019, Araraquara. Anais da XIX CFU e V JEBB, 2019.

**3. TEIXEIRA, T. R.;** SANTOS, G. S.; RANGEL, KAREN C.; CORDEIRO, L. R. G.; ABREU FILHO, P.; PEREIRA, L. M.; YATSUDA, A. P.; **CLEMENTINO, L. C.;** GRAMINHA, M. A. S.; JORDAO, L. G.; POHLIT, A. M.; VILELA, LEONARDO Z.; COLEPICOLO NETO, P.; DEBONSI, H. M.. *Desmarestia antarctica* (Desmarestiales, Phaeophyceae): An antarctic derived source of bioactive compounds against protozoan diseases. In: XVI International Symposium on Marine Natural Products & XI

European Conference on Marine Natural Products, 2019, Peniche. Anais do XVI MANAPRO and XI ECNMP, 2019.

4. DEBONSI, H. M.; TEIXEIRA, T. R.; ABREU FILHO, P.; YATSUDA, A. P.; **CLEMENTINO, L. C.**; GRAMINHA, M. A. S.; JORDAO, L. G.; POHLIT, A. M.; COLEPICOLO NETO, P.. Antiparasitic Metabolites Isolated from the Antarctic Algae-Associated Fungus: *Penicillium echinulatum*. In: XVI International Symposium on Marine Natural Products & XI European Conference on Marine Natural Products, 2019, Peniche. Anais do XVI MANAPRO and XI ECNMP, 2019.

5. **CLEMENTINO, L. C.**; TEIXEIRA, T. R.; SANTOS, G. S.; LAURINDO, W. C.; DEBONSI, H. M.; COLEPICOLO NETO, P.; GRAMINHA, M. A. S. Endophytic fungi of brown Antarctic macroalgae: Identification of antileishmanial metabolites and its possible molecular target. In: VII REDEALGAS Workshop, Biotechnology for Wellness, 2019, Arraial do Cabo. Anais do VII REDEALGAS, 2019.

6. MARTINS, J. W. L.; DE ALMEIDA, L.; PASSALACQUA, T. G.; PROKOPCZYK, I. M.; FERNANDES, G. F. S.; **CLEMENTINO, L. C.**; GRAMINHA, M. A. S.; SANTOS, J. L. Avaliação de novos compostos N-óxidos inibidores de cisteína proteases planejados contra leishmaniose. In: VIII Congresso Farmacêutico da UNESP e IV Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2018, Araraquara. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e aplicada, 2018. v. 39.

7. GRAMINHA, MARCIA A.S.; CLEMENTINO, L. C.; DEBONSI, HOSANA M.; ODA, F. B.; SANTOS, A. G.; FUJII, M. T.; VILELA, LEONARDO Z.; COLEPICOLO NETO, P.. From the Antarctic pole to the tropics: exploring secondary metabolites from the macroalgae *Himantothallus grandifolius* and *Ascoseira mirabilis* as alternative to treat the neglected disease leishmaniasis. In: XVII Congresso Brasileiro de Ficologia - CBFIC, 2018, Natal. Anais do XVII CBFIC, 2018.

#### **Participação em reuniões científicas e cursos de curta duração**

- Oficinas Virtuais CHAGASLEISH 2021 – Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e Leishmaniose. (Carga horária: 12 horas). Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2021.
- Membro da Comissão Avaliadora do XXXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2020.

- Membro da comissão julgadora de trabalhos no Biotecfarma, oferecido pela 67ª Jornada Farmacêutica da UNESP. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. 2020.
- Formação de Professores Mediadores para EaD. (Carga horária: 30h). Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil. 2020.
- Membro da comissão julgadora de pôsteres no XXXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. 2020.
- Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório. (Carga horária: 60h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. 2019.
- III Curso de Inverno em Biotecnologia do LBM-LBV, DGE-UFSCar. (Carga horária: 40h). Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil. 2019.
- Membro da comissão julgadora de pôsteres no XIX Congresso Farmacêutico da UNESP e V Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. 2019.
- 55º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical e XXVI Congresso Brasileiro de Parasitologia. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Belo Horizonte, MG. 2019.
- Membro da comissão julgadora de pôsteres no XXX Congresso de Iniciação Científica da UNESP - 1ª Fase. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. 2018.

### **Participação em bancas**

1. QUEIROZ, J.C.F.; COELHO, G. D.; **CLEMENTINO, L.C.** Participação em banca de PAULO ITAGINO LOPES THEODORO. Análise da produção de metabólitos secundários por fungos endofíticos de *Aloe vera*. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos) - Universidade Federal de Campina Grande.
2. GRAMINHA, M. A. S.; IMAMURA, K. B.; **CLEMENTINO, L. C.** Participação em banca de Jéssica Naiara Varonez da Fonseca. Aspectos Mecanísticos do antileishmanial 14e em *Leishmania amazonensis*. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

### **Outras atividades acadêmicas relevantes**

- Membro Titular da Congregação do Instituto de Química – UNESP - Araquara, no período de 01/02/2021 a 31/01/2022.
- Apresentação de Palestra Intitulada: A natureza nos inspira: Produtos naturais antárticos e tropicais como promissores antileishmaniais, durante o I Congresso Brasileiro de Biotecnologia On-line, realizado no período de 08 a 11 de março de 2021.
- Membro Suplente da Comissão Permanente de Pesquisa (CPP) do Instituto de Química – UNESP - Araraquara, no período de 01/02/2019 a 31/01/2020.
- Ganhador do Prêmio científico para Jovens Talentos Yocie Yoneshigue-Valentim, no VII REDEALGAS Workshop.
- Promoveu a palestra Intitulada "Do Cangaço ao Iglu: Uma experiência nos Extremos" na Escola de Ensino Fundamental e Médio Antonio Galdino Filho - Pocinhos/Paraíba, como ação extensionista do Projeto Macroalgas Marítimas da Antártica. 2019.
- Participou da OPERANTAR XXXVI no período de Janeiro a Fevereiro de 2018, tendo acampado durante 10 dias na Ilha Snow, Região da Península Antártica, para fins de estudos de ecotoxicologia de Macroalgas da Ilha.
- Revisor desde 2019, dos Periódicos: Journal of Applied Pharmaceutical Sciences e NATURAL PRODUCT RESEARCH.

### **Patente**

DEBONSI, H. M.; DEBONSI, HOSANA M.; YATSUDA, ANA PATRÍCIA; KAWAKAMI, C. M.; MARZOCCH-MACHADO, C. M.; BROCHI, J. C. V.; RANGEL, K. C.; **CLEMENTINO, L. C.**; CORDEIRO, L. R. G.; TONANI, L.; PEREIRA, L. M.; GRAMINHA, M. A. S.; KRESS, M. R. V. Z.; CANICOBA, N. C.; ABREU-FILHO, PÉRICLES GAMA; TAVARES, R. N. S.; ENGLER, S. S. M.; TEIXEIRA, THAIZ RODRIGUES . Uso de viridicatina e viridicatol como agentes destinados ao preparo de formulações cosméticas com atividade fotoprotetora e antioxidante e de formulações farmacêuticas para prevenção e/ou tratamento de doenças inflamatórias e doenças parasitárias. 2020, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020200178997, título: "Uso de viridicatina e viridicatol como agentes destinados ao preparo de formulações cosméticas com atividade fotoprotetora e antioxidante e de formulações farmacêuticas para prevenção e/ou tratamento de

doenças inflamatórias e doenças parasitárias", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 01/09/2020.

## Dedicatória

Dedico esta Tese ao meu amor maior, minha mãe Dona Lourdes, que com seu jeito único de ser e sua força, esteve sempre ao meu lado, por mais difícil que fosse em alguns momentos. À senhora, dedico este trabalho como agradecimento por tanto. Te amo, mãe!

Dedico também ao meu pai, Severino (*in memoriam*) que partiu há 28 anos. Espero que esteja orgulhoso da pessoa que me tornei, pois me orgulho de ser seu filho.

## Epígrafe

*“Morte e vida das hipóteses. Da equação eu parte do Cosmos ao axioma Cosmos parte do eu. Subsistência. Conhecimento. Antropofagia.”*

*Manifesto Antropofágico - Oswald de Andrade*

*“Prepare o seu coração  
Pras coisas que eu vou contar  
Eu venho lá do sertão  
Eu venho lá do sertão  
Eu venho lá do sertão  
E posso não lhe agradar*

*Na boiada já fui boi, mas um dia me montei  
Não por um motivo meu  
Ou de quem comigo houvesse  
Que qualquer querer tivesse  
Porém por necessidade  
Do dono de uma boiada  
Cujo vaqueiro morreu”*

*Disparada - Geraldo Vandré e Theo de Barros*

## Agradecimentos

Ao criador e a espiritualidade amiga por tudo que foi conduzido ao meu favor, por trilhar os melhores caminhos, regados de muito aprendizado e pessoas excepcionais, e por me fazer superar todas as dificuldades impostas durante este ciclo;

Aos meus irmãos, Lourildo, Luciene, Luciano, Luciana Nazareno, Hélio e Maria Aparecida (Cida), por todo o carinho e incentivo que sempre depositaram em mim. Obrigado por serem meu alicerce. Amo vocês;

À minha família, tios, primos e avós (*in memoriam*) por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado, sem vocês tudo seria mais difícil;

À Professora Dr<sup>a</sup> Marcia Graminha por ser essa pessoa tão especial em minha vida. Obrigado pela empatia desde o dia da seleção do Mestrado (quase 7 anos atrás, o tempo passa muito rápido!), por ter me mostrado o quanto é difícil ser “chefe” e o quanto é necessário fazer o justo e correto sempre que necessário, por mais difícil que seja às vezes. Com certeza, saio uma nova pessoa desse ciclo e você teve papel fundamental nesse processo, por vezes, acreditando mais em mim do que eu mesmo. Nunca esquecerei disso! Obrigado por cada “puxão de orelha” e por cada pequena comemoração que culminou na conclusão desta Tese. Sou grato por todas as oportunidades que me proporcionou, tenha certeza que as aproveitei ao máximo. Continue fazendo esse trabalho incrível que fez comigo, com certeza fará a diferença na vida de outras pessoas também! Por fim, perco uma grande orientadora e ganho uma grande amiga pra vida;

Ao meu co-orientador Professor Dr<sup>o</sup> Jean Santos e sua equipe: Guilherme Fernandes, Johnny Martins e Igor Prokopczyk pela síntese dos compostos, estudos de docking, delineamento dos ensaios enzimáticos e discussão acerca dos resultados obtidos. Vocês são parte fundamental do desenvolvimento deste trabalho;

Ao Professor Dr<sup>o</sup> Pio Colepicolo por todo o apoio prestado na execução deste projeto, pela oportunidade de continuar trabalhando dentro do projeto das macroalgas e por todo o apoio oferecido sempre que preciso;

Ao Professor Dr<sup>o</sup> Flávio Henrique-Silva do LBM-UFSCar e sua equipe: Danyelee Toyama, Priscila Shibao e Anderson por todo o auxílio e trabalho compartilhado durante a expressão e ensaios com a CPB2.8. Foram ótimos dias em São Carlos na companhia de ótimas pessoas. Um agradecimento especial também ao Renato e Kayki que me auxiliaram durante minha estadia em São Carlos nos estudos de expressão da CPB2.8, obrigado por todo o apoio e amizade;

Ao Professor Dr<sup>o</sup> Andrew Thomas, Dr<sup>a</sup> Paula Barlett, funcionários e sua equipe da Escola de Medicina da Rutgers University: Dr<sup>o</sup> Larry Gaspers, Oleta, Stefani, Victor, Juliana e Rute; muito obrigado por todo o aprendizado compartilhado e pelos bons momentos vividos durante o intercâmbio. Foi uma experiência que mudou minha vida científica e pessoal. Obrigado por fazerem esta experiência mais leve e por todo o auxílio prestado durante os seis meses que vivi em Newark;

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Tripanossomatídeos da FCF-UNESP, Izabel Martinez (Bel, *in memoriam*), Letícia, Aline, Mayara, Amanda, Thaís, Luiz, Angela, Natália, Wilquer (Zé), Juliane, Michele, Mariceli, Eduarda (Duda), Alessandra e Gabriel por todo o apoio, momentos de descontração e convívio. Esta caminhada foi mais leve por ter sido compartilhada com vocês;

Ao Pedro, meu irmão número 8, que tive a felicidade de conhecer no dia da seleção do Mestrado, desde então já são 7 anos regados com momentos de alegria, tristeza e estresse, mas com muito bom humor e apoio mútuo. Obrigado por ser tão importante em minha vida, especialmente nesta reta final do Doutorado, espero um dia poder retribuir por tanto. À sua “namorada” e minha amiga, Claudia, por ser este ser tão incrível, que me apaixonei desde o primeiro dia que conheci, obrigado por tanto carinho e acolhimento que tiveram comigo. Agradeço também às suas famílias, por terem sido a minha em tantos momentos.

À Rayza pela amizade e por tudo que vivemos durante este ciclo, espero que continuemos com essa sintonia em bons e maus momentos sempre contando um com o outro, obrigado por tudo morena!;

Aos funcionários da FCFar-UNESP Araraquara, em especial à Cris, Rô, Marisinha, Celso e sua equipe do biotério, às meninas da faxina Rose e Andrea pelo auxílio, momentos de distração e carinho ao longo destes anos;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, assim como, aos funcionários deste Instituto e da STPG;

Ao CNPq pela bolsa de doutorado (Processo 143334/2017-4) à CAPES pela bolsa concedida para intercâmbio por meio do Programa CAPES-PrInt-UNESP (Processo 88887.582126/2020-00), CNPQ, MCT-Proantar e FAPESP pelo auxílio financeiro;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a execução deste trabalho.

