

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Uso de derivado do eugenol LS15 (oleato de 4-alil-2-metoxifenila) para
tratamento de infecção *in vitro* por *Leishmania amazonensis* em macrófagos
RAW 264.7**

Helena de Abreu Tostes
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2026**

HELENA DE ABREU TOSTES

Uso de derivado do eugenol LS15 (oleato de 4-alil-2-metoxifenila) para tratamento de infecção *in vitro* por *Leishmania amazonensis* em macrófagos RAW 264.7

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Eduardo de A. M. da Silva

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2026**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

T716u
2026 Tostes, Helena de Abreu, 2001-
Uso de derivado do eugenol LS15 (oleato de
4-alil-2-metoxifenila) para tratamento de infecção *in vitro* por
Leishmania amazonensis em macrófagos RAW 264.7 / Helena
de Abreu Tostes. – Viçosa, MG, 2026.
1 dissertação eletrônica (54 f.): il.

Orientador: Eduardo de Almeida Marques da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2026.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2026.104>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Leishmaniose - Tratamento. 2. Eugenol. 3. Oleato de
4-alil-2-metoxifenila. I. Silva, Eduardo de Almeida Marques da,
1970-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 616.9364

HELENA DE ABREU TOSTES

Uso de derivado do eugenol LS15 (oleato de 4-aliil-2-metoxifenila) para tratamento de infecção *in vitro* por *Leishmania amazonensis* em macrófagos RAW 264.7

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de fevereiro de 2026.

Assentimento:

Helena de Abreu Tostes
Autora

Eduardo de Almeida Marques da Silva
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 11/05/2026 às 12:19:04 e pelo orientador em 11/05/2026 às 15:26:51. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **13KK.XWMG.L9TS** e clique no botão 'Validar documento'.

Dedico este trabalho ao meu pai, Marco Aurélio Botelho Tostes, que me ensinou o valor dos livros, da paciência e da lealdade e ao meu avô, Alceu José de Abreu (in memoriam), que me permitiu a alegria de seu amor e carinho até o dia de sua passagem.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao trabalho árduo de meus pais e familiares. Sem seu esforço, confiança e apoio, não sei de onde encontraria coragem para percorrer este caminho. Em uma família formada por docentes, é indescritível a sensação de seguir essa linhagem marcada pela esperança e pela admiração pelo magistério.

Agradeço a meu pai pelo verdadeiro significado de amizade, por sua superação, carinho e cuidado com meu coração, e por ainda me fazer sentir uma criança em seus braços. À minha mãe, agradeço pelo encorajamento, pela confiança e pela força diante dos desafios da vida.

Sou grata pela vida de minha irmã Stella e de meu cunhado Vinicius, que me presentearam com a alegria das vidas de Marina, Laura e Zeca (*in memoriam*), nosso eterno amigo de quatro patas.

Agradeço à minha avó Zelina, exemplo de serenidade, cuidado com a natureza e com a família, além de sua espiritualidade inabalável; à minha avó Maria Gislane (Leninha), pelo carinho, preocupação e apoio durante meus estudos; e ao meu avô Alceu (*in memoriam*), pelo afeto, pelo amor ao meu time do coração e pela alegria de nossos encontros.

Agradeço a Maíra, agradeço pelo apoio, companhia, cumplicidade e, sobretudo, a felicidade que tanto me concedeu.

Aos meus animais de estimação — meu cão Chico (Francisco) e meus gatos Sushi, Hashi e Kiwi — agradeço pela alegria e pelo suporte emocional que tantas vezes apenas eles puderam oferecer.

Aos amigos que tornaram essa caminhada mais leve, agradeço: a Brenda, pelo sorriso que ilumina até minhas noites mais escuras; a Guilherme, pelo apoio quando pensei não conseguir continuar; a Tauanne, pelos cafés e “voltinhas”; a Sabrina (“lab sis”), pelos abraços e conselhos; a Neverton, pelo conhecimento, gargalhadas e docinhos; a Vagner, pelo exemplo de dedicação à pesquisa; a Ester, pelo apoio nos momentos difíceis; e a Thaís, pela alegria compartilhada com seus gatinhos Flora e Júnior. Estendo minha gratidão a todos os amigos e parceiros de pesquisa da pós-graduação, que tornaram essa experiência ainda mais enriquecedora.

Agradeço ao professor e orientador Eduardo de Almeida Marques da Silva pela acolhida como orientanda, pelos conhecimentos compartilhados e pela confiança em minha pesquisa. Também agradeço ao professor Leandro Licursi de Oliveira pelos insights em meu caminho científico e ao professor Robson Ricardo Teixeira pelo fornecimento de insumos e materiais acadêmicos essenciais para esta pesquisa.

Agradeço ao Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais (IFSEMG),

campus Muriaé, por toda a base de conhecimento construída, pelo reconhecimento mesmo após o término de minha graduação e pelo carinho que permanece vivo entre mim e esta instituição. Reverencio meus professores, colaboradores e todos os funcionários que fizeram parte dessa trajetória.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa (UFV) pela oportunidade de realizar esta formação na instituição que sonho desde a adolescência, ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pelo suporte, especialmente aos laboratórios de Bioquímica Celular e Bioprodutos I (LBBI), ao Laboratório de Parasitologia, Epidemiologia e Virologia (LAPEV), ao Departamento de Química e ao Laboratório do Grupo de Síntese e Pesquisa de Compostos Bioativos. Também agradeço à AKC (Canine Health Foundation) pelo fomento às pesquisas realizadas pelo LIP.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

TOSTES, Helena de Abreu, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2026. **Uso de derivado do eugenol LS15 (oleato de 4-alil-2-metoxifenila) para tratamento de infecção *in vitro* por *Leishmania amazonensis* em macrófagos RAW 264.7.** Orientador: Eduardo de Almeida Marques da Silva.

A leishmaniose cutânea (LC) é um dos quadros clínicos no espectro das leishmanioses, classificadas como doenças tropicais negligenciadas. No Brasil, a espécie *Leishmania amazonensis* é uma das principais causadoras da LC. Existem desafios acerca dos tratamentos disponíveis, realizados principalmente com antimoniais pentavalentes, relatados por efeitos colaterais como toxicidade ao organismo do paciente, dor durante o tratamento intralesional e desenvolvimento de resistência biológica aos fármacos pelos parasitos do gênero *Leishmania*. O eugenol, um composto fenólico natural e encontrado em plantas como o cravo-da-Índia, é conhecido por seu potencial amplo na indústria, utilizado desde a indústria alimentícia, até mesmo como recurso farmacológico, além de ser conhecido pela ação antioxidante, antiparasitária, anticâncer e anti-inflamatória. Estudos revelaram o potencial do eugenol e de seus derivados diante de infecções por *Leishmania* como tratamento e agentes imunomoduladores. Um dos derivados, o LS15, possui uma cadeia oleil que pode atuar como pró-fármaco, o que melhora a entrada do grupo eugenol e pode auxiliar na ação deste contra parasitos internalizados. Neste trabalho, foi investigada a possibilidade de ação leishmanicida do LS15 *in vitro* em infecções por *Leishmania amazonensis* em macrófagos. Além de apresentar baixa citotoxicidade aos macrófagos, tratamento com o LS15 levou à redução da quantidade de formas amastigotas em 24 e 48 horas de tratamento dos macrófagos infectados. Esses resultados indicam potencial de utilização do composto em tratamento de leishmaniose cutânea. A partir deles, se abre a perspectiva de futuros estudos *in vivo* para desenvolvimento de tratamentos alternativos e mais acessíveis para LC, como a formulação de cremes e pomadas.

Palavras-chave: eugenol; *Leishmania amazonensis*; leishmaniose cutânea; oleato de 4-alil-2-metoxifenila; tratamento

ABSTRACT

TOSTES, Helena de Abreu, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2026.
Use of the eugenol derivative LS15 (4-allyl-2-methoxyphenyl oleate) for *in vitro* treatment of *Leishmania amazonensis* infection in RAW 264.7 macrophages.
Adviser: Eduardo de Almeida Marques da Silva.

Cutaneous leishmaniasis (CL) is a clinical form of leishmaniasis and is considered a neglected tropical disease. In Brazil, *Leishmania amazonensis* is one of the main causative species. Current treatments face many challenges, especially those using pentavalent antimonials, which are linked to high systemic toxicity, pain during intralesional injections, and the development of drug resistance. Eugenol, a natural phenolic compound obtained from plants like cloves, is widely known for its industrial and pharmacological potential, showing antioxidant, antiparasitic, anticancer, and anti-inflammatory effects. Recent research highlights the potential of eugenol and its derivatives as both leishmanicidal and immunomodulatory agents. One such derivative, LS15 (4-allyl-2-methoxyphenyl oleate), contains an oleyl chain that might act as a prodrug, improving the uptake of the eugenol group and boosting its action against internalized parasites. This study examined the *in vitro* leishmanicidal activity of LS15 against *Leishmania amazonensis* infections in macrophages. The results showed that the compound significantly decreased the number of amastigotes after 24 and 48 hours of treatment, while showing low toxicity to host macrophages. This work provides a basis for future *in vivo* studies focused on developing more accessible alternative treatments for cutaneous leishmaniasis, such as topical creams and ointments.

Keywords: 4-allyl-2-methoxyphenyl oleate; eugenol; cutaneous leishmaniasis; *Leishmania amazonensis*; treatment

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Molécula de Eugenol e Oleato de 4-alil-2-metoxifenila (LS15).....	20
Figura 2. Ensaio de viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 submetidos a diferentes concentrações de Glucantime® (100, 50, 10 e 5 µg x mL ⁻¹)	27
Figura 3. Ensaio de viabilidade celular <i>in vitro</i> de macrófagos RAW 264.7 submetidos a diferentes concentrações de eugenol (2 a 0,015625%, diluições 1:2).	29
Figura 4. Ensaio de viabilidade celular <i>in vitro</i> de macrófagos RAW 264.7 submetidos a diferentes concentrações de LS15 (2 a 0,06%, diluições 1:2).....	30
Figura 5. Avaliação da infecção de macrófagos por <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> , tratados por 48 horas com eugenol ou LS15.....	33
Figura 6. Avaliação da infecção de macrófagos por <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> , tratados por 48 horas com eugenol ou LS15.....	36

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. Leishmanioses: aspectos sociais, econômicos e culturais.....	15
2.2. <i>Leishmania</i> : taxonomia e mecanismos evolutivo-moleculares de evasão ao sistema imune	16
2.3. Leishmaniose cutânea: manejo clínico e tratamentos usuais	18
2.4. Eugenol e derivados: multifuncionalidade e aplicações farmacológicas no manejo das leishmanioses.....	19
3. Objetivo geral	21
3.1. Objetivos específicos	21
4. MÉTODOS	22
4.1. Linhagens celulares	22
4.2. Eugenol, Glucantime® e LS15 (Oleato de 4-alil-2-metoxifenila).....	22
4.4. Testes <i>in vitro</i>	23
4.4.1. Ensaio de viabilidade celular em macrófagos RAW 264.7	23
4.4.2. Ensaio de citotoxicidade em formas amastigotas internalizadas	24
4.5. Análise estatística	26
5. RESULTADOS	27
5.1. Ensaio de viabilidade celular em macrófagos RAW 264.7	27
5.2. Ensaio de citotoxicidade em formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> internalizadas em macrófagos – 24 horas de tratamento	31
5.2.1. Porcentagem de macrófagos infectados.....	31
5.2.2. Índice de infecção.....	31
5.2.3. Número de formas amastigotas por macrófago.....	31
5.2.4. Número de formas amastigotas por macrófago infectado	32
5.3. Ensaio de citotoxicidade em formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> internalizadas em macrófagos – 48 horas de tratamento	34
5.3.1. Porcentagem de macrófagos infectados.....	34

5.3.2.	Índice de infecção.....	34
5.3.3.	Número de formas amastigotas por macrófago.....	34
5.3.4.	Número de formas promastigotas por macrófago infectado.....	35
6.	DISCUSSÃO	37
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum de manifestação do espectro clínico da leishmaniose, com ocorrência de 95% dos casos registrados nas Américas, Bacia Mediterrânea, Oriente Médio e Ásia Central. Estima-se a incidência de 600.000 a 1 milhão de casos da doença por ano e apenas cerca de 200 mil notificados (Organização Mundial da Saúde, 2023). A LC é endêmica em mais de 90 países, não limitada ao fator quantitativo da população atingida, mas qualitativo de seu aspecto e condições de vida (Organização Mundial da Saúde, 2024; Honório et al., 2016; Wenning et al., 2022). Ela é classificada como uma doença tropical negligenciada, isto é, de prevalência em regiões vulneráveis nos aspectos sociais e econômicos, com baixa atenção e investimentos em pesquisa e saúde pública precária (Feller; Lemmer; Khammissa, 2022; Srour; Baratti-Mayer, 2020).

