



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE, LEISHMANICIDA E
ANTINOCICEPTIVODAS FOLHAS DE *Hyptis pectinata*(L.)Poit

ROSÂNGELA ESTEVÃO ALVESFALCÃO

Recife
2013



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

ROSÂNGELA ESTÊVÃO ALVES FALCÃO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE, LEISHMANICIDA E
ANTINOCICEPTIVA DAS FOLHAS DE *Hyptis pectinata* (L.) Poit

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito parcial para obtenção de título de Doutor em Biociência Animal.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tania Maria
Sarmiento Silva

Recife
2013

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE, LEISHMANICIDA E
ANTINOCICEPTIVA DAS FOLHAS DE *Hyptis pectinata* (L.) Poit

ROSÂNGELA ESTEVÃO ALVES FALCÃO

Aprovada em ____/____/2013

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Tania Maria Sarmiento Silva(DCM – UFRPE)
(Presidente)

Prof^a. Dr^a. Keila Aparecida Moreira (UFRPE – UAG)

Prof^a. Dr^a. Tatiana Souza Porto (UFRPE – UAG)

Prof^a. Dr^a. Magna Suzana Alexandre Moreira (UFAL)

Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior (UFAL)

*A minha metade de todas as horas,
José Estevão dos Santos Junior,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

A minha pequena família em especial a minha filha Thainá e minha mãe Nêmera, pela força nos momentos difíceis e carinho em todas as horas sem eles não haveria possibilidade de concluir este trabalho;

A minha Orientadora Dr^a Tania Maria Sarmiento da Silva, por todos os ensinamentos desprendimento e generosidade em cada fase do meu doutoramento;

A Dr^a Keila Aparecida Moreira, por ter me oportunizado os recursos necessários a minha busca, por acreditar no meu trabalho e pela amizade sincera;

A Dr^a Magna Suzana Alexandre Moreira, pela acolhida, disponibilidade e oportunidade de conviver e aprender na UFAL;

A Dr^a Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão, por ter me dado a oportunidade de estar no Programa de Biociência Animal;

A Dr^a Tereza dos Santos Correia, pela partilha de conhecimento fundamental a execução do meu trabalho;

A Dr^a Tatiana Souza Porto pela amizade e orientação e ensinamentos;

A Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto por ter aberto as portas do laboratório sob sua responsabilidade para que eu pudesse iniciar meus experimentos;

A Prof^a. Kêsia Xisto pelo carinho e ensinamentos;

Ao Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior, por ter sido professor pela disposição doar seu conhecimento para enriquecer o meu trabalho;

Ao Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira, pela orientação acadêmica durante meu doutorado;

Aos meus colegas dos laboratórios onde desenvolvi partes do meu trabalho, em particular, Telma, Girliane, Antonio - BIOFITO (UFRPE); Talita Camila - CENLAG (UAG); Fernando e Maria- Laboratório de Glicoproteínas (UFPE); Clovis Macedo e Luís Cláudio – BIOMOL (UFPE) e Felipe – BIOMOL (UPE); Rosilma Melo – Antibióticos (UFPE); Luiz Agra, Aline, Morgana, Alice, Diego – Laboratório de Farmacologia e Imunidade (UFAL);

RESUMO

A espécie *Hyptis pectinata* (Lamiaceae) é conhecida popularmente como "sambacaitá", "sambacaeté" ou "canudinho" e tem sido utilizada por comunidades de diversos países, para o tratamento de problemas de saúde comuns como feridas, inflamações e dores de diversos tipos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante, atividade leishmanicida e antinociceptiva das folhas de *Hyptis pectinata*, bem como isolar e identificar os constituintes químicos ativos. As folhas foram extraídas com etanol(EtOH). O extrato EtOH foi particionado com solventes orgânicos fornecendo as frações hexânica, acetato de etila (AcOEt) e metanol:água(MeOH:H₂O). Sendo a fração AcOEt uma das mais ativas, esta foi analisada por HPLC-DAD e foram isolados onze substâncias, sendo sete fenilpropanóides e quatro flavonóides. Dois fenilpropanóides foram identificados como substâncias inéditas e foram denominadas de ácido sambacaitárico e ácido 3-O-metil sambacaitárico. O extrato EtOH, as frações hexânica, AcOEt e MeOH:H₂O, e os fenilpropanóides isolados em maior quantidade (1-5 e 7) foram avaliados contra a forma promastigota de *Leishmania brasiliensis*. O extrato EtOH e as frações apresentaram significativa atividade leishmanicida. Das substâncias testadas apenas duas (ácido sambacaitárico e o ácido 3-O-metil rosmarínico) apresentaram atividade leishmanicida, justificando, em parte, o efeito mostrado na fração AcOEt. Seguindo o uso popular da espécie que é utilizada no Nordeste brasileiro para o tratamento de vários distúrbios orofaciais patológicos, incluindo dor orofacial e sendo a fração AcOEt rica em substâncias fenólicas, esta foi testada e demonstrada que a administração oral desta fração exerce efeitos protetores contra formalina, capsaicina, e nocicepção orofacial induzida por glutamato em roedores.

PALAVRAS-CHAVE: *Hyptis pectinata*, *Leishmania*, Antinociceptivo, Atividade leishmanicida

ABSTRACT

The species *Hyptis pectinata* (Lamiaceae) is popularly known as "sambacaitá", "sambacaeté" or "canudinho" and has been used by communities of various countries for the treatment of common health problems like wounds, inflammations and pains of various types. This study aimed to evaluate the antioxidant potential, leishmanicidal activity and antinociceptive leaves of *Hyptis pectinata*, as well as isolate and identify the active chemical constituents. The leaves were extracted with ethanol (EtOH). The EtOH extract was partitioned with organic solvents supplying fractions hexane, ethyl acetate (AcOEt) and methanol: water (MeOH: H₂O). EtOAc fraction being one of the most active, this was analyzed by HPLC-DAD and eleven substances were isolated, seven phenylpropanoid and flavonoid four. Two phenylpropanoids were identified as novel substances and were named sambacaitaric acid and 3-O-methyl sambacaitaric. The EtOH extract, fractions hexane, AcOEt and MeOH: H₂O, and phenylpropanoids isolated in larger quantities (1-5 and 7) were evaluated against the promastigote form of *Leishmania brasiliensis*. The EtOH extract and fractions showed significant leishmanicidal activity. Of the substances tested only two (sambacaitárico acid and acid 3-O-methyl rosmarinic) showed activity, explaining in part the effect shown in the AcOEt fraction. Following the popular use of the kind that is used in northeastern Brazil for the treatment of various pathological disorders orofacial, including orofacial pain and being the AcOEt fraction rich in phenolic substances, this was tested and demonstrated that oral administration of this fraction exerts protective effects against formalin, capsaicin, and orofacial nociception induced by glutamate in mice.

KEY WORDS: *Hyptis pectinata*, *Leishmania*, Antinociceptive, leishmanicidal activity

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
ABREVIATURAS	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Atividade Leishmanicida e os produtos naturais	17
2.1.1. Aspectos parasitológicos do gênero <i>Leishmania</i>	17
2.1.2. Tratamento da Leishmaniose	20
2.1.3. Uso de plantas medicinais no tratamento de Leishmaniose	21
2.2. Efeito antinociceptivo de plantas	23
2.3. Estresse Oxidativo e Atividade Antioxidantes de Plantas	27
2.4. Aspectos Fármaco-botânicos da <i>Hyptis pectinata</i> (L) Poit.	31
3. OBJETIVOS	34
3.1. Geral	34
3.2. Específicos	34
REFERÊNCIAS	35
4. CAPÍTULO 1	47
Artigo 1 – Atividade Leishmanicida de fenilpropanoides das folhas de <i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit	47
Abstract	49
Resumo	50
Introdução	51
Materiais e métodos	54
Geral	54
Material vegetal	55
Extração e Isolamento	55
Ensaio in vitro contra <i>Leishmania braziliensis</i>	57
Conclusão	57
Conflito de interesses	58
Contribuição dos autores	58
Agradecimentos	58
Referências	59
5. CAPÍTULO 2	68
Artigo 2 – Atividade antinociceptiva da fração acetato de etila das folhas de <i>Hyptis pectinata</i> (Lamiaceae)	68
Resumo	70
Introdução	71
Material e métodos	72
Animais	73
Drogas	73
Screening com o extrato e frações da folha de <i>H. pectinata</i> -Indução de contorções por ácido acético	73
Ensaio de nocicepção induzida por formalina em pata	74

Ensaio orofacial com formalina	74
Ensaio de indução orofacial nociceptiva por capsaicina e glutamato	74
Avaliação da atividade motora	75
Análise estatística	75
Resultados	75
Discussão	78
Agradecimentos	80
Referências	81
6.0. CAPÍTULO 3	83
Artigo 3 – Avaliação do potencial antioxidante e capacidade protetora do DNA das folhas de <i>Hyptis pectinata</i> (L) Poit	83
Resumo	85
Abstract	86
Introdução	87
Métodos	88
Material vegetal	88
Equipamentos e reagentes	88
Obtenção do extrato e frações	88
Determinação do teor de fenólicos totais	89
Determinação da atividade antioxidante com o sistema β -caroteno/ácido linolêico	91
Ensaio de proteção a molécula de DNA	91
Ensaio de proteção contra oxidação lipídica em membrana de eritrócito	92
Atividade citotóxica do extrato e das frações das folhas de <i>H. pectinata</i>	92
.Análise estatística	93
Resultados e discussão	93
Teor de fenólicos totais, atividade sequestradora de radical livre e atividade antioxidante do extrato e frações das folhas de <i>H. pectinata</i>	93
Ensaio de dano ao DNA	97
Ensaio de efeito eritrocítico	97
Efeito Citotóxico dos extratos	98
Discussão	99
Conclusão	99
Referências	101
Antileishmanial compounds from Leaves of <i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit	106
Evaluation of the orofacial antinociceptive profile of the ethyl acetate fraction and the major constituent rosmarinic acid from the leaves of <i>Hyptis pectinata</i> on rodents	125

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa com distribuição da Leishmaniose Cutânea nas Américas. Fonte OMS	17
Figura 2. Ciclo digênico da Leishmania.....	19
Figura 3. Esquema da transmissão da nocicepção. Fonte www.usak.ca 10/02/2013.....	24
Figura 4. Chave HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)com a correlação entre (1)ácido sambacaitárico (1a).....	63
Figura 5. Estrutura química dos compostos- (2-7) isolados de <i>H. pectinata</i>	64
Figura 6. Estrutura química dos compostos isolados (8-11)	65
Figura 7. Espectro Dicroísmo Circular de ácido sambacaitárico (linha pontilhada e ácido rosmarínico (linha sólida).....	65
Figura 8 Cromatograma obtido por HPLC-CAD (290nm) da fração AcOEt das folhas de <i>H. pectinata</i>	72
Figura 9. Efeito do extrato etanólico bruto e das frações hexano, metanol:água (100 mg/kg, v.o.) e acetato de etila (100 e 300 mg/kg, v.o.) de <i>H. pectinata</i> no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético. Os dados representam a média $\pm$ e erro padrão da média após análise por ANOVA One Way seguido do teste de Dunnet. * $p < 0,05$; *** $p < 0.0001$	76
Figura 10. Efeito do extrato etanólico e da fração acetato de etila (100 mg/kg, p.o.) de <i>H. pectinata</i> no ensaio de nocicepção induzido por formalina. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão da média após análise por ANOVA One Way seguido do teste de Dunnet. A fase A corresponde a fase neurogênica e a Fase B a fase posterior denominada inflamatória.	76
Figura 11. Efeito da fração AcOEt (<i>H. pectinata</i>) e morfina (MOR) em ensaio orofacial com formalina em camundongos, Veículo, fração AcOEt (100, 200, 400 mg/kg v.o.) e MOR (5mg/k i.p.g) administrados 1h antes da formalina, (A) primeira fase (0-5 min) e (B) segunda fase (15-40 min) cada coluna representa média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ ou ** $p < 0,001$ vs. Controle (ANOVA seguido por teste deTukey)	77
Figura 12. . Efeito da fraçãoAcOEt (<i>H. pectinata</i>) sob a capsaicina- (A) e glutamato- (B) na indução orofacial. Veículo (controle), fração AcOEt (100, 200 or 400 mg/kg, p.o.), e MOR (5 mg/kg, i.p.) foram administrados 1h antes da injeção de capsaicina e glutamato. Cada coluna representa média $\pm$ E.P.M.. (n = 8, por grupo). * $p < 0.05$ or ** $p < 0.001$ vs. controle (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).....	78
Figura 13. . Tempo observado dos camundongos no Rota Rod após tratamento com veículo, fração AcOEt (100, 200 e 400 mg/kg p.o.) e diazepam (3mg/kg p.o.). a resposta do motor foi gravada por 1h, 2h e 4h após a administração das drogas. Diferenças estatísticas vs grupo controle foi calculando utilizando ANOVA seguido por Turkey test. * $p < 0.001$	78
Figura 14 Teor de Fenólicos Totais (FT) do extrato EtOH e das frações Hexânica, AcOEt e MeOH:H2O (100 μ g/mL).....	94
Figura 15 Resultado da atividade sequestradora do radical DPPH do extrato EtOH e das frações Hex., AcOEt e MeOH:H2O	95
Figura 16 Resultado da atividade sequestradora do radical ABTS	95

