

Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma* e anti-*Leishmania* de *Mentha arvensis* e *Turnera ulmifolia*

[Evaluation of the anti-*Trypanosoma* and anti-*Leishmania* activity of *Mentha arvensis* and *Turnera ulmifolia*]

Karla K.A. SANTOS¹, Edinaldo F.F. MATIAS¹, Celestina E. SOBRAL-SOUZA¹, Saulo R. TINTINO¹,
Maria F.B. MORAIS-BRAGA¹, Glaucia M.M. GUEDES¹, Miriam ROLÓN², Celeste VEGA², Antonieta Rojas de ARIAS²,
José G.M. COSTA³, Irwin R.A. MENEZES⁴ & Henrique D.M. COUTINHO^{1*}

¹Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil

²Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC), Fundación Moisés Bertoni/Laboratorios Díaz Gill, Asunción-Paraguay

³Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil

⁴Laboratório de Farmacologia e Química Medicinal, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil.

Contactos / Contacts: Henrique Douglas Melo COUTINHO - E-mail address: hdmcoutinho@gmail.com

Abstract

Tripanosomiasis or “Chagas disease”, caused by *Trypanosoma cruzi*, affect 10 million people in Latin America. Today, the chemotherapy is the only specific treatment against this disease, being the most used drugs the nifurtimox and benznidazole. Leishmaniasis is a disease caused by parasites of the genus *Leishmania*, mainly founded in regions with forests, as the Amazonia. Recent reports about the Leishmaniasis indicate a deficit of therapeutical drugs available against this disease and reinforce the necessity of the discovering of new drugs. An interesting approach against these diseases is the use of natural products, as the extracts of plants as *Mentha arvensis* and *Turnera ulmifolia*. For the *in vitro* assays against *T. cruzi* and *Leishmania*, was used the clone CL-B5 and promastigote forms, respectively. The cytotoxic assay was performed using fibroblasts. Our results indicated that *M. arvensis* was active against all strains assayed, inhibiting 65 e 47% of the assayed strains ($IC_{50} = 192.3$ and $531.9 \mu\text{g/mL}$ respectively), representing an interesting and alternative source of natural products with anti-kinetoplastida activity.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensi*, *Mentha arvensis*, *Turnera ulmifolia*, cytotoxic activity, trypanocidal activity, Chagas disease.

Resumo

Doença de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, afeta cerca de 10 milhões de pessoas nas Américas. Atualmente, a quimioterapia é o único tratamento específico disponível para esta doença, onde os medicamentos utilizados são nifurtimox e benznidazol. Leishmaniose tegumentar Americana no Brasil é causada por uma variedade de espécies de *Leishmania* e uma grande diversidade destes parasitos pode ser encontrada na Região Amazônica. Revisões recentes na quimioterapia de leishmaniose enfatizam as deficiências dos agentes terapêuticos atualmente disponíveis e mostram a necessidade urgente de novos candidatos. Uma alternativa para substituir esses medicamentos são extratos naturais de *Mentha arvensis* e *Turnera ulmifolia*. Foram preparados extratos etanólicos das folhas de *M. arvensis* e *T. ulmifolia*. Para os testes *in vitro* de *T. cruzi*, foi utilizado o clone CL-B5 e para *Leishmania braziliensis* foram utilizadas formas promastigotas. O ensaio de citotoxicidade foi realizado com linhagens de fibroblastos. Nossos resultados indicam que *M. arvensis* foi eficaz contra as cepas de parasitos testadas apresentando 65 e 47% de inibição em uma concentração de $500 \mu\text{g/mL}$ (respectivamente, $CE_{50} = 192.3$ e $531.9 \mu\text{g/mL}$), sendo considerada uma fonte alternativa de produtos naturais com atividade contra *T. cruzi* e *L. braziliensis*.

Palavras Chave: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensi*, *Mentha arvensis*, *Turnera ulmifolia*, atividade citotóxica, atividade tripanocida, doença de Chagas.