O gênero *Leishmania* é dividido nos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* e abrange mais de 50 espécies, com mais de 20 delas capazes de infectar humanos (Akhoundi et al., 2016; Herrera et al., 2020; Paranaíba et al., 2017) (Akhoundi et al., 2016; Herrera et al., 2020; Paranaíba et al., 2017). Nas Américas, as principais espécies causadoras da manifestação cutânea da doença são *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis*, *Leishmania (Viannia) peruviana*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyaniensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*, sendo as três últimas as mais detectadas em território brasileiro (Brasil, s.d.; PAHO/WHO, 2024). A disseminação da doença ocorre majoritariamente a partir do repasto sanguíneo de fêmeas de insetos flebotomíneos da família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* no Novo e no Velho Mundo, respectivamente. No Brasil, esses insetos são nomeados por populares como “mosquito-palha” ou “birigui” (em inglês, *sandflies*). A infecção em mamíferos se caracteriza pelo desenvolvimento de lesões a partir do local de picada do flebotomíneo e se manifesta de forma localizada ou difusa, comum em regiões de exposição ao inseto (McGwire; Satoskar, 2014). Um dos principais fatores de potencialização do ciclo zoonótico e disseminação da LC e as outras formas de leishmaniose (mucocutânea e visceral) é a urbanização desenfreada associada à domesticação de animais com potencial de reservatório desses e outros parasitos, além de outros fatores como atividades turísticas, imigração e adaptação do inseto ao meio urbano (Hotez, 2018; Pavli; Maltezou, 2010)

Além das adversidades relacionadas ao desenvolvimento de vacinas, o tratamento de LC apresenta desafios tanto para os acometidos pela doença quanto para os profissionais da saúde em seu manejo, principalmente no que diz respeito à utilização dos medicamentos de primeira linha, os antimoniais pentavalentes (Glucantime[®], Pentamidina, antimoniato de meglumina, etc) ou de segunda linha em casos mais severos, como anfotericina B (Pinart et al., 2020). Além do alto custo, longo tempo de duração, desenvolvimento de resistência parasitária e toxicidade ao organismo, indivíduos em tratamento, em sua maioria trabalhadores em países previamente considerados sob vulnerabilidade econômica e social, relatam incômodo pela via de administração intralesional, além dos registros de alta taxa de evasão aos cuidados clínicos que exigem aplicações diárias, mas que são incompatíveis ao cotidiano de trabalho dos pacientes (Bellali et al., 2017; Gonçalves et al., 2019a; Makarani et al., 2025; Ponte-Sucre et al., 2017; Pradhan et al., 2022). Em pacientes concluintes do tratamento também é recorrente que o resultado pós-cicatrização não seja satisfatório, o que ultrapassa o âmbito da aparência e atinge a qualidade mental dos acometidos (Bennis et al., 2018; Pires et al., 2019).

É conhecido, ademais, que parasitos do gênero *Leishmania* atingem principalmente macrófagos e evoluíram geneticamente de modo a desenvolverem capacidade de evasão de mecanismos efetores do sistema imune mediados em grande parte por tal classe de células fagocíticas. Tais organismos alcançam, por intermédio de ferramentas moleculares, o direcionamento do modelo de resposta imune para uma tendência anti-inflamatória pelo padrão Th2, especialmente pela estimulação da produção de interleucinas (IL) como IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 e fator beta de transformação de crescimento (TGF- β) em linfócitos auxiliares do tipo TCD₄⁺, o que favorece o desenvolvimento de *Leishmania* (Maspi; Abdoli; Ghaffarifar, 2016; Scott; Novais, 2016)(Maspi; Abdoli; Ghaffarifar, 2016; Scott; Novais, 2016). Células fagocíticas como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas são as principais infectadas por formas evolutivas promastigotas metacíclicas de *Leishmania*, dotadas de alta virulência e capacidade de evasão do sistema imune. Dentro das células, estas formas se diferenciam em amastigotas, formas também infectantes que se reproduzem assexuadamente em vacúolos pós-endocíticos (De Pablos; Ferreira; Walrad, 2016; Killick-Kendrick, 1990; Tariq; Lazar; Abass, 2020). Dessa maneira, a predominância de perfis de resposta Th1 e Th17 exercem papéis fundamentais para o controle da doença. O perfil de células TCD₄⁺ do subtipo Th1 produzem citocinas

tais como Interferon Gamma (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF- α) e IL-12, associadas à maior ativação de macrófagos e outras células do sistema imune (Dey et al., 2007; Egui et al., 2018; Saha; Roy; Ukil, 2022) O subtipo Th17 atua também com a produção de citocinas, sobretudo a IL-17, que contribui para o perfil inflamatório ao recrutar células fagocíticas e ativar células como TCD $_8^+$ e NK (*natural killers*) durante a infecção cutânea por *Leishmania* (Morales-Primo et al., 2024). Esses dois padrões associados, portanto, contribuem para a supressão da resposta do padrão Th2 e, conseqüentemente, em relevante controle da infecção.

Somados todos os entraves relacionados ao contexto social, epidemiológico, tratamento, do potencial infeccioso dos parasitos evidenciados e das características do perfil imunológico da LC, entende-se que a busca por soluções em nível de profilaxia ou tratamento da doença é um relevante problema de saúde pública.

O Eugenol, um composto fenólico encontrado e extraído a partir de plantas das famílias *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae* e *Mysristicaceae* e em espécies como *Syzygium aromaticum* (cravo-da-Índia) é conhecido por seu potencial imunogênico e terapêutico em modelos de leishmaniose visceral e cutânea (Charan Raja et al., 2017b; Islamuddin et al., 2016; Kar et al., 2021; Teixeira et al., 2022). Além disso, é popularmente difundido que compostos fenólicos como um todo possuem atividade promissora em aspectos anti-inflamatórios, antioxidantes, antiparasitários, antialérgicos, além de sua importância na indústria culinária, farmacêutica e de cosméticos (Hachim; Shawi, 2016; Mohammadi Nejad; Özgüneş; Başaran, 2017; Pramod; Ansari; Ali, 2010; Ulanowska; Olas, 2021; Yujie Lao et al., 2024; Zari; Zari; Hakeem, 2021).

O trabalho em pauta propõe, por intermédio de estudos *in vitro*, a testagem de um derivado sintético do eugenol, o LS15, que é um composto orgânico conjugado de um grupo oleil de prévia eficácia em modelos de leishmaniose visceral atuando como um pró-fármaco ao mimetizar a entrada do grupo eugenol pela membrana plasmática (Charan Raja et al., 2017). A presença do grupo químico conjugado oleil poderia, em vista de sua possível ação na mimetização através da membrana plasmática, aprimorar a entrega do grupo eugenol e torná-lo mais efetivo contra as formas infectantes que, neste caso, estão internalizadas pelas células.

Portanto, com o objetivo de verificar o potencial do composto LS15 para tratamento de LC, seu uso é avaliado neste trabalho considerando os perfis de toxicidade em macrófagos e em formas amastigotas internalizadas de *Leishmania*

(Leishmania) amazonensis. De acordo com os dados mostrados, este mesmo composto poderá funcionar para futuras perspectivas de modelos *in vivo* em tratamentos alternativos de formulações tópicas que, além de serem mais acessíveis, podem reduzir os impactos proporcionados pelos tratamentos tradicionais contra LC.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Leishmanioses: aspectos sociais, econômicos e culturais

A Organização Mundial da Saúde (2023) classifica as leishmanioses como doenças tropicais negligenciadas e muitos dos países correlatos à prevalência da doença também representam áreas onde o acesso a saúde é precário (Tilahun; Alemu; Mulatu, 2014). Considerável parte dos estudos epidemiológicos e clínicos publicados são conduzidos em localidades sob emergência de conflitos militares e civis e em regiões ocupadas sobretudo por proletários e trabalhadores rurais, além de idosos, mulheres e crianças (Berry; Berrang-Ford, 2016; Gonçalves et al., 2019b; Lu et al., 2024; Moheballi, 2013; Oryan; Akbari, 2016). Nos casos da leishmaniose visceral (LV), a principal emergência epidemiológica é concentrada no comprometimento de funções sistêmicas essenciais para a saúde de um indivíduo, tais como o sistema imunológico, hematopoiético e hepático, que, em quadros graves da doença, como ocorre na coinfeção por HIV, ou sob outras condições de imunodepressão ou vulnerabilidades sistêmicas, podem levar à morte dos acometidos (Coutinho et al., 2017; Lindoso et al., 2018; Machado et al., 2021). Nas leishmanioses cutânea (LC) e mucocutânea (LM), a evidência de óbitos é rara, mas, em contrapartida, existem outras problemáticas econômicas, sociais e psicológicas acerca das patologias.

Assim como nos casos de LV, para LC e LM existe dificuldade de adesão ao tratamento devido à duração e ao método de posologia, que pode durar em média 30 dias em casos brandos e mais do que esse tempo em casos severos, além de limitações financeiras e distância de centros de tratamento (Bamorovat et al., 2023; Beyazgül et al., 2024; Núñez García, 2025). Esse fator é redundantemente inviável quando considerado o fator público-alvo, isto é, majoritariamente integrante de minorias econômicas e proletários. Outro entrave se dá no pós-tratamento: devido às características de lesões desenvolvidas, o processo de cura e escarificação é quase sempre denotado por cicatrizes marcantes, que se tornam fatores de vulnerabilidade psicológica e estigmatização, principalmente em mulheres e crianças, e tornam quaisquer grupos acometidos mais suscetíveis a preconceitos no ramo empregatício e social (Haileselassie; Zerihun; Mulugeta, 2025; Merdekios et al., 2025; Wenning et al., 2022b).

2.2. *Leishmania*: taxonomia e mecanismos evolutivo-moleculares de evasão ao sistema imune

Os parasitos do gênero *Leishmania* são eucariotos flagelados do reino protista pertencentes à classe Kinetoplastida, ordem Trypanosomatida e integrantes da família Trypanosomatidae que compartilham aspectos moleculares que representam homologias filogenéticas (Bernardes; Zani; Carvalho, 2013; Maurício, 2018; Merzlyak et al., 2001; Teixeira, 1998). O exemplo mais emblemático de homologia se dá pelas tripanotiona-sintetase e tripanotiona-reductase, enzimas participantes do balanço síntese-redução da tripanotiona (Augusto et al., 2025). Essas enzimas são emblemáticas, atuantes em mecanismos anti-estresse oxidativo e na manutenção de processos redox, caracterizadas pela ligação de dois grupos peptídicos glutationa por uma molécula de espermidina, importante para a sobrevivência dos parasitos e que atuam como potenciais marcadores para a ação de fármacos, em que a espermidina age como cofator redox e ligante de tiol no processo redox-tiol (Flohé; Hecht; Steinert, 1999; García-Davis et al., 2023; González-Montero et al., 2024; Lopez-Jaramillo et al., 1998; Manta et al., 2013).

Lipofosfoglicanos de superfície (LPGs) são moléculas presentes em parasitos do gênero *Leishmania* que têm papel importante no processo infeccioso. Elas iniciam seu papel funcional logo após a interação do flebotomíneo com o hospedeiro e sua ação geral é caracterizada pela lise de proteínas efetoras do complemento e pela interação com receptores de membrana do tipo Toll 2 e 4 (*Toll-like receptors* ou TLR-2 e TLR-4) em células do sistema imune inato, tais como macrófagos e células *natural-killer* (NKs) (Forestier; Gao; Boons, 2014; Pereira-Filho et al., 2023). Essa proteína é capaz de otimizar a adesão dos parasitos a macrófagos, inibir enzimas hidrolíticas e inativar a quinase C (PKC) (Franco; Beverley; Zamboni, 2012; Giorgione; Turcot; Epanand, 1996; Secundino et al., 2010; Turco; Descoteaux, 1992). Em especial, a LPG3 (lipofosfoglicano 3), pertencente a essa família proteica, atua ao formar ligações que sobrepõem sítios de ligação de ATP e são capazes de se ligar a moléculas de heparina, o que sugere sua participação em processo de adesão e de internalização do parasito em células fagocitárias (Martins et al., 2018).

Outro aspecto relacionado à infecção por parasitos causadores de LC é o recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção, sobretudo pela quimiotaxia exercida pela ação de IL-8 após sua ligação em receptores de membrana nessas células (Justiz-Vaillant et al., 2024; Quan et al., 1996). Apesar de neutrófilos atuarem

em respostas de perfil pró-inflamatório, que envolvem produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico (NO) e de formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), é observado que, em parte dos casos de LC, existe predominância de padrão de resposta imune anti-inflamatória, sobretudo resposta celular Th2 associada a linfócitos auxiliares (TCD₄⁺), e produção de citocinas reguladoras IL-10 e TGF- β (Abdoli; Maspi; Ghaffarifar, 2017; Carvalho et al., 2024; Justiz-Vaillant et al., 2024).

Proteínas de choque térmico (*heat shock proteins* ou HSPs) são chaperonas ubiquitinadas descritas por seu potencial protetor, sobretudo em contextos de estresses metabólicos induzidos por mudanças de temperatura, expressas em procariotos e eucariotos e classificadas de acordo com sua massa molecular (Hu et al., 2022). Sua expressão ocorre quando fatores de choque térmico (*heat shock factors* ou HSFs) são ativados pela mudança de temperatura e ligam-se a regiões promotoras do DNA, os “elementos de choque térmico” – *heat shock elements* ou HSEs. (Keller, 2025; Sharp; Brown; Miller, 1997). A proteína do tipo chaperona de choque térmico 70 (Hsp70), o tipo mais comum dessa classe e expressa em vários tipos celulares, também se enquadra em mecanismo de resistência à temperatura e à sobrevivência intracelular de espécies de *Leishmania* e é um fator para a discriminação de espécies a partir da estrutura de seus genes (Espada et al., 2018; Fraga et al., 2010, 2013; Montalvo et al., 2010).

É importante enfatizar a protease de membrana GP63 ou leishmanolisina (MSP), com ápice de atividade na forma evolutiva de formas promastigotas metacíclicas (Olivier et al., 2012), capaz de se ligar à proteína C3 da via alternativa do sistema complemento e clivá-la em sua forma inativa (iC3b), o que, ao mesmo tempo que leva à inibição de formação de poros na membrana celular dos parasitos via complexo de ataque à membrana (MAC), se liga ao receptor de membrana CR3 em macrófagos, facilitando a internalização do parasito (Devsani; Vemula; Bhandari, 2023; Yao; Donelson; Wilson, 2003). Essa proteína possui, ademais, capacidade de ligação a receptores de fibronectina e promove adesão e internalização dos parasitos em células-alvo no processo infeccioso (Brittingham et al., 1999; Moreno, 2020).

Os mecanismos evolutivo-moleculares previamente citados corroboram para a modulação da resposta imune em relação ao balanço Th1-Th2, caracterizada pela alteração de funções metabólicas de células efetoras como macrófagos. Tais mecanismos promovem a prevalência do padrão Th2, que, devido a estímulos

celulares gerados por moléculas previamente exemplificadas, têm como consequência a produção de citocinas e marcadores deste mesmo padrão, que favorecem a evasão dos parasitos *Leishmania* e o desenvolvimento da doença (Ganguli et al., 2015; Goto, 2025).

