

TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS DE *LANTANA MONTEVIDENSIS*: CONTRIBUIÇÃO PARA O SEU POTENCIAL FARMACOLÓGICO E SEUS COMPONENTES QUÍMICOS

Cicera S. da Silva^{1*}, Ricardo Gomes¹, Kleber Ribeiro¹, Luiz M. Barros², Jean P. Kamdem³

1. Estudantes de IC da Universidade Regional do Cariri, Biologia da URCA

2. Professor Pesquisador do Departamento de Biologia-URCA

3. Professor Pesquisador do Departamento de Biologia-URCA/Orientador

Resumo:

Lantana camara e *L. montevidensis*, são utilizadas na medicina tradicional para o mesmo fim (anti-asma, anti-úlceras, antitumorais, etc.), mas, pouco se sabe sobre a toxicidade de *L. montevidensis* e há informações limitadas sobre seus constituintes químicos.

Neste trabalho investigou-se a genotoxicidade e a citotoxicidade de extratos etanólicos (EtOH) e aquosos das folhas de *Lantana montevidensis* em leucócitos humanos, e sua possível interação com as membranas de eritrócitos humanos *in vitro*.

A capacidade antioxidante de ambos os extratos também foi investigada em modelos químicos e biológicos. Os extratos eliminaram o radical DPPH e impediram a peroxidação lipídica induzida pelo Fe²⁺ em homogenatos de cérebro de rato, e isso não foi atribuído à quelatação de Fe (II). A exposição de leucócitos humanos a altas concentrações de ambos os extratos (240-480 µg/mL) causou citotoxicidade, sem qualquer sinal de danos ao DNA (dados não mostrados). A análise por HPLC dos extratos mostrou diferentes quantidades de compostos polifenólicos que podem ter contribuído para esses efeitos. Esses resultados apoiam o uso funcional de *L. montevidensis* na medicina popular.

Autorização legal: O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFSM e registrado sob o número de protocolo 0089.0.243.000-07.

Palavras-chave: toxicidade; capacidade antioxidante; compostos polifenólicos;

Apoio financeiro: Universidade Regional do Cariri- URCA, PIBIC-FECOP, PIBIC-URCA.

Introdução:

As plantas com ações terapêuticas têm sido utilizadas por comunidades rurais e até mesmo pela população urbana no tratamento de várias doenças humanas, e seus efeitos benéficos foram atribuídos aos seus constituintes químicos. Isso se justifica pelo menos, em parte, porque os seus constituintes químicos podem ter uma actividade antioxidante, evitando assim o dano oxidativo resultante do stress oxidativo, que tem sido implicado em muitas doenças incluindo acidente vascular cerebral, câncer e neurodegeneração (Kamdem et al., 2016; Hassan et al., 2017).

O gênero *Lantana* é composto por cerca de 150 espécies em que *L. camara* e *L. montevidensis* são representados. As duas espécies são muito semelhantes do ponto de vista botânico e são usadas na medicina popular como carminativas, antiespasmódicas, antieméticas e para tratar infecções respiratórias, reumatismo, feridas, asma, febre biliar, bronquite, tumor, úlceras, hipertensão arterial, entre outras (Kalita et al., 2012).

Embora, *L. camara* seja estudada por suas propriedades farmacológicas, ela é reconhecida como uma das plantas mais tóxicas (Kalita et al., 2012). Seus efeitos tóxicos foram atribuídos à presença de lantadenos A, B e D (Kalita et al., 2012). Além disso, foi demonstrado que o óleo essencial obtido das folhas de *L. camara* é tóxico para fibroblastos NCTC92 (Barros et al., 2016). Adicionalmente, as folhas secas de *L. montevidensis* preparadas de diferentes maneiras (infusão, maceração, decocção) e seu óleo essencial têm sido utilizadas para os mesmos fins, como *L. camara*. Em oposição à amplamente estudada *L. camara*, muito poucos estudos têm demonstrado o potencial farmacológico de *L. montevidensis*. Extratos e

óleo essencial das folhas de *L. montevidensis* têm apresentado atividade antibacteriana com potencial para modular os antibióticos utilizados em infecções clínicas (Sousa et al., 2013). O extrato etanólico das folhas mostrou atividades antiinflamatórias, antipiréticas, analgésicas, antioxidantes e antibacterianas (Sousa et al., 2015).