Recibido | Received: 28 de julio de 2011.

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 12 de Enero de 2012.

Publicado en línea | Published online: 30 de Marzo de 2012.

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: Karla KA Santos, Edinaldo FF Matias, Celestina E. Sobral-Souza, Saulo R. Tintino, Maria FB Moraes-Braga, Glaucia MM Guedes, Miriam Rolón, Celeste Vega, Antonieta Rojas de Arias, José GM Costa, Irwin RA Menezes, Henrique DM Coutinho. 2012. Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma* e anti-*Leishmania* de *Mentha arvensis* e *Turnera ulmifolia*. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 11(2): 147 – 153.

INTRODUÇÃO

Países em desenvolvimento, ricos em biodiversidade e com abundantes conhecimentos tradicionais como no caso do Brasil, ainda apresentam uma alta incidência das chamadas “doenças negligenciadas”, como tuberculose, malária, leishmaniose e doença de Chagas (Funari e Ferro, 2005). O Brasil tem a maior biodiversidade vegetal do mundo, com mais de 55 mil espécies de plantas catalogadas, de um total de 550 mil espécies (Elisabetsky e Costa-Campos, 1996), no entanto, somente 8% têm sido estudadas na procura de compostos bioativos (Garcia *et al.*, 1996).

A doença de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, afeta cerca de 10 milhões de pessoas nas Américas (WHO, 2010). O parasito pode ser transmitido aos humanos por insetos triatomíneos, alimentos contaminados pelas fezes do inseto, transfusão de sangue, transplantes de órgãos a partir de doadores infectados e por via transplacentária (WHO, 2010). Atualmente, a quimioterapia é o único tratamento específico disponível para esta doença, onde os medicamentos utilizados são nifurtimox e benzonidazol (WHO, 2010), que mostra uma taxa de cura de 50-70% na fase aguda e menos de 20% na fase crônica (Dias *et al.*, 2009). Vários estudos envolvendo a análise de extratos de plantas têm revelado uma alternativa na procura por compostos com potencial contra *T. cruzi*, como por exemplo, extratos de *Arrabidaea triplinervia* (Leite *et al.*, 2006), *Dracocephalum kotschyi* (Saeidnia *et al.*, 2004) e *Azorella compacta* (Araya *et al.*, 2003).

Leishmaniose tegumentar Americana no Brasil é causada por uma variedade dermatrópica de espécies de *Leishmania* e uma grande diversidade destes parasitos pode ser encontrada na Região Amazônica (Rangel e Lainson, 2009). Revisões recentes sobre a quimioterapia de leishmaniose enfatizam as deficiências dos agentes terapêuticos atualmente disponíveis e mostram a necessidade urgente de novos candidatos (Croft *et al.*, 2005; Croft *et al.*, 2006). Leishmaniose é um grupo de doenças tropicais causada por parasitos de cerca de 20 espécies do gênero *Leishmania*, que foram transmitidos por um grupo de 50 espécies e subespécie de insetos flebotomíneos (Tesh, 1989; Young e Duncan, 1994). Leishmaniose apresenta diversas e complexas manifestações clínicas (Desjeux, 2004).

A avaliação da toxicidade de substâncias ativas é um dos primeiros passos para a utilização destes compostos em modelos animais. Atualmente as drogas utilizadas para parasitos como *T. cruzi* e *L.*

braziliensis mostra uma alta toxicidade porque metabólitos produzidos afetam tecidos do hospedeiro devido a sua alta reatividade (Dias *et al.*, 2009).

Mentha arvensis (Labiatae) é uma planta herbácea que ocorre em toda América do Sul. Esta planta e particularmente seu óleo essencial são comumente usados na medicina popular, explorando uma ampla gama de atividades biológicas e farmacológicas (Coutinho *et al.*, 2008; 2009a). Vários compostos tem sido isolado destes óleos, principalmente mentol, *p*-mentona, acetato de mentol e outros fitoquímicos (Wannissorn *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2005).