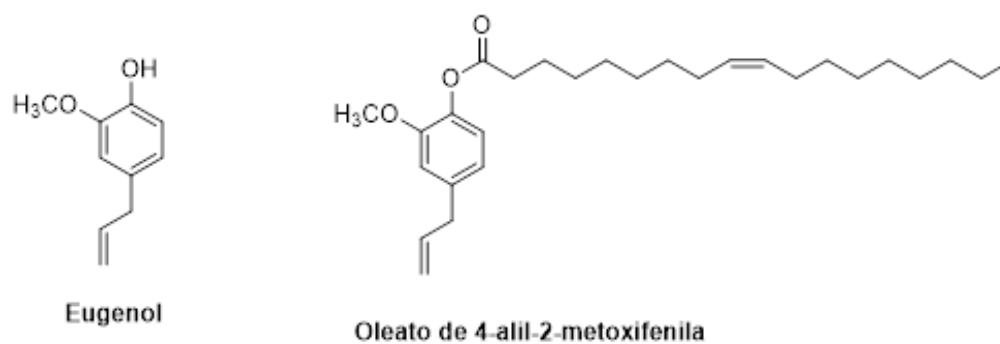
2.3. Leishmaniose cutânea: manejo clínico e tratamentos usuais

O manejo clínico da leishmaniose envolve desafios além das questões logísticas e sociais dos acometidos. As formas lesionais exibidas nos indivíduos muitas vezes exibem similaridades morfológicas tais como placas, nódulos e infiltrados subcutâneos, que podem levar a erros de triagem clínica primária por apresentarem sintomatologias análogas às de outras doenças, tais como psoríase, sarcoidose, piodermite, carcinoma escamoso, celulite, foliculite e eczema (Karaja et al., 2024; Ortega-Moreno et al., 2019; Vanlier et al., 2021). Isso, somado aos erros de diagnóstico muitas vezes causados pela inacessibilidade a métodos mais sensíveis e específicos em regiões vulneráveis economicamente, pode levar a limitações no manejo clínico e no direcionamento e tempo ideal para realização dos tratamentos e até mesmo ao desperdício de recursos já escassos (Hazra; Patra, 2018; Singh et al., 2025; Sousa et al., 2024). Além dos fatores que envolvem os impasses dos diagnósticos típicos, os tratamentos disponíveis, apesar de sua importância, também exibem problemáticas. É conhecido que os antimoniais têm como princípio de ação a interação com parasitos do gênero *Leishmania* que levam ao aumento da permeabilidade da membrana celular e se ligam ao DNA, ativando vias de sinalização pró-apoptóticas, além da inativação de enzimas anti-estresse oxidativo como a tripanotona reductase e DNA topoisomerase (Frézard; Demicheli; Ribeiro, 2009; Istanbulu; Bayraktar, 2022; Rauf et al., 2016). Apesar de demonstrarem considerável efetividade para o tratamento de LC, estes fármacos podem apresentar efeitos colaterais como dor durante e após aplicações, prurido e edemas quando se trata da administração intralesional, além de, em casos mais raros, efeitos sistêmicos, tais como o desenvolvimento de cardio, hepato e nefrotoxicidade, e pancreatite (Berbert et al., 2018; Kato et al., 2014a; Marques et al., 2019).

2.4. Eugenol e derivados: multifuncionalidade e aplicações farmacológicas no manejo das leishmanioses

O eugenol (4-alil-2-metoxifenol) é um composto fenólico de estrutura considerada simples ($C_{10}H_{12}O_2$), que tem a presença de um grupo hidroxila e de um grupo alil capazes de contribuir para seu potencial antioxidante, microbicida e anti-inflamatório em sistemas biológicos (Abdou et al., 2021; Faruq; Ibrahim, 2025). Este e seus derivados são conhecidos por seu potencial amplo em diferentes quadros patológicos, a incluir câncer, infecções, Alzheimer e leishmaniose, possuindo, ademais, características antioxidantes e anti-inflamatórias e podendo atuar de forma dose-dependente e sinergisticamente quando combinado a tratamentos já utilizados (Charan Raja, 2015; Parween; Jabeen; Prasad, 2021). Estudos voltados para a leishmaniose já demonstraram a efetividade do eugenol na indução de morte celular em *Leishmania* pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de danos mitocondriais, além de influenciar o balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias e estimular células do sistema imunológico (Justiz-Vaillant et al., 2024; Oliveira et al., 2014; Rani et al., 2024b). O composto também demonstrou baixa citotoxicidade frente aos macrófagos hospedeiros e baixos valores de IC_{50} para compostos destes derivados, e capacidade de potencializar a ação de células do sistema imune e direcionar a resposta para padrão Th1 (Islamuddin et al., 2016; Mallick et al., 2011; Rani et al., 2024b). Um dos derivados do eugenol, o oleato de eugenol ou “LS15” (4-alil-2-metoxifenila), ativa a via de sinalização PKC- β II-p38 MAPK, promovendo aumento da produção de citocinas comuns ao padrão pró-inflamatório (Th1), tais como IL-12 e IFN- γ , que têm papel crucial no aumento da produção de óxido nítrico (NO) e, conseqüentemente, na morte dos parasitos (Hazra; Raja MR; Mahapatra, 2023). O LS15 é acrescido de uma cadeia alifática, que dá a esta molécula característica anfifílica, que pode auxiliar a entrada do grupo eugenol em células e apresenta biocompatibilidade devido à similaridade química em relação à composição da membrana plasmática (Figura 1). Em outras palavras, devido à sua capacidade de ligação, compatibilidade bioquímica e estabilização em receptores na superfície da membrana celular, a cadeia alifática oleil se comporta como uma “pró-droga”, facilitando a entrega do grupo eugenol no interior da célula (Charan Raja et al., 2017a).

Figura 1 - Molécula de Eugenol 4-aliil-2-metoxifenila (LS15)



Fonte: Produzida pelo Professor Robson Ricardo Teixeira, Grupo de Síntese e Pesquisa de Compostos Bioativos, Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa (2026).

3. OBJETIVO GERAL

Testar *in vitro* o efeito do derivado de eugenol LS15 na viabilidade de macrófagos RAW 264.7 e nos níveis de infecção dessas células por formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*.

3.1. Objetivos específicos

- Avaliar, através de ensaio MTT, a viabilidade de macrófagos RAW 264.7 na presença de diferentes concentrações de Eugenol e seu derivado LS15 após 24 e 48 horas de exposição aos compostos;
- Aferir se, após 24 e 48 horas de tratamento, o Eugenol e seu derivado LS15 apresentam efeito leishmanicida em modelo de infecção *in vitro* por *L. amazonensis*.

4. MÉTODOS

4.1. Linhagens celulares

Macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos, sob responsabilidade da Professora Juliana Lopes Rangel Fietto, Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Viçosa, mantidos em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, BR) suplementado com soro fetal bovino (10%) (Nova Biotecnologia, Cotia, SP, BR), L-glutamina (1%) (Labsynth, Diadema, SP, Brasil), penicilina G (1%) (Sigma-Aldrich), HEPES (10 mmol x L⁻¹) (ACS Científica, Sumaré, SP, BR) e NaHCO₃ (2 g x mL⁻¹) (Labsynth), pH 7.2. Parasitos da espécie *Leishmania amazonensis* da cepa IFLA/BR/67/PH8 foram obtidos após passagem em camundongos C57BL/6 e cultivados em meio de cultura Grace (*Grace Insect Medium*, Gibco, Grand Island, NY, USA) com soro fetal bovino (10%) (Nova Biotecnologia) e penicilina G (1%) (Sigma-Aldrich), pH 6,5. O triglicérides (Yaniv Prod. Cosm. e Farm. LTDA, São José dos Pinhais, PR, BR) foi gentilmente cedido pelo Centro Universitário UniViçosa (Viçosa, Minas Gerais, Brasil).

4.2. Eugenol, Glucantime® e LS15 (Oleato de 4-alil-2-metoxifenila)

O Glucantime® (Antimoniato de meglumina) (Sanofi-Aventis Farmacêutica LTDA, Suzano, SP, BR) foi utilizado como droga controle. O eugenol (4-alil-2-metoxifenol) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi gentilmente cedido pelo Grupo de Síntese e Pesquisa de Compostos Bioativos, sob responsabilidade do professor Robson Ricardo Teixeira, do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa, sendo o derivado LS15 (Oleato de 4-alil-2-metoxifenila) produzido e gentilmente cedido por este mesmo grupo.

4.3. Produção do LS15 (4-alil-2-metoxifenila)

A um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 150 µL de eugenol (0,97 mmol, 1,0 equivalente), 420 µL de ácido oleico (1,49 mmol, 1,5 equivalente), 230 µL (1,49 mmol, 1,5 equivalente) do agente de acoplamento diisopropilcarbodiimida (DIC), 0,061 mg (0,5 mmol, 0,5 equivalente) do catalisador DMAP e 3 mL de diclorometano como solvente. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética em temperatura ambiente por 2 horas. O monitoramento da reação foi realizado por

cromatografia em camada delgada (CCD), com visualização sob luz UV e revelação com solução aquosa de KMnO_4 . Ao término da reação, a mistura foi transferida para um funil de separação e submetida à extração líquido-líquido, empregando-se água destilada ($3 \times 10 \text{ mL}$) como fase aquosa e diclorometano (20 mL) como fase orgânica. Após a extração, as fases orgânicas foram reunidas, secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas sob pressão reduzida. A purificação do produto foi realizada por cromatografia em coluna, utilizando sílica gel como fase estacionária e uma mistura de hexano-acetato de etila (6:1, v/v) como fase móvel. As frações contendo o composto puro foram reunidas em um balão de fundo redondo e concentradas sob pressão reduzida. O produto foi então transferido para frasco apropriado, previamente identificado, e mantido até a completa evaporação do solvente.

4.4. Testes *in vitro*

4.4.1. Ensaio de viabilidade celular em macrófagos RAW 264.7

Macrófagos RAW 264.7 foram utilizados para o ensaio de citotoxicidade após 24 e 48h de exposição ao composto de interesse. Para os ensaios de 24h de exposição, as células foram dispostas em placas de 96 poços de fundo plano em concentração de 5×10^4 células/100 μL /poço (5×10^5 células/mL). Nos testes de 48h a concentração de células foi ajustada para $1,25 \times 10^4$ células/100 μL /poço ($1,25 \times 10^5$ células/mL) para evitar superpopulação de células ao final do tempo utilizado.

Para a utilização dos compostos, foram preparadas soluções-estoque utilizando triglicérides como diluente. Para os tratamentos com Eugenol, foram preparadas soluções-estoque através de diluições (1:2) em concentrações de 19,0524 $\text{mmol} \times \text{L}^{-1}$ a 2,44 $\text{mol} \times \text{L}^{-1}$ de Eugenol. Para o LS15, procedimento semelhante e de mesmo fator de diluição foi realizado, porém com a preparação de concentrações entre 29,8105 e 954 $\text{mmol} \times \text{L}^{-1}$ de LS15. Soluções-estoque de Glucantime[®] também foram preparadas nas respectivas concentrações de 10,64, 5,32, 1,064 e 0,532 $\text{mol} \times \text{L}^{-1}$.

Após o período de adesão das células nos poços por 14 (quatorze) horas, os poços foram lavados com PBS (pH 7.2) para retirada das células não aderidas. Em seguida, novo meio RPMI-1640 foi adicionado. Para a administração dos compostos, foi estabelecido que esta ocorreria considerando 5% do volume total dos poços. Dessa

forma, as concentrações de eugenol utilizadas foram de 0,95262 a 122 mmol x L⁻¹, enquanto para o LS15 foram de 1,490525 a 47,7 mmol x L⁻¹. A droga controle utilizada foi o Glucantime® (Antimoniato de Meglumina, 300 mg x mL⁻¹), também em diferentes concentrações (33,25, 66,5, 133 e 266 mmol x L⁻¹).

Para calcular a viabilidade das células após os períodos de exposição aos compostos, o grupo controle não tratado foi estabelecido como parâmetro de referência de viabilidade (100% de viabilidade). Para o cálculo, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Absorbância do grupo teste}}{\text{Absorbância do grupo controle}} \times 100\%$$

4.4.2. Ensaio de citotoxicidade em formas amastigotas internalizadas

Após os testes de viabilidade celular em macrófagos não infectados, as mesmas concentrações dos grupos da droga-controle (Glucantime®) foram utilizadas e as que apresentaram menor citotoxicidade para as células foram selecionadas, tanto para o eugenol (1,90 e 3,8125 mmol x L⁻¹) quanto para o LS15 (11,925 e 47,7 mmol x L⁻¹).

Macrófagos RAW 264.7 foram incubados em placas de 24 poços (1 x 10⁵/mL/poço) para os testes de infecção em 24h e 5 x 10⁴ /mL/poço para 48h. Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram cultivadas até o 10º dia de cultura (1 x 10⁵ parasitos/mL no 1º dia de cultura) e utilizadas para a infecção dos macrófagos na proporção de vinte parasitos por macrófago.

O processo se iniciou a partir da disposição de lamínulas redondas de 13 mm em placas de 24 poços, seguida da adição de células fagocíticas nas respectivas contagens anteriormente descritas em 1 mL de meio RPMI-1640. Para garantir a adesão das células, estas foram incubadas a 5% CO₂, 37° C, por 14 (quatorze) horas e, no dia seguinte, as formas totais de *Leishmania amazonensis* no décimo dia de cultura foram ressuspensas em meio RPMI-1640 preparado conforme descrito anteriormente para cultivo de macrófagos e incubadas junto aos macrófagos durante 3 horas para internalização dos parasitos. Após esse tempo, os parasitos não internalizados foram retirados por lavagem dos poços feita três vezes com solução de PBS esterilizado (pH 7.2). Ao fim das lavagens, novo meio RPMI-1640 foi adicionado

e os compostos foram adicionados para as respectivas incubações nos períodos de 24 e 48h.