O presente estudo buscou caracterizar quimicamente os extratos aquosos e etanólicos das folhas de *L. montevidensis* e avaliar suas propriedades bioativas. Seu potencial antioxidante (DPPH, TBARS e quelação de Fe^{2+}) e efeitos tóxicos (genotoxicidade e citotoxicidade), e sua influência na fragilidade osmótica foram investigados em leucócitos e eritrócitos humanos.

Metodologia:

Os produtos químicos eram de grau analítico. Acetonitrilo, ácido fosfórico, ácido gálico, ácido cafeico, ácido elágico, ácido clorogênico e catequina foram adquiridos à Merck (Darmstadt, Alemanha). Quercetina, quercitrina, isoquercitrina, kaempferol, luteolina, apigenina e a rutina foram adquiridas do Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD) foi realizada com um sistema HPLC Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com bombas Shimadzu LC-20AT alternadas ligadas a um desgaseificador DGU 20A5 com um CBM 20A Integrador, detector de matriz de diodo SPD-M20A e software de solução LC 1.22 SP1.

As folhas de *Lantana montevidensis* foram coletadas no Padre Cícero, Crato - Ceará (7 ° 22'S; 39 ° 28'W 492 m acima do nível do mar), Brasil. O material vegetal foi identificado e o espécime foi depositado no Herbário Caririense Dárdano de Andrade - Lima, Universidade Regional do Cariri (URCA), com sob o número 7519. Para o extrato aquoso de *L. montevidensis* foram misturados 300 g de folhas frescas trituradas com 2L de água quente e a mistura foi deixada em repouso durante 3 dias. No terceiro dia, a mistura foi filtrada e o filtrado liofilizado.

Contudo, para o extrato etanólico (EtOH), 300g das folhas frescas trituradas foram maceradas com 1,5 L de etanol a 92% durante 3 dias. A suspensão foi filtrada e o filtrado foi evaporado sob pressão e liofilizado para se obter um sólido castanho escuro. Os extratos preparados (aquoso e etanólico) foram armazenados no congelador até serem utilizados.

As análises cromatográficas em fase reversa foram realizadas por HPLC em condições de gradiente, utilizando coluna Phenomenex C18 (4,6 mm x 250 mm) embalada com partículas de 5 μ m de diâmetro. Os extratos (etanólico e aquoso) das folhas de *L. montevidensis* foram filtrados através de filtro de membrana e depois desgaseificados por banho ultra-sônico antes do uso. Os extratos foram analisados na concentração de 30 mg/mL.

A atividade antioxidante foi determinada pela capacidade dos extratos de *L. montevidensis* de captar o radical DPPH, tal como descrito por Kamdem et al. (2012). A atividade quelante de Fe^{2+} dos extratos etanólico e aquoso das folhas de *L. montevidensis* foi determinada usando o método modificado por Kamdem et al. (2013). A produção de TBARS foi determinada como modificado por Barbosa-Filho et al. (2014).

O sangue venoso heparinizado foi obtido de doadores voluntários saudáveis do Hospital da Universidade Federal de Santa Maria (HUFMS), Santa Maria-RS, Brasil (idade 26 ± 9). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Utilizou-se análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA) seguida de Bonferroni pós-teste, quando apropriado, para avaliar as diferenças entre os grupos. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados e Discussão:

A Figura 1 mostra que o extrato etanólico (Fig. 1A) e o aquoso (Fig. 1B) exibiram um ligeiro efeito citotóxico em leucócitos nas concentrações mais elevadas testadas (240-480 $\mu\text{g/mL}$), quando comparado ao controle. No entanto, ambos os extratos (1-480 $\mu\text{g/mL}$) não tiveram efeito genotóxico em relação ao controle (dados não mostrados). Embora não tenhamos identificado os constituintes responsáveis pelo efeito citotóxico, alguns dos compostos identificados incluindo rutina, quercetina e kaempferol, demonstraram ter efeitos tóxicos a concentrações relativamente elevadas (Soares et al., 2006).

