



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA
CURSO DE BACHARELADO EM BIOMEDICINA



FRANCIREGINA SILVA ARAÚJO
MÉRCYA LOPES BRAGA

**GALATO DE OCTILA: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA, PERFIL
CITOTÓXICO E ANÁLISE DA INTEGRIDADE DE MEMBRANA**

PARNAÍBA
2025

FRANCIREGINA SILVA ARAÚJO
MÉRCYA LOPES BRAGA

**GALATO DE OCTILA: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA, PERFIL
CITOTÓXICO E ANÁLISE DA INTEGRIDADE DE MEMBRANA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Biomedicina da
Universidade Federal do Delta do
Parnaíba (UFDPa), *Campus* Ministro
Reis Velloso, como requisito parcial para
a obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina, com habilitação em
Análises Clínicas.

Orientador: Prof. Dr. Klinger Antonio da
Franca Rodrigues

PARNAÍBA

2025

FRANCIREGINA SILVA ARAÚJO
MÉRCYA LOPES BRAGA

**GALATO DE OCTILA: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA,
PERFIL CITOTÓXICO E ANÁLISE DA INTEGRIDADE DE MEMBRANA**

Aprovado em: 27/06/2025

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Klinger Antônio da Franca Rodrigues
Orientador

Ma. Julyanne Maria Saraiva de Sousa
1º Examinador

Bac. Maria Gabrielly Gonçalves da Silva Sousa
2º Examinador

Aos nossos pais, Clemilda e Márcio, Francisco e Regina, por serem base, impulso e afeto em cada etapa desta realização. Aos meus avós, Joana e João, que partiram antes dessa conquista, vocês estarão para sempre no meu coração. E à minha tia Socorro, que sempre me guiou ao longo da minha jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos, primeiramente, a Deus, por nos guiar ao longo de nossa trajetória acadêmica, por nos dar força diante de cada obstáculo, além de nos fortalecer, conceder sabedoria e discernimento.

Somos gratos aos nossos pais — Márcio e Clemilda, Francisco e Regina — por serem nosso alicerce, pelo amor, incentivo e suporte ao longo dessa caminhada. À minha irmã Luana, fonte constante de força e inspiração.

Um agradecimento especial, de forma individual, à minha namorada Beatriz, pela parceria, pelo apoio incondicional aos meus sonhos e por sonhar junto comigo.

Agradeço ao meu primo Marcos Jarley, por ter me ajudado durante esse percurso, e à minha prima Renara, que mesmo de longe sempre torceu por mim.

Reconhecemos a importância dos amigos do LADIC, que nos auxiliaram durante a jornada acadêmica, contribuindo com os experimentos, compartilhando conhecimento e tornando cada etapa mais leve com sua amizade e dedicação. Em especial, agradeço à Vanessa, por ser luz nos meus dias, exemplo de amiga e profissional, e por mim acolher sempre com o coração aberto; ao Airton, por estar ao nosso lado nos momentos mais difíceis; e à Julyanne, por ser uma mulher forte, paciente e inspiração constante. À Yasmin, agradeço pessoalmente por sempre me arrancar um sorriso quando mais precisava. Obrigada, de coração, por tudo.

Agradeço também aos meus amigos Victor, Fernanda e Bianca, com vocês esta jornada foi, sem dúvida, mais leve e especial. E a todos que estiveram presentes com palavras de incentivo, apoio e carinho, meu sincero obrigado.

À Prof^a Dra. Loredana, que despertou em mim o amor pela pesquisa e nunca permitiu que eu duvidasse do meu potencial, minha profunda gratidão.

Ao nosso orientador, Prof. Dr. Klinger Antonio da França Rodrigues, expressamos nosso reconhecimento pela orientação atenta, incentivo constante e confiança, fundamentais para nosso crescimento acadêmico e pessoal.

Aos membros da banca examinadora, agradecemos por aceitarem gentilmente o convite e por contribuírem com valiosas críticas e sugestões que aprimoraram este trabalho.

Por fim, agradecemos às agências de fomento CAPES, FAPEPI e CNPq pelo apoio financeiro indispensável para o desenvolvimento da pesquisa aqui apresentada.

"Enquanto eu tiver perguntas e não houver
resposta, continuarei a escrever."
— *Clarice Lispector*

RESUMO

As leishmanioses representam um grupo de doenças tropicais negligenciadas, com ampla distribuição global e elevado impacto na saúde pública. A leishmaniose visceral (LV) destaca-se por sua alta letalidade quando não tratada, sendo causada principalmente por *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*. O tratamento atual é limitado por toxicidade, alto custo e resistência parasitária, o que evidencia a necessidade de novas alternativas terapêuticas. Nesse contexto, compostos fenólicos como o galato de octila (GO), um éster do ácido gálico, têm se mostrado promissores por suas atividades antimicrobianas e antiparasitárias. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antileishmania do GO frente às formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. donovani* e *L. infantum*, bem como seu perfil citotóxico em células de mamíferos e seus efeitos sobre a integridade da membrana plasmática dos parasitos. As formas promastigotas foram tratadas com diferentes concentrações do GO, resultando em inibição significativa do crescimento parasitário, com valores de CI_{50} de 2,61 μM para *L. donovani* e 2,79 μM para *L. infantum*. Na análise sobre as formas amastigotas axênicas de *L. infantum*, foi observado um CI_{50} de 15,6 μM , indicando atividade relevante também frente ao estágio intracelular do parasito. Os ensaios de citotoxicidade em células LLC-MK2 e RAW 264.7 demonstraram CC_{50} de 417,2 μM e 349,8 μM , respectivamente, resultando em índices de seletividade elevados, acima de 100, o que reforça a segurança do composto frente às células hospedeiras. Adicionalmente, o ensaio de integridade de membrana com marcador fluorescente SYTOX Green revelou aumento significativo da permeabilidade em promastigotas de *L. infantum*, sugerindo que a ação do GO pode estar associada a danos estruturais na membrana plasmática do parasito. Esses resultados indicam que o GO apresenta um perfil bioativo promissor, combinando eficácia antiparasitária, baixa citotoxicidade e provável mecanismo de ação associado à desestabilização da membrana, configurando-se como uma molécula candidata para estudos futuros no desenvolvimento de novas terapias contra a leishmaniose visceral.

Palavras-chave: Antileishmania; Derivados do ácido gálico; Galato de Octila; Leishmaniose Visceral.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a group of neglected tropical diseases with wide global distribution and high public health impact. Visceral leishmaniasis (VL) stands out for its high lethality when left untreated and is mainly caused by *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum*. Current treatments are limited by toxicity, high cost, and parasite resistance, highlighting the urgent need for new therapeutic alternatives. In this context, phenolic compounds such as octyl gallate (OG), an ester derivative of gallic acid, have shown promising antimicrobial and antiparasitic activity. This study aimed to evaluate the antileishmanial activity of OG against promastigote and axenic amastigote forms of *L. donovani* and *L. infantum*, as well as its cytotoxic profile in mammalian cells and its effects on parasite membrane integrity. Treatment of promastigote forms with different concentrations of OG resulted in significant parasite growth inhibition, with IC₅₀ values of 2.61 µM for *L. donovani* and 2.79 µM for *L. infantum*. Against axenic amastigote forms of *L. infantum*, OG showed an IC₅₀ of 15.6 µM, indicating relevant activity against this clinically significant stage. Cytotoxicity assays in LLC-MK2 and RAW 264.7 cells showed CC₅₀ values of 417.2 µM and 349.8 µM, respectively, resulting in high selectivity indexes above 120, supporting the compound's safety toward host cells. Furthermore, membrane integrity assays using SYTOX Green revealed a significant increase in membrane permeability in *L. infantum* promastigotes, suggesting that OG's mechanism of action may involve membrane destabilization. These findings indicate that OG exhibits a promising bioactive profile, combining antiparasitic efficacy, low cytotoxicity, and a possible membrane-targeting mechanism, making it a strong candidate for future studies in the development of new therapies for visceral leishmaniasis.

Keywords: Antileishmania; Gallic acid derivative; Octyl Gallate; Visceral Leishmaniasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Análise da distribuição mundial da endemicidade da leishmaniose visceral.....	17
Figura 2: Fases do desenvolvimento de <i>Leishmania</i> spp.....	19
Figura 3: Inseto vetor das leishmanioses.....	19
Figura 4: Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.....	21
Figura 5: Resposta imune à infecção por <i>Leishmania</i> spp.....	23
Figura 6: Apresentações clínicas das diferentes formas de leishmanioses.....	24
Figura 7: Estrutura molecular do galato de octila (GO).....	32

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Efeito do galato de octila (GO) sobre formas promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.....	36
Gráfico 2: Efeito do galato de octila (GO) sobre a viabilidade em macrófagos RAW 264.7, células LLC-MK2 após 72h de tratamento.....	37
Gráfico 3: Efeito do galato de octila (GO) sobre formas amastigotas axênicas de <i>Leishmania</i> spp.....	39
Gráfico 4: Efeitos do galato de Octila (GO) na permeabilidade da membrana plasmática de promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividade antileishmania, citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7 e células LLC-MK2, e valores do índice de seletividade (IS) calculados para o galato de octila (GO), anfotericina B e antimoniato de meglumina.....	38
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG - Ácido Gálico

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ANOVA - Analysis of Variance

ATCC - American Type Culture Collection

BOD - Biochemical Oxygen Demand

CDC - Center For Disease Control and Prevention

CC₅₀ - Concentração de Citotoxicidade de 50 % das células

CE₅₀ - Concentração Efetiva sobre 50 % das amastigotas

CI₅₀ - Concentração Inibitória para 50 % dos parasitos

DTNs - Doenças Tropicais Negligenciadas

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

EROs - Espécies Reativas De Oxigênio

EFSA - Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar

GO - Galato de Octila

IDA - Ingestão Diária Aceitável

IL-10 - Interleucina 10

IL-12 - Interleucina 12

IL-4 - Interleucina 4

IL-6 - Interleucina 6

IFN- γ - Interferon Gama

IS - Índice de Seletividade

LADIC - Laboratório De Doenças Infecciosas

LCD - Leishmaniose Cutânea Difusa

LCL - Leishmaniose Cutânea Localizada

LD - Leishmaniose Cutânea Disseminada

LDPC - Leishmaniose Dérmica Pós Calazar

LMC - Leishmaniose Mucocutânea

LT - Leishmaniose Tegumentar

LV - Leishmaniose Visceral

M1 - Macrófagos Ativados

M2 - Macrófagos Ativados Alternativamente
MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-zil)-2,5-difeniltetrazolio
NETs - Neutrophil Extracellular Traps
NO - Óxido Nítrico
OMS - Organização Mundial De Saúde
PMMA - Polimetilmetacrilato
PAHO - Organização Pan-Americana da Saúde
PBS - Phosphate Buffer Solution
RPMI - Roswell Park Memorial Institute
Sb^{III} - Antimonial Trivalente
Sb^V - Antimonial Pentavalente
SDS - Dodecil Sulfato De Sódio
SFB - Soro Fetal Bovino
TR - Tripanotiona Redutase
T CD4+ - Linfócitos T auxiliares
TGF- β - Fator de Crescimento Tumoral Beta
Th1 - Via T-helper 1
Th2 - Via T-helper 2
TNF- α - Fator De Necrose Tumoral Alfa
Tregs - Via T regulatórias
UFDFPar - Universidade Federal do Delta do Parnaíba

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Leishmanioses	16
2.2	Parasita e Vetor	18
2.3	Ciclo Biológico da <i>Leishmania</i> spp.	20
2.4	Resposta imune à infecção por <i>Leishmania</i> spp.	21
2.5	Manifestações clínicas	24
2.6	Tratamento	25
2.7	Galato de Octila	27
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo geral	30
3.2	Objetivos específicos	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	Local de Pesquisa	31
4.2	Fármacos e Reagentes Utilizados	31
4.3	Composto estudado	31
4.4	Manutenção de Parasitas	32
4.5	Cultura de células de mamíferos	33
4.6	Atividade antileishmania sobre às formas promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.	33
4.7	Análise da citotoxicidade celular em linhagem RAW 264.7 e LLC-MK2	33
4.8	Avaliação do índice de Seletividade (IS)	34
4.9	Atividade antileishmania sobre às formas amastigotas axênicas de <i>L. infantum</i>	34
4.10	Avaliação da integridade da membrana plasmática sobre <i>L. infantum</i>	35
4.11	Análise estatística	35
5	RESULTADOS	36
5.1	Atividade antileishmania do GO sobre formas promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.	36
5.2	Citotoxicidade do GO sobre RAW.264.7 e células LLC-MK2 (CCL-7)	37
5.3	Índice de Seletividade (IS)	38
5.4	Atividade antileishmania do GO sobre formas amastigotas axênica de <i>Leishmania (L.) infantum</i>	39
5.5	Ensaio de integridade da membrana plasmática sobre <i>L. infantum</i>	40
6	DISCUSSÃO	41
7	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses constituem um grupo de zoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos por insetos vetores pertencentes à subfamília Phlebotominae (Kaufer et al., 2017). Estão incluídas no grupo das Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) onde apresentam uma ampla distribuição geográfica, acometendo aproximadamente 100 países em cinco continentes (WHO, 2024). Sua incidência está fortemente associada a populações residentes em regiões subdesenvolvidas, caracterizadas por deficiências em infraestrutura sanitária e acesso limitado aos serviços de saúde. O gênero *Leishmania* compreende mais de 54 espécies, das quais 20 são patogênicas e capazes de se propagar entre mamíferos hospedeiros (Marinho-Júnior, 2023).

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é caracterizada por uma elevada letalidade quando não tratada adequadamente. Essa forma clínica é causada principalmente pelas espécies *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*, cuja infecção resulta na disseminação dos parasitas para órgãos internos como fígado, baço e medula óssea. A LV manifesta-se por um quadro clínico sistêmico, incluindo febre prolongada, perda de peso, anemia e esplenomegalia acentuada (Singh; Singh, 2020; Volpedo et al., 2021). Apesar da existência de outras formas de leishmaniose, como a tegumentar, a LV representa a mais crítica em termos de morbimortalidade. Sua gravidade é influenciada tanto pela espécie do parasito quanto pela resposta imunológica do hospedeiro (Yadagiri et al., 2023). Devido à sua complexidade clínica, aos desafios terapêuticos e ao impacto na saúde pública, especialmente em regiões endêmicas, a LV continua sendo uma das principais preocupações no enfrentamento das DTNs (El Mazini et al., 2022).