Turnera ulmifolia L. (Turneraceae), uma pequena erva anual, pode ser encontrado no Norte e Nordeste brasileiro, onde é considerada uma erva daninha (Braga, 1976). Ela cresce preferencialmente em solos arenosos e em encostas. *T. ulmifolia* já é conhecida por ser de valor medicinal, sendo utilizada popularmente como anti-inflamatórios, como um expectorante, e no tratamento de vários problemas (Braga, 1976; Pio Corrêa, 1984; Hosamani, 1993). Autores detectaram flavonoides, alcaloides, taninos e compostos fenólicos em preparados desta planta (Antonio e Souza Brito, 1998; Gracioso *et al.*, 2002; Nascimento *et al.*, 2006) assim como diversas atividades farmacológicas (Coutinho *et al.*, 2009b; 2010).

MATERIAIS E METODOS

Material vegetal

Folhas de *M. arvensis* e *T. ulmifolia* foram coletadas na estação chuvosa (Abril, 2008) na cidade do Crato, estado do Ceará, Brasil. O material vegetal foi identificado pela Dra. Arlene Pessoa, e as exsiccatas foram depositadas com os números 2886 e 1618, respectivamente, no Herbário “Dárdano de Andrade Lima” da Universidade Regional do Cariri – URCA.

Preparação dos Extratos Etanólicos de Mentha arvensis (EEMA) e Turnera ulmifolia (EETU)

200 g de folhas de cada espécie foram secas em estufa e pulverizadas em temperatura ambiente. O material pulverizado foi macerado utilizando 1L de etanol 95% em temperatura ambiente durante 72h. O extrato obtido foi filtrado e concentrado à vácuo em rotaevaporador a 60°C e 760mm/Hg de temperatura e pressão, respectivamente (Brasileiro *et al.*, 2006). O rendimento dos extratos obtidos foi entre 5-6 g de cada extrato. Os extratos EEMA e EETU foram diluídos em DMSO para realização dos testes.

Linhagens celulares utilizadas

Para os testes *in vitro* de *T. cruzi*, foi utilizado o clone CL-B5 (Buckner *et al.*, 1996). Os parasitos, transfectados de forma estável com o gene para a β -galactosidase de *Escherichia coli* (*lacZ*), foram fornecidos pelo Dr. F. Buckner através do Instituto Conmemorativo Gorgas (Panama). As formas epimastigotas foram cultivadas a 28° C em Meio de cultura *Liver Infusion Tryptose Broth* (Difco, Detroit, MI), suplementado com Soro Fetal Bovino 10% (SFB) (Gibco, Carlsbad, CA), penicilina (Ern, S.A., Barcelona, Spain) e estreptomomicina (Reig Jofré S.A., Barcelona, Spain), conforme descrito por Le Senne *et al.*, (2002). As células foram coletadas para os testes na fase exponencial de seu crescimento.

Culturas de *Leishmania* spp. foram obtidas do Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Asunción, Paraguay - IICS e identificadas por análise isoenzimática. A manutenção das linhagens, forma de cultivo e isolamento das formas promastigotas de *Leishmania* spp. Seguiram os procedimentos descritos por Roldos *et al.*, (2008). Os ensaios de inibição das formas promastigotas foram realizados utilizando a linhagem de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), cultivada a 22° C em meio Schneider's *Drosophila*, suplementado com SFB 20%.

Os ensaios de citotoxicidade utilizaram a linhagem de fibroblastos NCTC929, cultivada em Minimal Essential Medium (Sigma). O meio de cultura foi suplementado com SFB inativada por calor (10%), penicilina G (100 U/mL) e estreptomomicina (100 mg/mL). As culturas foram mantidas a 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. A viabilidade destas linhagens foi avaliada através do uso da resazurina como método colorimétrico (Rolón *et al.*, 2006).