Figura 17 Resultado demonstrando a ação da fração MetOH, tendo como referência o trolox	96
Figura 18 Resultado demonstrando a ação da fração AcOEt tendo como referência o trolox	96
Figura 19 Resultado demonstrando a ação do extrato EtOH, tendo como referência o trolox	96
Figura 20. ensaio com DNA linha1 : DNA+ água destilada, linha 2: DNA + reagente de Fenton, linha 3: DNA+Quercetina+ Reagente de Fenton, linha 4: DNA +fração AcOEt + reagente de Fenton, linha 5: DNA +fração MetOH + reagente de Fenton	97
Figura 21. Percentual de hemólise encontrado na ação das frações AcOEt e MeOH: H ₂ O e quercetina	98
Figura 22. . Percentual de células viáveis encontradas após a incubação com o extrato etanólico e as frações metanol: H ₂ O, Acetato e Hexano.	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Casos notificados de Leishmaniose	18
Tabela 2. . Compostos encontrados em plantas com propriedades leishmanicidas	22
Tabela 3. Receptores que atuam na nocicepção	26
Tabela 4. Espécies de <i>Hyptis</i> com ação antinociceptiva	27
Tabela 6 Processo de ação dos radicais livres	29
Tabela 7. Relação de espécies do gênero <i>Hyptis</i> e seus usos farmacológicos	32
Tabela 8. ¹ H (300 MHz) e ¹³ C RMN (75 MHz) dados espectroscópicos de 1 e 1a (DMSO-d6 em ppm	66
Tabela 9. Efeito do extrato, frações e compostos isolados de <i>H. pectinata</i> contra promastigotas de <i>L. braziliensis</i> *	67

ABREVIATURAS

ABTS	ácido 2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazoline-6-sulfônico]
AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CAET	Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
CE ₅₀	Concentração efetiva a 50%
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Espectroscopia de correlação
d	duplete
dd	duplo duplete
DAD	Detector com Arranjo de Diodos
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazila
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
EtOH	Etanol
LC	Leishmaniose cutânea
LV	Leishmaniose Visceral
LMC	Leishmaniose muco-cutânea
FT	Fenólicos Totais
m	multiplete
MOR	morfina
NMDA	N-metil-D-aspartato
NP	ácido difenilbóricoetanolamina
Receptor 5HT	Receptor 5-hidroxitriptamina
Receptor TrK	Receptor Tirosina-kinase
Receptor NK	Receptor de membrana de células matadoras
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
TRPV1	Receptores Vanilloid 1

OBS: As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam desta relação, encontram-se descritos no texto ou são convenções adotadas universalmente

1. INTRODUÇÃO

Plantas e animais têm sido importantes fontes da medicina a milhares de anos. A Organização Mundial de Saúde (OMS)(LOZINOVA; LANDER, 2009)estima que mais de 80% da população, ainda se utilize da medicina tradicional baseada em ervas(TRIPATHI, 2003)devido sua eficácia e relativo baixo custo (ABD JALIL et al., 2012), constituindo-se um dos principais recursos utilizados em fármacos e produtos para saúde, o que favoreceu a criação pela OMS do Programa de Medicina Tradicional em 1970 (WILLCOX et al., 2001). Durante os últimos anos, a utilização das plantas medicinais tem sido observada com mais atenção pelos meios acadêmicos, dando-se a esta prática o nome de Fitoterapia–estudo de plantas e suas aplicações na cura de doenças.

O uso de fitoterápicos está regulamentado pelo Decreto No. 5.813 de 22 de junho de 2006, que estabelece as diretrizes para o acesso seguro e racional de plantas medicinais e fitoterápicos. A necessidade desta regulamentação se deve ao alto número de pessoas que se utilizam destes produtos para saúde, estima-se que 25% dos oito milhões de dólares que a indústria farmacêutica faturou em 2006, sejam provenientes de derivados de plantas, com um crescimento de 10% ao ano (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DA CIÊNCIA, 2006).

O conhecimento a cerca das ervas medicinais no Brasil e no Mundo foi construído empiricamente, através da história e do relato verbal de diferentes povos, principalmente indígenas, e tem fornecido inúmeras informações sobre espécies de plantas que podem servir como base para pesquisas e formulações de fármacos, capazes de oferecer à população, alternativas para as mais diversas afecções (ALBUQUERQUE et al., 2012).

Com a grande procura do mercado pelos produtos naturais, iniciou-se a construção de metodologias de investigação, capazes de retirar de plantas e animais o máximo de informação a cerca de seus compostos e das atividades biológicas desempenhadas por estes. Uma das estratégias para investigação das potencialidades de desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais é a utilizada pela etnofarmacologia, que consiste em combinar informações adquiridas nas comunidades locais que fazem uso da flora medicinal, com estudos químicos e farmacológicos obtidos em laboratórios especializados(SIMÕES, 2010).

A seleção de exemplares vegetais para pesquisa e desenvolvimento, baseada na alegação das comunidades, de um uso terapêutico em seres vivos, pode se constituir como valioso atalho na descoberta de fármacos.

O Brasil é um país com uma megadiversidade da flora e detentor de seis ecossistemas, onde o Ministério do Meio Ambiente estima que populações indígenas brasileiras dominem a aplicação medicinal de 1.300 plantas brasileiras (ARRIGONI-BLANK et al., 2005), sendo possível o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de doenças a partir das informações étnicas acerca destas plantas.

Aproximadamente 25% dos fármacos encontrados nos países industrializados tem em sua composição princípios ativos oriundos de produtos naturais, especialmente plantas superiores (YUNES, 2001), observando que:

[...] existe uma grande quantidade de pesquisas em busca de moléculas ativas nas plantas, organismos marinhos, insetos e microrganismos (p. 48)

Tanto a etnobotânica como a etnofarmacologia têm demonstrado ser poderosas ferramentas na busca por substâncias naturais de ação terapêutica. O estudo do uso tradicional de plantas e seus produtos no Brasil, em particular na região Nordeste têm sido gradualmente incrementado nos últimos anos, resultando em significativo corpo de publicações na área (CARTAXO et al., 2010; BIESKI et al., 2012;)

Dentre os vegetais com potencial médico encontram-se as plantas do gênero *Hyptis*, gênero encontrado nas américas, em particular no Nordeste e Cerrado do Brasil; (BISPO et al., 2001) e regiões oeste da África e Índia (PIETSCHMANN, 1998). Constituído por mais de 300 espécies, estas têm sido utilizadas no tratamento de infecções gastrintestinais e infecções de pele (LISBOA., 2006; MELO et al., 2006; MORAIS, 2005; SEPTIMO, 1994) entre outras aplicações.

Na região do Agreste Meridional, município de Garanhuns (PE), *Hyptis pectinata* é conhecida como sambacaeté, sambacaitá ou canudinho. Esta planta da família das Lamiaceae, é popularmente utilizada como erva medicinal pela população da região, por seu efeito cicatrizante, analgésico e anti-inflamatório tanto para afecções internas - onde é utilizada sob a forma de infusão das folhas no tratamento de gastrites e úlceras; como para ferimentos externos - onde a população utiliza-se do extrato aquoso em diferentes concentrações das suas folhas e caule não sendo

utilizada a raiz nos preparos (BISPO et al., 2001) ou após secagem e trituração, formando um pó negro a ser utilizado nas feridas sob esta forma ou diluído em água.

Diferentes formas de administração da *Hyptis pectinata* são apresentadas na cultura popular, desde sua administração tópica como interna através da ingestão do extrato aquoso em diferentes concentrações. A planta utilizada parenteralmente não possui atividade tóxica ou teratogênica (SHER, 2003).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante, atividade leishmanicida e antinociceptivas das folhas de *Hyptis pectinata*, bem como isolar e identificar os constituintes químicos através de métodos cromatográficos e espectométricos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Atividade Leishmanicida e os produtos naturais

21.1. Aspectos parasitológicos do gênero *Leishmania*

O protozoário do gênero *Leishmania* foi descrito por Willian Leishman e Charles Donovan em 1903, as investigações a cerca do gênero adquiriram importância pois estes protozoários são responsáveis por doenças tropicais e subtropicais em seres humanos e animais, sendo endêmica em 88 países do mundo, com estimativa de 12 milhões de casos(LOPEZ, 2010), particularmente nas Américas (Figura 1).

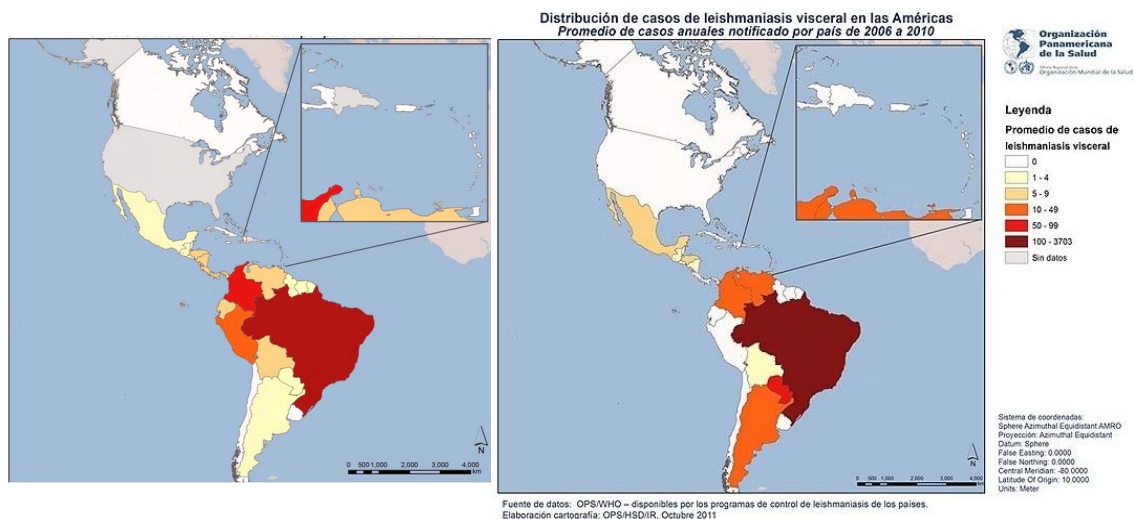


Figura 1. Mapa com distribuição da Leishmaniose Cutânea nas Américas. Fonte OMS

Existem 17 espécies de *Leishmania* parasitantes(CROFT; YARDLEY, 2002) que se manifestam de três formas clínicas: Leishmaniose Visceral (LV)(ABAGLI et al.), Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Muco-cutânea (LMC), sendo que, mais de 90% dos casos de LC ocorrem no Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil e Peru. A VL é endêmica em regiões da África, Ásia, Sul da Europa, América do Sul e Central (SHARMA, 2009), segundo a OMS 90% dos casos de LV ocorrem na Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão.

No Brasil em 2012 segundo o Ministério da Saúde, através do DATASUS, foram notificados 662 casos (Tabela 1), sendo sua transmissão identificada em 19

estados brasileiros(RANGEL; VILELA, 2008) com a região Nordeste apresentando o maior número de casos, em particular os estados do Maranhão e Ceará.

Tabela 1. Casos notificados de Leishmaniose

Casos Notificados de Leishmaniose		
Ano da notificação	Casos Confirmados de Leishmaniose Visceral	Casos Confirmados de Leishmaniose tegumentar
2011	279	814
2012	662	8.277

Também é conhecida uma quarta forma de Leishmaniose, proveniente do agravamento do quadro de leishmaniose visceral que se caracteriza por erupção macular, máculo-papular ou nodular; altamente infecciosas na sua apresentação nodular por conter grandes quantidades do parasita (CHAPPUIS et al., 2007).

Em Pernambuco, de 2001 a 2010 foram identificados 4.855 casos de leishmaniose cutânea, sendo a doença considerada endêmica nas áreas de Mata Atlântica, próximas aos municípios de Amaraji e Côrtes e com casos esporádicos na região Agreste (BRITO et al., 2012).

A leishmaniose visceral(ABAGLI et al.,2012) tem sido encontrada em pacientes imunodepressivos severos como em casos de(ANDREANI et al., 2012), transplantados, problemas no sistema hematopoiético; particularmente em pacientes com AIDS, onde o tratamento é delicado devido a toxicidade dos fármacos, resistência e imunodepressão (APONTE et al., 2010).

O parasito tem um ciclo de vida digenético, com duas morfologias distintas – promastigota – a forma flagelar e extracelular– amastigota forma parasitária, intracelular conforme mostra a Figura 2. A forma promastigota vive no intestino do vetor extracelular, podendo ser encontrado livre ou ligado a cutícula intestinal (ALMEIDA et al., 2003), dois dípteros da subfamília Phlebotominae são os vetores das várias espécies de *Leishmania* – o gênero *Phlebotomus* na Europa – *Lutzomya* nas Américas (MONZOTE, 2009).

