



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**Luiz Marivando Barros**

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E PROPRIEDADES BIOATIVAS DE *Lantana  
montevidensis* (SPRENG.) BRIQ. E *Lantana camara* L. (VERBENACEAE):  
EVIDÊNCIAS PARA O USO FARMACOLÓGICO**

**Santa Maria, RS, Brasil,  
2016**

**Luiz Marivando Barros**

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E PROPRIEDADES BIOATIVAS DE *Lantana montevidensis* (SPRENG.) BRIQ. E *Lantana camara* L. (VERBENACEAE):  
EVIDÊNCIAS PARA O USO FARMACOLÓGICO**

Tese apresentada por videoconferência ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Bioquímica Toxicológica**.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha  
Co-orientador: Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

**Santa Maria, RS, Brasil,  
2016**

**Ficha catalográfica da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM.**

BARROS, LUIZ MARIVANDO  
CONSTITUINTES QUÍMICOS E PROPRIEDADES BIOATIVAS DE  
Lantana montevidensis (SPRENG.) BRIQ. E Lantana camara  
L. (VERBENACEAE): EVIDÊNCIAS PARA O USO FARMACOLÓGICO /  
LUIZ MARIVANDO BARROS.-2016.  
107 p.; 30cm

Orientador: JOÃO BATISTA TEIXEIRA DA ROCHA  
Coorientador: IRWIN ROSE ALENCAR DE MENEZES  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica  
Toxicológica, RS, 2016

1. Atividades tripanossomicida e leishmanicida. 2.  
Trypanosoma cruzi. Leishmania braziliensis. 3. Óleo  
essencial. 4. Toxicologia. 5. Plantas. Agentes  
terapêuticos. I. ROCHA, JOÃO BATISTA TEIXEIRA DA II.  
MENEZES, IRWIN ROSE ALENCAR DE III. Título.

Todos os direitos autorais reservados a Luiz Marivando Barros. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só será feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Rua Santa Tereza, 531, Bairro São Miguel. Juazeiro do Norte-CE

Fone: (0xx) 88.3512.2687 CEP.: 63.010-520. E-mail: marivando.barros@urca.br;

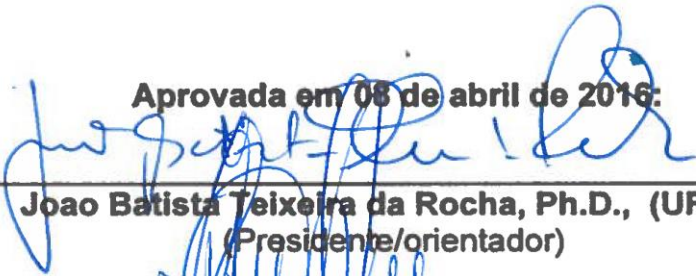
lmarivando@hotmail.com. Endereço Profissional: Departamento de Ciências Biológicas-URCA

**Luiz Marivando Barros**

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E PROPRIEDADES BIOATIVAS DE *Lantana montevidensis* (SPRENG.) BRIQ. E *Lantana camara* L. (VERBENACEAE):  
EVIDÊNCIAS PARA O USO FARMACOLÓGICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Bioquímica Toxicológica.

**Aprovada em 08 de abril de 2016:**

  
\_\_\_\_\_  
**Joao Batista Teixeira da Rocha, Ph.D., (UFSM)**  
(Presidente/orientador)

  
\_\_\_\_\_  
**Irwin Rose Alencar de Menezes, Ph.D, (URCA)**  
(Co-orientador)

  
\_\_\_\_\_  
**Félix Alexandre Antunes Soares, Ph.D (UFSM)**

  
\_\_\_\_\_  
**Maria Rosa Chitolina Schetinger, Ph.D (UFSM)**

  
\_\_\_\_\_  
**Daiana Silva de Avila, Ph.D (UNIPAMPA)**

  
\_\_\_\_\_  
**Antonio Alamo Feitosa Saraiva, Dr. (URCA)**

**Santa Maria, RS  
2016**



## DEDICATÓRIA

*A minha família, minha esposa Gena e aos nossos filhos David, Nelsinho, Lula Vinicius (in memorian) e Helô. Dedico aos meus irmãos Marizete, Marielto, Marivaldo, Marilando, Marcondes, Marinaldo, Marlito e Márcia, pois a família é a base para as conquistas até aqui alcançadas, por todo o incentivo, carinho e compreensão e que estiveram ao meu lado nas decisões que culminaram com a realização deste doutorado. Dedico também a minha mãe Dona Dita e ao meu pai Zé Nelson que infelizmente não está mais entre nós para presenciar esse momento, mas se faz necessário agradecer a educação recebida, o exemplo de luta, o amor dedicado que me fez e fará fortalecido.*

## AGRADECIMENTOS

A concretização deste trabalho ocorreu, principalmente, pelo auxílio, compreensão e dedicação de várias pessoas. Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste estudo e, de uma maneira especial, agradeço:

- À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, através do **Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha** por criar o DINTER na Universidade Regional do Cariri, e oportunizar a realização deste doutorado. Pela receptividade, confiança em mim depositada, pela pessoa humana, incentivadora, dedicada e por seus valiosos ensinamentos, no seu Laboratório de Bioquímica em Santa Maria e por compartilhar o conhecimento quanto às técnicas utilizadas. E ainda, não só pela **orientação nesta tese**, mas também por todas as oportunidades proporcionadas, pelo carinho, apoio e ensinamentos, decisivos, para o meu desenvolvimento profissional;

- A minha esposa Gena, pelo amor incondicional, a dedicação, o carinho, a paciência, a compreensão e pela força diária que necessitei em todos os momentos nessa caminhada, foi por ela que eu não desisti...

- Aos meus Filhos David, Nelsinho e Helô que são meu orgulho, minha vida, meu amor infinito;

- Aos meus pais Zé Nelson (in memoriam) e Dona Dita, por todo amor verdadeiro e apoio e incentivo em todos os momentos, porque sempre acreditaram na minha capacidade e tudo que conquistei na minha vida foi graças a eles;

- Aos professores que fizeram, parte desta formação: Henrique Douglas, José Galberto, Flaviana Morais, Nadghia Leite, Natália Leite, Ivaneide Rocha e Expedito Fidélis; ao co-orientador Irwin Rose Alencar; ao Coordenador Operacional do DINTER, Antonio Álamo e a Manu do IFCE de Juazeiro do Norte;

- Aos meus amigos: Emily, Jean Paul, Kati, Aninha, Weverton, Adriele e Juliana sobretudo pelo companheirismo, com orientação e ajuda nos experimentos, pelo harmonioso convívio diário e pelos momentos de descontração. São em momentos como estes que amizades são consolidadas. Sem o apoio destes, a realização desta tese não seria possível. A Aline Boligon, pela disponibilidade em ajudar.

- Aos professores da E.E.F.M. Valdicleiwatson da Silva Menezes de Cedro-PE, na pessoa da Diretora Neiriland Turbano, Secretária Rosinha e a Secretária de Educação de Pernambuco na Pessoa do Sr. Governador Eduardo

*Henrique Accioly Campos e Gerência Regional de Salgueiro - Waldemar Alves da Solva Júnior (Gerente da GRE) e Maria Aldenoura dos Anjos (Chefe CDP) pela concessão do afastamento para cursar o Doutorado e a E.E.F.M. Figueiredo Correia através da CREDE 19 de Juazeiro do Norte, vinculada a Secretaria de Educação do Ceará na Pessoa dos Diretores Carlos Vidal e Diassis também pela concessão do afastamento para cursar o Doutorado e ao professor Ronaldo Freitas.*

*- As amigas Elisângela Beneval e Marlene Meneses, por todo o carinho, apoio e caminhada neste doutorado.*

*- Aos companheiros de luta no doutorado Valter, Cunha, Ivanildo e Cleidinha.*

*- As minhas sobrinhas Natália, Nadghia e Verinha (e Marcelo; aos meus sobrinhos Lucas, Edson; aos meus cunhados Zequinha, Elba, Ivone e tia Tica, e ao meu primo Paulinho (e Andréia) pelo carinho e apoio e fonte de admiração, inspiração e perseverança.*

*- Em especial a Eliene Duarte por todo momento de luta, perseverança e fazer acreditar que seríamos vitoriosos e pelo harmonioso convívio diário durante a realização das disciplinas, viagens a Santa Maria, experimentos, preparação para qualificação, defesa e pela boa vizinhança de sua família: Dário, Bruninha e Dudu durante o estágio obrigatório em Santa Maria.*

*- A todos os professores doutores que deixaram seu ambiente de trabalho e família para vi contribuir aqui no Cariri com a realização deste doutorado: João Batista, Félix, Rosinha, Ester, Nilda, Roselei, Jeferson e Thaís.*

*- À Universidade pública, gratuita e de qualidade, pela oportunidade de desenvolver e concretizar este estudo e em especial à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação e a Pró-Reitoria de Administração da Universidade Regional do Cariri pela implantação do DINTER em convênio com o Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria e, pelo apoio financeiro concedido, na professora e ex-Reitora Antonia Otonite Cortez e Patrício Melo.*

*- À CAPES, pela implantação do DINTER e pelo apoio financeiro concedido. E as demais pessoas que contribuíram para a minha formação profissional.*

*- Enfim a todos àqueles que fazem parte da minha vida e que são essenciais para eu ser, a cada dia nessa longa jornada, um ser humano melhor. Meu sincero, muito obrigada!*

*“Meus filhos de uma coisa tenho certeza na vida **“o caminho para o sucesso na vida é a educação”** – Tenho aqui duas ferramentas de trabalho: uma enxada e um lápis de carpinteiro. A primeira representa a caneta grossa – sofrerá a vida inteira e só terá para o “sustento”. A segunda representa a caneta fina – a qual usará para estudar e com o conhecimento adquirido saberá enfrentar à vida, vencer os obstáculos, crescer e realizar teus sonhos com simplicidade, dignidade e felicidade para você e sua família”.*

**Zé Nelson**

## RESUMO

### CONSTITUINTES QUÍMICOS E PROPRIEDADES BIOATIVAS DE *Lantana montevidensis* (SPRENG.) BRIQ. E *Lantana camara* L. (VERBENACEAE): EVIDÊNCIAS PARA O USO FARMACOLÓGICO

Autor: LUIZ MARIVANDO BARROS

Orientador: Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha

Co-orientador: Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

Acredita-se que a utilização de plantas medicinais como terapia curativa e preventiva seja tão antiga quanto o próprio homem. No Brasil, a utilização de plantas no tratamento de doenças apresentam influências da cultura indígena, africana e européia. Algumas dessas plantas, como o camará-de-cheiro (*Lantana camara*) e o chumbinho (*Lantana montevidensis*), são utilizadas no Nordeste como agentes tônicos, sudoríferos e febrífugos, contra tosses, bronquites, reumatismo, asma, úlcera e infecções microbianas. Considerando a não existência de tratamento eficiente contra leishmaniose e tripanossomíase devido à resistência às drogas usadas, o pouco conhecimento sobre a toxicidade de plantas para uso medicinal, este estudo pode contribuir para o desenvolvimento de terapias alternativas no tratamento dessas doenças parasitárias. Neste contexto, o óleo essencial extraído por hidrodestilação das folhas de *L. camara* foi testada contra a *Leishmania braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*. Adicionalmente, apesar do fato que as duas plantas são utilizadas para as mesmas finalidades, pouco é conhecido sobre as atividades biológicas da *L. montevidensis*, em particular, a respeito a sua toxicidade e seu potencial antioxidante. Desta forma, outro objetivo desta tese era investigar a genotoxicidade e citotoxicidade de extratos etanólicos (EtOH) e aquosos das folhas de *L. montevidensis* em leucócitos humanos, bem como a sua possível interação com membranas de eritrócitos humanos *in vitro*. A atividade antioxidante de ambos os extratos também foi investigado. Os resultados demonstraram que a composição do óleo essencial de *L. camara* analisado por cromatografia gasosa por espectrometria de massa (GC/MS) revelou a presença de (E)-cariofileno (23,75%), biciclogermacrene (15,80%), germacreno D (11,73%), terpinoleno (6,1%), e sabineno (5,92%). O óleo essencial de *L. camara* inibiu *T. cruzi* e *L. braziliensis* com IC<sub>50</sub> de 201,94 µg/mL e 72,31 µg/mL, respectivamente. O óleo essencial de *L. camara* foi tóxico para os fibroblastos NCTC929 em 500 µg/mL (IC<sub>50</sub> = 301,42 µg/mL). Esses resultados corroboram entre si e, pelo menos em parte, explicado pela presença dos constituintes presente no óleo essencial. Tomados em conjunto, os nossos resultados sugerem que o óleo essencial de *L. camara* pode ser uma importante fonte de agentes terapêuticos para o desenvolvimento de medicamentos alternativos contra doenças parasitárias. A análise de HPLC-DAD dos extratos EtOH e extratos aquosos de *L. montevidensis* identificou ácido clorogênico e quercetina como os principais componentes para EtOH, enquanto os ácidos caféicos e clorogênicos foram os principais ácidos fenólicos no extrato aquoso. Nos ensaios de citotoxicidade, de fragilidade osmótica de eritrócitos humanos e viabilidade celular em ensaio cometa, os extratos EtOH e extratos aquosos de *L. montevidensis* (1-480 µg/mL) não demonstraram efeitos tóxicos e não afetaram o índice de danos no DNA, porém, promoveram citotoxicidade nas maiores concentrações (240-480 µg/mL). Para a atividade antioxidante, os extratos foram capazes de sequestrar o radical DPPH e inibir a peroxidação lipídica induzida pelo Fe<sup>2+</sup> (10 µM) em homogenados de cérebro e fígado de rato e, esta ação parece não ser atribuída a quelação de ferro (II). Estes resultados justificam pelo menos em parte o uso popular desta planta na medicina tradicional e sugerem que cuidado deve ser tomado quanto a sua dosagem ou frequência de uso. Contudo, espera-se que estes resultados possam contribuir significativamente com o conhecimento fitoquímico e atividade biológica destas espécies. Isto poderá ser de extrema importância para a região na obtenção de novos fármacos naturais, e conseqüentemente melhoria da qualidade de vida dos brasileiros.

**Palavras-chave:** Atividades tripanossomicida e leishmanicida. *Trypanosoma cruzi*. *Leishmania braziliensis*. Óleo essencial. Toxicologia. Plantas. Agentes terapêuticos.

## ABSTRACT

### CONSTITUENTS CHEMICALS AND BIOACTIVE OF *Lantana montevidensis* PROPERTIES (SPRENG.) BRIQ. AND *Lantana camara* L. (VERBENACEAE): EVIDENCE FOR USE PHARMACOLOGICAL

Author: LUIZ MARIVANDO BARROS

Supervisor: Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha

Co-supervisor: Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

Humans have been using medicinal plants for centuries as preventive or curative agents. In Brazil, the use of plants in the treatment of diseases is influenced by Indigenous, African and European cultures. Among these plants are *Lantana camara* and *L. montevidensis* commonly known as “camará-de-cheiro” and “chumbinho”, respectively. They are used in the North-eastern part of Brazil as tonic sudorific and febrifuge agent. They are also used against, coughs, bronchitis, rheumatism, asthma, ulcer and microbial infections. Considering that there is limited therapy against Leishmaniasis and Trypanosomiasis, due to drugs resistance, the knowledge of the pharmacology of plants extracts can constitute a prerequisite for the development of alternative drugs against these parasitic diseases. In this context, the essential oil extracted by hydrodistillation of *L. camara* leaf was tested against *Leishmania braziliensis* and *Trypanosoma cruzi*. Although both plants are used for the same purpose, there is limited information regarding the potential toxicity and antioxidant activity of *L. montevidensis*. Thus, we aimed to investigate the genotoxicity and cytotoxicity of ethanolic (EtOH) and aqueous extracts from the leaves of *L. montevidensis* in human leukocytes, as well as its possible interaction with membranes from human erythrocytes *in vitro*. The antioxidant activity of both extracts was also investigated. The results demonstrated that the essential oil composition of *L. camara* analyzed by gas chromatography mass spectrometry (GC/MS) showed a large amount of (E)-caryophyllene (23.75%), bicyclogermacrene (15.80%), sesquiterpene (11.73%), terpinolene (6.1%), and sabinene (5.92%). The essential oil of *L. camara* inhibited *T. cruzi* and *L. braziliensis* with IC<sub>50</sub> of 201.94 µg/mL and 72.31 µg/mL, respectively. *L. camara* essential oil was toxic to NCTC929 fibroblasts at 500 µg/mL (IC<sub>50</sub> = 301.42 µg/mL). These results corroborate each other and can be explained at least in part, by the presence of some chemical constituents in the oil. The results suggest that *L. camara* essential oil can be an important source of therapeutic agents for the development of alternative drugs against parasitic diseases. HPLC analysis of EtOH and aqueous extracts of *L. montevidensis* showed chlorogenic acid and quercetin as main components in EtOH extract, whereas, caffeic and chlorogenic acids were the major phenolic acids in the aqueous extract. It was observed that treatment of human leukocytes with EtOH and aqueous extracts of *L. montevidensis* (1-480 µg/mL) did not affect the osmotic fragility of human erythrocytes and DNA damage index, but, promoted cytotoxicity at higher concentrations (240-480 µg/mL). Regarding the antioxidant activity, the extracts scavenged DPPH radical and prevented Fe<sup>2+</sup>-induced lipid peroxidation in rat brain and liver homogenates, and this action was likely not attributed to iron (II) chelation. These results justify at least in part the use of this plant in folk medicine and suggests that caution should be made regarding its dosage or frequency use. All together, it is hoped that these results would contribute significantly to the knowledge about the phytoconstituents and biological activity of these species. This finding could be of immense importance for the region by obtaining new natural medicines from biodiversity and consequent improvement in quality of Brazilian life's.

**Keywords:** trypanocidal and leishmanicide activities. *Trypanosoma cruzi*. *Leishmania braziliensis*. Essential oil. Toxicology. Plants. therapeutic agents.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACR <sub>2</sub>	Enzima antimônio redutase
AGP	Trifosfato de guanosina
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
CG/MS	Cromatografia gasosa acoplada espectrometria de massa
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)
CNS	Conselho Nacional de Saúde
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
EAFFLC	Extrato Aquoso de Folhas Frescas de <i>Lantana camara</i>
EAFFLM	Extrato Aquoso de Folhas Frescas de <i>Lantana montevidensis</i>
EAFSLC	Extrato Aquoso de Folhas Secas de <i>Lantana camara</i>
EAFSLM	Extrato Aquoso de Folhas Secas de <i>Lantana montevidensis</i>
EALM	Extratos Aquoso de <i>Lantana montevidensis</i>
EDTA	Etileno diamino tetra acético
EEFFLC	Extrato Etanólico de Folhas Frescas de <i>Lantana camara</i>
EEFFLM	Extrato Etanólico de Folhas Frescas de <i>Lantana montevidensis</i>
EEFSLC	Extrato Etanólico de Folhas Secas de <i>Lantana camara</i>
EEFSLM	Extrato Etanólico de Folhas Secas de <i>Lantana montevidensis</i>
EELM	Extrato Etanólico de <i>Lantana montevidensis</i>
ERs	Espécies reativas
FOE	Fragilidade osmótica eritrocitária
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória para 50% (crescimento celular)
MDA	Malondialdeído
NIH	National Institute of Health
OLC	Óleo essencial de <i>Lantana camara</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PG	Propil galato
PL	Peroxidação lipídica
ROS	Espécies reativas de oxigênio
T(SH)	2-tripranotona (tiol específico do parasito leishmania)
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TBHQ	Terc-butil-hidroquinona
TDR1	Enzima específica do parasito

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
	Figura 1 - Ciclo de vida <i>Leishmania</i> Sp. ....	21
	Figura 2 - Ciclo de vida do gênero <i>Trypanosoma</i> .....	24
	Figura 3 - Localização da área de estudo: Chapada do Araripe, Crato-CE .....	33
	Figura 4 - A) Aspecto geral da parte aérea de <i>Lantana camara</i> L. B) Folha. C) Flor D) Fruto .....	34
	Figura 5 - A) Aspecto geral da parte aérea de <i>Lantana montevidensis</i> Briq. B) Folha. C) Flor. D) Fruto .....	36
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	45
4.1	PRODUÇÃO CIENTÍFICA .....	45
4.1.1	<b>Artigo 1</b> .....	45
	Table 1.- Composition of <i>Lantana camara</i> leaf essential oil .....	48
	Table 2 - Activity of essential oil from leaves of <i>L. camara</i> against <i>T. cruzi</i> .....	48
	Table 3 - Activity of <i>L. camara</i> leaf essential oil against <i>Leishmania braziliensis</i> .....	49
	Table 4 - Toxicity of Effect of <i>L. camara</i> leaf essential oil on NCTC929 fibroblast .....	49
4.1.2	<b>Artigo 2</b> .....	55
	Table 1- Calibration curve of the standards used in the analysis .....	74
	Table 2 - Schedule of evaluation of oxidation or chelation of Fe <sup>2+</sup> /Fe <sup>3+</sup> by plant extracts .....	74
	Table 3 - Quantitative analysis of phenolics and flavonoids from the ethanolic and aqueous leaves extracts of <i>L. montevidensis</i> .....	75
	Table 4 - Percent inhibition of DPPH radical by EtOH and aqueous extracts from the leaves of <i>L. montevidensis</i> .....	75
	Fig. 1 - Phenolics and flavonoids constituents of ethanolic (A) and aqueous (B) extracts from the leaves of <i>L. montevidensis</i> by high performance liquid chromatography (HPLC). Gallic acid (peak 1), catechin (peak 2), chlorogenic acid (peak 3), caffeic acid (peak 4), ellagic acid (peak 5), rutin (peak 6), quercitrin (peak 7), isoquercitrin (peak 8), quercetin (peak 9), kaempferol (peak 10), luteolin (peak 11) and apigenin (peak 12). The retention time of each compound is shown in Table 1 .....	77
	Fig. 2 - Oxidation of Fe <sup>2+</sup> by EtOH (A) and aqueous (B) extracts from the leaves of <i>L. montevidensis</i> . The extracts (1-60 µg/mL) were incubated with FeSO <sub>4</sub> (110 µM) for 10 min. The extracts (1-60 µg/mL) were incubated with FeSO <sub>4</sub> (110 µM) for 10 min. Then,	



ortophenanthroline was added and the absorbance of the reaction mixture was measured at 0, 10 and 20 min following its addition. After the last reading (at 20 min), 5 mM ascorbic acid (AA) was added to the reaction mixture, and the absorbance was read again after 5 min (at 25 min), 10 min (at 30 min) and 20 min (at 40 min) (see Table 1 for details). Values represent the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments performed in duplicate ..... 77

Fig. 3. Inhibitory potential of EtOH and aqueous extracts from the leaves of *L. montevidensis* on Fe<sup>2+</sup>-induced lipid peroxidation in rat brain (A and B) and liver (C and D) homogenates. The results are expressed as mean  $\pm$  SEM of n = 3 independent experiment performed in duplicate. \*p < 0.05 vs. basal; and # p < 0.05 vs Fe<sup>2+</sup> ..... 79

Fig 4 - Effect of ethanolic and aqueous extracts from the leaves of *L. montevidensis* on human leukocytes in the absence (A and B) and presence (C and D) of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The results are expressed as percentage of control. Each column represent the mean  $\pm$  SEM of four independent. \*p < 0.05 versus control, ns-not significant ..... 79

Fig. 5. Genotoxicity evaluation of ethanolic (A) and aqueous (B) extracts from the leaves of *L. montevidensis* by the Comet assay. MMS-methyl methanesulfonate. Results are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*p < 0.05 vs. control. Fig. 6. Osmotic fragility of erythrocytes treated with EtOH (A) and aqueous (B) extracts from the leaves of *L. montevidensis*. Hemolysis was expressed in percentage of the positive control (Triton-100). Treated erythrocytes were added to various concentrations of NaCl (0–0.9%) and incubated for 20 min and the absorbance of the supernatants were measured at 540 nm. The bars represent the means of n = 3 independent experiments performed in duplicate ..... 80

**Fig. 6.** Osmotic fragility of erythrocytes treated with EtOH (A) and aqueous (B) extracts from the leaves of *L. montevidensis*. Hemolysis was expressed in percentage of the positive control (Triton-100). Treated erythrocytes were added to various concentrations of NaCl (0–0.9%) and incubated for 20 min and the absorbance of the supernatants were measured at 540 nm. The bars represent the means of n = 3 independent experiments performed in duplicate ..... 80

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS  
LISTA DE ILUSTRAÇÕES  
RESUMO  
ABSTRACT  
APRESENTAÇÃO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1	DOENÇAS PARASITÁRIAS E PLANTAS COM FINS MEDICINAIS .....	16
1.2	LEISHMANIOSE E DOENÇA DE CHAGAS .....	18
1.2.1	<b>Leishmaniose</b> .....	18
1.2.2	<b>Doença de Chagas</b> .....	23
1.3	RESISTÊNCIA ÀS DROGAS ANTIPARASITÁRIAS E TERAPIAS NATURAIS CONTRA DOENÇAS PARASITÁRIAS .....	28
1.4	FAMÍLIA VERBENACEAE, GÊNERO <i>LANTANA</i> : <i>Lantana camara</i> e <i>Lantana montevidensis</i> .....	31
1.5	OS RADICAIS LIVRES NO SISTEMA BIOLÓGICO e ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS E NATURAIS .....	36
2	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	43
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	44
3.1	OBJETIVO GERAL .....	44
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	44
4	<b>RESULTADOS</b> .....	45
4.1	PRODUÇÃO CIENTÍFICA .....	45
4.1.1	<b>Artigo 1</b> - Chemical Characterization and Trypanocidal, Leishmanicidal and Cytotoxicity Potential of <i>Lantana camara</i> L. (Verbenaceae) Essential Oil .....	45
4.1.2	<b>Artigo 2</b> - Safety Assessment and Antioxidative activity of <i>Lantana montevidensis</i> : Contribution to its Phytochemical and Pharmacological activity .....	55
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	81
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	87
7	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	88
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	89

## APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO**, contém uma Revisão da Literatura concisa sobre os temas desenvolvidos nesta tese.

A metodologia realizada e os resultados obtidos que compõem esta TESE estão apresentados sob a forma de artigos, os quais se encontram no item **RESULTADOS**. Nestes artigos constam as seções: Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências.

Os itens **DISCUSSÃO e CONCLUSÃO**, encontrados no final desta tese, apresentam descrições, interpretações e comentários gerais sobre os artigos científicos incluídos neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS** descritas correspondem somente às citações que aparecem nos itens **APRESENTAÇÃO, INTRODUÇÃO e DISCUSSÃO** desta tese.

Esta tese é parte integrante dos projetos desenvolvidos no Laboratório de Bioquímica Toxicológica da UFSM com a aprovação nº 076-2012-2 - Toxicidade *in vitro* envolvendo ratos e aprovação nº 0890.243.000-07 - Toxicidade em células humanas, do Comitê de Ética e Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria. Os animais foram mantidos e usados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal elaborado pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). Todo o estudo está em conformidade com as normas e diretrizes bioéticas vigentes para ensaios envolvendo seres vivos: humanos (Res. Nº 196/1996 e 301/2000 do Conselho Nacional de Saúde – CNS), animais não-humanos (*Guide for the care and use of laboratory animals*, do NIH - National Institute of Health-EUA, 1996); Lei Federal Nº 11.794/2008; Princípios Éticos da Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA); e integridade da fauna e flora (Lei Federal Nº 9605/1998) (BAZZANO, 2006; BRASIL, 2006, 2008; MACHADO et al., 2012; PICON, 2015).

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 DOENÇAS PARASITÁRIAS E PLANTAS COM FINS MEDICINAIS

As doenças parasitárias são causadas pela infestação ou infecção com parasitas, como protozoários, seres unicelulares, vermes ou insetos. Estas doenças são comuns na África, sul da Ásia, América Central e América do Sul, sobretudo entre as crianças. As doenças parasitárias, tais como a doença de Chagas e a leishmaniose, chegam a causar um milhão ou mais de casos em todo o mundo, anualmente (NEVES et al., 2005).

As doenças parasitárias são responsáveis por considerável morbidade e mortalidade em todo o mundo, e frequentemente estão presentes com sinais e sintomas não específicos (MILLER et al., 2003). A diversidade de manifestações clínicas e de lesões está relacionada às características biológicas dos parasitas (estágio de evolução, densidade populacional, localização no trato gastrointestinal, capacidade de invasão, de migração e de consumo de nutrientes e sangue) e às condições do hospedeiro (estado nutricional, competência imunológica e alterações patológicas associadas) (MENEZES et al., 2008).

Nwaka e Ridley (2003), relatam que as doenças parasitárias permanecem sendo uma barreira para o desenvolvimento social e econômico dos países mais pobres, e são frequentemente chamadas de “doenças negligenciadas”, “doenças órfãs” ou “doenças tropicais”. Conforme (WHO, 2010), estas doenças tropicais negligenciadas (DTN) afetam mais de um bilhão de pessoas, especialmente nas áreas tropicais e subtropicais do mundo e, a maioria do total das mortes ocorrem em regiões situadas abaixo da linha do Equador (KETTER e MARJANOVIC, 2004).

As DTN são um conjunto de doenças infecciosas diferenciadas pelo alto nível de morbidade, entretanto com baixo nível de mortalidade e dentre as 17 DTN priorizadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) estão várias doenças parasitárias transmitidas por vetores (malária, tripanosomíases, leishmanioses, esquistossomose e as filarioses), que afetam intensamente a qualidade de vida (REGUERA et al., 2005, KEALEY e SMITTH, 2010). De acordo com a OMS, o Brasil é um dos países com a maior ocorrência de DTN e o impacto dessas

doenças difere de região para região, mas, apresenta uma estreita relação com as áreas de maior pobreza e menor desenvolvimento sócio-econômico, que no Brasil se concentram nas regiões Norte e Nordeste (LINDOSO e LINDOSO, 2009).

Para YAMANAKA (2012), as doenças parasitárias devido complexidade ecoepidemiológica, associadas as dificuldades no controle vetorial e a ausência de vacinas eficazes para uso humano, fazem do tratamento medicamentoso uma das únicas alternativas para enfrentar estes agravo de saúde. Além disso, o escasso arsenal quimioterápico disponível para tratamento destas doenças, somado a limitada eficácia e os efeitos colaterais dos medicamentos utilizados na clínica e o surgimento de parasitos resistentes aos quimioterápicos são problemas de ordem global (LINDOSO e LINDOSO, 2009).

Conforme Lima (2014), a busca por novos fármacos para as doenças humanas negligenciadas tem se acelerado na última década. A expansão dos programas de descoberta e desenvolvimento de novas substâncias tem sido apoiado pelas empresas farmacêuticas.

Os números relativos ao desenvolvimento e pesquisa de novos fármacos para essas doenças preocupam, de 1975 até hoje, com exceção da malária, apenas 13 novos fármacos foram aprovadas para uso na ação dessas doenças, representando 0,9% de todos os medicamentos aprovados no período, o que está muito abaixo da necessidade da demanda necessária atual, uma vez que as DTNs respondem por 5% do impacto de doenças no mundo e apenas 0,1% dos investimentos globais em pesquisa são destinados à busca de novas alternativas terapêuticas, sendo que, 5% são oriundos de indústrias farmacêuticas, 54% de instituições filantrópicas e 41% de instituições públicas (KETTER e MARJANOVIC, 2004; FREARSON et al., 2007).

Dada esta condição, Sangenis et al. (2014), alertam para alguns fatores que vem contribuindo para o aumento da incidência dessas doenças tropicais: aparecimento de parasitas resistentes aos fármacos usados em clínica; vetores com resistência aos inseticidas e populações endêmicas (FIGUEIREDO et al., 2014) crescentes nos países subdesenvolvidos, em desenvolvimento e desenvolvidos devido ao processo migratório e a co-infecção devida a outras doenças (LIMA, 2014).

O uso de plantas com fins medicinais vem crescendo substancialmente nos últimos anos devido à facilidade de acesso aos produtos naturais, o baixo custo e

sua compatibilidade cultural. A Caatinga e a Floresta Nacional do Araripe são bastante diversificadas e em parte, constituídas por espécies com características peculiares, como as que apresentam princípios ativos com potencial fitoterápico. Entre as diversas espécies nativas encontradas nestes ecossistemas a *Lantana camara* e *Lantana montevidensis*, popularmente conhecidas como “camará de cheiro” e “chumbinho”, respectivamente, destacam-se por suas potencialidades medicinais, sendo suas folhas muito utilizadas na medicina popular devido às propriedades curativas que lhe são atribuídas (SOUSA et al., 2014; RIBEIRO et al., 2014).

Entre as diversas atividades biológicas relatadas na literatura com *L. camara* e *L. montevidensis* pode-se destacar a ação sobre a proliferação de microrganismos como bactérias e fungos (BARRETO et al., 2010; SOUSA et al., 2011; NAZ e BANO, 2013).

Neste sentido, diante dos promissores relatos na literatura, a cerca desse gênero, e levando em consideração o potencial terapêutico destas espécies é notória a importância na continuidade de estudos envolvendo bioatividade e toxicologia *in vitro*, para um possível uso no tratamento das doenças parasitárias tais como a leishmaniose e a doença de Chagas.

## 1.2 LEISHMANIOSE E DOENÇA DE CHAGAS

### 1.2.1. Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença antroponótica e zoonótica, transmitida por um protozoário que durante seu ciclo de vida tem como hospedeiro vertebrado o homem (TESH, 1995; NEUBER, 2008). Um grande número de mamíferos silvestres e domésticos como roedores, carnívoros, marsupiais, ungulados, canídeos silvestres e primatas foram encontrados naturalmente infectados por diferentes espécies de *Leishmania* (COLLA-JACQUES et al., 2010; BRASIL, 2010; QUARESMA et al., 2011; MARCELINO et al., 2011; FREITAS et al., 2012; CARREIRA et al., 2012). Embora estes animais sejam considerados reservatórios silvestres do parasito, o cão doméstico possui um papel fundamental como

reservatório da leishmaniose visceral no ciclo de transmissão nas áreas urbanas (WERNECK, 2010).

A leishmaniose é um dos maiores problemas de saúde pública de países em desenvolvimento e encontra-se entre as endemias consideradas prioritárias no mundo, sendo citada em 98 países e territórios, afetando 12 milhões de pessoas, sendo que 350 milhões estão expostas à infecção (WHO, 2013; LIMA, 2014). A ocorrência da doença está relacionada a múltiplos fatores: sociais, econômicos, políticos e culturais (CARLOS et al., 2015).

No Brasil, a leishmaniose tegumentar americana apresenta ampla distribuição, com registro de casos em todas as regiões brasileiras (BRASIL, 2007). As grandes alterações na cobertura vegetal ao longo do século XX, influenciaram diretamente no perfil epidemiológico da leishmaniose (TOLEZANO, 2001). Essas ações provocaram modificações no ambiente natural que foram associadas a surtos de leishmaniose.

Em um estudo realizado no período de 1998 a 2006, objetivando identificar os fatores ambientais e sociais determinantes da leishmaniose no Vale do Ribeira em São Paulo verificou-se que extensas áreas com remanescentes da mata atlântica na região favoreceu a presença de flebotomíneos, isso explicaria a presença em grande parte dos municípios da região apresentar vetores, segundo dados da SUCEN (SILVA, LATORRE e GALATI, 2010).

Pessoas concentradas nas áreas residenciais periféricas e que tem mais contato com a mata estão mais expostas à leishmaniose. Observou-se que muitas moradias num dos bairros de Ubatuba – SP, mais atingidos pela doença, se encontravam inseridas na mata, com vegetação densa ao redor. Notou-se também a precariedade das residências, a falta de telas de proteção contra insetos, em portas e janelas o que provavelmente favorece a invasão vetorial, especialmente no período noturno quando os mosquitos são atraídos pela luminosidade no interior da residência (SILVA e GURGEL, 2015). Entre a população atingida pela leishmaniose a escolaridade parece ser um fator de influência nas pessoas atingidas pela doença. Entre 1998 e 2006, 70% das pessoas não tinham o Ensino Fundamental completo, 12% concluíram o Ensino Médio, máximo grau de instrução observado entre os indivíduos notificados com a leishmaniose.