Reagentes

Resazurina sódica foi obtida da Sigma-Aldrich (St Louis, MO) e estocada a 4°C ao abrigo da luz. A solução de resazurina foi preparada com tampão fosfato 1%, pH 7 e esterilizada por filtração antes de ser utilizada. O Clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosídeo (CPRG; Roche, Indianapolis, IN) foi dissolvido em uma solução de Triton X-100 0.9% (pH 7.4). Penicilina G (Ern, S.A., Barcelona, Spain), estreptomomicina (Reig Jofré S.A., Barcelona, Spain) e Dimetilsulfóxido (DMSO) também foram utilizados.

Teste de atividade anti-epimastigota

O teste foi realizado em microplacas com 96 cavidades, com culturas na fase exponencial, conforme

descrito por Vega *et al.*, (2005). Epimastigotas foram inoculados em uma concentração de 1×10^5 mL⁻¹ em 200 μ L de caldo de fígado triptose. As placas foram então incubadas com as drogas nas concentrações de 100 e 500 μ g/mL a 28° C por 72 h. Após este tempo, foram adicionados 50 μ L da solução de CPRG, de forma a atingir uma concentração final de 200 μ M. As placas foram incubadas por um tempo adicional de 6h a 37°C e foram submetidas a visualização sob 595nm. Cada experimento foi realizado duas vezes e de forma independente, tendo sido cada concentração testada em triplicata em cada experimento. A eficiência de cada composto foi estimada através do cálculo do percentual de atividade anti-epimastigota (AE%).

Teste de atividade antipromastigota

Culturas de formas promastigotas de *L. braziliensis* foram cultivadas até uma concentração de 10^6 células/mL e então transferidas para o teste. Os compostos foram dissolvidos em DMSO até as concentrações a serem testadas e foram transferidos para as microplacas. Cada ensaio foi realizado em triplicata. A atividade dos compostos foi avaliada após 72h por contagem direta das células após diluições seriadas e comparadas com um controle não tratado.

Teste de citotoxicidade

Fibroblastos NCTC929 foram plaqueados em placas de microdiluição de 96 cavidades a uma concentração final de 3×10^4 células/cavidade. As células foram cultivadas a 37° C em atmosfera com 5% de CO₂. Após isso, o meio de cultura foi removido e os compostos foram adicionados a 200 μ L, sendo realizado um novo cultivo por 24 h. Após esta incubação, 20 μ L de uma solução de Resazurina 2 mM foi adicionada em cada cavidade. As placas foram incubadas por 3h e a redução da resazurina foi determinada através de dupla absorbância nos comprimentos de onda de 490 e 595 nm. O valor do controle (branco) foi subtraído. Cada concentração foi testada em triplicata.

Análise estatística

A concentração efetiva (CE₅₀) foi calculada através do método de regressão linear.

RESULTADOS

Os resultados são mostrados na Tabela 1, o extrato etanólico de *M. arvensis* (EEMA) apresentou toxicidade moderada na concentração de 100 μ g/mL, já o extrato etanólico de *T. ulmifolia* (EETU) não demonstrou citotoxicidade na concentração de 100

µg/mL. Quanto à avaliação da atividade antiparasitária, EEMA apresentou 65% e 47% de inibição em *T. cruzi* e *L. braziliensis* respectivamente em 500 µg/mL e 25% de inibição para *T. cruzi* em uma concentração de 100 µg/mL, nesta concentração

não foi observada atividade contra *L. braziliensis*. Já EETU apresentou 29% e 9% de inibição em *T. cruzi* e *L. braziliensis* respectivamente em 500 µg/mL, não houve atividade quando a concentração testada foi 100µg/mL.

