



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
CURSO DE BIOMEDICINA



MARIA ADRIELLY GOMES DE SOUZA
MARIA GABRIELLY GONÇALVES DA SILVA SOUSA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eugenia dysenterica* (Mart)
DC. SOBRE A INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR *Leishmania* (*Leishmania*)
*amazonensis***

PARNAÍBA - PI

2023

MARIA ADRIELLY GOMES DE SOUZA

MARIA GABRIELLY GONÇALVES DA SILVA SOUSA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eugenia dysenterica*
(Mart) DC. SOBRE A INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR *Leishmania*
(*Leishmania*) *amazonensis***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina da Universidade Federal do Delta do Parnaíba – UFDPAr, *campus* Ministro Reis Velloso, como requisito obrigatório para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientação: Prof^o Dr. Klinger Antonio da Franca Rodrigues.

PARNAÍBA - PI

2023

MARIA ADRIELLY GOMES DE SOUZA
MARIA GABRIELLY GONÇALVES DA SILVA SOUSA


**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eugenia dysenterica*
(Mart) DC. SOBRE A INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR *Leishmania*
(*Leishmania*) *amazonensis***

Aprovado em 24 / 08 / 2023

BANCA EXAMINADORA:


Prof. Dr. Klinger Antônio de Franca Rodrigues

Orientador

Documento assinado digitalmente
 AIRTON LUCAS SOUSA DOS SANTOS
Data: 24/09/2023 16:19:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Bac. Airton Lucas Sousa dos Santos

1º Examinador

Documento assinado digitalmente
 VANESSA MARIA RODRIGUES DE SOUZA
Data: 24/09/2023 14:25:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Bac. Vanessa Maria Rodrigues de Souza.

2º Examinador

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eugenia dysenterica*
(Mart) DC. SOBRE A INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR *Leishmania*
(*Leishmania*) *amazonensis***

Maria Adrielly Gomes de Souza ^a, Maria Gabrielly Gonçalves da Silva Sousa ^a, Ana Joérica Lopes Vieira^a, Wellia Adriany Bernardo Vieira Santos^a, Klinger Antonio da Franca Rodrigues ^{a*}

^a Laboratório de Doenças Infecciosas, *Campus* Ministro Reis Velloso, Universidade Federal do Delta do Parnaíba, 64202-020, Parnaíba, PI, Brasil

*Autor Correspondente

Klinger Antonio da Franca Rodrigues

Laboratório de Doenças Infecciosas, *Campus* Ministro Reis Velloso, Universidade Federal do Delta do Parnaíba, 64202-020, Parnaíba, PI, Brasil

Tel.: + 55 83 98636330; E-mail: Klinger.antonio@gmail.com

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer primeiramente a **Deus**, que nos deu a vida e nos fortaleceu para chegarmos até aqui. Nada foi fácil, mas Ele nos capacitou e tornou possível a finalização deste ciclo em nossas vidas.

Às nossas **famílias**, pelo amor, suporte, amparo e fortaleza.

De forma especial e individual, eu Adrielly gostaria de agradecer à minha mãe **Jádria Oliveira**, que sempre abdicou de tudo em prol da minha vida. É e sempre será por você, mãe. Eu te amo mais do que tudo e sou imensamente grata por nunca ter desistido de nós. Aos meus avós: **Antônio** (*in memoriam*), **José da Paz**, **Luiza e Maria das Graças** por terem sido suporte para minha mãe durante esses anos, pelo cuidado, orações e amor incondicional. Aos meus **tios** (em especial **Márcio Ângelo**, que me trouxe para realizar minha matrícula), **primos, irmã e amigos de Piripiri** (em especial **Kellson e Lucas**, meus irmãos do coração). E à **Gaby**, com quem já compartilhei muita coisa, inclusive o TCC. Amiga, você foi um presente na minha vida, e espero mantê-la para sempre nela. Nossa amizade é especial demais. Enfim, todos que me apoiaram e ajudaram direta ou indiretamente durante esses anos de luta aqui, isso está sendo realidade porque tive vocês comigo. Obrigada por tudo!

De forma especial e individual, eu Maria Gabrielly, agradeço aos meus pais, **Francisco de Sousa e Vangely Gonçalves**, por toda atenção, dedicação, sacrifícios, compreensão e principalmente por todo o amor doado. Pelo exemplo que são para mim e por sempre acreditarem nos meus sonhos, amo vocês imensamente e incondicionalmente. Ao meu amado e querido irmão, **Ederton Gabriel**, pela parceria, companheirismo e amor. À amada vizinha, **Marias das Dores** (*in memoria*), que sempre acreditou em mim, apesar da ausência física, se faz sempre presente, a amo em todos os universos e planos que possam existir. Aos meus familiares (**tios, tias, primos e primas**) e **amigos** que sempre torceram e

incentivaram de forma direta e indireta. E a minha parceirinha da vida, **Maria Drielly**, que é a irmã que Deus, Parnaíba e Outlander me presentearam.

À nossa família de Parnaíba, “as meninas do whats”: **Rita, Andressa e Hinaira**. Que, por diversas vezes, foram nosso refúgio e amparo, com quem compartilhamos alegrias mas também as tristezas e lutas. Nós amamos vocês! Aos demais amigos que Parnaíba nos presenteou.

Ao nosso orientador **Prof. Dr. Klinger Antonio**, por ter sido primordial para isso, pelos ensinamentos e orientações. Você é uma verdadeira inspiração profissional para todos nós!

À banca examinadora pela disponibilidade e considerações.

E a todos do **LADIC**. Pelas risadas, compartilhamento de informações, pela amizade e principalmente, pela contribuição para esse trabalho, meus sinceros agradecimentos!

À UFDPAr.

E por fim, as agências de fomento CAPES/CNPQ, pelo financiamento da pesquisa.

RESUMO

As leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas, não contagiosas, de caráter antroponozoonótico e emergencial, endêmicas em cinco continentes e cuja incidência apresentada é alta. Os fármacos utilizados no tratamento atualmente possuem diversas limitações, tais como indução de efeitos colaterais, alto custo, emergência de cepas resistentes e administração prolongada. Em vista disso, há uma necessidade crescente de formular novos meios terapêuticos eficazes e não tóxicos. Os produtos naturais têm se destacado, e se tornado alvo de muitos estudos. O óleo essencial extraído da *Eugenia dysenterica* (Mart) DC. (OEEed), planta frutífera comum no Cerrado brasileiro, possui associação com propriedades antioxidante, antibacteriana, antifúngica e antiparasitária, mas ainda não possui estudos que avaliem o seu potencial antileishmania. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade do OEEed contra formas amastigotas internalizadas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e os potenciais mecanismos de ação. O OEEed apresentou atividade indireta contra o parasito, com concentração efetiva contra amastigotas intramacrofágicas ($CE_{50} = 5,95 \mu M$), elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-12, IL-1 β , ON e EROs), e diminuição de IL-10 e da atividade da arginase. Apresentou índice de seletividade maior do que o do fármaco de referência, sendo 31,7 vezes mais seletivo que o antimoniato de meglumina contra formas amastigotas intramacrofágicas. Nosso estudo sugere que o OEEed possui atividade antileishmania *in vitro* promissora, sendo um próspero candidato para investigação em ensaios *in vivo*.