O tratamento da LV ainda se baseia nos mesmos fármacos utilizados desde a década de 1940 (Roatt et al., 2020). A terapia padrão, recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), é baseada no uso de antimoniais pentavalentes (Sb^V), que apresentam efeitos adversos severos, como comprometimento da função renal, inflamação pancreática e distúrbios do ritmo cardíaco (Van Griensven; Diro, 2019; Garza-Tovar et al., 2020). Medicamentos de segunda linha, como anfotericina B, miltefosina, paromomicina e pentamidina, podem

resultar em complicações ainda mais graves, uma vez que apresentam níveis de toxicidade superiores aos Sb^{V} (Pradhan et al., 2022).

Nesse contexto, bioativos derivados de plantas e seus análogos semissintéticos têm se destacado como alternativas promissoras no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Hassan et al., 2022). Entre esses compostos, destacam-se os ésteres alquílicos do ácido gálico (AG), como o galato de octila (GO), reconhecido por sua ampla aplicação industrial em razão de suas propriedades antioxidantes (Locatelli et al., 2009; Amisigo et al., 2019). No setor alimentício, o GO é valorizado por contribuir com a estabilidade e preservação da qualidade dos produtos, sendo autorizado no Brasil pela Resolução RDC nº 326/2019, que estabelece uma ingestão diária aceitável de até 30 mg/kg (ANVISA, 2019).

Além de seu uso como aditivo, o GO possui uma estrutura química que favorece a permeabilidade celular, o que amplia seu potencial terapêutico (Ni et al., 2024). Diversas pesquisas destacam sua atividade frente a diferentes microrganismos, com efeitos relatados em estudos sobre vírus (Uozaki et al., 2007), bactérias (Stefaniu et al., 2021) e fungos (Tamang et al., 2022), bem como em células tumorais (Chua et al., 2020), demonstrando um perfil farmacológico multifuncional. Mais recentemente, a atividade antiparasitária do GO tem sido investigada contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* (Feuser et al., 2018) e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Andréo et al., 2015), apresentando resultados promissores. Paralelamente, estudos em outros modelos demonstram que o GO apresenta baixa citotoxicidade em células de mamíferos e capacidade de induzir apoptose mediada por estresse oxidativo (Vijayalakshmi et al., 2023), reforçando seu potencial como candidato terapêutico.

Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar, *in vitro*, a atividade leishmanicida do GO sobre formas promastigotas de *L. donovani* e *L. infantum*, os principais agentes etiológicos da leishmaniose visceral. Até o momento, não há evidências de atividade significativa do composto contra essas formas parasitárias, o que torna necessária uma avaliação mais profunda, com a caracterização do perfil bioativo do GO, a avaliação de sua citotoxicidade em células de mamíferos e a análise dos efeitos induzidos na integridade da membrana do parasito.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de doenças infecto-parasitárias não contagiosas, causadas por protozoários da família *Trypanosomatidae* (Sheikh, 2023). Consideradas uma das parasitoses de maior relevância em saúde pública global, as leishmanioses apresentam elevado índice de morbimortalidade, com ocorrência de milhões de novos casos anualmente (Yurchenko et al., 2023).

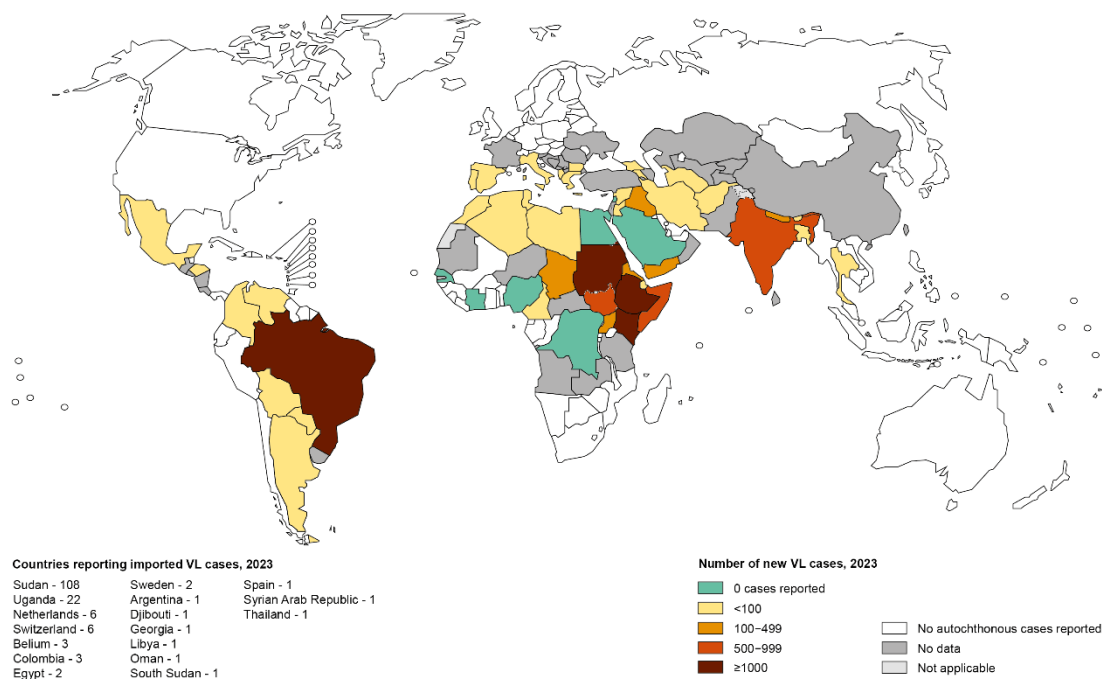
A distribuição geográfica das leishmanioses é ampla e heterogênea, sendo comumente categorizada em duas grandes regiões epidemiológicas: Velho Mundo e Novo Mundo. No Velho Mundo, a maior prevalência é observada na Ásia, África e Europa; já no Novo Mundo, os casos se concentram desde o México e América Central até a América do Sul (Morales et al., 2024). Essa ampla diversidade geográfica contribui para variações nos perfis epidemiológicos, nas manifestações clínicas e nos desafios enfrentados em relação ao controle e ao tratamento da doença (Evangelidou et al., 2024).

Geograficamente, as leishmanioses acometem aproximadamente 100 países distribuídos em cinco continentes, refletindo sua ampla disseminação global. Estima-se a ocorrência anual de cerca de 1 milhão de novos casos de leishmaniose tegumentar. Dentre as formas clínicas, a LV se destaca por sua maior gravidade, sendo responsável por aproximadamente 50.000 a 90.000 novos casos a cada ano, com uma estimativa de 5.000 a 10.000 óbitos anuais (WHO, 2024).

Em 2023, Brasil, Índia, Sudão e Quênia registraram as maiores incidências de novos casos de LV (Figura 1). De forma geral, a LV apresenta uma distribuição geográfica concentrada, sendo que Brasil, Etiópia, Quênia e Sudão são responsáveis por aproximadamente 60% dos casos notificados em todo o mundo (WHO, 2024). Na América do Sul, o Brasil destaca-se como o principal país endêmico, concentrando cerca de 90% dos casos humanos de LV (Silva et al., 2023). Essa elevada incidência está fortemente associada a processos de urbanização e desmatamento, os quais favorecem a transição do ciclo de transmissão das áreas silvestres para ambientes urbanos, contribuindo para a expansão da doença. Adicionalmente, fatores como a migração humana e o transporte de animais infectados favorecem a introdução da LV

em regiões anteriormente não endêmicas, ampliando ainda mais seu alcance geográfico (Rehbein et al., 2019).

Figura 1: Análise da distribuição mundial da endemicidade da leishmaniose visceral.



Fonte: Organização Mundial da Saúde (WHO). Número de novos casos de leishmaniose visceral em 2024.

De acordo com dados do Ministério da Saúde, no Brasil, a leishmaniose visceral (LV) mantém-se como um importante problema de saúde pública, registrando nos últimos cinco anos uma média anual de aproximadamente 3.500 casos, com um coeficiente de incidência de 2,0 casos por 100.000 habitantes. A distribuição da LV no território nacional é predominantemente concentrada nos estados do Maranhão, Pará, Bahia e Ceará, configurando essas regiões como áreas de maior endemicidade. Apesar de menos frequente, a forma visceral apresenta uma taxa de letalidade significativamente superior à da forma tegumentar, refletindo seu maior potencial de desfechos adversos e mortalidade (BRASIL, 2022).

A região Nordeste do Brasil concentra um expressivo número de casos de LV, totalizando 18.778 novos registros em um determinado intervalo de tempo. O estado do Maranhão apresenta o maior número absoluto de casos, com 5.805 notificações, seguido pelo Ceará (4.052 casos), Bahia (2.962 casos) e Piauí (1.909 casos). No

estado do Piauí, dados epidemiológicos indicam que a capital Teresina apresenta a maior incidência, com 26,3 casos por 100.000 habitantes, sendo seguida pelos municípios de Barras (3,4%) e Parnaíba (3,3%). As condições climáticas da região Nordeste, marcadas por clima tropical úmido e quente, favorecem a proliferação dos flebotomíneos, vetores da *Leishmania*. Esses insetos são atraídos por ambientes sombreados, úmidos e ricos em matéria orgânica em decomposição, o que contribui para a manutenção do ciclo de transmissão da leishmaniose visceral em áreas urbanas e periurbanas (Santos et al., 2021).

2.2 Parasita e Vetor

O gênero *Leishmania* é classificado em dois subgêneros principais: *Leishmania* (*Viannia*) e *Leishmania* (*Leishmania*), de acordo com critérios morfológicos e genéticos (Ravasi et al., 2024). As espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania* (*Viannia*) apresentam um ciclo de vida caracterizado pela colonização inicial do intestino posterior do inseto vetor, com migração posterior para o intestino médio. Por outro lado, as espécies do subgênero *Leishmania* (*Leishmania*) desenvolvem-se predominantemente na região média do intestino do vetor (Klatt et al., 2019).

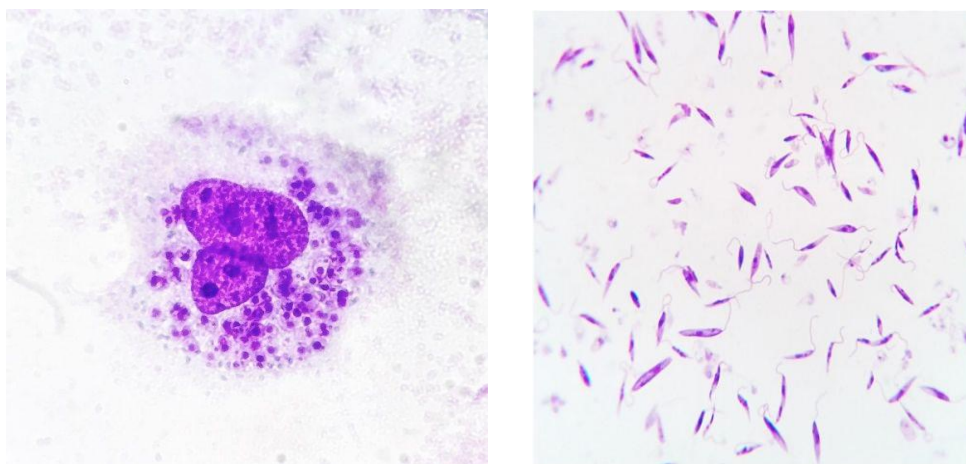
O protozoário do gênero *Leishmania* é um parasito dimórfico, apresentando formas evolutivas distintas ao longo de seu ciclo biológico. A forma promastigota é caracterizada por sua morfologia alongada e flagelada, com corpo delgado que varia entre 15-20 µm de comprimento e 1,5-3,5 µm de largura, sendo adaptada ao ambiente extracelular no intestino do inseto vetor. Em contraste, a forma amastigota apresenta morfologia ovoide, com dimensões reduzidas de 2-4 µm de diâmetro e flagelo internalizado. Essa forma é especializada para o ambiente intracelular no hospedeiro vertebral (Figura 2) (Mergen, 2023; Sasidharan; Saudagar et al., 2021).

Os parasitos responsáveis pela leishmaniose são transmitidos por meio do repasto sanguíneo de insetos vetores hematófagos. No Velho Mundo, os vetores pertencem ao gênero *Phlebotomus*, enquanto no Novo Mundo, a transmissão ocorre principalmente por espécies do gênero *Lutzomyia* (Figura 3) (Alemayehu et al., 2024).

Os flebotomíneos desempenham um papel significativo na saúde pública, especialmente em regiões tropicais e subtropicais, onde fatores ambientais como o

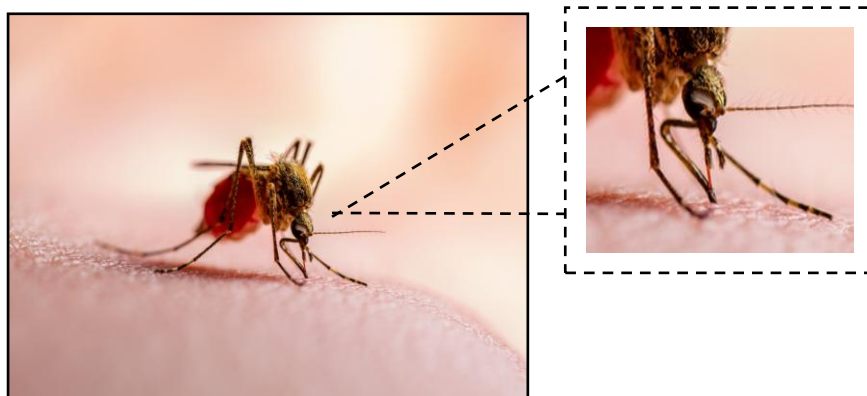
aumento da temperatura favorecem sua proliferação e o desenvolvimento completo do ciclo biológico. Temperaturas elevadas aceleram a metamorfose desses insetos, aumentando sua densidade populacional e, conseqüentemente, o risco de transmissão da leishmaniose (Aklilu et al., 2023). A infecção ocorre predominantemente no período noturno, por meio da picada das fêmeas hematófagas dos flebotomíneos, popularmente conhecidas como “chiclera”, “asa branca”, “palomilla”, “mosquito palha” ou “torito”, a depender da região (PAHO, 2023).