De forma geral, a transmissão urbana apresenta dois aspectos: quando há o deslocamento do inseto transmissor das florestas para bairros próximos a mata

ou pela ação dos flebotomíneos adaptados a áreas arborizadas, periféricas a cidade. Quando a mata é devastada, os animais das proximidades fogem ou morrem deixando os flebotomíneos sem suas fontes alimentares naturais. Tal risco se relaciona a destruição dos nichos ecológicos naturais dos flebotomíneos, que nesses casos em geral migram para o ambiente peridomiciliar, que conta com a presença de animais domésticos, o que pode propiciar condições favoráveis de transmissão da doença para o homem.

Assim, surtos e epidemias de leishmaniose estão associadas as alterações ambientais para exploração dos recursos naturais, a invasão do homem no ambiente natural, a ocupação desordenada do espaço urbano e as precárias condições de vida da população (RODRIGUES e LIMA, 2013).

O gênero *Leishmania* (Filo Protozoa: Ordem Kinetoplastidae: Família: Trypanosomatidae) descrito por Ross em 1903, compreende protozoários unicelulares e heteróxeos, que são transmitidos a vários mamíferos por vetores (fêmeas infectadas) dípteros da família *Psychodida*, hematófagos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (READY, 2010; SHUKLA et al., 2010; VENDRAMETTO et al., 2010), com ampla distribuição nas regiões com climas quentes e temperados (BORASCHI e NUNES, 2007). O gênero abrange cerca de 20 espécies, existentes nas formas flagelada, promastigota e amastigota, parasita intracelular obrigatório de macrófagos de mamíferos (WHO, 2013).

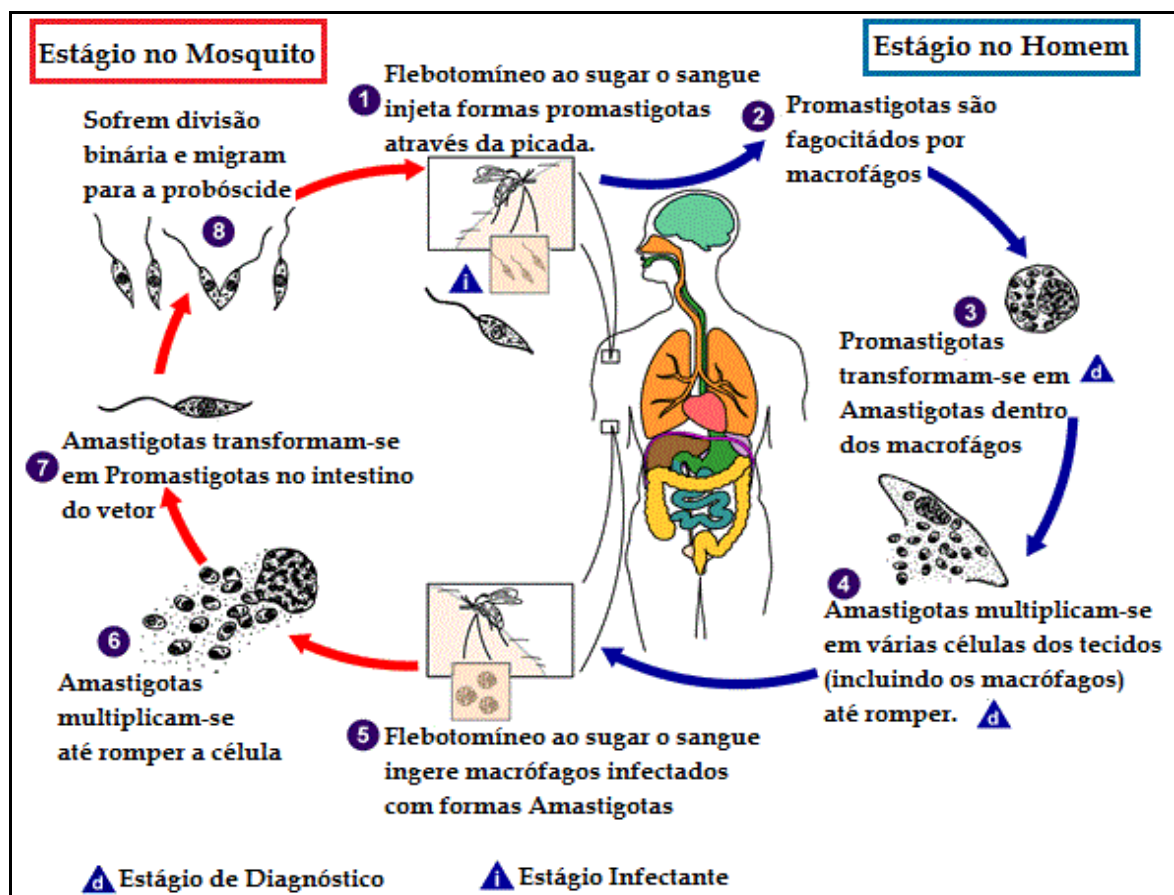
Há várias espécies de leishmanias envolvidas na transmissão. Nas Américas, são atualmente reconhecidas 11 espécies dermatólicas de *Leishmania* causadoras de doença humana e 8 espécies descritas, somente em animais. No Brasil, já foram identificadas 7 espécies, sendo 6 do subgêneros *Viannia* e 1 do subgênero *Leishmania*. As mais importantes são *Leishmania (Viannia) braziliensis*, L. (L.) *amazonensis* e L. (V.) *guyanensis*, levando o país a ser considerado altamente endêmico (BRASIL, 2010; MOTA e MIRANDA, 2011). No Brasil é encontrada a maior prevalência de todo continente Americano, estimando-se 65.000 novos casos por ano. A leishmaniose é a segunda doença parasitária mais comum no mundo, estimando-se 600.000 novos casos por ano (SILVA et. al., 2007).

As leishmanias apresentam com um ciclo de vida digenético (heteroxênico), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, estes



últimos sendo responsáveis pela transmissão dos parasitas de um mamífero a outro. Nos hospedeiros mamíferos, representados na natureza por várias ordens e espécies, os parasitas assumem a forma amastigota, arredondada e imóvel, que se multiplica obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário. À medida que as formas amastigotas vão se multiplicando, os macrófagos se rompem liberando parasitas que são fagocitados por outros macrófagos. Nos flebotomíneos as leishmanias vivem no meio extracelular, na luz do trato digestivo. Ali, as formas amastigotas, ingeridas durante o repasto sanguíneo, se diferenciam em formas flageladas, morfológica e bioquimicamente distintas das amastigotas, sendo posteriormente inoculadas na pele dos mamíferos durante a picada como descrito na Figura 1.

Figura 1 - Ciclo de vida *Leishmania* sp.



Fonte: (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013 (US) UNIVERSITY OF FLORIDA. Acesso em 24/03/2016).

A leishmaniose é uma das afecções dermatológicas que merece atenção, pela sua dimensão, risco de ocorrência de deformidades e envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico (BRASIL, 2010). A OMS divide as leishmanioses em quatro grupos clínicos: cutânea, mucocutânea, cutâneo-difusa e visceral. A cutânea é a forma mais frequente da doença e começa com o aparecimento de uma pápula ou nódulo no sítio de inoculação pelo mosquito infectado (REITHINGER et al., 2007).

A estrutura e o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes (Sb) são desconhecidos, sendo prováveis a inibição das adenosina (ATP) e guanosina trifosfatos (AGP) através da inibição do ciclo do ácido cítrico e da glicólise 5 e a ativação e conversão do antimonial para a forma trivalente (SbIII). Parece que o Sb é capaz de alterar o potencial redox tiol da célula induzindo o efluxo de tiol intracelular e inibindo a tripanotona redutase. Uma enzima específica do parasito, TDR1, pode catalisar a conversão de SbV para Sb III usando glutatona como redutor. A enzima antimônio redutase, ACR2, também reduz o SbV e aumenta a sensibilidade ao mesmo. O tiol, incluindo tiol parasito-específico como glicilcisteína, pode reduzir SbV para Sb III de forma não enzimática.

Há possibilidade de que mais de um mecanismo seja responsável pela ativação da droga. anfotericina B é um antibiótico polieno que interage com o ergosterol da membrana celular, formando poros que alteram a permeabilidade celular e o balanço iônico, causando a morte celular (LIMA et al., 2007).

Nesse contexto, Carvalho et al. (1994), Osório et al. (2007) e Goto e Lindoso (2010), relatam que o tratamento da leishmaniose não é satisfatório em termos de efetividade e toxicidade, sendo que o antimonial pode atingir o limiar de toxicidade, podendo levar a alterações cardíacas ou renais que obriguem a suspensão do tratamento. Além disso, a resistência às drogas já existentes e a sensibilidade de diferentes cepas. Diante do exposto a busca de novas moléculas e também de novas formas farmacêuticas para o tratamento das leishmanioses, tem sido incentivada (MALTEZOU, 2010).

Seu tratamento é desafio porque as drogas disponíveis apresentam elevada toxicidade, e nenhuma delas é bastante eficaz. A recidiva, a falha terapêutica em pacientes imunodeprimidos e a resistência ao tratamento são fatores que motivam a busca de uma droga ideal (LIMA et al., 2007). Tal toxicidade dos fármacos

utilizados atualmente e as formas resistentes de *Leishmania* têm impulsionado as pesquisas para a síntese de novos compostos sintéticos, semissintéticos e produtos naturais, principalmente os fitoterápicos tradicionalmente usados para o tratamento de parasitoses (TEMPONE et al., 2005; BRASIL, 2010).

### 1.2.2. Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma zoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* pertencente ao subfilo Mastigophora, ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma*. Ela é transmitida pelo inseto triatomíneo, um hemíptero, hematófago da família Reduviidae (CHAGAS, 1909; SCHMUNIS, 2000; LANA e TAFURI, 2001; REY, 2001). O número de mortes é cerca de quatorze mil por ano. Ainda constitui a doença parasitária responsável pelo maior número de mortes na América Latina, superando a malária.

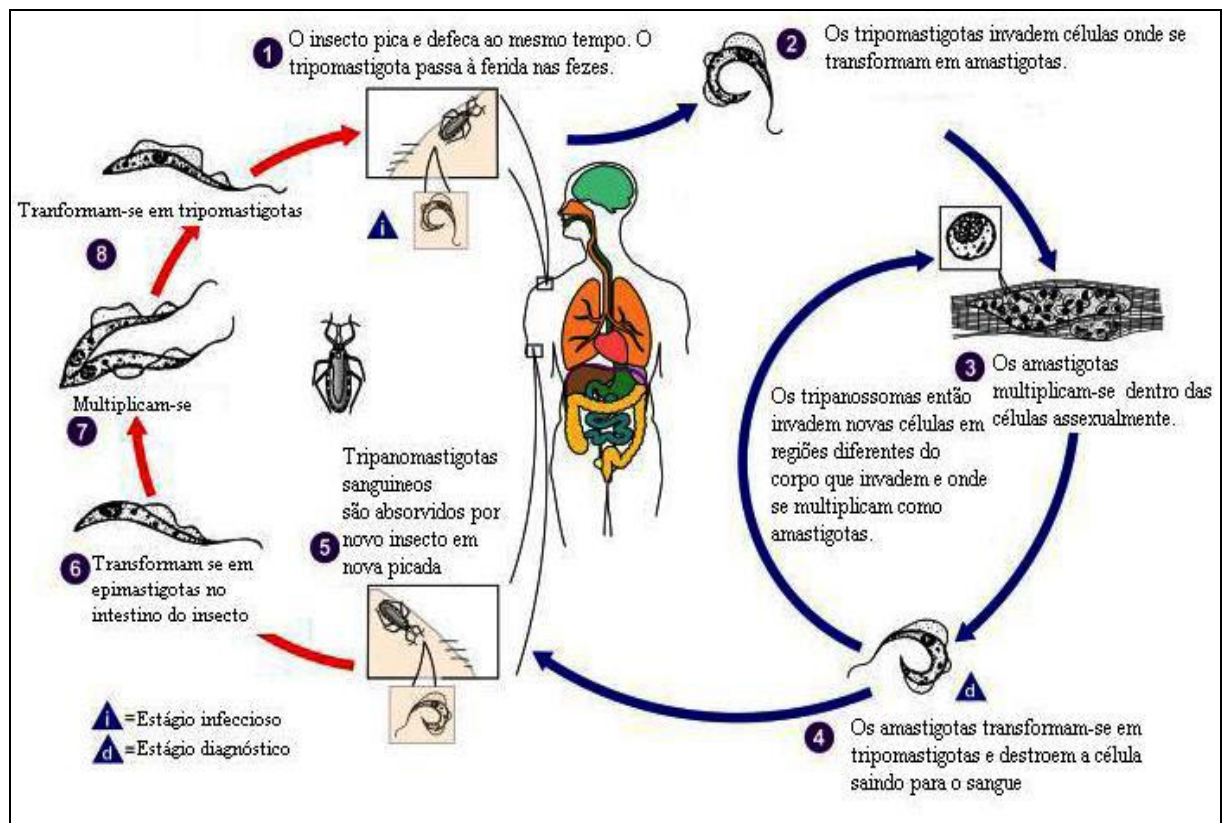
A propagação da doença continua através da transfusão e dos transplantes de órgãos em regiões endêmicas e não-endêmicas, assim como em casos isolados pela via oral (STEINDEL et al., 2008; RASSI JUNIOR et al., 2010). Da mesma forma como nas leishmanioses, o panorama da doença de Chagas tem relação direta com as baixas condições socioeconômicas, o que leva a crer que a prevenção e controle da doença dependem das condições de saúde, alimentação, educação e, sobretudo o acesso ao diagnóstico e tratamento eficiente (VIOTTI et al., 2009).

Schmunis e Yadon (2010) e Coura e Viñas (2010), relatam que ultimamente, a disseminação internacional da doença passou a existir através dos viajantes e imigrantes, considerando-se que a infecção pelo *T. cruzi* ocorre por via oral, transfusão de sangue e transplante de órgãos.

O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* é heteroxeno, com hospedeiros vertebrados e invertebrados (LANA e TAFURI, 2001) e, se inicia quando o barbeiro (triatomíneo infectado), ao se alimentar do sangue do hospedeiro vertebrado, elimina, em suas fezes e urina, o parasito em sua forma alongada (tripomastigotas metacíclicos) próximo do local da picada. Através de mucosas ou por ferimentos na pele, estes infectam células do hospedeiro, como as do coração. Dentro do hospedeiro, os tripomastigotas invadem células próximas ao ponto de entrada onde diferenciam-se nas formas intracelulares arredondadas, os amastigotas;

estes amastigotas multiplicam-se por divisão binária; então diferenciam-se em tripomastigotas e são liberados na circulação sanguínea. Os tripomastigotas infectam células de uma grande variedade de tecidos e transformam-se em amastigotas intracelulares, num ciclo infectante contínuo; o triatomíneo infecta-se ao ingerir sangue de um hospedeiro vertebrado contendo parasitas circulantes; os tripomastigotas ingeridos transformam-se em epimastigotas no intestino médio do vetor; multiplicando-se por divisão binária; no intestino posterior o parasita se diferencia na forma infectante, o tripomastigota metacíclico (Figura 2) (DPDx, 2016).

Figura 2: Ciclo de vida do gênero *Trypanosoma*



Fonte: (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013 (US) UNIVERSITY OF FLORIDA. Acesso em 24/03/2016).

De acordo com Coura e Dias (2009) e Brasil (2010), a doença de Chagas compreende duas fases clínicas distintas: aguda e crônica. A primeira fase é caracterizada por miocardite difusa e, a segunda é responsável por consideráveis taxas de morbidade e mortalidade (ZULANTAY et al., 2004).

O período de incubação do *T. cruzi* pode variar de 3 a 112 dias, dependendo do modo de infecção (SHIKANAI-YASUDA e CARVALHO, 2012). Sendo assim, a fase aguda dura de 4 a 8 semanas e se caracteriza pelo predomínio do parasita circulante na corrente sanguínea e geralmente é assintomática ou oligossintomática, nesse último caso Marcondes et al. (2000), relataram que a infecção pelo *T. cruzi* na fase aguda está associada com anemia, hipoplasia da medula óssea, trombocitopenia e leucopenia (PEREIRA e NAVARRO, 2013). Também são mencionadas, febre prolongada, mal-estar, hepato e/ou esplenomegalia e linfadenomegalia localizada na região da picada (sinal de Romaña ou chagoma de inoculação) (RASSI JÚNIOR et al., 2010).

Rassi Júnior et al. (2010), relatam que cerca de 8 milhões de pessoas se encontram na fase crônica sintomática da infecção, no entanto, a maioria dos infectados são assintomáticos, podendo permanecer nesta condição por cerca de 30 anos ou mais.

A taxa de mortalidade pode variar de 5 a 10% nessa fase e geralmente envolve crianças que morrem de miocardite e/ou mieloencefalite (MURCIA et al., 2013). Segundo o Ministério da Saúde entre 2005 e 2009 foram notificados 455 casos da doença em fase aguda no Brasil, dos quais 389 (85,5%) ocorreram na região norte do país, sendo 310 (68,1%) no Pará e 29 (6,3%) casos no estado do Amazonas (MONTEIRO et al., 2010; BRASIL, 2013). O número anual de casos agudos relatados entre 2000-2012 em El Salvador chegou a 731 entre crianças e adultos com mais de 13 anos. Embora o número anual de pacientes com doença de Chagas aguda tenha diminuído de 117 em 2007 para 16 em 2012, a razão para o grande número de casos agudos em El Salvador não é clara, uma vez que, a transmissão oral da doença não tem sido relatada no país (SASAGAWA et al., 2014).

Segundo Soares-Sobrinho et al. (2007) e Pereira e Navarro (2013), a fase crônica da doença é caracterizada pela baixa incidência de parasitas circulantes na corrente sanguínea e costuma ser assintomática, o paciente não apresenta sintomatologia importante do ponto de vista clínico ou resultados anormais no eletrocardiograma (ECG) de repouso e no estudo radiológico de tórax, esôfago e cólon, cerca de 60% dos pacientes apresenta esse quadro conhecido como forma indeterminada, que se mostra como o melhor prognóstico clínico para os pacientes crônicos, uma vez que, não existe comprometimento cardíaco ou

digestivo podendo perdurar pelo resto da vida. No entanto, de 20 a 40% dos pacientes evoluem para a forma cardíaca e/ou digestiva (SOARES-SOBRINHO et al., 2007; SATHLER-AVELAR et al., 2009).

Conforme Marin-Neto et al. (2007), a patogênese da forma cardíaca ocorre em cerca de 30% dos casos e é caracterizada por infiltrado inflamatório, morte celular e fibrose intersticial que levam a distúrbios do sistema de condução cardíaca, arritmia ventricular e miocardite, além de distúrbios microvasculares que podem resultar em morte súbita. Coura (2009), em seu estudo demonstrou que a persistência do parasita nos tecidos do hospedeiro desempenha um papel importante na agressão do miocárdio, sendo assim, acredita-se que eliminando o parasita, ou ao menos reduzindo sua quantidade pode-se melhorar a eficácia da resposta imune e reduzir a progressão da doença (MARIN-NETO et al., 2009; SOSA-ESTANI et al., 2009).

De acordo com Lescure et al. (2010), a prevalência da forma digestiva ocorre em 10% dos casos e geralmente resulta em dilatação do trato gastrointestinal que frequentemente, evolui para megacólon (constipação crônica, dor abdominal e obstrução) ou megaesôfago (disfagia, dor no peito e regurgitação) e segundo Oliveira et al. (2009), há uma estimativa de 300 mil indivíduos com megacólon. As disfunções do esôfago também podem estar associadas às alterações no trânsito intestinal, que se torna cada vez mais lento levando a hipertrofia muscular e em casos mais exacerbados, a dilatação do órgão (REY, 2008).

Segundo Kirchhoff (1996), a terapia utilizada no tratamento da doença baseia-se na eliminação do parasita durante a fase aguda e na atenuação dos sintomas durante a fase crônica com o uso de cardiotônicos e antiarrítmicos, para o coração, ou através de cirurgias corretivas do esôfago e do cólon. Apesar de muitas pesquisas e de grandes progressos alcançados no estudo dessa parasitose, o seu tratamento apresenta ainda hoje muitos problemas (SANTELLO, 2009). O principal obstáculo para o tratamento da doença de Chagas é o uso de medicamentos tóxicos e pouco eficazes, capazes de eliminar o parasita no período inicial da doença, porém com índices de cura muito baixos em sua fase crônica (BRASIL, 2009a, 2009b).

No final da década de 60 surgiram, respectivamente, o nifurtimox e o benznidazol, no entanto, nenhum destes compostos apresenta estudos

comprobatórios de sua efetividade durante a fase crônica da doença, além dos sérios efeitos colaterais que ocorrem em até 40% dos pacientes tratados (COURA e CASTRO, 2002; MARIN-NETO et al., 2009). A administração é feita por um longo período (30-60 dias) e não garante o sucesso do tratamento, já que existe uma grande variação na susceptibilidade de isolados do parasita a ação destes fármacos, além da resistência a ambos compostos já terem sido descritas (CARRILERO et al., 2011).

O tratamento específico para doença de Chagas, deve ser realizado o mais precocemente possível quando forem identificadas a forma aguda ou congênita da doença, ou a forma crônica recente. A droga disponível no Brasil é o Benznidazol, um derivado nitroimidazólico, com cujo nomenclatura é 6-*N*-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida, é ativo na fase aguda da doença de Chagas, curando cerca de 70% dos infectados, mas apresenta eficácia limitada na forma crônica da doença, com expressivos efeitos colaterais, provavelmente como consequência de lesões oxidativas ou redutivas nos tecidos do hospedeiro (URBINA e DO CAMPO, 2003; SANTORO et al., 2007; BRASIL, 2010), sendo contraindicado em gestantes (FERREIRA, 1990; BARROS et al., 2016).

O tratamento sintomático depende das manifestações clínicas, tanto na fase aguda como na crônica. Para as alterações cardiológicas são recomendadas as mesmas drogas que para outras cardiopatias (cardiotônicos, diuréticos, antiarrítmicos, vasodilatadores). Nas formas digestivas, pode ser indicado tratamento conservador (dietas, laxativos, lavagens) ou cirúrgico, dependendo do estágio da doença. O nifurtimox, desde a década de 1980, teve a sua comercialização descontinuada, primeiro no Brasil e em seguida em outros países da América do Sul: Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai (COURA e CASTRO, 2002). Segundo Maya et al. (2007), seu mecanismo de ação envolve a sua metabolização, que produz espécies reativas de oxigênio as quais são acumuladas pelo *T. cruzi*, ocasionando danos na membrana e no DNA do parasito

O nifurtimox foi retirado do mercado devido aos vários efeitos colaterais sofridos pelos pacientes (RASSI et al., 2002), como a anorexia, perda de peso, náuseas, vômito, diarreia, excitabilidade ou sonolência e alterações psíquicas (COURA e CASTRO, 2002). Dados da literatura mostram que o tratamento etiológico com estes fármacos na fase aguda da doença de Chagas é superior a 80% e na fase crônica recente é de 50% a 60%, porém, diferentes estudos

mostraram taxas de cura de apenas 5 a 8% em pacientes crônicos adultos tratados com benzonidazol ou nifurtimox (CANÇADO, 2002; URBINA e DO CAMPO, 2003; COURA e DIAS, 2009). Na mesma linha, Fernandes et al. (2009), relataram uma taxa de cura de 5% de pacientes em um período de três anos de acompanhamento

Apesar da baixa eficácia do nifurtimox e do benzonidazol na fase crônica da doença e dos efeitos adversos como anorexia, alterações psicológicas, erupções cutâneas, leucopenia, polineuropatia periférica e anormalidades teciduais e sua contra-indicação em gestantes, porém, ainda representam os únicos fármacos hoje disponíveis para o uso clínico (BRENER, 2000). Neste sentido, apesar da atuação de vários grupos de pesquisa, os avanços a fim de obter drogas mais efetivas e menos tóxicas são relativamente poucos. Dentre estes os derivados triazólicos apresentam vantagens em relação às terapias atuais, com potencial de cura de infecções agudas e crônicas, bem como em casos de reativação da doença em pacientes com imunossupressão (URBINA, 2009). Outra alternativa terapêutica presente na literatura são o uso de produtos naturais, componentes isolados e os semi-sintéticos com atividade tripanocida (COURA e CASTRO, 2002).

### 1.3. RESISTÊNCIA ÀS DROGAS ANTIPARASITÁRIAS E TERAPIAS NATURAIS CONTRA DOENÇAS PARASITÁRIAS

A resistência aos medicamentos, eficácia variável, toxicidade, administração parenteral, e a necessidade de longos cursos de administração são as principais desvantagens de drogas antiparasitárias atuais. Os fármacos comumente utilizados para o tratamento da leishmaniose são os antimoniais pentavalentes, os quais exercem a toxicidade renal e cardíaca. Desse modo, existe uma forte necessidade de tratamentos mais seguros e mais eficazes (PEREIRA et al., 2011; MORAIS-BRAGA et al., 2013).

Wrigley et al. (1997) e Pinto et al. (2002), relatam que o significativo desenvolvimento da pesquisa de produtos naturais nos últimos anos deve-se especialmente ao rápido progresso de técnicas de isolamento e análise dos compostos bioativos em plantas e pela facilidade da busca de informações em



diversos sistemas de bases de dados. O alvo principal da pesquisa fitoquímica é conhecer as espécies vegetais e seus constituintes químicos através do isolamento e identificação dos metabólitos secundários.

Até poucos anos atrás, o tratamento para *Leishmaniose visceral* foi um longo curso de injeções com um antimônio pentavalente. Contudo o parasita na Índia desenvolveu progressivamente a resistência a esta classe de drogas e hoje praticamente, se tornou ineficaz para o tratamento clínico. Atualmente existem opções para o tratamento como: AmBisome B® [anfotericina B lipossomal] administrada como duas perfusões, no entanto, o tratamento ainda é muito caro, mas a OMS vem se empenhando para obter um preço para baixo. A miltefosina é a única droga administrada por via oral disponível contra a *Leishmaniose visceral*, mas o tratamento leva tempo e tem que ser tomado duas vezes por dia durante 28 dias e, não pode ser prescrito para mulheres em idade fértil, a menos que elas tomem precauções contraceptivas confiáveis (WHO, 2010).

Diversas classes de metabólitos, oriundos de produtos naturais, têm sido reportadas na literatura como eficientes agentes leishmanicidas (CARVALHO e FERREIRA, 2001). Alguns alcalóides da classe dos quinolínicos (FOURNET et al., 1993; FOURNET et al., 1994; FOURNET et al., 1996), isoquinolínicos (AKENDENGUE et al., 1999) e indólicos (MUNOZ et al., 1994) tem se mostrado promissores frente a distintas espécies de *Leishmania*.

Devido à viabilidade restrita de agentes quimioterápicos leishmanicidas eficazes em áreas endêmicas, uma ampla parte da população que vive nestes lugares depende de plantas medicinais que são usadas em tratamentos populares para tratar e aliviar os sintomas da leishmaniose (CHAN-BACAB e PENA-RODRIGUEZ, 2001).

São poucos os estudos controlados sobre a terapêutica específica para a doença de Chagas crônica, particularmente em áreas de campo, onde o acompanhamento dos pacientes torna-se mais difícil, por falta de condições laboratoriais e de profissionais capacitados para fazê-lo adequadamente. Alguns estudos sobre tolerância e eficácia do nifurtimox e do benznidazole em pacientes nas fases aguda e crônica da doença de Chagas foram realizados no Brasil e em outros países do nosso continente, mostrando importantes efeitos colaterais com as duas drogas e indícios de cura parasitológica em torno de 60% nos casos

agudos, porém pouco expressivos nos casos crônicos (COURA et al., 1997; RASSI et al., 1992).

Neste contexto, Amato et al. (2008) e Schmidt et al. (2012a, 2012b), afirmam que estes fármacos além de serem tóxicos e de alto custo apresentam eficácia limitada, tornando urgente a busca por novas alternativas terapêuticas. Para tanto, é necessário descobrir novas substâncias ativas em modelos *in vitro* e *in vivo*, visando ao desenvolvimento de novos fármacos (PRITCHARD et al., 2003). Este processo é complexo, lento e de alto custo, fatores estes que causam grande impacto quando se trata de desenvolvimento de fármacos para doenças negligenciadas. Sendo assim, segundo Moran et al. (2005) e Newman e Cragg (2012), relatam que de 1975 até 2010 apenas 13 novos fármacos para doenças negligenciadas foram desenvolvidos.

Os produtos naturais são importantes na busca por novas substâncias bioativas, tendo sido utilizados como base para o desenvolvimento de medicamentos. Para se ter uma ideia, uma grande fração dos fármacos aprovados para consumo nos últimos 30 anos tem sua origem na natureza, principalmente nas áreas de câncer e doenças infecciosas onde mais de 60 % e 75 % destes fármacos, respectivamente, tem origem natural (NEWMAN et al., 2003; NEWMAN e CRAGG, 2012). Várias etapas compõem o processo de descoberta desses novos fármacos (PRITCHARD et al., 2003). As etapas de identificação de alvos e os estudos de mecanismos de ação são muito importantes neste processo (SCHENONE et al., 2013). Estas informações podem contribuir para a identificação de novos alvos farmacológicos, para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (SEN e CHATTERJEE, 2011), bem como prever a seletividade, a toxicidade e auxiliar na otimização compostos promissores (NATURE, 2010).

O uso de plantas para obtenção de novos fármacos tem aumentado pela necessidade do combate a microorganismos resistentes aos fármacos sintéticos atuais, pela melhora no controle de doenças endêmicas (CROFT e COOMBS, 2003; SHARIEF et al., 2006), por sua alta viabilidade e pela baixa toxicidade também, vem sendo apoiada pela Organização Mundial de Saúde através de seu Programa de Doenças Tropicais e, tem considerando a investigação sobre o uso plantas no tratamento da leishmaniose e da doença de Chagas como essencial e de alta prioridade (OMS, 2012). Neste sentido Anthony et al. (2005), já afirmava

que as plantas são importantes fontes para a descoberta de novas substâncias, sobretudo com ação antiparasitária, devido à associação entre a convivência dos parasitos, seres vivos e plantas medicinais.

Mishra et al. (2009), afirma que os produtos naturais proporcionam moléculas com impacto intenso na saúde humana e que os metabólitos secundários são produzidos na natureza com características biológicas distintas. Neste sentido diversos estudos já legitimaram o efeito de produtos naturais como potenciais fontes de novos e seletivos agentes para o tratamento de doenças tropicais causados por protozoários e outros parasitos e especificamente, abordando atividade tripanocida (HAMEDT et al., 2014; CARNEIRO et., 2015; FRANÇA RODRIGUES et al., 2015).

O Brasil é o país com maior variedade genética vegetal do mundo, descrito com mais de 55.000 espécies catalogadas (AZEVEDO e SILVA, 2006), apenas 8% desse percentual biológico foi avaliado na procura de compostos bioativos das 1.100 espécies vegetais analisadas em suas propriedades medicinais. Sendo que 590 plantas foram registradas no Ministério da Saúde para comercialização (SIMÕES et al., 2010). E ainda segundo Brasil (2006), as culturas tradicionais brasileiras utilizam com frequência as plantas medicinais com propriedades curativas, e esse conhecimento é transmitido ao longo de gerações.

#### 1.4 FAMÍLIA VERBENACEAE, GÊNERO *LANTANA*: *Lantana camara* e *Lantana montevidensis*

A família Verbenaceae compreende 100 gêneros e cerca de 2000 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, nas regiões temperadas do Hemisfério Sul e Hemisfério Norte (BARROSO, 1991; BUENO e LEONHARDT, 2011). O Brasil reúne a maior riqueza da família, com 16 gêneros e 290 espécies, sendo 191 endêmicas (SOUZA e LORENZI, 2012; SALIMENA et al., 2014), com ocorrência principalmente na região Sul e extremo Sul do Estado da Bahia, sendo 50 dessas espécies apontadas como raras (SOUZA e LORENZI, 2012; GIULIETTI, 2009). Os gêneros mais representativos na flora brasileira são *Lippia* L., com 88 espécies, sendo 68 endêmicas (SALIMENA e MÚLGURA, 2014; SALIMENA e MÚLGURA, 2015), e *Stachytarpheta* Vahl, representado por 81 espécies, 75

endêmicas (SALIMENA et al., 2014), ambos com maior riqueza nos cerrados e campos rupestres do Planalto Central e Cadeia do Espinhaço. *Lantana* L. está representado por 22 espécies na flora brasileira, das quais 12 são endêmicas (SILVA e SALIMENA, 2014).

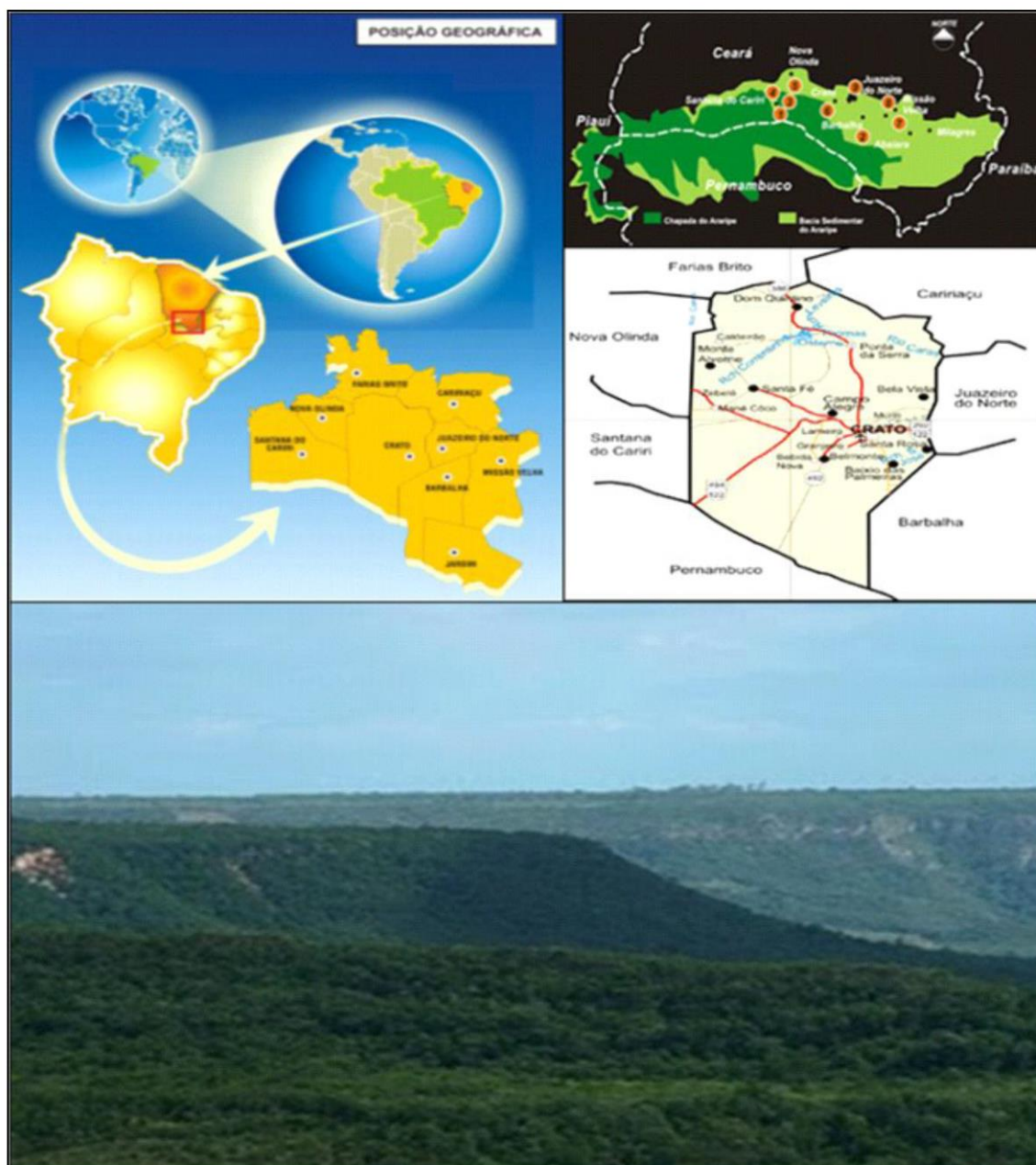
Nessa família estão incluídas espécies ornamentais comumente cultivadas, como a *Petrea volubilis* (flor-de-miguel), *Duranta repens* (dourinha), pequena cerca - viva muito comum, com folhas jovens douradas, *Lantana camara* (camará) e *Lantana montevidensis* (chumbinho) com pequenas flores ornamentais de cores variadas, muito atrativas às borboletas (SOUZA e LORENZI, 2012). O gênero *Lantana*, foi descrito por Linnaeus em 1753 onde continhas sete espécies, seis da América do Sul e uma da Etiópia (MUNIR, 1996). O termo *Lantana* (vem do latim *lento*, para se dobrar) deriva, provavelmente, do antigo nome latim do gênero *Viburnum* que se assemelha um pouco em folha e também em inflorescência (GHISALBERT, 2000). Entretanto, sua classificação taxonômica apresenta grandes variações devido ao elevado número de hibridação neste gênero, como alterações de cor na inflorescência que podem variar com a idade e maturidade da planta.