Palavras-chaves: *Eugenia dysenterica*; óleo essencial; antileishmania; atividade macrofágica.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas, não contagiosas, de caráter antroponozoonótico e emergencial. São endêmicas em cinco continentes e se encontram presentes, principalmente, em regiões tropicais e subtropicais (Divenuto *et al.*, 2023). Cerca de 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de contaminação, com incidência estimada de 700.000 a 1 milhão de novos casos por ano (WHO, 2023).

Essas doenças são causadas por parasitas do gênero *Leishmania*, transmitidos ao homem através do repasto sanguíneo de insetos flebotomíneos fêmeas dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* (Cecílio *et al.*, 2022). Com relação ao espectro clínico, este é variado e depende de fatores inerentes ao hospedeiro e ao parasita, podendo ser: dermatotrópico (leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose cutânea mucosa, leishmaniose cutânea difusa, leishmaniose cutânea disseminada e dérmica pós-calazar (LCPC) ou não dermatotrópico (leishmaniose visceral). Esta última manifestação apresenta um maior grau de letalidade, principalmente se a terapêutica for ineficaz ou, simplesmente, se a mesma não for realizada (Gonçalves *et al.*, 2022; Akbari *et al.*, 2021).

O tratamento contra as leishmanioses é fundamentado em fármacos de primeira linha, de uso histórico e universal, com destaque para os antimoniais pentavalentes (antimoniato de meglumina ou estibogluconato de sódio), e os de segunda linha, como a anfotericina B e suas formulações lipossomais (paromomicina, pentamidina e a miltefosina), que são administrados principalmente por via parenteral, com exceção da miltefosina que é por via oral (Morais *et al.*, 2020). Todos os fármacos estão associados a limitações relevantes como, por exemplo, falha terapêutica e indução de efeitos colaterais como alta toxicidade, alto custo, emergência de cepas resistentes e administração prolongada (Santiago *et al.*, 2021).

Portanto, a necessidade de uma nova terapêutica eficaz e que gere menos efeitos

colaterais é crescente. Em pesquisas de novos agentes antileishmania, os compostos derivados das plantas são uma alternativa promissora que vem se destacando no âmbito farmacêutico.

Dentre eles, destacam-se os óleos essenciais, substâncias voláteis biologicamente ativas produzidas a partir do metabolismo secundário das plantas (Fuentes *el at.*, 2021).

O gênero *Eugenia* é considerado um dos maiores da família Myrtaceae, com cerca de 400 espécies já identificadas, que se destacam pelo seu grande potencial econômico e farmacológico. Os óleos essenciais obtidos através delas demonstraram possuir uma grande diversidade química, tendo como componentes principais os sesquiterpenos cíclicos, compostos que apresentam relevante potencial terapêutico e que promovem alterações na membrana mitocondrial e plasmática do parasita (Fidelis *el at.*, 2022; Araújo *el at.*, 2019). Dentre as espécies deste gênero que já demonstraram possuir atividade antileishmania, destacam-se *Eugenia piauiensis Vellaff*, *Eugenia gracillima Kiaersk* e *Eugenia uniflora*, cujos efeitos já foram abordados em outros trabalhos (Fidelis *el at.*, 2022; Nunes *el at.*, 2021; Gomes Vidal Sampaio *el at.*, 2021; Rodrigues *el at.*, 2013).

A espécie *Eugenia dysenterica* (Mart) DC. é uma planta frutífera de porte médio e galhos tortuosos, muito comum no Cerrado. É popularmente conhecida no Brasil como “cagaita” ou “cagaiteira” devido à ação laxativa dos seus frutos, que são globosos e de coloração amarela (da Costa *el at.*, 2020; Araújo *el at.*, 2019). Os fitoconstituintes obtidos a partir do extrato dessa planta demonstraram possuir associação com propriedades antioxidantes, antibacterianas, antifúngica e antiparasitárias, além do efeito gástrico já mencionado (Araújo *el at.*, 2019). Além disso, investigações fitoquímicas relataram que as folhas de *E. dysenterica* possuem vários monoterpenos, sesquiterpenos, ésteres alifáticos e álcoois em sua composição (Dias *el at.*, 2023; Santana *el at.*, 2022).

Com base em estudos anteriores, que revelaram atividade antileishmania de óleos essenciais extraídos de outras espécies do gênero *Eugenia*, este trabalho teve como objetivo

avaliar os efeitos do óleo essencial da espécie *E. dysenterica* (OEEed) sobre a infecção de macrófagos J774.A1 por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Manutenção dos parasitas e células de mamíferos

Foram utilizadas promastigotas de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) mantidas a 26 °C por meio de repiques semanais em tubos de ensaio com meio Schneider suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Dias *et al.*, 2020).

A linhagem de macrófagos J774 A.1 (concedidas pelo banco de células do Rio de Janeiro, Brasil) foi cultivada em meio DMEM suplementado com 10 % de SFB, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, pH 7,2 a 37 °C em incubadora com demanda de 5 % de CO₂ e 80 % umidade (Dias *et al.*, 2020; Nunes *et al.*, 2021)

2.2 Ensaio de atividade antileishmania sobre formas amastigotas intracelulares

Em uma placa de 24 poços contendo lamínulas de vidro estéreis de 13 mm foram adicionados macrófagos J774 A.1 na proporção de 1×10^5 de células em 1 mL de meio DMEM suplementado. Posteriormente, a placa foi incubada a 37 °C e 5 % de CO₂ por um período de 4 h para possibilitar a adesão celular. Após esse tempo, 200 µL de um novo meio contendo formas promastigotas de *L. amazonensis* em sua forma estacionária, na proporção de 10 parasitas por macrófago, foram adicionados em cada poço. Seguido a isso, a placa foi incubada por mais 12 horas a 37 °C e 5 % de CO₂ para que a infecção ocorresse e, passado esse tempo, aspirou-se o meio para remover as formas promastigotas não internalizadas. Foram feitas três lavagens com PBS e depois adicionado 1 mL de um novo meio contendo o antimoniato de meglumina e o composto OEEed em concentrações de 50 – 1,56 µg/mL, para posterior

incubação de 72 h. Posteriormente as lamínulas foram retiradas, fixadas e coradas com panóptico rápido para análise microscópica. Para cada lamínula avaliou-se o mínimo de 300 macrófagos quanto à proporção de células infectadas e o número de parasitas por célula. Os valores obtidos foram utilizados para o cálculo da concentração efetiva média (CE₅₀), e o grupo controle negativo foi realizado com meio DMEM completo a 0,5 % de DMSO, sendo constituído pelos macrófagos infectados e não tratados, enquanto que o positivo foi constituído pelas células infectadas e tratadas com antimoniato de meglumina (Glucantime). Por fim, o sobrenadante foi retirado e armazenado a - 20 °C para posterior análise de mecanismos indiretos (Sousa *el at.*, 2023; Feitosa *el at.*, 2021; Borges *el at.*, 2020).