O vetor perfura a pele do hospedeiro com o aparelho bucal e lacera um vaso sanguíneo, formando uma poça hemorrágica (RIBEIRO, 1987), sendo o máximo da

capacidade infectante entre 4 a 7 dias da contaminação do vetor, quando ao picar o hospedeiro é capaz de regurgitar de 1 a 1000 promastigotas, (PRATES et al., 2012); BELKAID et al (1998) aponta que a saliva dos vetores possui componente biológicos ativos, que influenciam a capacidade da *Leishmania* de se estabelecer no hospedeiro .

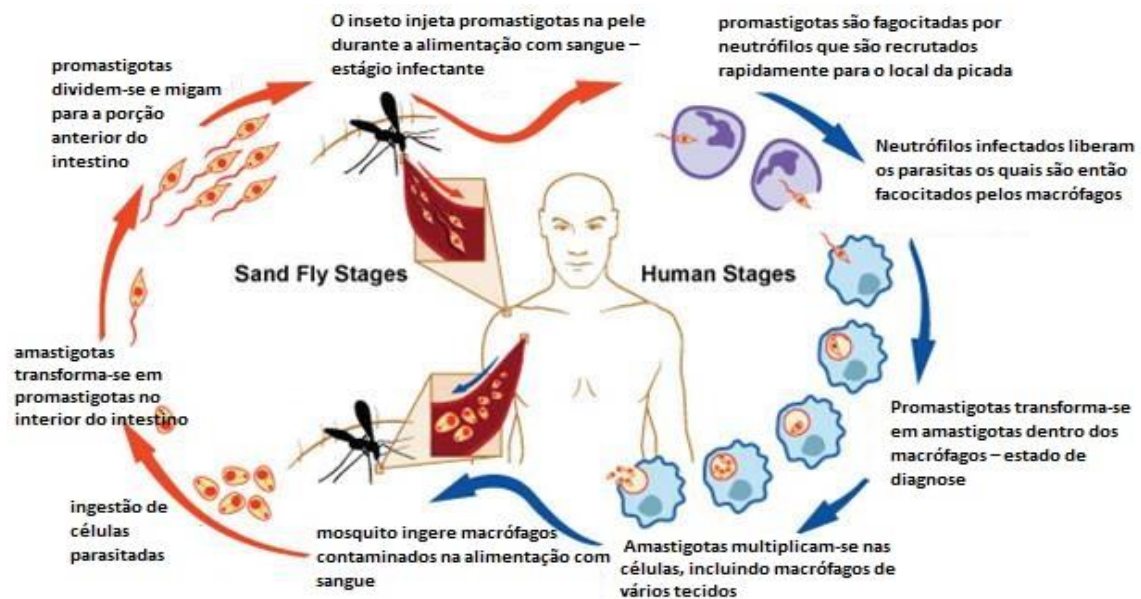


Figura 2. Ciclo digênico da Leishmania

No momento da inoculação diversos fatores são desencadeados por parte do hospedeiro com o aporte de trombinas, quininas, plaquetas, anticorpos, macrófagos, bem como agentes presentes na saliva do vetor como interleucinas e prostaglandinas. É neste cenário que as leishmanias, pela ação de seu ligante lipofosfoglicano (LPG) aos receptores de membrana encontrados nas células de defesa mononucleares, são fagocitadas pelos macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. (GILLESPIE et al., 2000).

No interior das células fagocitárias em particular os macrófagos, o parasita sofre um ataque oxidativo quando acontece a fusão entre o fagossoma com os lisossomos, onde ocorre a liberação de enzimas ácidas que atuam na degradação das substâncias normalmente englobadas na fagocitose. O parasita resiste por meio de uma bomba de prótons que mantém o pH intracelular na neutralidade, bem como a liberação de moléculas de lipofosfoglicano pelo protozoário que inibe as enzimas dos lisossomos (SHARMA, 2009). No interior dos macrófagos acontece a mudança

da forma promastigota em amastigota, aflagelada e sua multiplicação por divisão binária, determinando a morte celular.

A infecção por *Leishmania* já na forma amastigota, caracteriza- aparecimento de anticorpos específicos contra o parasito, em especial na leishmaniose visceral, com elevados níveis de, por exemplo, IgG, IgM, IgE e subclasses de IgG durante a doença (ANAM et al., 1999; RYAN et al., 2002).

Fechando o ciclo, quando o sangue infectado pela forma amastigota é sugado pelo vetor, a transformação da forma amastigota para forma promastigota acontece em poucas horas após a ingestão, exclusivamente no intestino do inseto, subindo na sua forma móvel, para a faringe do mosquito de 6 a 9 dias após a ingestão do parasita pelo inseto.

Por ser uma zoonose – doença que pode atingir tanto animais como seres humanos - a infecção por *Leishmania* é de difícil controle pois, envolve não só o combate aos vetores mas um grande número de reservatórios na população de mamíferos, silvestres e domésticos, fazendo-se um destaque especial ao cão.

2.1.2. Tratamento da Leishmaniose

O tratamento das Leishmanioses tem encontrado grandes dificuldades pela localização da forma amastigota no interior dos macrófagos, problemas de má nutrição dos indivíduos mais susceptíveis, as doenças paralelas aos casos de Leishmaniose como malária e pneumonia e no caso da AIDS o grande número de pacientes que desenvolvem resistência. Além dos fatores diretamente ligados aos pacientes, os fármacos utilizados no tratamento possui alto grau de toxicidade e são muitas vezes caros (ROCHA, 2005;COLER; REED, 2005;APONTE et al., 2010; TEIXEIRA, 2011; ADHIKARI et al., 2012)

Cerca de, 25 compostos em uso clínico têm se mostrado eficazes contra o parasita, dentre eles, o antimônio pentavalente (SbV) tem sido a droga de primeira escolha(FRANCO, M. A. et al., 1995; MISHRA, 2007). O fármaco, com administração intramuscular ou endovenosa, se distribui em alta concentração no plasma, baço e fígado ao longo do tratamento, com os níveis da droga se acumulando nos tecidos, pode causar náusea, dores abdominais, mialgia, pancreatite, hepatite, arritmia cardíaca(THAKUR et al., 2004; MACHADO et al.,

2007). O período de tratamento é de 20 a 40 dias, e um fator agravante no Brasil é o abandono do tratamento pela população rural.

A anfotericina B é um antifúngico obtido a partir da bactéria *Streptomyces nodusus* e que tem demonstrado atividade leishmanicida desde 1960(SINGH.; SIVAKUMAR, 2004), a droga apresenta uma ampla distribuição no organismo, no entanto, causa sérias reações adversas como miocardites, hipocalcemia severa, disfunção renal e risco de morte, necessitando por isso um prolongado período de hospitalização para monitoramento. Apesar do uso limitado por sua toxicidade, a anfotericina B tem sido a escolha para pacientes com resistência aos antimônios (YARDLEY; CROFT, 1997).

Pentamidina é um composto aromático utilizado inicialmente como droga hipoglicêmica somente mais tarde descoberta para uso contra protozoários, sendo utilizada em infecções contra *Leishmania*. A droga atua no genoma do parasita dificultando a replicação do DNA na mitocôndria (MISHRA et al., 2007) e provoca efeitos colaterais como mialgias, náuseas, gosto metálico, hipotensão em 2% dos casos podendo causar insulino-dependência e morte.(SINGH, R. K. et al., 2006). A pentamidina tem sido utilizada no tratamento de todas as formas de Leishmanioses, sendo no entanto, sua eficácia questionada em pacientes com *Leishmania braziliensis* e *L. panamensis* (SOTO-MANCIPE et al., 1993).

Outros compostos tem sido utilizados no tratamento das Leishmanioses como miltefosina, paromomicina, alopurinóis tem sido utilizados no entanto não tem solucionado o problema dos fármacos de primeira escolha com relação a alta toxicidade e o alto valor do tratamento (CROFT; YARDLEY, 2002).

2.1.3. Uso de plantas medicinais no tratamento de Leishmaniose

Nas áreas rurais dos países afetados pelas diversas formas de Leishmaniose, o uso de produtos derivados de plantas, no alívio dos sintomas é amplamente utilizado. Produtos naturais tem sido um potencial recurso no tratamento de diversas doenças e as pesquisas nesta área têm sido bastante estimuladas pela Organização Mundial de Saúde através do Departamento de Medicina e Farmacêutica Essencial – EMP (CHAN-BACAD, 2001).

Tabela 2. . Compostos encontrados em plantas com propriedades leishmanicidas

Produto natural	Espécie Vegetal	<i>Leishmaniassusceptíveis</i>	Referência
Quinonas	<i>Diospyros montana</i> <i>Pera benensis</i> <i>Ampelocera edentula</i>	<i>L. donovani</i> <i>L. braziliensis, L. amazonensis, L. donovani</i> <i>L. braziliensis, L. amazonensis, L. donovani</i>	HAZRA et al., 1987 FOURNET et al., 1992 FOURNET et al., 1994
	<i>Guatteria foliosa</i> <i>Rollinia marginata</i>	<i>L. Amazonenses, L. donovani</i> <i>L. braziliensis, L. amazonensis, L. donovani</i>	MAHIOU et al., 1994 FEVRIER et al., 1999
Alcalóides	<i>Dictyoloma peruviana</i> <i>Saracha punctata</i>	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis, L. amazonensis, L. donovani</i>	LAVAUD et al., 1995 MORETTI et al., 1994
Terpenos	<i>Nyctanthes arbortristis</i> <i>Picrorhiza kurroa</i> <i>Swertia chirata</i> <i>Oxandra espintana</i> <i>Pepero miagaloides</i> <i>Vernonia brachycalyx</i> <i>Jacaranda copaia</i>	<i>L. donovani</i> <i>L. donovani</i> <i>L. donovani</i> <i>L. mexicana, L. amazonensis</i> <i>L. donovani, L. braziliensis</i> <i>L. major</i> <i>L. amazonensis</i>	PURI et al., 1994 MITTAL et al., 1998 RAY et al., 1996 HOCQUEMILLER et al., 1991 MAHIOU et al., 1995 OKETCH-RABAH et al., 1998 MORETTI et al., 1993
Derivados Fenólicos	<i>Piper aduncum</i> <i>Glycyrrhiza spp.</i> <i>Celanodendron mexicanum</i> <i>Curcuma longa</i>	<i>L. amazonensis</i> <i>L. major, L. donovani</i> <i>L. donovani</i> <i>L. major</i>	TORRES-SANTOS et al., 1999 CHEN et al., 1993 CAMACHO et al., 2000 RASMUSSEN et al., 2000

Estudos têm sido feitos utilizando produtos naturais, particularmente plantas no combate tanto ao vetor como as diversas espécies de *Leishmania* (BORIES et al., 1991, AL-MUSAYEIB. et al., 2012; AL-MUSAYEIB et al., 2012).

Extratos de plantas e óleos essenciais têm sido utilizados em experimentos a partir do conhecimento da população visando a produção de fármacos a partir dos extratos ou de compostos isolados de plantas da flora nativa (Tabela 2).

Em vários países, diversas plantas têm sido utilizadas em pesquisas em particular aquelas que possuem chalconas (KAYSER; KIDERLEN, 2001; TORRES-SANTOS et al., 1999), alcaloides(WAECHTER et al., 1999), terpenos (MACHADO et al., 2012) e resultados tem sido demonstrados no uso experimental de extratos e compostos isolados já há bastante tempo.

O estudo de extratos e isolados de plantas que possam atuar potencialmente no combate as diversas formas de Leishmaniose é um campo que pode solucionar alguns dos problemas existentes no tratamento convencional, diminuindo o custo do tratamento para o grande público mais susceptível a doença e trazendo alternativas que agridam menos os pacientes, diminuindo os efeitos colaterais severos que os fármacos atuais apresentam.

2.2. Efeito antinociceptivo de plantas

A dor é uma modalidade sensorial que em muitos casos representa o único sintoma para diagnose de muitas doenças severas (ALMEIDA et al., 2012) e processos inflamatórios (ALVAREZ et al., 2012).

Embora medicamentos mais comuns ácido acetilsalicílico e esteróides, encontrados na medicina tradicional, tenham demonstrado resultados no tratamento da dor, diversos países tem utilizado produtos naturais para o tratamento de processos dolorosos e inflamações (AMABEOKU; KABATENDE, 2012)

A classificação neurofisiológica do termo dor, diferencia-se em três tipos: dor nociceptiva (somática ou visceral)(KAMESHWARAN et al., 2012; MORUCCI et al., 2012), dor neurogênica e dor psicogênica. O termo nocicepção está relacionado com o reconhecimento de sinais dolorosos pelo sistema nervoso, que formula informações relacionadas à lesão (KLAUMANN, 2008).

Quando o corpo sofre uma injúria interna ou externa, o impacto deste estímulo nos tecidos é traduzido através da via neural e transmitido através do sistema nervoso periférico para o sistema nervoso autônomo (JULIUS, BASBAUM, 2001).