Figura 2: Fases do desenvolvimento de *Leishmania* spp.



Fonte: Sousa et al., 2023. Formas amastigotas (A); Formas promastigotas (B).

Figura 3: Inseto vetor das leishmanioses.



Fonte: Vitat - RD Saúde, 2022. *Lutzomyia longipalpis*, flebotomíneo responsável pela transmissão das leishmanioses no Novo Mundo (adaptação de Araújo e Braga).

2.3 Ciclo Biológico da *Leishmania* spp.

O ciclo de vida do protozoário envolve um vetor pertencente aos flebótomos, conhecidos como mosquito-palha, birigui e outros, dependendo da região (Barbosa, 2023). Para que o parasita complete seu ciclo, a fêmea do mosquito deve praticar hematofagia. Durante a picada, o aparelho bucal do vetor rompe os tecidos e vasos sanguíneos, permitindo a introdução das promastigotas metacíclicas no hospedeiro vertebrado (Braga, 2023).

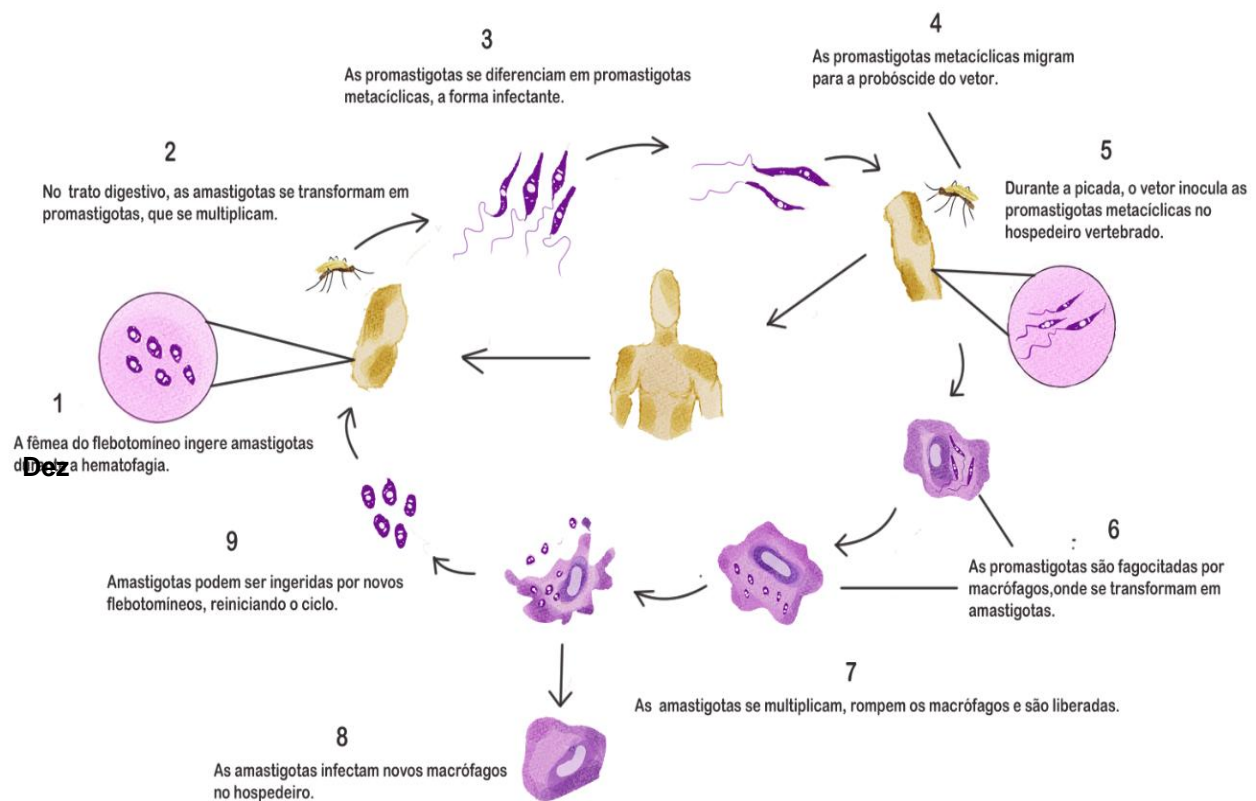
No inseto vetor, o ciclo inicia-se quando o mosquito ingere sangue contendo amastigotas durante a alimentação (Figura 4.1). No trato digestivo do inseto, as amastigotas são fagocitadas e se diferenciam em promastigotas no intestino médio (Figura 4.2) (Dias-Lopes et al., 2021). Essas formas móveis se aderem às paredes intestinais, onde passam por vários ciclos de divisão celular, transformando-se em promastigotas metacíclicas (Figura 4.3). Durante este período de incubação extrínseca, as promastigotas amadurecem, adquirindo características infectantes essenciais para a sobrevivência no hospedeiro vertebrado (Klatt et al., 2019; Serafim et al., 2021). Posteriormente, elas migram para a probóscide do inseto, prontos para serem transmitidas a um novo hospedeiro durante a próxima picada (Figura 4.4). Além disso, a saliva do vetor contém componentes farmacológicos que modulam a resposta imune local do hospedeiro, favorecendo a sobrevivência inicial das promastigotas (Sasidharan; Saudagar, 2021).

Liberadas na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado (Figura 4.5), o protozoário irá à procura do sistema fagocitário mononuclear, que inicia automaticamente sua função de proteção. No entanto, antes que a fagocitose seja concluída, as promastigotas sofrem modificações, como a ativação de genes e fatores de virulência que impedem a destruição precoce do parasita (Dutra, 2021).

Uma vez dentro de células fagocíticas, como os macrófagos, as promastigotas se transformam em amastigotas, que se alojam no vacúolo parasitóforo (Figura 4.6). Esse vacúolo tem a função de degradar o parasita usando enzimas lisossomais, mas esse processo é retardado pela ação de proteases produzidas pelo próprio protozoário, permitindo que ele se adapte ao ambiente intracelular e resista ao meio ácido (Soares et al., 2021; Vital et al., 2022).

Sem um mecanismo eficaz para controlar o parasita, as amastigotas se reproduzem continuamente por meio de fissão binária dentro das células, levando à ruptura da membrana celular e à liberação do protozoário no meio extracelular (Figura 4.7). Ali, eles são novamente fagocitados por outras células, perpetuando a disseminação da infecção (Figura 4.8) (Hagemann et al., 2023).

Figura 4: Ciclo biológico da *Leishmania* spp.



Fonte: Autoria Própria, 2025.

2.4 Resposta imune à infecção por *Leishmania* spp.

A interação entre o sistema imunológico e a *Leishmania* spp. é um fator determinante para a progressão da infecção ou a eliminação do parasito. A resposta imune envolve mecanismos inatos e adaptativos que, dependendo da sua modulação, podem favorecer a resistência ou a persistência da infecção (Costa-da-Silva et al., 2022).

No momento da transmissão pelo vetor, a *Leishmania* spp. entra em contato com células do sistema imune inato, como neutrófilos e macrófagos. Os neutrófilos,

recrutados rapidamente para o local da infecção, exercem um papel ambíguo (De Souza Vieira et al., 2024). Embora fagocitem o parasito e liberem espécies reativas de oxigênio (EROs) e armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), o parasita desenvolveu mecanismos para subverter essa defesa (Kupani et al., 2021). Frequentemente, as promastigotas sobrevivem dentro dos neutrófilos, que acabam sofrendo apoptose e liberando os parasitas viáveis no ambiente tecidual, facilitando sua captura por macrófagos próximos (Fernandes; Zamboni, 2024). Esse processo inicial, ilustrado na Figura 1, mostra como a infecção pode progredir mesmo diante da resposta imune inata aparentemente ativa.

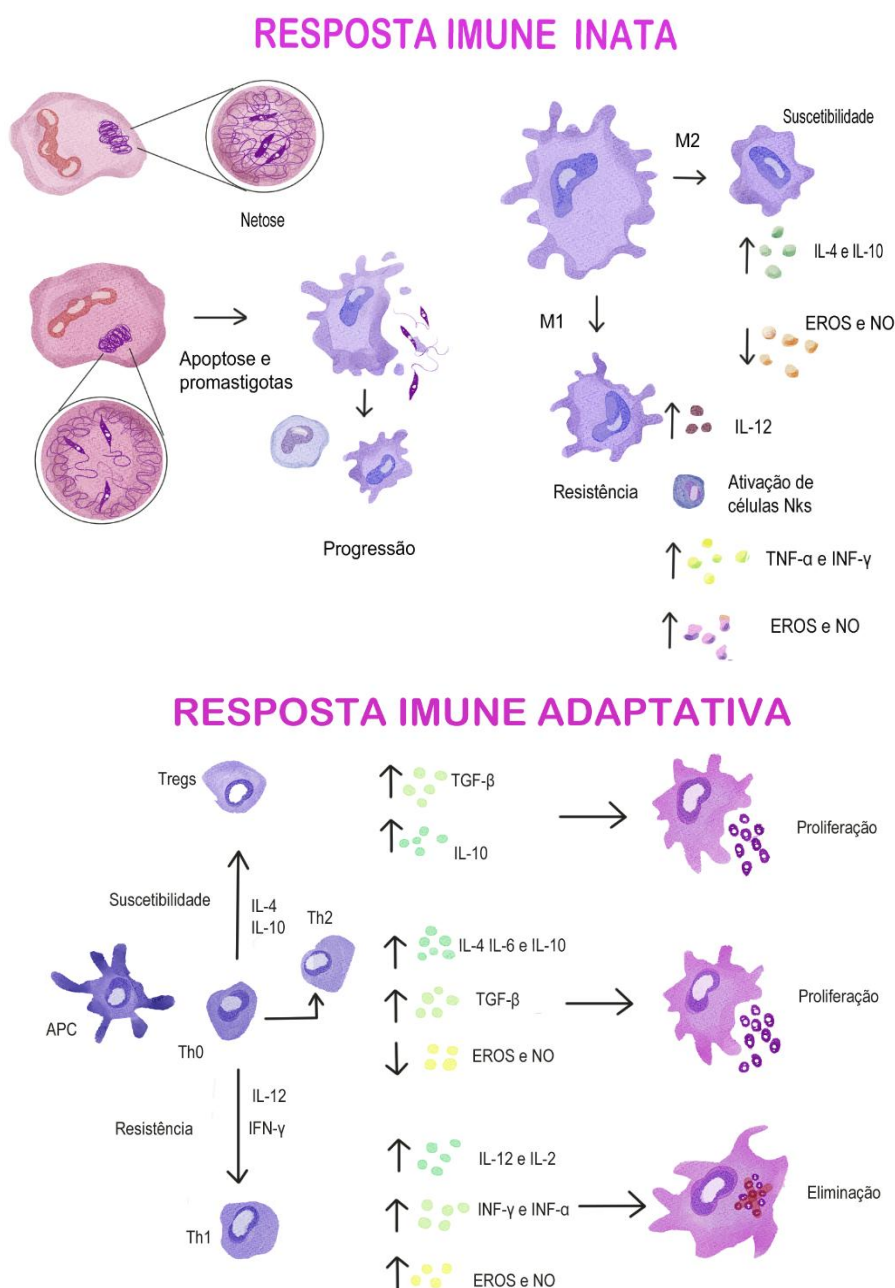
Os macrófagos, ao fagocitarem as promastigotas liberadas, tornam-se células-chave no destino da infecção, podendo atuar tanto como efetores da resposta microbida quanto como hospedeiros do parasito (Elmahallawy; Alkhaldi; Saleh, 2021). A diferenciação dessas células em perfis M1 ou M2 influencia diretamente esse desfecho. O fenótipo M1, induzido por citocinas como interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), está associado à produção de óxido nítrico (NO), EROs e liberação de IL-12, contribuindo para a ativação de células NKs (Natural Killers) e o reforço da resposta inflamatória (Lecoeur et al., 2022). Esse eixo M1/IL-12/INF- γ , evidenciado na Figura 1, está relacionado à resistência do hospedeiro e ao controle do crescimento.

Em contrapartida, a polarização para o perfil M2, estimulada por interleucinas como IL-4 e IL-10, reduz a atividade microbida dos macrófagos, favorecendo a replicação da *Leishmania* spp. no interior do fagolisossomo (Atri et al., 2018). Esse cenário contribui para a persistência do parasito nos tecidos e está associado à susceptibilidade, conforme também representado na Figura 1, que demonstra visualmente uma resposta inflamatória eficaz e uma permissiva.

A resposta adaptativa é igualmente decisiva para o controle ou agravamento da infecção. Após o reconhecimento do antígeno pelas células apresentadoras, os linfócitos T CD4⁺ podem se diferenciar em perfis Th1 ou Th2 (Na; Engwerda, 2024). A resposta Th1, promovida por IL-12 e sustentada pela liberação de IFN- γ , reforça a ativação de macrófagos M1 e estimula a produção de NO e EROs, sendo essencial para a eliminação do parasito (Almeida et al., 2023). Já o perfil Th2, impulsionado por IL-4, IL-6 e IL-10, induz um ambiente anti-inflamatório que compromete a ação dos macrófagos, contribuindo para a proliferação parasitária e maior suscetibilidade à infecção (Costa-da-Silva et al., 2022).

Além dessas vias, células T regulatórias (Tregs) também participam da modulação da resposta imune por meio da produção de IL-10 e TGF- β . Embora sua função seja essencial para evitar danos teciduais, sua atuação excessiva pode inibir mecanismos efetores e permitir a manutenção da infecção (Kupani et al., 2021). A Figura 1 integra esse eixo adaptativo ao representar a diferenciação dos linfócitos Th0 em Th1 ou Th2, bem como o papel imunossupressor das Tregs.

Figura 5: Resposta imune à infecção por *Leishmania* spp.