2.3 Avaliação do perfil imunomodulador do óleo essencial da espécie *E. dysenterica* sobre macrófagos infectados com *L. amazonensis*

2.3.1. Dosagem de citocinas

A análise das citocinas produzidas após o tratamento com o OEEed foi realizada a partir dos sobrenadantes obtidos da infecção dos macrófagos. A dosagem de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-12 foi feita através do método de ELISA sanduíche, segundo padrão já estabelecido pelo fabricante do kit (eBioscience). Para isso utilizou-se placas de 96 poços, que foram sensibilizadas com 50 μ L/poço do anticorpo de captura anti-citocina durante 18 horas a 4 °C. Foi feita a lavagem da placa com PBS e posterior aplicação de 100 μ L/poço de uma solução de bloqueio constituída por PBS a 10 % de soro fetal bovino (SFB) + Tween 20, seguido de incubação por 1 hora à temperatura ambiente. Passado esse tempo, realizou-se uma nova lavagem com PBS seguida da adição do padrão (diferentes concentrações de citocinas recombinantes) e das amostras em duplicata (sobrenadantes oriundos da infecção) aos poços, para incubar por mais 2 horas à temperatura ambiente. Realizada uma nova lavagem, a placa foi então incubada por mais 1 hora com 50 μ L do anticorpo de detecção conjugado à enzima

peroxidase, à temperatura ambiente e sob proteção da luz. Por fim, foi feita uma lavagem adicional e obteve-se a revelação da reação após adicionar o substrato cromogênico (tetrametilbenzidina + peróxido de hidrogênio). A reação foi então finalizada após 15 minutos, a partir da adição de ácido sulfúrico 1N, para enfim obter a leitura em espectrofotômetro a 450 nm. Os resultados foram analisados com o auxílio do Software Softmax (Miramin-Mohammadi *et al.*, 2021; Nunes *et al.*, 2021).

2.3.2 Dosagem de Óxido Nítrico (ON)

A mensuração indireta de ON foi avaliada pela estimativa da concentração de nitrito em sobrenadantes dos ensaios de infecção pelo método de Griess. Inicialmente, 100 µL dos sobrenadantes do ensaio de infecção de macrófagos com igual volume de reagente de Griess preparado no momento da análise (1 % sulfanilamida, 0,1 % dicloridrato de N- (1 naftil)-etilenodiamina, 2,5 % orto-fosfórico ácido) foram adicionados em uma placa de 96 poços (Amorin *et al.*, 2012); assim como a concentração seriada (2–125 µL) de NaNO₂ em meio DMEM para realização da curva padrão. A placa permaneceu incubada durante 10 min em temperatura ambiente e logo após foi lida em um espectrofotômetro a 540 nm. A concentração de nitrito foi estimada por interpolação da curva-padrão (Nunes *et al.*, 2021).

2.3.3 Determinação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Para determinar os níveis de EROs em macrófagos J774 A.1 infectados com *L. amazonensis* e tratados com o OEEd, foi utilizado o teste de H₂DCFDA (diclorodihidrofluoresceína), um composto não fluorescente, mas quando oxidado na presença de EROs torna-se diclorofluoresceína (DCF), um isolado altamente fluorescente (Machado *et al.*, 2021). A princípio, foram semeados macrófagos (1×10^6 por poço) em placas de 96 poços contendo meio DMEM suplementado, em seguida incubados por 3 h a 37 °C e 5 % de CO₂,

realizando assim a adesão celular. Após a adesão, estes macrófagos foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 10:1 leishmania/macrófago. Após 4 h de incubação, os macrófagos infectados foram tratados com OEED nas concentrações 3,12; 6,25 e 12,5 µg/mL por 72 h. Em seguida 10 µL de corante H₂DCFDA foram adicionados, atingindo uma concentração final de 20 µg/mL. A placa foi incubada a 37 °C por 30 min (no escuro), e a intensidade da fluorescência foi medida usando um espectrofluorômetro (FLx800) com 485 nm de excitação e 528 nm de emissão (Sousa *et al*, 2023). Como controle positivo foi utilizado o H₂O₂ (0,5 µg/mL), e o negativo as promastigotas mantidas em meio de cultura.

2.3.4 Determinação da atividade da arginase em macrófagos

A dosagem de uréia ocorreu após a determinação da atividade da arginase em macrófagos infectados lisados. Inicialmente macrófagos J774 A.1 foram infectados com *L. amazonensis*, seguido do tratamento nas concentrações de 3,12; 6,25 e 12,5 µg/mL de OEED respectivamente. Decorrido o período de tratamento, os macrófagos foram lisados através da adição de uma solução tampão, o Tritan-100, a 2 % por 30 min. Logo seguida, foi adicionado um conjunto de inibidores de proteases, com 100 µL de Tris-HCl a 25 mM (pH 7,4) e 10 µL de MnSO₄. O conteúdo dos poços foi centrifugado em uma rotação de 1500 x g por 30 minutos a 4 °C. Em seguida foi realizado a ativação da enzima por aquecimento a 12 min a 54 °C; o processo de hidrólise foi induzido pela incubação de 100 µL do lisado ativado com 100 µL de 0,1 M de arginina (pH 9,7) a 37 °C, durante 1 h; a reação foi interrompida pela adição de 800 µL de H₂SO₄-H₃PO₄- H₂O (1:3:7) e 40 µL de α-isonitrosopropiofenona em metanol a 100 %, e novamente aquecida a 100 °C ao longo de 30 minutos. Ensaios colorimétricos foram executados usando um FLUOstar OPTIMA leitor (BMG Labtech, Alemanha) a 540 nm, para mensurar a catalisação da arginase e a produção de 1 mol de ureia por minuto (Dias *el at.*, 2020).

2.4 Análise estatística

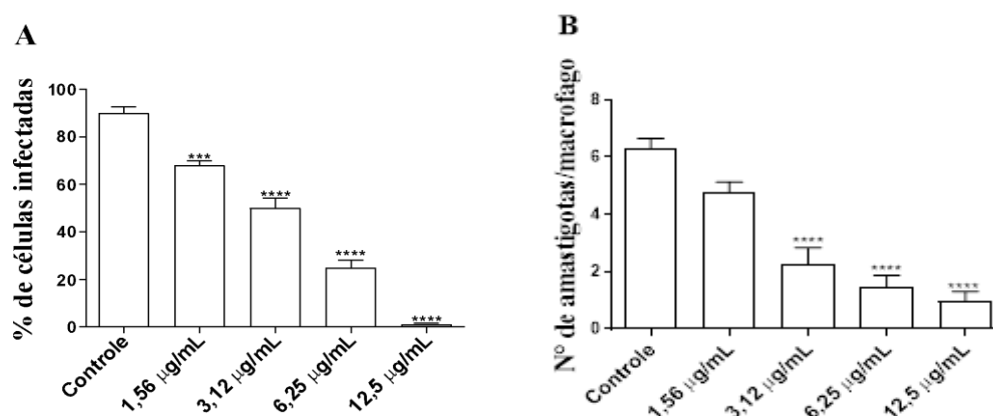
Para a análise estatística dos ensaios in vitro foram realizados pelo menos três experimentos independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando o software Graphpad Prism® versão 8.0, por meio da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, e sendo considerada significativa a diferença de $p < 0,05$. Por fim, os valores de CE_{50} e CC_{50} foram calculados por meio de regressão não linear (GraphPad Software).