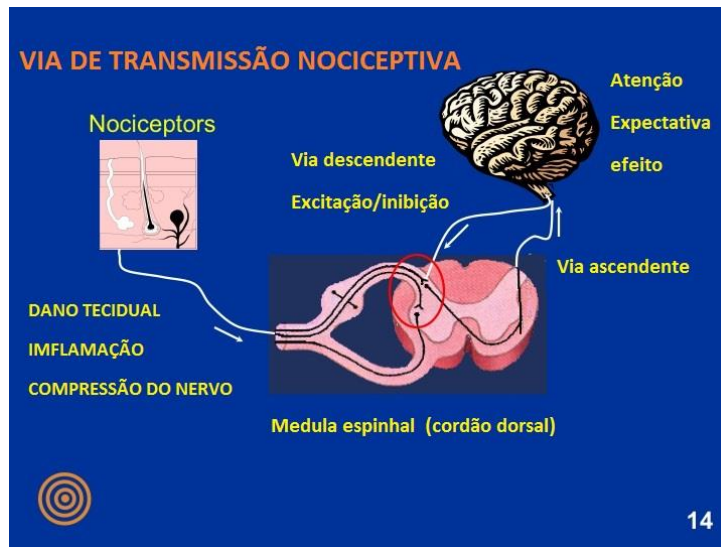


Figura 3. Esquema da transmissão da nocicepção. Fonte www.usak.ca 10/02/2013

Esta forma de se processar a informação é conhecida como nocicepção que é a forma como um dano tecidual, ou um potencial dano é relatado para o cérebro. De modo geral, o processo de nocicepção pode ser resumido em uma cadeia onde atuam três neurônios (Figura 3), um neurônio de primeira ordem – um nervo periférico e se estende para a porção dorsal da medula espinhal, um neurônio de segunda ordem contido no interior da medula que retransmite a informação e um neurônio de terceira ordem que se projeta para o córtex cerebral, chegando através do tálamo que funciona como uma estação retransmissora (JULIUS, BASBAUM, 2001).

A sensação dolorosa é causada quando existe um estímulo intenso o suficiente para acarretar a ativação das fibras nervosas A δ , o que ocasiona uma sensação de formigamento e dor. Quando o estímulo é aumentado, fibras nervosas C são recrutadas e uma intensa dor é sentida mesmo quando o estímulo cessa (LOVE et al., 2011).

A percepção da dor após uma injúria aguda obedece a duas fases: na primeira fase a sensação dolorosa é pouco intensa e ocorre imediatamente após o estímulo doloroso, conhecido com dor rápida. A segunda fase, conhecida como dor lenta é mais desagradável, menos localizada e se apresenta após um período mais longo (GARLAND, 2012).

A nocicepção é mediada por receptores especializados – nociceptores – que são modulados por mecanismos anti-inflamatórios e biomoleculares no meio extracelular (GARLAND, 2012) como apresentado na Tabela 3.e que na maioria das vezes acarreta a sensação de dor naquele que sofre a injúria.

O mecanismo de transdução nociceptivo envolve a ativação de canais de cátions no nervo livre. Com relação a receptores sensíveis a temperatura, a transdução nociceptiva térmica para aumentos de temperatura, é mediada por um tipo de receptor catiônico denominado Vanilloid. Receptores Vanilloid-1 (TRPV1) respondem a aumento de temperaturas nocivas ($> 45^{\circ}\text{C}$) e são sensíveis a capsaicina, enquanto que receptores Vanilloid2 (TRPV2) respondem a temperaturas mais altas (52°C) sendo insensíveis a capsaicina (GIORDANO, 2005). O receptor para frio e mentol-1(CMR-1/T8) responde pela sensação de baixas temperaturas.

O glutamato é o principal transmissor excitatório sináptico entre o nociceptor primário aferente e o gânglio nervoso dorsal, ele atua o receptor NMDA(N-metil-D-aspartato) que promove a abertura de canal iônico que permite o fluxo de Na^{++} para dentro da célula e K^{+} para fora.

Além do glutamato, mediadores inflamatórios como peptídeos, neurotransmissores como a serotonina, lipídios como as prostaglandinas e neurotrofinas como o fator de crescimento (LISBOA et al., 2006), são secretados no local da injúria, com o objetivo de estimular os nociceptores, o que causa a transmissão de um sinal aferente para o cordão dorsal da espinha, iniciando uma inflamação neurogênica.

Bastante ligada a processos inflamatórios, a dor tem sido combatida através de drogas esteroides e não esteroides que tem demonstrado relativa eficácia no tratamento das diversas formas inflamatórias (BHADORIYA et al., 2012).

Além de drogas sintéticas, o uso de produtos naturais tem sido alvo de diversos trabalhos que, baseados no conhecimento das comunidades sobre medicina natural, investiga a qualidade antinociceptiva das plantas (IMAM et al., 2012; JUNG et al., 2012; MORUCCI et al., 2012).

Tabela 3. Receptores que atuam na nocicepção

Estímulos Algogênicos	Mediadores
H ⁺	TRPV1/VR1, Na ⁺ , Ca ⁺⁺
Prótons	Canal ácido sensitivo (ASIC), Na ⁺
Estímulostérmicos	TRPV1/VR1 (>45° C), TRPV2 (>53° C), CMR1/trpM8 (8° – 25° C)
Distorções mecânicas	Canais de cátions não seletivos, Na ⁺ , K ⁺ , Ca ⁺⁺
BNDF (Brain-derived neurotrophic fator)	Receptor–TrK (Tirosina-kinase)
Prostaglandina –E2	Receptor Prostanóide. Kinase
Serotonina (5-HT)	Receptor 5-HT, Na ⁺ , receptor NK-1
Adenosina	Purinoreceptor A2
ATP	Receptor PTX
Glutamato	Receptores AMPA (ácido α-amino-3-hydroxy- 5-methyl-4-isoxazolepropionicO), NMDA (N- metil-D-aspartato), Na ⁺ , Ca ⁺⁺ , Ca ⁺⁺ intracelular, Kinase C
Bradiquinina	Receptor Bradiquinina B2, cationic influx

Dentre as espécies que tem sofrido avaliação da sua capacidade de atuar sobre processos dolorosos estão diversas da família Lamiaceae que se destacam pela ação dos óleos essenciais como a *Tecurium pollum* (ABDOLLAHI et al., 2003) *Nepeta crispa* Willd. (ALI et al., 2012), *Ocimum micranthum* Willd (LINO et al., 2005) ou *Dracocephalum kotschy* (GOLSHANI et al., 2004); bem como de alguns extratos como a *Salvia limbata* (ALEMY et al., 2012), *Salvia halophile* e *Salvia virgata* (AKKOL et al., 2008).

Do gênero *Hyptis* algumas espécies tem sido citadas com bons efeitos antinociceptivo como se apresenta na Tabela 4. Este efeito tem sido atribuídos aos

óleos essenciais sugerindo a ação em receptores opiáceos pelos compostos presentes.

Efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivo foram observados em extrato aquoso da *Hyptis pectinata* (BISPO et al., 2001) porém, sem identificação das substâncias responsáveis por esta propriedade.

Tabela 4. Espécies de *Hyptis* com ação antinociceptiva

Espécie	Extrato/fração	Referência
<i>Hyptis martiusii</i> Benth	Óleo essencial	CALDAS et al., 2011
<i>Hyptis fruticosa</i>	Óleo essencial	FRANCO et al., 2011; MENEZES et al., 2007
<i>Hyptis suaveolens</i>	Aquoso	SANTOS, et al., 2007)
<i>Hyptis pectinata</i>	Óleo essencial	ARRIGONI-BLANK et al., 2008

2.3. Estresse Oxidativo e Atividade Antioxidantes de Plantas

Uma das mais comuns propriedades das plantas são os compostos secundários que possuem atividade antioxidante, e que são utilizados em processos onde o estresse oxidativo desencadeia problemas no metabolismo animal (GAUTAM et al., 2012).

O processo de oxidação é essencial na produção de energia pelos sistemas biológicos (CSISZAR et al., 2012), pois estão relacionados não apenas a produção de energia mas ao crescimento celular, sinalização intercelular e síntese (JAGANJAC et al., 2012). No entanto, o excesso de reações de oxidação torna-se prejudicial por causar peroxidação de lipídios de membrana, agressão a proteínas de tecidos e membranas; bem como dano a enzimas, carboidratos e DNA (PHILPOTT et al., 2009).

Em 1956, Denham Harman propôs que uma das causas do envelhecimento dos sistemas biológicos seria a presença de espécies reativas de oxigênio, gerados como subprodutos da respiração mitocondrial

Os radicais derivados do oxigênio representam a mais importante classe de espécies radicais gerada pelos sistemas biológicos (DU et al., 2009), conforme apresentado na Tabela 3, os principais ROS seriam o superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ácido hipoclorídrico (HOCl) e radicais livres como radical hidroxila ($-OH$). Estas ROS são produtos normais do metabolismo celular que interagem com os constituintes celulares (CRISCUOLO; BOUILLAUD, 2009) e que só se tornam danosos quando o equilíbrio redox é bastante perturbado.

Neste momento, podem acontecer processos patológicos que, provocam desordens degenerativas, que vão desde o envelhecimento precoce a uma série de patologias nos quais os radicais livres estão implicados (HALLIWELL et al., 1992).

Mutações em DNA são um passo crítico em processos de carcinogênese, e elevados níveis de DNA lesionados tem sido identificados em tumores quando comparados com células normais, onde o envolvimento de oxidantes aparece como denominador comum (VALKO et al., 2007)

O termo radical livre é empregado para átomo ou molécula altamente reativo, que contém um número ímpar de elétrons em sua última camada. Este não emparelhamento de elétrons é o que confere a alta reatividade dos átomos e moléculas (HALLIWELL; CROSS, 1994).

Fisiologicamente, o excesso destes radicais livres é anulado por compostos antioxidantes que podem ser produzidos pelo corpo ou absorvidos através de dieta (RALSER; LEHRACH, 2009). Quando isto não acontece inicia-se um processo de estresses oxidativo, que é causado por um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade de um sistema biológico de detoxificar os reativos intermediários ou de reparar o dano causado por estes reativos (DAYEM et al., 2010). Quando um radical reage com um não radical, novos radicais não criados em uma reação em cadeia. Quando são gerados OH^- , adjacente a moléculas de DNA, o radical é capaz de atacar tanto a desoxirribose como as bases púricas e pirimídicas, esta afirmação é corroborada pela quantidade bastante superior de OH^- em DNA de tecidos humanos com câncer do que em

tecidos sadios (GETOFF, 2009). Também no processo de envelhecimento, os radicais livres tem sido citados, pois o efeito deletério dos radicais durante o metabolismo aeróbio pode causar danos não só ao DNA, mas a lipídios e proteínas por acúmulo ao longo do tempo.

O processo inicia-se com a molécula de oxigênio ocupando a posição final da cadeia transportadora de elétrons. Mesmo sob condições ideais, alguns elétrons escapam da cadeia e interagem com o oxigênio produzindo o radical superóxido, o que acontece em condições normais com 1 a 3% das moléculas de oxigênio no organismo. O primeiro local a ser danificado pelo radical superóxido é o DNA Mitocondrial (DAVIES, 2000), o motivo para que isto aconteça é que o DNA nuclear possui mecanismos de reparo eficientes, o que não acontece com o DNA Mitocondrial, conseqüentemente, grande extensão de DNAMt danificado acumula-se ao longo do tempo, causando a morte celular e o envelhecimento orgânico (TELSER, 2007).

O dano ao DNA é causado pela reação dos radicais OH com o açúcar desoxirribose encontrado na molécula de DNA, em seu grupamento amina, formando moléculas de água, hidrogênio, hidroxila e carbonila, o que leva a formação de um orifício no anel da desoxirribose (ABOLFATH et al., 2011), este fato danifica de forma definitiva a molécula e a partir deste ponto acontece uma sequência de ampliação do buraco causado pelo radical livre, conforme apresentado na Tabela 6.

Tabela 5 Processo de ação dos radicais livres

Substrato Danificado	Sistema de Reparo	Evidência de Estresse Oxidativo In Vivo
DNA: Todos os componentes da molécula de DNA são susceptíveis ao OH•, a guanina pode ser atacada por O ₂ .	Um grande número de enzimas existe que ao reconhecer anormalidades remove por excisão a porção danificada, resintetizando o padrão normal.	Excreção de bases de DNA danificado através de urina
Proteínas : os ROS podem oxidar os grupos - SH. O radical hidroxila ataca muitos resíduos de aminoácidos.	Resíduos de metionina oxidados podem ser reparados pela enzima metionina sufóxidoreductase, além de que as proteínas danificadas ao serem reconhecidas são destruídas pelas proteases.	Ataque de radicais livres as proteínas, produzem carbonilação de proteínas. Baixos níveis desta podem ser detectadas em tecidos e fluidos biológicos

Apesar de todos os componentes celulares poderem sofrer a ação de ROS (Tabela 6.), as membranas celulares são mais susceptíveis em decorrência da peroxidação lipídica. E diversas organelas como mitocôndrias, lisossomos, peroxissomos, núcleo e retículo endoplasmático estão envolvidos (CSISZAR, 2012).

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação é uma reação ocasionada pela ação dos radicais livres nos ácidos graxos polinsaturados e/ou no colesterol, iniciando um processo bioquímico em cadeia e que tanto podem acontecer nos organismos vivos como nos alimentos.