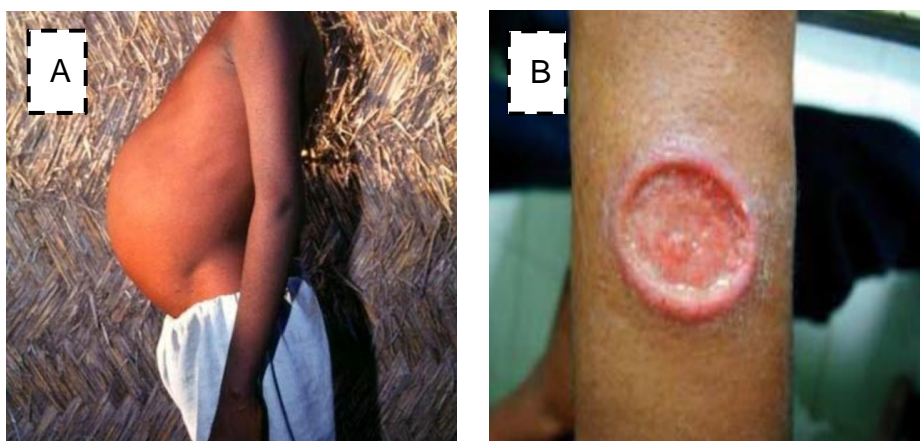
Fonte: Autoria Própria, 2025.

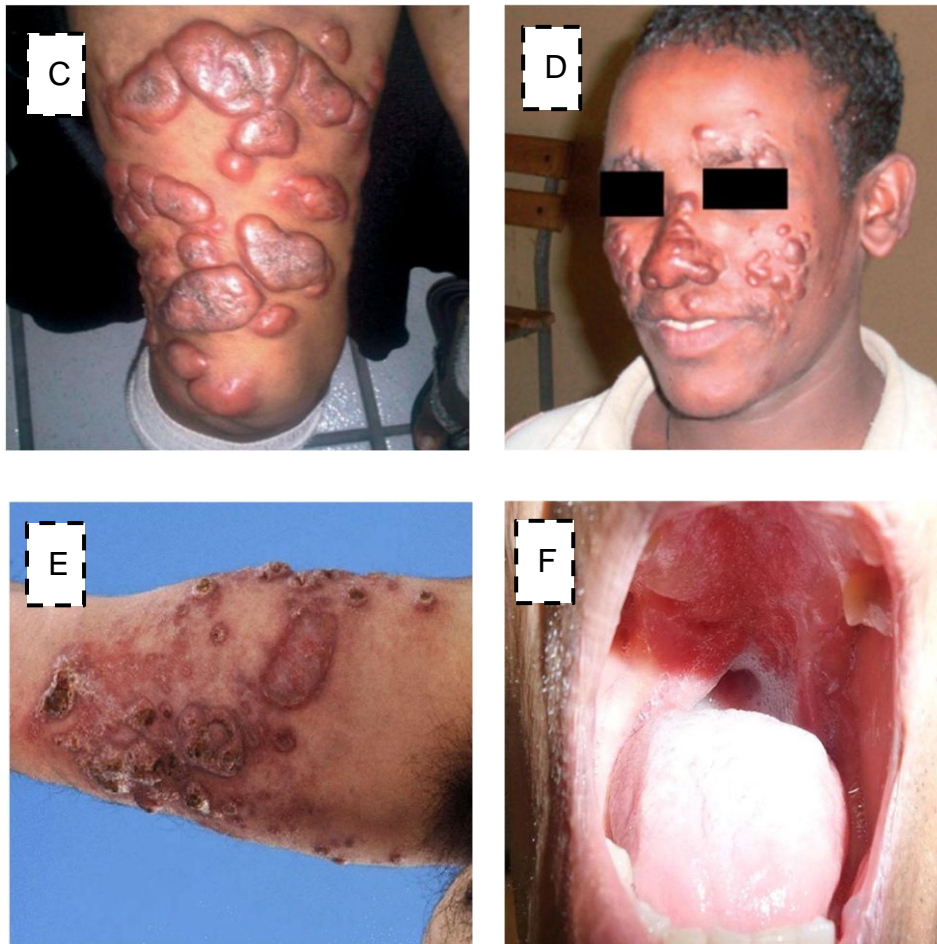
2.5 Manifestações clínicas

A leishmaniose apresenta ampla diversidade em suas manifestações clínicas, variando conforme as características do parasito, a biologia do vetor e os fatores do hospedeiro. Dentre essas, as respostas imunológicas do hospedeiro desempenham um papel determinante. Clinicamente, a doença se divide em LV causada por parasitos da espécie de *L. donovani* e *L. infantum*, e a LT associada há uma diversidade de espécies que estão relacionadas a diferentes manifestações clínicas. A LT inclui subtipos como: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose mucocutânea (LCM), leishmaniose cutânea disseminada (LCD) e leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC) (Abass *et al.*, 2020).

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença grave e persistente, considerada a segunda mais letal entre as doenças tropicais e subtropicais, além de ocupar uma posição sétima em perda de anos de vida ajustada por incapacidade. A *L. donovani* é restrita ao Velho Mundo e já no Novo Mundo predomina o *L. infantum* como Europa e nas Américas (Wamai *et al.*, 2020). Clinicamente, a LV apresenta curso prolongado, caracterizado por febre, perda de peso, palidez, hepatoesplenomegalia (aumento do fígado e baço) e linfadenopatia (aumento dos linfonodos). A doença tem alta taxa de mortalidade, com 5% a 10% dos casos evoluindo para óbito devido a complicações graves, como co-infecções bacterianas e hemorragias. Entre as alterações hematológicas, destacam-se anemia, neutropenia e trombocitopenia (Costa *et al.*, 2023).

Figura 6: Apresentações clínicas das Leishmanioses.





Fonte: Silveira et al., 2016; Mokni, 2019; Mann et al., 2021; OPAS; OMS, 2021. (A) Leishmaniose Visceral, (B) Leishmaniose Cutânea Localizada, (C) Leishmaniose Cutânea Disseminada, (D) Leishmaniose Mucocutânea, (E) Leishmaniose Cutânea Difusa e (F) Leishmaniose Dérmica Pós Calazar.

2.6 Tratamento

Há mais de 70 anos, o tratamento das leishmanioses depende de medicamentos classificados em primeira e segunda linha (Roatt et al., 2020). A escolha da terapia inicial considera tanto a localização geográfica quanto a manifestação clínica e a espécie envolvida, sendo direcionada por diretrizes da Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO et al., 2023). Os antimoniais pentavalentes (Sb^V), conhecidos comercialmente como Glucantime® (antimoniato de N-metil D-glucamina) e Pentostam® (estibogluconato de sódio), são geralmente a primeira opção terapêutica (OPAS, 2022). Quando esses medicamentos não são viáveis, utilizam-se alternativas de segunda linha, como anfotericina B (AmB), pentamidina, paromomicina e miltefosina (Garza-Tovar et al., 2020).

Os Sb^{V} são pró-fármacos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses, administrados por vias intramuscular, intravenosa ou interlesional, em doses de aproximadamente 20 mg/kg/dia por 28 a 30 dias (Matos et al., 2020). Sua ação envolve a entrada da molécula na forma inativa, sendo posteriormente convertida em antimonial trivalente (Sb^{III}) no interior do parasita (Ponte-Sucre et al., 2017). O Sb^{III} atua sobre a enzima tripanotona redutase, essencial para a defesa antioxidante do protozoário, comprometendo sua sobrevivência. No entanto, esses medicamentos apresentam efeitos adversos severos, incluindo cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e pancreatite (Zhang et al., 2025). Outras desvantagens incluem a longa duração do tratamento, o desconforto relacionado à administração e a resistência medicamentosa, muitas vezes associada à interrupção prematura da terapia (Moncada-Diaz et al., 2024).

A anfotericina B, um antifúngico pertencente à classe dos polienos, é utilizada como terapia de segunda linha, administrada por via intravenosa em doses diárias de 0,75 a 1 mg/kg/dia por 15 a 20 dias, de forma contínua ou alternada (Chakravart; Sundar, 2019). Sua ação é baseada na afinidade pelo ergosterol presente na membrana plasmática do parasita, promovendo a formação de poros que levam à perda de íons e à morte celular por desequilíbrio osmótico (Chanda et al., 2021). Apesar da eficácia, o fármaco apresenta eventos adversos significativos, como toxicidade renal, hipocalcemia e reações infusionais, além da necessidade de hospitalização (Sheikh et al., 2024). A anfotericina B lipossomal, também administrada por via intravenosa, é incorporada em vesículas lipossomais que reduzem a toxicidade, embora efeitos adversos como calafrios, rigidez muscular e nefrotoxicidade ainda possam ocorrer (Frézard et al., 2022). Seu uso, entretanto, é limitado pelo alto custo, sendo aplicada em dose total de 15 mg/kg de 3 a 5 dias (Aronson; Joya, 2019).

A miltefosina, administrada por via oral na dose de 100 a 150 mg/dia durante 28 dias, atua sobre os fosfolípidos da membrana celular do parasita, desestabilizando-a e induzindo um processo semelhante a apoptose (Benaim; Paniz-Mondolfi, 2024). Seus efeitos adversos mais comuns incluem distúrbios gastrointestinais, toxicidade renal e hepática, além de risco de teratogenicidade (Pradhan et al., 2022).

A paromomicina, um antibiótico aminoglicosídeo, pode ser administrada por via intramuscular em doses de 15 mg/kg/dia por 21 dias ou 20 mg/kg/dia por 17 dias

(Singh et al., 2023). Embora seu mecanismo de ação ainda não esteja totalmente elucidado, acredita-se que ela atue na membrana mitocondrial, prejudicando a cadeia respiratória, promovendo condensação nuclear, fragmentação do DNA e interferência na síntese proteica. Seus principais efeitos adversos são toxicidade renal e hepática (Pokharel; Ghimire; Lamichhane, 2021).

A pentamidina, administrada por via intramuscular na dose de 4 mg/kg/dia em dias alternados, totalizando quatro aplicações, atua interferindo na membrana mitocondrial do parasita e inibindo os processos de replicação e transcrição (Fischer et al., 2024). Entre os efeitos adversos relatados estão hiperglicemia, hipotensão e alterações eletrocardiográficas (Santiago et al., 2021).

Apesar da disponibilidade de diversas opções terapêuticas, o tratamento das leishmanioses ainda enfrenta desafios consideráveis. As principais limitações dos fármacos utilizados incluem a elevada toxicidade sistêmica, que compromete órgãos como coração, rins e fígado, e a necessidade de hospitalização em muitos casos (De Souza et al., 2024). Além disso, o alto custo de produção e aquisição desses medicamentos restringe o acesso em regiões endêmicas, principalmente em países de baixa renda. A eficácia terapêutica limitada e a ocorrência de resistência medicamentosa também impactam negativamente a adesão dos pacientes ao tratamento, reforçando a necessidade de desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas mais seguras, eficazes e acessíveis (Santiago et al., 2021; Ibiapina et al., 2022).

2.7 Galato de Octila

O galato de octila (GO) é um éster derivado do ácido gálico, um composto pertencente à classe dos fenóis, e do álcool octílico. O GO é conhecido por suas propriedades antioxidantes e amplamente utilizado na prevenção da autoxidação de lipídios (Hadidi et al., 2024).

Esse composto pode ser obtido de forma semissintética ou extraído de diversas fontes naturais, como frutas e vegetais. Entre essas fontes, destacam-se *Phyllanthus emblica* (groselha indiana) (Long et al., 2024), *Camellia sinensis* L. (chá verde) (Zhou et al., 2020), *Vaccinium corymbosum* L. (mirtilo) (Ștefănescu et al., 2020), *Rubus fruticosus* L. (amora) (Da Rosa et al., 2014), *Rubus idaeus* L.

(framboesa) (La Torre et al., 2024), *Mangifera indica* L. (manga) (Kim et al., 2021), e *Theobroma cacao* L. (cacau) (Umali et al., 2025). Outra fonte relevante é *Terminalia bellerica* Roxb. (belerique ou bibhitaki), uma planta medicinal indiana amplamente utilizada na medicina tradicional, notável por seu potencial terapêutico e pelas características distintas de seus frutos conforme o estágio de maturação (Olajide et al., 2022).

Em comparação ao ácido gálico, o galato de octila possui uma cadeia lateral alifática com oito átomos de carbono, o que lhe confere maior lipofilicidade, afinidade e permeabilidade celular. Essa modificação estrutural resulta em propriedades biológicas mais potentes, aumentando sua eficácia em diferentes aplicações (Latha; Daisy, 2013; Ni et al., 2024). No setor cosmético, é utilizado na preservação de produtos e no tratamento do envelhecimento cutâneo. Já na indústria alimentícia, contribui para o aumento da vida útil dos produtos, preservando suas características sensoriais e nutricionais — um fator crucial para a rentabilidade do setor (Khan et al., 2018; Gangadharan et al., 2024).

No Brasil, o uso do GO é regulamentado pela Instrução Normativa ANVISA/RDC nº 211/2023, que estabelece um limite máximo de 200 mg/kg para determinadas categorias de alimentos, como a gordura anidra de leite, embora seu uso seja restrito em produtos lácteos (ANVISA, 2023). Em outros países, como na União Europeia, ainda não há uma ingestão diária aceitável (IDA) estabelecida para o GO, o que ressalta a necessidade de mais estudos sobre sua segurança e toxicidade (EFSA, 2015).

Diversos estudos recentes têm explorado as múltiplas atividades do galato de octila, incluindo suas propriedades antimicrobianas e antitumorais. O GO demonstrou eficácia contra uma ampla gama de microrganismos, incluindo o vírus HSV-1 (Uozaki et al., 2007), as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Stefaniu et al., 2021), e o fungo *Candida albicans* (Tamang et al., 2022), bem como demonstrou efeitos antitumorais significativos. Estudos em modelos demonstraram que o GO possui capacidade de induzir apoptose mediada por estresse oxidativo (Chua et al., 2023).