3 RESULTADOS

3.1 Ensaio de atividade antileishmania sobre formas amastigotas intracelulares

Na **Fig. 1** estão apresentados os resultados após o tratamento com o OEEed, em macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Foram analisados os parâmetros de porcentagem de infecção (**Fig. 1 A**) e o número de amastigotas por macrófago (**Fig. 1 B**), onde houve uma redução do número de ambos, mesmo quando em baixas concentrações. A porcentagem de inibição foi de 68,08%, 50,08%, 24,85% e 1,10% para as concentrações de 1,56 - 12,5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. A concentração efetiva contra 50 % dos parasitas, ou seja, o CE_{50} do OEEed foi de 5,95 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que o gerado pelo antimoniato de meglumina foi de 658,7 $\mu\text{g/mL}$ (**Tabela 1**).

Fig. 1 - Eficácia do óleo essencial de *Eugenia dysenterica* (OEEed) no tratamento de macrófagos J774 A.1 infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* por 72 h.



Fonte: Elaboração própria. **A)** Porcentagem de macrófagos infectados; **(B)** número de amastigotas por macrófago infectado. Macrófagos foram infectados na proporção de 10^6 promastigotas de *L. amazonensis* para cada célula. Em seguida, foram tratados com diferentes concentrações de OEEed a 37 °C e 5% de CO₂ por 72h. Após esse tratamento, as lamínulas foram coradas e analisadas em microscopia de luz. O gráfico representa a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. ANOVA one-way seguida do pós-teste de Tukey foi realizada para comparação entre os grupos com (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$ em relação ao controle negativo (0,5% DMSO em DMEM completo).

Tabela 1. Efeitos do óleo essencial de *Eugenia dysenterica* (OEEed) e do Antimoniato de meglumina na viabilidade de macrófagos J774 A.1 e índice de seletividade (IS).

Compostos	Macrófagos J774 A.1	<i>L. amazonensis</i>	
	CC ₅₀	CE ₅₀	IS
	µg/mL	µg/mL	J774 A.1
OEEed	252,83	5,95	42,50
Antimoniato de meglumina	658,7	492,6	1,34

Fonte: Elaboração própria. Os dados representam a média \pm erro padrão para três experimentos independentes realizados em triplicata. As diferentes concentrações médias contra amastigotas intra-macrofágicas (Concentração Efetiva - CE₅₀) e macrófagos (Concentração Citotóxica - CC₅₀) foram calculadas por meio de regressão não linear. IS = CC₅₀ / CE₅

3.2 Avaliação do perfil imunomodulador do óleo essencial da espécie *Eugenia dysenterica* (Mart) DC. sobre macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis*

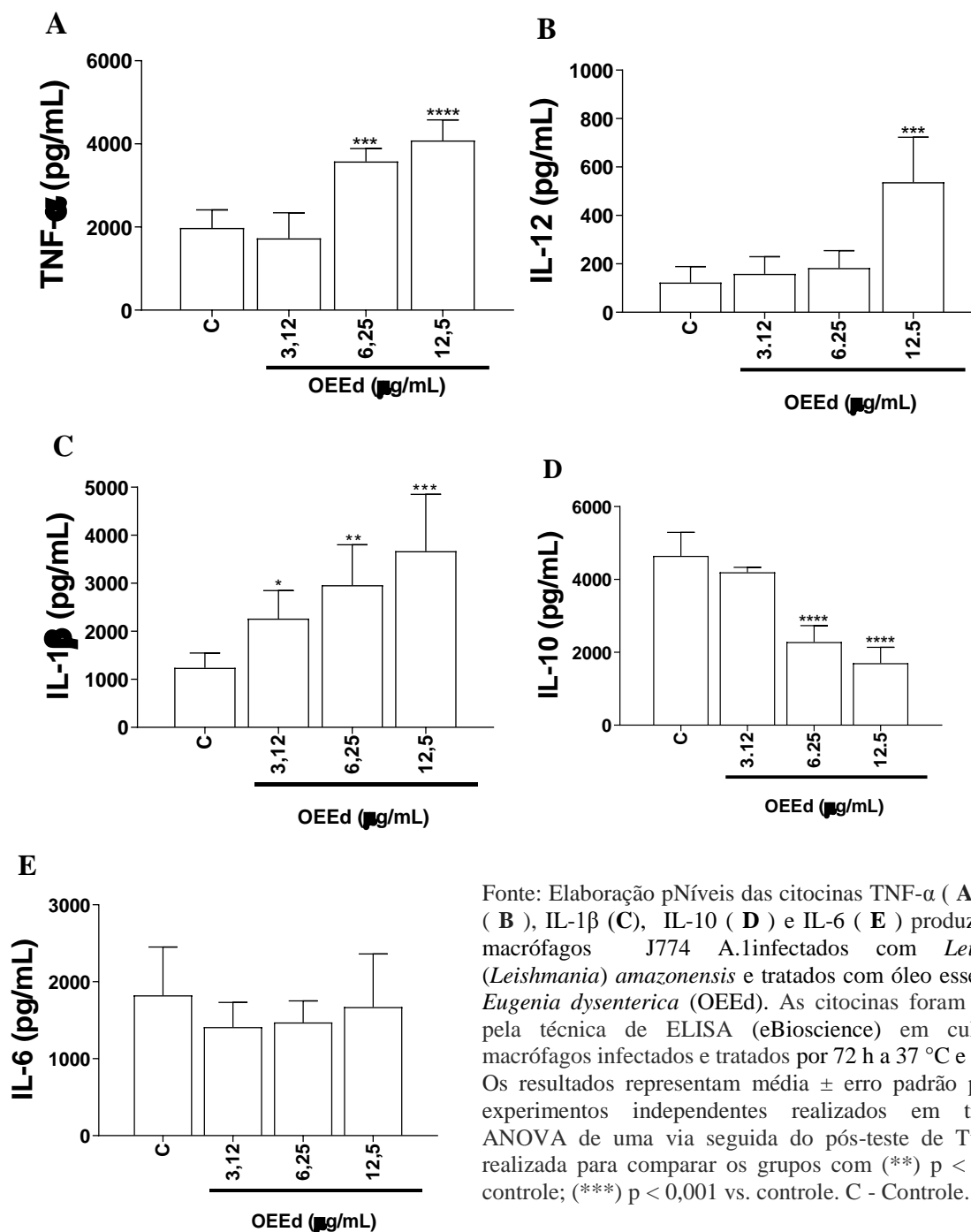
3.2.1. Dosagem de citocinas

A partir da observação dos resultados obtidos pelo tratamento com OEEed na taxa de infecção de macrófagos utilizando formas amastigotas intramacrofágicas de *L. amazonensis*, foi feita uma análise *in vitro* de uma possível associação da atividade antileishmania com a ativação macrofágica. Como mostrado na **Fig. 2** o tratamento com o OEEed (µg/ mL) induziu um aumento na produção de TNF- α (**Fig. 2 A**), com maior valor significativo na concentração máxima administrada; IL-12 (**Fig. 2 B**), com significância somente na concentração de 12,5 µg/mL; e IL-1 β (**Fig. 2 C**). E promoveu diminuição de IL-10 (**Fig. 2 D**), com significância a partir da concentração de 6,25 µg/mL. No entanto, não afetou os níveis de IL-6 (**Fig. 2 E**) nas

condições avaliadas.