Após o tempo requerido para cada experimento, as células das lamínulas foram fixadas em metanol absoluto (100%) e submetidas a coloração panótica (Renylab®, Barbacena, MG, BR). Após a coloração, a quantificação de células infectadas foi realizada por microscopia óptica, considerando o número de 100 células por contagem para a quantificação de amastigotas e de células infectadas.

Para cálculo do percentual de células infectadas, foi estabelecida a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de Células infectadas} = \frac{\text{Células infectadas}}{\text{Células contadas}} \times 100$$

Para cálculo do índice de infecção, que reflete a capacidade infecção dos parasitos, foi estabelecida a seguinte fórmula (Paladi et al., 2012):

Índice de infecção (II) =

$$\frac{\text{Amastigotas contadas}}{\text{Células contadas}} \times \% \text{ de células infectadas}$$

Para cálculo do número de formas amastigotas por macrófago, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Amastigotas por macrófago} = \frac{\text{Amastigotas contadas}}{\text{Células contadas}}$$

Para cálculo do número de formas amastigotas por macrófago infectado, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Amastigotas por macrófago infectado} = \frac{\text{Amastigotas contadas}}{\text{Células infectadas contadas}}$$

4.5. Análise estatística

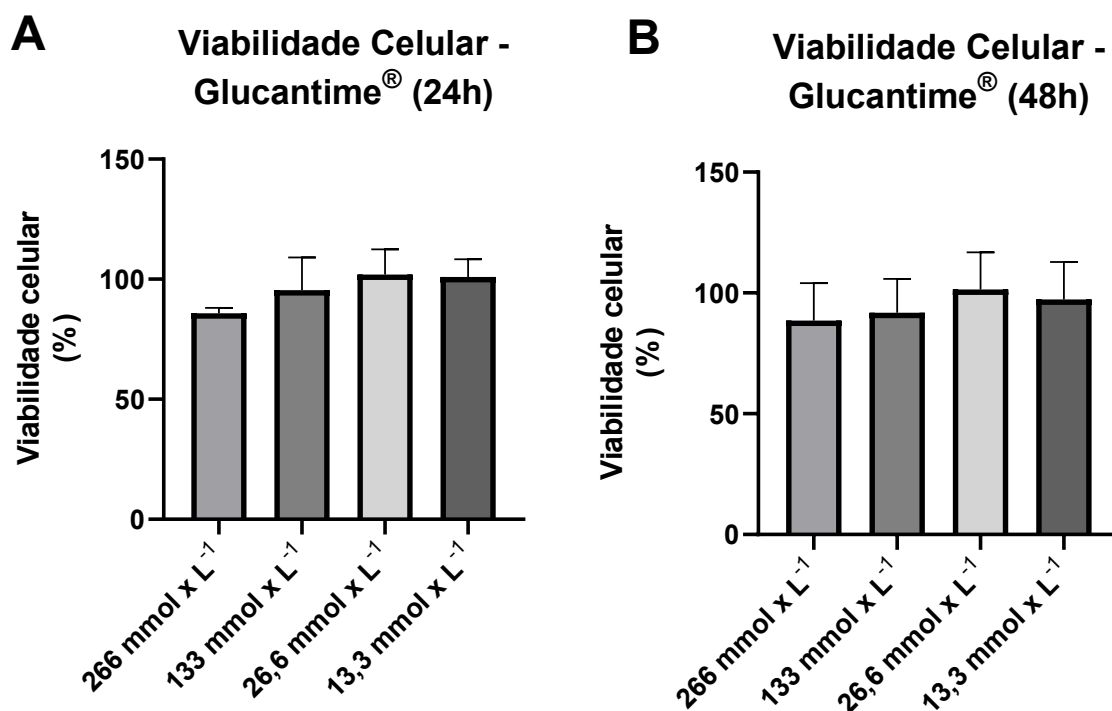
Os testes estatísticos foram realizados utilizando ANOVA unidirecional ($p < 0,05$), em que foram comparadas as médias entre os grupos testados utilizando Software GraphPad Prism (8.0).

5. RESULTADOS

5.1. Ensaio de viabilidade celular em macrófagos RAW 264.7

Macrófagos RAW 264.7 foram expostos a Glucantime[®] nas concentrações de 13,3, 26,6, 133 e 266 mmol x L⁻¹. Não foi observada redução significativa na viabilidade celular, que não foi menor que 80% para nenhum dos grupos após 24 ou 48 horas de incubação (Figura 2 – A e B).

Figura 2 – Gráficos de ensaio de viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 submetidos a diferentes concentrações de Glucantime[®] (33,25, 66,5, 133 e 266 mmol x L⁻¹)

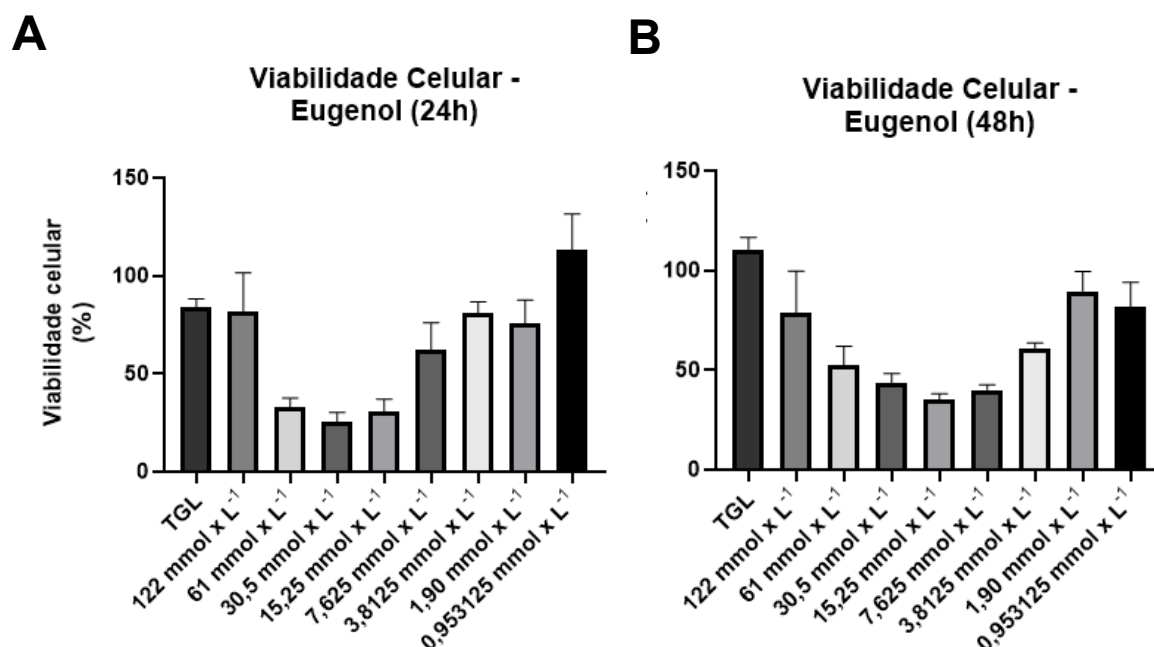


Nota: As células foram incubadas com Glucantime[®] por 24 horas (A) ou por 48 horas (B) e a viabilidade celular foi determinada por ensaio de MTT. Os gráficos representam a média e o erro padrão da média (SEM) de três experimentos independentes reunidos. O grupo não tratado foi definido como padrão de viabilidade (100%). ANOVA unidirecional post-hoc Turkey foi utilizada para comparação dos dados ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

O mesmo tipo de ensaio de viabilidade foi feito com uso de eugenol (Figura 3 – A e B). A diminuição de viabilidade foi observada entre os grupos de 15,25, 30,5 e 61 mmol x L⁻¹, com médias de viabilidade abaixo de 80% em relação ao grupo controle (Figura 3 – A e B). Apesar de ter sido apresentada, a concentração de 122 mmol x L⁻¹ nos experimentos de 24 e 48h não foi considerada como promissora para o prosseguimento dos testes. Durante o procedimento de leitura e pelas características químicas do eugenol evidenciadas pela baixa capacidade de homogeneização no meio, foi percebido o acúmulo da composição dessa concentração no fundo dos poços destinados a esse grupo, o que pode ter corroborado para imprecisões na leitura (Figura 3 – A e B). Foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os níveis de viabilidade quando comparados os seguintes grupos: (a) Triglicérides em relação a 30,5 mmol x L⁻¹; (b) 122 mmol x L⁻¹ em relação a 30,5 mmol x L⁻¹; (c) 15,25, 30,5 e 61 mmol x L⁻¹ em relação ao grupo não tratado; (d) 0,953125 mM em relação a 15,25 mmol x L⁻¹ (Figura 3 – A e B).

Figura 3. Gráficos de ensaio de viabilidade celular *in vitro* de macrófagos RAW 264.7 submetidos a diferentes concentrações de eugenol (0,953125 a 122 mmol x L⁻¹, diluições 1:2)

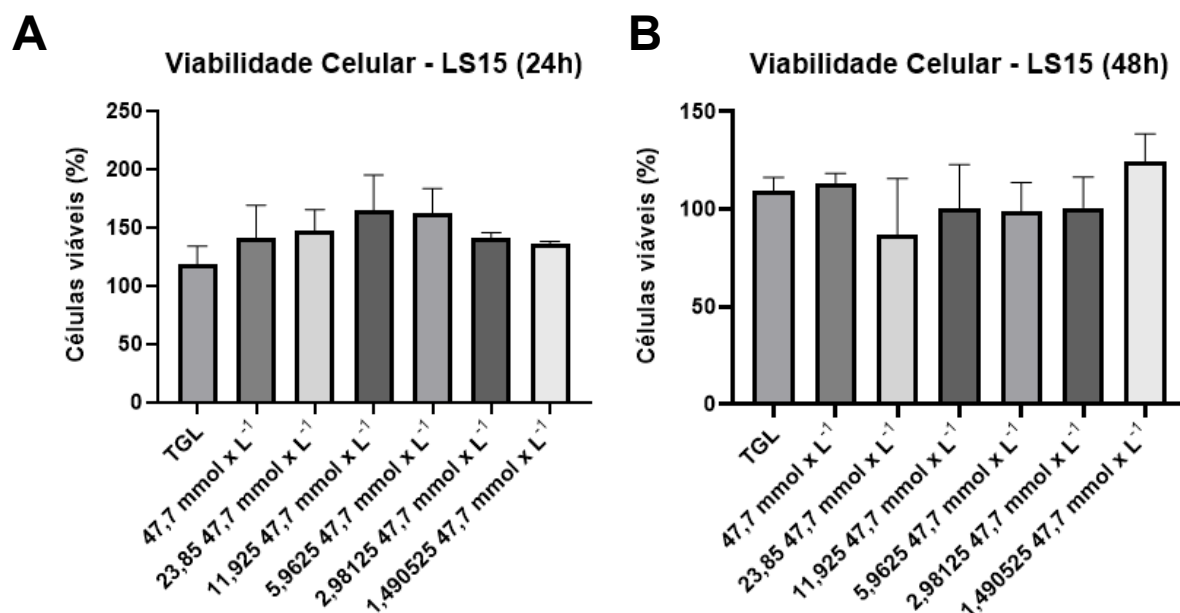


Nota: As células foram incubadas com eugenol por 24 horas (**A**) ou por 48 horas (**B**) e a viabilidade celular foi determinada por ensaio de MTT. Os gráficos representam a média e o erro padrão da média (SEM) de três experimentos independentes reunidos. ANOVA unidirecional post-hoc Turkey foi utilizada para comparação dos dados. O grupo não tratado foi definido como padrão de viabilidade (100%). **Gráfico A:** (a) $p < 0,05$ em relação ao grupo triglicerídeos; (b) $p < 0,05$ em relação ao grupo 30,5 mM; (c) $p < 0,05$ em relação ao controle não tratado; (d) $p < 0,05$ em relação ao grupo 15,25 mM. **Gráfico B:** (a) $p < 0,05$ em relação ao grupo não tratado; (b) $p < 0,05$ em relação ao grupo triglicérides; (c) $p < 0,05$ em relação ao grupo 15,25 mM; (d) $p < 0,05$ em relação ao grupo 7,625 mM.

Fonte: Elaborado pela autora.

A viabilidade de macrófagos RAW 264.7) após exposição a diferentes concentrações de LS15 também foi avaliada. Observou-se aumento das médias de absorbância em 24h de incubação com o composto nas diferentes concentrações e com triglicérides em comparação com o controle não tratado (Figura 4A). Em 48h de incubação, esse mesmo perfil foi observado para os grupos triglicérides (TGL), 47,7 e 1,490625 mmol x L⁻¹ (Figura 4B). Em nenhum dos dois períodos de incubação foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos (Figura 4 – A e B).

Figura 4 – Gráficos de ensaio de viabilidade celular *in vitro* de macrófagos RAW 264.7 submetidos a diferentes concentrações de LS15 (1,490625 a 47,7 mmol x L⁻¹, diluições 1:2)



Nota: As células foram incubadas com LS15 por 24 horas (A) ou por 48 horas (B) e a viabilidade celular foi determinada por ensaio de MTT. Os gráficos representam a média e o erro padrão da média (SEM) de três experimentos independentes feitos em triplicatas por grupo e analisados por ANOVA Unidirecional post-hoc Turkey. O grupo não tratado foi definido como padrão de viabilidade (100%).

Fonte: Elaborado pela autora.

Macrófagos RAW 264.7 foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* e expostos aos tratamentos com Glucantime[®], triglicérides, eugenol ou LS15 por 24 ou 48 horas e os parâmetros porcentagem de macrófagos infectados, índice de infecção, número de formas amastigotas por macrófago e número de formas amastigotas por macrófago infectado foram determinados conforme descrito na metodologia.