Além de suas propriedades antibacterianas, antivirais e antitumorais, o GO tem sido investigado em estudos voltados ao tratamento de parasitoses, como a toxoplasmose (Lu et al., 2022). Comparado aos tratamentos convencionais, o GO apresenta atividade inibitória significativa contra os parasitas, com poucos danos

celulares. O composto também demonstrou eficácia contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* quando encapsulado em nanopartículas de polimetilmetacrilato (PMMA), apresentando valores de CI_{50} de 4,6 μM e 7,2 μM , respectivamente (Feuser et al., 2019). Outros estudos observaram sua atividade antiparasitária contra epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, com valores de CI_{50} de 23,0 μM (Andréo et al., 2015). Esses dados reforçam o potencial do GO como uma alternativa terapêutica promissora, com a vantagem adicional de apresentar baixa citotoxicidade em células de mamíferos e capacidade de induzir apoptose via estresse oxidativo (Moghtaderi et al., 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antileishmania do GO sobre as espécies *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*, com ênfase na análise da citotoxicidade em células de mamíferos e na investigação da permeabilidade de membranas.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a atividade antileishmania do GO em promastigotas de *L. donovani* e *L. infantum*.
- Analisar a citotoxicidade do GO em macrófagos RAW 264.7 e em células LLC-MK2 (CCL-7);
- Investigar a atividade antileishmania do GO em amastigotas axênicas de *L. infantum*;
- Avaliar os efeitos do GO na integridade e permeabilidade da membrana plasmática das formas promastigotas de *L. infantum*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de Pesquisa

As atividades biológicas foram conduzidas no Laboratório de Doenças Infecciosas (LADIC), vinculado à Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr), no Campus Ministro Reis Velloso, localizado em Parnaíba, Piauí, Brasil.

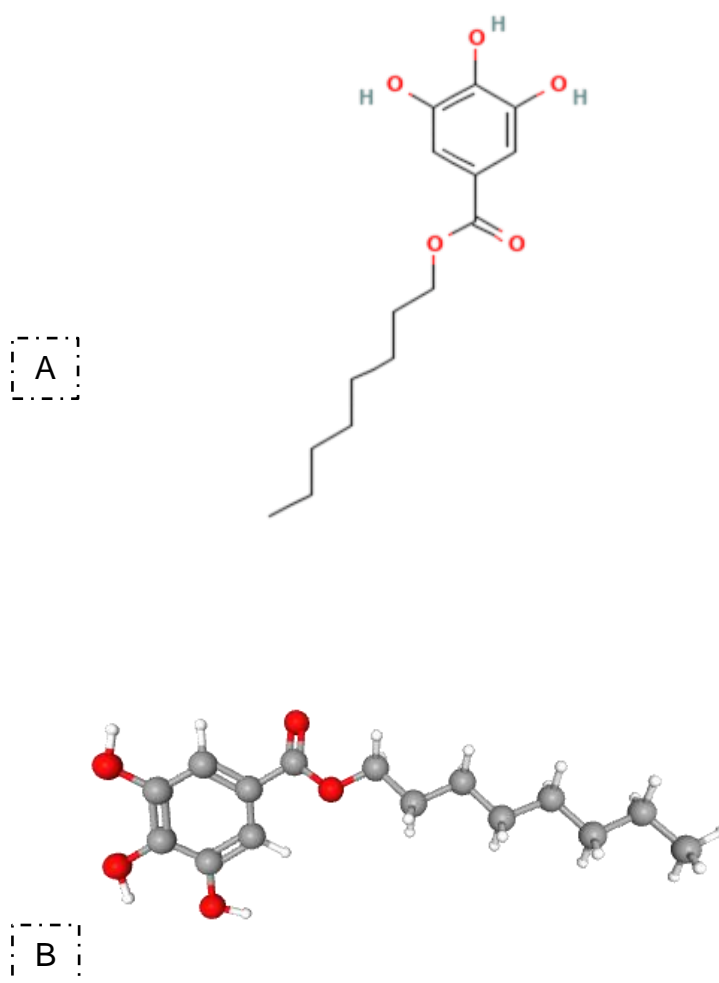
4.2 Fármacos e Reagentes Utilizados

Meio Schneider; meio DMEM e RPMI 1640 (Dulbecco's Modified Eagle Medium); solução antibiótica estabilizada contendo penicilina (10.000 U/mL) e estreptomicina (10 µg/mL); solução antibiótica-antimicótica estabilizada (penicilina 10.000 U/mL e estreptomicina 10 µg/mL); e sal de tetrazólio (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazólio - MTT, todos adquiridos da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA); dimetilsulfóxido (DMSO, 99% de pureza, utilizado em concentrações não superiores a 0,5%), SYTOX Green, Triton X-100 e lauril sulfato de sódio (SDS, dodecil sulfato de sódio, ambos adquiridos da Mallinckrodt Chemicals, St. Louis, MO, EUA); e soro fetal bovino (SFB) inativado por calor, obtido da Cultilab, São Paulo, SP, Brasil.

4.3 Composto estudado

A Figura 7 mostra a estrutura química do GO, com fórmula molecular $C_{18}H_{21}O_5$. O composto foi utilizado com **99% pureza**, obtido pela empresa Merck Life Science e dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO). As soluções foram diluídas até atingirem as concentrações desejadas, garantindo que a concentração de DMSO não ultrapassasse 0,5%.

Figura 7: Estrutura molecular do galato de octila (GO).



Fonte: National Center for Biotechnology Information - PubChem, 2024. Estrutura molecular do GO em 2 dimensões (A) e 3 dimensões (B).

4.4 Manutenção de Parasitas

Os parasitas das espécies *Leishmania (Leishmania) infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) e *Leishmania (Leishmania) donovani* (MHOM/IN/80/DD8), disponibilizados pela coleção parasitológica do Laboratório de Doenças Infecciosas – LADIC da UFDPAr, foram cultivadas em meio Schneider suplementado (20% de SFB, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina), pH 6,9. Desse modo, foram mantidas a uma temperatura de 26 °C em incubadora de demanda biológica de oxigênio (B.O.D), sendo cultivadas semanalmente para manter a viabilidade celular (Sousa et al., 2023).

As formas axênicas de *L. infantum* foram cultivadas em meio Schneider suplementado (20% de SFB, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) ajustado para pH 5,5. As culturas foram mantidas a 32 °C por 72h, sob condições controladas de incubação.

4.5 Cultura de células de mamíferos

As linhagens celulares de macrófagos murinos RAW 264.7, células LLC-MK2, foram obtidas a partir da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC - American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). Os macrófagos foram cultivados em frascos contendo meio DMEM e a células LLC-MK2 em RPMI 1640, ambos suplementados com 10% de SFB, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), mantendo o pH 7, a uma temperatura de 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de umidade. A troca do meio de cultura foi realizada a cada dois dias ou sempre que a cultura atingisse 80% de confluência (Sousa et al., 2023).

4.6 Atividade antileishmania sobre às formas promastigotas de *Leishmania* spp.

Para avaliar a atividade antileishmania, foram utilizadas placas de 96 poços contendo formas promastigotas em fase logarítmica, na concentração de 1×10^6 parasitas por poço. As formas promastigotas foram cultivadas em meio Schneider suplementado com pH 7, e expostas a diluições seriadas do GO, variando de 50 µM a 0,39 µM. Como controle negativo, utilizou-se apenas o meio Schneider suplementado, sem o composto. As placas foram incubadas por 72h a 26 °C em seguida foi adicionado 10µL de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazólio - MTT,). A leitura da densidade óptica foi feita em leitor de microplacas (Biotek, modelo ELx800, Winooski, VT, EUA), a 540 nm.

4.7 Análise da citotoxicidade celular em linhagem RAW 264.7 e LLC-MK2

Na avaliação da citotoxicidade, foram utilizadas placas de 96 poços, com 100 µL de meio RPMI contendo 1×10^5 células (RAW 264.7 e LLC-MK2) por poço. As placas foram incubadas por 4h a 37 °C com 5% de CO₂ para permitir a adesão celular. Em

seguida, para remover as células não aderidas, foram realizadas duas lavagens com o meio respectivo. As concentrações selecionadas do GO, variando de 800 μM a 3,12 μM , foram dissolvidas no mesmo meio, e 100 μL de cada solução foram adicionados aos poços, que foram então incubados por 72h. Após esse período, foram adicionados 10 μL de MTT (5 mg/mL) e as placas foram incubadas por mais 4h a 37 °C com 5% de CO_2 . Após a incubação, os sobrenadantes foram descartados e 100 μL de DMSO foram adicionados a cada poço para dissolver os cristais de formazan. Controles negativos foram realizados com macrófagos RAW 264.7, células LLC-MK2 não tratados. A leitura dos resultados foi realizada em um leitor de placas a uma absorbância de 540 nm.

4.8 Avaliação do índice de Seletividade (IS)

O índice de seletividade (IS) foi determinado pela razão entre a concentração citotóxica média (CC_{50}) das linhagens celulares de mamíferos testadas e a concentração inibitória média (CI_{50}), avaliando-se, assim, a seletividade frente às formas promastigotas de *Leishmania* spp. Alternativamente, o IS foi calculado pela razão entre a CC_{50} das linhagens celulares de mamíferos testadas e a concentração efetiva média (CE_{50}) determinada para as formas amastigotas (Sousa et al., 2023).

4.9 Atividade antileishmania sobre às formas amastigotas axênicas de *L. infantum*

Na avaliação sobre as formas amastigotas axênicas, os parasitas foram cultivados em placas de 96 poços (1×10^6 parasitas), em meio Schneider completo com pH 5.5, e tratados com concentrações seriadas de GO, variando de 50 μM a 6,25 μM . A incubação foi realizada por 72h a 32 °C, em estufa tipo B.O.D. Ao final do período de incubação, adicionou-se 10 μL de MTT (5 mg/mL) por poço, seguido de nova incubação por 4h. Posteriormente, foram adicionados 50 μL de SDS a 10% para solubilizar os cristais de formazan formados. A leitura foi realizada a uma densidade óptica em leitor de microplacas (Biotek, modelo ELx800, Winooski, VT, EUA), a 540 nm.

4.10 Avaliação da integridade da membrana plasmática sobre *L. infantum*

Para a análise da integridade da membrana plasmática, foram utilizadas placas de 96 poços contendo 100 µL de meio Schneider completo e formas promastigotas de *L. infantum* em fase logarítmica (1×10^6 por poço). As concentrações selecionadas do GO, correspondentes a $1 \times \text{Cl}_{50}$, $2 \times \text{Cl}_{50}$ e $4 \times \text{Cl}_{50}$, foram preparadas no mesmo meio de cultivo. Em seguida, foi adicionado o corante SYTOX Green (5 µM) em cada poço, e as placas foram incubadas por 7h, a 26 °C, em incubadora tipo B.O.D. Após o período de incubação, a fluorescência foi mensurada em leitor de placas (Victor X3, PerkinElmer, Finlândia) com excitação de 488 nm e emissão de 523 nm. Como controle negativo, foram utilizados parasitas não tratados, enquanto o controle positivo foi composto por parasitas tratados com Triton X-100.

4.11 Análise estatística

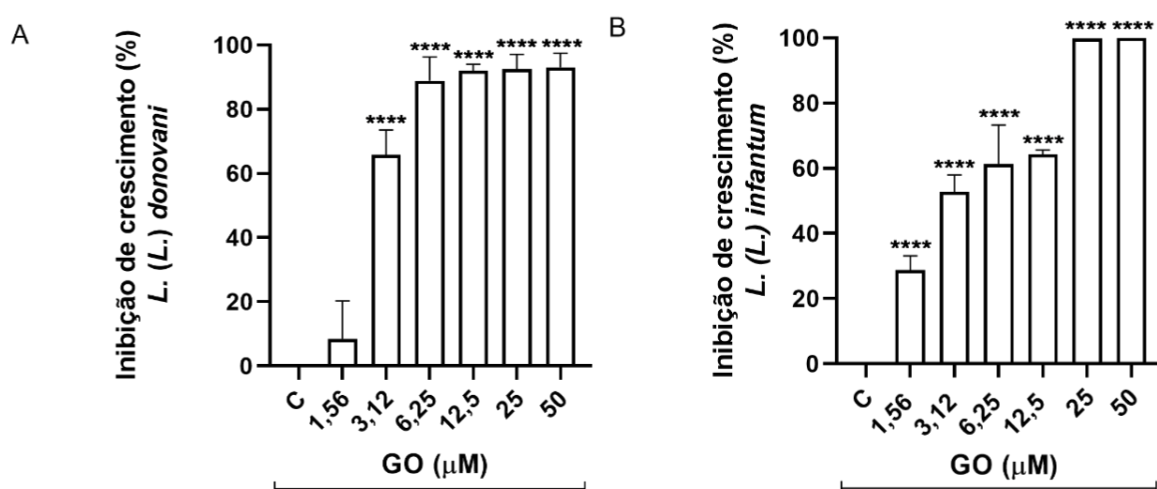
Todos os ensaios experimentais foram conduzidos com, no mínimo, três repetições independentes. As concentrações médias (CC_{50} e Cl_{50}) foram determinadas por meio de modelo de regressão não linear. Para comparações entre os grupos experimentais, utilizou-se análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. Foi adotado um nível de significância estatística de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Atividade antileishmania do GO sobre formas promastigotas de *Leishmania* spp.

Os resultados obtidos para a avaliação da inibição do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania* spp. pelo GO estão apresentados no Gráfico 1. A análise dos dados revelou que o GO foi capaz de inibir significativamente o crescimento das formas promastigotas de *L. donovani* (Gráfico 1A) a partir da concentração de 3,12 μ M. Ao avaliar individualmente cada concentração, observou-se uma inibição progressiva do crescimento parasitário, com percentuais de inibição de 65%, 88%, 91%, 92% e 93% nas concentrações de 3,12 μ M, 6,25 μ M, 12,5 μ M, 25 μ M e 50 μ M, respectivamente. O valor da concentração inibitória média (CI₅₀) gráfico 1B foi determinado em 2,61 μ M (Tabela 1). Para *L. infantum* (Gráfico 1B), o GO demonstrou efeito inibitório em todas as concentrações testadas, apresentando percentuais de inibição de 28%, 52%, 61%, 64%, 99% e 100% nas concentrações de 1,56 M, 3,12 μ M, 6,25 μ M, 12,5 μ M, 25 μ M e 50 μ M, respectivamente. O valor da CI₅₀ foi calculado em 2,79 μ M (Tabela 1).

Gráfico 1: Efeito do galato de octila (GO) sobre formas promastigotas de *Leishmania* spp.



Fonte: Autoria própria, 2025. A: *Leishmania (Leishmania) donovani*. B: *Leishmania (Leishmania) infantum*. Culturas em fase logarítmica (1×10^6 células) foram cultivadas em meio Schneider e incubadas a 26°C por 72h na presença de GO. Os dados representam a média \pm erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. (**) $p < 0,0001$ vs. controle.