Fig. 2-

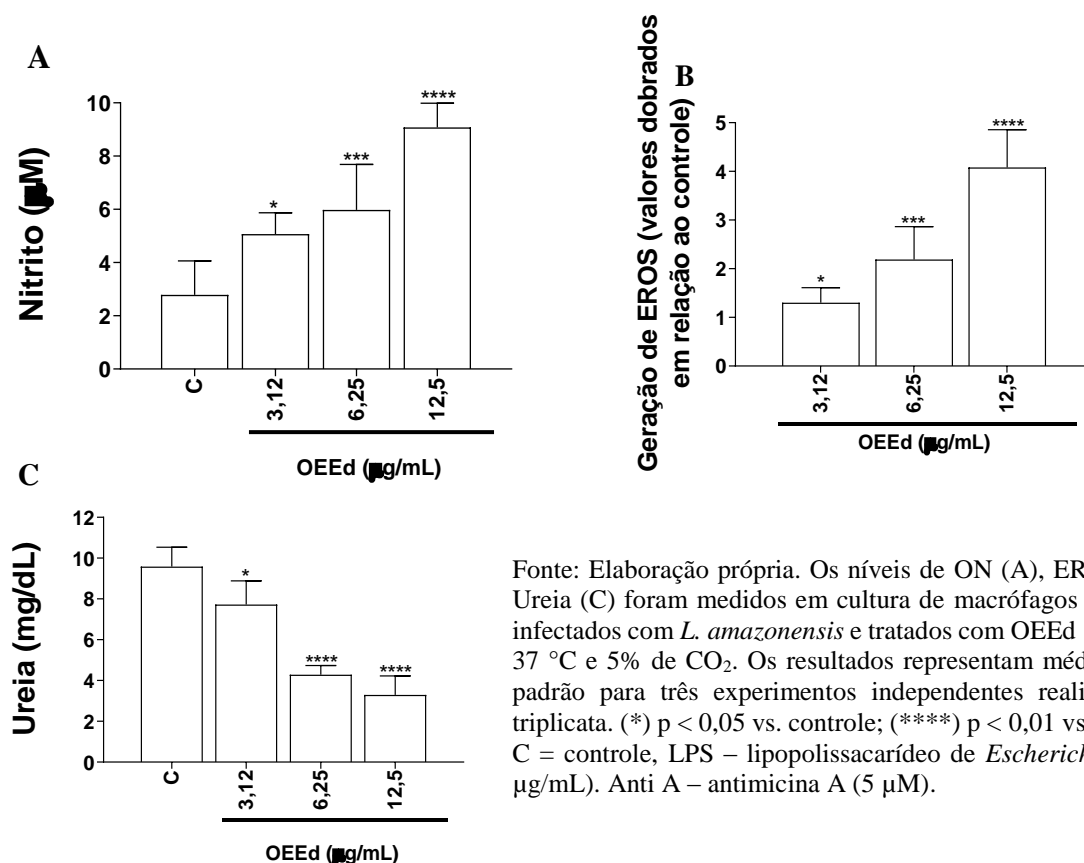
Fig.2 . Níveis de citocinas produzidas por macrófagos infectados com *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* e tratados com OEd.



3.2.2 Dosagem da produção de ON, EROs e Arginase

A geração de ON, EROs, e a inibição de Arginase, componentes relevantes e indicadores da ativação macrofágica, foi apurada em macrófagos incubados, infectados ou não com as formas promastigotas de *L. amazonensis*. Em macrófagos infectados com *L. amazonensis*, foi observado o aumento na produção de elementos leishmanicidas, como o ON (**Fig. 3 A**), cuja elevação dos níveis ocorreu em todas as concentrações (3,12 - 12,5 $\mu\text{g/mL}$). Quando investigada a geração de EROs (**Fig. 3 B**) em macrófagos estimulados por *Leishmania*, também observou-se um aumento dos níveis de EROs nas concentrações de 3,12 - 12,5 $\mu\text{g/mL}$. A atividade da arginase (**Fig. 3 C**), mensurada pelos níveis de ureia produzidos por macrófagos infectados, apresentou redução nas concentrações de 3,12 - 12,5 $\mu\text{g/mL}$, quando comparado ao controle.

Fig. 3. Níveis de Óxido Nítrico (ON), Espécies reativas de oxigênio (EROs) e Ureia expressados por macrófagos infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e tratados óleo essencial de *Eugenia dysenterica* (OEEed).



Fonte: Elaboração própria. Os níveis de ON (A), EROS (B) e Ureia (C) foram medidos em cultura de macrófagos J774 A.1 infectados com *L. amazonensis* e tratados com OEEed por 72 h a 37 °C e 5% de CO_2 . Os resultados representam médias \pm erro padrão para três experimentos independentes realizados em triplicata. (*) $p < 0,05$ vs. controle; (****) $p < 0,01$ vs. controle; C = controle, LPS – lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (2 $\mu\text{g/mL}$). Anti A – antimicina A (5 μM).

4 DISCUSSÃO

Devido às limitações atreladas à terapêutica atual contra as leishmanioses, compostos naturais derivados de plantas têm sido grandes alvos de estudos quanto às suas propriedades antileishmaniais (Rodrigues *et al*, 2015). Portanto, avaliou-se neste trabalho a atividade do OEEed sobre a infecção de macrófagos por *L. amazonensis*, ou seja, a fim de analisar se o composto tem o potencial de modular a atividade macrofágica para eliminação da forma amastigota, que é a causadora dos sinais e sintomas das leishmanioses.

Inicialmente verificou-se a atividade do OEEed sobre a infecção de macrófagos através dos parâmetros de percentagem de infecção e número de amastigotas por macrófagos. A eficácia deste modelo experimental sinaliza que a substância tem potencial para futuros estudos em modelos *in vivo*. Em nosso trabalho foi observado uma diminuição na porcentagem de infecção após o tratamento nas concentrações testadas, demonstrando a eficácia do OE em questão e inibição quase que totalitária na maior concentração, com um CE50 baixo de 5,95 µg/mL. Logo, o OEEed provou ser tão eficaz quanto OEs como: *Aloysia gratíssima*; *Chenopodium ambrosioides*; *Chrysopogon zizanioides*; *Endlicheria bracteolata* (Meisn.); e *Piper callosum* que são considerados potenciais agentes antileishmania (Garcia *et al*, 2023; Oliveira *et al*, 2022; Rottini *et al*, 2019; Garcia *et al*, 2018; Monzote *et al*, 2006).