O gênero *Lantana* inclui em sua maioria plantas herbáceas e arbustos, podendo atingir até 2 m de altura (JOLY, 2002), sendo muitas vezes plantadas com o objetivo de decoração devido à beleza de suas flores (RANJHAN e PATHAK, 1992). É nativa das Américas tropicais e subtropicais, mas poucos táxons são originários da Ásia tropical e da África; atualmente ocorrem em aproximadamente 50 países com um número de espécies e subespécies que varia de 50-270, onde a melhor estimativa é de 150 espécies, sendo uma espécie nativa para o Brasil (GHISALBERT, 2000; SOUZA e LORENZI, 2012).

As espécies de *Lantana* são geralmente pouco palatáveis e nem todas são tóxicas (JONES et al., 1997). São espécies conhecidas por serem praticamente imunes ao ataque de herbívoros, devido à presença de uma grande diversidade de substâncias naturais (KOHLI et al., 2006). Este gênero tem sido largamente estudado em relação aos seus fito constituintes voláteis e não-voláteis. Neste sentido, as pesquisas conduziram ao isolamento de vários compostos pertencentes principalmente às classes de triterpenóides pentacíclicos, glicosídeos, esteróides, irridóides, quinonas e flavonóides. As espécies *Lantana camara* L., típica das Américas e África, e *Lantana montevidensis* Briq., nativas do Brasil e Uruguai são arbustos introduzidas em muitos países como plantas ornamentais (DAY et al., 1998;

GHISALBERT, 2000), e especificamente na Chapada do Araripe, localizada ao Sul do Estado do Ceará, no Cariri em Crato, são endêmicas (Figura 3).

**Figura 3** – Localização da área de estudo: Chapada do Araripe, Crato-CE .



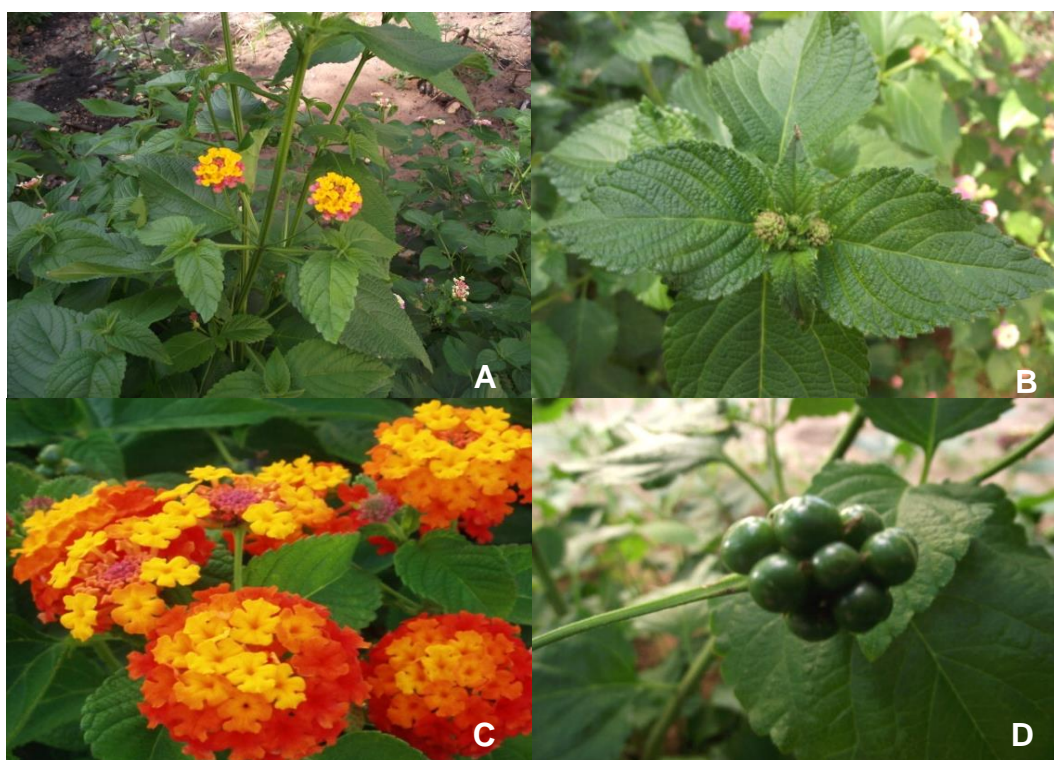
Fonte: (BARROS, 2015; Mapa adaptado da APA ARARIPE, 2011).

*Lantana camara* L., Verbenaceae é conhecida popularmente no Brasil pelo nome de camará e camará-de-cheiro (BRITO, 2004). Ocorre em muitas regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo introduzida em muitos países como plantas

ornamentais, devido à beleza de suas flores que possuem coloração intensa. É usada na medicina popular como emenagoga, diurética, expectorante, febrífuga e antirreumática. Suas raízes e folhas são atribuídas propriedades anticonvulsivantes (SOUSA, 2010).

Sousa (2010), descreve em seus trabalhos a espécie de acordo com suas características botânicas, onde a mesma apresenta arbusto ereto, até 2 m de altura (mais alto quando se torna trepador); ramos quadrangulares armados de pequenos acúleos recurvados, às vezes inermes; folhas ovado-cordiformes, opostas, serrado-crenado, vilosa ou áspero-hirtas e hispídas na pagina superior e pálida e vilosa-hirtos na pagina inferior e de cheiro semelhante ao da *Lippia alba* (erva-cidreira); flores primeiramente amarelas de ouro, depois cor de laranja, róseas ou vermelhas e finalmente, vermelhão, desabrochando do centro para a circunferência, dispostas em capítulos longo-pedunculados frutos baga roxo-escuros (Figura 4), e pequenos e muitíssimo apreciados pelos pássaros e quando maduro também são comidos pelos Hindus em época de escassez.

**Figura 4** - A) Aspecto geral da parte aérea de *Lantana camara* L. B) Folha. C) Flor D) Fruto.



Fonte: (BARROS, 2015)



Segundo Sharma et al. (2007), os frutos verdes da planta são tóxicas para os seres humanos.

É grande a variabilidade morfológica de *L. camara* (SILVA, 1999), e em outras espécies do gênero verificou-se a ocorrência de hibridização natural, o que dificulta a identificação de espécies no campo. Devido a problemas taxonômicos essas plantas são frequentemente classificadas incorretamente (SILVA, 1999; SALIMENA, 2002). A separação entre algumas espécies de *Lantana* é normalmente realizada a partir da análise de amostras férteis, o que é dificultado quando as plantas não apresentam flores e frutos.

A espécie *Lantana montevidensis* Briq., Verbenaceae é conhecida popularmente no Brasil como "chumbinho" (BARRETO et al., 2010), é um arbusto nativo no Brasil e Uruguai, considerada uma espécie invasora em muitas partes do mundo, sendo utilizada também em muitos países como uma planta ornamental em parques e jardins, devido à beleza de suas flores. Herbácea perene semi-arbustiva rasteira ou pendente com longa ramagem que pode atingir até 2,0 m de comprimento. Folhas opostas curto-pecioladas, ovado-blongas, arredondadas na base, acuminadas, crenado-serradas, reticulado-rugosas, verde escuras, texturizadas e de odor forte característico (SOUSA et al., 2011). As flores são tubulares, pequeninas, em branco ou violeta, reunidas em inflorescências globosas ao longo da ramagem (Figura 5). Floresce da primavera ao outono e pode ser cultivada em regiões de clima ameno a quente, mas é sensível a geadas e muito frio. Produz pequenas bagas escuras não comestíveis (STUMPF, 2016).

As folhas não devem ser ingeridas, tem substâncias tóxicas e apresenta em sua constituição química um expressivo número de compostos, principalmente os da classe dos sesquiterpenos, aos quais são atribuídas atividades biológicas, como antibacteriana e modificador da resistência aos antibióticos aminoglicosídeos (MONTANARI et. al., 2011; SOUSA et. al., 2013). No entanto Deena (2000), relata que a infusão das folhas de *L. montevidensis* é utilizada na medicina popular como antipirética, carminativa, para tratar problemas respiratórios, e muitas outras doenças. Nos estudos de Nagão et al., (2002), também relatam que o extrato metanólico das folhas mostrou uma atividade anti-proliferativa contra as células tumorais e a fração rica em flavonóides foi eficaz contra o adenocarcinoma gástrico humano, carcinoma uterino humano, e linhas de células de melanoma.

**Figura 5** - A) Aspecto geral da parte aérea de *Lantana montevidensis* Briq. B) Folha. C) Flor. D) Fruto.



Fonte: (BARROS, 2015)

### 1.5 OS RADICAIS LIVRES NO SISTEMA BIOLÓGICO e ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS E NATURAIS.

Radicais livres são moléculas instáveis e que apresentam um elétron que tende a se associar de maneira rápida a outras moléculas de carga positiva com as quais pode reagir ou oxidar. No nosso organismo, os radicais livres são produzidos pelas células, durante o processo de queima do oxigênio, utilizado para converter os nutrientes dos alimentos absorvidos em energia (FERREIRA et al., 1997).

Os radicais livres podem danificar células saudáveis do nosso corpo, entretanto, nosso organismo possui enzimas protetoras que reparam 99% dos danos causados pela oxidação, ou seja, nosso organismo consegue controlar o nível desses radicais produzidos através do nosso metabolismo (BARBOSA et al., 2010). Os processos metabólicos não são a única fonte de radicais livres. Fatores externos podem contribuir para o aumento da formação dessas moléculas. Entre esses fatores estão: poluição ambiental; raios-X e radiação ultravioleta; cigarro; álcool; resíduos de pesticidas; substâncias presentes em alimentos e bebidas (aditivos químicos, hormônios, entre outros); estresse; consumo excessivo de gorduras saturadas.



Espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ), ânion radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) e hidroperoxila ( $\text{ROO}\bullet$ ), causam danos ao DNA ou podem oxidar lipídios e proteínas. Os EROs atacam as cadeias de ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios e do colesterol, abstraindo um hidrogênio do grupo metileno *bis*-alílico, iniciando assim o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares. Os radicais de carbono formados podem reagir com oxigênio originando radicais peroxila, que por sua vez podem atacar novas cadeias de ácidos graxos poliinsaturados, propagando a reação. O resultado deste processo é a oxidação de várias moléculas de ácidos graxos (VALKO et al., 2004; SOUSA et al., 2007)

Em níveis considerados normais, os radicais livres não são prejudiciais à saúde. Em excesso, essas moléculas podem ser tóxicas ao nosso organismo. A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo. Portanto, os radicais livres, conhecidos comumente como espécies reativas são produzidas naturalmente ou por alguma disfunção biológica. No organismo, encontram-se envolvidas na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, o excesso destas espécies pode apresentar efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios das membranas, agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, alteração do DNA e inativação de enzimas. Dessa forma, podem estar relacionados com várias patologias, como por exemplo, artrite, catarata, choque hemorrágico, problemas cardíacos, disfunções cognitivas, câncer, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (BARREIROS, 2006).

Segundo Cai et al. (2004), a progressão de muitas doenças crônicas em humanos tem sido associada ao estresse oxidativo. Cai et al. (2004), Rahman e Adcock (2006), Bhooshan Pandey e Ibrahim Rizvi (2009) e Lobo et al. (2010), relataram que os níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (ROS) podem induzir a oxidação de proteínas, lipídios e DNA, levando à alteração das suas funções normais, no entanto, o consumo a longo prazo de dietas ricas em polifenóis de plantas tem sido associada como fator de risco reduzindo-se a cancro, doenças cardiovasculares, diabetes e distúrbios neurológicos.

A geração de radicais livres está diretamente relacionada com a oxidação em alimentos e sistemas biológicos. Portanto, a busca de métodos para determinação do sequestro de radical livre é importante, cujos ensaios constituem instrumentos

úteis para fazer uma seleção entre diferentes espécies vegetais, variedades, grau de maturação e condições de cultura, a fim de obter alto teor de antioxidantes naturais em alimentos. O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta.

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena (por ex., superóxido dismutase), ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes. Destas últimas destacam-se tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenóides (HASLAM, 1996; VALKO et al., 2004). Quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes podem ocorrer lesões oxidativas de caráter cumulativo. Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células.

De forma geral, denominam-se antioxidantes as substâncias que presentes em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato. Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis ou podem ser reciclados por outro antioxidante (SOUSA et al., 2007).

De acordo com Halliwell (1994), antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo. Dentre os aspectos preventivos é interessante ressaltar a correlação existente entre atividade antioxidante de substâncias polares e a capacidade de retardar o envelhecimento das células, bem como inibir o aparecimento de células cancerígenas (BARREIROS, 2006). Os antioxidantes são moléculas que podem interagir de forma segura com os radicais livres e terminar a reação em cadeia antes das moléculas vitais estarem danificadas (HARMAN, 1992; HALLIWELL, 1994).

Para Ozen et al. (2011), atualmente, existe uma procura crescente de antioxidantes naturais, especialmente de origem vegetal, não só para proteger o organismo contra as doenças associadas com o stress oxidativo mas, também, para aplicação como nutracêuticos, bio-farmacêuticos e aditivos alimentares (BRAITWAITE et al., 2014). Neste contexto, Kamdem et al. (2013) e Barbosa-Filho et al. (2014), afirmam que para este fim, a extração e caracterização de fitoquímicos

é necessária e, isto é reforçado pelo uso popular do extrato de plantas, bem como suas evidências científicas.

O estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante. A geração de radicais livres e/ou espécies reativas não radicais é resultante do metabolismo de oxigênio. A mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora. O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres e/ou espécies reativas não radicais. Esse sistema, usualmente, é dividido em enzimático (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) e não-enzimático. No último caso, é constituído por grande variedade de substâncias (BARBOSA et al., 2010).

Segundo Bailey (1996), os antioxidantes podem ser classificados em primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos. Os antioxidantes primários são compostos fenólicos que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (SIMIC e JAVANOVIC, 1994).

Frankel (1980), apresentou o mecanismo de ação representado pelo átomo de hidrogênio ativo do antioxidante é abstraído pelos radicais livres  $R^{\bullet}$  e  $ROO^{\bullet}$  com maior facilidade que os hidrogênios alílicos das moléculas insaturadas. Assim formam-se espécies inativas para a reação em cadeia e um radical inerte ( $A^{\bullet}$ ) procedente do antioxidante. Este radical, estabilizado por ressonância, não tem a capacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas.

Os antioxidantes principais e mais conhecidos deste grupo são os polifenóis, como butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG), que são sintéticos, e tocoferóis, que são naturais. Estes últimos também podem ser classificados como antioxidantes biológicos. Os sinergistas são substâncias com pouca ou nenhuma atividade antioxidante, que podem aumentar a atividade dos antioxidantes primários quando usados em combinação adequada com eles. Alguns antioxidantes primários quando usados em combinação podem atuar sinergisticamente. Os removedores de oxigênio são compostos que atuam capturando o oxigênio presente no meio, através de reações químicas estáveis tornando-os, conseqüentemente, indisponíveis para atuarem como propagadores da autooxidação. Ácido ascórbico, seus isômeros e seus

derivados são os melhores exemplos deste grupo. O ácido ascórbico pode atuar também como sinergista na regeneração de antioxidantes primários (BAILEY, 1996).

Os antioxidantes biológicos incluem várias enzimas, como glucose oxidase, superóxido dismutase e catalases. Estas substâncias podem remover oxigênio ou compostos altamente reativos de um sistema alimentício. O organismo é dotado de mecanismos para manter o equilíbrio entre compostos pró- e antioxidantes. Quando há insuficiência do potencial antioxidante em contrabalançar aumentos na formação de ERO, há danos oxidativos celulares. Dos mecanismos de defesa antioxidante para prevenir ou reduzir os efeitos do estresse oxidativo, participam enzimas endógenas (superóxido dismutase - SOD, catalase e glutathione peroxidase) e outras substâncias disponíveis na dieta, como os carotenoides, o alfa-tocoferol, o ácido ascórbico e compostos fenólicos, entre outras. O sistema enzimático representa a primeira defesa antioxidante endógena contra as ERO. No entanto, para impedir os danos celulares decorrentes de estresse oxidativo persistente, o aporte exógeno de substâncias com potencial antioxidante é de fundamental interesse (CATANIA et al., 2009).

Os agentes quelantes/seqüestrantes complexam íons metálicos, principalmente cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica. Um par de elétrons não compartilhado na sua estrutura molecular promove a ação de complexação. Os mais comuns são ácido cítrico e seus sais, fosfatos e sais de ácido etileno diamino tetra acético (EDTA) (BAILEY, 1996; LABUZA, 1971).

Os antioxidantes mistos incluem compostos de plantas e animais que têm sido amplamente estudados como antioxidantes em alimentos. Entre eles estão várias proteínas hidrolisadas, flavonóides e derivados de ácido cinâmico (ácido caféico) (BAILEY, 1996; RAMALHO e JORGE, 2006).

Em decorrência da grande diversidade química existente, em especial entre os compostos fenólicos, vários ensaios têm sido desenvolvidos para avaliação da capacidade antioxidante de amostras. Estes ensaios diferem em relação ao mecanismo de reação, às espécies-alvo, às condições reacionais e na forma com os resultados são expressos. Não obstante a diversidade de métodos para avaliar a capacidade antioxidante, não existe um procedimento metodológico universal. Este fato impõe a necessidade de avaliar a capacidade antioxidante por diferentes ensaios, com fundamentos e mecanismos de ação diferentes (DE OLIVEIRA, 2009).

O ferro é um metal potencialmente tóxico por ser capaz de catalisar reações de geração de espécies reativas (ERs), devido a sua capacidade de doar e receber elétrons, interconvertendo-se entre o estado férrico e ferroso. Conseqüentemente, as ERs interagem com vários componentes celulares, ocasionando oxidação de biomoléculas (GHOTI et al., 2010; DUARTE et al., 2016). Quando a sobrecarga de ferro supera a capacidade de transporte de ferro da transferrina, ele é depositado nos tecidos como ferro livre (SHANDER et al., 2009). O ferro livre participa da reação de Fenton, que catalisa uma reação não enzimática a partir de peróxido de hidrogênio, resultando na formação do radical hidroxila (OH<sup>-</sup>), um potente oxidante, com capacidade de atravessar membranas e reagir com moléculas celulares (HALLIWELL, 2006; SHANDER et al., 2009; GATTERMANN e RACHMILEWITZ, 2011).

A Toxicologia avalia a possibilidade de risco que uma substância química pode provocar quando em contato com um organismo vivo. Qualquer substância, dependendo das condições de exposição, pode ser considerada tóxica. Assim, torna-se necessário conhecer as condições de uso seguro de uma substância química para o homem. Ou seja, toda substância pode ser usada de forma segura, desde que as condições de exposição sejam mantidas abaixo dos níveis de tolerância (SPINDLER et al., 2000).

Sabe-se que plantas são utilizadas por automedicação a maior parte não tem o seu perfil tóxico bem conhecido. O aumento no número de reações adversas reportado é possivelmente justificado pelo aumento do interesse populacional pelas terapias naturais observado nas últimas décadas. A farmacovigilância de plantas medicinais e fitoterápicos é uma preocupação emergente e através do sistema internacional será possível identificar os efeitos indesejáveis desconhecidos, quantificar os riscos e identificar os fatores de riscos e mecanismos, padronizar termos, divulgar experiências, entre outros, permitindo seu uso seguro e eficaz (SILVEIRA et al., 2008).

Alguns fitoquímicos que são utilizados atualmente por automedicação ou por prescrição médica não tem o seu perfil tóxico bem conhecido (VEIGA-JUNIOR, 2008). Por outro lado, a utilização inadequada de um produto, mesmo de baixa toxicidade, pode induzir problemas graves desde que existam outros fatores de risco tais como contra-indicações ou uso concomitante de outros medicamentos (CORDEIRO et al., 2005; AMORIM et al., 2007).

Segundo Silva et al. (2006) e Alexandre et al. (2008), a crença de que as plantas medicinais são naturais e inofensivas, não é facilmente contradita, pois as evidências científicas de ocorrência de intoxicações e efeitos colaterais relacionados com o uso de plantas medicinais consistem em informações que dificilmente chegam ao alcance dos usuários atendidos nos serviços de saúde pública como SUS e nos Postos dos PSF, por serem caracterizados como indivíduos de baixa escolaridade e acervo cultural. O aumento no número de reações adversas é possivelmente justificado pelo aumento do uso de plantas medicinais (GALLO et al., 2000).

## 2. JUSTIFICATIVA

As doenças parasitárias, notadamente a leishmaniose e a doença de Chagas representam um problema de saúde pública nos países onde elas são endêmicas. O tratamento dessas doenças com compostos sintéticos como a Anfotericina B, apesar de sua eficácia, tem apresentado bastante toxicidade, causando efeitos colaterais como anafilaxia, trombocitopenia, dores generalizadas, febre, anemia, convulsões e anorexia. No entanto, não existe um tratamento efetivo para essas doenças principalmente na sua forma crônica. Desta forma, produtos naturais que possuem baixa toxicidade vêm sendo avaliados como fontes potenciais de agentes terapêuticos para o tratamento de doenças parasitárias.

Neste contexto, este estudo foi realizado com o intuito de investigar a toxicidade do óleo essencial das folhas de *Lantana camara*, bem como seu potencial anti-leishmanicida e anti-tripanicida. A *L. camara* é uma espécie, comum na Chapada do Araripe, localizado no Cariri (Sul do Ceará) é utilizada com frequência para dor de estômago, febre biliosa, dor de dente, gripe, asma, bronquite e antisséptica para feridas e coceiras entre outros.

Embora tenham na literatura estudos comprovando as propriedades farmacológicas da *L. camara*, não existe, evidência científica do seu uso em doenças parasitárias.

Por outro lado, há poucas evidências científicas sobre o uso da espécie *L. montevidensis*, em particular, a composição química e suas propriedades biológicas (SOUZA et al., 2013a; 2013b), entre elas o potencial antioxidante e citotóxico. Dessa forma, a segunda parte deste estudo foi realizada com o intuito de comprovar o uso desta planta na medicina tradicional no tratamento de doenças associadas ao estresse oxidativo. Diante desse contexto, objetivou-se com este estudo, avaliar a atividade antiparasitária de *L. camara* e o perfil antioxidante e toxicológico *in vitro* da espécie *L. montevidensis*, além disso, analisar a composição química das espécies.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os constituintes químicos e as propriedades bioativas de *Lantana montevidensis* (SPRENG.) BRIQ. e *Lantana camara* L. a fim de evidenciar seu uso farmacológico.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a composição fitoquímica dos constituintes presentes no óleo essencial de *Lantana camara* e dos compostos fenólicos presentes nos extratos aquoso (EALM) e etanólico (EELM) de *Lantana montevidensis*;
- Investigar a atividade tripanocida, leishmanicida e citotóxica contra fibroblastos, pelo óleo essencial de *Lantana camara* em ensaios *in vitro*;
- Avaliar o potencial quelante de metais, dos extratos EELM e EALM de *Lantana montevidensis* sobre  $Fe^{2+}$  bem como investigar a fragilidade osmótica, o potencial antioxidante, citotóxico, genotóxico e antioxidante em modelos químicos e biológicos.



## 4. RESULTADOS

### 4.1 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

#### 4.1.1 Artigo 1



Article

### **Chemical Characterization and Trypanocidal, Leishmanicidal and Cytotoxicity Potential of *Lantana camara* L. (Verbenaceae) Essential Oil**

Luiz Marivando Barros <sup>1,2</sup>, Antonia Eliene Duarte <sup>1,2</sup>, Maria Flaviana Bezerra Morais-Braga <sup>1</sup>, Emily Pansera Waczuk <sup>2</sup>, Celeste Vega <sup>1</sup>, Nadghia Figueiredo Leite <sup>1</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes <sup>3</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho <sup>1</sup>, João Batista Teixeira Rocha <sup>2</sup> and Jean Paul Kamdem <sup>2,4,\*</sup>

Article

# Chemical Characterization and Trypanocidal, Leishmanicidal and Cytotoxicity Potential of *Lantana camara* L. (Verbenaceae) Essential Oil

Luiz Marivando Barros <sup>1,2</sup>, Antonia Eliene Duarte <sup>1,2</sup>, Maria Flaviana Bezerra Morais-Braga <sup>1</sup>, Emily Pansera Waczuk <sup>2</sup>, Celeste Vega <sup>1</sup>, Nadghia Figueiredo Leite <sup>1</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes <sup>3</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho <sup>1</sup>, João Batista Teixeira Rocha <sup>2</sup> and Jean Paul Kamdem <sup>2,4,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato-CE, CEP 63105-000, Brazil; lmarivando@hotmail.com (L.M.B.); duarte105@yahoo.com.br (A.E.D.); flavianamoraisb@yahoo.com.br (M.F.B.M.B.); mcvegagomez@gmail.com (C.V.); nadghia.fl@gmail.com (N.F.L.); hdmcoutinho@gmail.com (H.D.M.C.)

<sup>2</sup> Post-Graduate Program in Biological Sciences, Biochemical Toxicology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, CEP 97105-900, Brazil; memypw@yahoo.com.br (E.P.W.); jbtrocha@yahoo.com.br (J.B.T.R.)

<sup>3</sup> Program of Post-Graduation in Molecular Bioprospection, Laboratory of Pharmacology and Molecular Chemistry, Chemistry Biology Department, Regional University of Cariri, Crato, CEP 63105-000, Brazil; irwin.alencar@urca.br

<sup>4</sup> Departamenro de Bioquímica, Instituto de Ciências Básica da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, CEP 90035-003, Brazil

\* Correspondence: kamdemjeanpaul2005@yahoo.fr or jpkamdem@gmail.com; Tel.: +55-55-3220-9462

Academic Editor: Marcello Iriti

Received: 20 December 2015; Accepted: 02 February 2016; Published: 10 February 2016

**Abstract:** Drug resistance in the treatment of neglected parasitic diseases, such as leishmaniasis and trypanosomiasis, has led to the search and development of alternative drugs from plant origins. In this context, the essential oil extracted by hydro-distillation from *Lantana camara* leaves was tested against *Leishmania braziliensis* and *Trypanosoma cruzi*. The results demonstrated that *L. camara* essential oil inhibited *T. cruzi* and *L. braziliensis* with IC<sub>50</sub> of 201.94 µg/mL and 72.31 µg/mL, respectively. *L. camara* essential oil was found to be toxic to NCTC929 fibroblasts at 500 µg/mL (IC<sub>50</sub> = 301.42 µg/mL). The composition of *L. camara* essential oil analyzed by gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS) revealed large amounts of (*E*)-caryophyllene (23.75%), bicyclogermacrene (15.80%), germacrene D (11.73%), terpinolene (6.1%), and sabinene (5.92%), which might be, at least in part, responsible for its activity. Taken together, our results suggest that *L. camara* essential oil may be an important source of therapeutic agents for the development of alternative drugs against parasitic diseases.

**Keywords:** *Lantana camara*; *Leishmania braziliensis*; *Trypanosoma cruzi*; essential oil

## 1. Introduction

Leishmaniasis is a complex disease known to cause serious public health problems in 88 countries (mainly from Africa, Asia, and Latin America) where the disease was found to be endemic [1]. It is caused by protozoan parasites from more than 21 *Leishmania* species that are transmitted to humans by bites of about 30 species of infected female phlebotomine sandflies [2–4].

The complexity of leishmaniasis is probably attributed to its multiple forms, including cutaneous, visceral, and mucocutaneous, which result from the replication of the parasite in macrophages in the mononuclear phagocyte system, dermis, and naso-oropharyngeal mucosa, respectively [5,6]. According to the World Health Organization [1], 12 million of people are affected

by the disease and the number of new cutaneous and visceral leishmaniases cases reported are increasing annually. In Brazil, for instance, ten among the fourteen species identified of *Leishmania* have been reported to infect human [7] and about 26,000 new cases of the disease are registered per year [8,9]. This is, at least in part, because the currently-available drugs (e.g., Pentavalent antimony, Paramomycin sulfate) (i) are unaffordable for the developing countries, and (ii) have developed resistance to parasites [6,10–12].

Another protozoan disease that is of critical concern in the Latin America is Chagas disease, which is caused by *Trypanosoma cruzi*. Its transmission to human is through feces of infected triatomine insects [13,14]. Like leishmaniasis, the available drugs for the treatment of Chagas disease (nifurtimox and benznidazole) are associated with undesirable effects and are not effective against the chronic forms of the disease [15,16].

Since the last decade, there has been a growing interest from the scientific community for the use of natural therapeutic agents in combating parasitic protozoa diseases including leishmaniasis and trypanosomiasis [17–19]. This is because natural therapeutic agents are generally regarded as safe, affordable, and are found to be more effective than synthetic pharmaceuticals in chronic diseases [18,19].

*Lantana camara*, commonly known in Brazil as “camara” and “camara de espinho”, is one of the most toxic plants with diverse and broad geographic distribution [20–24]. Its toxicity has been reported in animals [25]. The plant extracts of *L. camara* are used in folk medicine for the treatment of catarrhal infections, cancers, ulcers, asthma, high blood pressure, swellings, tetanus, malaria, chicken pox, bronchitis, respiratory diseases, and rheumatism [21,26,27]. Of pharmacological therapeutic importance, *L. camara* methanolic extract was reported to exhibit anti-leishmanial activity against the promastigote forms of *Leishmania amazonensis* [27]. On the other hand, *L. camara* oil is used for the treatment of skin itches, as an antiseptic for wounds, and externally for leprosy and scabies [22]. In addition, substantial evidence from the literature indicates that essential oil from the leaves of *L. camara* exhibit anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, and antimicrobial activities [28–31].

Although the use of essential oils from plant extracts for the treatment of parasitic protozoa diseases is less investigated, they can be of utmost importance for the development of new drugs against parasitic diseases. Their low density associated with their rapid diffusion across cell membranes (as a result of their liposolubility) can enhance the integration of their active components into the parasites. In this context, the present study aimed to investigate, the trypanocidal, leishmanicidal, and cytotoxic potential of essential oil from the leaves of *L. camara*. Further, chemical characterization of *L. camara* leaf essential oil was performed using gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS).

## 2. Results

### 2.1. GC/MS Analysis of *L. camara* Leaf Essential Oil

Table 1 shows the chemical composition of *L. camara* essential oil analyzed by GC-MS. As it can be seen, twenty seven (27) different compounds representing 98.69% of the total oil were identified. Based on our results, it appears that the major constituents were: (*E*)-caryophyllene (23.75%), bicyclogermacrene (15.80%), germacrene D (11.73%), terpinolene (6.01%), and sabinene (5.92%), while camphene (0.07%),  $\alpha$ -terpinene (0.08%), t-sabinene-hydrate (0.13%),  $\alpha$ -pinene (0.19%), and terpin-4-ol (0.25%) were the less abundant chemicals found in *L. camara* essential oil (Table 1).

**Table 1.** Composition of *Lantana camara* leaf essential oil.

Compounds	RI <sup>a</sup>	RI <sup>b</sup>	Oil Composition (%)
$\alpha$ -Pinene	939	937	0.19
Camphene	953	951	0.07
Sabinene	976	675	5.92
$\beta$ -Pinene	980	983	0.45
Myrcene	991	990	0.31
$\alpha$ -Terpinene	1018	1015	0.08
<i>p</i> -Cymene	1026	1026	2.73
( <i>Z</i> )- $\beta$ -Ocimene	1040	1037	0.68
( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimene	1050	1054	0.93
$\gamma$ -Terpinene	1062	1061	1.84
Terpinolene	1088	1079	6.01
Terpin-4-ol	1177	1174	0.25
$\alpha$ -Terpineol	1189	1193	1.02
<i>t</i> -Sabinene hydrate	1254	1257	0.13
$\alpha$ -Copaene	1376	1376	0.93
$\beta$ -Elemene	1391	1389	1.50
$\beta$ -Caryophyllene	1404	1401	3.46
( <i>E</i> )-Caryophyllene	1418	1423	23.75
Aromandendrene-allo	1461	1460	2.17
$\alpha$ -Humulene	1454	1451	4.04
Germacrene D	1480	1480	11.73
Valencene	1491	1489	8.32
Bicyclogermacrene	1494	1497	15.80
Cubebol	1514	1518	1.47
$\delta$ -Cadinene	1513	1509	0.26
Spathulenol	1576	1573	1.98
Caryophyllene oxide	1581	1585	2.67
Total identified (%)	-	-	98.69

Relative proportions of the essential oil constituents were expressed as percentage. <sup>a</sup> Retention indices from literature [32]; <sup>b</sup> Retention indices experimental (based on homologous series of *n*-alkane C<sub>7</sub>–C<sub>30</sub>).

## 2.2. Effect of *L. camara* Leaf Essential Oil against *T. cruzi*

*L. camara* essential oil inhibited *T. cruzi* growth as depicted in Table 2. At the highest concentration tested (250  $\mu$ g/mL), *L. camara* essential oil reduced the number of the parasites by almost 70%, when compared to control group. Nifurtimox (50  $\mu$ g/mL), which was used as standard drug against the epimastigotes of *T. cruzi*, killed about 93% of *T. cruzi*. The IC<sub>50</sub> values (concentration required to kill or inhibit the growth of parasites by 50%) for epimastigotes of *T. cruzi* were 3.02 and 201.94  $\mu$ g/mL for nifurtimox and *L. camara* essential oil, respectively.

**Table 2.** Activity of essential oil from leaves of *L. camara* against *T. cruzi*.

Nifurtimox ( $\mu$ g/mL)	%AE	Essential Oil ( $\mu$ g/mL)	%AE
-	-	250	67.39 $\pm$ 0.26
-	-	125	22.04 $\pm$ 5.89
100	100 $\pm$ 0.46	-	-
-	-	62.5	0 $\pm$ 3.06
50	93 $\pm$ 0.66	-	-
10	84 $\pm$ 0.62	-	-
1	43 $\pm$ 0.93	-	-
0.5	13 $\pm$ 2.50	-	-
0.1	0 $\pm$ 1.54	-	-
IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)	3.02 $\pm$ 0.75		201.94 $\pm$ 1.2

%AE: percentage of epimastigotes of *T. cruzi* killed after treatment with nifurtimox or *L. camara* essential oil. Results are the mean of *n* = 3 independent experiments performed in triplicate.