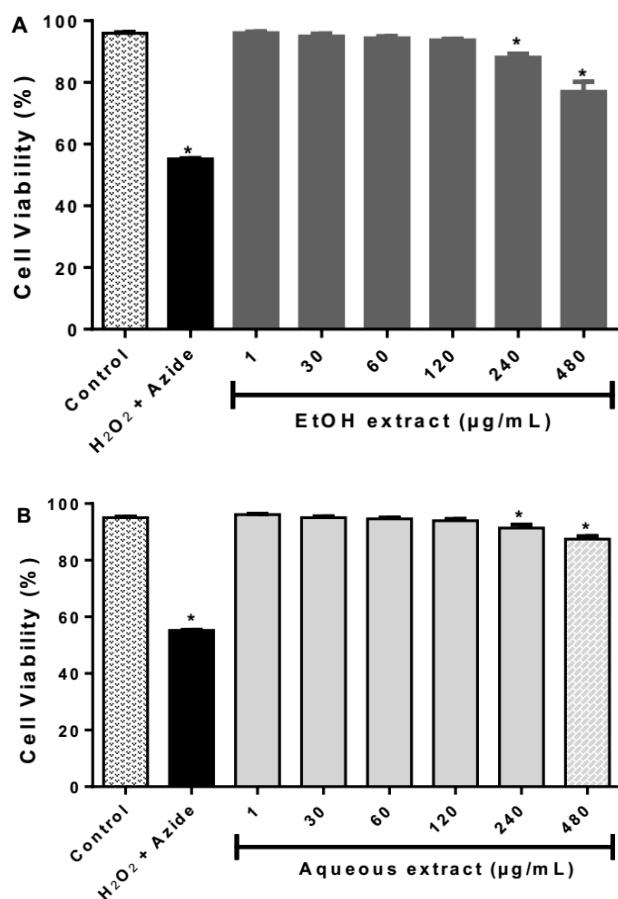


Figura 1: Efeito do extrato etanólico (A) e aquoso (B) das folhas de *L. montevidensis* em leucócitos humanos. *p < 0,05 indica a diferença significativa quando comparado ao controle.

Como pode ser visto na Tabela 1, os extratos sequestraram o radical DPPH em concentração dependente e inibiram a peroxidação lipídica induzida pelo Fe²⁺ nos homogenatos de cérebro de ratos (Figura 2).

Tabela 1: Percentagem de inibição do radical DPPH pelo extrato EtOH e aquoso das folhas de *L. montevidensis*.

Concentration (µg/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	-
IC ₅₀ (µg/mL)	290.5 ± 1.97 ^c	108.2 ± 3.46 ^b	37.05 ± 1.69 ^a

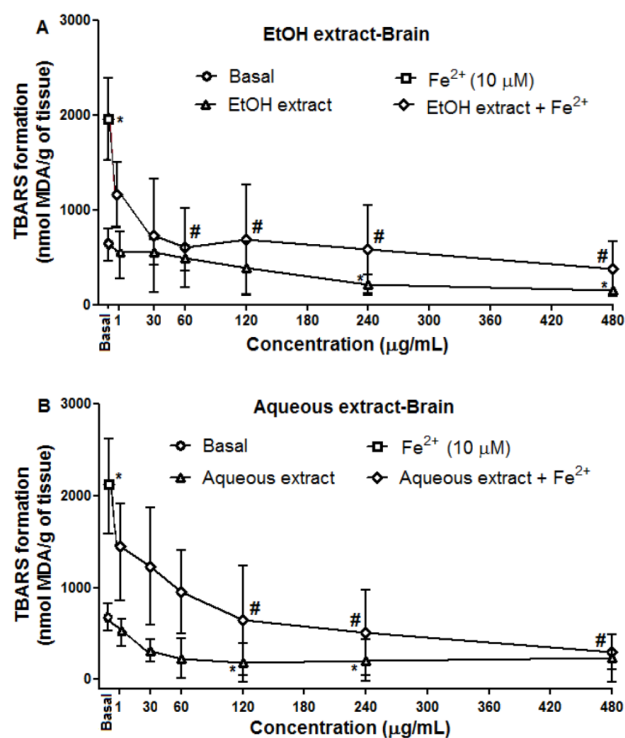


Figura 2: Inibição da peroxidação lipídica induzida pelo Fe²⁺ em homogenatos de cérebro. A= extrato EtOH e B = aquoso das folhas de *L. montevidensis*. Os resultados são expressos como média ± SEM de n = 3 experiência independente realizada em duplicado. *p < 0,05 vs. basal; e # p < 0,05 vs. Fe²⁺.