*MUITO OBRIGADO!*

## RESUMO

As doenças negligenciadas representam um grande desafio para políticas em saúde pública, sendo as leishmanioses e a malária duas importantes doenças parasitárias, por acometerem um mesmo perfil populacional e necessitarem de novos agentes terapêuticos para somarem ao portfólio de quimioterápicos atualmente em uso. Considerando os objetivos de Desenvolvimento Sustentável proposto pela ONU, o qual estabelece uma agenda global que propicie o desenvolvimento sustentável como uma perspectiva de construção de um futuro comum, pautado nas Pessoas, Prosperidade, Planeta, Paz e Parcerias. Dentro deste contexto, nosso grupo de pesquisa vem estudando novas moléculas promissoras para o tratamento de doenças parasitárias, contribuindo para o tema Saúde e Bem-Estar que visa o desenvolvimento de pesquisas direcionadas ao entendimento e ações de prevenção, terapia e controle de doenças transmissíveis e não transmissíveis, desenvolvimento e avaliação de novos fármacos e medicamentos. Assim, ao longo do desenvolvimento desta pesquisa, furoxanos (**4a-o**) e benzofuroxanos (**4p-x**) foram caracterizados quanto ao potencial anti-amastigota para *Leishmania infantum*, identificando os furoxanos doadores de NO (**4a-h**, **4l-m**) e o benzofuroxano **4r** como os mais potentes ( $EC_{50} < 10 \mu M$ ) e seletivos ( $SI > 10$ ). Após clonagem do gene e expressão da correspondente enzima cisteíno protease de *Leishmania mexicana* LmCPB2.8 $\Delta$ CTE (CPB 2.8) em *Pichia pastoris*, verificou-se que os furoxanos (**4a-n**), benzofuroxanos (**4q-r** e **4t-u**) e *N*-acil-hidrazonas (**14a-g**) apresentam boa capacidade de inibir a protease parasitária ( $0,8 < IC_{50} < 14 \mu M$ ). Como prova de conceito, destaca-se que a atividade leishmanicida dos compostos pode estar relacionada a um efeito dual provocado pela atividade microbicida do NO, associada à inibição da enzima, visto que (**14a-g**) inibem CPB2.8 ( $2 < IC_{50} < 12 \mu M$ ), mas não apresentam atividade anti-amastigota na máxima concentração testada ( $10 \mu M$ ). A análise *in silico* de parâmetros farmacocinéticos indicou **4f** para avaliação quanto ao seu potencial terapêutico frente a camundongos Balb/c infectados com *L. infantum*. Verificou-se que a administração oral duas vezes ao dia com uma dose de 7.7 mg/kg/dia, foi capaz de reduzir em 90% a carga parasitária no fígado e baço, sem causar danos hepáticos ou renais, finalizando assim o trabalho desenvolvido para *L. infantum*. Todas as moléculas foram posteriormente avaliadas frente a formas intra-eritrocitárias de *Plasmodium falciparum* geneticamente modificados para expressar o indicador de  $Ca^{2+}$  GCaMP3, mediante estágio sanduíche na New Jersey Medical School, Rutgers, Newark – EUA. Dentre os furoxanos, **4m** ( $EC_{50}$  2,8  $\mu M$ ) foi o mais promissor, enquanto **4r** foi o benzofuroxano mais ativo, apresentando inibição em torno de 40% do crescimento parasitário. Estudos de mecanismos de ação mostraram que **4m** não é capaz de alterar a morfologia do vacúolo digestivo, onde está localizada a cisteíno protease de plasmódio, como pode ser observado para o controle inibidor de proteases **E64**. Análise do extrato proteico de eritrócitos infectados e tratados por 10 horas com **4m** ou **E64** mostrou acúmulo de proteínas não degradadas apenas no tratamento com **E64**, indicando que a cisteíno protease de *P. falciparum*, potencialmente, não é o alvo de **4m**. Foi analisada também a capacidade dos compostos interferir na homeostase do  $Ca^{2+}$  intracelular, sendo **4m** capaz de alterar os níveis deste íon no parasita, não apresentando o mesmo efeito em hepatócitos murinos, após liberação do cátion a partir do retículo endoplasmático, sendo, portanto, este efeito seletivo para o parasita. A influência do NO liberado pela molécula **4m** neste desbalanço foi descartada, visto que o composto doador de NO utilizado como controle não promoveu nenhuma

alteração nos níveis de cálcio. Estes dados mostram que os furoxanos possuem grande potencial para o desenvolvimento de anti-leishmaniais e anti-maláricos.

**Palavras chave:** Anti-leishmaniais. Anti-maláricos. Cisteíno protease. Homeostase do Cálcio. Furoxanos. *Leishmania infantum*. Óxido nítrico. *Plasmodium falciparum*.

## ABSTRACT

Neglected diseases represent a major challenge for public health policies. Among these diseases, we highlight leishmaniasis and malaria: two important parasitic diseases that affect poor people with no political voice and heavily affected by the etiologic agents *Leishmania* spp. and *Plasmodium* spp. There are few available therapeutic drugs, which present high toxicity and low efficacy; thus, new therapeutic agents are urgently needed. Considering the Sustainable Development goals proposed by The United Nations, which establishes a global agenda to promote, among other goals, Health and wellness for the human population until 2030, our research group has been involved contributing to this theme in order to develop new therapy to control leishmaniasis and more recently, malaria on the context of this research project. Therefore, furoxan (**4a-o**) and benzofuroxan (**4p-x**) compounds were characterized regarding the anti-*Leishmania infantum* effect, which identified the furoxan NO donors (**4a-h**, **4l-m**) and benzofuroxan **4r** as the most potent and selective compounds ( $EC_{50} < 10 \mu\text{M}$ ;  $SI > 10$ ). Due to the presence of a *N*-acyl-hydrazone group that seems to target proteases, we cloned and expressed the corresponding *Leishmania mexicana* cysteine protease enzyme LMCPB2.8 $\Delta$ CTE (CPB2.8) in *Pichia pastoris* in order to evaluate the inhibitory effect of these compounds against the purified enzyme. The furoxans (**4a-n**), benzofuroxan (**4q-r** and **4t-u**) and *N*-acyl-hydrazone compounds (**14a-g**) show good ability to inhibit the parasite protease ( $0.8 \mu\text{M} < IC_{50} < 14 \mu\text{M}$ ). It is also important to highlight that the leishmanicidal activity of these compounds might be related to a dual effect caused by the microbicidal activity of NO and associated to the enzyme inhibition, since **14a-g**, which are not able to release NO, thus not present any anti-amastigote activity at the maximum tested concentration ( $10 \mu\text{M}$ ), although causing protease inhibition ( $2 \mu\text{M} < IC_{50} < 12 \mu\text{M}$ ). *In silico*, pharmacokinetic analysis shows the therapeutic potential of **4f** a *L. infantum*-infected Balb/c mice model. After oral administration, twice daily at a 7.7 mg/kg/day dose, **4f** reduced the parasite burden by 90% in the liver and spleen, with no observed toxicity to the liver or kidney, finishing the studies involving *L. infantum*. All molecules were subsequently evaluated against intra-erythrocyte forms of *Plasmodium falciparum* genetically modified to express the GCaMP3  $Ca^{2+}$  indicator through a sandwich stage at Rutgers New Jersey Medical School in Newark – USA. Among the furoxan, **4m** ( $EC_{50} 2.8 \mu\text{M}$ ) while **4r** was the most active benzofuroxan, showing inhibition around 40% of parasite growth inhibition. Studies regarding the mechanism of action suggests that **4m** probably is not targeting the *P. falciparum* proteases falcipains through the analyses of morphological modifications of the parasite digestive vacuole, or hemoglobin degradation. In the meantime, the ability of the compounds to interfere in intracellular calcium homeostasis was also analyzed. The compound **4m** is selectively capable to preferentially alter the levels of this ion in the parasite rather than in murine hepatocytes through the release of calcium from the endoplasmic reticulum not related to an indirect effect due to NO release. This data shows that the furoxan compounds have potential to develop antileishmanial and antimalarial drugs.

**Keywords:** Antileishmanial. Antimalarial. Cysteine protease. Calcium homeostasis. Furoxan. *Leishmania infantum*. Nitric oxide. *Plasmodium falciparum*.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>22</b>
2.1 Doenças Negligenciadas .....	22
2.2 Leishmanioses .....	23
2.2.1 Tratamento .....	28
2.3 Malária .....	31
2.3.1 Tratamento .....	34
2.4 Cisteíno proteases como alvo terapêutico para leishmanioses e malária .....	38
2.5 Compostos furoxanos e derivados .....	43
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>46</b>
3.1 Objetivos específicos .....	46
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>48</b>
1 INTRODUÇÃO .....	48
Design, synthesis and biological evaluation of <i>N</i> -oxide derivatives with potent <i>in vivo</i> antileishmanial activity .....	48
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>97</b>
1 INTRODUÇÃO .....	97
2 METODOLOGIA .....	97
2.1 Cultivo, sincronização e obtenção de <i>P. falciparum</i> .....	97
2.2 <i>Screening</i> via ensaio da lactato-desidrogenase (LDH) .....	98
2.3 Avaliação de alterações morfológicas em PfGCaMP3 frente a compostos furoxanos com atividade anti-plasmódio .....	99
2.4 Efeito dos compostos anti- <i>Plasmodium</i> na hidrólise de hemoglobina .....	99
2.5 Ensaio de homeostase do cálcio em PfGCaMP3 .....	100
2.6 Ensaio de homeostase do cálcio em hepatócitos murinos .....	101
2.7 Análise Estatística .....	102
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	102
3.1 O furoxano 4m apresentou atividade antiparasitária frente à cepa PfGCaMP3 .....	102
3.1 4m não altera a morfologia do vacúolo digestivo e não causa acúmulo de hemoglobina não degradada em PfGCaMP3 .....	106
3.2 4m é capaz de mobilizar cálcio proveniente do retículo endoplasmático e também acidificação do citosol em <i>P. falciparum</i> .....	109
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	<b>116</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>118</b>
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>120</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas compreendem um conjunto de doenças infecciosas causadas por uma série de patógenos, como bactérias, vírus, fungos e parasitas; também conhecidas como doenças tropicais negligenciadas por ocorrerem com maior frequência nos trópicos (HOTEZ et al., 2020). As leishmanioses são um conjunto de doenças que afetam milhares de pessoas no mundo e apresentam sérios problemas relacionados à terapêutica, necessitando, assim, de esforços para o desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento destas doenças (FEASEY et al., 2010). A malária por sua vez embora não seja classificada como negligenciada pela Organização Mundial da Saúde, é um importante problema de saúde pública uma vez que acomete o mesmo perfil populacional das leishmanioses e apresenta também problemas relacionados à sua terapêutica (ASHLEY; PYAE PHYO; WOODROW, 2018).

As leishmanioses ocorrem em 98 países da América Latina, África, Europa e Ásia, atingindo cerca de 12 milhões de pessoas e colocando em risco aproximadamente outros 350 milhões (ALVAR et al., 2012; LOHARIKAR et al., 2016). O agente etiológico pertence ao gênero *Leishmania*, com pelo menos 20 espécies descritas causadoras da doença, e transmitidos ao hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Novo Mundo) ou *Phlebotomus* (Velho Mundo) (VAN ASSCHE et al., 2011; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). As manifestações clínicas variam desde apresentação de úlceras na pele ou mucosas, até o desenvolvimento de infecção sistêmica, sendo estas classificadas como leishmaniose cutânea (LC), mucocutânea (LMC) ou visceral (LV), respectivamente (SINGH; SIVAKUMAR, 2004).

A malária é recorrente em cerca de 90 países, ocorrendo na América do Sul, África sub-Saariana e sul da Ásia, atingindo 200 milhões de pessoas, com 3,4 milhões de indivíduos sob risco de infecção (ASHLEY; PYAE PHYO; WOODROW, 2018). Esta doença é causada pelos parasitas do gênero *Plasmodium* transmitidos pelas fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*, durante o repasto sanguíneo. Apesar de haver mais de 120 espécies descritas, apenas as espécies *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi* e *Plasmodium ovale* causam infecção humana (KOTEPUI et al., 2020). A principal manifestação clínica da malária é a ocorrência de febre intervalada nos casos leves, que pode evoluir para

um quadro clínico mais grave, levando a óbito se não houver o diagnóstico e identificação correta da espécie causadora da infecção, geralmente o *P. falciparum*, seguido de terapêutica adequada para eliminação da espécie causadora da infecção (ASHLEY; PYAE PHYO; WOODROW, 2018).

As leishmanioses são consideradas extremamente negligenciadas pela OMS, possuindo baixo investimento em desenvolvimento de drogas, com fármacos disponíveis há mais de 70 anos, os quais apresentam baixa eficácia e elevada toxicidade; problemas associados com o tempo e via de administração, além casos de resistência (NWAKA; RIDLEY, 2003; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Para a malária, o cenário é um pouco diferente por possuir mais investimento em pesquisa e desenvolvimento de fármacos, entretanto, a terapêutica atual encontra uma série de desafios a serem superados, como casos de resistência, a necessidade de tratamentos mais curtos, prevenção da recaída de pacientes em infecções por *P. vivax* e bloqueio da transmissão da doença (DE RYCKER et al., 2018). Desta forma é mais que urgente e necessária a busca por compostos candidatos a novos fármacos anti-leishmanais e anti-maláricos.

Compostos furoxanos e derivados, principalmente os benzofuroxanos, são descritos por apresentarem diferentes atividades biológicas, incluindo ação leishmanicida e malaricida (VICENTE et al., 2008; DUTRA et al., 2014). Em 2014, Dutra e colaboradores, caracterizou o derivado furoxano **14e** (recentemente renomeado **Lapdesf14e**) como um agente leishmanicida, descrito como promissor antileishmanial, com eficácia *in vivo* para leishmaniose visceral, potente doador de óxido nítrico, além de ser inibidor de cisteína protease (CPB2.8 $\Delta$ CTE) de *Leishmania*, importante enzima envolvida no escape do sistema imune do hospedeiro. Contudo, este composto apresentou problemas relacionados à sua solubilidade, o que influencia diretamente na sua administração, dificultando assim o avanço no processo de desenvolvimento de fármacos. Para os benzofuroxanos, é sugerido que estes compostos atuam em *Leishmania* por estarem envolvidos na produção de estresse oxidativo, podendo interferir na mitocôndria do parasito, e recentemente, De Almeida (2017) os descreveu como inibidores de cisteína protease deste parasito, efeito associado ao grupo *N*-acil-hidrazona que compõem estruturalmente estes derivados (CASTRO et al., 2009; DE ALMEIDA, 2017).

Já para *Plasmodium* é relatada a bioatividade de furoxanos e benzofuroxanos de forma bastante pontual, sendo descrito que furoxanos híbridos com amodiaquina

possuem efeitos associados a acumulação no vacúolo digestivo do parasito, apresentando melhor potência em atividade que derivados benzofuroxanos, os quais estão associados a elevada citotoxicidade para células de mamífero e menor bioatividade para o parasita (VICENTE et al., 2008; MOTT et al., 2012).

Dentro deste contexto esta linha de pesquisa relacionada ao desenvolvimento de novos fármacos para doenças negligenciadas está alinhada ao tema Saúde e Bem-estar, um dos objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) do Milênio lançado em 2000 pela Organização das Nações Unidas (ONU) (BURALLI et al., 2018). De fato, a UNESP, por meio de iniciativa da pró-reitoria de Pós-Graduação, tem contribuído de forma sistemática e efetiva para o cumprimento destas metas. Portanto, o Tema 4: Saúde e Bem-Estar está alinhado com a ODS 3 – Saúde, Bem-estar e Vida Saudável. Neste contexto, esta tese contribuiu com a identificação de agentes anti-leishmaniais também de origem natural, produzindo artigos científicos publicados (CLEMENTINO et al., 2018, 2020; LOPERA et al., 2018; RANGEL et al., 2018; DO ESPÍRITO SANTO et al., 2019; COSTA et al., 2020; DOS SANTOS et al., 2020; SAHID et al., 2022) e patente ("Uso de viridicatina e viridicatol como agentes destinados ao preparo de formulações cosméticas com atividade fotoprotetora e antioxidante e de formulações farmacêuticas para prevenção e/ou tratamento de doenças inflamatórias e doenças parasitárias" , Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 01/09/2020 - BR 1020200178997), em adição à avaliação do potencial terapêutico de uma série de novos derivados furoxanos, incluindo fenil-, amida-furoxanos e benzofuroxanos aqui relatados.

Estas moléculas apresentam diferentes níveis de solubilidade e foram planejadas a partir do protótipo **Lapdesf14e** para leishmaniose visceral (DUTRA et al., 2014). Adicionalmente, no âmbito do programa CAPES-PrInt, estendemos nossos estudos, investigando o potencial antimalárico destes compostos. Sendo assim, esta tese está estruturada em revisão de Literatura e capítulos 1, 2: sendo o capítulo 1 referente ao trabalho desenvolvido para leishmaniose visceral causada por *L. infantum* e o capítulo 2 acerca do trabalho desenvolvido para malária causada por *P. falciparum*.