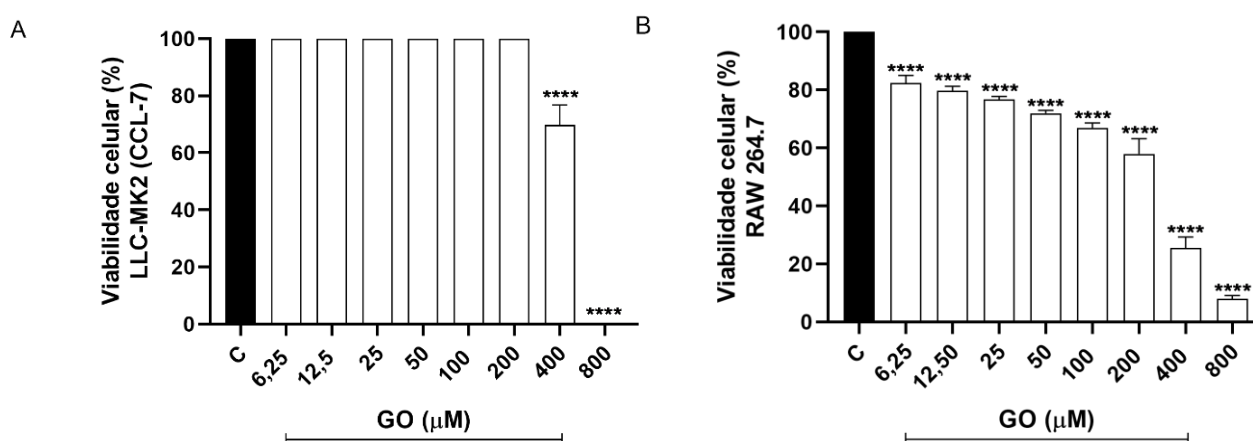
5.2 Citotoxicidade do GO sobre RAW.264.7 e células LLC-MK2 (CCL-7)

Os resultados do ensaio de citotoxicidade realizado em células mamíferas (RAW 264.7 e LLC-MK2) estão apresentados no Gráfico 2. Para as células LLC-MK2, nas concentrações de 12,5 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM e 200 μM , observou-se que não houve redução significativa (Gráfico 2A). No entanto, na concentração de 400 μM , a viabilidade foi reduzida para 69,77%. Já na maior concentração testada, de 800 μM , houve uma queda abrupta na viabilidade celular, resultando em 100% de citotoxicidade (Gráfico 2A).

Nos macrófagos RAW 264.7, nas mesmas concentrações de 12,5 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM e 200 μM , as viabilidades celulares observadas foram de 79,75%, 76,70%, 71,98%, 66,90% e 57,95%, respectivamente (Gráfico 2B). Na concentração de 400 μM , a viabilidade foi reduzida para 25,43%. E, na concentração de 800 μM , observou-se uma drástica redução da viabilidade celular, indicando alta toxicidade do composto para essas células (Gráfico 2B).

A segurança do composto foi avaliada por meio do valor de CC_{50} (concentração citotóxica capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular). Para as células LLC-MK2, obteve-se um CC_{50} de $417,20 \pm 9,27 \mu\text{M}$, enquanto para os macrófagos RAW 264.7, o CC_{50} foi de $349,8 \pm 5,47 \mu\text{M}$ (Tabela 1).

Gráfico 2: Efeito do galato de octila (GO) sobre a viabilidade em macrófagos RAW 264.7, células LLC-MK2 após 72h de tratamento.



Fonte: Autoria própria, 2025. A: Células LLC-MK2 (CCL-7). B: Macrófagos RAW 264.7. Culturas (5×10^5 células) foram incubadas a 37°C com 5% de CO_2 por 72h na presença de diferentes concentrações de GO. A citotoxicidade foi determinada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média \pm erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. (**) $p < 0,0001$ vs. controle.

5.3 Índice de Seletividade (IS)

Os valores do IS do GO estão apresentados na Tabela 1. Observa-se que o composto demonstrou alta seletividade para *Leishmania* spp., tanto nas formas promastigotas quanto amastigotas axênicas, em comparação às células.

Nas formas promastigotas, os índices de seletividade alcançaram 134 e 125,3 nos macrófagos RAW 264.7, e 159,8 e 149,5 nas células LLC-MK2, referentes às espécies *L. donovani* e *L. infantum*, respectivamente. Já nas formas amastigotas axênicas, os valores observados foram de 26,7 para RAW 264.7 e 22,4 para LLC-MK2, ambos obtidos com *L. infantum*.

Em comparação aos fármacos de referência, o GO demonstrou desempenho superior. A anfotericina B apresentou IS variando entre 1,35 e 1,0, para *L. donovani* e *L. infantum*, respectivamente. Com isso, o GO mostrou-se de 99 a 125 vezes mais seletivo em RAW 264.7. Nas LLC-MK2, os valores de 159,8 e 149,5 refletem seletividade expressivamente mais elevada ao observar a anfotericina B.

Em relação ao antimoníato de meglumina, cujos índices variaram de 0,67 a 0,79 nas LLC-MK2 e de 0,61 a 0,72 nos macrófagos, o GO demonstrou ser até 219 vezes mais seletivo, reforçando sua superioridade em termos de seletividade.

Tabela 1: Efeito antileishmania, citotoxicidade em células, e índice de seletividade (IS) para o galato de octila (GO), anfotericina B e antimoníato de meglumina.

Compostos	LLC - MK2	RAW 264.7	Promastigotas						Amastigotas		
			<i>L. donovani</i>			<i>L. infantum</i>					
	CC ₅₀ µM	CC ₅₀ µM	CI ₅₀ µM	ISM _{K2}	IS _{RAW}	CI ₅₀ µM	ISM _{K2}	IS _{RAW}	CI ₅₀ µM	ISM _{K2}	IS _{RAW}
Galato de Octila	417,2	349,8	2,61	159,8	134	2,79	149,5	125,3	15,6	26,7	22,4
Anfotericina B	0,33	0,38	0,28	1,17	1,35	0,36	0,91	1,0	0,23	1,4	0,26
Antimoníato de Meglumina	17363	15863	25740	0,67	0,61	21913	0,79	0,72	1017	17	15,5

IS = CC₅₀/CI₅₀ ou CE₅₀

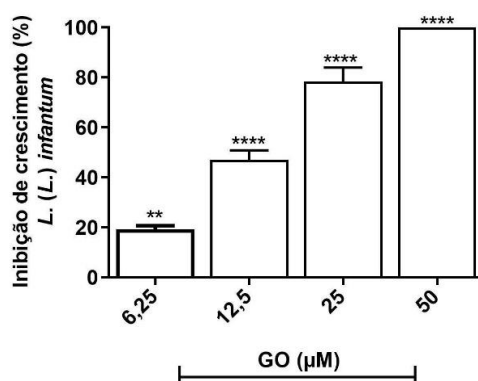
Fonte: Autoria Própria, 2025.

Dessa forma, conforme demonstrado na Tabela 1, o GO apresentou expressiva atividade inibitória contra *L. infantum* e *L. donovani*. Embora o valor de CI_{50} para *L. donovani* tenha sido 2,61 μM em comparação com *L. infantum* com 2,79 μM , os índices de seletividade foram semelhantes para ambas as espécies. Considerando que *L. infantum* é a espécie predominante no Novo Mundo e está diretamente associada à leishmaniose visceral no Brasil, os ensaios subsequentes de atividade antileishmania foram conduzidos com essa espécie, visando maior relevância epidemiológica e aplicabilidade dos resultados.

5.4 Atividade antileishmania do GO sobre formas amastigotas axênica de *Leishmania (L.) infantum*.

As formas amastigotas axênicas tratadas com GO, nas concentrações de 6,25 a 50 μM , resultaram em uma redução significativa da inibição parasitária. O composto apresentou uma CI_{50} de $15,6 \pm 0,73 \mu M$, indicando atividade leishmanicida relevante frente à forma axênica do parasita. As concentrações testadas inibiram de maneira estatisticamente significativa em comparação ao controle negativo. A menor concentração, 6,25 μM , apresentou inibição de 19%, enquanto as concentrações de 12,5 μM , 25 μM e 50 μM demonstraram redução expressiva na inibição ($p < 0,0001$), sendo que a maior concentração promoveu uma inibição de 100%.

Gráfico 3: Efeito do galato de octila (GO) sobre formas amastigotas axênicas de *Leishmania* spp.

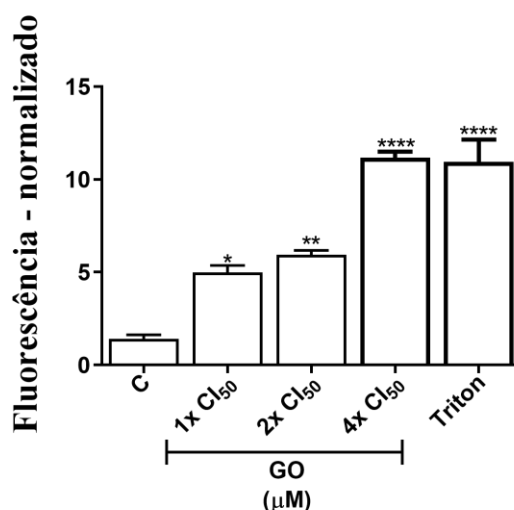


Fonte: Autoria própria, 2025. Culturas de *Leishmania (Leishmania) infantum* em fase logarítmica (1×10^6 células) foram cultivadas em meio Schneider e incubadas a 32°C por 72h na presença de GO. Os dados representam a média \pm erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. (**) $p < 0,0001$ vs. controle.

5.5 Ensaio de integridade da membrana plasmática sobre *L. infantum*

A exposição das formas promastigotas de *L. infantum* ao GO resultou em comprometimento significativo da integridade da membrana plasmática. Os dados obtidos revelaram um aumento progressivo na fluorescência com o incremento das concentrações testadas, indicando danos estruturais à membrana celular. Em comparação ao controle negativo, foi observado um aumento de 4X (400%) na fluorescência na concentração equivalente a $1 \times \text{Cl}_{50}$, seguido por 5X (500%) em $2 \times \text{Cl}_{50}$. Na concentração de $4 \times \text{Cl}_{50}$, a fluorescência aumentou para 11X (1100%), aproximando-se dos níveis registrados no controle positivo (Triton X-100), agente conhecido por induzir lise celular. Esses achados, representados no Gráfico 4, sugerem que o GO promove a perda de integridade da membrana de forma dose-dependente.

Gráfico 4: Efeitos do galato de Octila (GO) na permeabilidade da membrana plasmática de promastigotas de *Leishmania infantum*.



Fonte: Autoria própria, 2025. Células (10^6 /poço) foram incubadas a 26 °C por 7h na ausência ou presença de GO em Cl_{50} , $2 \times \text{Cl}_{50}$ e $4 \times \text{Cl}_{50}$. Uma sonda SYTOX Green foi usada. Os dados representam a média fluorescente normalizada \pm erro padrão para três experimentos independentes realizados em triplicata. (**) $p < 0,01$ vs. controle; (***) $p < 0,001$ vs. controle.

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos evidenciam que o GO apresentou atividade significativa contra as formas promastigotas de *Leishmania* spp., destacando-se como um potencial agente antileishmania. A escolha das formas promastigotas para a avaliação inicial de atividade é metodologicamente adequada, uma vez que essas formas são facilmente cultiváveis *in vitro* e representam um modelo consolidado para a triagem preliminar na identificação de candidatos promissores a investigações mais avançadas (Gopu et al., 2023), apesar das limitações inerentes a essa abordagem, pois não correspondem às formas intracelulares responsáveis pela manifestação clínica da doença.

Essa eficácia do GO está alinhada com evidências anteriores que demonstram a atividade antiprotozoária dos derivados do ácido gálico. Alves et al. (2017) investigaram o ácido gálico, molécula precursora do GO, e observaram uma inibição expressiva da proliferação de *L. major*, com valor de CE₅₀ de 16,4 µg/mL. A modificação estrutural do ácido gálico, por meio da inserção da cadeia octila, confere maior lipofilicidade, facilitando a permeação através da membrana celular do parasita e, conseqüentemente, potencializando seu efeito leishmanicida. Essa característica é particularmente relevante, considerando a necessidade de fármacos capazes de ultrapassar eficazmente as barreiras biológicas para atingir o parasita intracelular. Corroborando esses achados, estudos com outros galatos, como o galato de metila, demonstraram atividade antileishmania significativa. Em formas promastigotas de *L. amazonensis*, o galato de metila inibiu o crescimento parasitário em 15,7%, 56,2% e 84,1% nas concentrações de 3,12 µM, 6,25 µM e 12,5 µM, respectivamente, apresentando um CI₅₀ de 5,71 µM (Dias et al., 2020).

Considerando os resultados promissores quanto à atividade antileishmania sobre as formas promastigotas de *Leishmania* spp., realizou-se a avaliação do perfil de citotoxicidade do GO, com o objetivo de determinar sua seletividade frente às células hospedeiras.

A análise da viabilidade celular, utilizada como indicador das condições metabólicas das células, constitui ferramenta essencial para avaliação da citotoxicidade de compostos. Este parâmetro é mensurado por métodos quantitativos baseados em reações colorimétricas, com leitura em microplacas por espectrofotômetros, frequentemente denominados leitores ELISA (Barile et al., 1994).

Neste trabalho, empregou-se o ensaio de MTT, segundo o protocolo descrito por Mosmann (1983), no qual o sal de tetrazólio MTT, de coloração amarela, é convertido em cristais de formazan, de coloração púrpura, por células metabolicamente ativas. Esse processo ocorre por meio da ação de enzimas oxidoredutases, que utilizam NADH como doador de elétrons, convertendo-o em NAD^+ e promovendo a formação de um sal lipofílico insolúvel (Van Meerloo; Kaspers; Cloos, 2011; Kamiloglu et al., 2020).