### 2.3. Effect of Essential Oil from *L. camara* Leaves against *Leishmania braziliensis*

Essential oil from the *L. camara* leaves killed the promastigotes of *Leishmania braziliensis* in a concentration-dependent manner (Table 3). Of particular therapeutic importance, 100 µg/mL of *L. camara* essential oil killed 100% of the *L. braziliensis* promastigote forms of the parasite, while the standard drug used (pentamidine) killed 94% of the promastigotes. However, pentamidine was more effective than *L. camara* essential oil, since the concentration needed to kill 50% (IC<sub>50</sub>) of the parasites was 5.69, whereas the IC<sub>50</sub> for the essential oil of *L. camara* was 72.31 µg/mL.

**Table 3.** Activity of *L. camara* leaf essential oil against *Leishmania braziliensis*.

Pentamidine (µg/mL)	%AP	Essential Oil (µg/mL)	%AE
-	-	250	100 ± 0.76
-	-	125	100 ± 1.25
-	-	100	100 ± 2.23
100	93.9 ± 0.3	-	-
-	-	80	94.95 ± 1.46
-	-	70	36.4 ± 2.22
-	-	62.5	16.44 ± 0.90
-	-	50	15.9 ± 1.50
50	93.9 ± 0.1	-	-
25	89.2 ± 0.6	-	-
12.5	80.6 ± 0.2	-	-
6.25	54.2 ± 0.3	-	-
3.125	15.5 ± 1.1	-	-
IC <sub>50</sub> (µg/mL)	5.69 ± 0.42		72.31 ± 0.89

%AP: percentage of promastigotes of *L. braziliensis* killed by pentamidine or essential oil of *L. camara*.

%AE: percentage of epimastigotes of *T. cruzi* killed after treatment with pentamidine or *L. camara* essential oil. Results are the mean of  $n = 3$  independent experiments performed in triplicate.

### 2.4. Effect of *L. camara* Leaf Essential Oil on NCTC929 Fibroblasts

The cytotoxic potential of essential oil from *L. camara* in NCTC929 fibroblasts is shown in Table 4. Essential oil of *L. camara* at a concentration of 500 µg/mL completely killed the fibroblasts, while the same effect was observed for nifurtimox (the reference drug) at concentrations ranging from 200 to 600 µg/mL. The order of effectiveness of killing the fibroblast was: nifurtimox (IC<sub>50</sub> = 82.39 µg/mL) > *L. camara* essential oil (IC<sub>50</sub> = 301.42 µg/mL) (Table 4).

**Table 4.** Toxicity of Effect of *L. camara* leaf essential oil on NCTC929 fibroblast.

Nifurtimox (µg/mL)	%C	Essential Oil (µg/mL)	%C
600	100 ± 4.4	-	-
-	-	500	100 ± 1.49
400	100 ± 3.8	-	-
-	-	250	14.57 ± 0.72
200	100 ± 0.7	-	-
-	-	125	7.28 ± 1.18
100	64 ± 1.7	-	-
-	-	62.5	6.06 ± 7.72
50	7.0 ± 2.3	-	-
-	-	31.25	0.0 ± 4.09
25	1.4 ± 1.4	-	-
IC <sub>50</sub> (µg/mL)	82.39 ± 2.16		301.42 ± 3.1

%C: percentage of NCTC929 fibroblasts killed by nifurtimox or essential oil of *L. camara*. Results are the mean of  $n = 3$  independent experiments performed in triplicate.



### 3. Discussion

There are an increased interest in finding alternative drugs from the plant kingdom for the treatment of neglected parasitic diseases, in an attempt to replace or supplement those in current use [17,18,33]. Nowadays, phytochemicals are being synthesized and chemically modified to warrant higher potency against these human pathogens [18]. As a pre-requisite for the identification and isolation of active component(s) from plant extracts and/or essential oils, the knowledge of their biological activity is required. In this context, the main objective of the present study was to investigate the biological activities of *L. camara* essential oil with emphasis to its potential to inhibit the promastigote and epimastigote forms of *Leishmania braziliensis* and *Trypanosoma cruzi*, respectively.

Previous studies have reported the leishmanicidal activity of *L. camara* leaf essential oil on promastigote forms of *L. chagasi* and *L. amazonensis* [34] as well as its antibacterial activity [31]. Here, the anti-leishmanicidal activity of *L. camara* essential oil was assessed against the promastigote form of *Leishmania braziliensis*. Comparing our results with that obtained by Machado *et al.* [34], it is possible to extrapolate that *L. camara* essential oil was more effective against *L. amazonensis* ( $IC_{50} = 0.25 \mu\text{g/mL}$ ) and *L. chagasi* ( $IC_{50} = 18 \mu\text{g/mL}$ ) than *L. braziliensis* ( $IC_{50} = 72.31 \mu\text{g/mL}$ ) used in this study. Similar observation was reached by Morais-Teixeira *et al.* [35] when using meglumine antimoniate against the three species of *Leishmania*. In a region of Tunisia (Sned region) endemic to leishmaniasis, Ahmed *et al.* [36] showed that essential oils obtained from *Thymus hirtus* is significantly active against both *Leishmania major* and *L. infantum*, while that of *Ruta chalepensis* was only active against *L. infantum*. The difference in the effectiveness of these oils against different species of *Leishmania* can possibly be attributed to their distinct chemical composition.

The ability of *L. camara* essential oil to inhibit the epimastigote form of *Trypanosoma cruzi* was evaluated for the first time. The results demonstrated that *L. camara* essential oil at relatively high concentration (250  $\mu\text{g/mL}$ ) exhibited 67.39% inhibition against *T. cruzi*. On the other hand, 500  $\mu\text{g/mL}$  of *L. camara* essential oil was highly toxic to NCTC929 fibroblast. The toxicity of essential oil from *L. camara* was possibly related to its triterpenes (*i.e.*, lantadenes) reported to be present in all parts of the plant [37]. However, compounds other than triterpenes may be involved in *L. camara* essential oil toxicity. In line of this, Martínez-Díaz *et al.* [38] demonstrated recently that (*E*)-caryophyllene, which was the major component of *L. camara* essential oil, exhibits potent antiparasitic effect against *T. cruzi*. This result suggests that (*E*)-caryophyllene might be at least in part, responsible for the observed anti-parasitic activity. However, we cannot rule out the fact that minor and major compounds from *L. camara* essential oil should have made significant contribution to the oil's activity.

Recently, Charneau *et al.* [39] screened Brazilian Cerrado plant extracts for their anti-protozoan activity. They demonstrated that eight extracts from *Connarus suberosus*, *Blepharocalyx salicifolius*, *Psidium laruotteanum*, and *Myrsine guianensis* exhibited high anti-protozoan activity with  $IC_{50}$  values lower than 10  $\mu\text{g/mL}$ . Similarly, Costa *et al.* [40] showed that essential oils obtained from the leaves of species of Annonaceae family, specifically, *Annona pickelli* and *A. salzmannii*, have potent trypanocidal activity against *Trypanosoma cruzi* with  $IC_{50}$  value lower than 100  $\mu\text{g/mL}$ . If we compare our results with that obtained by Charneau *et al.* [39] and Costa *et al.* [40] under a similar assay system, we can presume that the anti-*Trypanosoma cruzi* activity of *L. camara* leaf essential oil was relatively low ( $IC_{50} = 201.94 \mu\text{g/mL}$ ).

### 4. Materials and Methods

#### 4.1. Chemicals

Resazurin sodium salt was obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) and stored at 4 °C and protected from light. A solution of resazurin was prepared in 1% phosphate buffer, pH 7, and filter sterilized prior to use. Chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside (CPRG; Roche, Indianapolis, IN, USA) was dissolved in 0.9% Triton X-100 (pH 7.4). Penicillin G (Ern, S.A., Barcelona, Spain), streptomycin (Reig Jofré S.A., Barcelona, Spain), and dimethylsulfate were also used.

#### 4.2. Plant Material and Isolation of Essential Oil

The leaves of *Lantana camara* were collected in Padre Cicero, Crato–Ceara (7°22'S; 39°28'W, 492 m above sea level), Brazil, in June 2012. The plant material was identified and the specimen was deposited in the Herbarium Caririense Dárdano de Andrade–Lima, Regional University of Cariri (URCA), under the number 7518.

The essential oil from the dried leaves of *L. camara* was obtained by hydro-distillation using a Clevenger-type apparatus as described by Guenther [41] with small modifications. At the end of the extraction process, the oil was dried over anhydrous sodium sulfate to remove the aqueous phase, and then stored at 4 °C prior to use.

#### 4.3. Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometry (GC/MS) Analysis

The essential oil after preparation was submitted to GC/MS analysis in a Varian 3800 Gas Chromatograph (SHIMADZU, Houston, TX., USA) equipped with a fused silica capillary column (25 m × 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 µm) coated with SE-54; carrier gas helium, flow rate 1.0 mL/min and with split mode. The injector temperature and detector temperature were 200 °C and 250 °C, respectively. The column temperature was programmed from 50 °C to 300 °C at 4 °C/min. Individual components were identified by matching their 70 eV mass spectra with those of the spectrometer database using the Wiley L-built library and two other computer libraries' MS searches using retention indices as a pre-selection routine, as well as by visual comparison of the fragmentation pattern with those reported in the literature [32]. The percentage composition was obtained from electronic integration measurements using flame ionization detection (FID), also set at 250 °C. *n*-Alkanes (C<sub>7</sub>–C<sub>30</sub>) were used as reference points in the calculation of relative retention indices (RIs). The concentration of the identified compounds was computed from the GC peak area without any correction factor. GC analyses were equipped with a flame ionization detector (FID) and a J and W Scientific DB-5 fused silica capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm). Injector and detector temperatures were 250 °C and 290 °C, respectively. Hydrogen was used as carrier gas, flow rate 1.0 mL/min, split mode (1:10).

#### 4.4. Cell Lines Used

For *in vitro* studies of *T. cruzi*, the clone CL-B5 was used [42]. Parasites were stably transfected with the *Escherichia coli* β-galactosidase gene (*lacZ*), provided by Buckner F. at the Instituto Conmemorativo Gorgas (Panama, Brazil). Epimastigotes were grown at 28 °C in liver infusion tryptose broth (Difco, Detroit, MI, USA) with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Carlsbad, CA, USA), penicillin (Ern, S.A., Barcelona, Spain), and streptomycin (Reig Jofré S.A., Barcelona, Spain), as described previously [43], and harvested during the exponential growth phase.

Culture of *L. braziliensis* was obtained from the Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Asunción, Paraguay–IICS. The maintenance of the strain, the form of cultivation, and isolation of shape promastigota were performed following the procedures described by Roldós *et al.* [43]. The inhibition assays of promastigotes was performed using the strain of *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), grown at 22 °C in Schneider's *Drosophila* medium supplemented with 20% FBS.

For the cytotoxicity assays, the fibroblast cell line NCTC929 grown in Minimal Essential Medium (Sigma) was used. The culture medium was supplemented with heat-inactivated FBS (10%), penicillin G (100 U/mL), and streptomycin (100 µg/mL). Cultures were maintained at 37 °C in humid atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. The viability of these strains was assessed according to Roldós *et al.* [43], through the use of resazurin as a colorimetric method.

#### 4.5. Trypanocidal Assay

The essential oil from the leaves of *L. camara* was evaluated against epimastigotes forms of *T. cruzi* using cultures that have not reached the stationary phase [44]. Briefly, epimastigotes were seeded at 1 × 10<sup>5</sup>/mL in 200 µL of liver tryptose broth medium. The plates were then incubated with or without different concentrations of *L. camara* essential oil (250, 125, and 62.5 µg/mL) at 28 °C for 72 h, at

which time 50  $\mu$ L of CPRG solution (200  $\mu$ M) was added. The plates were incubated at 37 °C for an additional 6 h and were then read at 595 nm. Nifurtimox (100, 50, 10, 1, 0.5, and 0.1  $\mu$ g/mL) was used as reference standard. The efficacy of the essential oil was estimated by calculating the anti-epimastigotes percentage (AE%) as follow:  $\%AE = [(A_{exp} - A_{boil}) / (A_{cont} - A_{cult})] \times 100$ , where,  $A_{exp}$  = absorbance of the experimental sample;  $A_{boil}$  = Absorbance of the blank sample;  $A_{cont}$  = Absorbance of the control;  $A_{cult}$  = Absorbance of the culture medium. It should be stressed that the essential oil was solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) prior to the experiment.

#### 4.6. Leishmanicidal Assay

Cultures of promastigotes of *Leishmania braziliensis* were grown in 96-well microplates to a concentration of  $10^6$  cells/mL. Different concentrations of *L. camara* essential oil (250, 125, 100, 80, 70, 62.5, and 50  $\mu$ g/mL) previously dissolved in DMSO, was incubated with the parasite for 72 h at 28 °C. The concentration of DMSO in the wells was not higher than 0.01%. The concentrations of the oil were obtained by serial dilutions. At the end of the incubation period, 20  $\mu$ L of resazurin (2 mM) was added to the plates and the efficacy of the essential oil or the standard drug was evaluated by direct counting of cells. Each test was performed in triplicate. Pentamidine (100, 50, 25, 12.5, 6.25, and 3.125  $\mu$ g/mL) was used as standard drugs. The results were expressed in percent inhibition of promastigotes (%AP) and compared with untreated control.

#### 4.7. Cytotoxicity Assay

NCTC929 fibroblasts were plated in 96-well microplates at a final concentration of  $5 \times 10^4$  cells/well. The cells were grown at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. After that, the culture medium was removed and *L. camara* essential oil at different concentrations (500, 250, and 125  $\mu$ g/mL) and a new culture was performed for 24 h. Then, 20  $\mu$ L of 2 mM resazurin was added to each well. The plates were incubated for 3 h, and the reduction of resazurin was measured using dual absorbance at wavelengths of 490 and 595 nm. The value of the control (blank) was subtracted. Nifurtimox at concentrations of 600, 400, 200, 100, 50, and 25  $\mu$ g/mL was used as reference.

#### 4.8. Statistical Analysis

Results are expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM) of at least three independent experiments performed in triplicate.

## 5. Conclusion

This study demonstrates for the first time the anti-parasitic effect of *L. camara* essential oil against *L. braziliensis* and *T. cruzi*. However, the oil was also toxic to fibroblasts, indicating its potential toxicity to mammalian cells. Consequently, further studies with isolated compounds from *L. camara* essential oil need to be investigated to elucidate the mechanism(s) underlying its anti-parasitic action.

**Acknowledgments:** Luiz Marivando Barros is particularly grateful to CAPES, CAPES/DINTER/URCA-UFSM. The authors would like to thank the professors from NAPO (Center for Analysis and Organic Research at UFSM) for providing the GC/MS chromatograms and spectra and Ademir Farias Morel (Department of Chemistry at UFSM) for the assessment of the *n*-alkane series. Jean Paul Kamdem is particularly grateful to CAPES, TWAS-CNPq and CNPq for the financial support.

**Author Contributions:** João Batista Teixeira Rocha and Jean Paul Kamdem designed the research; Henrique Douglas Melo Coutinho and Irwin Rose Alencar de Menezes provided the space and the reagents; Luiz Marivando Barros, Antonia Eliene Duarte, Maria Flaviane Bezerra Moraes-Braga, Celeste Vega, Nadghia Figueiredo Leite and Emily Pansera Waczuk performed the experiments and contributed to data collection; Luiz Marivando Barros and Jean Paul Kamdem wrote the manuscript. João Batista Teixeira Rocha contributed to the revision of the manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.



## References

1. WHO-World Health Organization. Leishmaniasis Magnitude of the Problem, 2010. Available online: [http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden\\_magnitude/en/print.html](http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/print.html) (assessed on 1 October 2015).
2. Shaw, J.J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: Present and future trends and their implications. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1994**, *89*, 471–478.
3. Desjeux, P. Leishmaniasis: Public health aspects and control. *Clin. Dermatol.* **1996**, *14*, 417–423.
4. Ashford, R.W. The leishmaniasis as model zoonoses. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1997**, *91*, 693–701.
5. Herwaldt, B.L. Leishmaniasis. *Lancet* **1999**, *354*, 1191–1199.
6. Croft, S.L.; Sundar, S.; Fairlamb, A.H. Drug resistance in Leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 111–126.
7. Cruz, A.K.; de Toledo, J.S.; Falade, M.; Terraio, M.C.; Kamchonwongpaisan, S.; Kyle, D.E.; Uthaipibull, C. Current treatment and drug discovery against *Leishmania* spp. and *Plasmodium* spp.: A review. *Curr. Drug Targ.* **2009**, *10*, 178–192.
8. WHO-World Health Organization. *Neglected Tropical Diseases—Innovative and Intensified Disease Management*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2007.
9. Mishra, B.B.; Singh, R.K.; Srivastava, A.; Tripathi, V.J.; Tiwari, V.K. Fighting against leishmaniasis: Search of alkaloids as future true potential anti-leishmanial agents. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2009**, *9*, 107–123.
10. Croft, S.L.; Coombs, G.H. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* **2003**, *19*, 502–508.
11. Natera, S.; Machuca, C.; Padrón-Nieves, M.; Romero, A.; Diaz, E.; Ponte-Sucre, A. *Leishmania* spp.: Proficiency of drug-resistant parasites. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2007**, *29*, 637–642.
12. Clem, A.A. Current perspective on *Leishmaniasis*. *J. Glob. Infect. Dis.* **2010**, *2*, 124–126.
13. Rassi, A., Jr.; Rassi, A.; Marin-Neto, J.A.M. Chagas disease. *Lancet* **2010**, *375*, 1388–1402.
14. Mougabure-Cueto, G.; Picollo, M.I. Insecticide resistance in vector Chagas disease: Evolution, mechanisms and management. *Acta Trop.* **2015**, *149*, 70–85.
15. Coura, J.R.; de Castro, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, *97*, 3–24.
16. Soeiro, M.N.; de Castro, S.L. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. *Expert Opin. Ther. Targets* **2009**, *13*, 105–121.
17. Rocha, L.G.; Almeida, J.R.G.S.; Macêdo, R.O.; Barbosa-Filho, J.M. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine* **2005**, *12*, 514–535.
18. Ndjonka, D.; Rapado, L.N.; Silber, A.M.; Liebau, E.; Wrenger, C. Natural products as a source for treating neglected parasitic diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 3395–3439.
19. Derda, M.; Hadas, E. The use of phytotherapy in diseases caused by parasitic protozoa. *Acta Parasitol.* **2014**, *60*, 1–8.
20. Sharma, O.P.; Makkar, H.P.; Dawra, R.K. A review of the noxious plant *Lantana camara*. *Toxicon* **1988**, *26*, 975–987.
21. Ghisalberti, E.L. *Lantana camara* Linn (Review). *Fitoterapia* **2000**, *71*, 467–485.
22. Day, M.D.; Wiley, C.J.; Playford, J.; Zalucki, M.P. *Lantana: Current Management Status and Future Prospects*; ACIAR Monograph 102; Australian Centre for International Agricultural Research: Canberra, Australia, 2003.
23. Kalita, S.; Kumar, G.; Karthik, L.; Rao, K.V.B. A review on medicinal properties of *Lantana camara*. *Res. J. Pharm. Technol.* **2012**, *5*, 771–775.
24. Bhagwat, S.A.; Breman, E.; Thekaekara, T.; Thornton, T.F.; Willis, K.J. A battle lost? Report on two centuries of invasion and management of *Lantana camara* L. in Australia, India and South Africa. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32407.
25. Sharma, O.P.; Makkar, H.P.; Dawra, R.K.; Negi, S.S. A review of the toxicity of *Lantana camara* (Linn) in animals. *Clin. Toxicol.* **1981**, *18*, 1077–1094.
26. Tripathi, A.K.; Shukla, B.N. Antifungal activity of some plant extracts against *Fusarium oxysporum* sp. causing wilt of linseed. *J. Mycol. Plant Pathol.* **2002**, *32*, 266–267.
27. Braga, F.G.; Bouzada, M.L.M.; Fabri, R.L.; Matos, M.O.; Moreira, F.O.; Scio, E.; Coimbra, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *111*, 396–402.

28. Deena, M.J.; Thoppil, J.E. Antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana camara*. *Fitoterapia* **2000**, *71*, 453–455.
29. Begum, S.; Wahab, A.; Siddiqui, B.S. Pentacyclic tri-terpenoids from the aerial parts of *Lantana camara*. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 134–137.
30. Kumar, V.P.; Chauhan, N.S.; Padh, H.; Rajani, M. Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *107*, 182–188.
31. Seth, R.; Mohan, M.; Singh, P.; Haider, S.Z.; Gupta, S.; Bajpai, I.; Singh, D.; Dobhal, R. Chemical composition and antibacterial properties of the essential oil and extracts of *Lantana camara* Linn. from Uttarakhand (India). *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2012**, *2*, S1407–S1411.
32. Adams, R.P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*; Allured Publishing Corporation: Carol Stream, IL, USA, 1995; p. 456.
33. Ibrahim, M.A.; Mohammed, A.; Isah, M.B.; Aliyu, A.B. Anti-trypanosomal activity of African medicinal plants: A review update. *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *154*, 26–54.
34. Machado, R.R.P.; Júnior, W.V.; Lesche, B.; Coimbra, E.S.; de Souza, N.B.; Abramo, C.; Soares, G.L.G.; Kaplan, M.A.C. Essential oil from leaves of *Lantana camara*: A potential source of medicine against leishmaniasis. *Braz. J. Pharmacogn.* **2012**, *22*, 1011–1017.
35. Morais-Teixeira, E.; Carvalho, A.S.; Costa, J.C.S.; Duarte, S.L.; Mendonça, J.S.; Boechat, N.; Rabello, A. *In vitro* and *in vivo* activity of meglumine antimoniate produced at Farmanguinhos-Fiocruz, Brazil, against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (L.) chagasi* and *L. (Viannia) braziliensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **2008**, *103*, 358–362.
36. Ahmed, S.B.; Sghaier, R.M.; Guesmi, F.; Kaabi, B.; Mejri, M.; Attia, H.; Laouini, D.; Smaal, I. Evaluation of antileishmanial, cytotoxic and antioxidant activities of essential oils extracted from plants issued from leishmaniasis-endemic region of Sned (Tunisia). *Nat. Prod. Res.* **2011**, *25*, 1195–1201.
37. Sharma, O.P.; Sharma, S.; Patabhi Patabhi, V.; Mahato, S.B.; Sharma, P.D. A review of the hepatotoxic plant *Lantana camara*. *Crit. Rev. Toxicol.* **2007**, *37*, 313–352.
38. Martínez-Díaz, R.A.; Ibáñez-Escribano, A.; Burillo, J.; de la Heras, L.; del Prado, G.; Agulló-Ortuno, M.T.; Julio, L.F.; González-Coloma, A. Thrypanocidal, trichomonocidal and cytotoxic components of cultivated *Artemisia absinthium* Linnaeus (Asteraceae) essential oil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **2015**, *110*, 693–699.
39. Charneau, S.; de Mesquita, M.L.; Bastos, I.M.; Santana, J.M.; de Paula, J.E.; Grellier, P.; Espindola, L.S. *In vitro* investigation of Brazilian Cerrado plant extract activity against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei gambiense*. *Nat. Prod. Res.* **2015**, *29*, 1–7.
40. Costa, E.V.; Dutra, L.M.; Salvador, M.J.; Ribeiro, L.H.; Gadelha, F.R.; de Carvalho, J.E. Chemical composition of the essential oils of *Annona pickelii* and *Annona salzmannii* (Annonaceae), and their antitumor and trypanocidal activities. *Nat. Prod. Res.* **2013**, *27*, 997–1001.
41. Guenther, E. *Individual Essential Oils of the Plant Families Rutaceae and Labiatae*; Robert, E., Ed.; Krieger Publishing Company, Inc.: New York, NY, USA, 1975; Volume 3, pp. 316–319.
42. Le Senne, A.; Muelas-Serrano, S.; Fernandez-Portillo, C.; Escario, J.A.; Gómez-Barrio, A. Biological characterization of a beta-galactosidase expressing clone of *Trypanosoma cruzi* CL strain. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, *97*, 1101–1105.
43. Roldós, V.; Nakayama, H.; Rolón, M.; Montero-Torres, A.; Trucco, F.; Torres, S.; Vega, C.; Marrero-Ponce, Y.; Heguaburu, V.; Yaluff, G.; et al. Activity of a hydroxybibenzyl bryophyte constituent against *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*: *In silico*, *in vitro* and *in vivo* activity studies. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 1797–1807.
44. Vega, C.; Rolón, M.; Martínez-Fernández, A.R.; Escario, J.A.; Gómez-Barrio, A. A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing  $\beta$ -galactosidase. *Parasitol. Res.* **2005**, *95*, 296–298.

**Sample Availability:** Samples of the compounds are not available from the authors.



© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons by Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 4.1.2 Artigo 2

**Archives of Pharmacal Research****Safety Assessment and Antioxidative activity of Lantana montevidensis: Contribution to its Phytochemical and Pharmacological activity**

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	ARPR-D-16-00094
<b>Full Title:</b>	Safety Assessment and Antioxidative activity of Lantana montevidensis: Contribution to its Phytochemical and Pharmacological activity
<b>Article Type:</b>	Original Article
<b>Corresponding Author:</b>	Luiz Marivando Barros Universidade Regional do Cariri BRAZIL
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Universidade Regional do Cariri
<b>First Author:</b>	Luiz Marivando Barros
<b>Suggested Reviewers:</b>	Adedayo Oluwaseun Ademiluyi, Ph.D. Functional Foods and Nutraceutical Unit, Federal University of Technology, United Kingdom ademiluyidayo@yahoo.co.uk

*Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation*



1 **Safety Assessment and Antioxidative activity of *Lantana montevidensis*: Contribution to**  
 2 **its Phytochemical and Pharmacological activity**

3 Luiz Marivando Barros<sup>a,b</sup>, Emily Pansera Waczuk<sup>b</sup>, Antonia Eliene Duarte<sup>a,b</sup>, Katiane  
 4 Roversi<sup>c</sup>, Francisco Assis Bezerra da Cunha<sup>a,b</sup>, Mirian Rolon<sup>d</sup>, Cathia Coronel<sup>d</sup>, Maria Celeste  
 5 Vega Gomez<sup>d</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes<sup>e</sup>, José Galberto Martins da Costa<sup>f</sup>, Maria  
 6 Arlene Pessoa da Silva<sup>g</sup>, Aline Augusti Boligon<sup>h</sup>, Diogo Onofre Souza<sup>i</sup>, Jean Paul  
 7 Kamdem<sup>b,i\*</sup>, João Batista Teixeira da Rocha<sup>\*b</sup>

8 <sup>a</sup>Universidade Regional do Cariri-URCA, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde-CCBS,  
 9 Departamento de Ciências Biológicas, CEP 63100-000, Pimenta, Crato-Ceará, Brazil

10 <sup>b</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em  
 11 Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900,  
 12 Brazil

13 <sup>c</sup>Departamento de Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,  
 14 Farmatox, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

15 <sup>d</sup>Centre for the Development of Scientific la Investigación (CEDIC), Fundación Moisés  
 16 Bertoni /Laboratorios Diaz Gill, Asuncion, Paraguay

17 <sup>e</sup>Departamento de Química Biológica, Química Departamento de Biologia, Química  
 18 Medicinal e Laboratório de Farmacologia da Universidade Regional do Cariri- URCA, Brazil

19 <sup>f</sup>Universidade Regional do Cariri, Departamento de Química Biológica, Laboratório de  
 20 Pesquisas de Produtos Naturais, CEP 63.105.000, Crato-Ceará, Brazil

21 <sup>g</sup>Universidade Regional do Cariri-URCA, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório  
 22 de Botânica Aplicada. CEP 63,100-000, Pimenta, Crato-Ceará, Brazil

23 <sup>h</sup>Laboratório de Fitoquímica, Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de  
 24 Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

25 <sup>i</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básica da Saúde, Universidade Federal  
 26 do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS CEP 90035-003, Brazil

27 \*Corresponding authors: Dr. Jean Paul Kamdem and Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha  
 28 and; E-mails: [kamdemjeanpaul2005@yahoo.fr](mailto:kamdemjeanpaul2005@yahoo.fr) and [jbtrocha@yahoo.com.br](mailto:jbtrocha@yahoo.com.br)

29

30

31 **Abstract**

32

33 This study sought to investigate for the first time the genotoxicity and cytotoxicity of  
 34 ethanolic (EtOH) and aqueous extracts from the leaves of *Lantana montevidensis* in human  
 35 leukocytes, as well as their possible interaction with human erythrocytes membranes *in vitro*.  
 36 The antioxidant activity of both extracts was also investigated. Treatment of leukocytes with  
 37 EtOH or aqueous extracts (1-480 µg/mL) did not affect DNA damage index, but promoted  
 38 cytotoxicity at higher concentrations (240-480 µg/mL). Both extracts did not modify the  
 39 osmotic fragility of human erythrocytes. The extracts scavenged DPPH radical and prevented  
 40 against Fe<sup>2+</sup>-induced lipid peroxidation in rat and brain homogenates and this was likely not

41 attributed to iron(II) chelation. HPLC analysis identified chlorogenic acid and quercetin as the  
42 major components in EtOH extracts, while caffeic and chlorogenic acids were the major  
43 phenolic acids in the aqueous extract. These results provide supportive information on the  
44 functional use of *L. montevidensis* in folk medicine and suggests that caution should be  
45 exercised regarding its dosage and frequency use.

46

47 **Keywords:** *Lantana montevidensis*, genotoxicity, cytotoxicity, osmotic fragility, HPLC-DAD

48

49

## 50 **1. Introduction**

51

52 Plants with therapeutic actions have been used by rural communities and even urban  
53 population in the treatment of several human diseases, and their beneficial effects have been  
54 attributed to their chemical constituents. This is at least, in part, because their chemical  
55 constituents may have antioxidant activity, thereby, preventing the oxidative damage resulting  
56 from oxidative stress, which has been implicated in many diseases including stroke, cancer  
57 and neurodegeneration (Uttara et al., 2009; Visconti and Grieco, 2009; Rodrigo et al., 2013).

58 The genus *Lantana* is composed of about 150 species (Ghisalberti, 2000) in which *L.*  
59 *camara* and *L. montevidensis* are represented. The two species are very similar in a botanical  
60 point of view (Munir, 1996) and are used in popular medicine as carminative antispasmodic,  
61 antiemetic and to treat respiratory infections, rheumatism, wounds, asthma, biliary fever,  
62 bronchitis, tumor, ulcers, high blood pressure, etc (Tokarnia et al., 1984, 1999; Munir, 1996;  
63 Barreto et al., 2010; Sousa et al., 2011; Kalita et al., 2012). The difference between the two  
64 types of *Lantana* is height and flower color.

65 Although, *L. camara* is well studied for its pharmacological properties (Kalita et al.,  
66 2012), it is recognized so far among the most toxic plants (Ghisalberti, 2000; Kalita et al.,  
67 2012). Its toxic effects to human and livestock have been reported in Australia, India, New  
68 Zealand, South Africa and America, and were attributed to the presence of lantadenes A, B  
69 and D (Seawright et al., 1983; Sharma et al., 1988; Pass, 1991; Kalita et al., 2012). In  
70 addition, the essential oil obtained from the leaves of *L. camara* was recently found to be  
71 toxic to NCTC929 fibroblasts (Barros et al., 2016).

72 *L. montevidensis* (Family, Verbenaceae), popularly known as “camará” or “cambará”, is a  
73 sprawling shrub native to Brazil and Uruguay. It is considered an invasive species in many  
74 parts of the world where it has been introduced as an ornamental plant (Taylor et al., 2015).  
75 The dried leaves of *L. montevidensis* prepared in different ways (infusion, maceration,

76 decoction), and its essential oil have been traditionally used for the same purposes like *L.*  
77 *camara* (Hashimoto, 1996). In opposition to the widely studied *L. camara*, very few studies  
78 have demonstrated the pharmacological potential of *L. montevidensis*. Extracts and essential  
79 oil from the leaves of *L. montevidensis* have been reported to exhibit antibacterial activity  
80 with the potential to modulate antibiotics drugs used in clinical infections (Barreto et al.,  
81 2010; Sousa et al., 2011, 2012, 2013). In addition, methanolic extract of the leaves showed  
82 anti-inflammatory, anti-pyretic, analgesic, antioxidant and antibacterial activities (Makboul et  
83 al., 2013; Sousa et al., 2015). Phytochemical studies revealed that flavonoid fraction from the  
84 leaves of *L. montevidensis* exhibits antiproliferative activity against human gastric  
85 adenocarcinoma, human uterine carcinoma and murine melanoma cell lines (Nagão et al.,  
86 2002). Triterpenoids and flavones are likely to be the major components of *L. montevidensis*  
87 leaves extracts (Wollenweber et al., 1997; Nagão et al., 2002; Makboul et al., 2013), while  $\beta$ -  
88 caryophyllene, germacrene and bicyclogermacrene are the main constituents of its essential  
89 oil (Sousa et al., 2013).

90 Considering the lack of information in the literature regarding the biological activities of  
91 *L. montevidensis*, and that little is known about its chemical composition, the present study  
92 aimed to chemically characterize the aqueous and ethanolic extracts from the leaves of *L.*  
93 *montevidensis*, and to evaluate their bioactive properties. Particularly, their potential  
94 antioxidant (DPPH, TBARS, and  $\text{Fe}^{2+}$  chelation) and toxic effects (genotoxicity and  
95 cytotoxicity), as well as their influence on osmotic fragility were investigated in human  
96 leukocytes and erythrocytes respectively.

97

## 98 **2. Materials and Methods**

99

### 100 *2.1. Chemicals*

101 All chemical were of analytical grade. Acetonitrile, phosphoric acid, gallic acid, caffeic  
102 acid, ellagic acid, chlorogenic acid and catechin were purchased from Merck (Darmstadt,  
103 Germany). Quercetin, quercitrin, isoquercitrin, kaempferol, luteolin, apigenin and rutin were  
104 acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). High performance liquid  
105 chromatography (HPLC-DAD) was performed with a Shimadzu Prominence Auto Sampler  
106 (SIL-20A) HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with Shimadzu LC-20AT  
107 reciprocating pumps connected to a DGU 20A5 degasser with a CBM 20A integrator, SPD-  
108 M20A diode array detector and LC solution 1.22 SP1 software. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl



109 (DPPH), ascorbic acid, malonaldehydebis-(dimethylacetal) (MDA), thiobarbituric acid  
110 (TBA), sodium azide and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) were obtained from Sigma Chemical Co.  
111 (St. . Louis, MO, USA).

112

### 113 2.2. Plant material

114 The leaves of *Lantana montevidensis* were collected in Padre Cicero, Crato - Ceara (7°  
115 22'S; 39° 28'W, 492 m above sea level), Brazil, in January 2012. The plant material was  
116 identified and the specimen was deposited in the Herbarium Caririense Dárdano de Andrade -  
117 Lima, Regional University of Cariri (URCA), under the number 7519. For the aqueous extract  
118 of *L. montevidensis* 300 g of crushed fresh leaves were mixed with 2 L of hot water and the  
119 mixture was allowed to stand for 3 days. On the 3<sup>rd</sup> day, the mixture was filtered and the  
120 filtrate was lyophilized. However, for the ethanolic extract (EtOH), the fresh crushed leaves  
121 (300 g) was macerated with 1.5 L of 92% ethanol for 3 days. The suspension was then filtered  
122 and the filtrate was evaporate under pressure and lyophilized to obtain a dark brown solid.  
123 The prepared extracts (aqueous and ethanolic) were stored in the freezer until being used.