O antimoniato de meglumina é o principal fármaco utilizado atualmente no tratamento contra as leishmanioses, exceto quando se tratam de mulheres grávidas e pacientes coinfectados com HIV (Gonçalves *et al*, 2021). Devido a isso, ele foi utilizado neste trabalho como controle positivo, a fim de observar e comparar seus resultados com os obtidos a partir do óleo em questão. O OEEed apresentou-se mais eficaz quando comparado ao fármaco de referência, com base no índice de seletividade (IS) obtido de 42,50, dado muito relevante tendo em vista que é necessário um valor superior a 20 para o fármaco ser considerado seguro (Evans *et al*, 2001). Em contrapartida, o antimoniato de meglumina demonstrou possuir um IS de 1,34 o que reforça

a conhecida alta toxicidade e efeitos adversos que este medicamento dispõe (Mathison *et al*, 2023). Sendo assim, o OEEd apresentou-se 31,7 vezes mais seletivo contra as formas amastigotas intramacrofágicas quando comparado ao fármaco.

Considerando a eficácia do OEEd na redução do índice da infecção, foi investigado os mecanismos celulares indiretos de resposta imune a partir da produção de citocinas, ON, EROs e atividade de arginase, pois tratam-se de alvos terapêuticos de interesse atualmente (Sousa *et al*, 2023).

Os macrófagos são uma das principais células de defesa do sistema imunológico, exercendo importante papel no combate ao parasita *Leishmania* spp. (Dias *et al.*, 2020). A resposta imune Th1, através da estimulação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-12, EROs e ON, está relacionada à inibição do crescimento parasitário. O TNF- α atua induzindo os macrófagos ao estresse oxidativo, a fim de produzir ON e EROs para promover uma proteção contra o parasita tanto *in vitro* como *in vivo*. Níveis elevados estão correlacionados com uma maior gravidade da lesão, indicando ser uma citocina que atua na resolução da infecção (Rostami *et al.*, 2021; Michelon *et al.*, 2020). Já a IL-12 está associada com a síntese de ON e consequente inibição do parasita, pois estimula a produção de IFN- γ e de células T CD4+, e a diferenciação destas (Nunes *et al.*; Rostami *et al.*, 2021). Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o efeito anti-amastigota do OEEd está associado ao aumento da resposta Th1, evidenciada a partir da produção estimulada dos níveis de TNF- α , IL-12 e IL-1 β no sobrenadante de macrófagos infectados com *L. amazonensis*.

As IL-6 e IL-10 (resposta Th2), quando em altos níveis, agem inibindo a ativação da resposta Th1, induzindo uma resposta citotóxica e colaborando com a progressão da doença. Esse aumento também bloqueia a ativação dos macrófagos, impedindo que os mesmos realizem sua função de combater os parasitas (Rostami *et al.*; Samant *et al.*, 2021). Com isso, conclui-se

que a diminuição dos níveis de IL-10, observada após o tratamento com OEEed, indica que o composto foi capaz de estimular uma ação protetora contra os parasitas.

O ON foi um elemento considerado por um longo período como o mecanismo primário mais eficaz envolvido na defesa contra o parasita *Leishmania*. É sintetizado a partir do aminoácido, L-arginina pelo óxido nítrico sintase induzível (iNOS), e possui a capacidade de prevenir danos teciduais indesejados ao interromper o recrutamento de fagócitos derivados de monócitos (Formaglio *et al.*, 2021). Com relação à sua produção, foi observado um aumento relevante em seus níveis após o tratamento com OEEed. Como citado anteriormente, esse aumento é corroborado pela elevação dos níveis de IL-12 e pela redução da infecção; assim como, pelos resultados obtidos no estudo de Rodrigues, 2013 com a espécie *E. uniflora*, que indicou atividade leishmanicida.

As EROs interagem com uma grande diversidade de moléculas, como proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e carboidratos. Logo, a sua produção é indicativa da despolarização da membrana mitocondrial, e isso faz com que também desempenhem um importante papel na eliminação de patógenos intracelulares, e na diferenciação celular do parasita, assim como podem desencadear a morte do parasita por meio de artifícios equivalentes à apoptose. Após o tratamento com OEEed foi possível observar uma elevação em seus níveis, o que também corrobora com o fato do composto apresentar capacidade protetora contra os parasitas (Silva-Silva *et al.*; Reverte *et al.*, 2022; Miranda *et al.*, 2017).

Como já foi discutido, o OEEed conseguiu elevar os níveis de ON. Isso pode ter contribuído com a redução dos níveis de ureia, acompanhado da diminuição da atividade da arginase, que é antagônico do iNOS por competir pelo mesmo substrato, a L-arginina (Dias *et al.*, 2020; Adinehbeigi *et al.*, 2017). A arginase é um importante alvo farmacológico em função de ser uma metalohidrolase responsável pela biossíntese de poliaminas, e pela conversão da L-arginina em L-ornitina e uréia, na fase final do ciclo da ureia, sendo, portanto, essencial para a

proliferação e manutenção do parasita e por promover a desintoxicação de EROs pela tripanotiona redutase (TR) (Assouab *et al.*, 2022; da Silva *et al.*, 2012).

5 CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados obtidos, o OEEed demonstrou possuir atividade antileishmania contra as formas amastigotas de *L. amazonensis* em concentrações seguras para a célula hospedeira. O estudo também demonstrou que a atividade leishmanicida obtida está associada à ativação dos mecanismos de resposta imune de macrófagos, fato evidenciado com a elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-12 e IL-1 β), ON e EROs, e com a redução dos níveis de IL-10 e arginase. Esses achados corroboram com a interpretação do OEEed ser um ótimo candidato para estudos futuros em modelos *in vivo*.

Declaração de contribuição de autoria

Maria Adrielly Gomes de Souza: Investigação, Conceituação, Metodologia, Curadoria de dados e Redação; **Maria Gabrielly Gonçalves da Silva Sousa:** Investigação, Conceituação, Metodologia, Curadoria de dados e Redação; **Ana Joérica Lopes Vieira:** Investigação; **Wellia Adriany Bernardo Vieira Santos:** Investigação; **Klinger Antonio da Franca Rodrigues:** Investigação, Conceituação, Metodologia, Curadoria de dados, Redação Aquisição de financiamento e Administração do projeto.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

À Instituição de Excelência, UFDPAr, por fornecer infraestrutura e outras acessibilidades à pesquisa científica.

Formatação das fontes de financiamento

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (número de concessão 403260/2021-3) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Piauí (FAPEPI) (número de concessão 004/2020-PPSUS).