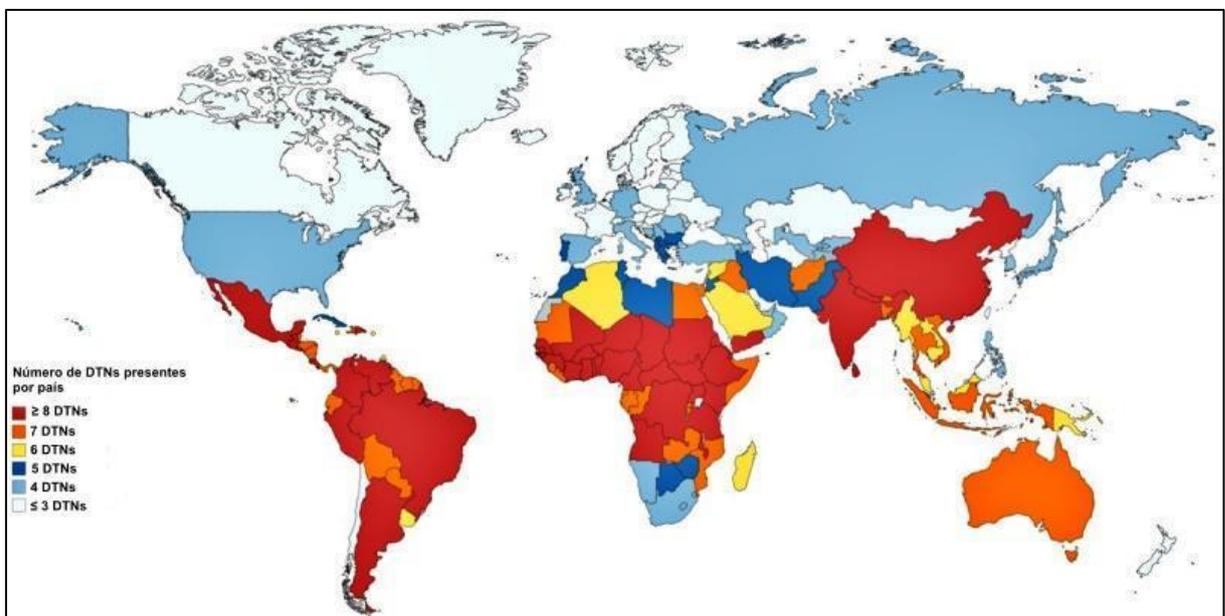
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Doenças Negligenciadas

As Doenças Negligenciadas (DNs) correspondem a um conjunto de 17 doenças infecciosas causadas por bactérias, fungos, vírus e parasitas e de maior prevalência nos países tropicais e subtropicais, podendo ser também denominadas como Doenças Tropicais Negligenciadas. Ao longo da apresentação deste trabalho, será adotada a denominação DNs, uma vez que estas doenças podem ocorrer em outras regiões do planeta, além dos trópicos, como a Europa (Figura 1) (BURGOS et al., 2020; HOTEZ et al., 2020).

Estas doenças ocorrem em regiões caracterizadas pela pobreza da população com acesso inadequado ao saneamento básico e contato próximo de insetos vetores, especialmente em países em desenvolvimento como o Brasil e afetam aproximadamente 2 bilhões de pessoas no mundo, causando 350 000 mortes anuais segundo estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2014 (MOLYNEUX; SAVIOLI; ENGELS, 2016; MITRA; MAWSON, 2017; ENGELS; ZHOU, 2020).

**Figura 1. Distribuição mundial das DTNs.**



Número de DTNs por país de acordo com a Organização Mundial da Saúde. Fonte: Adaptado de BURGOS et al., 2020.

Entre as DNs existentes, a doença de chagas, doença do sono e leishmanioses são responsáveis pelas maiores taxas de morte e que despertam pouco interesse da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de fármacos, com pouco retorno em

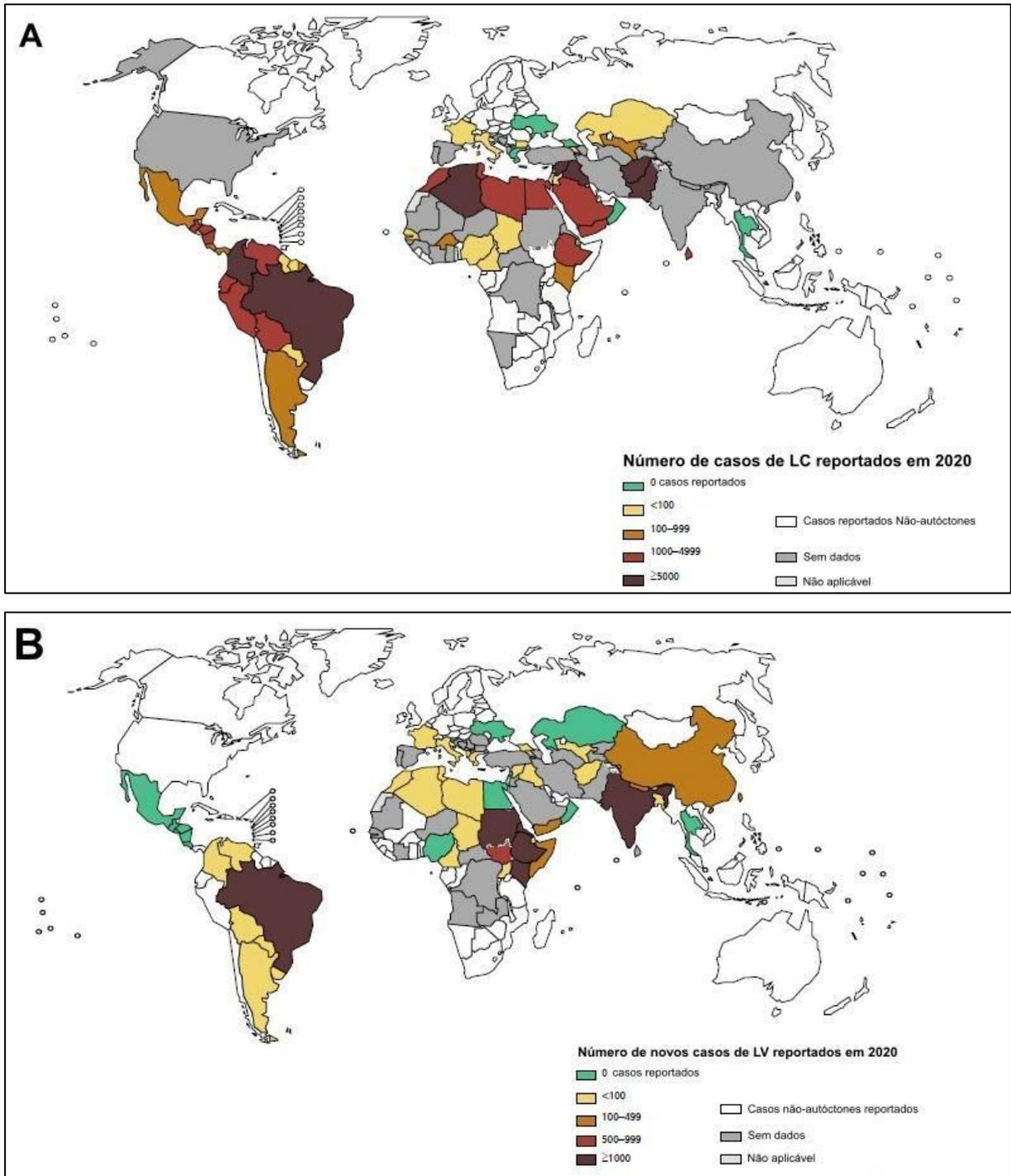
dividendos (MOLYNEUX; SAVIOLI; ENGELS, 2016). A malária por sua vez, em termos de morbidade, é considerada um importante problema de saúde pública pela OMS, afetando o mesmo perfil populacional descrito (HOTEZ et al., 2020).

## **2.2 Leishmanioses**

As leishmanioses estão entre as DNs mais negligenciadas pela OMS, ficando em segundo lugar em mortalidade e em sétimo em termos de anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (DALYS); além disso, estima-se que devido às consequências da pandemia causada pela COVID-19 a incidência de LC pode aumentar substancialmente devido a movimentos migratórios e ao cenário de agravamento da pobreza, facilitando a transmissão dos parasitas em vetores permissivos, assim como, a LV pode ser agravada em áreas endêmicas devido a ineficácia do controle imunológico em infecções virais para pacientes com a doença (BHOR; RAFATI; PAI, 2021; MIGUEL et al., 2021).

De acordo com a OMS, este conjunto de doenças que compõem as leishmanioses são endêmicas em todos os continentes, podendo ser dividida em dois grandes grupos LC e LV, com 350 milhões de pessoas em risco de contrair a doença e mais de 2 milhões de novos casos estimados anualmente, além de casos reportados em 200 países para o ano de 2020 (Figura 2) (WHO, 2021; BHOR; RAFATI; PAI, 2021)

**Figura 2. Distribuição mundial das leishmanioses em 2020.**



Distribuição Mundial da LC e LV para do ano de 2020 de acordo com a Organização Mundial da Saúde, baseada no número de novos casos reportados. A – Distribuição mundial da leishmaniose cutânea. B – Distribuição da leishmaniose visceral. Fonte: Adaptado de WHO, 2021.

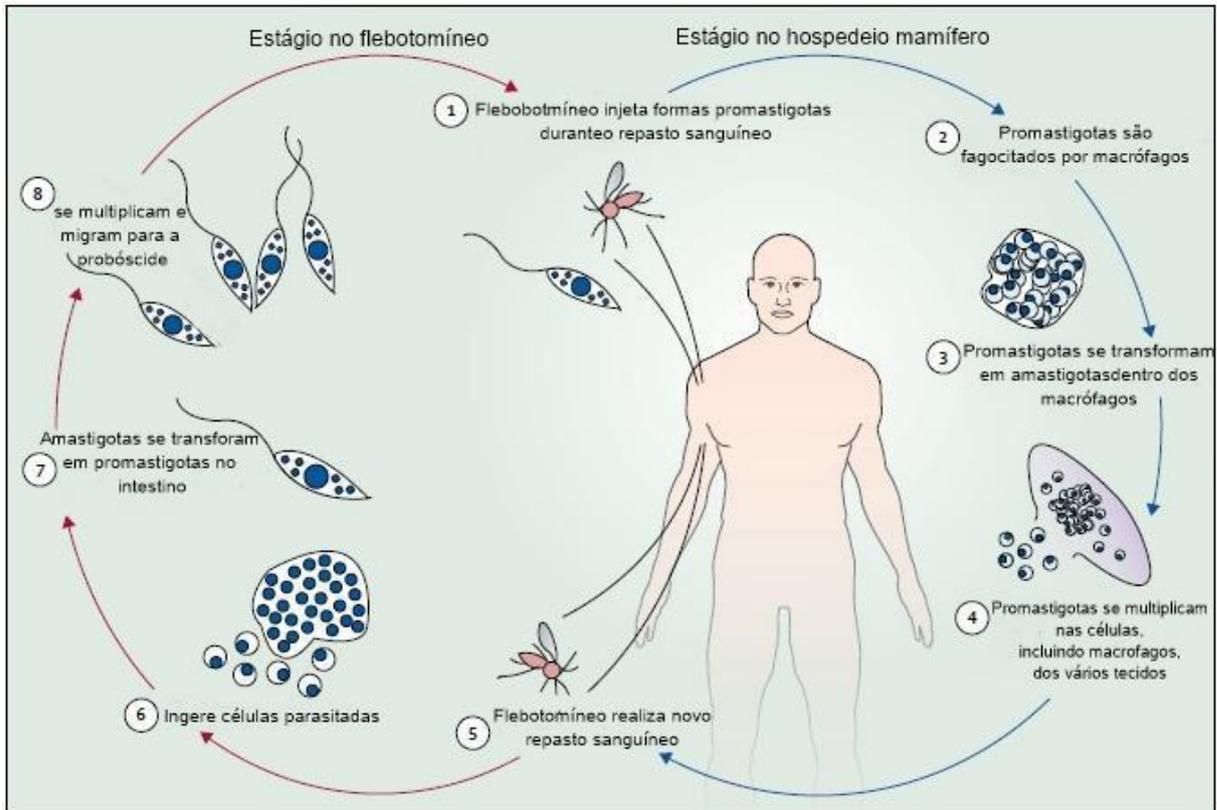
A LC é a forma mais comum da doença, incluindo dentro desta classificação a forma mucocutânea que acomete regiões de mucosa, porém a LV é a forma mais severa e na maioria das vezes fatal se não tratada (WHO, 2021). Estas parasitoses são causadas por parasitas do gênero *Leishmania*, que são encontrados nas formas promastigotas, no inseto vetor; e na forma amastigota, internalizada em células do

sistema fagocítico mononuclear, especialmente macrófagos, nos hospedeiros mamíferos (SUNTER; GULL, 2017). A *Leishmania* possui ainda características estruturais e bioquímicas particulares, como a presença de uma mitocôndria única, com DNA concatenado, denominado de cinetoplasto, glicossomos que realizam parte da via glicolítica, além de metabolismo único de tióis (SINGH; GARG; ALI, 2016; SUNTER; GULL, 2017).

O principal transmissor de *Leishmania* spp. na natureza é o inseto do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo – Europa, África e Ásia) ou *Lutzomyia* (Novo Mundo – América e Oceania), família Psychodidae, com pelo menos 70 espécies transmissoras conhecidas, que podem infectar hospedeiros mamíferos incluindo o ser humano, possuindo assim um ciclo de vida digenético (BATES, 2007; DÍAZ; PONTE-SUCRE, 2018). O ciclo biológico do parasita dura em torno de 72 horas e inicia quando a fêmea do inseto flebotomíneo injeta as formas promastigotas metacíclicas (forma infectante) no hospedeiro mamífero que são reconhecidos por receptores de superfície de células do sistema fagocítico mononuclear, preferencialmente macrófagos, que fagocitam as formas promastigotas formando o fagossomo, onde essa estrutura sofre maturação ao se fundir com o lisossomo do macrófago formando assim o fagolisossomo ou vacúolo parasitóforo, completando a diferenciação para amastigotas (KAYE; SCOTT, 2011).

Uma vez dentro das células, o parasita consegue subverter o sistema imune do hospedeiro e se multiplicar através de sucessivas divisões binárias simples até o rompimento celular, que irá promover a infecção de novas células (MULLER; BAKER; ROLLINSON, 2000). Durante o repasto sanguíneo o inseto é contaminado com macrófagos infectados, que se rompem no trajeto pelo trato digestório do mesmo; então os amastigotas são diferenciados a promastigotas procíclicas (forma não infectiva), as quais se multiplicam e colonizam a faringe e esôfago do vetor, até atingir o estágio final infectivo denominado promastigotas metacíclicas (KILLICK-KENDRICK, 1990) (Figura 3).

**Figura 3. Ciclo de vida do parasito *Leishmania* no inseto flebotomíneo e no hospedeiro mamífero.**



Formas promastigotas de *Leishmania* diferenciam-se no inseto flebotomíneo em promastigotas metacíclicas infecciosas. Durante o repasto sanguíneo, o inseto regurgita as formas metacíclicas, que são fagocitadas principalmente por macrófagos. Os promastigotas diferenciam-se em amastigotas aflagelados, que se replicam dentro das células hospedeiras, e se rompem quando há amastigotas em excesso, infectando novas células fagocitárias. O ciclo de transmissão é completo quando as células infectadas são capturadas por outro flebotomíneo.

Fonte: Adaptado de BURZA, et al., 2018.

As leishmanioses apresentam diferentes manifestações clínicas que variam de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida, estado imunológico do hospedeiro e presença de comorbidades (PELLISSARI et al., 2011). Na manifestação cutânea há tropismo por regiões de pele e mucosa, com feridas ulcerativas ou não, únicas ou múltiplas, além de causar destruição de regiões de mucosa quando mucocutânea (Figura 4). No Brasil, é mais comum a manifestação cutânea da doença causada pelas espécies *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania amazonensis* (SINGH; SIVAKUMAR, 2004; SINGH; SUNDAR, 2014).

**Figura 4. Manifestações clínicas da leishmaniose cutânea.**



Manifestações clínicas da LC e LMC. A foto da esquerda mostra lesão ulcerosa única, enquanto a imagem da direita mostra lesões múltiplas ulcerosas ou não.

Fonte: FARAHMAND et al., 2011.

A LV é a forma mais grave da doença e o foco da primeira etapa deste trabalho. A forma visceral das leishmanioses pode ser fatal em mais de 90% dos casos se não tratada; em 2020 34% dos novos casos de LV foram reportados na região Africana, enquanto que os outros 66%, na Europa, Américas, Região leste do Mediterrâneo e Sul da Ásia (WHO, 2021). Esta forma da doença é causada principalmente por *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) e *Leishmania donovani*, apresentando amplo espectro clínico que pode variar de manifestações leves a moderadas e graves com período de incubação de 10 a 24 meses (média de 2 a 6 meses) e os casos de óbito se devem à anemia severa instalada e infecção bacteriana associada (MANN et al., 2021).