124

### 125 2.3. Characterization of aqueous and ethanolic extracts from the leaves of *L. montevidensis* 126 by HPLC-DAD

127 Reverse phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions  
128 using Phenomenex C<sub>18</sub> column (4.6 mm x 250 mm) packed with 5µm diameter particles; the  
129 mobile phase was: (A) acetonitrile: water (95:5, v/v) and (B) water: phosphoric acid (98:2,  
130 v/v), and the composition gradient was: 5% of B until 10 min and changed to obtain 20%,  
131 40%, 60%, 70% and 100% B at 20, 30, 40, 50 and 60 min, respectively, following the method  
132 described by Colpo et al. (2014) with slight modifications. The ethanolic and aqueous extracts  
133 from the leaves of *L. montevidensis* and the mobile phase were filtered through 0.45 µm  
134 membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use. The extracts  
135 (ethanolic and aqueous) of *L. montevidensis* were analyzed at 30 mg/mL. The flow rate was  
136 0.6 mL/min and the injection volume was 50 µL. Stock solutions of standards references were  
137 prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.025 – 0.400 mg/mL for  
138 catechin, quercetin, quercitrin, isoquercitrin, kaempferol, luteolin, apigenin and rutin; and  
139 0.030 – 0.250 mg/ml for gallic, chlorogenic, ellagic and caffeic acids. Quantification was  
140 carried out by integration of the peaks using the external standard method, at 270 nm for  
141 gallic and ellagic acids, 280 nm for catechin, 327 nm for chlorogenic and caffeic acids, and

142 365 for quercetin, quercitrin, isoquercitrin, kaempferol, apigenin, luteolin and rutin. The  
143 chromatography peaks were confirmed by comparing its retention time with those of  
144 reference standards and by DAD spectra (200 to 600 nm). The calibration curve for the  
145 standards used is presented in [Table 1](#). Limit of detection (LOD) and limit of quantification  
146 (LOQ) were calculated based on the standard deviation of the responses and the slope using  
147 three independent analytical curves, as defined by [Boligon et al. \(2013\)](#). LOD and LOQ were  
148 calculated as  $3.3 \sigma/S$  and  $10 \sigma/S$ , respectively, where  $\sigma$  is the standard deviation of the response  
149 and S is the slope of the calibration curve.

150

#### 151 2.4. Antioxidant activity in chemical and biological models

##### 152 2.4.1. 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity

153 The antioxidant activity was determined by the ability of the aqueous and ethanolic  
154 extracts from the leaves of *L. montevidensis* to scavenge the DPPH radical, as described by  
155 [Kamdem et al. \(2012\)](#) with some modifications. Briefly, 50  $\mu\text{L}$  of ethanolic and aqueous  
156 extracts in different concentrations (1- 480  $\mu\text{g/mL}$ ) were mixed with 100  $\mu\text{L}$  of freshly  
157 prepared DPPH solution (0.3 mM in ethanol). The plate was then kept in the dark at room  
158 temperature for 30 min. The reduction of DPPH color was measured by monitoring the  
159 decrease in absorption at 517 nm using a microplate reader (SpectraMax, USA). Ascorbic  
160 acid was used as positive control. The percent DPPH inhibition was calculated as follow: %  
161 inhibition =  $100 - [100 (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}})/A_{\text{control}}]$ , where  $A_{\text{sample}}$  is the absorbance of the tested  
162 sample with DPPH;  $A_{\text{blank}}$ , the absorbance of the test tube without the addition of DPPH and  
163  $A_{\text{control}}$  is the absorbance of DPPH solution.

164

##### 165 2.4.2. $\text{Fe}^{2+}$ Chelating activity of the extracts

166 The  $\text{Fe}^{2+}$  chelating activity of the ethanolic and aqueous extracts from the leaves of *L.*  
167 *montevidensis* was determined using a modified method of [Kamdem et al. \(2013\)](#). The  
168 reaction mixture containing 58  $\mu\text{L}$  of saline solution (0.9%, w/v), 45  $\mu\text{L}$  Tris-HCl (0.1 M, pH,  
169 7.5), 27  $\mu\text{L}$  of extracts (1-60  $\mu\text{g/mL}$ ) and 36  $\mu\text{L}$  of 110  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  was incubated for 10 min  
170 at 37°C. Subsequently, 34  $\mu\text{L}$  of 1, 10-phenanthroline (0.25%, w/v) was added and the  
171 absorbance of the orange coloured complex formed was measured at 0, 10 and 20 min at 510  
172 nm (against blank solutions of the samples) using microplate reader (SpectraMax, USA). The  
173 same procedure was performed for the control (i.e.,  $\text{Fe}^{2+}$ ), but without the extract. To ascertain  
174 the chelating potential of the extracts, we determined the potential reduction of any  $\text{Fe}^{3+}$  (that



175 might be formed during the incubation periods) by adding the reducing agent, ascorbic acid  
176 (to give a final concentration of 5 mM) to the reaction mixture. The absorbance was then  
177 determined after 5, 10 and 20 min following ascorbic acid addition. This is because the  
178 extracts could be oxidizing  $\text{Fe}^{2+}$  to  $\text{Fe}^{3+}$ , leading to a decrease in absorbance that was not  
179 related to  $\text{Fe}^{2+}$  chelation. To summarize, the schedule for the evaluation of  $\text{Fe}^{2+}$  chelation or  
180 oxidation by the extracts is presented in [Table 2](#).

181

#### 182 2.4.3. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay

183 TBARS production was determined as described by [Ohkawa et al. \(1979\)](#) and modified  
184 by [Barbosa-Filho et al. \(2014\)](#). The rats were killed by decapitation and the whole brain and  
185 liver were rapidly removed, placed on ice and weighed. The tissues were immediately  
186 homogenized in cold 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 (1:10 w/v for the liver and 1:5 w/v for the  
187 brain) and centrifuged at 3600 rpm for 10 min. The pellet was discarded and the supernatant  
188 was used for the assay. Aliquots of homogenates of brain or liver (20  $\mu\text{L}$ ) were incubated with  
189 10  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$ , in the presence or absence of extracts (1-480  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) at 37 ° C for 1 h to  
190 induce lipid peroxidation. Subsequently, 40  $\mu\text{L}$  of sodium dodecyl sulfate (8.1%), 100  $\mu\text{L}$  of  
191 acetic acid/HCl (pH 3.4) and 100  $\mu\text{L}$  of 0.6% thiobarbituric acid (TBA) were added and the  
192 reaction mixture was incubated at 100 °C for 1 h. After cooling, the samples were centrifuged  
193 for 2 min at 6000 rpm and the absorbance of the supernatant was read at 532 nm using an  
194 ELISA microplate reader (SpectraMax, USA). This work was performed in accordance with  
195 the guidelines of the Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (UFSM) and  
196 approved by the Ethics Committee of UFSM (076.2012-2).

197

#### 198 2.5. Blood sample collection and preparation of human leukocytes and erythrocytes

199 The heparinized venous blood was obtained from healthy volunteer donors from the  
200 Hospital of the Federal University of Santa Maria (HUFSM), Santa Maria-RS, Brazil, (age 26  
201  $\pm$  9). The study was approved by the Ethics Committee of UFSM and registered under the  
202 protocol number 0089.0.243.000-07. Human leukocytes and erythrocytes were obtained as  
203 previously described ([Kamdem et al., 2013](#); [Barbosa-Filho et al., 2014](#)). The leukocytes were  
204 separated by differential sedimentation rate using 5% dextran and subsequent adjustment of  
205 samples  $2 \times 10^6$  leukocytes/mL with Hank's buffered saline solution (HBSS)/heparin (5.4  
206 mM KCl, 0.3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4.2 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1.3 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 mM  
207  $\text{MgCl}_2$ , 0.6 mM  $\text{MgSO}_4$ , 137 mM NaCl and 10 mM D-glucose, 10 mM Tris-HCl, heparin 15

208 IU/mL, adjusted to pH 7.4). The erythrocytes were separated by centrifugation of the blood  
209 samples at 2000 rpm for 5 min at room temperature. The plasma was aspirated and the cell  
210 pellet was washed three times with phosphate buffered saline (6.1 mM, pH 7.4, containing  
211 150 mM NaCl).

212

### 213 *2.6. Determination of osmotic fragility in erythrocytes*

214 The effect of ethanolic and aqueous extracts from the leaves of *L. montevidensis* on the  
215 osmotic fragility of human erythrocytes was estimated by measuring their resistance to  
216 hemolysis in increasing concentrations of salt solutions as described by [Godal and Heisto](#)  
217 [\(1981\)](#) adapted by [Barbosa-Filho et al. \(2014\)](#). Five hundred microliters (500  $\mu$ L) of  
218 erythrocytes, 100  $\mu$ L of various concentrations of aqueous and ethanolic extracts (1-480  
219  $\mu$ g/mL) and 900 mL of phosphate buffered saline (PBS) (6.1 mM, pH 7.4, containing 150  
220 mM NaCl) were pre-incubated for 3 h at 37 °C. After incubation, the samples were mixed and  
221 centrifuged at 2500 rpm for 10 min and the supernatant was discarded. The erythrocytes were  
222 washed twice with PBS, centrifuged at 2500 rpm for 2 min and the supernatant discarded.  
223 Treated and untreated erythrocytes (7.5  $\mu$ L) were then incubated with 1.5 mL of various  
224 concentrations of NaCl (0 to 0.9%), pH 7.4 for 20 min. The samples were homogenized and  
225 centrifuged at 2000 rpm for 5 min. The obtained supernatant from each ependorf was  
226 transferred to microplate and the lysis of erythrocytes was followed by measuring the  
227 absorbance of the hemoglobin content in the supernatant at 540 nm using microplate reader  
228 (SpectraMax, USA). The results were expressed as percent of control.

229

### 230 *2.7. Genotoxicity evaluation by the Comet Assay*

231 The potential genotoxic effect of the extracts was investigated according to the methods  
232 described by [Collins \(2014\)](#) with some modifications. Leukocytes were isolated as described  
233 above and treated with various concentrations of aqueous and alcoholic extracts of *L.*  
234 *montevidensis* (1-480  $\mu$ g/mL) for 3 h. The comet assay was performed according to the  
235 following steps: (1) 15  $\mu$ L of leukocyte suspension ( $2 \times 10^6$  leukocytes/mL) was mixed with  
236 low-melting agarose and then, (2) added to 90 ml 0.75% LMP agarose (w/v), mixed, and  
237 placed on a slide precoated with normal melting point agarose (1% w/v), (3) a coverslip was  
238 added and the samples allowed to solidify at 4 °C, (4) coverslips were removed and slides  
239 were placed in a lysis solution (2.5 M NaCl; 100 mM EDTA, 8 mM Tris-HCl, 1% Triton X -  
240 100 pH 10-10.5), where they remained for 24 h under protection from light; (5) after lysis, the

241 slides were placed in a bucket containing neutralizing solution (400 mM Tris-HCl, pH 7.5) for  
242 15 min; (6) then, they were incubated in electrophoresis solution (300 mM NaOH, 1 mM  
243 EDTA, pH 13.5) for 20 min at 4 ° C under the condition of 25 V, 300 mA, 7W; (7) the slides  
244 were washed three times in distilled water and allowed to dry at room temperature; (8) slides  
245 were rehydrated for 3 minutes in distilled water, fixed for 10 min in 15% trichloroacetic acid,  
246 5% zinc sulfate and 5% glycerol, and then washed three times in distilled water and allowed  
247 to dry at room temperature; (9) the slides were stained with 5% sodium carbonate, 0.1%  
248 ammonium nitrate, 0.1% silver nitrate, 0.25% tungstosilicico acid and 0.15% formaldehyde;  
249 (10) staining was stopped with 1% acetic acid and air dried sheets; (11) finally, the slides  
250 were visualized and scored according to the tail length into five classes (from class 0: no  
251 damage, no tail; to class 4: maximum damage, comet without heads) under blind conditions  
252 for at least two individuals. DNA damage was expressed as DNA damage index (DI), which  
253 is based on the length of the migration. The DI was calculated from the cells in different  
254 damage classes as follows:  $DI = 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4$ , where  $n_1$ - $n_4$  denote the number of  
255 cells with the level 1-4 of damage. Methyl methanesulfonate (MMS) (20  $\mu$ M) was used as  
256 positive control while distilled water was used as negative control.

257

#### 258 *2.8. Cytotoxicity evaluation by trypan blue dye exclusion assay*

259 The cytotoxic potential effect of the extracts was performed using a modified method of  
260 [Smith et al. \(2007\)](#). Briefly, 2.5 mL of the extracts (1-480  $\mu$ g/mL) was added to 497.5 mL of  
261 leukocytes suspension and incubated in the presence or absence of hydrogen peroxide (2 mM)  
262 + azide (1 mM) at 37°C for 3 h. Fifty microliters (50  $\mu$ L) of treated leukocytes was mixed  
263 with 50  $\mu$ L of 0.4% trypan blue and allowed to stand for 5 min at room temperature. From the  
264 mixture, an aliquot of 10  $\mu$ L was checked microscopically for viability using a  
265 hemocytometer. Viability was expressed as the percentage of viable cells among the total  
266 cells.

267

#### 268 *2.9. Statistical analysis*

269 Results are expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). One or two-way analysis  
270 of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-test were used when appropriated, to  
271 assess the differences between the groups.  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

272

273

### 274 3. Results

275

#### 276 3.1. Chemical constituents of ethanolic and aqueous extracts from the leaves of *L.* 277 *montevidensis* by HPLC

278 Phenolic acids and flavonoids determined in the ethanolic (Fig. 1A) and aqueous (Fig. 1B)  
279 extracts of the leaves of *L. montevidensis* are depicted in Fig. 1. Both extracts revealed the  
280 presence of gallic acid ( $R_t = 10.05$  min, peak 1), catechin ( $R_t = 15.72$  min, peak 2),  
281 chlorogenic acid ( $R_t = 22.46$  min, peak 3), caffeic acid ( $R_t = 25.13$  min, peak 4), ellagic acid  
282 ( $R_t = 32.09$  min, peak 5), rutin ( $R_t = 39.87$  min, peak 6), quercitrin ( $R_t = 44.76$  min, peak 7),  
283 isoquercitrin ( $R_t = 45.61$  min, peak 8), quercetin ( $R_t = 49.97$  min, peak 9), kaempferol ( $R_t =$   
284  $55.02$  min, peak 10), luteolin ( $R_t = 60.23$  min, peak 11) and apigenin ( $R_t = 70.15$  min, peak  
285 12).

286 The quantitative analysis of these constituents indicate that chlorogenic acid ( $8.59 \pm 0.01$   
287 mg/g) and quercetin ( $6.03 \pm 0.01$  mg/g) were the major constituents found in the EtOH  
288 extract, while catechin ( $0.48 \pm 0.03$  mg/g) and kaempferol ( $1.57 \pm 0.02$  mg/g) were the less  
289 abundant (Table 3). Similarly, caffeic acid ( $6.25 \pm 0.01$  mg/g) and chlorogenic acid ( $6.17 \pm$   
290  $0.03$  mg/g) were the major constituents found in the aqueous extract, whereas, apigenin ( $0.86$   
291  $\pm 0.01$  mg/g) and quercitrin ( $0.71 \pm 0.01$  mg/g) were the minor (Table 3).

292

#### 293 3.2. Antioxidant activity

##### 294 3.2.1. DPPH free radical scavenging ability

295 The effect of EtOH and aqueous extracts from the leaves of *L. montevidensis* on DPPH  
296 reduction is presented in Table 4. Both extracts and the ascorbic acid used as reference,  
297 showed antioxidant activity against DPPH radical scavenging in a concentration- dependent  
298 manner. At the lowest concentration tested ( $1 \mu\text{g/mL}$ ), the radical scavenging potential of the  
299 aqueous extract ( $24.20 \pm 2.32$  %) was more pronounced, even than that of ascorbic acid ( $9.55$   
300  $\pm 2.01$  %). Based on the  $IC_{50}$  values, the ability to scavenge the DPPH free radical of the  
301 aqueous extract was two times higher than that of EtOH extract ( $108.2 \pm 3.46$  vs.  $290.5 \pm 1.97$   
302  $\mu\text{g/mL}$ ). However, ascorbic acid exhibited the highest DPPH free radical scavenging, with  
303  $IC_{50}$  of  $37.05 \pm 1.69 \mu\text{g/mL}$  (Table 4).

304

##### 305 3.2.2. Iron chelation or oxidizing effect of *L. montevidensis*

306 In this assay, the rate of the reduction in the absorbance of the orange complex formed by



307  $\text{Fe}^{2+}$  and orthophenanthroline allows estimation of a co-existent chelator. As it can be seen in  
308 Fig. 2A and 2B, EtOH (1-60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and aqueous extracts (1-60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) caused a decrease in  
309 the absorbance at 510 nm compared with  $\text{Fe}^{2+}$ . In order to investigate whether the reduction in  
310 the absorbance in the presence of extracts was attributed to  $\text{Fe}^{2+}$  chelation or oxidation,  
311 ascorbic acid (AA) was added to the reaction medium after 20 min of incubation of  $\text{Fe}^{2+}$  with  
312 the extracts and orthophenanthroline. Addition of ascorbic acid caused only a modest  
313 increase in the absorbance at 510 nm and this was a little more apparent for the aqueous  
314 extract (Fig. 2B). The most plausible interpretation of these results is that the extracts can  
315 chelate  $\text{Fe}^{2+}$  and accelerate the oxidation of  $\text{Fe}^{2+}$  to  $\text{Fe}^{3+}$ . However, this  $\text{Fe}^{3+}$  was only partially  
316 or not released from the complex; because otherwise ascorbic acid should have reduced  $\text{Fe}^{3+}$   
317 to  $\text{Fe}^{2+}$ , resulting to the formation of the complex between  $\text{Fe}^{2+}$  and ortho-phenanthroline.  
318 But, this occurred only to a limited extent.

319

### 320 3.2.3. Effect of *L. montevidensis* extracts on lipid peroxidation (LPO) induced by iron in rat 321 brain and liver homogenates

322 In the rat brain homogenate, the potential of EtOH (Fig. 3A) and aqueous (Fig. 3B) extracts to  
323 inhibit LPO was assessed by the amount of MDA produced. Both extracts caused a significant  
324 reduction in the amount of MDA produced when compared to the basal ( $p < 0.05$ ; Fig. 3A and  
325 3B). The basal inhibition with the EtOH extract was effective starting at 240  $\mu\text{g}/\text{mL}$  where its  
326 maximum effect was attained (Fig. 3A). Whereas, inhibition by the aqueous extract occurred  
327 at concentrations of 120 and 240  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Fig. 3B). There was a significant increase in the  
328 amount of MDA in  $\text{Fe}^{2+}$  (10  $\mu\text{M}$ )-induced LPO when compared with the basal, in rat brain  
329 homogenate (Fig. 3A and 2B;  $p < 0.05$ ). EtOH extract (60-480  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was effective to  
330 protect against LPO induced by  $\text{Fe}^{2+}$  in brain homogenate (Fig. 3A) when compared to iron  
331 alone. The same effect was observed in a concentration-dependent manner with aqueous (120-  
332 480  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Fig. 3B).

333 The capacity of EtOH and aqueous extracts from the leaves of *L. montevidensis* to inhibit  
334  $\text{Fe}^{2+}$ -induced lipid peroxidation was also investigated in rat liver homogenate. The use of  
335 these two tissues (brain and liver) is because they have distinct enzymes that can interact with  
336 the components of the extracts and possibly change their antioxidant activities (De Freitas and  
337 Rocha, 2011).

338 As shown in Fig. 3C and Fig. 3D respectively, EtOH (30-480  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and aqueous (60-  
339 480  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) extracts caused a significant reduction in the amount of MDA produced under

340 basal condition, when compared with the basal ( $p < 0.05$ ). As expected,  $\text{Fe}^{2+}$  (10  $\mu\text{M}$ )  
341 significantly induced LPO in the rat liver homogenate, which was evidenced by the amount of  
342 MDA produced (Fig. 3C and 3D). Treatment with both extracts protected against LPO  
343 induced by iron in a concentration dependent manner (Fig. 3C and 3D). But, the reduction in  
344 MDA produced was statistically significant only at concentrations of 240 and 480  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for  
345 both extracts (Fig. 3C and 3D).

346

### 347 3.3. Cytotoxicity and anti-cytotoxic effects of *L. montevidensis* leaf extracts

348 The potential cytotoxic effect of EtOH and aqueous extracts from the leaves of *L.*  
349 *montevidensis* was investigated in human leukocytes as well as their capacity to protect  
350 against  $\text{H}_2\text{O}_2$  cytotoxicity. As it can be observed in Fig. 4, EtOH (Fig. 4A) and aqueous (Fig.  
351 4B) extracts by themselves, caused a significant decrease in the cell viability at the higher  
352 concentrations tested (240-480  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) when compared with the control ( $p < 0.05$ ).

353 We also investigated whether these extracts could protect against the exogenous oxidative  
354 stressor,  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2mM). As expected, there was a significant decrease of cell viability (~  
355 41.43%) of leukocytes treated with  $\text{H}_2\text{O}_2$  when compared with the control ( $p < 0.05$ , Fig. 4C  
356 and 4D). Co-treatment with EtOH (Fig. 4C) or aqueous (Fig. 4D) extracts did not change  
357  $\text{H}_2\text{O}_2$  cytotoxicity ( $p > 0.05$ ).

358

### 359 3.4. Genotoxicity effect of *L. montevidensis* leaf extracts

360 Fig. 5 shows that incubation of human leukocytes with EtOH (Fig. 5A) or aqueous (Fig.  
361 5B) extracts at all the concentrations tested did not have any effect on DNA damage, when  
362 compared to the control ( $p > 0.05$ ). However, methyl methanesulfonate (MMS) used as  
363 positive control, dramatically increased the DNA damage index compared with the control ( $p$   
364  $< 0.05$ ), suggesting a possible induction of DNA single-strand breaks.

365

### 366 3.5. Effect of ethanolic and aqueous extracts on erythrocytes osmotic fragility

367 Fig. 6 shows that there was a complete hemolysis (100%) in the control group containing  
368 0% NaCl (i.e., distilled water). Treatment of human erythrocytes with EtOH (Fig. 6A) or  
369 aqueous (Fig. 6B) extracts (1-480  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) did not modify the percentage erythrocyte fragility  
370 ( $p > 0.05$ ) at different salt concentrations (0-0.9%), when compared with their respective  
371 controls.

372

#### 373 4. Discussion

374 *Lantana montevidensis* leaf extracts have been used in traditional Brazilian medicine to  
375 treat various ailments including tumor and ulcers, in which free radicals have been implicated  
376 in their etiology (Goldstein et al., 1989; Demir et al., 2003). Although *L. montevidensis* has  
377 been used in traditional medicine for the same purpose what *L. camara*, there is however, very  
378 limited studies on its pharmacological activities as well as its safety. In this context, this study  
379 aimed at investigating the antioxidant capacity of *L. montevidensis* in various assays systems,  
380 and its toxicity in human leukocytes and erythrocytes.

381 In biological system, antioxidants are extremely important due to their direct removal of  
382 pro-oxidants in order to ensure maximum protection for biological sites (Cheeseman and  
383 Slater, 1993; Kohen and Nyska, 2002; Pisoschi and Pop, 2015). Iron(II) is a potent pro-  
384 oxidant that has been found to be increased in many neurodegenerative disorders associated  
385 with oxidative stress, including Parkinson's and Alzheimer's diseases (Zecca et al., 2008;  
386 Becerril-Ortega et al., 2014). Indeed,  $Fe^{2+}$  has been extensively used *in vitro* to assess the  
387 antioxidant potential of chemicals or plant extracts, since it can induce oxidative stress via the  
388 generation of ROS (Harris et al., 1992). In the current study,  $Fe^{2+}$  caused a significant increase  
389 in the amount of malondialdehyde (MDA), one of the most abundant by-products of lipid  
390 peroxidation (LPO) generated via radical-initiated oxidative decomposition of  
391 polyunsaturated fatty acid (Singh et al., 2015). Interestingly, EtOH and aqueous extracts from  
392 the leaves of *L. montevidensis* efficiently inhibited  $Fe^{2+}$ -induced LPO in rat brain and liver  
393 homogenates. This results suggests that the components of both extracts may have interacted  
394 with free radicals or chelated free iron, thereby, rendering it unavailable for the Fenton  
395 processes. Our results are in agreement with that of Sousa et al. (2015) who showed that leaf  
396 and root extracts of *L. montevidensis* inhibit  $Fe^{2+}$ -induced LPO in egg phospholipids.

397 The biological activity of transition metals such as iron is associated with the presence of  
398 unpaired electrons that favor their participation in redox reaction (Repetto et al., 2010). For  
399 instance, they can participate in the initiation step of LPO, DNA assault and oxidative stress  
400 through metal-catalyzed reactions (Aboul-Ela et al., 2011; Pratviel, 2012; Repetto et al., 2012;  
401 Aitken et al., 2014). Here, we have investigated the  $Fe^{2+}$ -chelating ability of EtOH and  
402 aqueous extracts of *L. montevidensis*. The results demonstrated that both extracts did not  
403 chelate  $Fe^{2+}$ , suggesting that their antioxidant capacity observed against LPO seems to be  
404 associated with direct action with free radicals and not  $Fe^{2+}$  chelation.

405 The free radical scavenging activity of EtOH and aqueous extracts was evaluated by the

406 DPPH assay. In this assay, the purple color of the DPPH is changed to the yellow color in the  
407 presence of hydrogen donating antioxidant. Thus, the more yellowish color of DPPH  
408 observed, the greater is the antioxidant activity of the tested compound/extract. Both extracts  
409 caused a concentration dependent reduction in the color of DPPH radical, suggesting their  
410 hydrogen donating ability. However, aqueous extract exhibited a higher DPPH radical  
411 scavenging activity than EtOH extract. The difference in this activity may be explained by the  
412 ability of the aqueous extract to quickly donate hydrogen atoms to the DPPH radical than the  
413 EtOH extract. It has been postulated that molecules that can donate hydrogen atoms to  
414 damaged molecules can be considered as repair compounds (Kohen and Nyska, 2002). Thus,  
415 it is possible to extrapolate that the donation of hydrogen atoms by EtOH and aqueous  
416 extracts to fatty acid radical which was previously attacked by a radical (and lost its  
417 hydrogen) in the Fe<sup>2+</sup>-induced LPO, has contributed to limit the damages or inhibit LPO.

418 The exceptional growth of human exposure to natural products particularly from plants  
419 origin has led to the resurgence of the scientific interest in their biological activities, with  
420 emphasis on their toxicological evaluations in order to ascertain their safety (Kamdem et al.,  
421 2013; Barbosa-Filho et al., 2014; Waczuck et al., 2015; Duarte et al., 2016). Substantial  
422 evidence from the literature reveal that plants used in traditional medicine or as food can have  
423 mutagenic, cytotoxic and genotoxic effects *in vitro* and *in vivo* assays (Zink and Chaffin,  
424 1998; Celik, 2012). Here, the effect of EtOH and aqueous extracts of *L. montevidensis* on  
425 DNA of human leukocytes was evaluated by the comet assay, which is regarded as a valuable  
426 biomarker of genotoxicity (Tice et al., 2000; Matic et al., 2013). We found that both extracts  
427 (1-480 µg/mL) did not have genotoxic affect in relation to the control. However, at the higher  
428 concentrations tested (240-480 µg/mL), they showed a slight cytotoxic effect. Although we  
429 have not identified the constituent (s) responsible for the cytotoxic effect, some of the  
430 compounds identified including rutin, quercetin and kaempferol have been shown to have  
431 toxic effects at relatively high concentrations (Soares et al., 2006). Consequently, it is  
432 possible to presume that the DNA damage evaluated by the comet assay can occur in parallel  
433 or not with the toxicity detected as decreased survival (by Trypan blue). Despite the fact that  
434 it is difficult to translate the *in vitro* results obtained here to a real *in vivo* situation, our  
435 findings suggest that caution should be taken regarding the dosage and the frequency use of *L.*  
436 *montevidensis* in the traditional medicine.

437 Exposure of human erythrocytes to phytotherapeutic products can influence erythrocyte  
438 membrane integrity making the cells more fragile and labile to damage (Rizvi and Srivastava,



439 1999; Mpiana et al., 2010). In the present study, osmotic fragility was used as a useful  
440 cytotoxic indicator to evaluate the interactions of *L. montevidensis* extracts with the cell  
441 membrane *in vitro*. However, *L. montevidensis* extracts did not have any effect on the osmotic  
442 fragility of erythrocytes, suggesting that the antioxidant defense systems of the erythrocytes  
443 may have contributed to protect the cell membranes.

444 The chemical composition of *L. montevidensis* extracts showed the presence of  
445 polyphenolic compounds (phenolic acids and flavonoids). Their long-term consumption has  
446 been shown to be associated with reduced risk of cardiovascular diseases, neurodegenerative  
447 diseases, cancer and diabetes among others in epidemiological studies (Qiao et al., 2014; Lall  
448 et al., 2015). Therefore, the action of these phytochemicals alone or synergistically could be  
449 responsible for radical scavenging activity and the prevention of LPO observed in this study.

450

## 451 **5. Conclusions**

452 Overall, the present study investigated for the first time the toxicity of ethanolic and  
453 aqueous extracts from the leaves of *L. montevidensis* in human cells, and their antioxidant  
454 activity in various assays systems. Exposure of human leukocytes to higher concentrations of  
455 both extracts (240-480 µg/mL) caused cytotoxicity, without any sign of DNA damage,  
456 indicating that caution should be exercised regarding the dosage and frequency use of *L.*  
457 *montevidensis* in traditional medicine. However, treatment of human erythrocytes with both  
458 extracts (1-480 µg/mL) did not have any effect on erythrocytes membranes. Ethanolic and  
459 aqueous extracts exhibited strong antioxidant activity as evidenced by their DPPH radical  
460 scavenging activity and their efficacy to inhibit lipid peroxidation in rat brain and liver  
461 homogenates. These effects can be attributed to the presence of bioactive phytochemicals  
462 found in *L. montevidensis*, and may therefore justify its pharmacological use in folk medicine.

463

## 464 **Acknowledgement**

465 LMB is particularly grateful to the CAPES/DINTER/URCA-UFSM Program. JPK  
466 acknowledge the financial support of CAPES, CNPq, TWAS, and CNPq-TWAS.

467

## 468 **Conflict of interest**

469 The authors declare no conflict of interest with any person or any organization.

470

471 **References**

- 472 Aboul-Ela, H.M., Saad, A.A., El-Sikaily, A.M., Zaghloul, T.I. 2011. Oxidative stress and  
473 DNA damage in relation to transition metals overload in Abu-Qir Bay, Egypt. *J. Genet. Eng.*  
474 *Biothechnol.* 9, 51-58.
- 475 Aitken, R. J., Finnie, J. M., Muscio, L., Whiting, S., Connaughton, H. S., Kuczera, L.,  
476 Rothkirch, T.B., De Iuliis, G. N. 2014. Potential importance of transition metals in the  
477 induction of DNA damage by sperm preparation media. *Hum. Reprod.* 29, 2136-2147.
- 478 Barbosa Filho, V. M., Waczuk, E. P., Kamdem, J. P., Abolaji, A. O., Lacerda, S. R., da Costa,  
479 J. G. M., Menezes, I.R.A., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Rocha, J.B.T., Posser, T. 2014.  
480 Phytochemical constituents, antioxidant activity, cytotoxicity and osmotic fragility effects of  
481 *Caju (Anacardium microcarpum)*. *Ind Crops Prod.* 55, 280-288.
- 482 Barreto, F. S., Sousa, E. O., Rodrigues, F. F. G., Costa, J. G. M., and Campos, A. R. 2010.  
483 Antibacterial activity of *Lantana camara* Linn *Lantana montevidensis* Brig extracts from  
484 cariri-Ceara, Brazil. *J. Young Pharm.* 2, 42-44.
- 485 Barros, L.M., Duarte, A.E., Morais-Braga, M.F.B., Waczuk, E.P., Vega, C., Leite, N.F.,  
486 Menezes, I.R.A., Coutinho, H.D.M., Rocha, J.B.T., Kamdem, J.P. 2016. Chemical  
487 characterization and trypanocidal, leishmanicidal and cytotoxicity potential of *Lantana*  
488 *camara* L. (Verbenaceae) essential oil. *Molecules* 21, 209.
- 489 Becerril-Ortega, J., Bordji, K., Fréret, T., Rush, T., Buisson, A. 2014. Iron overload  
490 accelerates neuronal amyloid- $\beta$  production and cognitive impairment in transgenic mice  
491 model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 35, 2288-2301.
- 492 Boligon, A. A., Kubiça, T. F., Mario, D. N., de Brum, T. F., Piana, M., Weiblen, R., Athayde,  
493 M. L. 2013. Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia*  
494 Reissek extracts. *Acta Physiol. Plant.* 35, 2229-2239.
- 495 Celik, T. A. 2012. Potential genotoxic and cytotoxic effects of plant extracts. *A Compendium*  
496 *of Essays on Alternative Therapy.* p233-250.
- 497 Cheeseman, K. H., Slater, T. F. 1993. An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med.*  
498 *Bull.* 49, 481-493.
- 499 Collins, A. R. 2014. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay.  
500 *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 794-800.
- 501 Colpo, E., Vilanova, C. D. D., Reetz, L. G. B., Duarte, M. M., Farias, I. L. G., Meinerz, D. F.,  
502 da Rocha, J. B. T. 2014. Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves  
503 inflammatory parameters. *Nutrition* 30, 459-465.
- 504 De Freitas, A. S., Rocha, J. B. T. 2011. Diphenyl diselenide and analogs are substrates of  
505 cerebral rat thioredoxin reductase: a pathway for their neuroprotective effects. *Neurosci. Lett.*  
506 503, 1-5.
- 507 Demir, S., Yilmaz, M., Koseoglu, M., Akalin, N., Aslan, D., Aydin, A. 2003. Role of free  
508 radicals in peptic ulcer and gastritis. *Turk. J. Gastroenterol.* 14, 39-43.
- 509 Duarte, A.E., Waczuk, E.P., Roversi, K., Silva, M.A.P.S., Barros, L.M., Cunha, F.A.B.,  
510 Menezes, I.R.A., Costa, J.G.M., Boligon, A.A., Ademiluyi, A.O., Kamdem, J.P., Rocha,

- 511 J.B.T., Burger, M.E. 2016. Polyphenolic composition and evaluation of antioxidant activity,  
512 osmotic fragility and cytotoxic effects of *Raphiodon echinus* (Nees & Mart.) Schauer.  
513 *Molecules* 21, 2.
- 514 Ghisalberti, E. L. 2000. *Lantana camara* L.(verbenaceae). *Fitoterapia* 71, 467-486.
- 515 Godal, H. C., Heistø, H. 1981. High prevalence of increased osmotic fragility of red blood  
516 cells among Norwegian blood donors. *Scand. J. Haematol.* 27, 30-34.
- 517 Goldstein B.D., Czerniecki B., Witz, G. 1989. The role of free radicals in tumor promotion.  
518 *Environ. Health Perspect.* 81, 55-57.
- 519 Harris, M. L., Schiller, H. J., Reilly, P. M., Donowitz, M., Grisham, M. B., Bulkley, G. B.  
520 1992. Free radicals and other reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease:  
521 cause, consequence or epiphenomenon?. *Pharmacol. Ther.* 53, 375-408.
- 522 Hashimoto, G. 1996. *Illustrated Cyclopedia of Brazilian Medicinal Plants*. Aboc-sha., pp.  
523 1194-1198.
- 524 Kalita, S., Kumar, G., Karthik, L., Rao, K.V.B. 2012. A review on medicinal properties of  
525 *Lantana camara* Linn. *Res. J. Pharm. Tech.* 5, 711-715.
- 526 Kamdem, J. P., Stefanello, S. T., Boligon, A. A., Wagner, C., Kade, I. J., Pereira, R. P., Preste  
527 Ade, S., Roos, D.H., Waczuk, E.P., Appel, A.S., Athayde, M.L., Souza, D.O., Rocha, J. B. T.  
528 2012. *In vitro* antioxidant activity of stem bark of *Trichilia catigua* Adr. Juss. *Acta Pharm.* 62,  
529 371-382.
- 530 Kamdem, J. P., Olalekan, E. O., Hassan, W., Kade, I. J., Yetunde, O., Boligon, A. A.,  
531 Athayde, M.L., Souza, D.O., Rocha, J. B. T. 2013. *Trichilia catigua* (Catuaba) bark extract  
532 exerts neuroprotection against oxidative stress induced by different neurotoxic agents in rat  
533 hippocampal slices. *Ind. Crops Prod.* 50, 625-632.
- 534 Kohen, R., Nyska, A. 2002. Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress  
535 phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol.*  
536 *Pathol.* 30, 620-650.
- 537 Lall, R. K., Syed, D. N., Adhami, V. M., Khan, M. I., Mukhtar, H. 2015. Dietary polyphenols  
538 in prevention and treatment of prostate cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 3350-3376.
- 539 Makboul, M. A., Attia, A. A., Farag, S. F., Mohamed, N. M. 2013. Investigation of essential  
540 oil and biological activities of *Lantana montevidensis* (Spreng.) Briq. cultivated in *Egypt*. *J.*  
541 *Nat. Pharmaceut.* 4, 13–20.
- 542 Matić, S., Stanić, S., Bogojević, D., Vidaković, M., Grdović, N., Dinić, S., Solujić, S.,  
543 Mladenovic, M., Stanković, M., Mihailović, M. 2013. Methanol extract from the stem of  
544 *Cotinus coggygria* Scop., and its major bioactive phytochemical constituent myricetin  
545 modulate pyrogallol-induced DNA damage and liver injury. *Mutat. Res.* 755, 81-89.
- 546 Mpiana, P. T., Ngbolua, K. N. N., Bokota, M. T., Kasonga, T. K., Atibu, E. K., Tshibangu, D.  
547 S., Mudogo, V. 2010. *In vitro* effects of anthocyanin extracts from *Justicia secunda* Vahl on  
548 the solubility of haemoglobin S and membrane stability of sickle erythrocytes. *Blood*  
549 *Transfus.* 8, 248-254.
- 550 Munir, A. A. 1996. Chemical constituents of *Lantana* species. *J. Adel. Bot. Gard.* 17, 1-5.