Referências

- ADINEHBEIGI, K. et al. *In vitro* antileishmanial activity of fisetin flavonoid via inhibition of glutathione biosynthesis and arginase activity in *Leishmania infantum*. **Pathogens and global health**, v. 111, n. 4, p. 176–185, 2017. <https://doi:10.1080/20477724.2017.1312777> .
- ADLER-FLINDT, S.; MARTIN, S. Comparative cytotoxicity of plant protection products and their active ingredients. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 54, p. 354–366, 2019. <https://doi:10.1016/j.tiv.2018.10.020>.
- AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. Immunotherapy in treatment of leishmaniasis. **Immunology letters**, v. 233, p. 80–86, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2021.03.011>
- AMORIM, F. M. et al. Morita-Baylis-Hillman adduct shows *in vitro* activity against *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with a reduction in IL-6 and IL-10 but independent of nitric oxide. **Parasitology**, v. 140, n. 1, p. 29–38, 2013. <https://doi:10.1017/S0031182012001291>.
- ANDRÉ, S. et al. Antileishmanial drugs modulate IL-12 expression and inflammasome activation in primary human cells. **The journal of immunology**, v. 204, n. 7, p. 1869–1880, 2020. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900590>
- ARAÚJO, F. F. et al. Espécies silvestres brasileiras do gênero *Eugenia* (Myrtaceae) como hotspot de inovação para fins alimentícios e farmacológicos. **Pesquisa Alimentar Internacional**, v. 121, p.57-72, jul.2019. <https://doi:10.1016/j.foodres.2019.03.018>.
- ARCHIBALD, Reginald M. et al. Determinação colorimétrica de ureia. **Journal of Biological Chemistry**, v. 157, p. 507-518, 1945. Record Number : 19451400029
- ARRUDA, D. C. et al. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites *in vitro* and *in vivo*. **Biomedecine & pharmacotherapie [Biomedicine & pharmacotherapy]**, v. 63, n. 9, p. 643–649, 2009. <https://doi:10.1016/j.biopha.2009.02.004>.
- ASSOUAB, A.; EL FILALY, H.; AKARID, K. Inhibiting human and *Leishmania* arginases using *Cannabis sativa* as a potential therapy for cutaneous leishmaniasis: A molecular docking study. **Tropical medicine and infectious disease**, v. 7, n. 12, p. 400, 2022. <https://doi:10.3390/tropicalmed7120400>.
- BARATA LOPES, A. C. C. et al. Chemical composition and potential antileishmanial and cytotoxic activity of *Duguetia stelechantha* (Diels) R.E.Fr. essential oil. **Industrial crops and products**, v. 202, n. 116978, p. 116978, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116978>
- CARDOSO, F. DE O. et al. Modulation of cytokines and extracellular matrix proteins expression by *Leishmania amazonensis* in susceptible and resistant mice. **Frontiers in microbiology**, v. 11, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01986>
- CECÍLIO, P.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; OLIVEIRA, F. Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with *Leishmania* parasites. **Communications biology**, v. 5, n. 1, 2022. doi: [10.1038/s42003-022-03240-z](https://doi.org/10.1038/s42003-022-03240-z).
- WYREPKOWSKI, C. D. C. et al. Aspectos farmacológicos da terapia medicamentosa utilizada para a leishmaniose cutânea: uma revisão de literatura. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 12, n. 8, p. e3352, 2020. <http://dx.doi.org/10.25248/reas.e3352.2020>
- da COSTA, J. S. et al. Óleos essenciais de espécies brasileiras de *Eugenia* e *Syzygium* e suas atividades biológicas. **Biomoléculas**, v. 10, n.8, p.1155, ago 2020. Acesso em: 28 jul. de 2023 <https://doi.org/10.3390/2Fbiom10081155>

COSTA, M. F. et al. Caracterização biométrica de frutos e sementes de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) na região sul do Piauí, Brasil. **Diversitas Journal**, v. 5, n. 3, p. 1432–1441, 2020.

<https://doi.org/10.17648/diversitas-journal-v5i3-873>

DA SILVA, E. R.; MAQUIAVELI, C. DO C.; MAGALHÃES, P. P. The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase. **Experimental parasitology**, v. 130, n. 3, p. 183–188, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.01.015>.

DIAS, E. B. DOS S. et al. Essential oil variability in *Eugenia dysenterica* fruits. **Natural Product Research**, v. 37, n. 1, p. 119–122, 2023. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1947273>.

DIAS, Clarice Noletto et al. Methyl gallate: selective antileishmanial activity correlates with host-cell directed effects. **Chemico-Biological Interactions**, v. 320, p. 109026, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109026>.

DIVENUTO, F. et al. Role of Treg, Breg and other cytokine sets in host protection and immunopathology during human leishmaniasis: Are they potential valuable markers in clinical settings and vaccine evaluation? **Acta tropica**, v. 240, n. 106849, p. 106849, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106849>

DURAZZINI, A. M. S. et al. *Eugenia pyriformis* Cambess: a species of the Myrtaceae family with bioactive essential oil. **Natural Product Research**, p. 1–5, 2019. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1669031>

EVANS, S. M. et al. Development of a high throughput *in vitro* toxicity screen predictive of high acute *in vivo* toxic potential. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 15, n. 4–5, p. 579–584, 2001. [https://doi.org/10.1016/s0887-2333\(01\)00064-9](https://doi.org/10.1016/s0887-2333(01)00064-9).

FEITOSA, I.B. **Avaliação do efeito leishmanicida e imunomodulador da furazolidona e seus produtos da complexação com ciclodextrinas sobre a infecção por *Leishmania (L.) infantum***. Orientador: Allyson Guimarães Costa. 2021. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, 2021.

FIDELIS, Eduarda Monteiro et al. Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) as a source of bioactive compounds for health benefits: A review. **Arabian Journal of Chemistry**, p. 103691, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103691>.

FORMAGLIO, P. et al. Nitric oxide controls proliferation of *Leishmania major* by inhibiting the recruitment of permissive host cells. **Immunity**, v. 54, n. 12, p. 2724–2739.e10, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.09.021>.

FUENTES, C. et al. Relevant essential oil components: a minireview on increasing applications and potential toxicity. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 31, n. 8, p. 559–565, 2021. <https://doi.org/10.1080/15376516.2021.1940408>.

GARCIA, A. R. et al. Antileishmanial screening, cytotoxicity, and chemical composition of essential oils: A special focus on *Piper callosum* essential oil. **Chemistry & biodiversity**, v. 20, n. 2, 2023. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200689>.

GARCIA, M. C. F. et al. The *in vitro* antileishmanial activity of essential oil from *Aloysia gratissima* and guaiol, its major sesquiterpene against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology**, v. 145, n. 9, p.1219–1227, 2018. <https://doi.org/10.1017/S0031182017002335>.

GONÇALVES, R. S. et al. Alterações eletrocardiográficas em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana tratados com antimoniato de meglumina: revisão integrativa. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 20, n. 1, p. 131, 2021. doi: <https://doi.org/10.9771/cmbio.v20i1.37087>

GONÇALVES, T. B., et al. Leishmanioses: aspectos epidemiológicos e perspectivas de tratamentos alternativos. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas E Tecnologia**, Paraná, vol. 10, n. 1, p. 1273–1282, 2022. <https://doi.org/10.16891/2317-434X.v.10.e1.a2022.pp1273-1282>.

MACHADO, Patricia de Almeida et al. PF-429242, a subtilisin inhibitor, is effective *in vitro* against *Leishmania infantum*. **Frontiers in Microbiology**, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.583834> .