Os sintomas mais comuns são febre persistente, hepatoesplenomegalia (aumento do fígado e baço), pancitopenia, hipergamaglobulinemia (IgG e IgM) e acentuada perda de peso (Figura 5 A) (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). No continente africano e na Índia ainda é relatada uma complicação da LV, conhecida como Pós-Calazar ou popularmente como febre negra, que consiste em erupções nodulares na pele, frequentemente observada após o tratamento (SANGENIS et al., 2014) (Figura 5 B).

**Figura 5. Manifestações clínicas da leishmaniose visceral.**



Manifestações clínicas da LV. **A** – Quadro clínico de hepatoesplenomegalia causada pela LV. **B** – Quadro clínico de LV Pós-Calazar com erupções nodulares.  
Fonte: SANGENIS et al., 2014 e BURZA et al., 2018.

É importante destacar que associado ao quadro clínico crítico das leishmanioses, especialmente da LV, é relatado na literatura casos de coinfeção com doenças autoimunes como pacientes portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), o que torna as leishmanioses um problema ainda mais grave (LINDOSO et al., 2016).

### **2.2.1 Tratamento**

Os fármacos utilizados como primeira escolha para as leishmanioses incluem os antimoniais pentavalentes, antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio, já os de segunda escolha, compreendem a anfotericina B (AnfB) e suas formulações (lipossomal ou dispersão coloidal), miltefosina, paromomicina e pentamidina (Quadro 1) (DAVIES et al., 2003; CROFT; OLLIARO, 2011; BARRETT; CROFT, 2012).

**Quadro 1.** Fármacos atualmente empregados no tratamento da Leishmaniose Visceral (LV), Cutânea (LC), Mucocutânea (LMC) e Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar (LDPC), via de administração e ano de introdução no mercado.

<b>Fármaco</b>	<b>Administração</b>	<b>LV</b>	<b>LC</b>	<b>LMC</b>	<b>LDPC</b>	<b>Introdução</b>
Antimoniais pentavalentes	Parenteral	X	X	X	X	1937-1945
Anfotericina B deoxicolato e formulações lipossomais	Intravenosa	X			X	1959
Paromomicina	Tópica para LC e parenteral para LV	X	X			2006
Miltefosina	Oral	X	X	X		2002
Pentamidina	Intramuscular	X	X	X		1973

Os antimoniais pentavalentes ( $Sb^V$ ) estão disponíveis desde 1920 quando foi observada sua eficácia para as leishmanioses, porém, entraram no mercado em 1937, e a partir de 1945, na forma de estibogluconato, sendo empregados tanto para o tratamento da LC quanto da LV e administrados por via parenteral (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010).

Embora o mecanismo de ação destes compostos não seja completamente compreendido, sabe-se que os antimoniais sofrem oxidação de  $Sb^V$  para a forma ativa  $Sb^{III}$  no interior das células parasitadas e afetam a bioenergética do parasita; sendo relatado como mecanismo predominante desta classe de compostos a acumulação intracelular seletiva de  $Sb^{III}$  através da disfunção do transportador do tipo aquaporina AQP1, aumento nos níveis de tióis e superexpressão de transportadores do tipo ABC (MATOS et al., 2020; OLÍAS-MOLERO et al., 2021). Os efeitos colaterais mais frequentes relatados pelo uso de antimoniais são mialgia, artralgia, leucopenia e anorexia, podendo ainda ser cardio, nefro e hepatotóxicos, com restrições ao uso por grávidas e pessoas idosas (GOTO, H., LINDOSO, 2010; CROFT; OLLIARO, 2011).

A AnfB é um antibiótico poliênico, derivado de uma cepa de *Streptomyces nodosus*, introduzida para o tratamento da LV em 1960, sendo utilizada como opção terapêutica nos países onde há casos de resistência aos antimoniais pentavalentes (WORTMANN et al., 2010; BALASEGARAM et al., 2012). Além de sua forma convencional, existem as formulações de AnfB: a lipossomal que é menos tóxica, porém com meia-vida mais curta e mais cara que a convencional; a complexo lipídico de AnfB e AnfB coloidal que são menos circulantes que a convencional, possuindo parâmetros cinéticos distintos que implicam diretamente em reajustes no tratamento quando comparada a AnfB convencional (HAMILL, 2013). Este fármaco possui

afinidade por ergosterol, principal esteroide de membrana do parasito, o que impede a ligação da *Leishmania* ao macrófago, uma vez que este fármaco se liga na membrana do parasito, pode atuar também formando canais transmembranas, aumentando o influxo de íons, causando sua morte (VAN ASSCHE et al., 2011).

A pentamidina é uma diamina aromática introduzida em 1930 inicialmente contra *Trypanosoma* spp., administrada via intravenosa ou intramuscular, com uso cada vez menor uma vez que pode causar diabetes mellitus insulina dependente, além de causar nefrotoxicidade, hipoglicemia e hipotensão (NO, 2016). Seu mecanismo de ação está associado a diminuição do potencial de membrana mitocondrial devido ao acúmulo na mitocôndria do parasito, causando alterações na síntese de DNA e alterações na morfologia do cinetoplasto (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).

A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídico, descoberto nos anos 1960, produzido pela fermentação de *Streptomyces rimosus* com alta eficácia contra um grande espectro de bactérias e protozoários, incluindo *Leishmania*, com mecanismo de ação ainda não completamente elucidado; contudo, a inibição da síntese proteica através da inibição da translocação e reciclagem de subunidades ribossômicas, assim como a modificações no potencial de membrana possam ser seu modo de ação em *Leishmania* (GOTO, H., LINDOSO, 2010; LINDOSO et al., 2012). Os efeitos colaterais incluem ototoxicidade, nefro e hepatotoxicidade (MATOS et al., 2020).

A miltefosina por sua vez é um derivado da alquilfosfocolina, descoberta por volta de 1980, com atividade antineoplásica, porém atribuída a atividade anti-*Leishmania in vivo* em 1990, sendo uma alternativa à quimioterapia para as leishmanioses, com eficácia clínica comparada a AnfB, além de administrada via oral (SINGH; SUNDAR, 2014). Acredita-se que atua interagindo com a membrana celular do parasito por modulação de receptores da superfície celular, metabolismo de inositol e ativação de fosfolipases, causando a morte celular do tipo apoptose (SEIFERT; CROFT, 2006). Os efeitos colaterais incluem teratogenicidade, o que restringe o uso em grávidas, e efeitos relacionados ao longo tempo de meia vida no organismo (> 120h), como casos de cepas resistentes (OLÍAS-MOLERO et al., 2021). No Brasil, seu uso foi recomendado recentemente, no ano de 2020, para o tratamento da leishmaniose tegumentar (cutânea) a partir de nota informativa pelo Ministério da Saúde (<https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/dezembro/17/nota-informativa-miltefosina.pdf>).

Ainda não existe uma vacina para a prevenção das leishmanioses em humanos, enquanto que para cães, principal reservatório da LV mais próximo ao ser humano, há algumas opções disponíveis, porém com ressalvas quanto à sua padronização, deficiências metodológicas e diferenças substanciais nas características das populações estudadas (OLÍAS-MOLERO et al., 2021). A eutanásia dos animais infectados ainda é a principal recomendação para controle da doença em áreas endêmicas, entretanto há divergências sobre a eficácia do método, além de questões éticas envolvidas (COSTA et al., 2013).

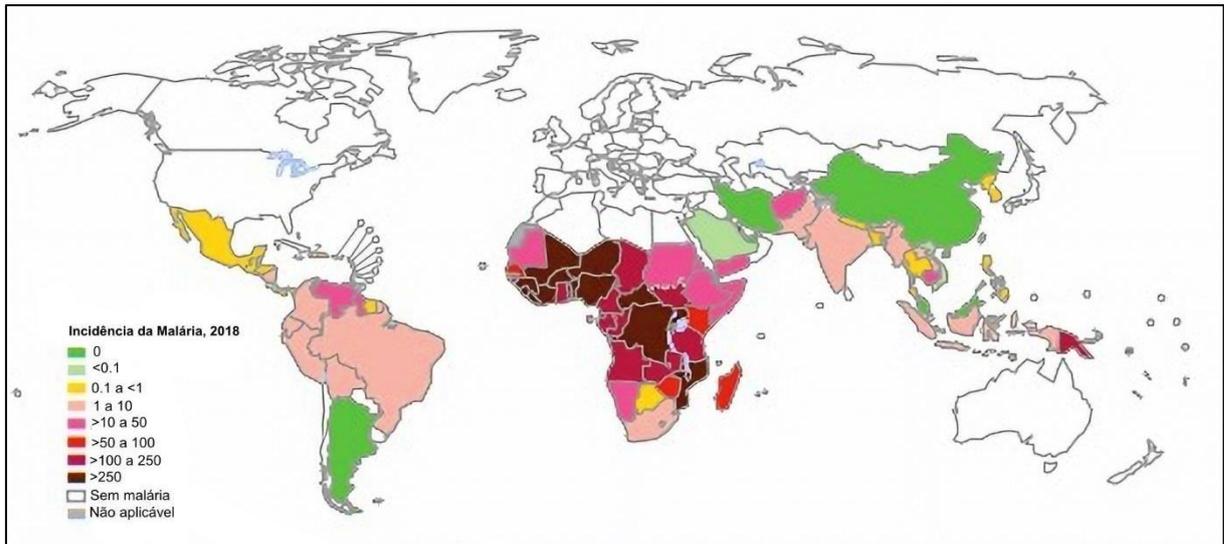
Portanto, sem o controle da infecção nos reservatórios domésticos, em pouco tempo surgem os casos humanos. Assim, após o diagnóstico da doença em humanos, deve ser empregada a quimioterapia com os fármacos disponíveis, de acordo com a orientação dos gestores de saúde pública local. Como observado, todos os fármacos atualmente empregados possuem alta toxicidade associada ao seu uso, além de restrições em determinadas regiões, devido à baixa eficácia geralmente associada à resistência desenvolvida pelo parasita (OLIVEIRA et al., 2011).

Sendo assim, observada a limitada disponibilidade de fármacos leishmanicidas, dificuldade de administração (com exceção da miltefosina), como também casos de cepas resistentes, torna a pesquisa de novos anti-leishmaniais necessária e importante para contornar estes problemas.

### **2.3 Malária**

A malária é considerada pela OMS um importante problema em saúde pública com 241 milhões de casos registrados e 627 mil mortes nos países endêmicos para o ano de 2020, entretanto, acredita-se que este número de mortes seja influenciado pela pandemia da COVID-19, devido a interrupção dos serviços de assistência pela OMS, especialmente no continente Africano (WHO, 2021). Ocorre em mais de 90 países, com maior concentração de casos no continente africano, com mais de 93% das mortes ocorridas no mundo (Figura 6). No Brasil, a transmissão se concentra na região da Amazônia legal (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins) com cerca de 99% dos casos registrados (BRASIL, 2021).

**Figura 6. Distribuição mundial da malária.**



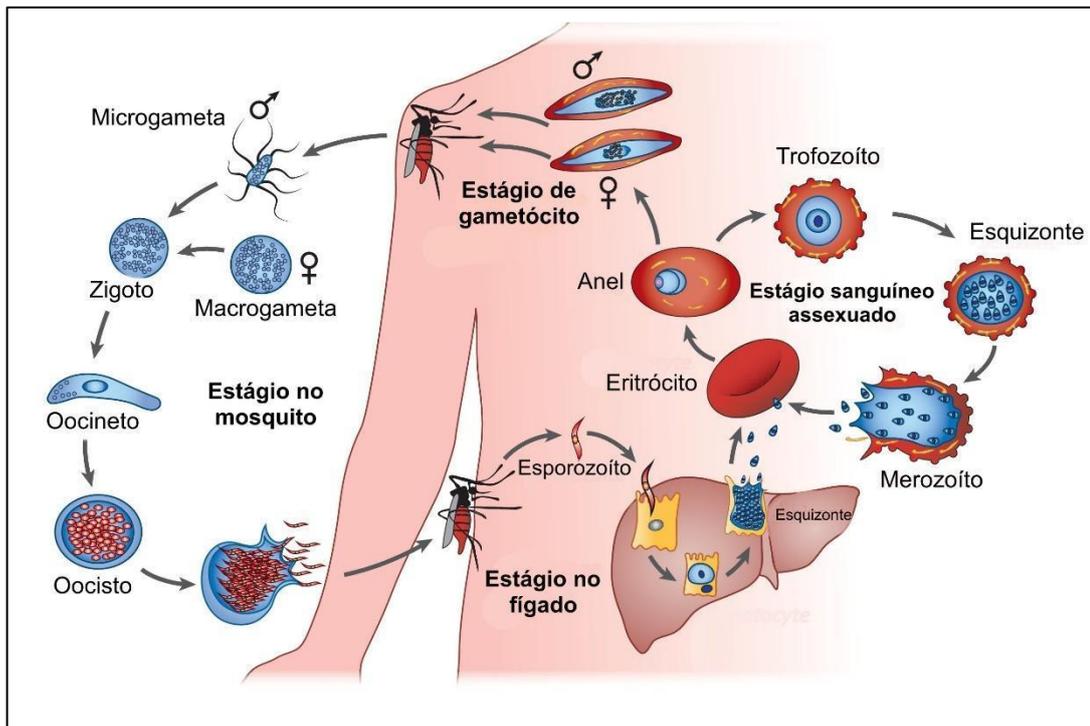
Distribuição mundial da malária de acordo com a Organização Mundial da Saúde, baseado na incidência de casos (número de casos por 1000 habitantes). Fonte: Adaptado de WHO, 2019.

O principal transmissor da malária em humanos é o mosquito do gênero *Anopheles*, família *Culicidae*, popularmente conhecido como pernilongo, com mais de 430 espécies conhecidas, sendo aproximadamente 70 espécies que podem transmitir a doença de fato (PIMENTA et al., 2015). Até o momento, mais de 200 espécies de *Plasmodium* foram descritas, entretanto, apenas cinco capazes de infectar seres humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*, sendo este último naturalmente mantido em macacos causando malária zoonótica no Sudeste de Ásia (SATO, 2021).

A infecção inicia-se quando os indivíduos são picados pela fêmea do inseto vetor *Anopheles* resultando na liberação dos esporozoítos na corrente sanguínea, os quais irão infectar os hepatócitos (Figura 7). Uma vez nestas células, ocorre multiplicação dos parasitas dando origem aos merozoítas que irão romper os hepatócitos, caindo na circulação sanguínea infectando as hemácias, dando início a segunda fase do ciclo, a esquizogonia sanguínea (BRASIL, 2021). É neste estágio intraeritrocitário que ocorre a proliferação em massa dos parasitos por reprodução assexuada cíclica e que aparecem os sintomas da doença. Os ciclos eritrocíticos repetem-se a cada 48 horas em infecções por *P. falciparum* e *P. vivax*, e a cada 72 horas para *P. malariae*. Após algumas gerações nos eritrócitos, os merozoítas se diferenciam a gametócitos feminino (macrogameta) e masculino (microgameta), cuja fecundação ocorrerá no trato digestório do inseto, formando primeiramente o oocineto

e, posteriormente os esporozoítas, forma que será transmitida ao homem no momento da picada do inseto, encerrando assim o ciclo (ASHLEY; PYAE PHYO; WOODROW, 2018; MAIER et al., 2019).