Quando o processo de oxidação lipídica acontece nos alimentos como salsichas, queijo parmesão, manteiga, charque, hambúrguer, acontece a formação de óxidos de colesterol, esses são facilmente absorvidos pelo intestino, inibindo a síntese de colesterol, levando a morte celular com a formação de infiltrados aterogênicos.

Essa cascata de processos, gera principalmente, radical alquila ($L\bullet$), alcóxila ($LO\bullet$) e peróxila ($LOO\bullet$) levando a lesão de membranas celulares por alteração de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e numa condição extrema a morte celular (HARMS-RINGDAHL, 1988; HARRIS, 1994).

Diversos fatores estão associados à ocorrência da oxidação lipídica in vivo, estresse, idade avançada, infecções, inflamações, hipertermia, aterosclerose, diabetes mellitus; drogas como álcool, sulfonamidas, tetraciclina; e alimentos como café e dietas ricas em gorduras e pró-oxidantes (DUTHIE, 1993; KEHRER, 1993).

Compostos fenólicos encontrados em plantas têm sido estudados por inibirem a oxidação lipídica e também por poderem ser utilizados em processos industriais para conferir cor, adstringência e aroma a vários alimentos. Assim muitas pesquisas tem se detido a separar, identificar e quantificar compostos fenólicos em alimentos (SOARES, 2002).

Os compostos fenólicos podem ser classificados em um grande número de substâncias tais como: fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, taninos e ligninas. Substâncias na maioria das vezes, de grande polaridade e muito reativos.(A. KING, 1999), e podem ser encontrados na natureza de forma livre,

ligados a açúcares ou proteínas, formando dois grandes grupos, os flavonoides e derivados e os ácidos fenólicos e cumarinas.

Antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais e algumas vezes quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como de propagação do processo oxidativo, sendo seu uso, em alguns casos, eficientes na prevenção da oxidação lipídica desde que não seja comprovada alguma toxicidade (SANYAL, 2012).

Os componentes polifenólicos das plantas podem atuar como antioxidantes ou como agentes de outros mecanismos contribuindo para uma ação anticarcinogênica ou cardioprotetora (BAE; SUH, 2007).

Em trabalhos onde a ação antioxidante dos compostos polifenólicos sugerem interferência na peroxidação de ácidos graxos (CAZZOLA; CESTARO, 2011), proteção a estrutura do DNA (DA SILVA et al., 2011; HARPER et al., 1999; ABRAHAM et al., 2012) ou membranas celulares (SANTOS, et al., 2011; SILVA et al., 2011).

2.4. Aspectos Fármaco-botânicos da *Hyptis pectinata* (L) Poit.

A família das Lamiaceae é descrita como aromática, de grande maioria possuindo caule quadrado, folhas opostas e corolas tubulares, cultivadas por seus óleos essenciais. Pertencente a família das Lamiaceae, o gênero *Hyptis* possui em torno de 300 gêneros e 7 500 espécies (SOUZA, 2005) distribuídas nas Américas, Índia, África e Oceania (BARBOSA FILHO, 2005).

Diversas espécies do gênero *Hyptis*, entre elas *Hyptis emori* Torr.; *Hyptis spicigera* Lam.; *Hyptis suaveolens* Point.; *Hyptis pectinata* (L.) Point.; *Hyptis verticillata* Jacq. têm sido utilizadas na medicina popular de diferentes países para um grande número de doenças (Tabela 7)

Entre suas ações, têm sido apontadas; atividade analgésica (SANTOS et al., 2007), antiinflamatória, atuação em doenças respiratórias, distúrbios gastrointestinais (ARRIGONI-BLANK et al., 2008,) tumores de pele (FRAGOSO-

SERRANO et al., 2005). O infuso da folha é utilizado contra amenorreias e as partes aéreas contra hepatalgias (GRENAND, 1987).

Tabela 6. Relação de espécies do gênero *Hyptis* e seus usos farmacológicos

Espécie	Ação	Referência
<i>Hyptis suaveolens</i>	Bactericida e antifúngico	(BASILIO, 2006)
<i>Hyptis albida</i>	Bactericida	(ALEJANDRA ROJAS, 1992)
<i>Hyptis emory Torr</i>	Problemas respiratórios	(PEREDA-MIRANDA et al., 1993)
<i>Hyptis spicigera Lard.</i>	Inflamações	(FRAGOSO-SERRANO et al., 1999)
<i>Hyptis verticillata Jacq.</i>	Tumores e problemas de pele	(NOVELO et al., 1993)
<i>Hyptis fasciculata</i>	Tumores	(AMADO et al., 2009)

Conhecida no Nordeste brasileiro como, sambacaitá, sambacaité ou sambacaeté; a *Hyptis pectinata* (L) Poit. tem sido amplamente utilizada na forma de infusão, chás e pastas de uso tópico no tratamento de desordens gástricas, doenças de pele, febre e problemas de vias aéreas superiores, assim como infecções bacterianas e fúngicas (ALONSO-CASTRO, 2011).

No aspecto da sistemática botânica, a *Hyptis pectinata* (Figura 3) é classificada como uma planta herbácea, de folhas opostas, cruzadas e aromáticas, traqueófito, espermatófito, da família das Lamiaceae. É encontrada como erva daninha, propagando-se facilmente através de sementes (BRAGA, 1979, BASILIO, 2006) apresenta suas folhas como opostas, lâmina 1,0 – 2,5 x 0,8 – 1,6 cm, oval a oval elíptica, ápice agudo, base obtusa ou obtuso-truncada, margem serrada ou crenada; pecíolo 0,5 – 1,0 cm.

Suas flores são pequenas, agrupadas em inflorescências, hermafroditas, pentâmeras, zigomorfas e bilabiadas (ARRIGONO-BLANK et al., 2005; MELO et al., 2005) possuem posição terminal, em panículas espiciformes densas, 60 – 100 – foldres; ráquis longa, 20 – 50 cm de comprimento (BASÍLIO et al., 2006).



Figura 3. *Hyptis pectinata* - Garanhuns-PE(Fonte R.E.A.Falcão 10/02/2013)

Por ser não ser perene, raramente é encontrada no verão, sendo apenas durante os meses de chuva que a planta encontra-se apta a ser utilizada *in natura*. Sua floração acontece no final da estação chuvosa (julho) e a dispersão de suas sementes ocorre no início de outubro, ficando a partir deste momento a planta em estado de senescência (BASÍLIO et al, 2006)..

A *Hyptis pectinata* possui identificados 33 componentes do óleo essencial com um quantitativo predominante de monoterpenos em torno de 95,8% (BISPO et al., 2001).

O gênero *Hyptis* possui representantes que têm sido utilizados por populações de diversos países com objetivos medicinais. Pesquisas têm sido desenvolvidas utilizando diversas espécies do gênero *Hyptis* tanto como fatores de proteção contra artrópodes (ARAUJO et al., 2003, ABAGLI et al., 2012;), inibidores de proteases (AGUIRRE et al., 2004), ação dos terpenos(NASCIMENTO et al., 2008). Esses e outros trabalhos sugerem a existência de compostos neste gênero taxonômico que possuam atividades biológicas interessantes e aplicáveis em animais domésticos e seres humanos. Efeito analgésico e antiinflamatório já foi identificado na *Hyptis pectinata* (BISPO et al., 2001) , bem como antimicrobiano do extrato de suas folhas(FRAGOSO-SERRANO et al., 2005)

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- Avaliar as atividades leishmanicida, antinociceptiva, e antioxidante das folhas de sambacaitá (*Hyptis pectinata*).

3.2. Específicos

- Identificar os constituintes químicos das folhas de *Hyptis pectinata*
- Avaliar a capacidade leishmanicida do extrato etanólico, frações e substâncias isoladas.
- Avaliar o efeito antinociceptivo do extrato etanólico e frações hexânica, acetato de etila e metanol: água das folhas de *Hyptis pectinata*.
- Avaliar a capacidade antioxidante do extrato bruto e frações.

REFERÊNCIAS

A. KING, G. Y. Characteriscts and occurrence of phenolic phytochemicals. Journal of the American Dietetic Association, v. 99, n. 2, p. 213-218, 1999.

ABAGLI, A. Z. et al. Potential of the bush mint, *Hyptissuaveolens* essential oil for personal protection against mosquito biting. J Am Mosq Control Assoc, v. 28, n. 1, p. 15-9, 2012.

ABD JALIL, M. A.; SHUID, A. N.; MUHAMMAD, N. Role of medicinal plants and natural products on osteoporotic fracture healing. Evid Based Complement Alternat Med, v. 2012, p. 714512, 2012.

ABDOLLAHI, M.; KARIMPOUR, H.; MONSEF-ESFEHANI, H. R. Antinociceptive effects of *Teucrium polium* L total extract and essential oil in mouse writhing test. Pharmacol Res, v. 48, n. 1, p. 31-5, 2003.

ADHIKARI, A. et al. *Mycobacterium indicus pranii* (Mw) re-establishes host protective immune response in *Leishmaniadonovani* infected macrophages: critical role of IL-12. PLoS One, v. 7, n. 7, 2012.

AGRA, M. D. F. F., PATRICIA FRANÇA DE; BARBOSA FILHO, JOSÉ MARIA. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. Rev. Bras. Farmacogn. , v. 17, n. 1, 2007.

AGUIRRE, C. et al. A novel 8.7 kDa protease inhibitor from chan seeds (*Hyptis suaveolens* L.) inhibits proteases from the larger grain borer *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae). Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, v. 138, n. 1, p. 81-9, 2004.

AKKOL, E. K. et al. Phenolic composition and biological activities of *Salvia halophila* and *Salvia virgata* from Turkey. Food Chemistry, v. 108, n. 3, p. 942-949, 2008.

AL-AKWA, A. A.; SHAHER, M.; AL-AKWA, S.; ALERYANI, S.L. Free radicals are present in human serum of *Catha edulis* Forsk (Khat) abusers. Journal of Ethnopharmacology, v.125, 471-473, 2009

AL-MUSAYEIB, N. M. et al. Study of the *in Vitro* Antiplasmodial, Antileishmanial and Antitrypanosomal Activities of Medicinal Plants from Saudi Arabia. Molecules, v. 17, n. 10, p. 11379-90, 2012.

ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medical ethnobiology and ethnopharmacology in latin america. Evid Based Complement Alternat Med, v. 2012, p. 379160,2012.

ALEJANDRA ROJAS, L. H., ROGELIO PEREDA-MIRANDA, RACHEL MATA. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology,, v. 35, p. 275-283, 1992.

ALEMY, S. et al. Antinociceptive activity and effect of methanol extract of *Salvia limbata* on withdrawal syndrome in mice. Eur Rev Med Pharmacol Sci, v. 16, n. 1, p. 38-42, 2012.

ALI, T. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the essential oil of *Nepeta crispa* Willd. in experimental rat models. Nat Prod Res, v. 26, n. 16, p. 1529-34, 2012.

ALMEIDA, J. R. et al. Antinociceptive activity of ethanol extract from *Duguetia chrysocarpa* Maas (Annonaceae). ScientificWorldJournal, v. 2012, p. 859210, 2012.

ALMEIDA, M. C. E. A. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 98, n. 7, p. 861-870, 2003.

ALONSO-CASTRO, A. J. et al. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. J Ethnopharmacol, v.133, p.945-972, 2011.

ALVAREZ PEREZ GIL, A. L. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the ethanolic extract of *Bougainvillea xbuttiana*. J Ethnopharmacol, v. 144, n. 3, p. 712-9, 18 2012.

AMABEOKU, G. J.; KABATENDE, J. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Leaf Methanol Extract of *Cotyledon orbiculata* L. (Crassulaceae). Adv Pharmacol Sci, v. 2012, p. 862625, 2012.

AMADO, N. G. et al. Isoquercitrin isolated from *Hyptis fasciculata* reduces glioblastoma cell proliferation and changes beta-catenin cellular localization. Anticancer Drugs, v. 20, n. 7, p. 543-52, 2009.

ANAM, K. et al. Immunoglobulin subclass distribution and diagnostic value of *Leishmania donovani* antigen-specific immunoglobulin G3 in Indian kala-azar patients. Clin Diagn Lab Immunol, v. 6, n. 2, p. 231-5,1999.

ANDREANI, G. et al. Mechanisms of interaction between protozoan parasites and HIV. *Curr Opin HIV AIDS*, v. 7, n. 3, p. 276-82, 2012.

APONTE, J. C. et al. In vitro and in vivo anti-*Leishmania* activity of polysubstituted synthetic chalcones. *Bioorg Med Chem Lett*, v. 20, n. 1, p. 100-3, 2010.

ARAUJO, E. C. et al. Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptismartiusii* Benth. *J Agric Food Chem*, v. 51, n. 13, p. 3760-2, 2003.

ARRIGONI-BLANK, M. F. et al. Antinociceptive activity of the volatile oils of *Hyptis pectinata* L. Poit. (Lamiaceae) genotypes. *Phytomedicine*, v. 15, n. 5, p. 334-9, 2008.