- 551 Nagão, T., Abe, F., Kinjo, J., Okabe, H. 2002. Antiproliferative constituents in Plants. 10.  
552 Flavones from the leaves of *Lantana montevidensis* Briq. and consideration of structure-  
553 activity relationship. Biol. Pharm. Bull. 25, 875-879.
- 554 Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by  
555 thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 95, 351-358.
- 556 Pass, M. A. 1991. Poisoning of Livestock by. Handbook of Natural Toxins: Toxicology of  
557 Plant and Fungal Compounds, New York: Marcel Dekker 6: 297-311.
- 558 Pisoschi, A. M., Pop, A. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A  
559 review. Eur. J. Med. Chem. 97, 55-74.
- 560 Pratiel, G. 2012. Oxidative DNA damage mediated by transition metal ions and their  
561 complexes. Met Ions Life Sci. 10, 201-216.
- 562 Qiao, J., Kong, X., Kong, A., Han, M. 2014. Pharmacokinetics and biotransformation of tea  
563 polyphenols. Curr. Drug Metab. 15, 30-36.
- 564 Repetto, M. G., Ferrarotti, N. F., Boveris, A. 2010. The involvement of transition metal ions  
565 on iron-dependent lipid peroxidation. Arch. Toxicol. 84, 255-262.
- 566 Repetto, M., Boveris, A., Semprine, J. 2012. Lipid peroxidation: chemical mechanism,  
567 biological implications and analytical determination. INTECH Open Access Publisher. Book  
568 Chapter 1, in Biochemistry, Genetics and Molecular Biology, edited by Angel Catala. Doi:  
569 10.5772/45943.
- 570 Rizvi, S. I., Srivastava, P. P. 1999. Protective effect of capsaicin on the osmotic fragility of  
571 human erythrocytes. Indian J. Exp. Biol. 37, 835-836.
- 572 Rodrigo, R., Fernandez-Gajardo, R., Gutierrez, R., Manuel Matamala, J., Carrasco, R.,  
573 Miranda-Merchak, A., and Feuerhake, W. 2013. Oxidative stress and pathophysiology of  
574 ischemic stroke: novel therapeutic opportunities. CNS Neurol. Disord. Drug Targets 12, 698-  
575 714.
- 576 Seawright, A. A., Everist, S. L., Hrdlicka, J. 1983. Comparative features of *Lantana*,  
577 *Myoporum* and *Pimelea* toxicities in livestock. Plant fungal Toxins, pp. 511-541.
- 578 Sharma, O.P., Makkar, H.P.S., Dawra, R.K. 1988. A review of the noxious plant *Lantana*  
579 *camara*. Toxicon 26, 975-987.
- 580 Singh, M., Kapoor, A., Bhatnagar, A. 2015. Oxidative and reductive metabolism of lipid-  
581 peroxidation derived carbonyls. Chem. Biol. Interact. 234, 261-273.
- 582 Smith, J. G., Joseph, H. R., Green, T., Field, J. A., Wooters, M., Kaufhold, R. M., Antonello,  
583 J., Caulfield, M. J. 2007. Establishing acceptance criteria for cell-mediated-immunity assays  
584 using frozen peripheral blood mononuclear cells stored under optimal and suboptimal  
585 conditions. Clin Vaccine Immunol. 14, 527-537.
- 586 Soares, V. C. G., Varanda, E. A., Raddi, M. S. G. 2006. *In vitro* basal and metabolism-  
587 mediated cytotoxicity of flavonoids. Food Chem. Toxicol. 44, 835-838.
- 588 Sousa, E. O., Almeida, T. S., Rodrigues, F. F., Campos, A. R., Lima, S. G., Costa, J. G. 2011.  
589 *Lantana montevidensis* Briq improves the aminoglycoside activity against multiresistant

- 590 *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Indian J. Pharmacol.* 43, 180–182.
- 591 Sousa, E. O., Barreto, F. S., Rodrigues, F. F., Campos, A. R., Costa, J. G. 2012. Chemical  
592 composition of the essential oils of *Lantana camara* L. and *Lantana montevidensis* Briq. and  
593 their synergistic antibiotic effects on aminoglycosides. *J. Essent. Oil Res.* 24, 447-452.
- 594 Sousa, E. O., Rodrigues, F. F. G., Campos, A. R., Lima, S. G., da Costa, J. G. M. 2013.  
595 Chemical composition and synergistic interaction between aminoglycosides antibiotics and  
596 essential oil of *Lantana montevidensis* Briq. *Nat. Prod. Res.* 27, 942-945.
- 597 Sousa, E. O., Miranda, C. M., Nobre, C. B., Boligon, A. A., Athayde, M. L., Costa, J. G.  
598 2015. Phytochemical analysis and antioxidant activities of *Lantana camara* and *Lantana*  
599 *montevidensis* extracts. *Ind. Crops Prod.* 70, 7-15.
- 600 Taylor, S., Kumar, L., Reid, N., Kriticos, D. J. 2015. Climate change and the potential  
601 distribution of an invasive shrub, *Lantana camara* L. *Plos One* 7: e35565.
- 602 Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Sasaki,  
603 Y. F. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology  
604 testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206-221.
- 605 Tokarnia C.H., Döbereiner J., Lazzari A.A., Peixoto P.V. 1984. Intoxicação por *Lantana* spp.  
606 (Verbenaceae) em bovinos nos Estados de Mato Grosso e Rio de Janeiro. *Pesq. Vet. Bras.* 4,  
607 129-141.
- 608 Tokarnia, C. H., Armien, A. G., Barros, S. S. D., Peixoto, P. V., Döbereiner, J. 1999. Estudos  
609 complementares sobre a toxidez de *Lantana camara* (Verbenaceae) em bovinos. *Pesq. Vet.*  
610 *Bras.* 19, 128-132.
- 611 Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., Mahajan, R. T. 2009. Oxidative stress and  
612 neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic  
613 options. *Curr. Neuropharmacol.* 7, 65-74.
- 614 Visconti, R., Grieco, D. 2009. New insights on oxidative stress in cancer. *Curr. Opin. Drug*  
615 *Discov. Devel.* 12, 240-245.
- 616 Waczuk, E. P., Kamdem, J. P., Abolaji, A. O., Meinerz, D. F., Bueno, D. C., do Nascimento  
617 Gonzaga, T. K. S., do Canto Dorow, T.S., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Rocha, J.B.T.,  
618 Ávila, D.S. 2015. *Euphorbia tirucalli* aqueous extract induces cytotoxicity, genotoxicity and  
619 changes in antioxidant gene expression in human leukocytes. *Toxicol. Res.* 4, 739-748.
- 620 Wollenweber, E., Dörr, M., Muniappan, R., Siems, K. 1997. Flavonoid aglycones and  
621 triterpenoids from the leaf exudate of *Lantana camara* and *Lantana montevidensis*. *Biochem.*  
622 *System. Ecol.* 25, 269-270.
- 623 Zecca, L., Casella, L., Albertini, A., Bellei, C., Zucca, F. A., Engelen, M., Szewczyk, G.,  
624 Zareba, M., Sarna, T. 2008. Neuromelanin can protect against iron-mediated oxidative  
625 damage in system modeling iron overload of brain aging and Parkinson's disease. *J.*  
626 *Neurochem.* 106, 1866-1875.
- 627 Zink, T., Chaffin, J. 1998. Herbal 'health' products: What family physicians need to know.  
628 *Am. Fam. Physician* 58, 1133-1140.  
629



630 **Table captions**

631

632 **Table 1-** Calibration curve of the standards used in the analysis.

Standard	Retention time (R <sub>t</sub> , min)	Calibration Equation	Correlation coefficient (r <sup>2</sup> )
Gallic acid	Rt = 10.05	Y = 13062x + 1238.9	r = 0.9995
Catechin	Rt = 15.72	Y = 12594x + 1195.7	r = 0.9999
Chlorogenic acid	Rt = 22.46	Y = 13584x + 1309.6	r = 0.9997
Caffeic acid	Rt = 25.13	Y = 11893x + 1270.4	r = 0.9999
Ellagic acid	Rt = 32.09	Y = 12537x + 1179.5	r = 0.9996
Rutin	Rt = 39.87	Y = 13015x + 1328.7	r = 0.9995
Quercitrin	Rt = 44.76	Y = 11854x + 1371.9	r = 0.9998
Isoquercitrin	Rt = 45.61	Y = 13476x + 1189.3	r = 0.9994
Quercetin	Rt = 49.97	Y = 12065x + 1249.5	r = 0.9997
Kaempferol	Rt = 55.02	Y = 11968x + 1251.3	r = 0.9999
Luteolin	Rt = 60.23	Y = 12407x + 1294.8	r = 0.9993
Apigenin	Rt = 70.15	Y = 11704x + 1256.1	r = 0.9998

633 All chromatography operations were carried out at ambient temperature and in triplicate.

634

635

636

637 **Table 2-** Schedule of evaluation of oxidation or chelation of Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> by plant extracts.

Time	Sequence of addition	Reading at 510 nm
0 min	Extract (1-60 µg/mL) FeSO <sub>4</sub> (110 µM)	-
10 min	Ortho-phenanthroline (0.25%)	-
10 min	Immediately after mixing with ortho-phenanthroline	First reading (0 min)
20 min	-	Second reading (10 min)
30 min	-	Third reading (20 min)
30 min	Ascorbic acid (AA, final concentration, 5 mM)	-
35 min	-	First reading after AA (25 min)
40 min	-	Second reading after AA (30 min)
50 min	-	Third reading after AA (40 min)

638

639

640

641 **Table 3-** Quantitative analysis of phenolics and flavonoids from the ethanolic and aqueous  
 642 leaves extracts of *L. montevidensis*

Compounds	Ethanolic	Aqueous	LOQ	LOD
	mg/g	mg/g	g/mL	g/mL
Gallic acid	5.61 ± 0.02	2.83 ± 0.01	0.015	0.053
Catechin	0.48 ± 0.03	1.59 ± 0.01	0.026	0.084
Chlorogenic acid	8.59 ± 0.01	6.17 ± 0.03	0.009	0.031
Caffeic acid	4.73 ± 0.02	6.25 ± 0.01	0.018	0.059
Ellagic acid	1.62 ± 0.01	2.73 ± 0.02	0.013	0.049
Rutin	5.78 ± 0.01	2.68 ± 0.01	0.032	0.105
Quercitrin	5.16 ± 0.02	0.71 ± 0.01	0.007	0.023
Isoquercitrin	2.81 ± 0.03	4.05 ± 0.03	0.025	0.079
Quercetin	6.03 ± 0.01	2.59 ± 0.02	0.010	0.034
Kaempferol	1.57 ± 0.02	0.83 ± 0.01	0.023	0.064
Luteolin	2.96 ± 0.01	2.70 ± 0.01	0.017	0.053
Apigenin	2.08 ± 0.01	0.86 ± 0.01	0.011	0.037

643 Results are expressed as mean ± S.E.M of three determinations. Averages followed by  
 644 different letters in the same column are significantly different by Tukey test ( $p < 0.05$ ). LOD-  
 645 limit of detection, LOQ-limit of quantification.  
 646  
 647  
 648  
 649  
 650  
 651

652 **Table 4-** Percent inhibition of DPPH radical by EtOH and aqueous extracts from the leaves of  
 653 *L. montevidensis*

Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	EtOH extract	Aqueous extract	Ascorbic acid
1	7.48 ± 0.73	24.20 ± 2.32	9.55 ± 2.01
10	-	-	23.35 ± 0.34
30	11.84 ± 1.15	36.46 ± 1.85	38.64 ± 0.38
50	-	-	57.93 ± 1.77
60	19.19 ± 1.90	47.86 ± 5.65	-
100	-	-	73.64 ± 0.47
120	23.88 ± 1.22	54.12 ± 5.3	-
240	41.92 ± 2.79	62.46 ± 4.65	-
400	-	-	89.81 ± 0.71
480	82.35 ± 0.88	73.21 ± 2.12	-
<b>IC<sub>50</sub> (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>290.5 ± 1.97</b>	<b>108.2 ± 3.46</b>	<b>37.05 ± 1.69</b>

654 Results are expressed as mean ± SEM ( $n = 4$ ). Means with different letters are in the same  
 655 line differ significantly from each other.  
 656  
 657  
 658  
 659

660 **Figures Caption**

661 **Fig. 1.** Phenolics and flavonoids constituents of ethanolic (A) and aqueous (B) extracts from  
 662 the leaves of *L. montevidensis* by high performance liquid chromatography (HPLC). Gallic  
 663 acid (peak 1), catechin (peak 2), chlorogenic acid (peak 3), caffeic acid (peak 4), ellagic acid  
 664 (peak 5), rutin (peak 6), quercitrin (peak 7), isoquercitrin (peak 8), quercetin (peak 9),  
 665 kaempferol (peak 10), luteolin (peak 11) and apigenin (peak 12). The retention time of each  
 666 compound is shown in [Table 1](#).

667 **Fig. 2.** Oxidation of  $Fe^{2+}$  by EtOH (A) and aqueous (B) extracts from the leaves of *L.*  
 668 *montevidensis*. The extracts (1-60  $\mu$ g/mL) were incubated with  $FeSO_4$  (110  $\mu$ M) for 10 min.  
 669 The extracts (1-60  $\mu$ g/mL) were incubated with  $FeSO_4$  (110  $\mu$ M) for 10 min. Then,  
 670 orthophenanthroline was added and the absorbance of the reaction mixture was measured at 0,  
 671 10 and 20 min following its addition. After the last reading (at 20 min), 5 mM ascorbic acid  
 672 (AA) was added to the reaction mixture, and the absorbance was read again after 5 min (at 25  
 673 min), 10 min (at 30 min) and 20 min (at 40 min) (see [Table 1](#) for details). Values represent the  
 674 mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments performed in duplicate.

675 **Fig. 3.** Inhibitory potential of EtOH and aqueous extracts from the leaves of *L. montevidensis*  
 676 on  $Fe^{2+}$ -induced lipid peroxidation in rat brain (A and B) and liver (C and D) homogenates.  
 677 The results are expressed as mean  $\pm$  SEM of  $n = 3$  independent experiment performed in  
 678 duplicate. \* $p < 0.05$  vs. basal; and #  $p < 0.05$  vs  $Fe^{2+}$ .

679 **Fig 4.** Effect of ethanolic and aqueous extracts from the leaves of *L. montevidensis* on human  
 680 leukocytes in the absence (A and B) and presence (C and D) of  $H_2O_2$ . The results are  
 681 expressed as percentage of control. Each column represent the mean  $\pm$  SEM of four  
 682 independent. \* $p < 0.05$  versus control, ns-not significant.

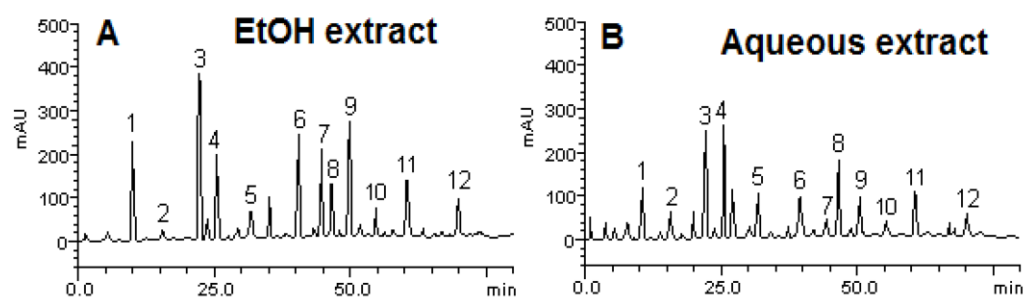
683 **Fig. 5.** Genotoxicity evaluation of ethanolic (A) and aqueous (B) extracts from the leaves of  
 684 *L. montevidensis* by the Comet assay. MMS-methyl methanesulfonate. Results are mean  $\pm$   
 685 SEM of three independent experiments. \* $p < 0.05$  vs. control.

686 **Fig. 6.** Osmotic fragility of erythrocytes treated with EtOH (A) and aqueous (B) extracts from  
 687 the leaves of *L. montevidensis*. Hemolysis was expressed in percentage of the positive control  
 688 (Triton-100). Treated erythrocytes were added to various concentrations of NaCl (0–0.9%)  
 689 and incubated for 20 min and the absorbance of the supernatants were measured at 540 nm.  
 690 The bars represent the means of  $n = 3$  independent experiments performed in duplicate.

691  
 692  
 693  
 694  
 695  
 696  
 697  
 698  
 699  
 700  
 701  
 702  
 703

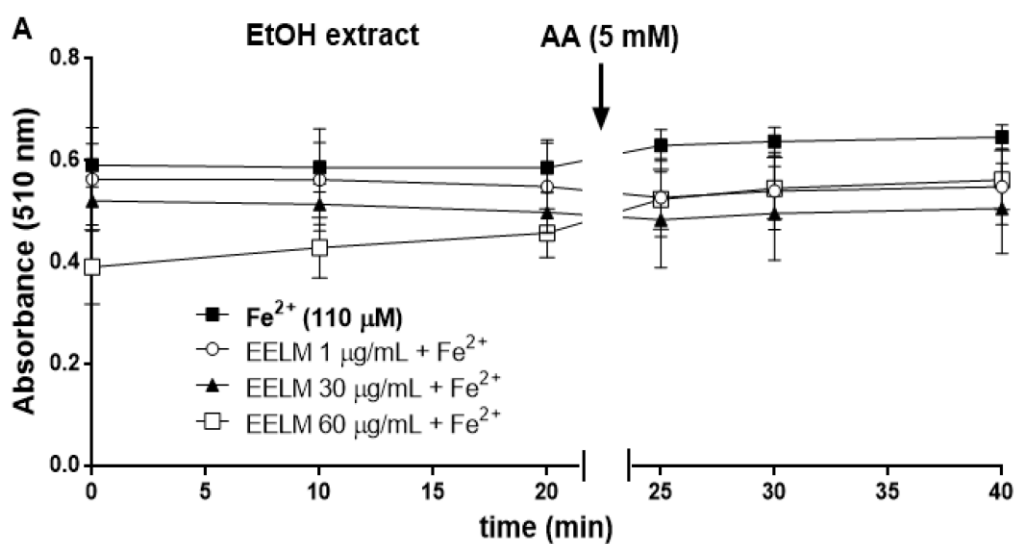


704 Fig. 1.  
705



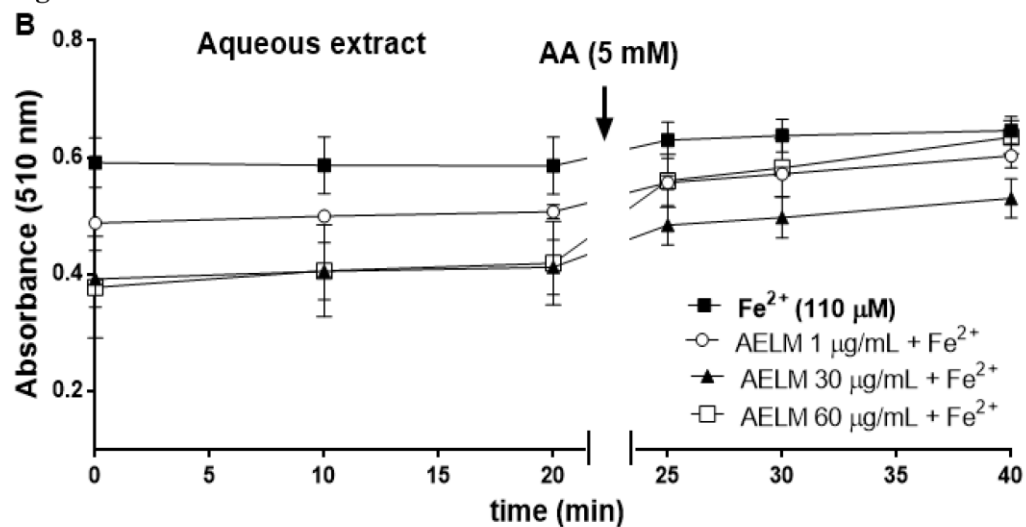
706  
707  
708  
709  
710

Fig. 2A



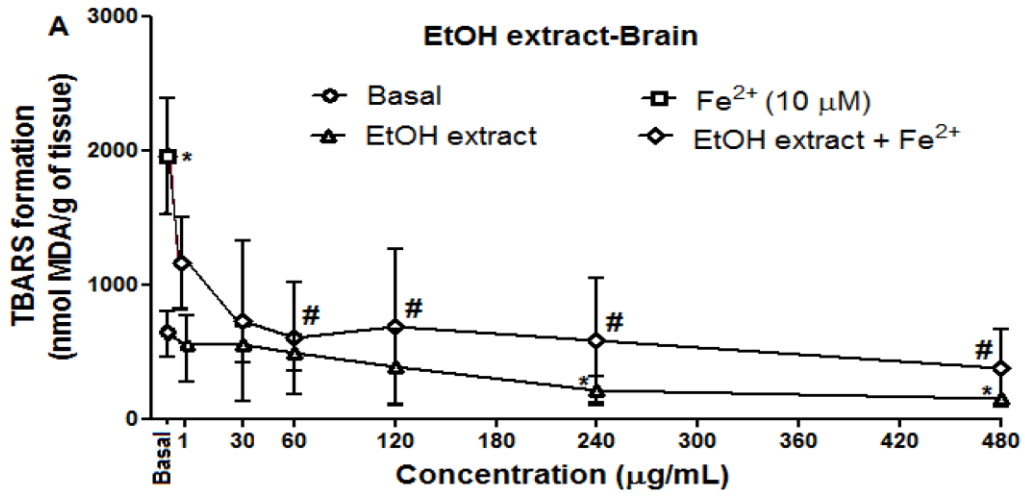
711  
712  
713  
714

Fig. 2B



715  
716  
717  
718

719 Fig. 3A

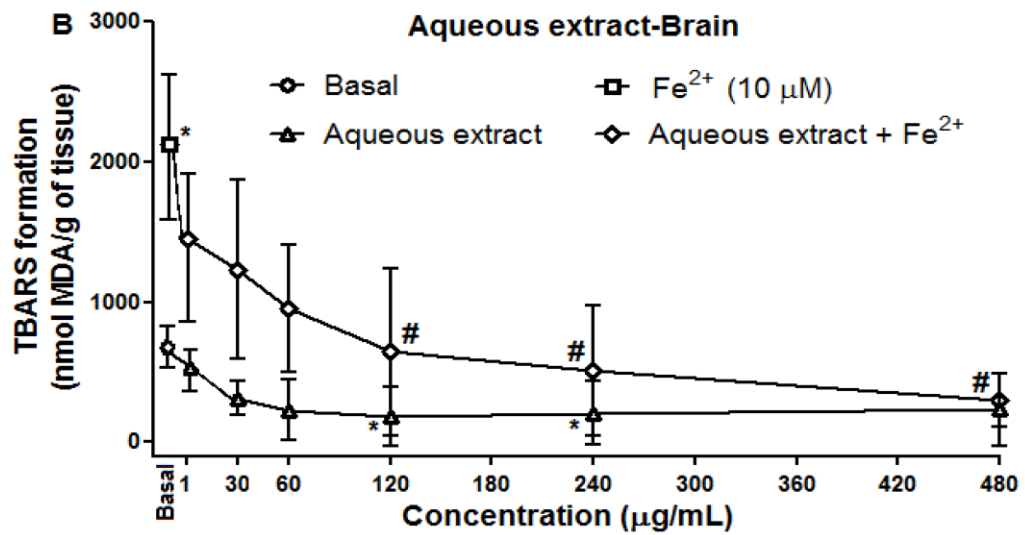


720

721

722

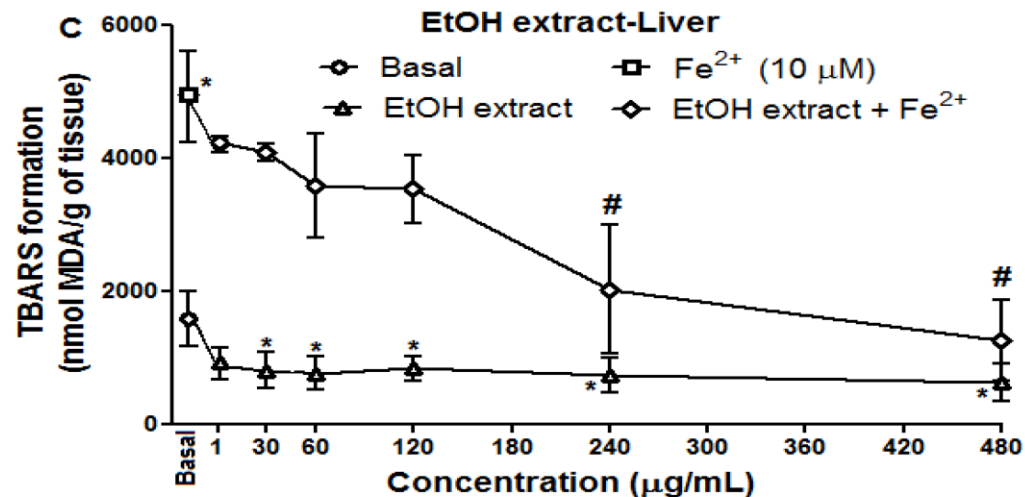
723 Fig. 3B



724

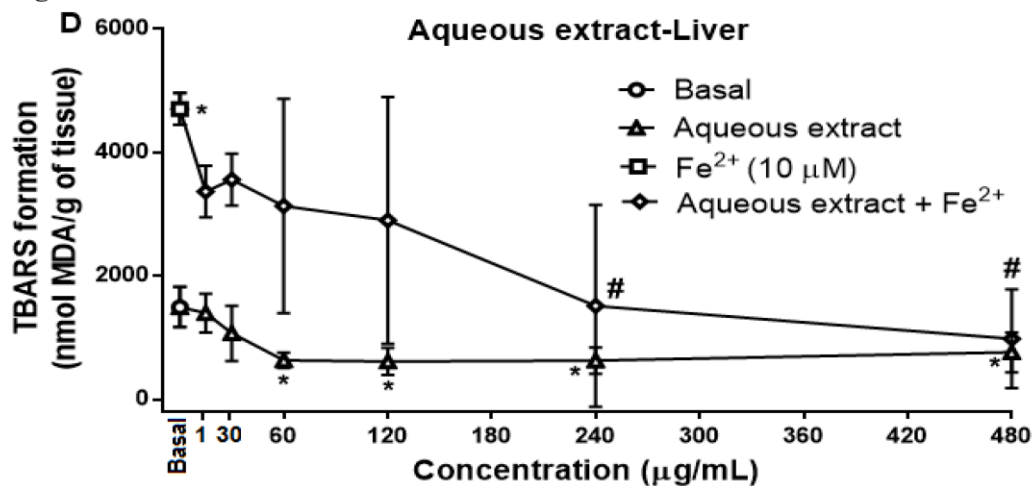
725

726 Fig. 3C



727

728 Fig. 3D



729  
730  
731

Fig. 4A

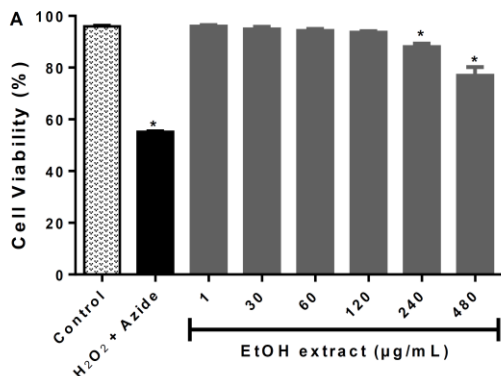


Fig. 4B

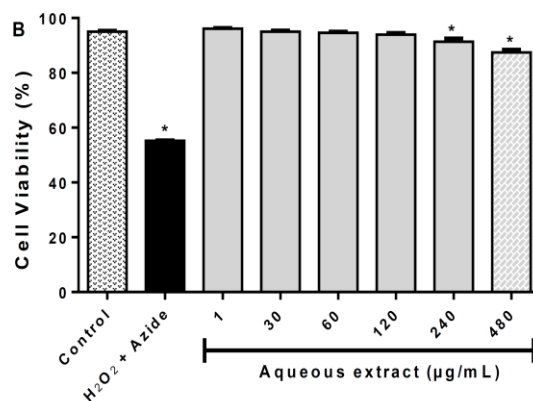


Fig. 4C

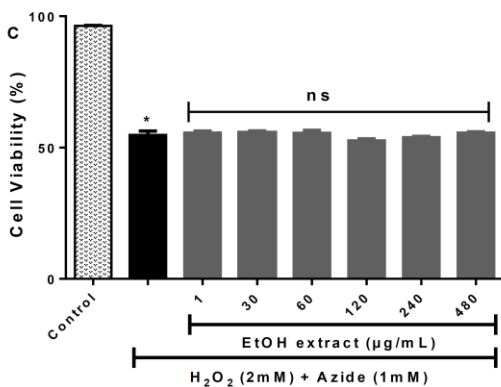
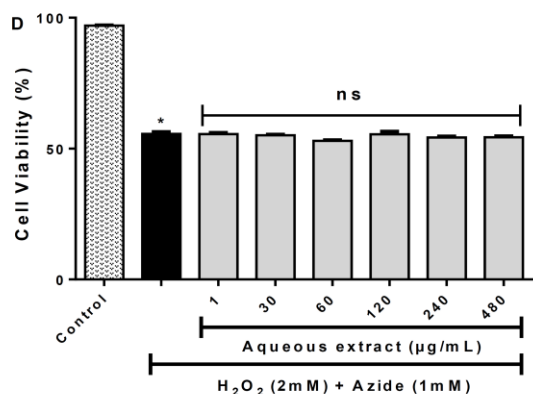


Fig. 4D



732  
733  
734  
735  
736

Fig. 5A

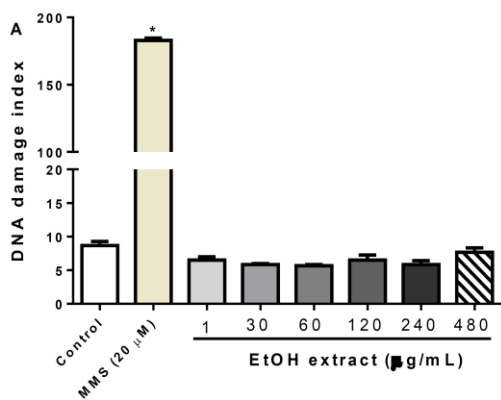
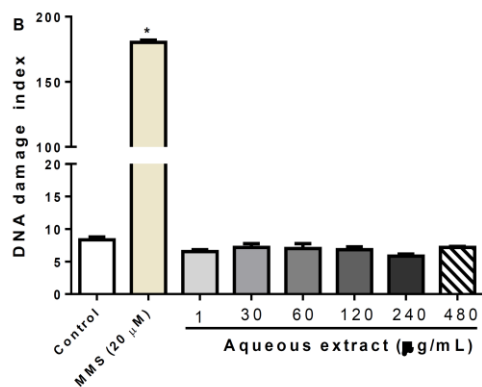


Fig. 5B

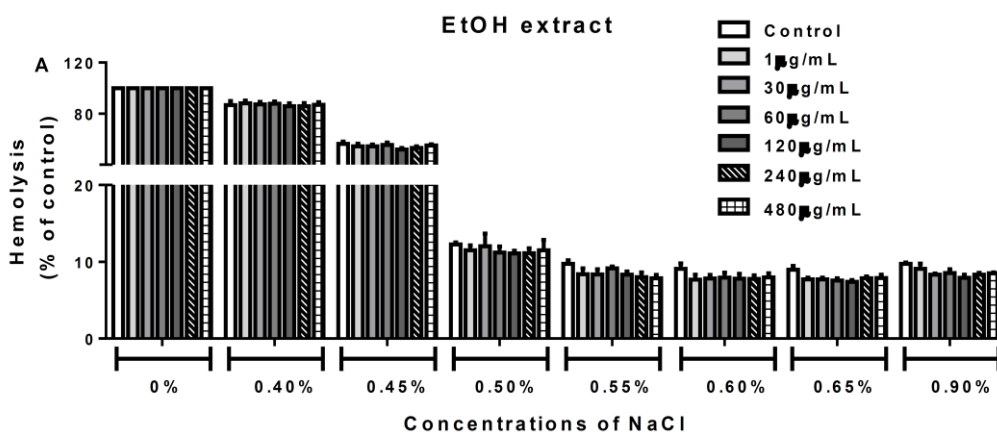


737

738

739

Fig. 6A



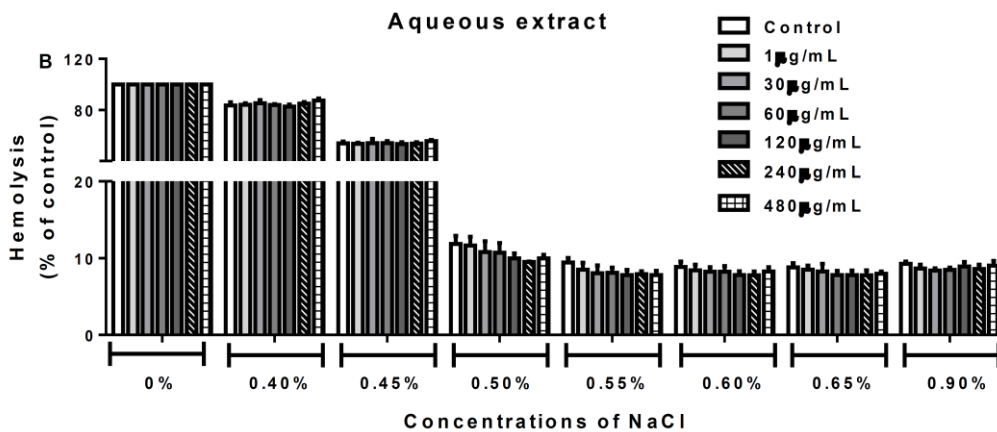
740

741

742

743

Fig. 6B



744

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo evidenciam a relevância de modelos *in vitro* na avaliação da toxicidade de produtos naturais, em duas espécies do gênero *Lantana*.