**Figura 7. Ciclo biológico do parasito *Plasmodium* spp. causador da malária.**



Formas esporozoítas de *Plasmodium* spp. são injetadas no ser humano e migram para o fígado, aonde irão se diferenciar a esquizontes que irão romper os hepatócitos dando origem aos merozoítos, que caem na circulação sanguínea infectando as hemácias dando início ao ciclo assexuado, em que a cada 48 ou 72 horas estes parasitas completam um ciclo de multiplicação evoluindo do estágio imaturo de anel até o estágio maduro de merozoíto. É nesta fase que se iniciam os sintomas clínicos da doença. Após algumas gerações, os merozoítos podem se diferenciar para gametas feminino (macrogameta) e masculino (microgameta) que são ingeridos pelo mosquito em um novo repasto sanguíneo. É iniciado então o estágio esporogônico, em que no estômago do mosquito o microgameta penetra o macrogameta dando origem ao zigoto, que se torna alongado e com motilidade (oocineto) migrando para o intestino médio gerando o oocisto. Estes oocistos irão crescer, se multiplicar dando origem aos esporozoítos, que irão migrar para as glândulas salivares, tornando assim o mosquito infectivo novamente fechando o ciclo.

Fonte: Adaptado de MAIER et al., 2019.

É importante destacar que durante o estágio hepático, nas infecções por *P. vivax* e *P. malariae*, alguns parasitas podem entrar em estado de latência, sendo denominados de hipnozoítas, responsáveis por recaídas da doença, geralmente seis meses após o tratamento (BRASIL, 2021). O período de incubação da doença dura tipicamente de 10-14 dias para *P. falciparum* e *P. knowlesi*, 2-3 semanas para *P. vivax* e *P. ovale* e 18 dias ou mais para *P. malariae*; porém pode haver variações, *P. vivax*,

por exemplo, pode ter de 3-6 meses de incubação primária (ASHLEY; PYAE PHYO; WOODROW, 2018).

Os sintomas da malária podem iniciar de 6-8 dias após a picada do mosquito, ou meses depois de estar em áreas de contágio, podendo variar de acordo com a espécie. Os sintomas clássicos de malária não-complicada são caracterizados por episódios de febre, calafrio e sudorese intervalados (48 horas para *P. vivax* e *ovale* e 72 para *P. malariae*) acompanhados de dor abdominal, náusea, vômitos, diarreia, dor nas costas, mialgia, palidez e icterícia que correspondem a liberação dos merozoítas pelos eritrócitos rompidos (BASU; SAHI, 2017).

A periodicidade de sintomas é menos comum para *P. falciparum* que apresenta manifestações multiformes, podendo apresentar-se como gastroenterite aguda, infecções do trato respiratório superior ou raramente pode apresentar icterícia simulando hepatite viral (TUTEJA, 2007). O quadro clínico pode variar dependendo da cepa envolvida, parasitemia, tempo de doença e nível de imunidade adquirida, com destaque para primoinfectados que estão sujeitos a maior gravidade necessitando de acompanhamento médico, especialmente em infecções por *P. falciparum*, responsável pela maioria dos casos letais (BRASIL, 2021). Nos casos mais graves, denominados de malária-complicada, é relatado dor abdominal intensa, redução do volume de urina, vômito persistente, sangramento, cianose, convulsão e hepatoesplenomegalia, podendo ser letal (TUTEJA, 2007; BASU; SAHI, 2017).

Por assemelhar-se com outras doenças e não haver um quadro clínico específico, é recomendável a busca de orientação médica e solicitação de exame laboratorial para diagnóstico específico da malária, que pode ser por esfregaço sanguíneo e análise microscópica, kits imunocromatográficos com anticorpos mono e policlonais, ou ainda por diagnóstico molecular (TORRES et al., 2006).

### **2.3.1 Tratamento**

Algumas classes de fármacos são empregadas no tratamento da malária, dependendo do caso clínico e da cepa de *Plasmodium* envolvida. Dentro da classe das 4-Aminoquinonas estão a cloroquina, hidroxicloroquina e amodiaquina (análogo da cloroquina) sendo a cloroquina extensivamente o antimalárico mais usado em todo o mundo, efetiva para *P. ovale*, *P. malariae*, na maioria dos casos de infecção por *P. vivax*, como também em casos de malária não-complicada por *P. falciparum* (WINSTANLEY; WARD, 2006). Esta classe de compostos, possui como mecanismo

de ação a inibição da formação de hemozoína dentro do vacúolo digestivo do parasita. Em um curso normal de infecção, o parasita metaboliza a hemoglobina transformando-a no metabólito intermediário hematina, o qual é tóxico, em um complexo inerte chamado hemozoína. A cloroquina aumenta o pH do vacúolo digestivo, prejudicando o metabolismo da hemoglobina, e formando um complexo tóxico hematina/cloroquina (BRAY et al., 1998).

Entre os efeitos colaterais associados ao uso da cloroquina estão dor de cabeça, tontura, náusea e problemas gastrointestinais. Em casos de overdose pode causar hipotensão, convulsões e problemas respiratórios; já a amodiaquina pode causar hepatite e agranulocitose (BRAGA et al., 2015).

Os antifolatos são utilizados em combinações fixas, geralmente sulfadoxina-pirimetamina, utilizada em áreas de resistência à cloroquina por *P. falciparum*. Cloroproguanil vem sendo utilizado com dapsona; outros “sulfa” medicamentos como sulfadoxina, sulfalena e dapsona apresentam efeito sinérgico com pirimetamina ou cloroproguanil (WINSTANLEY; WARD, 2006). Este grupo de fármacos interfere na síntese de DNA, inibindo a tetrahidrofolato-redutase do parasita, esgotando o tetrahidrofolato, um cofator da síntese de DNA. Casos de alergias e febre são relatados associados ao uso dos antifolatos e combinações (GREGSON; PLOWE, 2005).

O grupo das artemisininas inclui o artemeter, artesunato e a própria artemisina utilizados no tratamento da malária complicada, ou em combinação com outros fármacos para malária não-complicada causada por *P. falciparum* (O'NEILL; BARTON; WARD, 2010). As artemisininas parecem ser metabolizadas em dihidroartemisina, um sesquiterpeno de lactona endoperóxido, que media a morte do parasita através da produção de radicais livres após sua clivagem; por serem dependentes de  $Fe^{2+}$  para sua ativação, acredita-se que atuem no vacúolo digestivo, e por esta razão são ativas contra formas sanguíneas e não contra gametócitos (FENG et al., 2019). No geral, esta classe de fármacos é bem tolerada, porém há efeitos tóxicos à embriões, não sendo recomendado para grávidas.

Mefloquina é um fármaco de ação semelhante a cloroquina, utilizado no tratamento de malária não-complicada multirresistente causada por *P. falciparum*, mas pode atuar em formas assexuadas para todas as espécies de *Plasmodium* que acometem humanos. Não recomendado para grávidas, este fármaco pode causar

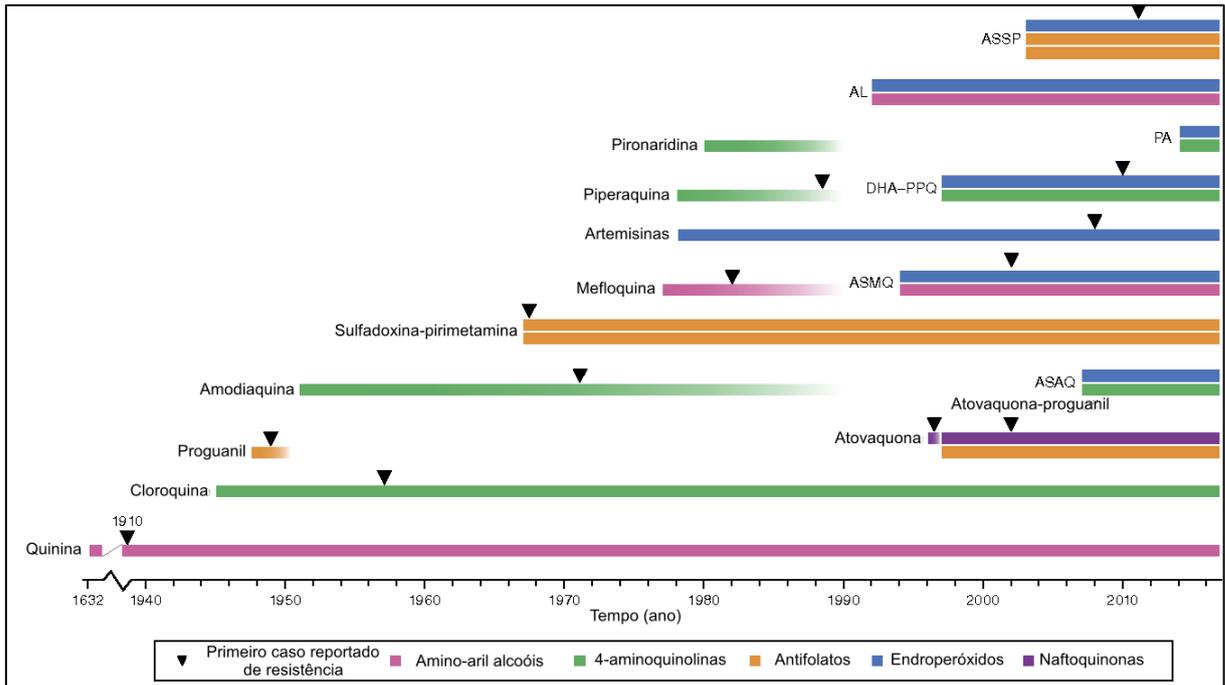
natimorte, podendo ainda causar dores de cabeça, ou efeitos gastrointestinais moderados como efeitos colaterais gerais (MARTINS et al., 2021).

A atovaquona-proguanil atua de forma sinérgica, inibindo a respiração mitocondrial, sendo utilizada no tratamento de malária multirresistente causada por *P. falciparum*; entretanto, por ser de alto custo, com recomendação indicada como quimioprofilaxia para viajantes. Halofantrina inibe a polimerização de moléculas heme do parasita resultado na intoxicação do mesmo, por metabólitos provenientes da degradação da hemoglobina; é utilizada para tratar malária não-complicada por *P. falciparum* e tem como principal efeito colateral arritmia ventricular (WINSTANLEY; WARD, 2006; DE VILLIERS; MARQUES; EGAN, 2008).

A primaquina é conhecida por ser ativa contra formas hipnozoítas de *P. vivax* e *P. ovale*, sendo ainda o único fármaco disponível contra este estágio do parasita; porém a primaquina causa hemólise em pacientes deficientes em glicose-6-fosfato desidrogenase, devendo então ser solicitado avaliação antes de seu uso (BRAGA et al., 2015; CAMARDA et al., 2019).

Com o passar dos anos os parasitas foram adquirindo resistência aos fármacos disponíveis (Figura 8), especialmente à cloroquina; portanto, por volta dos anos 2000 a OMS adotou como estratégia global o uso da terapia baseada em combinações com artemisina no sentido de reverter a resistência adquirida por *Plasmodium* (EKLAND; FIDOCK, 2008). Porém, mesmo após a combinação de fármacos como estratégia para reverter a resistência, ainda são registrados no Sudeste da Ásia e África casos de resistência à até mesmo a artemisina como também à suas associações (BLASCO; LEROY; FIDOCK, 2017).

**Figura 8. História da introdução dos principais antimaláricos e do primeiro surgimento de resistência em campo.**



As barras simples são monoterapias, duplas e triplas, terapia combinada. As cores referem-se às classes químicas a que pertencem os antimaláricos. A quinina, importada pela primeira vez para a Europa na década de 1630, encontrou resistência parcial no início do século XX e, mais tarde, foi substituída pela cloroquina (CQ), um antigo padrão-ouro usado massivamente até a resistência aparecer uma década depois. A resistência ao proguanil foi detectada dentro de um ano de uso clínico, quando foi substituído pelo sulfadoxina-pirimetamina (SP) que encontrou resistência rapidamente e hoje é usado principalmente para tratamento preventivo intermitente durante a gravidez e para quimioprevenção da malária sazonal em combinação com AQ (SPAQ, não mostrado) e como tratamento de primeira linha em combinação com artesunato (ASSP) em algumas áreas sensíveis a SP155. Artemisininas (ARTs) foram usadas pela primeira vez em monoterapia (artesunato injetável ainda é usado para malária grave), embora sua curta meia-vida no plasma e problemas de resistência tenham levado ao desenvolvimento de terapias combinadas à base de artemisinina (ACTs) para malária não-complicada. Vários medicamentos parceiros do ACT (como amodiaquina e mefloquina) foram usados como monoterapias e permaneceram em uso como agentes únicos muito tempo depois que a resistência foi encontrada pela primeira vez. A piperaquina e a pironaridina foram introduzidas na China como substitutos da CQ há cerca de 40 anos. A resistência à monoterapia com piperaquina foi relatada no final da década de 1980. A resistência à ART foi relatada pela primeira vez em 2008, mas já estava presente vários anos antes no oeste do Camboja. A falha do tratamento devido à resistência a um ou ambos os componentes de um ACT, foi documentada primeiro para ASMQ e, mais recentemente, para DHA-PPQ. A OMS relatou recentemente falhas no tratamento da AL no Laos. Atovaquona-proguanil (Malarone) é atualmente prescrito como agente profilático à viajantes para áreas endêmicas de malária. AL, artemeter + lumefantrina; ASMQ, artesunato + mefloquina; ASAQ, artesunato + amodiaquina; DHA-PPQ, di-hidroartemisinina + piperaquina; PA, artesunato + pironaridina; ASSP, artesunato + SP. Fonte: Adaptado de BLASCO; LEROY; FIDOCK, 2017.

Embora existam opções terapêuticas para o tratamento da malária, ainda há muitos problemas associados ao tratamento, sejam pelos casos de resistência à cloroquina que ainda é o principal fármaco utilizado, ou ao tratamento com artemisina e associações; como também, pelos inúmeros efeitos colaterais associados aos fármacos disponíveis (BLASCO; LEROY; FIDOK, 2017).

No final de 2021, a OMS iniciou a aplicação da primeira vacina contra a malária desenvolvida no mundo, a RTS,S (Mosquirix<sup>®</sup>) uma vacina pré-eritrocítica, baseada em componentes antigênicos da proteína de superfície de esporozoítos de *P. falciparum*, a circunsporozoíta (CSP), que levou 34 anos desde o início dos estudos até sua finalização com os ensaios clínicos de fase III (LAURENS, 2019). O antígeno recombinante desta vacina inclui: a região central repetitiva (R) da CSP, a região terminal carboxilada da CSP, que contém epítotos T, fundido com o antígeno de superfície (S) do vírus da hepatite B (HBsAg). Para melhorar a reatividade celular, a proteína é formulada em AS01 – uma emulsão em água e óleo (sistema adjuvante lipossomal) (LEVI; BALLALAI; ANDRADE, 2015).

A vacina RTS,S é recomendada para crianças, aplicada em quatro doses, sendo as primeiras três na idade de cinco, seis e sete meses de vida, e a última dose por volta dos 18 meses, com eficácia em torno de 40% na redução do número de mortes e 30% nos casos graves; contudo, ainda é necessário os esforços para vacinas contra outras espécies, bem como vacinas mais eficazes (LAURENS, 2019; TAKASHIMA et al., 2021).

#### **2.4 Cisteíno proteases como alvo terapêutico para leishmanioses e malária**

Proteases ou peptidases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas e são importantes em várias atividades biológicas incluindo digestão de peptídeos, ativação de outras enzimas, modulação do sistema imunológico, participação no ciclo celular, diferenciação e autofagia (SIQUEIRA-NETO et al., 2018). Estas enzimas podem ser divididas em seis classes que variam de acordo com o mecanismo de ação e os aminoácidos presentes no sítio ativo: Aspartico-, Cisteíno-, Serino-, Metallo-, Treonino-, Glutâmico- e Asparagino- proteases, podendo ainda dentro da mesma classe, serem divididas em famílias por características como similaridade de sequências, especificidade bioquímica de substratos e inserção de *loops* peptídicos (SAJID; MCKERROW, 2002).