ARRIGONI-BLANK, M. F. S.-M., R.; CAMPOS, D.A.; SILVA, P.A.; ANTONIOLLI, A.R.; L.C. CAETANO, A. E. G. S. A., A.F. BLANK. Morphological, agronomical and pharmacological characterization of *Hyptis pectinata* (L.) Poit germplasm. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 15, n. 4, p. 298-303, 2005.

BAE, S.-H.; SUH, H.-J. Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea. *LWT - Food Science and Technology*, v. 40, n. 6, p. 955-962, 2007.

BARBOSA FILHO, J. M. E. A. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, n. 4, p. 392-413, 2005. .

BASILIO, I. J. L. D. A., M. F.; ROCHA, E. A.; LEAL, C. K. A.; ABRANTES, H. F. Estudo farmacobotânico comparativo de folhas de *Hyptis pectinata* (L.) poit e *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). *Acta Farm. Bonaerense*, v. 25, n. 4, p. 518-525, 2006.

BELKAID, Y. et al. Development of a natural model of cutaneous Leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med*, v. 188, n. 10, p. 1941-53, 1998.

BHADORIYA, S. S. et al. Anti-Inflammatory and Antinociceptive Activities of a Hydroethanolic Extract of *Tamarindus indica* Leaves. *Sci Pharm*, v. 80, n. 3, p. 685-700, 2012.

BISPO, M. D. et al. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. *J Ethnopharmacol*, v. 76, n. 1, p. 81-6, 2001.

BORIES, C. et al. Antiparasitic activity of *Annona muricata* and *Annona cherimolia* seeds. *Planta Med*, v. 57, n. 5, p. 434-6, 1991.

BRAGA, R. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. Ed. Fortaleza, 1979. 540p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DA CIÊNCIA, T. E. I. E. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. FARMACÊUTICA, D. D. C. Brasília: Ministério da Saúde: 60 p. 2006.

BRITO, M. E. et al. Cutaneous Leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 45, n. 4, p. 425-9, 2012.

CALDAS, G. F. et al. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae). *J Ethnopharmacol*, v. 137, n. 1, p. 886-92, 2011.

CAMACHO, M. R. et al. Bioactive compounds from *Celaenodendron mexicanum*. *Planta Med*, v. 66, n. 5, p. 463-8, 2000.

CHAN-BACAD, M. P.-R., LM. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat. Prod. Rep.*, v. 18, p. 674-688, 2001.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral *Leishmaniasis*: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*, v. 5, n. 11, p. 873-82, 2007.

CHEN, M. et al. Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 37, n. 12, p. 2550-6, 1993.

COLER, R. N.; REED, S. G. Second-generation vaccines against Leishmaniasis. *Trends Parasitol*, v. 21, n. 5, p. 244-9, 2005.

CROFT, S. L.; YARDLEY, V. Chemotherapy of Leishmaniasis. *Curr Pharm Des*, v. 8, n. 4, p. 319-42, 2002.

CRISCUOLO, F.; BOUILLAUD, F. Free radicals run in lizard families: a mitochondrial uncoupling phenomenon or not? *Biol Lett*, v. 5, n. 3, p. 343-4, 2009

CSISZAR et al. Testing the oxidative stress hypotesis of aging in primate fibroblasts: is there a correlation between species longevity and cellular ROS production?. J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. v.67, n.8, p. 841-852, 2012

DAVIES, E. C. K. J. A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. Free Radic. Biol. Med., n. 29, p. 222-230, 2000.

DAYEM, A. A. et al. Role of Oxidative Stress in Stem, Cancer, and Cancer Stem Cells. Cancers, v. 2, n. 2, p. 859-884, 2010.

DU, S.; FRANCISCO, J. S.; KAIS, S. Study of electronic structure and dynamics of interacting free radicals influenced by water. J Chem Phys, v. 130, n. 12, p. 124-312, 2009.

FEVRIER, A. et al. Acetogenins and other compounds from *Rollinia emarginata* and their antiprotozoal activities. Planta Med, v. 65, n. 1, p. 47-9, 1999.

FOURNET, A. et al. Biological and chemical studies of *Pera benensis*, a Bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous Leishmaniasis. J Ethnopharmacol, v. 37, n. 2, p. 159-64, 1992.

FOURNET, A. et al. AntiLeishmanial activity of a tetralone isolated from *Ampelocera edentula*, a Bolivian plant used as a treatment for cutaneous Leishmaniasis. Planta Med, v. 60, n. 1, p. 8-12, 1994.

FRAGOSO-SERRANO, M.; GIBBONS, S.; PEREDA-MIRANDA, R. Anti-staphylococcal and cytotoxic compounds from *Hyptis pectinata*. Planta Med, v. 71, n. 3, p. 278-80, 2005.

FRAGOSO-SERRANO, M.; GONZALEZ-CHIMEO, E.; PEREDA-MIRANDA, R. Novel labdane diterpenes from the insecticidal plant *Hyptis picigera*. J Nat Prod, v. 62, n. 1, p. 45-50, 1999.

FRANCO, C. R. et al. Bioassay-guided evaluation of antinociceptive properties and chemical variability of the essential oil of *Hyptis fruticosa*. Phytother Res, v. 25, n. 11, p. 1693-9, 2011.

FRANCO, M. A. et al. Antimony oxidation states in antiLeishmanial drugs. Am J Trop Med Hyg, v. 52, n. 5, p. 435-7, 1995.

GARLAND, E. L. Pain processing in the human nervous system: a selective review of nociceptive and biobehavioral pathways. *Prim Care*, v. 39, n. 3, p. 561-71, 2012.

GAUTAM, M. K. et al. Curative effect of *Terminalia chebula* extract on acetic acid-induced experimental colitis: role of antioxidants, free radicals and acute inflammatory marker. *Inflammopharmacology*, 2012

GETOFF, N. Vitamin free radicals and their anticancer action. Review. *In Vivo*, v. 23, n. 4, p. 599-611, 2009

GILLESPIE, R. D.; MBOW, M. L.; TITUS, R. G. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunol*, v. 22, n. 7, p. 319-31, 2000.

GOLSHANI, S. et al. Antinociceptive effects of the essential oil of *Dracocephalum kotschy* in the mouse writhing test. *J Pharm Pharm Sci*, v. 7, n. 1, p. 76-9, 2004.

GRENAND, P. C. M., C.; JAQUEMIN, M. *Pharmacopées traditionnelles en Guyane*. Paris: Ed. LÓRSTOM, 1987. 559p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M.; CROSS, C. E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med*, v. 119, n. 6, p. 598-620, 1992

HALLIWELL, B.; CROSS, C. E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect*, v. 102 Suppl 10, p. 5-12, 1994

HAZRA, B. et al. Antiprotozoal activity of diospyrin towards *Leishmania donovani* promastigotes in vitro. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 81, n. 5, p. 738-41, 1987.

HERMOSO, T. et al. Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system. *EMBO J*, v. 10, n. 13, p. 4061-7, 1991.

HOCQUEMILLER, R. et al. Isolation and synthesis of espintanol, a new antiparasitic monoterpene. *J Nat Prod*, v. 54, n. 2, p. 445-52, 1991.

IMAM, M. Z. et al. Antinociceptive activity of methanol extract of flowers of *Impatiens balsamina*. *J Ethnopharmacol*, v. 142, n. 3, p. 804-10, 2012.

JAGANJAC, M. et al. Even stressed cells are individuals: second messengers of free radicals in pathophysiology of cancer. *Croat Med J*, v. 53, n. 4, p. 304-9, 2012.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I.. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, v.431p. 203-210, 2001

JUNG, H. J. et al. Enhancement of anti-inflammatory and antinociceptive actions of red ginseng extract by fermentation. *J Pharm Pharmacol*, v. 64, n. 5, p. 756-62, 2012.

KAMESHWARAN, S. et al. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory potential of flower extract *Tecoma stans*. *Indian J Pharmacol*, v. 44, n. 4, p. 543-4, 2012.

KLAUMANN, P. R. W., A.F. P. S.; SILLAS, T. Pathophysiology of pain. *Archives of Veterinary Science*, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2008.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F. *In vitro* leishmanicidal activity of naturally occurring chalcones. *Phytother Res*, v. 15, n. 2, p. 148-52, 2001.

KUBOW, S.. Lipid oxidation products in food and atherogenesis. *Nutrition Reviews*, v. 51, n. 2, p. 33-40, 1993.

LAVAUD, C. et al. 4-Quinolone alkaloids from *Dictyoloma peruviana*. *Phytochemistry*, v. 40, n. 1, p. 317-20, 1995.

LINO, C. S. et al. Evaluation of antinociceptive and antiinflammatory activities of the essential oil (EO) of *Ocimum micranthum* Willd. from Northeastern Brazil. *Phytother Res*, v. 19, n. 8, p. 708-12, 2005.

LISBOA, A. C. et al. Antinociceptive effect of *Hyptis pectinata* leaves extracts. *Fitoterapia*, v. 77, n. 6, p. 439-42, 2006.

LOPEZ, R. E. Proteases de *Leishmania*: Novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. *Quim.Nova*, v. 33, n. 7, p. 1541-1548, 2010.

LOVE, E. J.; MURRELL, J.; WHAY, H. R. Thermal and mechanical nociceptive threshold testing in horses: a review. *Vet Anaesth Analg*, v. 38, n. 1, p. 3-14, 2011.

LOZINOVA, T. A.; LANDER, A. V. Effect of irradiation intensity on the production of free radicals by near-UV photosensitization of frozen adenine solutions with an inorganic phosphate. *Biofizika*, v. 54, n. 6, p. 992-8, 2009.

MACHADO, P.R. et al. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. *Clinical infectious diseases*, v.44, p. 788-793, 2007.

MACHADO, M. et al. Monoterpenic aldehydes as potential anti-Leishmania agents: activity of *Cymbopogon citratus* and citral on *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major*. *Exp Parasitol*, v. 130, n. 3, p. 223-31, 2012.

MAHIOU, V. et al. Piperogalin, a new prenylated diphenol from *Peperomia galioides*. *J Nat Prod*, v. 58, n. 2, p. 324-8, 1995.

MAHIOU, V. et al. New aporphine alkaloids from *Guatteria foliosa*. *J Nat Prod*, v. 57, n. 7, p. 890-5, 1994.

MELO, G. B. et al. Proliferative effect of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Acta Cir Bras*, v. 21 Suppl 1, p. 33-6, 2006.

MELO, G. B. et al. Effect of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* on liver mitochondrial respiration. *Phytomedicine*, v. 12, n. 5, p. 359-62, 2005.

MENEZES, I. A. et al. Antinociceptive effect and acute toxicity of the essential oil of *Hyptis fruticosa* in mice. *Fitoterapia*, v. 78, n. 3, p. 192-5, 2007.

MISHRA, J.; SAXENA, A.; SINGH, S. Chemotherapy of Leishmaniasis: past, present and future. *Curr Med Chem*, v. 14, n. 10, p. 1153-69, 2007.

MITTAL, N. et al. Protective effect of Picroliv from *Picrorhiza kurroa* against *Leishmania donovani* infections in *Mesocricetus auratus*. *Life Sci*, v. 63, n. 20, p. 1823-34, 1998.

MONZOTE, L. Current treatment of Leishmaniasis: A Review. *The Open Antimicrobial Agents Journal*, v. 1, p. 9-19, 2009.

MORAIS, S. M., DANTAS, J.D., SILVA, A.R., MAGALHÃES, E.F. Plantas medicinais usadas pelos índios tapebas do Ceará. *Revista Brasileira de Farmacologia*, v. 15, p. 169-177, 2005.

MORETTI, C. et al. Tropical biological diversity and therapeutic innovations. Research conducted by ORSTOM. *Ann Soc Belg Med Trop*, v. 73, n. 3, p. 169-78, 1993.

MORETTI, C. et al. Antimalarial activity of *cedronin*. J Ethnopharmacol, v. 43, n. 1, p. 57-61, 1994.

MORUCCI, F. et al. Antinociceptive activity of aqueous extract and isolated compounds of *Lithrea molleoides*. J Ethnopharmacol, v. 142, n. 2, p. 401-6, 2012.

NASCIMENTO, P. F. et al. *Hyptis pectinata* essential oil: chemical composition and anti-*Streptococcus mutans* activity. Oral Dis, v. 14, n. 6, p. 485-9, 2008.

NOVELO, M. et al. Cytotoxic constituents from *Hyptis verticillata*. J Nat Prod, v. 56, n. 10, p. 1728-36, 1993.

OKETCH-RABAH, H. A. et al. Antiprotozoal properties of 16,17-dihydrobrachycalxolide from *Vernonia brachycalyx*. Planta Med, v. 64, n. 6, p. 559-62, 1998.

PALAS, F.S.G.; Gurkan, H. The role of free radicals in ethiopathogenesis of diseases. Advances in Molecular Biology. v.1p. 1-9, 2008.

PEREDA-MIRANDA, R. et al. Structure and stereochemistry of pectinolides A-C, novel antimicrobial and cytotoxic 5,6-dihydro- α -pyrones from *Hyptis pectinata*. J Nat Prod, v. 56, n. 4, p. 583-93, 1993.