5.2. Ensaio de citotoxicidade em formas amastigotas de *L. amazonensis* internalizadas em macrófagos – 24 horas de tratamento

5.2.1. Porcentagem de macrófagos infectados

Todos os grupos, exceto Glucantime® 26,6 mmol x L⁻¹ e Triglicérides, apresentaram redução de porcentagem de macrófagos infectados ($p < 0,05$) em relação ao controle não tratado. Apesar disso, o grupo controle diluente triglicérides (TGL) apresentou redução na média de células infectadas superior a 50% em relação ao grupo controle não tratado (Figura 5A).

Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados todos os grupos de eugenol e LS15 em relação à maior concentração de Glucantime® (266 mmol x L⁻¹).

5.2.2. Índice de infecção

Todos os grupos de tratamentos apresentaram redução no índice de infecção em relação ao grupo controle não tratado (Figura 5B).

Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados todos os grupos de eugenol e LS15 em relação à maior concentração de Glucantime® (266 mmol x L⁻¹).

5.2.3. Número de formas amastigotas por macrófago

Todos os grupos (exceto por Glucantime® 13,3 mM e triglicérides) apresentaram redução na quantidade de formas amastigotas por macrófago em comparação com o grupo não tratado (Figura 5C). Apesar de não apresentarem diferenças estatisticamente significantes, houve redução superior a 50% nas médias dos grupos Glucantime® 13 mmol x L⁻¹ e triglicérides em comparação com o controle não tratado (Figura 5C).

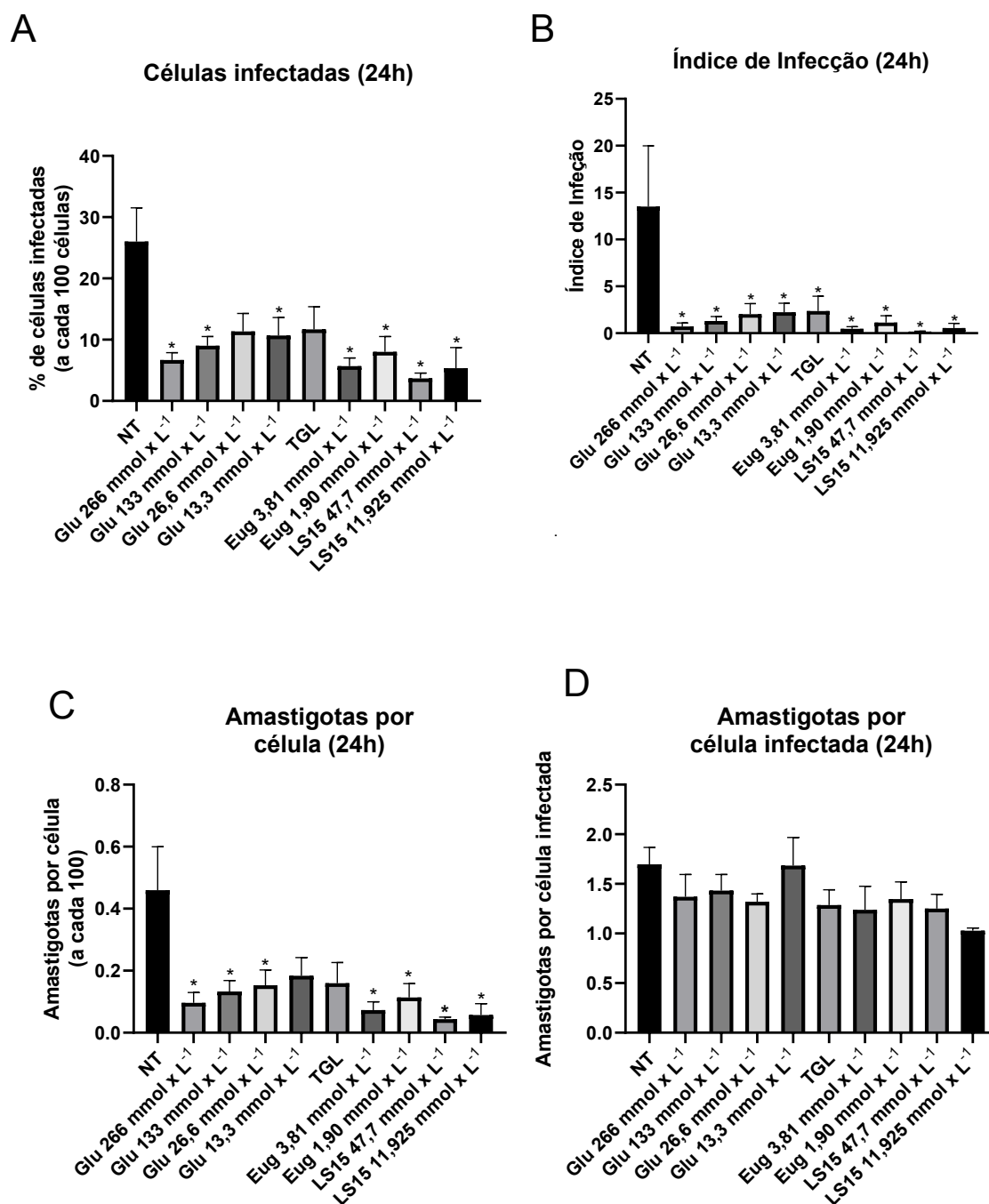
Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados todos os grupos de eugenol e LS15 em relação à maior concentração de Glucantime® (266 mmol x L⁻¹).

5.2.4. Número de formas amastigotas por macrófago infectado

Para os grupos analisados, não houve diferença de número de amastigotas por macrófagos infectados em relação ao grupo controle não tratado, apesar do grupo LS15 ($11,925 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$) ter apresentado a maior redução em média entre os grupos (Figura 5D).

Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados todos os grupos de eugenol e LS15 em relação à maior concentração de Glucantime® ($266 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$).

Figura 5 – Gráficos de avaliação da infecção de macrófagos por *Leishmania (L.) amazonensis*, tratados por 24 horas com eugenol ou LS15



Nota: Macrófagos RAW 264.7 foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* e expostos aos tratamentos com os diferentes compostos por 24 horas, conforme descrito na metodologia. **(A)** Percentual de células infectadas; **(B)** Índice de infecção; **(C)** Número de formas amastigotas por macrófago; **(D)** Número de formas amastigotas por macrófago infectado. Os gráficos representam a média e o erro padrão da média (SEM) de três experimentos independentes reunidos. ANOVA unidirecional post-hoc Turkey foi utilizada para comparação dos dados. * $p < 0,05$ em relação ao grupo não tratado. **MØ** = macrófago; **NT** = não tratado; **Glu** = Glucantime®; **TGL** = triglicérides; **Eug** = eugenol.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.3. Ensaio de citotoxicidade em formas amastigotas de *L. amazonensis* internalizadas em macrófagos – 48 horas de tratamento

5.3.1. Porcentagem de macrófagos infectados

Em relação ao grupo não tratado, os tratamentos com Glucantime® (266 mmol x L⁻¹), eugenol (1,90 e 3,8125 mmol x L⁻¹) e LS15 (11,925 e 47,7 mmol x L⁻¹) apresentaram redução na porcentagem de células infectadas em relação ao grupo não tratado (Figura 5A). Os grupos Glucantime® (26,6 e 133 mmol x L⁻¹) e triglicérides, apesar de não demonstrarem redução estatisticamente significativa em relação ao grupo não tratado, apresentaram redução em média do percentual de células infectadas, em torno de 50% (Figura 6A).

Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados todos os grupos de eugenol e LS15 em relação à maior concentração de Glucantime® (266 mmol x L⁻¹).

5.3.2. Índice de infecção

Houve redução do índice de infecção em todos os grupos quando relacionados ao controle negativo não tratado (Figura 6B).

Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados todos os grupos de eugenol e LS15 em relação à maior concentração de Glucantime® (266 mmol x L⁻¹).

5.3.3. Número de formas amastigotas por macrófago

Todos os grupos de compostos de tratamento com eugenol (1,90 e 3,8125 mmol x L⁻¹) e LS15 (11,925 e 47,7 mmol x L⁻¹) e as duas maiores concentrações de Glucantime® (133 e 266 mmol x L⁻¹) apresentaram redução estatisticamente significativa no número de amastigotas por macrófago em relação ao grupo controle não tratado (Figura 6C). Apesar da redução não ter sido considerada estatisticamente significativa, observa-se diferença entre a média do grupo triglicérides (TGL) e a do grupo não tratado, com redução de aproximadamente 57% na taxa de amastigotas por célula (Figura 5C).

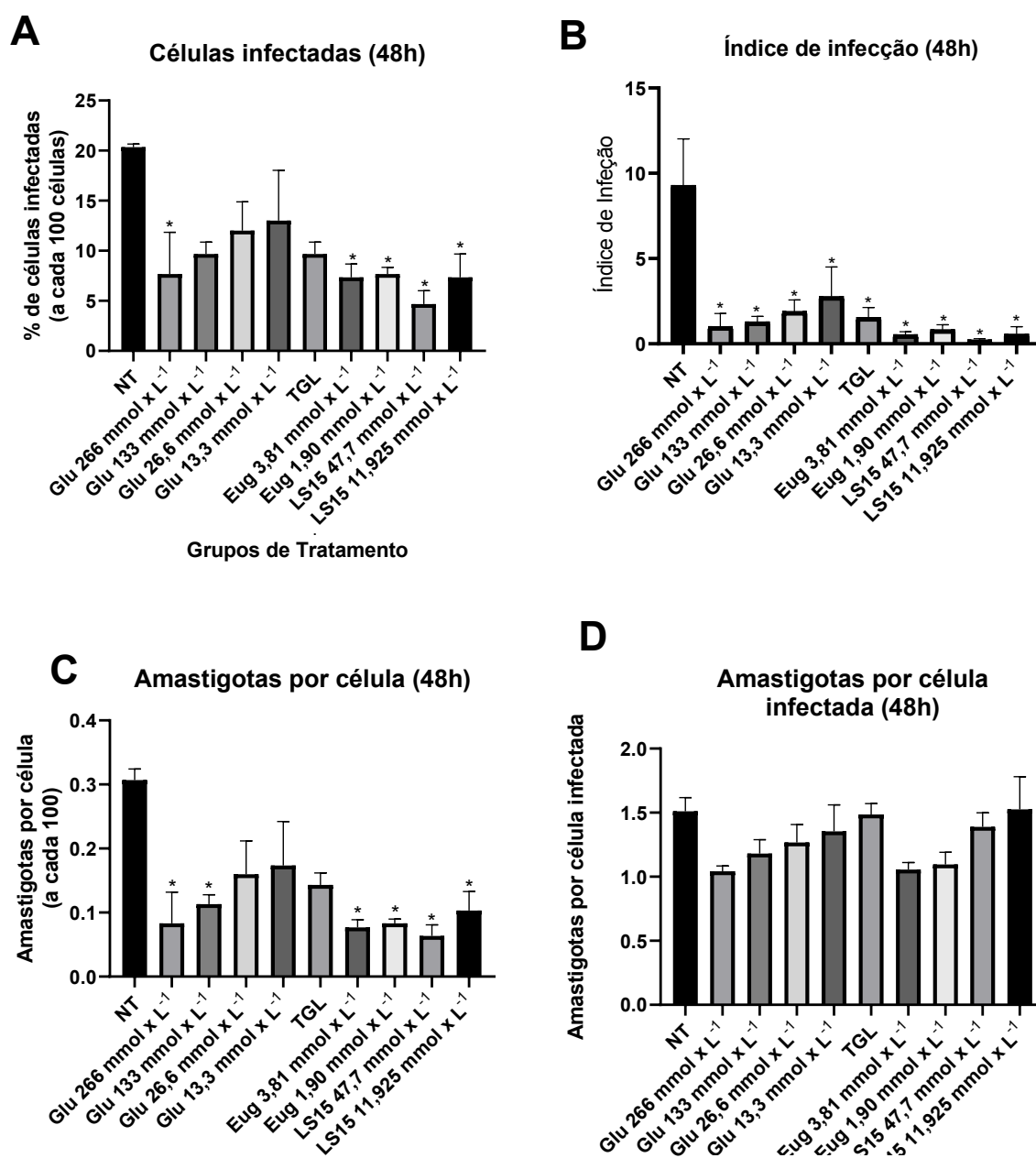
Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados todos os grupos de eugenol e LS15 em relação à maior concentração de Glucantime® (266 mmol x L⁻¹).

5.3.4. Número de formas promastigotas por macrófago infectado

Os outros grupos analisados não apresentaram diferenças em relação ao grupo controle não tratado (Figura 6D).

Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados todos os grupos de eugenol e LS15 em relação à maior concentração de Glucantime® (266 mmol x L⁻¹).

Figura 6 – Avaliação da infecção de macrófagos por *Leishmania (L.) amazonensis*, tratados por 48 horas com eugenol ou LS15



Notas: Macrófagos RAW 264.7 foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* e expostos aos tratamentos com os diferentes compostos por 48 horas, conforme descrito na metodologia. **(A)** Percentual de células infectadas; **(B)** Índice de infecção; **(C)** Número de formas amastigotas por macrófago; **(D)** Número de formas amastigotas por macrófago infectado. Os gráficos representam a média e o erro padrão da média (SEM) de três experimentos independentes reunidos. ANOVA unidirecional post-hoc Turkey foi utilizada para comparação dos dados. * $p < 0,05$ em relação ao grupo não tratado. **MØ** = macrófago; **NT** = não tratado; **Glu** = Glucantime® **TGL** = triglicérides; **Eug** = eugenol.

Fonte: Elaborado pela autora.