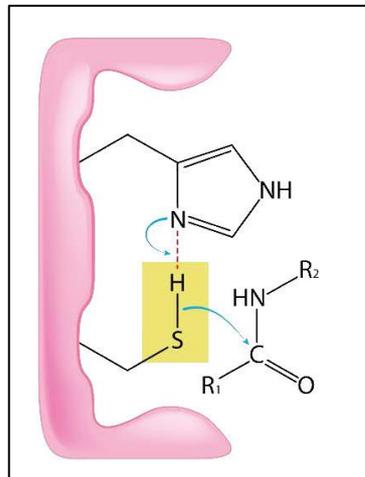
Estas enzimas são importantes em diversos organismos, especialmente em protozoários, desempenhando papel fundamental na virulência, patogênese, modulação do sistema imune, proliferação celular, dentre outras funções que as tornam atrativas como alvo terapêutico (MCKERROW et al., 2009; RAWAT et al., 2021). As CPs também estão presentes nos humanos, aonde estudos de bioinformática revelaram a presença de 11 catepsinas, incluindo B, C, F, F, H, K, L,

O, S, V, X, e W envolvidas em distintos processos, incluindo doenças como o câncer (VERMA; DIXIT; PANDEY, 2016).

A primeira cisteína protease descrita e caracterizada foi a papaína de *Carica papaya*, em 1983. Entre as cisteína proteases de protozoários (CPs), estão as CPs do clã CA entre as mais descritas e caracterizadas, conhecidas também como papaína-like, por sua semelhança com a papaína (VARUGHESE et al., 1989). Os sítios ativos das CPs abrigam resíduos catalíticos, possuindo essencialmente um resíduo de cisteína e um de histidina, seja como díade ou tríade catalítica por acomodação de resíduos como treonina, asparagina, ácido glutâmico e ácido aspártico (RAWAT et al., 2021).

Estas enzimas catalisam a quebra de proteínas clivando ligações peptídicas usando um grupo tiol nucleofílico de uma cisteína. A ligação do substrato adequado resulta na ativação do tiol (remoção do próton pelo grupo histidina), atuando agora como nucleófilo, atacando e rompendo a ligação peptídica, então um peptídeo é liberado e outro liga-se covalentemente ao enxofre. A hidrólise pela água liberando um segundo peptídeo completa o ciclo de clivagem destas enzimas (Figura 9) (SAJID; MCKERROW, 2002).

**Figura 9. Mecanismo de ação das cisteína proteases.**



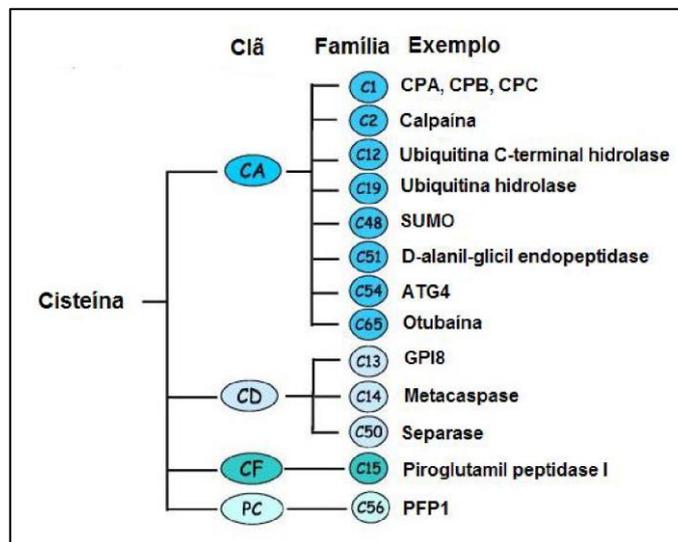
Esquema do mecanismo de ação das cisteína proteases apontando a formação do nucleófilo sulfidril do sítio ativo é representado na área amarela e a ligação peptídica que é atacada antes da hidrólise está indicada pela seta azul apontando para o carbono.

Fonte: <https://bio.libretexts.org/>.

Os parasitas do gênero *Leishmania* apresentam três famílias de CPs (Figura 10), denominadas CPA, CPB e CPC, que por sua vez, são expressas em diferentes estágios do ciclo de vida. É descrito para *L. mexicana* que as CPs são apontadas como fatores de virulência, devido a possível participação de CPs no processo de

diferenciação de promastigotas metacíclicas a amastigotas, bem como em seu papel no balanço da resposta Th1/Th2 (ALEXANDER; COOMBS; MOTTRAM, 1998; CAMERON et al., 2004). A CPB é descrita como um importante fator de virulência estando envolvida na evasão das defesas microbidas dos macrófagos, contribuindo para a sobrevivência do parasita no interior da célula (MOTTRAM et al., 1996).

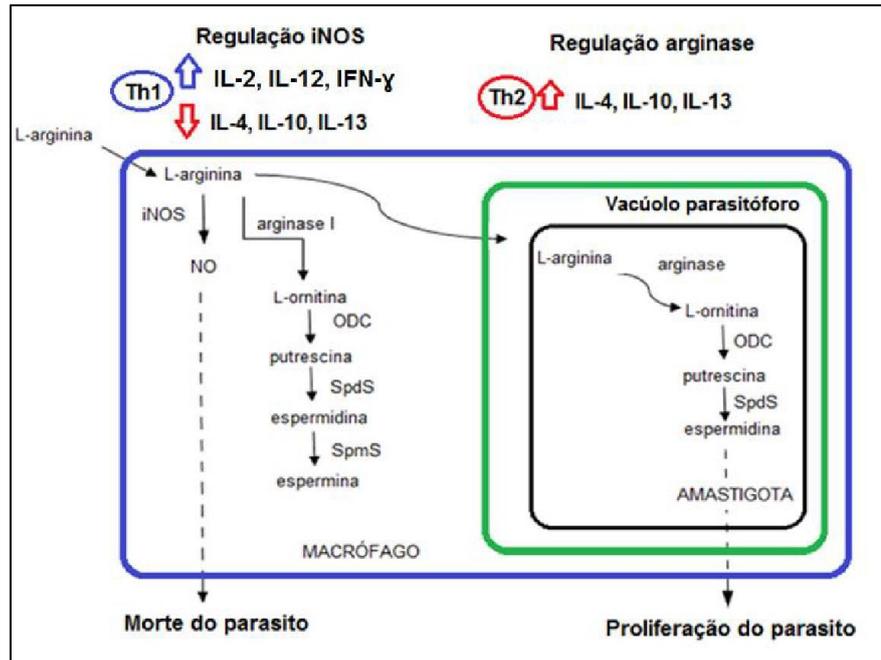
**Figura 10. Clãs e famílias de proteases de *L. (L.) major*. A nomenclatura é baseada no banco de dados MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>).**



Fonte: DE ALMEIDA, 2017.

A CPB é codificada por genes que ocorrem em cópias múltiplas arranjadas em tandem e pode modular a resposta imune do hospedeiro para a formação de células T *helper* 2 (Th2) em detrimento daquelas T *helper* 1 (Th1), tornando o hospedeiro susceptível para o estabelecimento da infecção por *Leishmania* (Figura 11) (MOTTRAM; COOMBS; ALEXANDER, 2004). Em *L. mexicana* foi observado que tal fenômeno acontece pela regulação negativa da produção de INF- $\gamma$ , via degradação do fator de transcrição NF- $\kappa\beta$ , com subsequente inibição da produção de IL-12 (MOTTRAM; COOMBS, 1998; SIQUEIRA-NETO, et al., 2018).

**Figura 11. Representação esquemática da via de ativação de macrófagos e resultado da infecção.**



O metabolismo da arginina no hospedeiro e no parasito possui papel chave na ativação de macrófagos e sobrevivência do parasito durante o processo infeccioso. Como resultado de uma ativação clássica, macrófagos respondem às citocinas Th1, que contribuem para eliminação do parasito, contudo, uma ativação alternativa, estimulada por citocinas Th2, proporcionam a sobrevivência do parasito.

ARG: arginase; ODC: ornitina descarboxilase; SpdS: espermidina sintase; SpmS: espermina sintase; iNOS: óxido nítrico sintase induzível; NO: óxido nítrico.

Fonte: DE ALMEIDA, 2017.

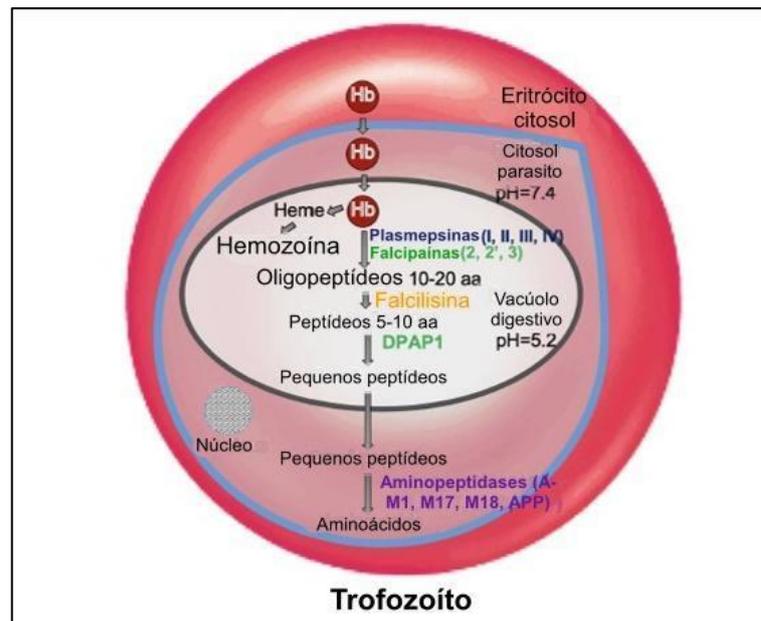
Mottram e colaboradores (1996) demonstraram que cepas mutantes nulas para CPB2.8 perdem capacidade infectiva, recuperando infectividade semelhante à cepa selvagem quando "curadas" com a transfecção de plasmídeos que albergam o gene que codifica a CPB, mostrando o papel crucial desta enzima na infecção por *Leishmania*.

Assim como em *Leishmania*, os parasitas causadores da malária, *Plasmodium* spp. também possuem uma série de cisteíno proteases que tem papel central durante o ciclo celular no parasita, seja na invasão ou degradação de eritrócitos, degradação de tecidos ou invasão celular (MUSYOKA; NJUGUNA; BISHOP, 2019). Em *Plasmodium*, as cisteíno proteases melhor caracterizadas são as da família da papaína (clã CA, família C1), caracterizadas pela presença da tríade catalítica Cis-His-Asn conservada (MISHRA; SINGH; SINGH, 2019). O sequenciamento do genoma de *P. falciparum* revelou a presença de quatro falcipaínas (FPs-1, 2, 2' e 3), três dipeptidil peptidases (DPAP-1, -2, -3), nove proteínas SERA e um homólogo da calpaína (ROSENTHAL, 2011).

Durante o estágio eritrocítico, especialmente na fase de trofozoíta, é especialmente observado acentuada atividade das falcipaínas FP-2 e FP-3 presentes

em abundância em *P. falciparum*. Estas enzimas são encontradas no vacúolo digestivo (VD) possuindo como principal função a rápida clivagem da hemoglobina em múltiplos sítios, levando à sua degradação, em conjunto com outras classes de enzimas catalíticas (Figura 12). FP-2 também está envolvida na degradação de proteínas esqueléticas da membrana eritrocitária, incluindo a anquirina e a proteína da banda 4.1 (ROSENTHAL, 2011; MISHRA; SINGH; SINGH, 2019).

**Figura 12. Papel das proteases na degradação da hemoglobina.**



Trofozoítos “ingerem” o citoplasma dos eritrócitos e o transportam para o grande e central vacúolo digestivo, análogo aos lisossomos. Nesta via, várias enzimas proteolíticas conhecidas são envolvidas: aspártico proteases (Plasmepsinas I, II, III e IV), três cisteíno proteases da família da papaína (Falcipainas-2, 2' e 3), metaloprotease (Falcilisina) e a dipeptidil aminopeptidase 1 (DPAP1). O produto final são aminoácidos que irão suprir a demanda nutricional da metamorfose desde o estágio de anel, até os esquizontes multinucleados do estágio assexuado.

Fonte: Adaptado de MISHRA; SINGH; SINGH, 2019.

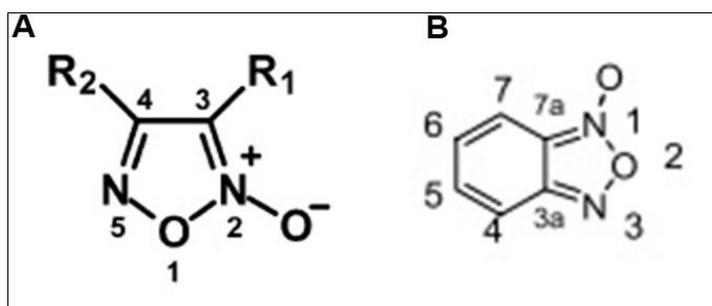
Pode-se ainda dizer que as falcipainas são um alvo atrativo para o desenvolvimento de fármacos, uma vez que desenvolvem papel crucial no estágio de maturação e multiplicação nos eritrócitos. Sijwali e colaboradores (2003) mostraram que a FP-2 é essencial no processo de degradação de hemoglobina, uma vez que uma cepa *knockout* do gene da FP-2 teve diminuição do processo de clivagem de hemoglobina quando comparada à cepa selvagem em estágio trofozoíta, além de ser três vezes mais sensível a inibidores de cisteíno protease. Já para FP-1, o mesmo não ocorreu, a cepa *knockout* apresentou o mesmo perfil fenotípico da cepa selvagem (SIJWALI; ROSENTHAL, 2004).

Vários inibidores de cisteíno proteases são descritos na literatura para as falcipainas, como peptídeos, peptídeo-miméticos e não peptídicos, uma vez que há a estrutura resolvida da FP-2 e FP-3 o que facilita a etapa de desenho racional de inibidores (RAWAT et al., 2021). Alguns destes compostos chegam a etapa de ensaios *in vivo*, mas não progridem (ROSENTHAL, 2004). Portanto, a busca por inibidores específicos e seletivos para falcipainas, que possam evoluir nas etapas de desenvolvimento de fármacos ainda é um desafio. No que diz respeito a fármacos que possuem como alvo cisteíno proteases de protozoários, há na literatura apenas um registro referente ao fármaco K11777 que avançou em estágio pré-clínico contra a doença de Chagas, porém foi interrompido devido a problemas de segurança (MCKERROW, 2018).

## 2.5 Compostos furoxanos e derivados

Os furoxanos (1,2,5-oxadiazol-2*N*-óxido) e benzofuroxanos (benzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-1*N*-óxido) (Figura 13), são moléculas bastante conhecidas na literatura, possuindo várias bioatividades descritas. Estas moléculas foram sintetizadas pela primeira vez há mais de 100 anos, com promissora atividade antiparasitária descrita, dentre elas anti-*Leishmania*, anti-*Plasmodium*, anti-*Trypanosoma*, anti-*Schistosoma* (GASCO et al., 2004; CASTRO et al., 2009; MOTT et al., 2012; DUTRA et al., 2014; GIL et al., 2014). Esta classe de moléculas apresentam em sua estrutura um grupamento *N*-óxido que age como grupo biorreduzível no parasito, gerando espécies reativas de nitrogênio, dentre elas o óxido nítrico (NO), além de causar S-nitrosilação de proteínas, o que é associado como principal mecanismo de ação do efeito antiparasitário do NO (GASCO et al., 2004; BOIANI et al., 2008).

**Figura 13. Estrutura geral dos furoxanos e benzofuroxanos.**



Estrutura geral dos furoxanos (A) e benzofuroxanos (B). A posição do grupamento N-óxido é indicada como 1-, N- ou N1-óxido para os furoxanos, enquanto que para os benzofuroxanos é indicado como 2-, N- ou N2-óxido. Fonte: GASCO et al., 2004; CERECETTO; GONZALES, 2007.