O ensaio foi conduzido utilizando duas linhagens celulares: macrófagos murinos RAW 264.7, reconhecidos como as principais células-alvo da infecção por *Leishmania* spp. (Podinovskaia; Descoteaux, 2015), e células epiteliais LLC-MK2, derivadas de rins de macaco *Rhesus* (Duran-Rehbein et al., 2014). A adoção de diferentes linhagens visou ampliar a abrangência da análise quanto ao potencial citotóxico do composto. Os valores de CC_{50} obtidos variaram entre as linhagens, mas permaneceram superiores aos respectivos valores de CI_{50} , indicando seletividade do GO para os parasitas em detrimento das células hospedeiras. Dados similares foram reportados por Alves et al. (2017), que observaram baixa toxicidade do ácido gálico em células mamíferas, com CC_{50} de 126,6 $\mu\text{g/mL}$. De forma análoga, Melo et al. (2022) identificaram baixa citotoxicidade para o galato de isopropila, outro éster alquilático do ácido gálico, com CC_{50} de 1260 $\mu\text{g/mL}$, corroborando o potencial seletivo dessa classe de compostos frente aos parasitas.

Entretanto, a avaliação isolada da citotoxicidade não permite a inferência definitiva acerca do potencial terapêutico de um composto, sendo imprescindível o cálculo do índice de seletividade (IS). Conforme demonstrado nos dados apresentados na Tabela 1, o GO apresentou os maiores valores de IS para *L. donovani* e *L. infantum*, excedendo 100 em ambas as linhagens celulares avaliadas (LLC-MK2 e RAW 264.7). Esses resultados evidenciam uma elevada seletividade do composto em relação aos parasitas, indicando um perfil terapêutico promissor, com eficácia antiparasitária em concentrações que não induzem citotoxicidade significativa.

Por outro lado, os fármacos de referência, anfotericina B e antimoniato de meglumina, apresentaram índices de seletividade consideravelmente inferiores, com valores próximos ou abaixo de 1, refletindo um perfil terapêutico limitado em termos de seletividade. Assim, os dados reforçam o potencial do GO como candidato promissor para o desenvolvimento de terapias antileishmania, evidenciando sua

capacidade de atuar seletivamente contra o parasito, com reduzido impacto sobre as células hospedeiras.

Diante da atividade promissora observada frente às formas promastigotas, a análise foi estendida para as formas amastigotas axênicas, estágio clinicamente relevante no hospedeiro vertebrado. Apesar dos índices de seletividade semelhantes entre as espécies testadas, optou-se por *L. infantum* devido à sua ampla prevalência no Brasil, onde é responsável pelos casos de leishmaniose visceral. Essa escolha garante maior relevância epidemiológica e alinhamento com as estratégias nacionais de controle da doença. Nessa etapa, o GO apresentou atividade significativa, com CI_{50} de 15,6 μM frente às formas amastigotas axênicas.

O efeito inibitório observado corrobora as evidências de Dias et al. (2020), que relataram que o galato de metila apresentou inibição significativa em amastigotas axênicas de *L. amazonensis*, com CE_{50} de 5,39 μM e, destacando a efetividade dos galatos alquilados contra formas intracelulares do parasita e reforçando o potencial dessa classe de compostos.

Tais resultados demonstram que o GO possui perfil bioativo consistente nos diferentes estágios do ciclo de vida do parasita, compatível com os efeitos descritos para outros ésteres alquílicos, evidenciando sua capacidade antiparasitária robusta.

A comparação com a anfotericina B — fármaco de referência para leishmaniose visceral — foi fundamental para contextualizar a eficácia do GO frente às opções terapêuticas atuais. A anfotericina B demonstrou elevada atividade contra as formas promastigotas, com baixos valores de CI_{50} , confirmando sua potente ação antiparasitária e justificando seu uso como controle padrão em ensaios *in vitro* (De Farias Ribeiro et al., 2021). A relevância dos derivados do ácido gálico, incluindo o GO, como agentes antileishmania, é reforçada não apenas pela sua atividade biológica, mas também por seu perfil favorável de toxicidade e origem natural, o que pode favorecer sua aceitação e desenvolvimento como terapias alternativas. A crescente resistência aos tratamentos convencionais, aliada aos efeitos adversos dos antimoniais e da anfotericina B, evidencia a necessidade urgente de novas opções terapêuticas mais seguras e eficazes (WHO, 2020).

Complementando essa análise, foi conduzido o ensaio de integridade de membrana, com o objetivo de investigar o possível mecanismo de ação do GO sobre a membrana do parasita. A escolha desse alvo fundamenta-se na importância da

integridade da membrana para a sobrevivência do protozoário, visto que seu comprometimento leva à morte celular, seja por apoptose ou necrose.

A metodologia empregou a sonda fluorescente SYTOX Green, com Triton X-100 como controle positivo. Esse corante não atravessa membranas celulares intactas e emite fluorescência apenas quando interage com o DNA, permitindo, assim, a detecção do comprometimento da barreira celular (Carvalho et al., 2021).

Os dados obtidos revelaram que o GO promoveu aumento significativo na permeabilidade das formas promastigotas de *Leishmania* spp., de maneira dependente da concentração. A fluorescência normalizada indicou que a permeabilização máxima ocorreu na concentração de $4 \times \text{CI}_{50}$, superando inclusive o sinal registrado no controle positivo.

Esses achados confirmam as propriedades de permeabilização inerentes ao GO, comuns aos compostos alquílicos, indicando que promove danos progressivos à membrana plasmática do parasita, evento determinante para a indução da morte celular em protozoários. Estudos como os de Keyvani-Ghamsari, Rahimi e Khorsandi (2023) e Karakuş (2024) demonstram que o aumento do comprimento da cadeia alquila possui correlação direta com o aumento da lipofilicidade, o que resulta em maior afinidade pela membrana, culminando na desestabilização da estrutura lipídica e consequente lise celular. Tais dados reforçam que o efeito observado está em consonância com o mecanismo de ação proposto para o composto.

7 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que o galato de octila (GO) exibe atividade leishmanicida significativa frente às formas promastigotas e amastigotas axênicas de *Leishmania infantum*, espécie associada à leishmaniose visceral no Brasil. O composto evidenciou eficácia antiparasitária, refletida em valores de CI_{50} compatíveis com os parâmetros desejáveis, além de apresentar reduzida toxicidade em macrófagos RAW 264.7 e células LLC-MK2, conferindo elevados índices de seletividade.

Adicionalmente, a avaliação da integridade de membrana revelou que o GO promove danos à membrana plasmática do parasito, sugerindo que sua elevada lipofilicidade pode estar associada a esse mecanismo de ação. Comparado aos fármacos convencionais, como anfotericina B e antimoniato de meglumina, o GO apresentou perfil de maior seletividade e menor toxicidade, destacando seu potencial como candidato a novas alternativas terapêuticas.

REFERÊNCIAS

ALVES, M. M. DE M. et al. Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by *Leishmania major*. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 390, n. 9, p. 893–903, 2017.

ATRI, C.; GUERFALI, F. Z.; LAOUINI, D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 6, 2018.

ARONSON, N. E.; JOYA, C. A. Cutaneous Leishmaniasis: Updates in Diagnosis and Management. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 101–117, 2019.

ALEMAYEHU, Bereket et al. A abundância e distribuição de flebotomíneos (com ênfase em *Phlebotomus pedifer*) (Diptera: Psychodidae) ao longo do gradiente altitudinal no distrito de Kindo Didaye, zona de Wolaita, sul da Etiópia. **Revista de Entomologia Médica**, v. 4, pág. 940-947, 2024.

AKLILU, Esayas et al. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) da Etiópia. **Heliyon**, v. 3, 2023.

ABADÍAS-GRANADO, I. et al. Leishmaniose cutânea e mucocutânea. **Actas Dermo-Sifiliográficas** (English Edition), 2021.

ABREU, C. A. et al. The Role of Senescent CD8+T Cells in the Pathogenesis of Disseminated Leishmaniasis. **Pathogens**, v. 13, n. 6, p. 460, 29 maio 2024.

ABASS, E.; AL-HASHEM, Z.; YAMANI, L. Z. Leishmaniasis in Saudi Arabia: Current situation and future perspectives. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 36, n. 4, 16 abr. 2020.

AMISIGO, C. M. et al. In vitro anti-trypanosomal effects of selected phenolic acids on *Trypanosoma brucei*. **PloS one**, v. 14, n. 5, p. e0216078, 2019.

ANDRÉO, R. et al. Toxicity and loss of mitochondrial membrane potential induced by alkyl gallates in *Trypanosoma cruzi*. **International scholarly research notices**, v. 2015, p. 924670, 2015.

ALMEIDA, F. S. et al. Leishmaniasis: Immune cells crosstalk in macrophage polarization. **Tropical medicine and infectious disease**, v. 8, n. 5, p. 276, 2023.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 326, de 3 de dezembro de 2019. Dispõe sobre as listas de aditivos alimentares autorizados para uso em alimentos. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 4 dez. 2019. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2019/rdc_326_2019.pdf. Acesso em: 8 abr. 2025.

BENAIM, G.; PANIZ-MONDOLFI, A. Unmasking the mechanism behind miltefosine: Revealing the disruption of intracellular Ca²⁺ homeostasis as a rational therapeutic

target in Leishmaniasis and Chagas disease. **Biomolecules**, v. 14, n. 4, p. 406, 2024.

BETIM XHEKAJ et al. First Detection and Molecular Analysis of *Leishmania infantum* DNA in Sand Flies of Kosovo. **Pathogens**, v. 12, n. 10, p. 1190–1190, 24 set. 2023.

BARBOSA, Vitória Siqueira. **Educação e saúde pública: Perspectivas da população do Estado do Espírito Santo sobre a Leishmaniose Visceral**. Monografia (graduação em Ciências Biológicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2023.

BRAGA, Natália Camargo. **Fisiopatologia da Leishmaniose Visceral e desenvolvimento de vacinas humanas: Uma revisão bibliográfica**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

COSTA, C. H. N. et al. From Infection to Death: An Overview of the Pathogenesis of Visceral Leishmaniasis. **Pathogens**, v. 12, n. 7, p. 969, 24 jul. 2023.

CHUA, K. V. et al. Octyl Gallate Induces Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Apoptosis and Suppresses Endothelial-Mesenchymal Transition-Promoted M2-Macrophages, HSP90 α Secretion, and Tumor Growth. **Cells**, v. 9, n. 1, 2020.

CARVALHO, R. DE C. V. DE et al. Limonene-carvacrol: A combination of monoterpenes with enhanced antileishmanial activity. **Toxicology**, v. 74, n. 105158, p. 105158, 2021.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 20, n. 10, p. 1251–1265, 2019.

COSTA-DA-SILVA, A. C. et al. Immune responses in leishmaniasis: An overview. **Tropical medicine and infectious disease**, v. 7, n. 4, p. 54, 2022.

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, p. 1–12, 2022.

DA ROSA, C. G. et al. Encapsulation of the phenolic compounds of the blackberry (*Rubus fruticosus*). **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie [Food science and technology]**, v. 58, n. 2, p. 527–533, 2014.

DE SOUZA, V. M. R. et al. Anti-*Leishmania amazonensis* activity of morolic acid, a pentacyclic triterpene with effects on innate immune response during macrophage infection. **Microorganisms**, v. 12, n. 7, p. 1392, 2024.

DE SOUZA-VIEIRA, T. et al. Functional plasticity shapes neutrophil response to *Leishmania* major infection in susceptible and resistant strains of mice. **PLoS pathogens**, v. 20, n. 10, p. e1012592, 2024.

DIAS-LOPES, G. et al. Axenic amastigotes of *Leishmania* species as a suitable model for in vitro studies. **Acta tropica**, v. 220, n. 105956, p. 105956, 2021.

DANIEL MUÑOZ MORALES et al. The Impact of Climatological Factors on the Incidence of Cutaneous Leishmaniasis (CL) in Colombian Municipalities from 2017 to 2019. **Pathogens**, v. 13, n. 6, p. 462–462, 30 maio 2024.

DE CORDOVA, C. A. S. et al. Octyl and dodecyl gallates induce oxidative stress and apoptosis in a melanoma cell line. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 25, n. 8, p. 2025–2034, 2011.

DE FARIA RIBEIRO, Luana Paula et al. Tratamento empírico com desoxicolato de Anfotericina B, em caso suspeito de Leishmaniose Visceral: um relato de caso. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 13602-13609, 2021.

DURAN-REHBEIN, G. A.; VARGAS-ZAMBRANO, J. C.; CUÉLLAR, A.; PUERTA, C. J.; GONZALEZ, J. M. Mammalian cellular culture models of trypanosoma cruzi infection: A review of the published literature. **Parasite**, v. 21, n. c, 2019.

ELMAHALLAWY, E. K.; ALKHALDI, A. A. M.; SALEH, A. A. Host immune response against leishmaniasis and parasite persistence strategies: A review and assessment of recent research. **Biomedecine & pharmacotherapie [Biomedicine & pharmacotherapy]**, v. 139, n. 111671, p. 111671, 2021.

EGER, Iriane. **Potencial quimioterapêutico de diferentes derivados do ácido gálico para o tratamento da infecção pelo Trypanosoma cruzi**: avaliação in vitro e in vivo. 2010. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Florianópolis.

EL MAZINI, S. et al. The Sporadic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in Morocco: A presumably trend towards endemicity. **Acta tropica**, v. 227, n. 106288, p. 106288, 2022.

ESAYAS AKLILU et al. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of Ethiopia. **Heliyon**, v. 9, n. 3, p. e14344–e14344, 1 mar. 2023.

EVANGELIDOU, M. et al. A Retrospective Study of Genetic Characterization in Suspected Visceral Leishmaniasis Cases in Greece, 2005 to 2020. **Pathogens**, v. 13, n. 8, p. 688–688, 14 ago. 2024.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific Opinion on the re-evaluation of octyl gallate (E 311) as a food additive. **EFSA Journal, Parma**, v. 13, n. 11, p. 4248, 2015. Disponível em: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2015.4248>. Acesso em: 8 abr. 2025.

FEUSER, P. E. et al. Increased in vitro leishmanicidal activity of octyl gallate loaded poly(methyl methacrylate) nanoparticles. **Pharmaceutical development and technology**, v. 24, n. 5, p. 593–599, 2019b.

FRÉZARD, F. et al. Liposomal amphotericin B for treatment of leishmaniasis: From the identification of critical physicochemical attributes to the design of effective topical and oral formulations. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 99, 2022.

FERREIRA, L. L. G.; ANDRICOPULO, A. D. Chemoinformatics strategies for leishmaniasis drug discovery. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. NOV, p. 1–11, 2018.