6. DISCUSSÃO

É conhecido que macrófagos possuem um papel dicotômico na infecção por *Leishmania*. Além de atuarem no controle da carga parasitária, eles são as principais células hospedeiras das formas infectantes (amastigotas) do parasito, e seu acúmulo no local de lesão após recrutamento por quimiocinas produzidas durante o processo de infecção pode agravar o perfil lesional pela produção de fatores pró-inflamatórios (Goto; Mizobuchi, 2023). Entretanto, apesar de apresentarem evidente correlação com a evolução inflamatória da doença, a diminuição significativa da quantidade dessas células não é desejável por também possuírem papel efetor contra parasitos do gênero *Leishmania* por intermédio de mecanismos pró-oxidativos decorrentes, por exemplo, da produção de óxido nítrico (Reverte; Snäkä; Fasel, 2022). Portanto, a questão inicial para a testagem dos compostos era se estes apresentariam níveis citotóxicos consideráveis para os macrófagos e se essas células, tendo em vista sua importância biológica no processo de infecção no alojamento das formas infectantes de *Leishmania*, comunicação com outras células do sistema imunológico e produção de fatores pró-inflamatórios, manteriam sua viabilidade acima de 80% (Almeida et al., 2023; Carneiro et al., 2021).

Nos ensaios de viabilidade celular utilizando o fármaco Glucantime[®], a detecção da redução não significativa de viabilidade dos macrófagos na presença das concentrações de 13,3, 26,6, 133 e 266 mmol x L⁻¹ do medicamento nos períodos de 24 e 48 horas (Figura 1 – A e B) permitiu a utilização dessas mesmas dosagens em posteriores infecções *in vitro* em grupo de tratamento como fármaco-controle. Os antimoniais pentavalentes, espectro de medicamentos ao qual o Glucantime[®] pertence, são conhecidos por causarem efeitos colaterais em pacientes, tais como toxicidade renal, hepática, inflamações locais, dores na aplicação, náuseas e vômitos, o que leva até mesmo à interrupção do tratamento (Kato et al., 2014b; Masmoudi et al., 2005; Moreira et al., 2015). Além disso e do aumento de resistência de parasitos do gênero *Leishmania* às drogas em uso em todo o mundo, a toxicidade promovida pelos antimoniais pentavalentes pode incluir toxicidade aos macrófagos e prejudicar a resposta imune por estes promovida durante infecção por *Leishmania* (Noletto; Petkowicz; Mercê, 2015). Pritsch (2015), ao testar a exposição de macrófagos murinos à concentração de 300 µg x mL⁻¹ (798 mmol x L⁻¹) em período de 24 horas detectou, com o mesmo tipo de ensaio de viabilidade (MTT), diminuição da viabilidade celular

(cerca de 78%). Portanto, concentrações menores e diferentes de Glucantime® (13,3, 26,6, 133 e 266 mmol x L⁻¹) testadas neste presente trabalho foram mantidas para a realização dos testes posteriores. Todas essas considerações são, inclusive, justificativas para a busca de novas alternativas de tratamento eficaz, menos tóxico para as células do paciente e que sejam de fácil aplicação.

Tanto eugenol quanto LS15 apresentaram, em algumas de suas concentrações, perfis que viabilizam sua utilização por manterem a taxa de viabilidade das células satisfatória em relação ao controle não tratado. Na avaliação do perfil de citotoxicidade do eugenol (concentrações de 0,953125 a 122 mmol x L⁻¹) após 24h de incubação com os macrófagos, sem considerar o grupo tratado com eugenol a 2%, as concentrações de 15,25 a 61 mmol x L⁻¹ evidenciaram perfis citotóxicos aos macrófagos (Figura 2A). Os grupos tratados com 0,953125, 1,90 e 3,8125 mmol x L⁻¹ de eugenol não apresentaram redução significativa da viabilidade de macrófagos em relação ao grupo não tratado, configurando a possibilidade de utilização de tais concentrações sem prejuízo às células no prosseguimento dos estudos (Figura 3A). Perfil semelhante foi encontrado quando o tempo de incubação foi de 48h, porém o grupo de 7,625 mmol x L⁻¹ apresentou evidência de citotoxicidade às células (Figura 3B). Estudos já mostraram a capacidade do eugenol de direcionar a diferenciação de macrófagos para o padrão M2, promovendo a redução de eventos inflamatórios durante as infecções, ao passo que reduz a chance de danos teciduais e celulares e aprimora a taxa de reparos a eventuais danos resultantes da inflamação (Chniguir et al., 2024; Pires Costa et al., 2025). A partir dos testes de 24 e 48h de incubação com o eugenol, foram definidas as concentrações de 0,953125, 1,90 e 3,8125 mmol x L⁻¹ para o teste em infecção *in vitro*, tendo em vista que não foram altamente citotóxicos ao modelo de células (MØ RAW 264.7).

LS15 testado nas concentrações de 1,490625 a 47,7 mmol x L⁻¹ não prejudicou a viabilidade das células, pelo contrário, apresentou sutis aumentos nas médias de absorbância em comparação com o grupo não tratado (Figura 4 – A e B).

Como nenhuma concentração do composto apresentou citotoxicidade para macrófagos, a primeira e a terceira maior concentração (47,7 e 11,925 mmol x L⁻¹, respectivamente) foram escolhidas para a testagem de tratamento em infecção *in vitro*.

Quando os macrófagos foram tratados por 24h, houve diminuição do número de células infectadas em todos os grupos de células tratadas com eugenol ou com LS15 em relação ao grupo não tratado (Figura 5A). O mesmo foi observado quando os macrófagos foram tratados por 48h (Figura 6A). Esses resultados indicam que ambos os compostos exercem ação anti*Leishmania* contra formas amastigotas, o que pode ser importante para o uso desses compostos em formulações para tratamento de lesões já estabelecidas. Estudos descrevem o potencial do eugenol de promover ações anti-inflamatórias, com produção de citocinas reguladoras relacionadas a esse perfil e com diminuição de expressão de marcadores de estresse oxidativo (Barbosa-de-Oliveira et al., 2023; Gulec Peker; Kaltalioglu, 2021). No contexto de infecção por *Leishmania*, tal perfil pode se tornar um fator favorável à sobrevivência do parasito, contudo, alguns de seus derivados podem induzir disfunções mitocondriais capazes de levar os parasitos à morte (Evangelista et al., 2023; Rani et al., 2024a). Assim, apesar da capacidade imunomoduladora anti-inflamatória conhecida do eugenol em macrófagos, o grupo oleil, integrante da cadeia sintética do LS15, pode atuar como pró-farmaco da cadeia de eugenol a qual está ligado. Esse fenômeno, somado à capacidade do eugenol de gerar danos às *Leishmania*, pode se apresentar como um mecanismo compensatório ao possível efeito anti-inflamatório do eugenol para os macrófagos.

É importante observar que houve redução da média de células infectadas no grupo do diluente triglicérides (Figuras 5A e 6A) que, apesar de não estatisticamente significativa em relação ao controle não tratado, sugere ação deste composto sobre a infecção. Entretanto, a partir de estudos com *Leishmania infantum*, a ação dos triglicérides e seu acúmulo intracelular em macrófagos pode possuir dependência em relações parasito-hospedeiro específicas para se tornar eficaz ou não contra patógenos (Rodríguez et al., 2017). Portanto, o potencial leishmanicida desse componente, sobretudo sobre *Leishmania amazonensis*, ainda requer de testagens mais robustas. O triglicérides foi selecionado como diluente para os estudos *in vitro*, pois o eugenol e seus derivados são compostos de natureza oleosa hidrofóbica. De acordo com a configuração química do grupo dos triglicérides, ao mesmo tempo que a presença de cadeias longas e consideráveis níveis de insaturação possam configurar hidrofobicidade, a disposição de seus ácidos graxos na cadeia glicerol permitem certa solubilidade em água (Yang et al., 2024). Portanto, isso favoreceu a solubilização dos compostos em suas respectivas soluções-estoque e a

homogeneização no meio de cultura. Triglicerídeos e outros grupos de lipídios em quadros inflamatórios como os de aterosclerose podem ser fatores de indução para a proliferação de macrófagos e sua diferenciação em seu subtipo pró-inflamatório (M1) (Kim et al., 2016; Liu et al., 2022; Yui; Yamazaki, 1989). Dessa maneira, de forma inesperada, o diluente, quando adicionado aos compostos, pode ter tido ação potencializadora ou sinérgica para o eugenol contra a infecção por *L. amazonensis*.

O índice de infecção é um parâmetro numérico que permite verificar o nível de infecção em células a partir de cálculos utilizando o número de amastigotas contadas, células totais contadas e percentual de células infectadas. Tanto para tratamento dos macrófagos 24h quanto por 48h, houve diminuição do índice de infecção em todos os grupos de células tratadas relação ao grupo não tratado (Figura 5B e 6B). Esse resultado sugere a possibilidade do LS15 ser um composto capaz de inibir a capacidade infectante de tais parasitos no principal grupo de células-alvo, seja pela ação do próprio composto ou de sua combinação com o triglicérides. Mais uma vez é importante destacar a ação do triglicérides, que, mesmo administrado isoladamente, levou à diminuição do índice de infecção, o que corrobora o resultado anterior relacionado com sua influência na porcentagem de células infectadas.

A quantidade de formas amastigotas por macrófago é outro parâmetro para determinar a abrangência da infecção no total de células contadas. Em ambos os experimentos de 24 e 48 horas de tratamento, os compostos testados apresentaram considerável redução em relação ao grupo controle não tratado. Portanto, é considerável que os compostos foram capazes de reduzir a capacidade de disseminação da infecção para outras células, característica que pode indicar a contenção da infecção a um determinado perímetro em casos de lesões pela baixa ou ineficiente mobilidade dos parasitos entre as células-alvo (Sarkar et al., 2018). Mais uma vez, corroborando os resultados obtidos para porcentagem de células infectadas e índice de infecção, o grupo tratado com triglicérides apresentou, em média, redução de mais de 50% no número de amastigotas por célula.

Em relação ao número de formas amastigotas por macrófago infectado, para ambos os períodos de tratamento e diferentemente dos padrões observados na análise anterior, não houve diferença entre os diferentes grupos analisados. De outro modo, isso quer dizer que a capacidade de sobrevivência nas células já comprometidas não foi reduzida. Cargas parasitárias elevadas em macrófagos podem ser um fator para a continuidade da infecção. Como principais consequências, estão

a lise precoce das células hospedeiras que favorece o desenvolvimento de quadros crônicos ou recidivos, além da ativação de vias de sinalização pró-apoptóticas por estresse devido à competição por recursos metabólicos e liberação de antígenos patogênicos altamente imunorreativos, que podem levar a danos teciduais severos (Al-Khalaifah, 2022; Chang et al., 2003; Moreira et al., 2015).

Um dos poucos impasses encontrados para a utilização do LS15 a partir dos testes realizados é relativo às quantidades necessárias para o tratamento. Enquanto nos grupos de testagem do eugenol se fazem necessárias menores concentrações, para o LS15 estas são um pouco maiores. Isso pode se apresentar como um fator de encarecimento para futuros produtos-finais no desenvolvimento de possíveis tratamentos, tendo em vista que, enquanto o eugenol apresenta maior facilidade de obtenção, o LS15 requer de maior processamento, pois se trata de um composto sintético.

Dados da literatura mostram a capacidade do eugenol de direcionar a diferenciação de macrófagos para o padrão M2, promovendo a redução de eventos inflamatórios durante as infecções, ao passo que reduz a chance de danos teciduais e celulares e aprimora a taxa de reparos a eventuais danos resultantes da inflamação (Chniguir et al., 2024; Pires Costa et al., 2025). Tal apontamento demonstra, além dos dados apresentados, o potencial da utilização do eugenol e seus derivados no prosseguimento dos estudos *in vitro* e principalmente *in vivo* em quadros de LC.

A utilização do derivado sintético LS15 e outros compostos promissores com ação leishmanicida viabiliza o desenvolvimento de tratamentos alternativos para LC. A realização do estudo em questão visa, em perspectivas futuras, o desenvolvimento de tratamentos tópicos para a doença, tais como a produção de pomadas, cremes, hidrogeis, tinturas e bálsamos. A utilização de tratamentos tópicos viabiliza a redução de efeitos tóxicos e de exposição sistêmicos já conhecidos devido ao direcionamento direto à área-alvo do tratamento (Thilagam et al., 2025). Além disso, no caso das leishmanioses, o desenvolvimento de formulações tópicas podem permitir a administração própria pelos pacientes, o que reduz a necessidade de visitas ao ambiente hospitalar. Isso, como consequência, pode melhorar a adesão ao tratamento e reduzir a frequência de tratamentos intralesionais dolorosos (De Lima et al., 2023; Severino et al., 2022).

Em resumo, exceto pelas taxas de amastigotas por macrófago infectado (24 e 48h), todos os grupos de interesse testados apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo não tratado para ambos os períodos de incubação. Um importante destaque se dá em relação às concentrações milimolares ($\text{mmol} \times \text{L}^{-1}$) de eugenol ($3,81 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$) e LS15 ($47,7 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$) em relação à maior concentração de Glucantime[®] ($266 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$), a concentração de eugenol aproximadamente 70 vezes menor e a do LS15, seis. Isso, em outras palavras, significa a necessidade de menores concentrações para um efeito semelhante ou até mesmo mais eficazes que a droga controle, também evidenciado pela ausência de significância estatística entre tais grupos. Apesar da concentração de eugenol ser evidentemente menor para vias de efeito anti-*Leishmania*, a utilização do composto LS15, devido às características químicas evidenciadas, além de evidente efeito promissor, possivelmente apresenta maior biocompatibilidade e possibilidade de utilização em maiores concentrações tendo em vista seu baixo potencial citotóxico.