A análise dos extratos por HPLC mostrou quantidades diferentes de compostos polifenólicos (Tabela 2) que podem ter contribuído para esses efeitos.

Tabela 2: Análise quantitativa dos compostos fenólicos e flavonóides do extrato etanólico e aquoso das folhas de *L. montevidensis*

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

Conclusões:

A exposição de leucócitos humanos a altas concentrações de ambos os extratos (240-480 µg/mL) causou citotoxicidade, sem qualquer sinal de danos ao DNA (dados não mostrados), indicando que deve ser tomado cuidado quanto à dosagem e frequência de *L. montevidensis* na medicina tradicional. No entanto, o tratamento de eritrócitos humanos com ambos os extratos (1-480 µg/mL) não teve qualquer efeito sobre as membranas dos eritrócitos (dados não mostrados).

Os extratos (etanólico e aquoso) exibiram uma forte atividade antioxidante como evidenciado pela sua atividade de remoção de radicais DPPH e a sua eficácia para inibir a peroxidação lipídica em homogenatos de cérebro de rato e de ratos (dados não mostrados). Esses efeitos podem ser atribuídos à presença de fitoquímicos bioativos encontrados em *L. montevidensis*, podendo, justificar seu uso farmacológico na medicina popular.

Referências bibliográficas

Barbosa-Filho VM, Waczuk EP, Kamdem JP, Abolaji AO, Lacerda SR, da Costa JGM, et al. **Phytochemical constituents, antioxidant activity, cytotoxicity and osmotic fragility effects of Caju (*Anacardium microcarpum*)**. Ind Crops Prod. 2014; 55: 280-8.

Barros LM, Duarte AE, Morais-Braga MFB, Waczuk EP, Vega C, Leite NF, et al. **Chemical characterization and trypanocidal,**

leishmanicidal and cytotoxicity potential of *Lantana camara* L. (Verbenaceae) essential oil. Molecules 2016; 21, 209.doi:10.3390/molecules21020209.

Hassan W, Noreen H, Rehman S, Gul S, Kamal MA, Kamdem JP, Zaman B, da Rocha JBT. **Oxidative stress and antioxidant potential of one hundred medicinal plants.** Curr Top Med Chem. 2017; doi: 10.2174/1568026617666170102125648

Kalita S, Kumar G, Karthik L, Rao KVB. **A review on medicinal properties of *Lantana camara* Linn.** Res J Pharm Tech. 2012; 5: 711-715.

Kamdem JP, Stefanello ST, Boligon AA, Wagner C, Kade IJ, Pereira RP, et al. **In vitro antioxidant activity of stem bark of *Trichilia catigua* Adr.** Acta Pharm. 2012; 62: 371-606.

Kamdem JP, Adeniran A, Boligon AA, Klimaczewski CV, Elekofehinti OO, Hassan W, et al. **Antioxidant activity, genotoxicity and cytotoxicity evaluation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ethanolic extract: Its potential role in neuroprotection.** Ind Crops Prod. 2013; 51: 26-34

Kamdem JP, Abolaji AO, Elekofehinti OO, Omotuyi IO, Ibrahim M, Hassan W, Barbosa NV, Souza DO, Rocha JBT. **Therapeutic Potential of Plant Extracts and Phytochemicals Against Brain Ischemia-Reperfusion Injury: A Review.** The Nat Prod J. 2016; 6: 250-284.

Soares VCG, Varanda EA, Raddi MSG. **In vitro basal and metabolism-mediated 650 cytotoxicity of flavonoids.** Food Chem Toxicol. 2006; 44: 835-38.

Sousa EO, Rodrigues FFG, Campos AR, Lima SG, da Costa JGM. **Chemical composition and synergistic interaction between aminoglycosides antibiotics and essential oil of *Lantana montevidensis* Briq.** Nat Prod Res. 2013; 27: 942-45.

Sousa EO, Miranda CM, Nobre CB, Boligon AA, Athayde ML, Costa JG. **Phytochemical analysis and antioxidant activities of *Lantana camara* and *Lantana montevidensis* extracts.** Ind Crops Prod. 2015; 70: 7-15.