O NO ao ser metabolizado em células de mamíferos e microrganismos, pode causar formação excessiva de oxidantes e novos produtos que levam ao comprometimento da estrutura e função celular, levando a degeneração e morte da célula (RADI, 2018). Uma das organelas celulares mais atingidas por este processo é a mitocôndria, onde dados na literatura sustentam que o aumento de NO causa disfunção mitocondrial através de uma série de eventos como alteração dos gradientes eletroquímicos, redox mitocondrial e homeostase da bioenergia (RADI et al., 2002).

Um dos subprodutos gerados pela metabolização do NO nas células é o peroxinitrito que pode levar a alterações na bioenergética mitocondrial e na homeostase do cálcio, como também promover a abertura de poros de transição de permeabilidade mitocondrial (RADI et al., 2002). Em células de mamíferos, danos causados por NO e mudanças na homeostase do cálcio juntos iniciam morte celular programada ou necrose em uma variedade de tipos celulares (RIDGLEY; XIONG; RUBEN, 1999). Parasitas do gênero *Leishmania* possuem alguns reservatórios de cálcio como acidocalcisomas, retículo endoplasmático e apenas uma mitocôndria (DOCAMPO; HUANG, 2015); portanto, alterações que estejam sendo causadas pelo efeito deletério dos subprodutos gerados pelo NO são importantes para o entendimento desta via.

Em parasitas do gênero *Plasmodium* sabe-se que o cálcio está envolvido na bioenergética do parasita, sendo um segundo mensageiro crucial ligado ao egresso e invasão de células hospedeiras, secreção de proteínas, motilidade e regulação do ciclo celular (BROCHET; BILLKER, 2016). Estes parasitas possuem como principais reservatórios de cálcio o vacúolo digestivo, retículo endoplasmático, mitocôndria e acidocalcisomo que podem ser prejudicados pelo desbalanço de cálcio intracelular (DE OLIVEIRA et al., 2021).

Alguns trabalhos caracterizaram componentes importantes responsáveis pela sinalização de cálcio em *P. falciparum*, sendo os mais descritos: bombas SERCA (*Sarco Endoplasmic Reticulum*  $Ca^{2+}$ -ATPase) responsáveis pelo bombeamento deste íon para dentro do retículo endoplasmático; pirofosfatases (VP1) e V-ATPases presentes no vacúolo digestivo que regulam o pH ácido desta organela pela

manutenção de cálcio; e as proteínas quinases dependentes de cálcio (CPDKs) descritas por estarem envolvidas na regulação da motilidade dos gametas no inseto vetor, e egresso do ciclo biológico na fase eritrocitária (VIDADALA et al., 2014; DOCAMPO; HUANG, 2015; DE OLIVEIRA et al., 2021). Na fase intraeritrocítica, na qual há bastante investimento no desenvolvimento de drogas anti-maláricas, o parasita é desafiado ao usar o cálcio para sinalização, uma vez que a concentração desse íon na corrente sanguínea é na ordem de milimolar, enquanto que intracelular pode variar de 100 nM a 480 nM (GARCIA et al., 1996; ROHRBACH et al., 2005).

Autores relatam que a homeostase do cálcio intracelular é importante para *Plasmodium* uma vez que está conectado a sinais intracelulares críticos ligados ao ciclo celular do parasita, estando envolvido em uma rede de vias reguladoras, o que torna este fenômeno um importante alvo para o desenvolvimento de drogas anti-maláricas (GAZARINI et al., 2007; LOURIDO; MORENO, 2015; DE OLIVEIRA et al., 2021). Vidadala e colaboradores (2014) descreveram uma série de compostos baseados em pirazolopirimidina e imidazopirazina como potentes inibidores de quinase dependente de cálcio-4 em *P. falciparum* (PfCDPK4), sem toxicidade para células de mamífero (VIDADALA et al., 2014). Enomoto e colaboradores (2012) mostraram que o composto 2-aminoetil difenilborinato bloqueia a oscilação espontânea de cálcio, via receptor IP3/cálcio dependente, causando o bloqueio da progressão do ciclo celular de *P. falciparum* no estágio eritrocítico (ENOMOTO et al., 2012).

Portanto, tendo em vista o potencial anti-parasitário dos derivados furoxanos, nosso grupo de pesquisa estudou uma série de compostos desta classe, identificando o composto **Lapdesf14e**, que apresentou potencial terapêutico por administração intraperitoneal para tratamento da LV, com mecanismo de ação associado a inibição da CPB2.8 de *Leishmania* e produção de NO (DE ALMEIDA, 2017; DE ALMEIDA et al., 2017). Entretanto, sabe-se que esta via de administração não é a ideal, logo melhorar este protótipo, desenvolvendo moléculas com atividade semelhante ou superior e que possam ser utilizadas por administração via oral, foi um dos objetivos deste trabalho, estando de acordo com a iniciativa do *Drugs for Neglected Diseases* (DNDi) para o desenvolvimento de novos fármacos para doenças negligenciadas (KATSUNO et al., 2015). Portanto, modificações estruturais foram realizadas utilizando **Lapdesf14e** como protótipo.

Foram desenvolvidos 24 derivados furoxanos, sendo 14 amida- e fenil-furoxanos, dez benzofuroxanos e adicionalmente sete compostos contendo apenas *N*-acil-hidrazona para verificar a influência deste grupo químico na atividade anti-*Leishmania* e anti-*Plasmodium*. A *N*-acil-hidrazona é descrita por atuar na inibição de cisteíno proteases de *Leishmania* e *Plasmodium*, sendo explorada também no desenho de novos compostos bioativos para outras doenças parasitárias como Doença de Chagas (CARVALHO et al., 2012; KUMAR et al., 2017).

## 5 CONCLUSÃO

Este trabalho mostra o potencial promissor dos novos derivados furoxanos para as doenças parasitárias leishmanioses e malária. Durante o seu desenvolvimento, também contribuiu para a identificação de novos agentes anti-leishmaniais de origem natural ou sintética, produzindo nove artigos científicos publicados e uma patente. Para a leishmaniose visceral, todas as moléculas apresentaram baixa citotoxicidade ( $SI < 10$ ), sendo os derivados furoxanos os mais potentes contra formas amastigotas de *L. infantum*, sendo o  $EC_{50} < 10 \mu M$ , exceto para 4i, 4j, 4n e 4o, e para os benzofuroxanos, apenas 4r apresentou estes critérios. Os furoxanos foram capazes de liberar N-óxido, o que pode ter contribuído na atividade leishmanicida observada. Isto foi observado após a utilização da enzima recombinante LmCPB2.8 $\Delta$ CTE expressa em *P. pastoris* e verificar que derivados como os benzofuroxanos e hidrazonas inibem a CPB, entretanto possuem pouca ou nenhuma atividade para formas amastigotas de *L. infantum*.

A análise *in silico* do ADME das melhores moléculas indicou que 4f apresenta as melhores características para testes *in vivo* por administração oral, característica muito desejada para novos agentes leishmanicidas, principalmente considerando que todos os fármacos, exceto miltefosina, são administrados por longos períodos de tempo (~30 dias) e por via parenteral, o que requer hospitalização do paciente, comprometendo a adesão deste ao tratamento. A molécula 4f mostrou ser eficaz em um curso de tratamento muito curto (cinco dias, 2x ao dia), com a maior dose (7.7 mg/kg/dia correspondente a dose da miltefosina) e quando administrado por via oral, reduzindo em ~90% a carga parasitária no fígado e baço de camundongos infectados com *L. infantum* em um modelo agudo da infecção. A análise dos marcadores bioquímicos através do plasma sanguíneo indicou que o composto não apresenta toxicidade para o fígado ou rim, já que não causou alterações nos marcadores avaliados.

Adicionalmente, no âmbito do programa CAPES-PrInt, estendemos nossos estudos, investigando o potencial antimalárico destes compostos para futura aplicação no tratamento da malária. Três furoxanos apresentaram boa potência quando investigados em culturas sincronizadas de *P. falciparum*., sendo 4m ( $EC_{50} 2.8 \mu M$ ) o melhor composto. Diferentemente do que era esperado, estudos de mecanismo de ação sugerem que 4m não é inibidor de facipainas (cisteíno proteases) de *P. falciparum*, apesar destas proteases pertencerem à classe das papaínas, assim como cisteíno protease de *L. mexicana* ( $IC_{50} = 6 \mu M$ ), uma vez que ensaios indiretos de avaliação desta inibição baseado em estudos de microscopia,

não detectaram alterações morfológicas do vacúolo digestivo do parasita, bem como não foi possível observar acúmulo de hemoglobina não degradada após o tratamento com o composto, sugestivos de inibição das proteases.

Contudo, verificou-se que **4m** é capaz de causar a liberação de cálcio intracelular, possuindo como alvo o retículo endoplasmático, com efeito seletivo para o parasita, uma vez que hepatócitos tratados com o composto não apresentaram tal efeito. Essa liberação de cálcio deve estar ocorrendo após acidificação do citoplasma, em decorrência das propriedades físico-químicas da molécula relacionadas à presença de um grupo amida ligado ao *N*-óxido associada à liberação de NO, promovendo em conjunto efeitos deletérios para a viabilidade do parasita.

## 6 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**, v. 161, p. 6794-6801 1998.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, e35671, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0035671.

ANSORGE, I. et al. Protein sorting in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells permeabilized with the pore-forming protein streptolysin O. **Biochemical Journal**, v. 315, n. 1, p. 307–314, 1996.

ASHLEY, E. A.; PYAE PHYO, A.; WOODROW, C. J. Malaria. **The Lancet**, v. 391, p. 1608-1621, 2018. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/>.

BALASEGARAM, M. et al. Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 17, n. 4, p. 493-510, 2012.

BARRETT, M. P.; CROFT, S. L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **British Medical Bulletin**, v. 104, n. 1, p. 175-196, 2012.

BASU, S.; SAHI, P. K. Malaria: An Update. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 48, n. 7, p. 521-528, 2017.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, n. 37, p. 1097-1106, 2007. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.04.003.

BESSION-BARD, A.; PUGIN, A.; WENDEHENNE, D. New Insights into Nitric Oxide Signaling in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 21-39, 2008.

BHOR, R.; RAFATI, S.; PAI, K. Cytokine saga in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v. 147, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155322>.

BLASCO, B.; LEROY, D.; FIDOCK, D. A. Antimalarial drug resistance : linking *Plasmodium falciparum* parasite biology to the clinic. **Nature Medicine**, v. 23, n. 8, p. 917–928, 2017.

BOIANI, L. et al. Furoxan-, alkylnitrate-derivatives and related compounds as anti-trypanosomatid agents: Mechanism of action studies. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 17, p. 7900–7907, 2008.

BORGES-PEREIRA, L.; CAMPOS, B. R. K. L.; GARCIA, C. R. S. The GCaMP3 - A GFP-based calcium sensor for imaging calcium dynamics in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **MethodsX**, v. 1, p. 151–154, 2014.

BRAGA, C. B. E. et al. Side effects of chloroquine and primaquine and symptom reduction in malaria endemic area (Mâncio lima, Acre, Brazil). **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2015, 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/346853>

BRASIL. **Guia de tratamento da malária no Brasil - Ministério da Saúde**. Disponível em: < <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/malaria>>. Acesso em 10 Mai 2022.

BRAY, P. G. et al. Access to Hematin: The Basis of Chloroquine Resistance. **Molecular Pharmacology**, v. 54, p. 170-179, 1998.

BROCHET, M.; BILLKER, O. Calcium signalling in malaria parasites. **Molecular Microbiology**, v. 100, n. 3, p. 397–408, 2016.

BURALLI, R. J. et al. Moving towards the Sustainable Development Goals: The UNLEASH Innovation Lab experience. **Ambiente e Sociedade**, v. 21, 2018. doi: 10.1590/1809-4422asoc17Ex0001vu18L1TD.

BURGOS, L. M. et al. Neglected tropical diseases and other infectious diseases affecting the heart. The NET-heart project: Rationale and design. **Global Heart**, v. 15, n. 1, 2020.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.

CAMARDA, G. et al. Antimalarial activity of primaquine operates via a two-step biochemical relay. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019.

CAMERON, P. et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 5, p. 3297–3304, 2004.

CARVALHO, S. A. et al. Design and synthesis of new (E)-cinnamic N-acylhydrazones as potent antitrypanosomal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 512–521, 2012.

CASTRO, D. et al. Anti-trypanosomatid benzofuroxans and deoxygenated analogues: synthesis using polymer-supported triphenylphosphine, biological evaluation and mechanism of action studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 12, p. 5055–5065, 2009.

CERECETTO, H; GONZÁLEZ, M. Benzofuroxan and Furoxan. Chemistry and Biology. **Topics in Heterocyclic Chemistry**, v. 10, p. 265–308. 2007.

CERECETTO, H.; PORCAL, W. Pharmacological Properties of Furoxans and Benzofuroxans: Recent Developments. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 57-71, 2005.

CHEN, Y. et al. Structural insight into enhanced calcium indicator GCaMP3 and GCaMPJ to promote further improvement. **Protein and Cell**, v. 4, n. 4, p. 299–309, 2013.

CLEMENTINO, L. da C. et al. *In vitro* activities of glycoalkaloids from the Solanum lycocarpum against Leishmania infantum. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 28, p. 673-677. 2018.

CLEMENTINO, L. da C. et al. The antileishmanial activity of the antarctic brown alga *Ascoseira mirabilis* Skottsberg. **Natural Product Research**, v. 65, n. 23, p. 5470-5474, 2020. doi: 10.1080/14786419.2020.1782403.

COSTA, D. N. C. C. et al. Culling Dogs in Scenarios of Imperfect Control: Realistic Impact on the Prevalence of Canine Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, 2013. doi: 10.1371/journal.pntd.0002355.

COSTA, N. C. S. et al. Antimicrobial activity of RP-1 peptide conjugate with ferrocene group. **PLoS ONE**, v. 15, 2020. doi: 10.1371/journal.pone.0228740.

CROFT, S. L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy-challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 10, p. 1478-1483, 2011.

DA COSTA CLEMENTINO, L. et al. Design, synthesis and biological evaluation of N-oxide derivatives with potent in vivo antileishmanial activity. **PLoS ONE**, v. 16, 2021. doi: 10.1371/journal.pone.0259008.

DAVIES, C. R. et al. Leishmaniasis: new approaches to disease control. **BMJ Clinical research**, v. 326, n. 7385, p. 377–382, 2003.

DE ALMEIDA, L. **Leishmanioses e derivados de furoxano e benzofuroxano : atividade biológica in vitro e in vivo e potenciais mecanismos de ação**. Tese. 2017. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Instituto de Química de Araraquara. Araraquara, São Paulo, 2017., 2017.

DE OLIVEIRA, L. S. et al. Calcium in the Backstage of Malaria Parasite Biology. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 1–15, 2021.

DE RYCKER, M. et al. Challenges and recent progress in drug discovery for tropical diseases. **Nature**, v. 559, n. 7715, p. 498–506, 2018.

DE VILLIERS, K. A.; MARQUES, H. M.; EGAN, T. J. The crystal structure of halofantrine-ferriporphyrin IX and the mechanism of action of arylmethanol antimalarials. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, n. 8, p. 1660–1667, ago. 2008.

DELHAES, L. et al. The microculture tetrazolium assay (MTA): Another colorimetric method of testing *Plasmodium falciparum* chemosensitivity. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 93, n. 1, p. 31–40, 1999.

DÍAZ, E.; PONTE-SUCRE, A. Leishmaniasis: The biology of a parasite. *In*: PONTE-SUCRE, A; PADRON-NIEVES M. **Drug Resistance in Leishmania Parasites: Consequences, Molecular Mechanisms and Possible Treatment**. Springer, p. 1–16, 2018.