PIETSCHMANN, M. V., O.; BESTMANN, H.S.; PANT, A.K.; MTHELA, C.S. Volatile constituents of *Hyptis pectinata* L. Point. (Lamiaceae). Journal of essential oil research, v. 10, n. 5, p. 550-52, 1998.

PHILPOTT, M.; LIM, C. C.; FERGUSON, L. R. Dietary protection against free radicals: A case for multiple testing to establish structure-activity relationships for antioxidant potential of anthocyanic plant species. Int J Mol Sci, v. 10, n. 3, p. 1081-103, 2009

PRATES, D. B. et al. New Insights on the Inflammatory Role of *Lutzomyia longipalpis* Saliva in Leishmaniasis. J Parasitol Res, v. 2012, p. 643029, 2012.

PURI, A. et al. Immunostimulant activity of *Nyctanthes arbor-tristis* L. J Ethnopharmacol, v. 42, n. 1, p. 31-7, 1994.

RANGEL, E. F.; VILELA, M. L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral Leishmaniasis in Brazil. Cad Saude Publica, v. 24, n. 12, p. 2948-52, 2008.

RALSER, M.; LEHRACH, H. Building a new bridge between metabolism, free radicals and longevity. *Aging* (Albany NY), v. 1, n. 10, p. 836-8, 2009

RASMUSSEN, H. B. et al. Absolute configuration and antiprotozoal activity of minquartynoic acid. *J Nat Prod*, v. 63, n. 9, p. 1295-6, 2000.

RAY, S. et al. Amarogentin, a naturally occurring secoiridoid glycoside and a newly recognized inhibitor of topoisomerase I from *Leishmania donovani*. *J Nat Prod*, v. 59, n. 1, p. 27-9, 1996.

RIBEIRO, J. M. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu Rev Entomol*, v. 32, p. 463-78, 1987.

ROCHA, L. A., JRGS; MACÊDO RO; BARBOSA-FILHO, JM. A review of natural products with antiLeishmanial activity. *Phytomedicina*, v. 12, p. 514-535, 2005.

RYAN, J. R. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous Leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, v. 40, n. 3, p. 1037-43, 2002.

SANTOS, R. P. et al. Phytochemical profiles and inhibitory effect on free radical-induced human erythrocyte damage of *Dracaena draco* leaf: A potential novel antioxidant agent. *Food Chemistry*, v. 124, n. 3, p. 927-934, 2011.

SANTOS, T. C. et al. Antinociceptive effect and acute toxicity of the *Hyptissuaveolens* leaves aqueous extract on mice. *Fitoterapia*, v. 78, n. 5, p. 333-6, 2007.

SANTOS, R.P.; MENDES, L.S.; SILVA, B.M.; PINHO, P.G.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B.; PEREIRA, J.A.; CARVALHO, M., Phytochemical profiles and inhibitory effect on free radical-induced human erythrocyte damage of *Dracaena draco* leaf: A potential novel antioxidant agent. *Food Chemistry*, v. 124, p. 927-934, 2011

SEPTIMO, L. R. A Fitoterapia Baseada em Ervas Medicinais do Cerrado. Brasília: Ministério da Cultura, 1994.

SHARMA, U. S., S. Immunology of Leishmaniasis. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 47, p. 412-423, 2009.

SHER, R. E. A. Avaliação do efeito teratogênico do extrato aquoso das folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. (Lamiaceae) em ratas Wistar. *Biologia Geral e Experimental*, v. 3, n. 2, 2003.

SIMÕES, C. M. O. E. A. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Florianópolis: UFSC & UFRGS, 2010.

SINGH, R. K.; PANDEY, H. P.; SUNDAR, S. Visceral Leishmaniasis (kala-azar): challenges ahead. *Indian J Med Res*, v. 123, n. 3, p. 331-44, 2006.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of Leishmaniasis. *J Infect Chemother*, v. 10, n. 6, p. 307-15, 2004.

SOTO-MANCIPE, J.; GROGL, M.; BERMAN, J. D. Evaluation of pentamidine for the treatment of cutaneous Leishmaniasis in Colombia. *Clin Infect Dis*, v. 16, n. 3, p. 417-25, 1993.

SOUZA, V. C. L. H. Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. São Paulo: Nova Odessa, 2005.

TEIXEIRA, E. D., QS; GALUPPO MK; ROMANHA, AJ; RABELLO A. The in vitro leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against four medically relevant *Leishmania* species of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 106, n. 4, p. 475-478, 2011.

THAKUR, C. P.; NARAYAN, S.; RANJAN, A. Epidemiological, clinical & pharmacological study of antimony-resistant visceral Leishmaniasis in Bihar, India. *Indian J Med Res*, v. 120, n. 3, p. 166-72, 2004.

TRIPATHI, A. N. J. T. Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 2, n. 2, p. 234-253, 2003.

TORRES-SANTOS, E. C. et al. Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 43, n. 5, p. 1234-41, 1999.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007

WAECHTER, A. I. et al. Antiprotozoal activity of aporphine alkaloids isolated from *Unonopsis buchtienii* (Annonaceae). *Phytother Res*, v. 13, n. 2, p. 175-7, 1999.

WILLCOX, M. L. et al. Natural products for the treatment of tropical diseases. *Trends Parasitol*, v. 17, n. 2, p. 58-60, 2001.

WILLIS, W. D., JR. Anatomy and physiology of descending control of nociceptive responses of dorsal horn neurons: comprehensive review. *Prog Brain Res*, v. 77, p. 1-29, 1988.

YARDLEY, V.; CROFT, S. L. Activity of liposomal amphotericin B against experimental cutaneous Leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 41, n. 4, p. 752-6, 1997.

YUNES, R. N. C., J.B. Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna. Santa Catarina: Argos, 2001.

4. CAPÍTULO 1

Artigo 1 – Atividade Leishmanicida de fenilpropanoides das folhas de *Hyptis pectinata*(L.) Poit¹

^{1*} Artigo submetido arevista Chemistry Central Journal, fator de impacto 3.28.

Atividade Leishmanicida de fenilpropanoides das folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit

Rosangela Alves Falcao¹ (rosangela.falcao@terra.com.br)

Patricia Lins AzevedodoNascimento³(patricialanascimento@hotmail.com)

Silvana Alves de Souza¹ (silvanaalvesp@hotmail.com)

Telma Maria Guedes da Silva¹(thelguel@bol.com.br)

Aline Cavalcanti de Queiroz²(allycq_farmacia@hotmail.com)

Carolina Barbosa Brito da Matta² (caroll_brito@hotmail.com)

Magna Suzana Alexandre Moreira² (suzana.magna@gmail.com)

Celso Amorim Camara¹ (ccelso@dcm.ufrpe.br)

Tania Maria Sarmento Silva¹² (tanciasarmento@dcm.ufrpe.br)

1-Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica, Departamento de Ciências Moleculares, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP 52171-900, Pernambuco, Brazil.

2-Laboratório de Farmacologia e Imunidade , Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970, Alagoas, Brazil.

3- Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP 52.171-900, Pernambuco, Brazil

*Corresponding author: Tel.: +55 81 33206382; fax: +55 81 33206374
E-mail: tanciasarmento@dcm.ufrpe.br (TMS Silva)

Abstract

Background: *Hyptis pectinata* (L.) Poit is popularly known in Brazil as “sambacaitá” or “canudinho”, is a aromatic shrub largely grown in the northeastern of Brazil. The leaves and barks are used as infusion for the treatment of throat and skin inflammations, bacterial infections, pain and cancer.

Results: Analogues of rosmarinic acid and flavonoids were obtained from leaves of *Hyptis pectinata*, consisting of two new compounds, sambacaitaric acid (**1**) and 3-O-methyl-sambacaitaric acid (**2**) and nine known compounds, rosmarinic acid (**3**), 3-O-methyl-rosmarinic acid (**4**), ethyl caffeoate (**5**), nepetoidin A (**6**), nepetoidin B (**7**), cirsiol (**8**), circimaritin (**9**), 7-O-methyluteolin (**10**) and genkwanin (**11**). The structures of these compounds were determined on the basis of spectroscopic methods. The compounds **1-5** and **7** were evaluated *in vitro* against promastigotes forms of *L. braziliensis*, and were also evaluated ethanolic extract, hexanic, ethyl acetate and methanol-water fractions.

Conclusions: From the leaves of *Hyptis pectinata* were isolated seven phenylpropanoids and four flavonoids. The EtOH extract, Hexane, AcOEt, MeOH:H₂O fractions and compounds **1**, **2** and **4** exhibited antileishmanial activity, compounds **1** were as potent as pentamidine. In contrast, the compounds **3**, **5**, and **7** did not present activity against promastigote forms of *L. braziliensis* until 100 µM. As long as we know, compounds **1** and **2** are being described for the first time.

Keywords: *Hyptis pectinata*, phenylpropanoids, flavonoids, antileishmanial activity

Resumo

Introdução: *Hyptis pectinata* (L.) Poit é popularmente conhecida no Brasil como sambacaitá “sambacaeté” ou “canudinho”, é uma espécie arbustiva muito comum no Nordeste do Brasil. Suas folhas e cascas são utilizadas na forma de infusão no tratamento inflamações de garganta, problemas de pele, infecções bacterianas, dor e câncer.

Resultados: Análogos do Ácido Rosmarínico e flavonoides foram obtidos das folhas de *Hyptis pectinata*, consistindo de dois compostos novos, ácido sambacaitárico (**1**) e o ácido 3-O-metil-sambacaitárico (**2**) e nove compostos conhecidos, ácido rosmarínico (**3**), ácido 3-O-metil-rosmarínico (**4**), etil cafeoato (**5**), nepetoidina A (**6**), nepetoidina B (**7**), cirsiol (**8**), circimaritina (**9**), 7-O-metilluteolina (**10**) e genkwain (**11**). A estrutura destes compostos foi determinada com base em métodos espectroscópios. Os compostos de **1** a **5** e o composto **7** foi avaliado *in vitro* contra formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*, juntamente com o extrato etanólico (EtOH) e as frações hexânicas, acetato de etila (AcOEt) e metanol-água (MeOH:H₂O).

Conclusões: Das folhas de *Hyptis pectinata* foram isolados sete fenilpropanóides e quatro flavonóides. O extrato EtOH e as frações Hexano, AcOEt, MeOH:H₂O, além dos compostos **1**, **2** e **4** exibiram atividade leishmanicida, sendo o composto **1** com potência equivalente a pentamidina. Em contraste, os compostos **3**, **5** e **7** não apresentaram atividade contra formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* na concentração de 100 µM. Ressaltamos que os compostos **1** e **2** estão sendo descritos pela primeira vez.

Keywords: *Hyptis pectinata*, fenilpropanóides, flavonóides, atividade leishmanicida

Introdução

A família Lamiaceae possui extensão cosmopolita e compreende 236 gêneros e 7.173 espécies [1]. Este grupo de plantas é conhecido pelos seus óleos essenciais [2], os quais são ricos em terpenóides, especialmente na subfamília Nepetoideae. Na América do Sul, *Hyptis* é um dos principais gêneros desta subfamília que compreende 280 espécies. Destas espécies, ocorrem no Brasil 146 de forma endêmica[3].

Hyptis pectinata (L.) Poit, subfamília Nepetoideae, popularmente conhecida no Brasil por “sambacaitá” ou “canudinho”, é um arbusto aromático com largo crescimento no nordeste do Brasil [4], sendo uma planta herbácea com folhas aromáticas, pequenas flores bilabiais agrupadas em inflorescências axilares[5]. Embora existam relatórios sobre os constituintes de *H. pectinata*, estes estudos [6] tem como foco principal a composição do óleo essencial [7]. A planta é utilizada pela medicina popular para várias condições tais como, rinofaringites, congestão nasal, problemas de pele[8], distúrbios gástricos, febre [9] e infecções bacterianas[10]. As folhas e cascas são usadas na forma de infusos para tratamentos de garganta, inflamações de pele, infecções bacterianas, dor e câncer [11-13].

O efeito curativo de *H. pectinata* sugere que a planta pode ter uma ação leishmanicida. A Leishmaniose é um grande problema de saúde pública no mundo, com três milhões de casos anuais [14]. A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma séria zoonose endêmica em considerável área da América Latina [15]. A principal forma clínica da LTA são a leishmaniose cutânea, mucosa e mucocutânea, além da cutânea difusa. No Brasil, LTA é encontrada em todos os estados com alta incidência nos últimos 20 anos, além de existir uma grande diversidade genética de parasitas, pelo menos sete espécies de *Leishmania* são descritas como agente etiológico da doença cutânea em humanos, sendo a maioria causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*[16-18].

As drogas comercialmente encontradas para tratamento de Leishmaniose possuem um alto grau de toxicidade, necessitando de monitoramento hospitalar devido ao risco de óbito[19]. Graças a este problema no tratamento, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem encorajado através do Programa de Doenças Tropicais a pesquisa de produtos naturais capazes de atuar no tratamento da leishmaniose[20].