Neste estudo, foi abordado o potencial citotóxico e antiparasitário do óleo essencial de *Lantana camara*, além de caracterizá-lo quimicamente. A ação tripanocida de plantas já foram descritas em estudos realizados por (FIGUEIREDO et al., 2014; BEZERRA et al., 2012). O aumento do número de pessoas infectadas com doenças negligenciadas, tais como (Leishmaniose e Doença de Chagas), aliado ao da resistência e dos parasitas ao tratamento atual, demonstra a necessidade do surgimento de candidatos a novos fármacos (SANTOS et al., 2013). Neste sentido, ao investigar a citotoxicidade do óleo essencial de *L. camara* (OLC) demonstrou-se que nas concentrações testadas o óleo essencial apresentou toxicidade contra fibroblastos de mamíferos (NCTC929).

Apesar de pouco estudada, outras atividades biológicas já foram descritas como propriedades antifúngica, antibacteriana e antiacetilcolinesterásica (SANTOS et al., 2015), cicatrização de feridas e atividade antimicrobiana (KUMAR et al., 2015). Sonibare e Effiong (2008), observaram em ensaio com *Artemia salina* (*Brine shrimp lethality test*) que o óleo se apresenta como altamente tóxico, corroborando com trabalhos anteriores que, também, mostraram que *L. camara* é altamente tóxico para animais de pasto (MC LENNAN e AMOS, 1989), e chegando até mesmo causar morte em crianças ao consumirem as bagas verdes (WOLFSON e SOLOMON, 1964).

Neste estudo, *L. camara* foi extremamente tóxica para fibroblastos de mamíferos. Nas concentrações mais baixas (125 e 100 µg/mL) o óleo essencial apresenta menor toxicidade (14,57 e 7,28%) para fibroblastos. A citotoxicidade pode estar correlacionada com a capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana celular devido uma provável interação hidrofóbica dos componentes presentes no óleo essencial com a mesma. Estes dados estão de acordo com os apresentados nesse estudo.

Tal toxicidade também pode explicar a ação antiparasitária frente as formas promastigota de *Leishmania brasiliensis* e epimastigota de *Trypanosoma cruzi*. Óleos essenciais podem ser eficazes no tratamento ou prevenção de doenças parasitárias, visto que propriedades como baixa densidade e rápida difusão através das

membranas celulares, em decorrência da sua lipossolubilidade podem melhorar a inserção intracelular dos componentes ativos do óleo essencial nos parasitas (JARAMILLO et al., 2004), além de desestabilizar as membranas, tornando-as mais permeáveis, perdendo íons e outros conteúdos celulares, ou interrompendo a bomba de prótons, a transferência de elétrons, o transporte ativo e a coagulação do conteúdo celular (FRANÇA, 2011).

Observou-se neste estudo que os compostos (E)-cariofileno, germacreno D,  $\gamma$ -elemeno e o sabineno, foram os constituintes majoritários presentes no óleo essencial de *Lantana camara*, resultados semelhantes foram encontrados por Khan et al. (2002), que relataram o germacreno D, 3-elemeno,  $\beta$ -cariofileno como constituintes principais presente no óleo essencial de *L. camara*. Conforme Costa et al. (2009), o óleo essencial de *L. camara* apresentou 25 constituintes, representando 99,75%, sendo os constituintes majoritários biciclogermacreno, isocariofileno, valenceno e germacrene D. Da mesma forma, Costa et al. (2009), encontraram o biciclogermacrene, enquanto Passos et al. (2012), observaram predominância de mono e sesquiterpenos, tendo sido o componente majoritário, germacrene D (19.8%). Tais diferenças podem ser atribuídas possivelmente à interação constante entre os vegetais e os fatores ambientais: temperatura, umidade, luminosidade e constituição química do solo.

A utilização de óleos essenciais ou extratos botânicos no controle fitossanitário tem sido frequentemente relatada. Diversos trabalhos com óleos essenciais têm indicado o seu potencial no controle de bactérias (SILVA et al., 2010; DEMUNER et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2011) e de fungos fitopatogênicos. A inibição do desenvolvimento de fungos pode ser atribuída tanto a sua ação direta, que inibe o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto à indução de resistência a diversos patógenos (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003; DONLAPORN e SUNTORNSUK, 2010; DEUS et al., 2011; PERINI et al., 2011; SEIXAS et al., 2011; GARCIA et al., 2012; PASSOS et al., 2012).

O óleo exibiu efeito inibitório do crescimento das formas promastigotas em concentrações que variaram entre 100-250  $\mu\text{g/mL}$ . Estudos anteriores relataram a atividade leishmanicida do óleo essencial de *L. camara* em formas promastigotas de *L. chagasi* e *L. amazonensis* (MACHADO et al., 2012), sendo mais eficaz contra a *L. amazonensis* ( $\text{IC}_{50} = 0,25 \mu\text{g/mL}$ ) e *L. chagasi* ( $\text{IC}_{50} = 18 \mu\text{g/mL}$ ), do que a *L. braziliensis* ( $\text{IC}_{50} = 72,31 \mu\text{g/mL}$ ) utilizada nesse estudo.

A capacidade de óleo essencial de *L. camara* para inibir a forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi* também foi avaliada. Os resultados demonstraram que OLC apresentou ação significativa em concentração relativamente elevada (250 µg/mL) exibindo uma capacidade de inibição em 67,39% contra *T. cruzi*. Por outro lado, 500 µg/mL de óleo essencial *L. camara* foi altamente tóxico para NCTC929 fibroblastos. A presença de terpenos, são responsáveis pela sua toxicidade (KIM et al., 2012), cujos efeitos benéficos, também são observados.

Cunha et al. (2003) e Martínez-Díaz et al. (2015), demonstraram recentemente que (E)-cariofileno, o principal componente do óleo essencial de *L. camara*, apresenta potente efeito antiparasitário contra *T. cruzi*. Outros triterpenos (ácido 3β,6β,21β-trihydroxyolean-12- ene, ácido oleanólico, ácido beta-2-methylbutanoyloxy-3-oxo olean-12-en-28-oic, ácido pomólico, ácido camarico, β-sitosterol 3-(β-d-glucopyranoside), (E)cariofileno) com potente atividade antitripanocida e moderada leishmanicida (MOHAMED et al., 2016). Neste caso, (E)-cariofileno pode ser, pelo menos em parte responsável pela atividade antiparasitária observada, embora, não se pode descartar a contribuição dos demais compostos.

O óleo de *Lantana camara* apresentou forte atividade contra *Leishmania brasiliensis* em concentração de 250 µg/mL e moderada contra *T. cruzi*. A maior resistência dos microrganismos patogênicos a baixas concentrações do OLC pode ser uma indicação, de que tais parasitos apresentam certos níveis de resistência natural aos compostos do óleo essencial e sua ação antiparasitária pode ser dose-dependente. Outros estudos com os compostos isolados do óleo essencial de *L. camara*, devem ser conduzidos, bem como os mecanismos relacionados à sua ação antiparasitária. Entretanto, outras pesquisas são necessárias abordando a aplicação dos óleos essenciais como agentes antikinoplastídeos.

Devido às condições climáticas da Região Nordeste, em função do curto período chuvoso, na localidade de coleta do material botânico da pesquisa que se estendeu apenas de janeiro a março de 2012, houve dificuldade na obtenção de material para obtenção do óleo essencial de *Lantana montevidensis*, o que nos levou a fazer o cultivo da espécie no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Regional do Cariri - URCA. Dada esta dificuldade e o baixo rendimento (0,15%) na obtenção do óleo essencial, optou-se por investigar o efeito tóxico das folhas de *Lantana montevidensis*, as quais têm sido utilizadas na medicina tradicional brasileira, como antiproliferativa (NAGÃO et al., 2002); larvicida (COSTA et al., 2010)



e antioxidante (MONTANARI et al., 2011; SOUSA et al., 2013; RODRIGUES et al., 2015); antimicrobiana e antiprotozoária (MOHAMED et al., 2016), além das infusões de folhas da planta serem utilizadas para tratar a febre, gripe, asma, bronquite, e outras doenças do aparelho respiratório (MAKBOUL et al., 2012). No entanto, não há relatos que descrevam a toxicidade dessa espécie, quer no âmbito farmacológico, ou mesmo envolvendo a sua segurança.

Por ser uma espécie amplamente usada pela comunidade cratense, *Lantana montevidensis* necessita ser investigada quanto a natureza tóxica, para assegurar o seu uso, para fins medicinais. Neste contexto, foi determinada a composição de polifenóis, através da caracterização dos extratos aquoso de *L. montevidensis* (EALM) e etanólico de *L. montevidensis* (EELM); a capacidade antioxidante em sistemas químicos e biológicos, de ensaios *in vitro*, e sua toxicidade em leucócitos e eritrócitos humanos, bem como a capacidade de *L. montevidensis* complexar o íon ferro (II).

A impressão digital de HPLC dos extratos, revelou a presença de compostos fenólicos (ácido clorogênico, gálico, cafeico, elágico) e flavonóides (quercetina, rutina, quercitrina, luteolina, apigenina, kaempferol). Sousa et al. (2015), também demonstraram uma composição química semelhante, pois, identificaram por HPLC-DAD a presença de compostos fenólicos e flavonóides, entre eles quercetina, rutina, ácido gálico, ácido clorogênico e ácido cafeíco.

Costa e Sousa (2012), em seu estudo de revisão de literatura sobre o gênero *Lantana*, além de outras classes químicas também relataram a presença dos compostos identificados nesse estudo. Estes polifenóis e flavonóides, classes químicas presente nesta espécie, demonstram um grande potencial terapêutico e, neste sentido, destaca-se a atividade antioxidante e a ação como inibidores de peroxidação lipídica (PL) (ALOTHMAN et al., 2009; KUMBHARE et al., 2012; PISTÓN et al., 2014).

A exposição ao  $Fe^{2+}$  livre pode induzir ao estresse oxidativo, processo que produz muitos eventos patológicos nas células e para o organismo humano (FLOYD, 1999; AKINYEMI, et al., 2015; DUARTE et al., 2016). Em ambos os tecidos, os extratos aquoso e etanólico mostraram atividade antioxidante contra a peroxidação lipídica (PL), induzida por  $Fe^{2+}$ , reduzindo significativamente a formação de TBARS em homogeneizados de cérebro e fígado de ratos. O possível potencial desses extratos para inibir a PL induzida por  $Fe^{2+}$  pode ser atribuída, pela capacidade dos

constituintes químicos de inativar  $Fe^{2+}$ , assim, inibir a geração de espécies reativas. Esses dados são interessantes, e corroboram com Souza et al. (2015), que verificaram inibição da PL induzida por  $Fe^{2+}$  em fosfolipídios de ovo. Uma abordagem interessante demonstrou recentemente que o ácido clorogênico encontrado na composição desses extratos inibe a formação de radicais livres (RNS e ROS) (PISTÓN et al., 2014).

O ensaio colorimétrico de DPPH é uma indicação da capacidade da amostra para eliminar os radicais livres. O extrato aquoso (EALM) e etanólico (EELM) foram capazes de eliminar radicais livres, expressa pela redução do DPPH. Ambos os extratos causaram uma redução dose-dependente da concentração, na cor do radical DPPH, sugerindo a sua capacidade de doar hidrogênio. Entretanto, o extrato aquoso (EALM), apresentou uma atividade de eliminação de radicais DPPH, maior do que (EELM). Isto pode ser explicado pela capacidade do extrato aquoso, de reagir com o radical DPPH. A proteção do antioxidante ácido ascórbico tem sido registrada (BARBOSA FILHO et al., 2014; LI et al., 2015, MA et al., 2015).

Relatos demonstram que os extratos das folhas de *L. montevidensis* exibem menores valores de  $IC_{50}$ , em comparação com óleo essencial, o que indica o maior potencial como sequestrantes de radicais livres, sendo possivelmente uma importante fonte de fitoquímico antioxidante (SOUSA et al., 2013, RODRIGUES et al., 2015). Esta evidência experimental sugere que devido à sua atividade antioxidante, esta planta pode ser útil no tratamento de patologias humanas em que a produção de radicais livres desempenha um papel fundamental. Os compostos presentes nestes extratos, como quercetina (FOTI, 2011), ácido cafeíco (GÜLÇİN, 2006), ácido clorogênico (XIANG e NING, 2008) e rutina (YANG et al., 2008), já tiveram sua atividade sequestrante de radicais livres comprovada.

A capacidade antioxidante pode ser correlacionada com a capacidade de compostos para quelar metais e desativar a capacidade transição eletrônica, evitando assim a retirada ou transferência de elétrons que está diretamente relacionada a habilidade de gerar espécies reativas que são capazes de promover a iniciação da PL e estresse oxidativo através da reação catalisada de metal (OBOH et al., 2007). O ferro é um metal essencial necessário para a fisiologia celular normal, e está presente em sistemas biológicos ligados a várias frações de proteínas, tais como hemoglobina e ferritina. Nesse contexto, ao investigar a capacidade quelante de  $Fe^{2+}$ , ambos os extratos não apresentaram significativa atividade de quelação de

Fe<sup>2+</sup>, sugerindo que a sua capacidade antioxidante observada contra PL parece estar associada com ação direta com os radicais livres e não a quelação de Fe<sup>2+</sup>.

Ensaio toxicológicos são importantes para avaliar a segurança de extratos vegetais, principalmente, quando usados para fins medicinais (DE FREITAS et al., 2008; BARBOSA-FILHO et al., 2014; WACZUCK et al., 2015; DUARTE et al., 2016). Neste sentido, foi avaliado o efeito lesivo dos constituintes químicos presente nos extratos das folhas de *L. montevidensis* através do ensaio de fragilidade osmótica em eritrócitos humanos, conforme descrição de Sharma e Sharma (2001). Neste estudo, não houve alteração na fragilidade osmótica, após 3 h de tratamento de eritrócitos humanos com ambos os extratos de *L. montevidensis*. Neste caso, os constituintes químicos dos extratos provavelmente não provocaram alterações nas proteínas da membrana e na estrutura lipídica das células.

A citotoxicidade dos extratos de *L. montevidensis*, também foi investigada, agora em leucócitos humanos, utilizando o método de exclusão de azul de trypan, durante 3 h. Os dados deste estudo mostram que, assim como observado no ensaio de fragilidade osmótica, não houve citotoxicidade de leucócitos humanos, exceto nas concentrações mais elevadas testadas (240-480 µg/mL). Pelo menos em parte, este resultado assemelha-se a citotoxicidade encontrada em óleo essencial, para fibroblastos de mamíferos, investigada na primeira etapa desse estudo. Além disso, ambos os extratos não foram eficientes na reversão da citotoxicidade induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cujo efeito tóxico, poderia ser atribuído aos fitoconstituintes presentes nas concentrações e que não foram capazes de neutralizar o radical.

Através do ensaio cometa, um biomarcador importante de genotoxicidade, usado para avaliar lesões primárias no DNA, foi também avaliado o efeito dos extratos aquoso e etanólico, em leucócitos humanos. Apesar da leve citotoxicidade, nenhum sinal de dano ao DNA foi observado em todas as concentrações testadas. Este resultado assemelha-se com o obtido por Hernandez et al. (2014). Contudo, nossos resultados sugerem que o cuidado deve ser tomado em relação à dosagem, pois, doses superiores e/ou o uso frequente destes extratos de *L. montevidensis*, na medicina popular na Região do Cariri, pode resultar em efeitos tóxicos.

## 6. CONCLUSÕES

- ✓ Nesta pesquisa *Lantana camara* não apresentou triterpenos, sugerindo que os compostos que não sejam triterpenos podem estar envolvidos na toxicidade do óleo essencial;
- ✓ O óleo essencial de *L. camara* inibiu *T. cruzi* e *L. braziliensis*, no entanto, foi altamente tóxico para os fibroblastos (NCTC929) na concentração 500 µg/mL;
- ✓ A composição química do óleo essencial de *L. camara* revelou uma grande quantidade de (E) - cariofileno, biciclogermacreno e germacreno D, enquanto os os extratos etanólico e aquoso (EELM/EALM) das folhas de *L. montevidensis* mostraram a presença de compostos polifenólicos (ácidos fenólicos e flavonóides);
- ✓ Os extratos EELM/EALM de *Lantana montevidensis* não quelaram o Fe (II), não alteraram a fragilidade osmótica dos eritrócitos humanos, no entanto apresentaram forte atividade antioxidante e inibiram a peroxidação lipídica nos homogeneizados de cérebro e fígado de rato;
- ✓ Os leucócitos humanos em concentrações elevadas dos EELM/EALM causaram citotoxicidade, sem qualquer sinal de danos no DNA.

## 7. PERSPECTIVAS

Nesta pesquisa constatamos que alguns resultados foram promissores e suscitam a realização de novos estudos:

- ✓ Investigar a atividade tripanocida e leishmanicida de compostos isolados do óleo essencial das folhas de *Lantana camara*;
- ✓ Avaliar a atividade tripanocida e leishmanicida do óleo essencial de *Lantana montevidensis*, bem como seus componentes isolados;
- ✓ Caracterizar anatomicamente e realizar estudos histoquímicos das folhas e do caule de *Lantana montevidensis*;
- ✓ Investigar a toxicidade do óleo essencial obtido das folhas de *L. camara* e *L. montevidensis* em modelos de *Drosophila melanogaster*;
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante/pró-oxidante do extrato etanólico de folhas frescas (EEFFLMÆEFFLC) e de folhas secas (EEFSLM/EEFSLC) e do extrato aquoso de folhas frescas (EAFFLMÆAFFLC) e de folhas secas (EAFSLMÆAFFLC) de *L. montevidensis* e *L. camara*, respectivamente;
- ✓ Avaliar a letalidade dos extratos EEFFLMÆEFFLC, EEFSLM/EEFSLC, EAFFLMÆAFFLC e EAFSLMÆAFFLC, contra *Artemia salina*;
- ✓ Avaliar a toxicidade aguda dos extratos EEFFLMÆEFFLC, EEFSLM/EEFSLC, EAFFLMÆAFFLC e EAFSLMÆAFFLC, em *Rhamdia quelen* (jundiá) e zebra fish.

## REFERÊNCIAS

- AKENDENGUE, B.; NGOU-MILAMA, E.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R. Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products. **Parasite**, v.6, p.3-8, 1999.
- AKINYEMI, A. J.; OLABIYI, A. A.; OGUNMODEDE, O. T.; AMOS, S. Inhibitory effect of tannic acid and its derivative (gallic acid) against cisplatin-induced thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) production in rat kidney—*in vitro*. **International Journal of Advanced Research**, v.3, n.1, p.116-126. 2015.
- ALEXANDRE, R. F.; BAGATINI, F.; SIMÕES, C. M. O. Potenciais interações entre fármacos e produtos à base de valeriana ou alho. **Rev Bras Farmacogn**, v.18, p.455-463, 2008.
- ALOTHMAN, M.; BHAT, R.; KARIM, A. A. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. **Food Chemistry**, v.115, n.3, p.785-788, 2009.
- AMATO, V.S.; TUON, F. F.; BACHA, H.A.; NETO, V. A.; NICODEMO, A. C. Mucosal leishmaniasis . Current scenario and prospects for treatment. **Acta Trop**, v.105, n.1, p.1–9. 2008.
- AMORIM, M. F. D.; DINIZ, M. F. F. M.; ARAÚJO, M. S. T.; PITA, J. C. L. R.; DANTAS, J. G.; RAMALHO, J. A.; XAVIER, A.L.; PALOMARO, T. V; JÚNIOR, N. L. B. The controvertible role of kava (*Piper methysticum* G. Foster) an anxiolytic herb, on toxic hepatitis. **Rev Bras Farmacogn**, v.17, p.448-454, 2007.
- ANTHONY, J. P.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components – a resource for antiparasitic agents? **Trends Parasitol**, v.21, p.462-468, 2005.
- AZEVEDO, S.K.S.; SILVA, I.M. Plantas medicinais e de uso religioso comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v.20, p.185-194, 2006.
- BAILEY, A. E.; **Bailey's industrial oil and fat products**. 5th ed. New York: John Wiley. v.3, 1996.
- BARBOSA FILHO, V. M.; WACZUK, E. P.; KAMDEM, J. P.; ABOLAJI, A. O.; LACERDA, S. R.; DA COSTA, J. G. M.; MENEZES, I. R. A.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; ROCHA, J. B. T.; POSSER, T. Phytochemical constituents, antioxidant activity, cytotoxicity and osmotic fragility effects of caju (*Anacardium microcarpum*). **Industrial Crops and Products**, v.55, p.280-288, 2014.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, v.23, n.4, 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova**. São Paulo. v.29 n.1 jan/feb. 2006. doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021

BARRETO, F. S.; SOUSA, E. O.; RODRIGUES, F. F. G.; COSTA, J. G. M.; CAMPOS, A. R. Antibacterial Activity of *Lantana camara* Linn. *Lantana montevidensis* Brig. Extracts from Cariri-Ceará, Brazil. **Journal of Young Pharmacists**, v.2, p.42–44, jan–mar. 2010.

BARROS, L. M.; DUARTE, A. E. MORAIS BRAGA, M. F. B.; WACZUK, E. P.; VEGA, C.; LEITE, N. F.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; ROCHA, J. B. T.; KAMDEM, J. P. Chemical characterization and trypanocidal, leishmanicidal and cytotoxicity potential of *Lantana camara* L. (Verbenaceae) essential oil. **Molecules** v.21, n.2, p.209, 2016. doi:10.3390/molecules21020209

BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: UFV, p. 326, 1991.

BAZZANO, F. C. O. Aspectos Éticos da Pesquisa Científica, p. 149-180. In: SILVA, José Vitor da (Org.) et al. **Bioética: meio ambiente, saúde e pesquisa**. 1. ed. São Paulo: Iátria, 2006.

BEZERRA, W. S.; MENEGUETTI, D. U. O.; CAMARGO, L. M. A. A busca de fármacos para tratamento da tripanossomíase americana: 103 anos de negligência. **Saúde (Santa Maria)**, v.38, p.9-20, 2012.

BHOOSHAN PANDEY, K.; IBRAHIM RIZVI, S. Protective effect of resveratrol on markers of oxidative stress in human erythrocytes subjected to *in vitro* oxidative insult. **Phytotherapy Research**, Article first published online. v.24, n.13, p.S11–S14, may. 2009. DOI: 10.1002/ptr.2853.

BORASCHI, C. S. S., NUNES, C. M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral urbana no Brasil. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 12, n.71, p.44-48, 2007.

BRAITHWAITE, T., HOLDER, G. E. LEE, R. W. J. et al. Diagnostic features of the autoimmune retinopathies. **Autoimmun Ver**, v.13, p.534-538, 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde – Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. 1ª edição. Brasília - DF: MS, 2006. 60 p.

BRASIL. Lei Nº 11.794 de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei Nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, Acesso em 12 mar. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Brasil. Secretária de Estado da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7. ed. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Casos de doença de Chagas aguda (DCA)**. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 2005 a 2009. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabchagascasos0509.pdf> (acessado em novembro/2013).



BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Relatório interno da Unidade Regional de Montes Claros**, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 2007. 182p. ISBN 978-85-334-1270-5

BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**, 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2000.

BRITO, M. F.; TOKARNIA, K. H.; DÖBEREINER, J. A toxidez de diversas lantanas para bovinos e ovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, n.3, p.153-159, 2004.

BUENO, O. L.; LEONHARDT, C. Distribuição e potencial paisagístico dos gêneros *Citharexylum* L. e *Verbenoxylum* Tronc. no Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia**, v.66, n.1, p.47-60, 2011.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sci.**, v.74, p.2157-2184, 2004.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benzonidazole. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo, v.44, p.1-20, 2002.

CARLOS, M. M.; IGNATTI, C.; ROSA, M. R. Leishmaniose tegumentar americana: incidência no Vale do Ribeira/São Paulo, Brasil. **Recien-Revista Científica de Enfermagem**, n.15, p.3-10, 2015.

CARNEIRO, J. N. P.; ALBUQUERQUE, R. S.; LEITE, N. F.; MACHADO, A. J. T.; BRITO, D. I. VI. DE.; ROLÓN, M.; VEGA, C.; CORONEL, . COUTINHO, H. D. M.; MORAIS-BRAGA, M. F. B. Avaliação da atividade tripanocida, leishmanicida e citotóxica do geraniol e citronelal. **Cadernos de Cultura e Ciência (URCA)**, v.13, p.29-36, 2015.

CARREIRA, J. C. A.; DA SILVA, A. V. M.; PITA-PEREIRA, D.; BRAZIL, R. P. Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia: Marsupialia) with *leishmania infantum* in Brazil. **Parasit Vectors**, v.5, p.111, 2012.

CARRILERO, B.; MURCIA L, MARTÍNEZ-LAGE L.; SEGOVIA, M. Side effects of benznidazole treatment in a cohort of patients with Chagas disease in nonendemic country. **Ver Esp Quimioter**, v.24, p.123-6, 2011.

CARVALHO, E. F.; DE CASTRO, F. T.; RONDINELLI, E.; CARVALHO, J. F.; Physiological aspects of *Tripanossoma cruzi* gene regulation during heat-shock. **Biol Res**, v.27, p.225-231, 1994.

CARVALHO, P. B.; FERREIRA, E. I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. **Fitoterapia**, v.72, p.599-618, 2001.

CATANIA, A. S.; BARROS, C. R. D.; FERREIRA, S. R. G. Vitamins and minerals with antioxidant properties and cardiometabolic risk: controversies and perspectives. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.53, n.5, p.550-559, 2009.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.1, n.2, p.159-218, 1909.

CHAN-BACAB, M. J.; PENA-RODRÍGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanial activity. **Royal Soc. Chem.**, v.18, p.674-688, 2001.

COLLA-JACQUES, F. E.; CASANOVA, C., DO PRADO, A. P. Study of sand fly fauna in an endemic area of American cutaneous leishmaniasis and canine visceral leishmaniasis in the municipality of Espírito Santo do Pinhal, São Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.105, p.208-215, 2010.

CORDEIRO, C. H. G.; CHUNG, M. C.; SACRAMENTO, L. V. S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Rev Bras Farmacogn** v.15, p.272-278, 2005.

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; SOUSA, E. O.; JUNIOR, D. M. S.; CAMPOS, A. R.; COUTINHO, H. D. M.; DE LIMA, S. G. Composition and larvicidal activity of the essential oils of *Lantana camara* and *Lantana montevidensis*. **Chemistry of Natural Compounds**, v.46 n.2, p.313-315, 2010.

COSTA, J. G.; SOUSA, E. O. D.; RODRIGUES, F. F.; LIMA, S. D.; BRAZ-FILHO, R. Composição química e avaliação das atividades antibacteriana e de toxicidade dos óleos essenciais de *Lantana camara* L. e *Lantana sp.* **Brazilian Journal Pharmacognosy**, v.19, p.721-5, 2009.

COURA, J. R.; ABREU, L. L.; WILLCOX, H. P. F.; PETANA, W. Estudo comparativo controlado com emprego de benzonidazole, nifurtimox e placebo, na forma crônica da doença de Chagas, em uma área de campo com transmissão interrompida. Avaliação preliminar. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.30, p.39-144, 1997.

COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.97, p.3-24, 2002.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.104, p.7, 2009.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature** v.465, (Suppl.), p.6-7, 2010.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitol**, v. 19, p.502-508, 2003.

CUNHA, W. R.; MARTINS, C.; FERREIRA, D. D.; CROTTI, A. E.; LOPES, N. P.; ALBUQUERQUE, S. *In vitro* trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species. **Planta medica**, n.69, n.5, p.470-471, 2003.

DAY, M. D.; WILLSON, B. W.; LATIMER, J. The life history and host range of *Ectaga garcia*, a biological control agent for *Lantana camara* and *L. montevidensis* in Australia. **BioControl**, v.43, n.3, p.325-338, 1998.

DE FREITAS, M. V.; RITA DE CÁSSIA, M. N.; DA COSTA HUSS, J. C.; DE SOUZA, T. M. T.; COSTA, J. O.; FIRMINO, C. B.; PENHA-SILVA, N. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. **Toxicology in Vitro**, v.22 n.1, p.219-224, 2008.

DE OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v.32, n.3, p.689-702, 2009.

DEENA, M. J.; THOPPIL, J. E. Antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana*. **Fitoterapia**, v.71, n.4, p.453-5, 2000.

DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C. A.; MAGALHÃES, C. G.; SILVA, C. J.; MALTHA, C. R. A.; PINHEIRO, A. L. Seasonal variation in the chemical composition and antimicrobial activity of volatile oils of three species of *Leptospermum* (Myrtaceae) grown in Brazil. **Molecules**, v.16, p.1181-1191, 2011.

DEUS, R. J. A.; ALVES, C. N.; ARRUDA, M. S. P. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, p.1-7, 2011.

DONLAPORN, S.; SUNTORNSUK, W. Antifungal activities of ethanolic extract from *Jatropha curcas* seed cake. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, p.319-324, 2010.

DPDx - **X-Laboratory identification of parasitic diseases of public health concern trypanosomiasis, American. Fact Sheet**. Division of Parasitic Diseases and Malaria (DPDM). Centers for Disease Control (CDC). <http://www.cdc.gov/dpdx/index.html>. Consultado em 26 de março de 2016

DUARTE, A. E.; WACZUK, E. P.; ROVERSI, K.; DA SILVA, M. A. P.; BARROS, L. M.; DA CUNHA, F. A. B.; DE MENEZES, I. R. A.; COSTA, J. G. M.; BOLIGON, A. A.; ADEMILUYI, O.; KAMDEM, J. P.; ROCHA, J. B. T.; BURGER, M. S. Polyphenolic composition and evaluation of antioxidant activity, osmotic fragility and cytotoxic effects of *Raphiodon echinus* (Nees e Mart.) Schauer. **Molecules**, v.21, n.1, p.2, 2016.

FERNANDES, C. D.; TIECHER, F. M.; BALBINOT, M. M.; LIARTE, D.B.; SCHOLL, D.; STEINDEL, M.; ROMANHA, A.J. Efficacy of benznidazol treatment for asymptomatic chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three years follow-up. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.104, n.1, p 27-32, feb. 2009.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FERREIRA, H. D. O. Tratamento da forma indeterminada da doença de Chagas com nifurtimox e benzonidazol. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.23, n.4, p.209-211, 1990.

FIGUEREDO, F. G.; TINTINO, S. R.; BRITO, D. I. V.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; LEITE, N. F.; LUCENA, B. F. F.; SOBRAL-SOUZA, C. E.; GOMEZ, M. C. V.; VEJA, C.; COUTINHO, H.D.M. Avaliação das potenciais atividades tripanocida e antileishmania do extrato de folhas de *Piper arboreum* (Piperaceae) e de suas frações. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.35, p.149-154, 2013.

FLOYD, R. A. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. **Experimental Biology and Medicine**, v.222, n.3, p.236-245. 1999.

FOTI, M. C.; DAQUINO, C.; DILABIO, G. A.; INGOLD, K. U. Kinetics of the oxidation of quercetin by 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). **Organic letters**, v.13, n.8, p.4826-4829, 2011.

FOURNET, A.; ANGELO B. A.; MUÑOZ, V.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A B. J. 2-Substituted quinoline alkaloids as potential antileishmanial drugs. **An-timicrobial Agents and Chemotherapy**, v.37, p.859-863,1993.

FOURNET, A.; GANTIER, J. C.; GAUTHERET, L.; LEYSALLES, M. H.; MUNOS, J.; MAYRARGUES, H.; MOSKOWITZ, R.; CAVÉ, A. The activity of 2-substituted quinoline alkaloids in Balb/c mice infected with *Leishmania donovani*. **J Antimicrob Chemoth**, v.33, p.537-544, 1994.

FOURNET, A.; FERREIRA, M.E.; ROJAS DE ARIAS, A.; TORRES DE ORTIZ, S.; FUENTES, S.; NAKAYAMA, H.; SCHININI, A. In vitro efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. **Antimicrob Agents Chemoth**, v.40, p.2447-2451,1996.

FRANCA RODRIGUES, K. A.; AMORIM, L. V.; DIAS, C. N.; MORAES, D. F. C.; CARNEIRO, S. M.P.; CARVALHO, F. A. de A. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent  $\alpha$ -pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v.160, p.32-40, 2015.

FRANÇA, O. J. F. **Estudo da composição química e atividade biológica do óleo essencial de *Ruta graveolens* Linneau (Rutaceae)**. 105p. 2011. João Pessoa. Tese (Doutorado) – UFPB/CCEN. 2011.

FRANKEL, E. N. Lipid oxidation. **Prog. Lip. Res.**, v.19, p.1-22, 1980

FREARSON, J. A.; WYATT, P. G.; GILBERT, I. H. G.; FAIRLAMB, H. A. Target assessment for antiparasitic drug discovery, **Trends Parasitol**, v.23, p.589-595, 2007.

FREITAS, T. P. T.; D'ANDREA, P.S.; DE PAULA, D. A. J.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; BONVICIO, C. R.; DE ALMEIDA, A. B. P. F.; BOA-SORTE, E. C.; SOUZA, V. R. F. Natural infection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mus musculus captured

in Mato Grosso, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.12, p.81-83, jan. 2012.

GALLO, M.; SARKAR, M.; AU, W.; PIETRZAK, K.; COMAS, B.; SMITH, M.; JAEGER, T. V.; EINARSON, A. R. N.; KOREN, G. Pregnancy outcome following gestational exposure to Echinacea: a prospective controlled study. **Arch Intern Med**, v.160, p.3141-3143, 2000.

GARCIA, R. Á.; JULIATTI, F. C.; BARBOSA, K. A. G.; CASSEMIRO, T. A. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal**, v.28, p.48-57, 2012.

GATTERMANN, N.; RACHMILEWITZ, E.A. Iron overload in MDS pathophysiology, diagnosis, and complications. **Annals of Hematology**, v.90, p.1-10. 2011. doi: 10.1007/s00277-010-1091-1.

GHISALBERTI, E. L. *Lantana camara* L. (Verbenaceae). **Fitoterapia**, v.71, n.5, p.467-486, 2000.

GHOTI, H. FIBACH, E. MERKEL, D. AVRAHAM, G. P. GRISARIU, S. RACHMILEWITZ, E. A. Changes in parameters of oxidative stress and free iron biomarkes during treatment with deferasirox in iron overloaded patients with myelodysplastic syndromes. Letters to the Editor. **Hematologica**, v.95, n.8, p.1433-1434, 2010.

GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 5. ed. São Paulo: Atlas, 2010. 176p.

GIULIETTI, A. M.; RAPINI, A.; ANDRADE, M. J. G.; QUEIROZ, L. P.; SILVA, J. M. C. **Plantas raras do Brasil**. Belo Horizonte, MG: Conservação Internacional, Co-editora: Universidade Estadual de Feira de Santana. 2009. 496p.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.**, v.8, n.4, p.419-433, 2010.

GÜLÇİN, İ. Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). **Toxicology**, v.217, n.2, p.213-220, 2006.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease curiosity, cause, or consequence?, **Lancet**, v.344, p.721-724, 1994.

HALLIWELL, B. Proteasomal dysfunction; a common feature of all neurodegenerative diseases? Implications for the environmental origins of neurodegeneration. **Antioxidants e Redox Signaling**, v.8, p.11-12, 2006.