DO ESPÍRITO SANTO, R. D. et al. N, N' N"-trisubstituted guanidines: Synthesis, characterization and evaluation of their leishmanicidal activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 171, p. 116-128, 2019.

DOCAMPO, R.; HUANG, G. Calcium signaling in trypanosomatid parasites. **Cell Calcium**, v. 57, n.3, p. 194-202, 2015.

DOS SANTOS, G. S. et al. GC-MS Analysis, Bioactivity-based Molecular Networking and Antiparasitic Potential of the Antarctic Alga *Desmarestia antarctica*. **Planta Medica International Open**, v. 07, n. 03, p.122–132, 2020.

DUTRA, L. A. et al. Leishmanicidal activities of novel synthetic furoxan and benzofuroxan derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4837–4847, 2014.

EKLAND, E. H.; FIDOCK, D. A. In vitro evaluations of antimalarial drugs and their relevance to clinical outcomes. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 7, p. 743–747, 2008.

ENGELS, D.; ZHOU, X. N. Neglected tropical diseases: An effective global response to local poverty-related disease priorities. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 9, 2020. doi: 10.1186/s40249-020-0630-9.

ENOMOTO, M. et al. Blockage of spontaneous  $Ca^{2+}$  oscillation causes cell death in intraerythrocytic *Plasmodium falciparum*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012.

FARAHMAND, M. et al. An overview of a diagnostic and epidemiologic reappraisal of cutaneous leishmaniasis in Iran. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n.1, p. 17-21, 2011.

FEASEY, N. et al. Neglected tropical diseases. **British Medical Bulletin**, v. 93, n. 1, p. 179-200, 2010.

FENG, L. U. et al. A brief history of artemisinin: Modes of action and mechanisms of resistance. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 17, n. 5, p. 331-336, 2019.

FERRERO, R. et al. Comparative effects of several nitric oxide donors on intracellular cyclic GMP levels in bovine chromaffin cells: Correlation with nitric oxide production. **British Journal of Pharmacology**, v. 127, n. 3, p. 779–787, 1999.

GALLI, U. et al. Synthesis and antimalarial activities of some furoxan sulfones and related furazans. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 12, p. 1335–1340, 2005.

GARCIA, C. R. S. et al. Calcium homeostasis in intraerythrocytic malaria parasites. **European Journal of Cell Biology**, v. 71, n. 4, 1996.

GARCIA, C. R. S. et al. Acidic calcium pools in intraerythrocytic malaria parasites. **European Journal of Cell Biology**, v. 76, n. 2, p. 133–138, 1998.

GASCO, A. et al. NO donors: Focus on furoxan derivatives. **Pure and Applied Chemistry**, v. 76, n. 5, p. 973–981, 2004.

GAZARINI, M. L. et al. Calcium signaling in a low calcium environment: How the intracellular malaria parasite solves the problem. **Journal of Cell Biology**, v. 161, n. 1, p. 103–110, 2003.

GAZARINI, M. L. et al. Antimalarial drugs disrupt ion homeostasis in malarial parasites. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 3, p. 329–334, 2007.

GIL, A. et al. Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationships of new quinoxaline derivatives as anti-*Plasmodium falciparum* agents. **Molecules**, v. 19, n. 2, p. 2166–2180, 2014.

- GOTO, H., LINDOSO, J. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–433, 2010.
- GREGSON, A.; PLOWE, C. V. Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. **Pharmacological Reviews**, v. 57, n. 1, p. 117-145, 2005.
- HOTEZ, P. J. et al. What constitutes a neglected tropical disease? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 1 2020. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008001>.
- KATSUNO, K. et al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 11, p. 751-758, 2015.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.
- KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 4, n. 1, p. 1-24, 1990.
- KOTEPUI, M. et al. Global prevalence and mortality of severe Plasmodium malariae infection: A systematic review and meta-analysis. **Malaria Journal**, v. 19, n. 1, 2020.
- KUMAR, P. et al. Design, synthesis, conformational and molecular docking study of some novel acyl hydrazone based molecular hybrids as antimalarial and antimicrobial agents. **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2017.
- LAURENS, M. B. RTS,S/AS01 vaccine (Mosquirix™): an overview. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 16, n. 3, p. 480-489, 2019.
- LEVI, G.; BALLALAI, I.; ANDRADE, J. Vacina contra a malária. **Imunizações**, v. 8, n. 4.
- LINDOSO, J. A. L. et al. Review of the current treatments for leishmaniasis. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 3, n. 12, p. 69–77, 2012.
- LINDOSO, J. A. L. et al. Leishmaniasis – HIV coinfection : current challenges. **HIV/AIDS - Research Palliative Care**. v. 8, p. 147–156, 2016.
- LOHARIKAR, A. et al. Status of new vaccine introduction — Worldwide, september 2016. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 41, p. 1136-1140, 2016.
- LOPERA, A. A. et al. Solution-combustion synthesis of doped TiO<sub>2</sub> compounds and its potential antileishmanial activity mediated by

photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 183, p. 64-74, 2018.

LOURIDO, S.; MORENO, S. The Calcium Signaling Toolkit of the Apicomplexan Parasites *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium* spp. **Cell Calcium**, v. 57, n. 3, p. 1–19, 2015.

MAIER, A. G. et al. *Plasmodium falciparum*. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 6, p. 481-482, 2019.

MAKLER, M. T.; PIPER, R. C.; MILHOUS, W. K. Lactate dehydrogenase and the diagnosis of malaria. **Parasitology Today**, v. 14, n. 9, p. 376–377, 1998.

MANN, S. et al. A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 8, p. 121–132, 2021.

MARTINS, A. C. et al. Review of the mechanism underlying mefloquine-induced neurotoxicity. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 51, n. 3, p. 209-216, 2021.

MATOS, A. P. S. et al. A review of current treatments strategies based on paromomycin for leishmaniasis. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 57, 2020. doi: 10.1016/j.jddst.2020.101664.

MCKERROW, J. H. et al. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 263-269, 2009.

MCKERROW, J. H. Update on drug development targeting parasite cysteine proteases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 8, 2018. doi: 10.1371/journal.pntd.0005850.

MIGUEL, D. C. et al. The impact of COVID-19 on neglected parasitic diseases: what to expect?. **Trends in Parasitology**, v. 37, n. 8, p. 694-697, 2021.

MISHRA, M.; SINGH, V.; SINGH, S. Structural insights into key plasmodium proteases as therapeutic drug targets. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAR, p. 1–13, 2019.

MITRA, A. K.; MAWSON, A. R. Neglected tropical diseases: Epidemiology and global burden. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 2, n. 36, p. 1-15, 2017.

MOLYNEUX, D. H.; SAVIOLI, L.; ENGELS, D. Neglected tropical diseases: Progress towards addressing the chronic pandemic. **The Lancet**, v. 6736, n. 16, 2016.

MONCOQ, K.; TRIEBER, C. A.; YOUNG, H. S. The molecular basis for cyclopiazonic

acid inhibition of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 13, p. 9748–9757, 2007.

MORAES, B. S. et al. Leishmanicidal candidate LASSBio-1736, a cysteine protease inhibitor with favorable pharmacokinetics: Low clearance and good distribution. **Xenobiotica**, v. 48, n. 12, p. 1258–1267, 2018.

MOTT, B. T. et al. A furoxan-amodiaquine hybrid as a potential therapeutic for three parasitic diseases. **Medicinal Chemistry Communications**, v. 3, n. 12, p. 1505–1511, 2012.

MOTTRAM, J. C. et al. Evidence from disruption of the *Imcpb* gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 12, p. 6008–6013, 1996.

MULLER, R.; BAKER, J. R.; ROLLINSON, D. Cell Biology of *Leishmania*. **Advances in parasitology**, v. 44, 2000.

MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R. Calcium regulation in protozoan parasites. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 359-364, 2003.

MUSYOKA, T. M.; NJUGUNA, J. N.; BISHOP, Ö. T. Comparing sequence and structure of falcipains and human homologs at prodomain and catalytic active site for malarial peptide based inhibitor design. **Malaria Journal**, v. 18, n. 159, p. 1–21, 2019.

NO, J. H. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. **Acta Tropica**, v. 155, p. 113–123, 2016.

NWAKA, S.; RIDLEY, R. G. Virtual drug discovery and development for neglected diseases through public-private partnerships. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 11, p. 919–928, 2003.

O'NEILL, P. M.; BARTON, V. E.; WARD, S. A. The molecular mechanism of action of artemisinin - The debate continues. **Molecules**, v. 15, n. 3, p. 1705–1721, 2010.

OLÍAS-MOLERO, A. I. et al. Antileishmanial drug discovery and development: Time to reset the model?. **Microorganisms**, v. 9, n. 12, 1 dez. 2021.

OLIVEIRA, L. F. et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, v. 118, n. 2, p. 97-96, 2011.

PELISSARI, D. M. et al. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1,

p. 107–110, 2011.

PIMENTA, P. F. P. et al. An overview of malaria transmission from the perspective of amazon anopheles vectors. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 23–47, 2015.

PRASAD, R. et al. Blocking Plasmodium falciparum development via dual inhibition of hemoglobin degradation and the ubiquitin proteasome system by MG132. **PLoS one**, v. 8, n. 9, p. 1–14, 2013.

RADI, R. et al. Serial Review: Nitric Oxide in Mitochondria. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 1, p. 107-110, 2002.

RADI, R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 23, p. 5839-5848, 2018.

RADI, R.; CASSINA, A.; HODARA, R. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. **Biological Chemistry**, v. 383, p. 401-409, 2002.

RANGEL, K. C. et al. Antileishmanial activity of the Antarctic red algae Iridaea cordata (Gigartinales; Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 31, p. 825-834, 2018.

RAWAT, A. et al. Cysteine proteases: Battling pathogenic parasitic protozoans with omnipresent enzymes. **Microbiological Research**, v. 249, 2021. doi: 10.1016/j.micres.2021.126784.

RIDGLEY, E. L.; XIONG, Z. H.; RUBEN, L. Reactive oxygen species activate a Ca<sup>2+</sup>-dependent cell death pathway in the unicellular organism Trypanosoma brucei. **Biochemical Journal**, v. 340, n. 1, p. 33–40, 1999.

ROHRBACH, P. et al. Quantitative calcium measurements in subcellular compartments of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 30, p. 27960–27969, 2005.

ROONEY, T. A.; SASS, E. J.; THOMAS, A. P. Characterization of cytosolic calcium oscillations induced by phenylephrine and vasopressin in single fura-2-loaded hepatocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 29, p. 17131–17141, 1989.

ROSENTHAL, P. J. Cysteine proteases of malaria parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 13–14, p. 1489–1499, 2004.

ROSENTHAL, P. J. Falcipains and Other Cysteine Proteases of Malaria Parasites.

**Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 712, p. 30–48, 2011.

SAHID, E. D. N. et al. Baccharis trimera (Less.) DC leaf derivatives and eupatorin activities against Leishmania amazonensis. **Natural Product Research**, v. 36, n. 6, p. 1599–1603, 2022.

SAJID, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 1-21, 2002.

SALIBA, K. J.; KIRKI, K. pH regulation in the intracellular malaria parasite, Plasmodium falciparum. H<sup>+</sup> extrusion via a V-type H<sup>+</sup>-ATPase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 47, p. 33213–33219, 1999.

SAMPSON, L. J.; PLANE, F.; GARLAND, C. J. Involvement of cyclic GMP and potassium channels in relaxation evoked by the nitric oxide donor, diethylamine NONOate, in the rat small isolated mesenteric artery. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 364, n. 3, p. 220–225, 2001.

SANGENIS, L. H. C. et al. Expansão da Leishmaniose Visceral no estado do Rio de Janeiro, Brasil: Relato do primeiro caso autóctone no município de Volta Redonda e a dificuldade de diagnóstico. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 56, n. 3, p. 271–274, 2014.

SANZ, L. M. et al. *P. falciparum* in vitro killing rates allow to discriminate between different antimalarial mode-of-action. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.  
doi:10.1371/journal.pone.0030949.

SATO, S. Plasmodium—a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. **Journal of Physiological Anthropology**, v. 40, n. 1, p. 1-13, 2021.

SEIFERT, K.; CROFT, S. L. In Vitro and In Vivo Interactions between Miltefosine and Other Antileishmanial Drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 73–79, 2006.

SIJWALI, P. S.; ROSENTHAL, P. J. Gene disruption confirms a critical role for the cysteine protease falcipain-2 in hemoglobin hydrolysis by Plasmodium falciparum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 13, p. 4384–4389, 2004.

SINGH, K.; GARG, G.; ALI, V. Current Therapeutics, Their Problems and Thiol Metabolism as Potential Drug Targets in Leishmaniasis. **Current Drug Metabolism**, v. 17, n. 9, p. 897–919, 2016.

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.

SINGH, O. P.; SUNDAR, S. Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis: Current status and future prospects. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1–9, 2014.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 10, n. 6, p. 307–315, 2004.

SIQUEIRA-NETO, J. L. et al. Cysteine proteases in protozoan parasites. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 8, 2018. doi: 10.1371/journal.pntd.0006512.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Liposomal amphotericin B and leishmaniasis: dose and response. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 7, p. 4267-4277, 2010.

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: From textbook descriptions to biological understanding. **Open Biology**, v. 7, n. 9, 2017. doi: 10.1098/rsob.170165.

TAKASHIMA, E. et al. Identification of Novel Malaria Transmission-Blocking Vaccine Candidates. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11 2021. doi: 10.3389/fcimb.2021.805482.

THOMAS, A. P.; RENARD, D. C.; ROONEY, T. A. Spatial and temporal organization of calcium signalling in hepatocytes. **Cell Calcium**, v. 12, n. 2–3, p. 111–126, 1991.

TORRES, K. L. et al. Standardization of a very specific and sensitive single PCR for detection of Plasmodium vivax in low parasitized individuals and its usefulness for screening blood donors. **Parasitology Research**, v. 98, n. 6, p. 519–524, 2006.

TUTEJA, R. Malaria - An overview. **FEBS Journal**, v. 274, n. 18, p. 4670-4679, 2007.

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.

VAN ASSCHE, T. et al. Leishmania-macrophage interactions: insights into the redox biology. **Free Radical Biology and medicine**, v. 51, n. 2, p. 337-351, 2011.

VAN SCHALKWYK, D. A. et al. Inhibition of *Plasmodium falciparum* pH regulation by small molecule indole derivatives results in rapid parasite death. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, n. 9, p. 1291–1299, 2010.

VARUGHESE, K. I. et al. Crystal Structure of a Papain-E-64 Complex. **Biochemistry**, v. 7, n. 28, 1989. doi: 10.1021/bi00429a058.

VERMA S., DIXIT, R., PANDEY K.C. Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7. 2016. doi.org/10.3389/fphar.2016.00107.

VICENTE, E. et al. Synthesis and antiplasmodial activity of 3-furyl and 3-thienylquinoxaline- 2-carbonitrile 1,4-Di-N-oxide derivatives. **Molecules**, v. 13, n. 1, p. 69–77, 2008.

VIDADALA, R. S. R. et al. Development of potent and selective Plasmodium falciparum calcium-dependent protein kinase 4 (PfCDPK4) inhibitors that block the transmission of malaria to mosquitoes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 74, p. 562–573, 2014.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global leishmaniasis surveillance: 2019–2020, a baseline for the 2030 roadmap**. Geneva, 2021. (WHO technical reports series, n. 35, p. 401-420).

WHO. WORLD AND HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report 2019**. Geneva, 2019 (WHO technical report series).

WHO. WORLD AND HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report 2021**. Geneva, 2021 (WHO technical report series).

WINSTANLEY, P.; WARD, S. Malaria Chemotherapy. **Advances in Parasitology**, v. 61, 2006. doi: 10.1016/S0065-308X(05)61002-0.

WORTMANN, G. et al. Liposomal amphotericin B for treatment of cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 5, p. 1028–1033, 2010.