MARCILI, A.; AZEVEDO, R. C de F. Alterações cutâneas secundárias à infecção por leishmania sp.: revisão de literatura. **Braz. J. of Develop**, Curitiba, Vol. 6 (4): 19328-19346, Abr 2020. doi: [10.34117/bjdv6n4-195](https://doi.org/10.34117/bjdv6n4-195).

MATHISON, B. A.; BRADLEY, B. T. Review of the clinical presentation, pathology, diagnosis, and treatment of leishmaniasis. **Laboratory medicine**, v. 54, n. 4, p. 363–371, 2023. <https://doi.org/10.1093/labmed/lmac134>.

MICHELON, A. et al. Atividade imunomodulatória de extratos de Uvaia (*Eugenia pyriformis*) sobre macrófagos murinos. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, vol. 6 (8): 57178-57184, ago.2020. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n8-212>

MIRAMIN-MOHAMMADI, A. et al. Immune Responses in Cutaneous Leishmaniasis: *in vitro* Thelper1/Thelper2 Cy-tokine Profiles Using Live Versus Killed *Leishmania major*. **Journal of Arthropod-Borne Diseases**, vol. 15, n.1, p. 126-135, mar. 2021. <https://doi.org/10.18502/jad.v15i1.6491>.

MIRANDA, N. et al. The photodynamic action of pheophorbide a induces cell death through oxidative stress in *Leishmania amazonensis*. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 174, p. 342–354, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.08.016>

MONZOTE, L. et al. Activity of the Essential Oil from *Chenopodium ambrosioides* Grown in Cuba against *Leishmania amazonensis*. **Chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 130–136, 2006. <https://doi.org/10.1159/000092858>

MORAIS, Mayara Castro de et al. Trypanocidal essential oils: A review. **Molecules**, v. 25, n. 19, p. 4568, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25194568>

MOREL, Carlos M. Inovação em saúde e doenças negligenciadas. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 8, p. 1522-1523, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2006000800001>

MOURA, G. M. R. de et al. Tratamento das lesões causadas pela leishmaniose tegumentar. **Revista Liberum accessum**, Goiânia, Vol. 3(1): 29-36, Jul. 2020. Acesso em: 05 de out. de 2022.

NUNES, T. A. DE L. et al. *Eugenia piauhiensis* Vellaff. essential oil and γ -elemene its major constituent exhibit antileishmanial activity, promoting cell membrane damage and *in vitro* immunomodulation. **Chemico-biological interactions**, v. 339, n. 109429, p. 109429, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109429>.

OLIVEIRA, T. A. S. et al. Antibacterial, antiparasitic, and cytotoxic activities of chemical characterized essential oil of *Chrysopogon zizanioides* roots. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v. 15, n. 8, p. 967, 2022. <https://doi.org/10.3390/ph15080967>

REVERTE, M.; SNÄKÄ, T.; FASEL, N. The dangerous liaisons in the oxidative stress response to *Leishmania* infection. **Pathogens**, v. 11, n. 4, p. 409, 2022. doi: 10.3390/pathogens11040409. <https://doi.org/10.3390/pathogens11040409>

RIBEIRO, C. V. et al. *Leishmania infantum* induces high phagocytic capacity and intracellular nitric oxide production by human proinflammatory monocyte. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, 2020. <https://doi.org/10.1590/0074-02760190408>

RODRIGUES, K. A. DA F. et al. *Eugenia uniflora* L. essential oil as a potential anti-*Leishmania* agent: Effects on *Leishmania amazonensis* and possible mechanisms of action. **Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**, v. 2013, p. 1–10, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/279726>.

RODRIGUES, K. A. DA F. et al. Syzygium cumini (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation *in vitro*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 160, p. 32–40, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.11.024>

ROTTINI, M. M. et al. Endlicheria bracteolata (Meisn.) Essential Oil as a Weapon Against Leishmania amazonensis: In Vitro Assay. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 14, p. 2525, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24142525>

ROSTAMI, M. N.; KHAMESIPOUR, A. Potential biomarkers of immune protection in human leishmaniasis. **Medical microbiology and immunology**, v. 210, n. 2–3, p. 81–100, 2021. Acesso em: 19 jul.2023. <https://doi.org/10.1007/s00430-021-00703-8>.

SAHA, A.; ROY, S.; UKIL, A. Cytokines and signaling networks regulating disease outcomes in leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 90, n. 8, 2022.. Acesso em: 21 jul. 2023. <https://doi.org/10.1128/iai.00248-22>

SAMANT, M. et al. Role of cytokines in experimental and human visceral leishmaniasis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, 2021. Acesso em: 19 jul. 2023. <https://doi.org/10.3389%2Ffcimb.2021.624009>

SANTANA, L. F. et al. Nutraceutical potential of bioactive compounds of Eugenia dysenterica DC in metabolic alterations. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 8, p. 2477, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27082477>

SANTIAGO, A. S.; PITA, S. S. DA R.; GUIMARÃES, E. T. Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual e a necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e29510716543, 2021. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16543>.

SANTOS, Larissa Sousa et al. Chemical composition, in vitro trypanocidal and antibacterial activities of the essential oil from the dried leaves of *Eugenia dysenterica* DC from Brazil. **Journal of essential oil bearing plants**, v. 22, n. 2, p. 347-355, 2019. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1626293>

SILVA-SILVA, J. V. et al. Carajurin induces apoptosis in Leishmania amazonensis promastigotes through reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v. 15, n. 3, p. 331, 2022. <http://doi:10.3390/ph15030331>.

SILVA, S. M. M. Eugenia dysenterica Mart. Ex DC. (cagaita): planta brasileira com potencial terapêutico. **Infarma Ciências Farmacêuticas**. Brasília, v. 27, n.1, p.49-95, 2015a. <http://dx.doi.org/10.14450/2318-9312.v27.e1.a2015.pp49-95>

SILVA, Sandra Márcia Mazuti et al. Eugenia Dysenterica Mart. Ex DC.(cagaita): Planta brasileira com potencial terapêutico. **Infarma Ciências Farmacêuticas**, v. 27, n. 1, p. 49-95, 2015b. <http://dx.doi.org/10.14450/2318-9312.v27.e1.a2015.pp49-95>

SILVEIRA, R.M.et al. Diversidade da Composição Química dos Óleos Essenciais de Eugenia – Myrtaceae: uma revisão. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.3, p. 33276-33303, mar 2021. doi: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n3-855>

SOUSA, J. P. A. DE et al. Antileishmanial activity of 2-amino-thiophene derivative SB-200. **International immunopharmacology**, v. 123, n. 110750, p. 110750, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.110750>

SOUSA, J. M. S. DE et al. Cytotoxic and antileishmanial effects of the monoterpene β -ocimene. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v. 16, n. 2, p. 183, 2023a. <https://doi.org/10.3390/ph16020183>

SOUZA, Wanderley de et al. **Doenças Negligenciadas**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 2010. <http://www.abc.org.br/IMG/pdf/doc-199.pdf>

VALDIVIESO-UGARTE, M. et al. Antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties of essential oils: A systematic review. **Nutrients**, v. 11, n. 11, p. 2786, 2019.
<https://doi.org/10.3390/nu11112786>

World Health Organization. **WHO**.2023. Acesso em:15/09/2023. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>