HAMEDT, A. L.; ORTIZ, I. C.; GARCÍA-HUERTAS, P. A.; SAENZ, J.; DE ARAUJO, A. C.; DE MATTOS, J. C. P.; RODRÍGUEZ-GAZQUEZ, M. A.; TRIANA-CHÁVEZ, O. Cytotoxic, mutagenic and genotoxic evaluation of crude extracts and fractions from *Piper jericense* with trypanocidal action. **Acta Tropica**, v.131, p.92-97, 2014.

- HARMAN, D. Role of free radicals in aging and disease. **An. Nya Sci.**, v. 673, p.126-141, 1992.
- HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: action. **Journal of Natural Products**, v.59, n.205, p.205-209, 1996.
- HERNANDES, L. C.; AISSA, A. F.; DE ALMEIDA, M. R.; DARIN, J. D. A. C.; RODRIGUES, E.; BATISTA, B. L.; BARBOSA, F.; MERCADANTE, A. Z.; BIANCHI, M. L.P.; ANTUNES, L. M. G. *In vivo* assessment of the cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) fruit, **Food Research International**, v.62, p.121-127, 2014.
- JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S.; ZIMMER, E. A. Phylogenetic relationships of the perianthless Piperales: reconstructing the evolution of floral development, **International Journal of Plant Sciences**, v.165, n.3, p.403-416, 2004.
- JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 13. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional. p.777, 2002.
- KAMDEM, J. P.; ADENIRA, N. A.; BOLIGON, A. A.; KLIMACZEWSKI, C. V.; ELEKOFEHINTI, O. O.; HASSAN, W.; IBRAHIM, M.; WACZUK, E. P.; MEINERZ, D. F.; ATHAYDE, M. L. Antioxidant activity, genotoxicity and cytotoxicity evaluation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ethanolic extract: Its potential role in neuroprotection. **Industrial Crops and Products**, v.51, p.26-34, 2013.
- KEALEY, A.; SMITH, R. Neglected tropical diseases: infection, modeling and control. **J Health Care Poor Underserved**, v.21, p.53–69, 2010. doi:10.1353/hpu.0.0270 PMID:20173255.
- KETTER, H.; MARJANOVIC, S. **Nature Rev. Drug Discov**, v.3, p.171, 2004.
- KHAN, M.; SRIVASTVA, S. K.; SYAMISUNDER, K. V.; SINGH, M.; NAQUVI, A. A. Chemical composition of leaves and flower essential oil of *Lantana camara* from India. **Flavour and Fragrance Journal**, v.17, n.1, p.75-77, 2002.
- KIM, S. K., e HIMAYA, S. W. Triterpene glycosides from sea cucumbers and their biological activities. **Advances in Food and Nutrition Research**, v.65, p.297-319, 2012.
- KIRCHHOFF, L. V. American trypanosomiasis (Chagas' disease). **Gastroenterol Clin North Am.**v.25, p.517-33. 1996.
- KOHLI, R. K.; BATISH, D. R.; BATISH, H. P.; SINGH, H. P.; DOGRA, K. S. Status, invasiveness and environmental threats of three tropical American invasive weeds 106 (*Parthenium hysterophorus* L., *Ageratum conyzoides* L., *Lantana camara* L.) in India. **Biological Invasions**, v.8, n.7, p.501-510, 2006.
- KUMAR, V., KAUR, A. P., UMA, V. K., KUMAR, R., VANDANA, K. E., e NAYAK, V. An evaluation of the wound healing and anti-microbial property of the tincture of *Lantana camara*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.7, n.5, 2015.

- KUMBHARE, M. R., GULEHA, V., e SIVAKUMAR, T. Estimation of total phenolic content, cytotoxicity and in-vitro antioxidant activity of stem bark of *Moringa oleifera*. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v.2, n.2, p.144-150, 2012.
- LABUZA, T.P. Kinetics of lipid oxidation in foods. **CRC Crit. Rev. Food Technol, Cleveland**, v.2, n.3, p.355-405, 1971.
- LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. In: Neves, D. P. **Parasitologia Humana**, 11 ed. São Paulo: Atheneu. Cap. 11, p.85-108, 2001.
- LESCURE, F. X.; LE LOUP, G.; FREILIJ, H.; DEVELOUX, M.; PARIS, L.; BRUTUS, L.; PIALOUX, G. Chagas disease: changes in knowledge and management. **Lancet Infect Dis**. v.10, n.8, p.556–570, 2010.
- LI, X., CHEN, D., WANG, G., e LU, Y. Probing the interaction of human sérum albumin with DPPH in the absence and presence of the eight antioxidants. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.137, p.1144-1152, 2015.
- LIMA, E. B. D.; PORTO, C.; MOTTA, J. O. C. D.; SAMPAIO, R. N. R. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **An. Bras. Dermatol**, v.82, n., p.111-124, 2007.
- LIMA, G. S. **Estudo da atividade tripanossomicida e leishmanicida de extrato, frações e terpenos de *Croton cajucara* Benth.** 2014. 75f. Tese (Doutorado em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2014.
- LINDOSO, J. A. L.; LINDOSO, A. A. B. P. Neglected tropical diseases in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.51, n.5, p.247-253, 2009.
- LOBO, M. K.; COVINGTON, H. E.; CHAUDHURY, D.; FRIEDMAN, A. K.; SUN, H.; DAMEZ-WERNO, D.; DEISSEROTH, K.; HAN, M. H.; NESTLER, E. J.; Cell type-specific loss of BDNF signaling mimics optogenetic control of cocaine reward. **Science**. v.330, p.385–390. doi:10.1126/science.1188472. 2010.
- MA, Y.; GAO, T. T.; TIAN, L. P.; TAN, Y.; e WANG, J. H. Chemical Constituents and Antioxidant Evaluation of *Paeonia anomala*. **Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae**, v.2, p.19. 2015.
- MACHADO, R. R. P.; JÚNIOR, W. V.; LESCHE, B.; COIMBRA, E. S.; DE SOUZA, N. B.; ABRAMO, C.; SOARES, G. L. G.; KAPLAN, M. A. C. Essential oil from leaves of *Lantana camara*: a potential source of medicine against leishmaniasis. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.22, n.395, p.1011-1017, 2012.
- MAKBOUL, M. A.; ATTIA, A. A.; FARAG S. F.; KAMAL, N. M. Macro- and micromorphology of the aerial parts of *Lantana montevidensis* (Spreng.) Briq. cultivated in Egypt. **Bulletin of Pharmaceutical Sciences Assiut University Bull**, v.35, Part 2, p.127-160, 2012.
- MALTEZOU, H.C. Drug Resistance in Visceral Leishmaniasis. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2010, p.1-8, 2010.



MARCELINO, A.P.; FERREIRA, E.C.; AVENDANHA, J.S.; COSTA, C.F.; CHIARELLI D, ALMEIDA G, MOREIRA E.C, LEITE RC, REIS J.K.P, GONTIJO C.M.F. Molecular detection of *Leishmania braziliensis* in *Rattus norvegicus* in an area endemic for cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Rev. Parasitol**, v.183, p.54-58, 2011.

MARCONDES, M. C.; BORELLI, P.; YOSHIDA, N.; RUSSO, M. Acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment. **Microbes and Infection**, n.2, p.347–352, 2000.

MARIN-NETO, J. A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B. C.; SIMÕES, M. V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v.115, n.9, p.1109–1123, 2007.

MARIN-NETO, J. A.; RASSI JÚNIOR, A.; AVEZUM JÚNIOR, A.; MATTOS, A. C.; RASSI, A. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.104 (Suppl. I), p.319-24, 2009.

MARTÍNEZ-DÍAZ, R. A.; IBÁÑEZ-ESCRIBANO, A.; BURILLO, J.; DE LAS HERAS, L.; DEL PRADO, G.; AGULLÓ-ORTUÑO, M. T.; JULIO, L. F.; GONZÁLEZ-COLOMA, A. Trypanocidal, trichomonacidal and cytotoxic components of cultivated *Artemisia absinthium* Linnaeus (Asteraceae) essential oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, (AHEAD). 2015.

MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÜNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comp Biochem Physiol A MollIntegr Physiol**, v.146, n.4, p.601-20. Apr. 2007.

MC LENNAN, M. W.; AMOS, M. L. Treatment of *Lantana* poisoning in cattle. **Aust. Vet. J.**, v.66, p.93-94, 1989.

MENEZES, A. L.; LIMA, V. M. P.; FREITAS, M. T. S.; ROCHA, M. O.; SILVA, E. F.; DOLABELLA, S. S. Prevalence of intestinal parasites in children from public daycare centers in The city of Bel Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.1, n.50, p.9-57, 2008.

MILLER, S. A. et al. Intestinal parasitic infection and associated symptoms in children attending day care in Trujillo Venezuela. **Tropical Medicine & International Health**, v.8, n.4, p.7-342, 2003.

MISHRA, P.; KUMAR, A.; KHARE, P. Pro-apoptotic effect of the landrace Bangla Mahoba of Piper beetle in *Leishmania donovani* may be due to the high content of eugenol. **J. Med. Microbiol**, n.58, p.1058-66, 2009.

MOHAMED, N. M.; MAKBOUL, M. A.; FARAG, S. F.; JAIN, S.; JACOB, M. R.; TEKWANI, B. L.; ROSS, S. A. Triterpenes from the roots of *Lantana montevidensis* with antiprotozoal activity. **Phytochemistry Letters**, v.15, p.30-36, 2016.

- MONTANARI, R. M.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; SILVA, C. J.; CARVALHO, L. S.; ANDRADE, N. J. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from Verbenaceae species: alternative sources of (E)-caryophyllene and germacrene-D. **Quimica Nova**, v.34, n.9, p.1550-1555, 2011.
- MONTEIRO, W. M.; BARBOSA, M. G. V.; TOLEDO, M. J. O.; FÉ, F. A.; FERREIRA FÉ, N. Série de casos agudos de doença de Chagas atendidos num serviço terciário de Manaus, Estado do Amazonas, de 1980 a 2006. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.2, p.207-210. mar-abr, 2010
- MORAIS-BRAGA, M. F. B.; SOUZA, T.; SANTOS, K. K.; ANDRADE, J. C.; GUEDES, G. M.; TINTINO, S. R.; COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; SARAIVA, A. A. F. Citotocidade e atividade antiparasitária de *Lygodium venustum* SW. **Acta Toxicológica Argentina**, v.21, n.1, p.50-56, 2013.
- MORAN, M.; ROPARS, A.; GUZMAN, J.; DIAZ, J.; GARRISON, C. The new landscape neglected disease drug development. **Wellcome Trust**, 2005
- MOTA, L. A. A.; MIRANDA, R. R. Manifestações dermatológicas e otorrinolaringológicas na Leishmaniose. **Arquivos do Instituto de Otorrinolaringologia**, v.15, n.3, p.376-381, 2011.
- MUNIR, A. A. Uma revisão taxonômica de *Lantana camara* L. e *L. montevidensis* Briq. (Verbenaceae) na Austrália. **Journal of the Adelaide Botanic Gardens**, v.17, n.3, p.1-27, 1996.
- MUNOZ, V.; MORETII, C.; SAUVAIN, M.; CARON, C.; PROZEL, A.; MASSIOT, G.; RICHARD, B.; LE MEN-OLIVIER, L. Isolation of bis-indole alkaloids with antileishmanial and antibacterial activities from *Peschiera var heurkii* (Syn. *Tabernaemontana var heurkii*). **Planta Med**, v.60, p.455-459, 1994.
- MURCIA, L.; CARRILERO, B.; SAURA, D.; IBORRA, M. A.; SEGOVIA, M. Diagnóstico y tratamiento de La enfermedad de Chagas. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, n.31, Supl.1, p.26-34, 2013.
- NAGÃO, T.; ABE, F.; KINJO, J.; OKABE, H. Antiproliferative Constituents in Plants. Flavones from the Leaves of *Lantana montevidensis* Briq. and Consideration of Structure-Activity Relationship. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.25, n.7, p.875-879, 2002.
- NASCIMENTO, J. C.; BARBOSA, L. C. A.; PAULA, V. F.; DAVID, J. M.; FONTANA, R.; SILVA, L. A. M.; FRANÇA, R. S. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Ocimum canum* Sims. and *Ocimum selloi* Benth. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.83, p.787-799, 2011.
- NATURE. Mechanism matters. **Nat Med**, v.16, n.4, p.347. apr. 2010.
- NAZ, R.; BANO, A. Phytochemical screening, antioxidants and antimicrobial potential of *Lantana camara* in different solvents. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v.3, n.6, p.480-486, 2013.
- NEUBER, H. Leishmaniasis. **J Dtsch Dermatol Ges**, v.6, p.754-65, 2008.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**, 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Atheneu Editora, 2005. 494p.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.**, p.311–35, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J Nat Prod.**, v.66, n.7, p.1022–37. Jul, 2003.

NIH - **National Institute of Health-EUA**, 1996. Website [<http://www.nih.gov>].

NWAKA, S.; RIDLEY, R. G. Virtual drug discovery and development for neglected diseases through public-private partnerships. **Nature Rev. Drug Discov**, v.2, 919-28, nov. 2003, (<http://www.dndi.org.br/>), acesso em 28 de março de 2016.

OBOH, G.; PUNTEL, R.L; ROCHA, J.B.T. Hot pepper (*Capsicum annum*, *Tepine Capsicum chinese*, Habanero) prevents Fe<sup>2+</sup> - induced lipid peroxidation in brain – *in vitro*. **Food Chemistry**, v.102, p.178–185, 2007.

OLIVEIRA, G. C.; LOPES, L. R.; ANDREOLLO, N. A.; BRAGA, N.S.; NETO, J. S. C. Tratamento cirúrgico do megaesôfago no Hospital de Clínicas da UNICAMP – fatores associados a melhores ou a piores resultados. **Rev Col Bras Cir.**, v.36, n.4, p.300–306, 2009.

ONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. Moléstias decorrentes de substância tóxicas e venenosas estranhas. *In*: JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia Veterinária**, São Paulo: Manole, p.729-730, 1997.

OSORIO, E.; ARANGO, G.J; JIMÉNEZ, N; ALZATE, F; RUIZ, G; GUTIÉRREZ, D; PACO, M.A; GIMÉNEZ, A; ROBLEDO, S. Antiprotozoal and citotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. **J. of Ethnopharmacology**, v.111, p.630-635, 2007.

OZEN, A.; HALILOGLU, T.; SCHIFFER, C. A. Dynamics of preferential substrate recognition in HIV-1 protease: redefining the substrate envelope. **Journal of Molecular Biology**, p.726-744, 2011.

PASSOS, J. L.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; ALVARENGA, E. S.; SILVA, C. M.; BARRETO, R. W. Chemical characterization of volatile compounds of *Lantana camara* L. and *L. radula* Sw. and their antifungal activity. **Molecules**, v.17, p.11447-11455, 2012.

PEREIRA, I. D. O.; SACRAMENTO, L. V. S.; MARQUES, M. J. Leishmanioses: "estado da arte". **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v.9, n.1, 2011.

PEREIRA, P. C.; NAVARRO, E. C. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. **J Venom AnimToxins Incl Trop Dis**, v.19, n.1, p.34. dec, 2013.

PERINI, V.B. de M.; CASTRO, H.G. de; SANTOS, G.R. dos; AGUIAR, R.W. de S.; LEÃO, E.U.; SEIXAS, P.T.L. Avaliação do efeito curativo e preventivo do óleo essencial do capim citronela no controle de *Pyricularia grisea*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.2, p.23-27, 2011.

PICON, R. As peculiaridades da Lei 9.605/98 (crimes ambientais). **Revista Jus Navigandi**, Teresina, ano 20, n. 4445, 2 set. 2015. Disponível em: <<https://jus.com.br/artigos/42218>> (Acesso em: 30 abr. 2016).

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Current status, challenges and trends on natural products in Brazil. **Quimica Nova**, v.25, supl.1, p.45-61, 2002.

PISTÓN, M., MACHADO, I., BRANCO, C. S., CESIO, V., HEINZEN, H., RIBEIRO, D., FERNANDES, E., CHISTÉ, R.C. ; FREITAS, M. Infusion, decoction and hydroalcoholic extracts of leaves from artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *cardunculus*) are effective scavengers of physiologically relevant ROS and RNS. **Food Research International**, v.64, p.150-156, 2014.

PRITCHARD, J. F.; JURIMA-ROMET, M.; REIMER, M. L. J.; MORTIMER, E.; ROLFE, B.; CAYEN, M. N. Making better drugs: Decision gates in non-clinical drug development. **Nat Rev Drug Discov**, p.2, n.7, p.542-53. 2003.

QUARESMA, P. F.; RÊGO, F. D.; BOTELHO, H. A. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais state, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.105, n.10, p.579-585, 2011.

RAHMAN, I.; ADCOCK, I. M. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. **Eur Respir J**, v.28, p.219-242, 2006.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v.29, n.4, p.755-760, 2006.

RANJHAN, K. S.; PATHAK, N. N. Nutritional and metabolic disorders of buffaloes. *In*: TULLOH, N. M.; HOLMES, J. H. G. **Buffalo Production**, Netherlands: Elsevier, p.370-372, 1992.

RASSI JÚNIOR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v.375, p.1388-1402, 2010.

RASSI, A.; AMATONETO, V.; SIQUEIRA, A. F.; FERRIOLI, FILHO. F.; AMATO, V. S.; RASSI, G. G.; RASSI, J. A. Tratamento da fase crônica da doença de Chagas com nifurtimox associado a corticóide. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.35, p.547-550, 2002.

RASSI, A.; LUQUETTI, A. O.; RASSI JUNIOR, A.; RASSI, S. G.; RASSI, A. G. Chagas' Disease- Clinical Features. *In*: Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M. E.; Rassi A. (eds) **Chagas' Disease (American Trypanosomiasis): Its Impact on Transfusion and Clinical Medicine**, Ed. ISBT. São Paulo, p.81-101, 1992.

READY, P. D. Leishmaniasis emergence in Europe. **Euro Surveill**, v.15, n.10, p.1-11, 2010.

REGUERA, R.M.; TEKWANI, B.L; BALAÑA-FOUCE, R. Polyamine transport in parasites: A potential target for new antiparasitic drug development. **Comparative Biochemistry and Physiology**, part C 140, p.151-164, 2005.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J-C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous Leishmaniasis. **The Lancet**, v.7, p.581-596, 2007.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 349p.

REY, L. **Parasitologia**. 4ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

RIBEIRO, D. A.; DE OLIVEIRA, L. G. S.; DE MACÊDO, D. G.; DE MENEZES, I. R. A.; DA COSTA, J. G. M.; DA SILVA, M. A. P.; LACERDA, S. R.; DE SOUZA, M. M. A. Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v.155, n.3, p.1522–33, sep. 2014.

RODRIGUES, E. A.S.; LIMA, S. C. Alterações ambientais e os riscos de transmissão da leishmaniose tegumentar americana na área de influência da usina hidrelétrica (UHE) Serra do Facão, Goiás, Brasil. **Hygeia**, v.9, n.16, p.159-168, 2013.

RODRIGUES, F. F.; CAMILO, C. J.; GALVÃO-RODRIGUES, F. F.; LOPES, C. M.; DE ALMEIDA, S. C.; DA COSTA, J. G. M. Chemical profile, total phenols, total flavonoids and antioxidant activity of five species of the Caatinga biome. **Journal of Chemical e Pharmaceutical Research**, v.7, n.2, 2015.

SALIMENA, F. R. G. Novos sinônimos e tipificações em *Lippia* sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae). Darwiniana (1-4):121-125. Notas taxonômicas em Verbenaceae. **Rodriguésia**, v.66, n.1, p.191-197. 2002.

SALIMENA, F. R. G.; MULGURA, M. *Lippia*. In: **Lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2014.

SALIMENA, F. R. G.; MÚLGURA, M. Notas taxonômicas em Verbenaceae do Brasil Taxonomic notes in Verbenaceae of Brazil. **Rodriguésia**, v.66, n.1, p.191-197. 2015. DOI: 10.1590/2175-7860201566110

SALIMENA, F. R. G.; THODE, V.; MULGURA, M.; O'LEARY, N.; FRANÇA, F.; SILVA, T. R. S.; SOUZA, V.C. Verbenaceae. In: **Lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2014.

SANGENIS, L. H. C.; LIMA, S. R. D. A.; MELLO, C. X. D.; CARDOSO, D. T.; MELLO, J. N.; SANTO, M. C. C. D. E.; TAVARES, W. Expansion of visceral leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil: report of the first autochthonous case in the municipality of Volta Redonda and the difficulty of diagnosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.56, n.3, p.271-274, 2014.

SANTELLLO, F. H. **Efeito da administração de melatonina em ratos orquiectomizados e infectados *Trypanosoma cruzi***. Ribeirão Preto. 2009. 122p.

SANTORO, G. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G.; MENDONÇA, L. Z.; SOARES, M. J. *Trypanosoma cruzi*: activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Exp. Parasitol**, v.116, p.283-290, 2007.

SANTOS, K. K. A.; ROLÓN, M.; VEJA, C.; ARIAS, A. R.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Atividade leishmanicida in vitro de *Eugenia uniflora* e *Momordica charantia*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.34, p.47-50, 2013.

SANTOS, R. C.; MELO FILHO, A. A.; CHAGAS, E. A.; TAKAHASHI, J. A.; FERRAZ, V. P.; FERNANDEZ, I. M.; RIBEIRO, P. R. E.; MELO, A. C. G. R.; HOLANDA, L. C. Chemical composition, antimicrobial and anti-acetylcholinesterase activities of essential oil from *Lantana camara* (Verbenaceae) flowers. **Journal of Medicinal Plant Research**, v.9, p.922-928, 2015.

SASAGAWA, E.; AGUILAR, A. V.; RAMÍREZ, M. A.; CHÉVEZ, J. E.; NAKAGAWA, J.; CEDILLOS, R. A.; KITA, K. Acute Chagas disease in El Salvador 2000-2012 - Need for surveillance and control. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.109, n.2, p.256-8. Apr. 2014.

SCHENONE M, DANČÍK V, WAGNER BK, CLEMONS P A. Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. **Nat Chem Biol**, n.9, n.4, p.232–40. 2013.

SCHMIDT, T.J.; KHALID, S. A.; ROMANHA, A. J.; ALVES, T. M. A.; BIAVATTI, M. W.; BRUN, R.; COSTA, F. B.; DE CASTRO, S. L.; FERREIRA, V. F.; DE LACERDA, M. V. G.; LAGO, J. H. G.; LEON, L. L.; LOPES, N. P.; AMORIM, R. C. N.; NIEHUES, M.; OGUNGBE, I. V.; POHLIT, A. M.; SCOTTI, M. T.; SETZER, W. N.; SOEIRO, M. N. C.; STEINDEL, M.; TEMPONE, A. G. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - Part I. **Curr Med Chem**, n.19, p.2128–2175, 2012.

SCHMIDT, T.J.; KHALID, S. A.; ROMANHA, A. J.; ALVES, T. M. A.; BIAVATTI, M. W.; BRUN, R.; COSTA, F. B.; DE CASTRO, S. L.; FERREIRA, V. F.; DE LACERDA, M. V. G.; LAGO, J. H. G.; LEON, L. L.; LOPES, N. P.; AMORIM, R. C. N.; NIEHUES, M.; OGUNGBE, I. V.; POHLIT, A. M.; SCOTTI, M. T.; SETZER, W. N.; SOEIRO, M. N. C.; STEINDEL, M.; TEMPONE, A. G.. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - Part II. **Curr Med Chem**, n.19, p.176–2228, 2012.

SCHMUNIS, G. A. A tripanossomiase americana e seu impacto na saúde pública das Americas. *In*: Brener, Z.; Andrade, Z.; Barral-Neto, M. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**, 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2000.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v.115, p.14-21, 2010.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. STANGARLIN, J. R. CRUZ, M. E. S. Efeito do extrato bruto de plantas medicinais na indução de fitoalexinas em soja e sorgo. **Fitopatol. Bras**, Brasília, v.22 (suplemento), p.346, 1997.

SEIXAS, M. T. L.; SOUZA, J. N.; SOUZA, R. P.; TEIXEIRA, M. C. A.; SOARES, N. M. Avaliação da frequência de parasitos intestinais e do estado nutricional em escolares de uma área periurbana de Salvador, Bahia, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v.40, n.4, p.304-314, 2011.

- SEN, R.; CHATTERJEE, M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. *Phytomedicine*. **Elsevier GmbH**, v.18, n.1, p.1056–69, 2011.
- SHANDER, A.; CAPPELLINI, M. D.; GOODNOUGH, L.T. Iron overload and toxicity: the hidden risk of multiple blood transfusions. **Vox Sanguinis**, v.97, p.185–197, 2009.
- SHARIEF, A. H.; KHALIL, E. A. G.; THEANDER, T. G.; KHARAZMI, A.; OMER, S. A.; IBRAHIM, M. E. *Leishmania donovani*: an *in vitro* study of antimony-resistant amphotericin B-sensitive isolates. **Exp. Parasitol**, v.114, p.247-252, 2006.
- SHARMA, O. P.; SHARMA, S.; PATTABHI PATTABHI, V.; MAHATO, S. B.; SHARMA, P. D. A review of the hepatotoxic plant *Lantana camara*. **Critical Reviews Toxicology**, v.7, p.313-52, 2007.
- SHARMA, P.; SHARMA, J. D. In vitro hemolysis of human erythrocytes – by plant extracts with antiplasmodial activity. **J. Ethnopharm**, v.74, p.239-243, 2001.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clin Infect Dis**, v.54, n.6, p.845–852, 2012.
- SHUKLA, A.K.; SINGH, B.K.; PATRA, S.; DUBEY, V.K. Rational approaches for drug designing against leishmaniasis. **Appl. Biochem. Biotechnol**, v.160, p.2208-2218, 2010.
- SILVA, A. E. P.; GURGEL, H. C. Leishmaniose tegumentar americana e suas relações sócio ambientais no município de Ubatuba-SP. **Confins**, 2011. Disponível em: Acesso em: 21 jul 2015.
- SILVA, A. F.; LATORRE, M. R. D. O.; GALATI, E. A. B. Fatores relacionados à ocorrência de leishmaniose tegumentar no Vale do Ribeira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.1, p.46-51, 2010
- SILVA, J. E. C.; PARENTE, B.; BURGOS, V. O. Prevalência de parasitas intestinais em crianças de 05 a 12 anos, em Nova Alvorada do Sul-MS. **Interbio**, v.4, n.1, p.5-14, 2010.
- SILVA, L, COSTA, H. O.; DUPRAT, A. C.; BAIRÃO, F.; DELLA NINA, M. Granulomatose laríngea. Avaliação e métodos diagnósticos e terapêuticos em 24 casos. **ACTA ORL/ Técnicas em Otorrinolaringologia**, v.25, n.1, p.16-23, 2007.
- SILVA, M. I. G.; GONDIM, A. P. S.; NUNES, I. F.S.; SOUSA, F. C. F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Rev Bras Farmacogn**, v.16, p.455-462, 2006.
- SILVA, T. R. S. **Redelimitação e revisão taxonômica do gênero Lantana L. (Verbenaceae) no Brasil**. 1999. 176f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Botânica). Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, 1999.
- SILVA, T. R. S.; SALIMENA, F. R. G. *Lantana*. In: **Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. 2014. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15163>> Acesso em 03/08/2014.



SILVEIRA, P. D.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Rev bras farmacogn**, v.18, n.4, p.618-26, 2008.

SIMIC, M. G.; JAVANOVIC, S. V. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. *In*: HO, C.T., OSAWA, T., HUANG, T.M., ROSEN, R.T. (Ed.). **Food phytochemicals for cancer prevention**, Washington: American Chemical Society (ACS Symposium Series, n.546). p.20-33. 1994.

SIMÕES C, M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Sexta edição. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2010. 1102p.

SOARES SOBRINHO, J. L.; MEDEIROS, F. P. M.; DE LA ROCA, M. F.; SILVA, K. E. R.; LIMA, L. N. A.; ROLIM NETO, J. R. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da Doença de Chagas. **Rev Patol Trop.**, v.36, n.2, p.103-18, 2007.

SONIBARE, O. O.; EFFIONG, I. Antibacterial activity and cytotoxicity of essential oil of *Lantana camara* L. leaves from Nigeria. **African Journal of biotechnology**, v.7, n.1, 2008.

SOSA-ESTANI, S.; VIOTTI, R.; SEGURA, E. L. Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, n.104, (Suppl. I), p.167-80, 2009.

SOUSA, C. D. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. D.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v.3, n.2, p.351-355, 2007.

SOUSA, E. O. **Estudo químico e avaliação biológica de *Lantana camara* L. e *Lantana montevidensis* Briq. (Verbenaceae)**. 2010. 116p. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) – Universidade Regional do Cariri, Ceará, 2010.

SOUSA, E. O.; COSTA, J. G. Genus *Lantana*: chemical aspects and biological activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.22, n.5, p.1115-1180, 2012.

SOUSA, E. O.; COSTA, J. G. M. I. Genus *Lantana*: chemical aspects and biological activities. Curitiba. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.22, n.5, p.1155-1180. Sep./Oct. 2012. doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000058.

SOUSA, E. O.; MIRANDA, C. M.; NOBRE, C. B.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; COSTA, J. G. Phytochemical analysis and antioxidant activities of *Lantana camara* and *Lantana montevidensis* extracts. **Industrial Crops and Products**, v.70, p.7-15. 2015.

SOUSA, E. O.; ROCHA, J. B. T.; BARROS, L. M.; BARROS, A. R.; COSTA, J. G. M. Phytochemical characterization and in vitro antioxidant properties of *Lantana camara* L. and *Lantana montevidensis* Briq. **Industrial Crops and Products**, v.43, p.517-522, 2013b.

SOUSA, E. O.; RODRIGUES, F. F. G.; CAMPOS, A. R.; LIMA, S. G.; DA COSTA, J. G. M. Chemical composition and synergistic interaction between aminoglycosides antibiotics and essential oil of *Lantana montevidensis* Briq. **Natural product research**, v.27, n.10, p.942-945, 2013a.

SOUSA, E. O.; RODRIGUES, F. F.; COUTINHO, H. D.; CAMPOS, A. R.; LIMA, S. G.; COSTA, J. G. M. Chemical composition and aminoglycosides synergistic effect of *Lantana montevidensis* Briq.(Verbenaceae) essential oil. **Rec. Nat. Prod**, v.5, p.60-64, 2011.

SOUSA, M.; FERNANDES, M. J.; MOREIRA, P.; TEIXEIRA, V. H. Nutritional supplements usage by Portuguese athletes. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v.83, n.1, p.48-58, 2013.

SOUZA, R. K. D.; DA SILVA, M. A. P.; DE MENEZES, I. R. A.; RIBEIRO, D. A.; BEZERRA, L. R.; SOUZA, M. M. DE A. Ethnopharmacology of medicinal plants of carrasco, northeastern Brazil.,” **Journal of ethnopharmacology**, v.157, p.99–104, nov. 2014.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para a identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 3. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. p.674, 2012.

SPINDLER, P.; SJOBERG, P.; KNUDSEN L. E. First Exposure in Man: Toxicological Considerations. **Pharmacology e Toxicology**, v.86, n.1, p.8-12, 2000.

STEINDEL M, PACHECO LK, SCHOLL D, SOARES M, DE MORAES MH, EGER I, KOSMANNA C, SINCERO TCM, STOCO PH, MURTA SMF, CARVALHO-PINTO CJ, GRISARD EC. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.60, n.1, p.25-32, 2008.

STUMPF, M. Plantas herbáceas de sol - lantana-rasteira (*Lantana montevidensis*). **FazFacil Plantas e Jardim**, 3p. 2016. <http://www.fazfacil.com.br/jardim/lantana-montevidensis/>. Acessado em 19/03/2016.

TEMPONE, A.G.; BORBOREMA, S.E.T.; ANDRADE Jr, H.F.; GUALDA; N. C. A; YOGI; A; CRAVALHO; C.S; BACHIEGA; D; LUPO; F.N; BONOTTO; S.V; FISCHER; D.C.H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloidsproducing families. **Phytomedicine**, v.12, p.382-390, 2005.

TESH, R. Control of zoonotic visceral leishmaniasis. Is it time to change strategies? **Am. J. Trop. Med. Hygiene**, v.52, p.287-292, 1995.

TOLEZANO, J. E.; TANIGUCHI, H. H.; ELIAS, C. R.; LAROSA R. E. T. I. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Estado de São Paulo. III. Influência da ação antrópica na sucessão vetorial da LTA. **Revista Instituto Adolf Lutz**. v.60, n.1, p.47-51. 2001.

URBINA, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, suppl. I, p.311-318, 2009.

- URBINA, J. A.; DO CAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends Parasitol**, v.19, p.495-501, 2003.
- VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C. J.; TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Mol. Cell. Biochem**, v.266, n.1-2, p.37-56, Nov. 2004,
- VEIGA-JUNIOR, V. F.; MELLO, J. C. P. As monografias sobre plantas medicinais. **Rev Bras Farmacogn**, v.18, p.464-471, 2008.
- VENDRAMETTO, M. C; SANTOS, A. O; NAKAMURA, C. V; FILHO, B. P. D; CORTEZ, D. A. G; UEDANAKAMURA, T. Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoid-5, a compound isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallescens*. **Parasitol. Inter.**, v.59, p.154-158, 2010.
- VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.A.; ÁLVAREZ, M.G.; LOCOCO, B.E.; PETTI, M.A.; BERTOCCHI, G.L. and ARMENTI, A.H. The impact of socioeconomic conditions on chronic chagas disease progression. **Rev Esp Cardiol.**, v.62, n.11, p.1224-32, 2009.
- WACZUK, E. P.; KAMDEM, J. P.; ABOLAJI, A. O.; MEINERZ, D. F.; BUENO, D. C.; DO NASCIMENTO GONZAGA, T. K. S.; DOROW, T. S. DO C.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; ROCHA, J. B. T.; ÁVILA, D. S. *Euphorbia tirucalli* aqueous extract induces cytotoxicity, genotoxicity and changes in antioxidant gene expression in human leukocytes. **Toxicology Research**, v.4, n.3, p.739-748, 2015.
- WERNECK, G. L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Cad Saúde Pública**, v.26, (Lv), 2010.
- WHO. **Bulletin of the World Health Organization Past issues**. v.88, n.1, jan. 2010.
- WHO. **Leishmaniasis en las Américas: recomendaciones para el tratamiento**. Washington, D.C.: OPS, 2013. ISBN 978-92-75-31752-5
- WOLFSON, S. L.; SOLOMON, T. W. Poisoning by fruit of *Lantana camara*. **Am. J. Dis. Child**, v.107, p.109-112, 1964.
- WRIGLEY, S.; HAYS, M.; THOMAS, R.; CHRYSTAL, E. A source of new industrial products. **Phytochemical diversity**, Cambridge: Thomas Graham House, 1997.
- XIANG, Z.; NING, Z. S. Cavenging and antioxidant properties of compound derived from chlorogenic acid in South-China honeysuckle. **LWT-Food Science and Technology**, v.41, v.7, p.1189-1203, 2008.
- YAMANAKA, C. N. **Avaliação in vitro da atividade leishmanicida, tripanocida de derivados de diaminas**. 2012. 71p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e biociências) — Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, 2012.
- YANG, J.; GUO, J.; YUAN, J. *In vitro* antioxidant properties of rutin. **LWT-Food Science and Technology**, v.41, n.6, p.1060-1066, 2008.
- ZULANTAY, I.; BAGÁN, F.; SALAS, C.; ZILLERUELO, N.; OSUNA, A.; GIL, L. C.; RODRÍGUEZ, J.; ROJAS, A.; EGEA, J. L.; APT, W. Enfermedad de Chagas crônica. Ausencia de *Triatoma infestans* intradomiciliario y persistencia de *Trypanosoma cruzi* circulante post-terapia. **Parasitol. Latinoam.**, n.59, p.93-98, 2004.