Uma discussão importante, além das evidências previamente descritas, é a de como ocorre a ação do LS15 no meio intracelular: i. a existência de esterases citoplasmáticas e a possibilidade de clivagem a partir da esterificação presente entre a cadeia do grupo eugenol e a cadeia oleil, sendo esta última a porção da molécula responsável pelo mecanismo de pró-fármaco. Essa clivagem, a partir desse grupo enzimático, permitiria a liberação do grupo eugenol no meio intracelular; ii. a composição da membrana do vacúolo em que se localizam as formas amastigotas ser semelhante à da membrana plasmática devido ao mecanismo de fagocitose, o que também poderia facilitar a entrada do LS15. Esses e outros mecanismos detêm da futura necessidade de investigação para sua respectiva comprovação, contestação ou descoberta de outras possibilidades metabólicas que viabilizam o efeito anti-*Leishmania* do eugenol e seus derivados.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos realizados neste trabalho abrangeram aspectos *in vitro* da performance do eugenol e, especificamente, de um de seus derivados, o LS15, com testagens relativas a seus potenciais de citotoxicidade nas células hospedeiras (macrófagos) e em formas amastigotas internalizadas. Para melhor avaliação dos perfis desses compostos ainda *in vitro*, outros testes podem ser realizados para a seleção de critérios para aplicação *in vivo*, tais como a dosagem de óxido nítrico (NO) e outras espécies relacionadas ao estresse oxidativo. Além disso, podem ser realizados testes em formas promastigotas para observação da resposta nas duas diferentes formas dos parasitos, em modelo de infecção *in vitro* após períodos de incubação mais longos de formas amastigotas e em amastigotas axênicas. Por fim, este estudo atua como um iniciador para perspectivas futuras em testagens para LC, com ênfase na produção de fármacos alternativos aos antimoniais pentavalentes, tais como o desenvolvimento de cremes, pomadas, hidrogéis e tônicos, que tendem a tornar o tratamento mais acessível, menos tóxico e de menor custo para a população.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOLI, Amir; MASPI, Nahid; GHAFARIFAR, Fatemeh. **Wound healing in cutaneous leishmaniasis: A double edged sword of IL-10 and TGF- β .** *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* Elsevier Ltd. 1 abr. 2017.
- ABDOU, A. *et al.* **Recent advances in chemical reactivity and biological activities of eugenol derivatives.** *Medicinal Chemistry Research* Springer. 1 maio 2021.
- AKHOUNDI, Mohammad *et al.* **A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies.** *PLoS Neglected Tropical Diseases* Public Library of Science. 3 mar. 2016.
- AL-KHALAIFAH, Hanan S. **Major Molecular Factors Related to Leishmania Pathogenicity.** *Frontiers in Immunology.* 13 jun. 2022.
- ALMEIDA, Fernanda Silva *et al.* **Leishmaniasis: Immune Cells Crosstalk in Macrophage Polarization.** *Tropical Medicine and Infectious Disease.* 15 maio 2023.
- AUGUSTO, André *et al.* **Targeting Trypanothione Synthetase and Trypanothione Reductase: Development of Common Inhibitors to Tackle Trypanosomatid Disease.** *Pharmaceuticals* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). 1 ago. 2025.
- BAMOROVAT, Mehdi *et al.* **Poor adherence is a major barrier to the proper treatment of cutaneous leishmaniasis: A case-control field assessment in Iran.** *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance.* 1 abr. 2023.
- BARBOSA-DE-OLIVEIRA, Maria Clara *et al.* **Modulation of Alveolar Macrophage Activity by Eugenol Attenuates Cigarette-Smoke-Induced Acute Lung Injury in Mice.** *Antioxidants.* 11 jun. 2023.
- BELLALI, Hedia *et al.* **Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis Prevalence Among Farmers in Central Tunisia, 2014.** *Journal of Agromedicine.* 3 jul. 2017.
- BENNIS, Issam *et al.* **Psychosocial burden of localised cutaneous Leishmaniasis: A scoping review.** *BMC Public Health* BioMed Central Ltd. 15 mar. 2018.
- BERBERT, Taisa Rocha Navasconi *et al.* **Pentavalent Antimonials Combined with Other Therapeutic Alternatives for the Treatment of Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review.** *Dermatology Research and Practice.* 24 dez. 2018.
- BERNARDES, L. S. C.; ZANI, C. L.; CARVALHO, I. **Trypanosomatidae Diseases: From the Current Therapy to the Efficacious Role of Trypanothione Reductase in Drug Discovery.** *Current Medicinal Chemistry.* 1 maio 2013.
- BERRY, Isha; BERRANG-FORD, Lea. **Leishmaniasis, conflict, and political terror: A spatio-temporal analysis.** *Social Science and Medicine.* 1 out. 2016.

BEYAZGÜL, Burcu *et al.* **Reasons of abandonment treatment in patients with leishmaniasis.** Eskişehir Türk Dünyası Uygulama ve Araştırma Merkezi Halk Sağlığı Dergisi. Nov. 2024.

BRITTINGHAM, Andrew *et al.* **Interaction of *Leishmania* gp63 with Cellular Receptors for Fibronectin.** Infection and Immunity. Set. 1999.

CARNEIRO, M. B. *et al.* **Regulation of macrophage subsets and cytokine production in leishmaniasis.** Cytokine. Nov. 2021.

CARVALHO, Augusto M. *et al.* **In Situ versus Systemic Immune Response in the Pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis.** Pathogens. 1 mar. 2024.

CHANG, Kwang-Poo *et al.* **Leishmania model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity.** Acta Tropica. Mar. 2003.

CHARAN RAJA, Mamilla R. **Versatile and Synergistic Potential of Eugenol: A Review.** Pharmaceutica Analytica Acta. 2015.

CHARAN RAJA, Mamilla R. *et al.* **Eugenol derived immunomodulatory molecules against visceral leishmaniasis.** European Journal of Medicinal Chemistry. out. 2017a.

CHARAN RAJA, Mamilla R. *et al.* **Eugenol derived immunomodulatory molecules against visceral leishmaniasis.** European Journal of Medicinal Chemistry. 20 out. 2017b.

CHARAN RAJA, Mamilla R. *et al.* **Eugenol derived immunomodulatory molecules against visceral leishmaniasis.** European Journal of Medicinal Chemistry. 20 out. 2017c.

CHNIGUIR, Amina *et al.* **Eugenol Inhibits Neutrophils Myeloperoxidase In Vitro and Attenuates LPS-Induced Lung Inflammation in Mice.** Pharmaceuticals. 15 abr. 2024.

COUTINHO, João Victor Soares Coriolano *et al.* **Visceral leishmaniasis and Leishmaniasis-HIV coinfection: Comparative study.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 1 set. 2017.

DE LIMA, Sarah Kymberly Santos *et al.* **Therapeutic Activity of a Topical Formulation Containing 8-Hydroxyquinoline for Cutaneous Leishmaniasis.** Pharmaceutics. 8 nov. 2023.

DE PABLOS, L. M.; FERREIRA, T. R.; WALRAD, P. B. **Developmental differentiation in *Leishmania* lifecycle progression: post-transcriptional control conducts the orchestra.** Current Opinion in Microbiology Elsevier Ltd. 1 dez. 2016.

DEVSANI, Namrata; VEMULA, Divya; BHANDARI, Vasundhra. **The glycoprotein gp63– a potential pan drug target for developing new antileishmanial agents.** BiochimieElsevier B.V. 1 abr. 2023.

DEY, R. *et al.* **Induction of Host Protective Th1 Immune Response by Chemokines in *Leishmania donovani* -infected BALB/ c Mice.** Scandinavian Journal of Immunology. 14 dez. 2007.

EGUI, Adriana *et al.* **Phenotypic and Functional Profiles of Antigen-Specific CD4+ and CD8+ T Cells Associated With Infection Control in Patients With Cutaneous Leishmaniasis.** Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 19 nov. 2018.

ESPADA, Caroline R. *et al.* **Identification of *Leishmania (Viannia)* species and clinical isolates of *Leishmania amazonensis* from Brazil using PCR-RFLP of the heat-shock protein 70 gene reveals some unexpected observations.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 1 ago. 2018.

EVANGELISTA, Roberta *et al.* **Synthesis and Evaluation of the Antileishmanial Activity of Novel Eugenol Analogs Containing 1,2,3-Triazole Fragments against Intracellular *Leishmania braziliensis*.** Journal of the Brazilian Chemical Society. 2023.

FARUQ, Ahmad; IBRAHIM, Ibrahim. **Comprehensive Overview of Eugenol: Focusing on Sources, Structure, Pharmacological Activities, Mechanisms of Action, Safety Profile, and Applications.** Journal of Drug Design and Medicinal Chemistry. 13 Set. 2025.

FELLER, Liviu; LEMMER, Johan; KHAMMISSA, Razia Abdool Gafaar. **Is noma a neglected/overlooked tropical disease?** Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2 out. 2022.

FLOHÉ, L.; HECHT, H. J.; STEINERT, P. **Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism.** Free Radical Biology and Medicine. Nov. 1999.

FORESTIER, Claire Lise; GAO, Qi; BOONS, Geert Jan. ***Leishmania lipophosphoglycan*: How to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate?** Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 1 abr. 2014.

FRAGA, Jorge *et al.* **Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene.** Infection, Genetics and Evolution. Mar. 2010.

FRAGA, Jorge *et al.* **Evolution and species discrimination according to the *Leishmania* heat-shock protein 20 gene.** Infection, Genetics and Evolution. Ago. 2013.

FRANCO, Luis H.; BEVERLEY, Stephen M.; ZAMBONI, Dario S. **Innate immune activation and subversion of mammalian functions by *Leishmania lipophosphoglycan*.** Journal of Parasitology Research. 2012.

FRÉZARD, Frédéric; DEMICHELI, Cynthia; RIBEIRO, Raul R. **Pentavalent antimonials: New perspectives for old drugs.** *Molecules*. Jul. 2009.

GARCÍA-DAVIS, Sara *et al.* **Laurequinone, a Lead Compound against Leishmania.** *Marine Drugs*. 1 jun. 2023.

GANGULI, Piyali *et al.* **Identification of Th1/Th2 regulatory switch to promote healing response during leishmaniasis: a computational approach.** *Journal on Bioinformatics and Systems Biology*. 1 dez. 2015.

GIORGIONE, Jennifer R.; TURCOT, Salvatore J.; EPAND, Richard M. **Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from Leishmania donovani (sucrose-loaded vesicles/membrane partitioning/protein kinase C activation/enzyme kinetics).** *Hungarian Academy of Sciences*. 15 out. 1996.

GONÇALVES, Nelson Veiga *et al.* **Cutaneous leishmaniasis: Spatial distribution and environmental risk factors in the state of Pará, Brazilian Eastern Amazon.** *Journal of Infection in Developing Countries*. 1 out. 2019a.

GONÇALVES, Nelson Veiga *et al.* **Cutaneous leishmaniasis: Spatial distribution and environmental risk factors in the state of Pará, Brazilian Eastern Amazon.** *Journal of Infection in Developing Countries*. 1 out. 2019b.

GONZÁLEZ-MONTERO, María Cristina *et al.* **Targeting Trypanothione Metabolism in Trypanosomatids.** *Molecules Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. 1 maio 2024.

GOTO, Yasuyuki; MIZOBUCHI, Haruka. **Pathological roles of macrophages in Leishmania infections.** *Parasitology International*. Jun. 2023.

GULEC PEKER, Emine Gulceri; KALTALIOGLU, Kaan. **Cinnamaldehyde and eugenol protect against LPS-stimulated oxidative stress and inflammation in Raw 264.7 cells.** *Journal of Food Biochemistry*. 22 dez. 2021.

HACHIM, Ahmad Khadhim Khadhim; SHAWI, Hassan. **Biological Activity of Eugenol Acetate as Antibacterial and Antioxidant Agent, Isolation from *Myrtus communis* L. Essential Oil.** *International Journal of Bioengineering & Biotechnology*. 13 set. 2016.

HAILESELASSIE, Binega; ZERIHUN, Zenawi; MULUGETA, Afeworki. **Stigma, perception, and lived realities: An ethnographic study of cutaneous leishmaniasis in rural Ethiopia.** 5 ago. 2025.

HAZRA, Raghunath; RAJA MR, Charan; MAHAPATRA, Santanu Kar. **A brief report on eugenol oleate is an oral immunomodulatory molecule against visceral leishmaniasis.** *Indian journal of physiology and allied sciences*. 28 jun. 2023.

HAZRA, Satakshi; PATRA, Sanjukta. **Alleviating the Neglected Tropical Diseases: Recent Developments in Diagnostics and Detection.** *Current Topics in Medicinal*

Chemistry. 6 dez. 2018.

HERRERA, Giovanni *et al.* **An interactive database of Leishmania species distribution in the Americas.** Scientific Data. 1 dez. 2020.

HONÓRIO, Isabel de Melo Honório *et al.* **Qualidade de vida em pessoas com leishmaniose cutânea.** Revista Brasileira em Promoção da Saúde, 30 set. 2016.

HOTEZ, Peter J. **The rise of leishmaniasis in the twenty-first century.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene Oxford University Press. 1 set. 2018.

HU, Chen *et al.* **Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities.** MedComm John Wiley and Sons Inc. 1 set. 2022.

ISLAMUDDIN, Mohammad *et al.* **Immunotherapeutic Potential of Eugenol Emulsion in Experimental Visceral Leishmaniasis.** PLoS Neglected Tropical Diseases. 24 out. 2016.

ISTANBULLU, Huseyin; BAYRAKTAR, Gulsah. **Toward New Antileishmanial Compounds: Molecular Targets for Leishmaniasis Treatment.** *In: Leishmaniasis - General Aspects of a Stigmatized Disease.* [S.l.]: IntechOpen. 2022.

JUSTIZ-VAILLANT, Angel Alberto *et al.* **Unraveling the Immune Response Dynamics of Leishmaniasis: Insights, Challenges, and Vaccine Development.** 28 jun. 2024.

KARAJA, Saja *et al.* **Cutaneous leishmaniasis mimicking psoriasis: A case report.** Clinical Case Reports. 2024.

KAR, Amrita *et al.* **Synergic effect of eugenol oleate with amphotericin B augments anti-leishmanial immune response in experimental visceral leishmaniasis *in vitro* and *in vivo*.** International Immunopharmacology. 1 fev. 2021.

KATO, Kelly C. *et al.* **Hepatotoxicity of pentavalent antimonial drug: Possible role of residual sb(3) and protective effect of ascorbic acid.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Jan. 2014a.

KATO, Kelly C. *et al.* **Hepatotoxicity of Pentavalent Antimonial Drug: Possible Role of Residual Sb(III) and Protective Effect of Ascorbic Acid.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. jan. 2014b.