Tabela 1
Atividade antiepimastigota *T. cruzi*, atividade antipromastigota *L. braziliensis* e citotoxicidade

Extratos/ Drogas	Concentração (µg/mL)	Citotoxicidade (%C)	Atividade antiparasitária			
			<i>T. cruzi</i> (%AE)	CE ₅₀ (µg/mL)	<i>L. braziliensis</i> (%AP)	CE ₅₀ (µg/mL)
EEMA	500	75	65	192.3	47	531.9
	100	31	25		0	
EETU	500	49	29	862.1	9	2777.8
	100	0	0		0	
Nif	1	-	54.9	0.91	-	-
	0.5	-	45.6		-	
Metro	2	-	-	-	100	0.51
	1	-	-		97.9	

DISCUSSÃO

A estratégia de pesquisa por novos fármacos para o tratamento da doença de chagas passa por ensaios *in vitro* e *in vivo* que são executados em diferentes etapas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) um candidato deve ser submetido a ensaios *in vitro* de citotoxicidade e atividade antiparasitária, realizada essa primeira triagem os resultados são analisados para definir a possibilidade de ensaios *in vivo* (Dias et al., 2009).

Os resultados demonstram que o extrato de *M. arvensis* apresentou uma melhor atividade contra as duas linhagens de parasitos quando comparado com o extrato de *T. ulmifolia*. Contra as formas epimastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *L. braziliense*, *M. arvensis* apresentou um percentual de inibição próximo ou maior que 50% de inibição a uma concentração de 500 µg/mL, dado importante visto que uma inibição neste nível com uma concentração de 500µg/mL é considerado clinicamente relevante (Rosas et al., 2007). Este é o primeiro relato de atividade anti-*Trypanosoma* e anti-*Leishmania* para *M. arvensis*. Outras espécies do gênero *Mentha* já foram testadas contra *T. cruzi*. *M. spicata* demonstrou atividade moderada e *M. piperita* foi inativa contra formas epimastigotas (Rojas et al., 2010). Estudos realizados com o extrato etanólico de *Eugenia*

jambolana mostrou atividade expressiva contra epimastigotas de *T. cruzi* sendo capaz de eliminar 100% da amostra em uma concentração de 100 µg/mL (Santos et al., 2011). Extrato de *Haplophyllum myrtifolium* já foi testado contra formas promastigotas de *Leishmania*, demonstrando uma atividade inibitória significativa contra o parasito (Östan et al., 2007), diversos estudos tem demonstrado atividade relevante de plantas medicinais frente as diversas formas do protozoário do gênero *Leishmania*, tais como *Arbutus unedo* (Kivçak et al., 2009) e *Allium sativum* (Wabwoba et al., 2010).

Um importante critério na procura por compostos ativos com atividade tripanocida e leishmanicida é a avaliação da toxicidade em células do hospedeiro. A atividade citotóxica de outras plantas foram avaliadas em diferentes modelos de células humanas, tais como: linfócitos humanos (Reyes-Chilpa et al., 2008), células MRC-5 (Cabral et al. 2010) e macrófagos peritoneais (Houghton et al., 2007).

CONCLUSÕES

Nossos resultados indicam que *M. arvensis* foi eficaz contra as cepas de parasitos testadas apresentando uma fonte alternativa de produtos naturais com atividade contra *T. cruzi* e *L. braziliensis*. Em se tratando da

citotoxicidade novos testes devem ser realizados já que os níveis foram elevados, viabilizando futuros ensaios *in vivo*.