FERNANDES, J. C. R.; ZAMBONI, D. S. Mechanisms regulating host cell death during Leishmania infection. **mBio**, v. 15, n. 11, p. e0198023, 2024.

FORTES, Gabriela Accampora et al. Análise da prevalência de casos registrados de leishmaniose tegumentar americana nas regiões do Brasil no período de 2015 a 2020. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, v. 1, n. 19, 2021.

FISCHER, T. et al. Treatment of mucocutaneous leishmaniasis - A systematic review. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft [Journal of the German Society of Dermatology]**, v. 22, n. 6, p. 763–773, 2024.

GANGADHARAN, G. et al. Gallic acid based polymers for food preservation: A review. **ACS omega**, v. 9, n. 36, p. 37530–37547, 2024.

GARZA TOVAR, T. F. et al. An overview of the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Faculty reviews**, v. 9, 2020.

GOPU, Boobalan et al. Insights sobre as abordagens de triagem de medicamentos para leishmaniose. **Imunofarmacologia Internacional**, v. 114, p. 109591, 2023.

HAGEMANN, C. L. et al. Mecanismos celulares de patogenicidade em protozoários de importância médica. **Revista Libertas**, v. 24, n. 41, p. 39–56, 2023.

HADIDI, M. et al. The potential health benefits of Gallic acid: Therapeutic and food applications. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 8, p. 1001, 2024.

HOTEZ, P. J. et al. World neglected tropical diseases day. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 1, p. e0007999, 2020.

IBIAPINA, A. B. et al. Evidence map of diagnosis, treatment, prognosis, prevention, and control in visceral leishmaniasis. **Revista panamericana de salud publica [Pan American journal of public health]**, v. 46, p. 1, 2022.

J, B.; M, B. M.; CHANDA, K. An overview on the therapeutics of neglected infectious diseases-leishmaniasis and Chagas diseases. **Frontiers in chemistry**, v. 9, p. 622286, 2021.

FRANÇA-SILVA, C. J. et al. The Program for the Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil: The Effect of the Systematic Euthanasia of Seropositive Dogs as a Single Control Action in Porteirinha, a Brazilian City with an Intense Transmission of Visceral Leishmaniasis. **Pathogens**, v. 12, n. 8, p. 1060–1060, 18 ago. 2023.

KUPANI, M. et al. IL-10 and TGF- β induced arginase expression contributes to deficient nitric oxide response in human visceral leishmaniasis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 614165, 2020.

KHAN, B. A. et al. New perspectives on the efficacy of Gallic acid in cosmetics & nanocosmeceuticals. **Current pharmaceutical design**, v. 24, n. 43, p. 5181–5187, 2018.

KAMILOGLU, S.; SARI, G.; OZDAL, T.; CAPANOGLU, E. Guidelines for cell viability assays. **Food Frontiers**, v. 1, n. 3, p. 332–349, 2020.

KAUFER, A.; ELLIS, J.; STARK, D.; BARRATT, J. The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–17, 2017.

KLATT, Stephan et al. Leishmania tarentolae: Taxonomic classification and its application as a promising biotechnological expression host. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 7, p. e0007424, 2019.

KIM, H. et al. Mango (*Mangifera indica* L.) polyphenols: Anti-inflammatory intestinal microbial health benefits, and associated mechanisms of actions. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 9, p. 2732, 2021.

LA TORRE, C. et al. Chemical profile and bioactivity of *Rubus idaeus* L. fruits grown in conventional and aeroponic systems. **Plants**, v. 13, n. 8, 2024.

LECOEUR, H. et al. Going ballistic: Leishmania nuclear subversion of host cell plasticity. **Trends in parasitology**, v. 38, n. 3, p. 205–216, 2022.

LATHA, R. C. R.; DAISY, P. Therapeutic potential of octyl gallate isolated from fruits of *Terminalia bellerica* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmaceutical biology**, v. 51, n. 6, p. 798–805, 2013.

LOCATELLI, C.; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: a review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 60, p. 233–239, 2013.

LONG, X. et al. Changes in phenolic compounds of *Phyllanthus emblica* juice during different storage temperature and pH conditions. **Journal of food science**, v. 89, n. 7, p. 4312–4330, 2024.

Leishmaniasis. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 11 dez. 2024.

LU, D. et al. Investigation of Antiparasitic Activity of Two Marine Natural Products, Estradiol Benzoate, and Octyl Gallate, on *Toxoplasma gondii* In Vitro. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 841941, 17 mar. 2022.

MELO, D. S. DE et al. Isopropyl gallate, a Gallic acid derivative: In silico and in vitro investigation of its effects on *Leishmania major*. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 12, p. 2701, 2022.

MANN, S. et al. A review of leishmaniasis: Current knowledge and future directions. **Current tropical medicine reports**, v. 8, n. 2, p. 121–132, 2021.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation And Cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MACHADO, G. U.; PRATES, F. V.; MACHADO, P. R. L. Disseminated leishmaniasis: clinical, pathogenic, and therapeutic aspects. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 94, n. 1, p. 9–16, fev. 2019.

MARINHO-JÚNIOR, J. F. et al. High levels of infectiousness of asymptomatic *Leishmania (Viannia) braziliensis* infections in wild rodents highlights their importance in the epidemiology of American Tegumentary Leishmaniasis in Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 17, n. 1, p. e0010996, 2023.

MANNAN, S. B. et al. Prevalence and associated factors of asymptomatic leishmaniasis: a systematic review and meta-analysis. **Parasitology international**, v. 81, n. 102229, p. 102229, 2021.

MERGEN, Maria Eduarda; SOUZA, Marília Mascarenhas. Leishmaniose Visceral canina, métodos diagnósticos e tratamento na atualidade–Revisão de literatura. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, v. 6, n. 13, p. 1024-1036, 2023.

Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da leishmaniose tegumentar. Disponível em <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt/situacao-epidemiologica>. Acesso em: 21 de setembro de 2024.

MOGHTADERI, H. et al. Gallic acid and curcumin induce cytotoxicity and apoptosis in human breast cancer cell MDA-MB-231. **BiolImpacts: BI**, v. 8, n. 3, p. 185–194, 2018.

MONCADA-DIAZ, M. J. et al. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Leishmania* spp. **Pathogens**, v. 13, n. 10, p. 835, 2024.

MATOS, A. P. S. et al. A review of current treatments strategies based on paromomycin for leishmaniasis. **Journal of drug delivery science and technology**, v. 57, n. 101664, p. 101664, 2020.

NA, J.; ENGWERDA, C. The role of CD4+ T cells in visceral leishmaniasis; new and emerging roles for NKG7 and TGFβ. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 14, p. 1414493, 2024.

NOLETO DIAS, C. et al. Methyl gallate: Selective antileishmanial activity correlates with host-cell directed effects. **Chemico-biological interactions**, v. 320, n. 109026, p. 109026, 2020.

NI, C. et al. Identification of octyl gallate, a novel apoptosis-inducing compound for colon cancer therapy, from *Sanguisorba officinalis* L. by cell membrane chromatography and UHPLC-(Q)TOF-MS/MS. **Heliyon**, v. 10, n. 11, p. e32230, 2024.

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.

OLAJIDE, T. M. et al. Antioxidant properties of two novel lipophilic gallic acid derivatives. **Grasas y Aceites**, v. 73, n. 3, p. e473, 8 set. 2022.

Organização Mundial da Saúde. **Leishmaniose**; Organização Mundial da Saúde: Genebra, Suíça, 2022; Disponível online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> Acesso em: 20 mar. de 2025.

PONTE-SUCRE, A. et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 12, p. e0006052, 2017.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 111–129, jan. 2015.

POKHAREL, P.; GHIMIRE, R.; LAMICHHANE, P. Efficacy and Safety of Paromomycin for Visceral Leishmaniasis: A Systematic Review. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2021, 2021.

PRADHAN, S. et al. Treatment options for leishmaniasis. **Clinical and experimental dermatology**, v. 47, n. 3, p. 516–521, 2022.

PIMENTA, Paulo Filemon Paolucci; FREITAS, Vanessa Cabreira de; SECUNDINO, Nágila Francinete Costa. A interação do protozoário *Leishmania* com seus insetos vetores. **Tópicos avançados em Entomol. Mol. Cap**, v. 12, p. 1-45, 2012.

Publicada consolidação das normas sobre aditivos e coadjuvantes de tecnologia para uso em alimentos. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2023/alimentos-publicada-consolidacao-das-normas-de-aditivos-alimentares-e-coadjuvantes-de-tecnologia>>. Acesso em: 29 abr. 2025.

Pan American Health Organization (PAHO/WHO). **Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas**. nº 11, dezembro 2022.

RAVASI, D. et al. Exploring Emerging Challenges: Survey on Phlebotomine Sand Flies and *Leishmania infantum* at the Northern Endemic Border in Europe. **Pathogens**, v. 13, n. 12, p. 1074, dez. 2024.

ROATT, B. M. et al. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 104, n. 21, p. 8965–8977, 2020.

ROCHA, R.; PEREIRA, A.; MAIA, C. Non-Endemic Leishmaniases Reported Globally in Humans between 2000 and 2021—A Comprehensive Review. **Pathogens**, v. 11, n. 8, p. 921–921, 16 ago. 2022.

SINGH, R.; KASHIF, M.; SRIVASTAVA, P.; MANNA, P. P. Recent Advances in Chemotherapeutics for Leishmaniasis: Importance of the Cellular Biochemistry of the Parasite and Its Molecular Interaction with the Host. **Pathogens**, v. 12, n. 5, 2023.

SHEIKH, S. Y. et al. A review on potential therapeutic targets for the treatment of leishmaniasis. **Parasitology international**, v. 100, n. 102863, p. 102863, 2024.

SANTIAGO, A. S. et al. 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.

SANTOS, Juliany Harumi Kikuchi et al. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar e visceral na região Nordeste durante os anos de 2010 a 2019 Epidemiology of cutaneous and visceral leishmaniasis in the Northeast region during the year 2010 to 2019. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 6, p. 25372-25384, 2021.

ȘTEFĂNESCU, B.-E. et al. The chemical and biological profiles of leaves from commercial blueberry varieties. **Plants**, v. 9, n. 9, p. 1193, 2020.

STEFANIU, A. et al. Interactions of Alkyl Gallates with SARS-CoV-2 Main Protease: A Molecular Docking Approach. **Chemistry Proceedings**, v. 3, n. 1, 2021.

SASIDHARAN, S.; SAUDAGAR, P. Leishmaniasis: where are we and where are we heading? **Parasitology research**, v. 120, n. 5, p. 1541–1554, 2021.

SILVEIRA, N. A. et al. Benefícios do uso de plantas medicinais como terapêutica para a leishmaniose: uma revisão narrativa. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, v. 8, n. 18, p. e181768, 2025.

SHEIKH, S. Y. et al. Drug repositioning to discover novel ornithine decarboxylase inhibitors against visceral leishmaniasis. **Journal of molecular recognition: JMR**, v. 36, n. 7, 2023.

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, 2023.

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.

SU, X. et al. Phenolic acid profiling, antioxidant, and anti-inflammatory activities, and miRNA regulation in the polyphenols of 16 blueberry samples from China.

Molecules (Basel, Switzerland), v. 22, n. 2, 2017.

STEVERDING, D. et al. Gallic acid alkyl esters: Trypanocidal and leishmanicidal activity, and target identification via modeling studies. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 18, p. 5876, 2022.

TAO, J.; JIA, W. Leishmania. Em: **Molecular Medical Microbiology**. [s.l.] Elsevier, 2024. p. 3061–3068.

TAMANG, M. D. et al. Potentiation of β -Lactams against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Using Octyl Gallate, a Food-Grade Antioxidant. **Antibiotics**, v. 11, n. 2, 2022.

UOZAKI, Misao et al. Antiviral effect of octyl gallate against DNA and RNA viruses. **Antiviral Research**, [s. l.], v. 73, n. 2, p. 85–91, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16950523>>.

UMALI, A. B. et al. Comparative evaluation of the physicochemical properties and prebiotic potential of cocoa (*Theobroma cacao* L.) bean shell and commercial cocoa powders with varying degrees of alkalization. **Discover Food**, v. 5, n. 1, 2025.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 79–99, 2019.

VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G. J. L.; CLOOS, J. Cell sensitivity assays: The MTT assay. **Methods In Molecular Biology**, v. 731, p. 237–245, 2011.

VIJAYALAKSHMI, P. et al. Octyl gallate and Gallic acid isolated from *Terminalia bellirica* circumvent breast cancer progression by enhancing the intrinsic apoptotic signaling pathway and elevating the levels of anti-oxidant enzymes. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 195, n. 12, p. 7214–7235, 2023.

VITAL, W. DE S. et al. A influência da presença de polimorfismos de lectina ligante de manose na ocorrência da leishmaniose: revisão sistemática e metanálise. **Anais Brasileiros de Dermatologia (Portuguese)**, v. 97, n. 3, p. 298-306, 2022.

VOLPEDO, G.; PACHECO-FERNANDEZ, T.; HOLCOMB, E. A.; CIPRIANO, N.; COX, B.; SATOSKAR, A. R. Mechanisms of Immunopathogenesis in Cutaneous Leishmaniasis And Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis (PKDL). **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. June, p. 1–16, 2021.

WAMAI, R. G. et al. Visceral leishmaniasis: a global overview. **Journal of Global Health Science**, v. 2, n. 1, 2020.

WOLF, V. G. et al. Octyl gallate, a food additive with potential beneficial properties to treat *Helicobacter pylori* infection. **Food & Function**, [s.l.], v. 8, 2017. Disponível em: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2017/fo/c7fo00707h>.

YANG, J. et al. Broad-spectrum antibacterial activity of octyl gallate and its modulation of the gut microbiota. **Antibiotics**, v. 13, n. 8, p. 731, 2024. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/13/8/731>. Acesso em: 8 abr. 2025.

YADAGIRI, G. et al. Immunotherapy and immunochemotherapy in combating visceral leishmaniasis. **Frontiers in medicine**, v. 10, p. 1096458, 2023.

ZHOU, X. et al. Metabolism of Gallic acid and its distributions in tea (*Camellia sinensis*) plants at the tissue and subcellular levels. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 16, p. 5684, 2020.

ZHANG, H. et al. Progress in antileishmanial drugs: Mechanisms, challenges, and prospects. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 19, n. 1, p. e0012735, 2025.