KELLER, Anna. **A review on heat shock proteins (HSP70 and HSP90) in protein folding and stress response.** International Journal of Molecular Biology and Biochemistry. 1 jan. 2025.

KILLICK-KENDRICK, R. **Phlebotomine vectors of the leishmaniases: a review.** Medical and Veterinary Entomology. 28 jan. 1990.

KIM, Hyun-Kyung *et al.* **Triglyceride Regulates the Expression of M1 and M2 Macrophage-specific Markers in THP-1 Monocytes.** Biomedical Science Letters. 31 dez. 2016.

LINDOSO, José Angelo Lauletta *et al.* **Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: Current perspectives.** HIV/AIDS - Research and Palliative CareDove Medical Press Ltd. 2018.

LIU, Xinbo *et al.* **The Correlation between the Inflammatory Effects of Activated Macrophages in Atherosclerosis and Aortic Dissection.** Annals of Vascular Surgery. set. 2022.

LOPEZ-JARAMILLO, P. *et al.* **Treatment of cutaneous leishmaniasis with nitric-oxide donor.** The Lancet. abr. 1998.

LU, Chao *et al.* **Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in children of Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan.** Tropical Medicine and International Health. 1 jul. 2024.

MACHADO, Carolina Angélica Libório *et al.* **Epidemiological profile and lethality of visceral leishmaniasis/human immunodeficiency virus co-infection in an endemic area in Northeast Brazil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2021.

MAKARANI, Naureenbanu *et al.* **Leishmaniasis: A multifaceted approach to diagnosis, maladies, drug repurposing and way forward.** Microbe (Netherlands). Elsevier B.V. 1 mar. 2025.

MALLICK, Suvadip *et al.* **Protective Therapy with Novel Chromone Derivative against *Leishmania donovani* infection Induces Th1 Response *in vivo*.** Chemotherapy. 2011.

MANTA, Bruno *et al.* **Trypanothione: A unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids.** Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects. maio 2013.

MARQUES, Sílvio Alencar *et al.* **American tegumentary leishmaniasis: Severe side effects of pentavalent antimonial in a patient with chronic renal failure.** Anais Brasileiros de Dermatologia. 1 maio 2019.

MARTINS, Thaís Viana Fialho *et al.* **Lipophosphoglycan 3 from *Leishmania infantum chagasi* binds heparin with micromolar affinity.** Bioinformatics and Biology Insights. 2018.

MASMOUDI, A. *et al.* **Glucantime® par voie parentérale: bénéfice versus toxicité.** Médecine et Maladies Infectieuses. Jan. 2005.

MASPI, Nahid; ABDOLI, Amir; GHAFFARIFAR, Fathemeh. **Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review.** Pathogens and Global HealthTaylor and Francis Ltd.17 ago. 2016.

MAURÍCIO, Isabel L. *Leishmania* taxonomy. *In: The Leishmaniases: Old Neglected Tropical Diseases. [S.l.]*: Springer International Publishing. 2018.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. **Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment.** QJM: An International Journal of Medicine. 1 jan. 2014.

MERDEKIOS, Behailu *et al.* **Unveiling the hidden burden: Exploring the psychosocial impact of cutaneous leishmaniasis lesions and scars in southern Ethiopia.** PLoS ONE. 1 fev. 2025.

MERZLYAK, Ekaterina *et al.* **Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: Polyphyly of Leptomonas and Blastocrithidia.** Journal of Eukaryotic Microbiology. 2001.

MOHAMMADI NEJAD, Solmaz; ÖZGÜNEŞ, Hilal; BAŞARAN, Nurşen. **Öjenolün farmakolojik ve toksikolojik özellikleri.** Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences Turkish Pharmacists Association. 2017.

MOHEBALI, Mehdi. **Visceral leishmaniasis in Iran: Review of the Epidemiological and Clinical Features.** Iranian J Parasitol. Jul-set 2013

MONTALVO, A. M. *et al.* **Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: A universal simple tool for Leishmania species discrimination in the New and Old World.** Parasitology. 2010.

MORALES-PRIMO, Abraham U. *et al.* **Th17 Cell and Inflammatory Infiltrate Interactions in Cutaneous Leishmaniasis: Unraveling Immunopathogenic Mechanisms.** Immune Network. 2024.

MOREIRA, Diana *et al.* **Leishmania infantum modulates Host Macrophage Mitochondrial Metabolism by Hijacking the SIRT1-AMPK Axis.** PLOS Pathogens. 4 mar. 2015.

MORENO, Cláudia Jassica Gonçalves. **Metaloproteinase de tripanosomatídeos: avaliação de potenciais inibidores como ferramenta para desenvolvimento de fármacos.** Natal: [S.n.]. . Acesso em: 27 dez. 2025.

NOLETO, Guilhermina Rodrigues; PETKOWICZ, Carmen Lúcia Oliveira; MERCÊ, Ana Lucia Ramalho. **Polysaccharides and their vanadium complexes: new therapeutic perspectives by their ability of modulating macrophages.** Macrophage, 2 maio 2015.

NÚÑEZ GARCÍA, Sandra Elizabeth. **Factores asociados al abandono del tratamiento en pacientes con Leishmaniasis: una revisión sistemática.** Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar. 22 fev. 2025.

OLIVEIRA, Edinilze S. C. *et al.* **Chemical composition and biological activities of Bocageopsis multiflora essential oil.** Journal of Essential Oil Research. 2014.

ORTEGA-MORENO, María Eugenia *et al.* **Leishmaniasis cutánea: principales diagnósticos diferenciales.** Dermatol Venez. 2019.

ORYAN, A.; AKBARI, M. **Worldwide risk factors in leishmaniasis**. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine Elsevier (Singapore) Pte Ltd. 1 out. 2016.

PALADI, Carolina de Siqueira *et al.* **In Vitro and in vivo activity of a palladacycle complex on Leishmania (Leishmania) amazonensis**. PLoS Neglected Tropical Diseases. 15 maio 2012.

PARANAIBA, Larissa F. *et al.* **Leishmania enriettii (Muniz & Medina, 1948): A highly diverse parasite is here to stay**. PLoS Pathogens Public Library of Science. 1 maio 2017.

PARWEEN, Nikhat; JABEEN, Amber; PRASAD, Birendra. **Eugenol - a review of a versatile molecule with remarkable pharmacological properties**. Journal of Advanced Scientific Research. 31 maio 2021.

PAVLI, Androula; MALTEZOU, Helena C. **Leishmaniasis, an emerging infection in travelers**. International Journal of Infectious Diseases. Dez. 2010.

PEREIRA-FILHO, Adalberto Alves *et al.* **Evasion of the complement system by Leishmania through the uptake of C4bBP, a complement regulatory protein, and probably by the action of GP63 on C4b molecules deposited on parasite surface**. Acta Tropica. 2023.

PINART, Mariona *et al.* **Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis**. Cochrane Database of Systematic Reviews John Wiley and Sons Ltd. 27 ago. 2020.

PIRES COSTA, Eduarda *et al.* **Antioxidant and anti-inflammatory activity of eugenol, bis-eugenol, and clove essential oil: an in vitro study**. ACS Omega. 22 jul. 2025.

PIRES, Malini *et al.* **The impact of leishmaniasis on mental health and psychosocial well-being: A systematic review**. PLoS ONE Public Library of Science, 1 out. 2019.

PONTE-SUCRE, Alicia *et al.* **Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge**. PLoS Neglected Tropical Diseases Public Library of Science. 14 dez. 2017.

PRADHAN, S. *et al.* **Treatment options for leishmaniasis**. Clinical and Experimental Dermatology John Wiley and Sons Inc. 1 mar. 2022.

PRAMOD, Kannissery; ANSARI, Shahid H.; ALI, Javed. **Eugenol: a natural compound with versatile pharmacological actions**. Natural product communications. Dez. 2010.

PRITSCH, Izanara Cristine. **Avaliação in vitro da exposição do Glucantime® em macrófagos não infectados e infectados com Leishmanis (Viannia) braziliensis, Vianna (1911): Dissertações [199]. Curitiba, 2015.]. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/xmlui/handle/1884/69755>>.**

QUAN, J. M. *et al.* **Antibodies against the N-terminus of IL-8 receptor A inhibit neutrophil chemotaxis.** Biochemical and biophysical research communications. 15 fev. 1996.

RANI, Dixhya *et al.* **Design, synthesis, and biological evaluation of eugenol-isoxazoline hybrid derivatives as potential anti-leishmanial agents.** Journal of Molecular Structure. Jul. 2024a.

RANI, Dixhya *et al.* **Design, synthesis, and biological evaluation of eugenol-isoxazoline hybrid derivatives as potential anti-leishmanial agents.** Journal of Molecular Structure. 15 jul. 2024b.

RAUF, Muhammad Khawar *et al.* **Antileishmanial, DNA Interaction, and Docking Studies of Some Ferrocene-Based Heteroleptic Pentavalent Antimonials.** Archiv der Pharmazie. 1 jan. 2016.

REVERTE, Marta; SNÄKÄ, Tiia; FASEL, Nicolas. **The dangerous liaisons in the oxidative stress response to *Leishmania* infection.** Pathogens. 28 mar. 2022.

RODRÍGUEZ, N. E. *et al.* **Lipid bodies accumulation in *Leishmania infantum* - infected C57BL/6 macrophages.** Parasite Immunology. 16 ago. 2017.

SAHA, Amrita; ROY, Souravi; UKIL, Anindita. **Cytokines and Signaling Networks Regulating Disease Outcomes in Leishmaniasis.** Infection and Immunity. 18 ago. 2022.

SARKAR, Amrita *et al.* **Quantification of Intracellular Growth Inside Macrophages is a Fast and Reliable Method for Assessing the Virulence of Leishmania Parasites.** Journal of Visualized Experiments. 16 mar. 2018.

SCOTT, Phillip; NOVAIS, Fernanda O. **Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis.** Nature Reviews Immunology Nature Publishing Group. 25 ago. 2016.

SECUNDINO, Nagila *et al.* **Proteophosphoglycan confers resistance of *Leishmania major* to midgut digestive enzymes induced by blood feeding in vector sand flies.** Cellular Microbiology. Jul. 2010.

SEVERINO, Patrícia *et al.* **Cutaneous/Mucocutaneous Leishmaniasis Treatment for Wound Healing: Classical versus New Treatment Approaches.** Microbiology Research. 17 out. 2022.

SHARP, Vincent A.; BROWN, Barbara E.; MILLER, David. **Heat shock protein (hsp 70) expression in the tropical reef coral *Goniopora djiboutiensis*.** Journal of Thermal Biology. Fev. 1997.

SINGH, Vishal Kumar *et al.* **Advancing Treatment for Leishmaniasis: From Overcoming Challenges to Embracing Therapeutic Innovations.** ACS Infectious Diseases. 10 jan. 2025.

SOUSA, Júlia Santos Pinto de *et al.* **Visceral leishmaniasis: Therapeutic challenges and the potential of microalgae as a source of antileishmanial compounds.** Research, Society and Development. 12 dez. 2024.

SROUR, M. Leila; BARATTI-MAYER, Denise. **Why is noma a neglected-neglected tropical disease?** PLOS Neglected Tropical Diseases. 20 ago. 2020.

TARIQ, Lima; LAZAR, Youash; ABASS, Kasim Sakran. **Morphology, life cycle, pathogenesis and virulence factors of genus Leishmania: a review.** Plant Archives. Jan. 2020.

TEIXEIRA, Róbson Ricardo *et al.* **Eugenol derivatives with 1,2,3-triazole moieties: Oral treatment of cutaneous leishmaniasis and a quantitative structure-activity relationship model for their leishmanicidal activity.** Experimental Parasitology. 1 jul. 2022.

TEIXEIRA, S. M. R. **Control of gene expression in Trypanosomatidae.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research. Dez. 1998.

THILAGAM, N. Bharathi Sai *et al.* **A Comprehensive Review on Current Knowledge and Future Potential of Topical Therapies in Breast Cancer Treatment.** European Journal of Breast Health. 2 jan. 2025.

TILAHUN, Feleke; ALEMU, Workalemahu; MULATU, Getasew. **Magnitude and associated factors of cutaneous leishmaniasis in Mekelle City, Ayder Referral Hospital, Tigray, Northern Ethiopia, 2014.** Clinical Medicine Research. 2014.

TURCO, Salvatore J.; DESCOTEAUX, Albert. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. Annual Review of Microbiology. Out. 1992.

ULANOWSKA, Magdalena; OLAS, Beata. **Biological properties and prospects for the application of eugenol—a review.** International Journal of Molecular Sciences MDPI. 1 abr. 2021.

VANLIER, Corentine *et al.* **A case report of cutaneous leishmaniasis: a misleading clinical presentation.** Infection. 1 fev. 2021.

WENNING, Brianne *et al.* **Exploring the cultural effects of gender on perceptions of cutaneous leishmaniasis: a systematic literature review.** Global Health Research and Policy. 1 dez. 2022a.

WENNING, Brianne *et al.* **Exploring the cultural effects of gender on perceptions of cutaneous leishmaniasis: a systematic literature review.** Global Health Research and Policy. 1 dez. 2022b.

YANG, Dubing *et al.* **Internal Factors Affecting the Crystallization of the Lipid System: Triacylglycerol Structure, Composition, and Minor Components.** Molecules. 18 abr. 2024.

YAO, Chaoqun; DONELSON, John E.; WILSON, Mary E. **The major surface protease (MSP or GP63) of Leishmania sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function.** Molecular and Biochemical Parasitology Elsevier. 2003.

YUI, Satoru; YAMAZAKI, Masatoshi. **Neutral Lipid Accumulation in Macrophages During Lipid-Induced Macrophage Growth.** Journal of Leukocyte Biology. 1 mar. 1989.

YUJIE LAO *et al.* **Beyond flavor: the versatile roles of eugenol in health and disease.** Food Funct.. 2024.

ZARI, Ali T.; ZARI, Talal A.; HAKEEM, Khalid Rehman. **Anticancer properties of eugenol: A review.** Molecules MDPI. 1 dez. 2021.