REFERENCES

- Antonio MA, Souza Brito AR. 1998. Oral anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of a hydroalcoholic extract and partitioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). **J Ethnopharmacol** 61: 215 - 228.
- Araya JE, Neira I, Silva S, Mortara RA, Manque P, Cordero E, Sagua H, Loyola A, Bórquez J, Morales G, González J. 2003. Diterpenoids from *Azorella compacta* (Umbelliferae) active on *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 98: 413 - 418.
- Braga R. 1976. **Plantas do nordeste, especialmente do Ceará**. 3rd Ed. Fortaleza. ESAM (Coleção Mossoroense).
- Brasileiro BG, Pizziolo VR, Raslan DS, Jamal CM, Silveira D. 2006. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Rev Bras Cs Farm** 42: 195 - 202.
- Buckner FS, Verlinde CL, La Flamme AC, Van Voorhis WC. 1996. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrob Agents Chemother** 40: 2592 - 2597.
- Cabral MMO, Barbosa-Filho JM, Maia GLA, Chaves MCO, Braga MV, De Souza W, Soares RO. 2010. Neoglicans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against *Trypanosoma cruzi*. **Exp Parasitol** 124: 319 - 324.
- WHO 2010. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). In: WHO-World Health Organ fact sheet N° 340. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> [consultado em 9 de Setembro, 2010].
- Coutinho HD, Costa JG, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira Jr JP. 2008. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy** 54: 328 - 330.
- Coutinho HD, Costa JG, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira Jr JP. 2009a. Potentiating effect of *Mentha arvensis* and chlorpromazine in the resistance to aminoglycosides of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **In Vivo** 23: 287 - 289.
- Coutinho HD, Costa JG, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira Jr JP. 2009b. Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. **BMC Complement Altern Med** 9: 13 - 16.
- Coutinho HD, Costa JG, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira Jr JP. 2010. Increasing of the aminoglycoside antibiotic activity against a multidrug resistant *E. coli* by *Turnera ulmifolia* L. and chlorpromazine. **Biol Res Nurs** 11: 332 - 335
- Croft SL, Barrett MP, Urbina JA. 2005. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends in Parasitol** 21: 508 - 512.
- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. 2006. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin Microbiol Rev** 19: 111 - 126.
- Desjeux P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis** 27: 305 - 318.
- Dias LC, Dessoy MA, Silva JN, Thiemann OH, Oliva G, Andricopulo AD. 2009. Chemotherapy of Chagas' Disease: State of the art and perspectives for the development of new drugs. **Quim Nova** 32: 2444 - 2457.
- Duarte MC, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VL, Delarmelina C. 2005. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **J Ethnopharmacol** 97: 305 - 311.
- Elisabetsky E, Costa-Campos L. 1996. Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. **J Ethnopharmacol** 51: 110 - 120.
- Funari CS, Ferro VO. 2005. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Rev Bras Farmacogn** 15: 178 - 182.
- Garcia ES, Silva ACP, Gilbert B, Corrêa CBV, Cavalheiro MVS, Santos RR. 1996. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Campinas. Editora da UFSC, Santa Catarina, Brazil.
- Gracioso JS, Vilegas W, Hiruma-Lima CA, Souza Brito AR. 2002. Effects of tea from *Turnera ulmifolia* L. on mouse gastric mucosa support the Turneraceae as a new source of

- antiulcerogenic drugs. **Biol Pharma Bull** 25: 487 - 491.
- Hosamani KM. 1993. Fatty acids in seed oil from *Turnera ulmifolia*. **Phytochemistry** 34: 1363 - 1365.
- Houghton PJ, Howes MJ, Lee CC, Steventon G. 2007. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **J Ethnopharmacol** 110: 391 - 400.
- Kivçak B, Mert T, Ertabaklar H, Balcioglu IC, Ozensoy Töz S. 2009. In vitro activity of *Arbutus unedo* against *Leishmania tropica* promastigotes. **Turkiye Parasitol Derg** 33: 114 - 115.
- Le Senne A, Muelas-Serrano S, Fernandez-Portillo C, Escario JÁ, Gómez-Barrio A. 2002. Biological characterization of a beta-galactosidase expressing clone of *Trypanosoma cruzi* CL strain. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 97: 1101 - 1105.
- Leite JPV, Oliveira AB, Lombardi JA, Filho JDS, Chiari E. 2006. Trypanocidal activity of Triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and Derivates. **Biol Pharma Bull** 29: 2307 - 2309.
- Nascimento MA, Silva AK, Franca LC, Quignard EL, Lopez JÁ, Almeida MG. 2006. *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae): Preliminary study of its antioxidant activity. **Biores Technol** 97: 1387 - 1391.
- Östan I, Sağlam H, Limoncu ME, Toz SÖ, Özbel Y, Özbilgin A. 2007. *In vitro* and *in vivo* activities of *Haplophyllum myrtifolium* against *Leishmania tropica*. **New Microbiol** 30: 439 - 445.
- Pio Corrêa M. 1984. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. 3rd Ed. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, Brazil.
- Rangel EF, Lainson R. 2009. Proven and putative vectores of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 104: 937 - 954.
- Reyes-Chilpa R, Estrada-Muñoz E, Veja-Avila E, Abe F, Kinjo J, Hernández-Ortega S. 2008. Trypanocidal constituents in plants. 7. Mamea-type coumarins. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 103: 431 - 436.
- Rojas J, Sólis H, Palacios O. 2010. Evaluación *in vitro* de la actividad anti *Trypanosoma cruzi* de aceites esenciales de diez plantas medicinales. **An Fac Med** 71: 161 - 165.
- Roldos V, Nakayama H, Rolón M, Montero-Torres A, Trucco F, Torres S, Vega C, Marrero-Ponce Y, Hagueburu V, Yaluff G, Gómez-Barrio A, Sanabria L, Ferreira ME, Rojas de Arias A, Pandolfi E. 2008. Activity of a hydroxybenzyl bryophyte constituent against *Leishmania spp* and *Trypanosoma cruzi*: In silico, in vitro and in vivo activity studies. **Eur J Med Chem** 43: 1797 - 1807.
- Rolón M, Seco E, Vega C, Nogal JJ, Escario JA, Gómez-Barrio A, Malpartida F. 2006. Selective activity of polyene macrolides produced by genetically modified *Streptomyces* on *Trypanosoma cruzi*. **Int J Antimicrob Agents** 28: 104 - 109.
- Rosas LV, Cordeiro MSC, Campos FR, Nascimento SKR, Januário AH, França SC, Nomizo A, Toldo MP, Albuquerque S, Pereira PS. 2007. *In vitro* evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). **Braz J Med Biol Res** 40: 663 - 670.
- Saeidnia S, Gohari AR, Uchiyama N, Ito M, Honda G, Kiuchi F. 2004. Two new monoterpene glycosides and trypanocidal terpenoids from *Dracocephalum kotschyi*. **Biol Pharm Bull** 52: 1249 - 1250.
- Santos KKA, Matias EFF, Tintino SR, Souza CES, Braga MFBM, Guedes GMM, Rolón M, Veja C, Arias AR, Costa JGM, Menezes IA, Coutinho HDM. 2012. Cytotoxic, trypanocidal, and antifungal activities of *Eugenia jambolana* L. **J Med Food** 15: 66 - 70.
- Tesh RB. 1989. The epidemiology of *Phlebotomus* (sandfly) fever. **Isr J Med Sci** 25: 214 - 217.
- Vega C, Rolón M, Martínez-Fernández AR, Escario JÁ, Gómez-Barrio A. 2005. A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing beta-galactosidase. **Parasitol Res** 95: 296 - 298.
- Wabwoba BW, Anjili CO, Ngeiywa MM, Ngure PK, Kigundu EM, Ingonga J, Makwali J. 2010. Experimental chemotherapy with *Allium sativum* (Liliaceae) methanolic extract in rodents infected with *Leishmania major* and *Leishmania donovani*. **J Vector Borne Dis** 47: 160 - 167.
- Wannissorn B, Jarikasem S, Siriwangchai T, Thubthimthed S. 2005. Antibacterial

properties of essential oils from Thai medicinal plants. **Fitoterapia** 76: 233 - 236.

Young GD, Duncan MA. 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, The West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Mem Am Entomol Inst** 54: 1 - 881.