O presente trabalho conduziu ao isolamento de dois novos compostos denominados ácido sambacaitárico (1) e ácido 3-O-metil-sambacaitárico (2) (Figura 4) e nove conhecidos compostos oriundo de folhas *H. pectinata.*, sendo de **1-7** fenilpropanóides e **8-11** flavonoides (Figura 5 e 6). Os extratos EtOH, Hexânico, AcOEt, MeOH:H₂O e os compostos **1-5** e **7** foram avaliados *in vitro* contra formas promastigotas de *L. braziliensis*.

Resultados e discussão

As folhas de *Hyptis pectinata*, após sofrerem extração e fracionamento, produziram os compostos de **1-11**. (Figuras 4-6). Os compostos 1 e 2 foram identificados como novas substâncias análogas ao ácido rosmarínico, baseado nos detalhes descritos pelo RMN (Ressonância Magnética) (Tabela 8). O composto **1** foi obtido como um pó amarelado e amorfo e sua rotação óptica foi $[\alpha]_D = +30$ (c 0.001, MeOH). A formula molecular foi deduzida como C₁₈H₁₆O₈ por HRESIMS, que mostraram um pico de íon molecular $[M-H]^+$ para m/z 359.0759 (Calculado para C₁₈H₁₅O₈, 359.0761). O espectro de Ultra Violeta (UV) exibiu sinais em 322, 296 e 239 nm, espectro de IR mostrou sinais em 3435, 1628, 1524 e 1405 cm⁻¹. O ¹H e ¹³C do espectro de RMN de **1** foi similar ao obtido pelo ácido rosmarínico.

No espectro ¹H-RMN de **1**, dois conjuntos de sinais prótons ABX em δ 7.03, d, $J=2.0$ Hz; 6.74, d, $J=8.5$ Hz; 6.92, dd, $J=8.5, 2.0$ Hz) e (δ 6.66, d, $J=2.0$ Hz; 6.59, d, $J=8.5$ Hz; 6.48, dd, $J=8.5, 2.0$ Hz), e dois prótons oefínicos em δ 7.34 (d, $J=17.0$ Hz) e 6.18 (d, $J=17.0$ Hz) foram observados. Na região alifática, foram observados três sinais de prótons em δ 4.85 (m), 3.01 (m) e 2.74 (m). O espectro de ¹³C-NMR mostrou 18 sinais de carbono. O H-7 sinal de próton (δ 7.34) acoplado a longa distância com carbonos aromáticos em δ 125.58 (C-1), 114.23 (C-2), e 119.4 (C-6) e um carbono olefínico em δ 114.90 (C-8) e um carbono de carbonila em δ 166.22 (C-9) na correlação heteronuclear múltipla (HMBC) espectro (Figura 1). A configuração absoluta de **1** foi determinada por espectroscopia de dicroísmo (CD). A medida que o centro quiral e seu ambiente imediato são idênticos aos do ácido rosmarínico **3** (Figura 4) seria de se esperar um espectro CD similar em torno de C-8' igual a **1**. Com base nas observações, a estrutura do composto (**1**) foi estabelecida sendo ácido isoferuloil-4'-(3'-hidroxifenil)-(8'R)-lático denominado ácido sambacaitárico.

O ácido sambacaitárico (**1**) foi tratado com Ac_2O /piridina para dar o derivado paracetil (**1a**). Os dados espectrais RMN ^1H e ^{13}C NMR de **1a**, foram obtidos da extensivas análises 1D e 2D em RMN (Figura 1 e Tabela 1) sendo também utilizado para confirmar as estruturas postuladas em **1**. A estrutura **1a** apresenta o $[\text{M}-\text{H}]^+$ para m/z 527 na ionização por electrospray de espectroscopia de massa (ESI-MS) correspondendo a fórmula molecular $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$.

O composto **2** foi obtido a partir de substância em forma de pó amarela amorfa que apresentou uma rotação ótica positiva $[\alpha]_D = +10$ (c 0.1, MeOH). A fórmula molecular foi deduzida como $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_8$, a qual revela o pico $[\text{M}-\text{H}]^+$ em m/z 373. O espectro UV exibiu sinais em 340 nm e espectros IR mostraram sinais em 3420, 1680 e 1607 cm^{-1} . O ^1H e ^{13}C espectro RMN foi similar ao do composto **1** além da presença de um grupo metoxil na posição 3. Assim, a estrutura deste novo composto foi estabelecida como sendo ácido 3-O-metil-sambacaitárico.

Outros compostos conhecidos foram identificados por dados espectroscópicos (UV, IR, ESIMS e RMN) como ácido rosmarínico (**3**), ácido 3-O-methyl-rosmarínico (**4**) [21], Etil caffeoato (**5**) [22], Nepetoidina A (**6**), Nepetoidina B (**7**) [23], cirsiol (**8**) [24], circimaritina (**9**) [25], 7-O-metilluteolina (**10**) [26] egenkwanina (**11**) [27].

Os compostos **6** e **7** (nepetoidinas A e B, respectivamente) de acordo com Grayer et al [28], a presença deste par de ésteres de ácido caféico tem importância quimiotaxonômica pois distinguem a subfamília Nepetoideae das outras subfamílias de Lamiaceae.

O flavonóide **8** (cirsiol) é o primeiro relatado no gênero *Hyptis*, no entanto encontrado nas Lamiaceae nos gêneros *Sideritis*, *Stachys*, *Teucrium* e *Rosmarinus*. De acordo com Tomas-Barberan et al [29] estes compostos são localizados externamente, dissolvidos em uma matriz terpenóide, e tem sido encontrado em larga escala em espécies de habitat secos. Os flavonoides **9** (circimaritina) e **11** (genkwanina) foram isolados em *Hyptis fasciculata*, espécie nativa do Brasil, Argentina e Uruguai. O composto **10** (7-O-methilluteolina) foi reportado pela primeira vez no gênero *Hyptis*.

Para avaliar e comparar o perfil leishmanicida de *H. pectinata*, foram utilizados o extrato EtOH; as frações hexânica, AcOEt e MeOH:H₂O; e os compostos isolados em maior quantidade **1-5** e **7**. A atividade *in vitro* utilizou as formas promastigotas de *L. braziliensis*. Os parâmetros utilizados para atividade

leishmanicida foram os valores para o efeito máximo e IC_{50} (a concentração da amostra que causa redução de 50% de sobrevivência/ viabilidade do parasita) apresentados na Tabela 9.

O extrato EtOH, as frações Hexânica, AcOEt e MeOH:H₂O e os compostos **1**, **2** e **4** apresentaram atividade leishmanicida, com o efeito máximo de $91,6 \pm 2,5$ / $61,5 \pm 1,2$ / $81,5 \pm 5,9$ / $90,0 \pm 3,6$ / $56,0 \pm 0,8$ / $48,8 \pm 1,7$ e $69,1 \pm 2,7\%$, respectivamente. Além disso, o extrato EtOH ($IC_{50} = 0,7 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$), a fração AcOEt ($IC_{50} = 0,4 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$), fração Hexânica ($IC_{50} = 0,2 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$), compostos **1** ($IC_{50} = 6,9 \pm 0,7 \mu\text{M}$ / $2,5 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$) e **4** ($IC_{50} = 5,4 \pm 0,8 \mu\text{M}$ / $2,0 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$) apresentaram-se tão potentes quanto a pentamidina (com eficácia de $93,5 \pm 0,7 \%$ e $IC_{50} = 0,9 \pm 0,03 \mu\text{M}$ / $0,3 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$). Em contraste, os compostos **3**, **5**, e **7** não apresentaram atividade contra as formas promastigotas de *L. braziliensis* na concentração 100 μM .

Vários polifenóis tem sido apresentados com efeitos leishmanicidas promissores[31, 32]. Com relação estrutura/atividade, verifica-se que, a presença de metoxilação do ácido sambacaitárico em C₃ reduz a eficácia e o potencial do composto perante a *L. braziliensis*. Por outro lado, a ausência do grupo metoxila na posição **3** no ácido rosmarínico (**3**) impediu a atividade contra a forma promastigota de *L. braziliensis*. Radtke [33] demonstrou que o ácido rosmarínico não apresentou toxicidade seletiva quando testado em estágios de promastigotas de outras espécies de *Leishmania* (*L. major*, *L. donovani*, *L. guyanensis*, *L. killicki*), mas exibe uma atividade moderada contra a forma intracelular amastigota.

Com relação aos ésteres de ácido caféico presentes neste estudo (**5** and **7**) não tem sido demonstrado atividade leishmanicida contra promastigotas de *L. braziliensis* [34] porém mostra que outros ésteres de ácido caféico como 1-metilbutil caffeato, 1'-metilhexil caffeato e 1'-metiloctil caffeato foram ativos contra a forma axênica amastigota de *L. amazonensis*, com IC_{50} of $2,0 \pm 0,1$, $10,0 \pm 0,4$ e $1,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$, respectivamente.

Materiais e métodos

Geral

Os pontos de fusão foram determinados em um estágio Koeffler quente e sem correção. Os espectros de absorção no infravermelho foram registrados em pastilha

de KBr, utilizando um espectrofotômetro Varian 640 FT-IR com um acessório de funcionamento PIKE ATR operando em 4000-400 cm^{-1} range. A cromatografia líquida- ionização por eletrospray-espectrometria de massa foi obtido em modo electrospray negativo usando um Esquire 3000 Plus (Bruker) e HRESIMS foi obtido em MicroTOF (Bruker). Sílica gel 60 F₂₅₄ (E. Merck) para placas TLC. Sephadex[®] LH-20 (Sigma) foi utilizado na cromatografia em coluna. Espectros ¹H e ¹³C RMN foram obtidos utilizando um Bruker DRX 500 (500 MHz for ¹H e 125 MHz em ¹³C) e Bruker DPX300 (300 MHz em ¹H e 75 MHz em ¹³C) em DMSO-*d*₆. O Dicroísmo Circular foi gravado com espectrofotômetro Jasco J-515 CD. A rotação ótica foi determinada em espectrofotômetro KRUESS OPTRONIC. Todos os solventes usados são de uso comercial para HPLC.

Material vegetal

As folhas de *Hyptis pectinata* foram coletadas na cidade de Garanhuns, Estado de Pernambuco, Brasil de abril a julho de 2010. A espécie está depositada no Instituto de Pesquisa Agropecuária (IPA), Pernambuco, Brasil.

Extração e Isolamento

O material da planta foi extraído sucessivamente em EtOH até atingir a quantidade de 7.0 g de extrato seco. Este extrato foi dissolvido em MeOH:H₂O (1:1) e fracionado sucessivamente com hexano e AcOEt. A porção da fração AcOEt (3.5 g) foi cromatografada em coluna de Sephadex LH-20 utilizando metanol como fase móvel. Compostos **1** (44.2 mg), **2** (54.0 mg), **3** (97.9 mg), **4** (26.0), **5** (24.9 mg), **6** (20.0 mg), **7** (28.3 mg), **8** (22.4 mg), **9** (14.0 mg), **10** (11.0 mg) e **11** (7.4 mg) foram purificados em HPLC semi-preparativo em coluna Luna Phenomenex RP-18 (21 mm x 250 mm x 5 μm) com uma taxa de fluxo de 16 mL/min utilizando na fase móvel H₂O (A) e metanol (B): 0-10 min: 40-60 % B, 25 min 80 % B, 28 min, 100 % para 320 nm. A purificação dos compostos foi examinada utilizando HPLC analítico. A pureza dos compostos foi examinada usando HPLC analítico com detecção por arranjo de diodo.

Ácido Sambacaitárico(**1**), $[\alpha]_D = +50$ (c 0.001, MeOH), IR (KBr) ν_{max} : 3435 (OH), 1658 (C=O), 1524, (C=C do anel aromático). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz, ver Tabela 1),

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz, ver Tabela 1). HRESIMS (modo negativo) m/z 359.0761 $[\text{M}-\text{H}]^+$ ($\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{O}_8$).

Ácido 3-O-metil-sambacaitarico (**2**), $[\alpha]_D = +10$ (c 0.001, MeOH), ^1H NMR (300Mz, DMSO): δ 7.35 (1H, d, $J=15.9$ Hz, H-7); 7.01 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-2), 6.91 (1H, dd, $J=8.1;2.1$ Hz, H-6), 6.73 (1H, d, $J=8.1$ Hz, H-5), 6.66 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-2'), 6.58 (1H, d, $J=8.1$ Hz, H-5'), 6.48 (1H, dd, $J=8.1;2.1$ Hz, H-6'), 6.18 (1H, d, $J=15.9$ Hz, H-8), 8.83 (1H, m; H-8'), 3.02 e 2.73 (2H, m, H-7'). ^{13}C NMR (75Mz, DMSO): δ 172.6 (C-9'), 166.7 (C-9), 148.2 (C-4), 146.3 (C-3), 145.3 (C-3'), 144.5 (C-7), 143.89 (C-4'), 130.5 (C-1'), 126.1 (C-1), 121.3 (C-6), 120.1 (C-6'), 116.9 (C-2'), 116.3 (C-5), 115.8 (5'), 115.5 (C-2), 115.3 (C-8), 76.6 (C-8'), 56.9 (OCH_3), 37.8 (C-7').

Ácido Rosmarínico (**3**), $[\alpha]_D = +10$ (c 0.001, MeOH), UV λ_{max} 242, 324. IR (KBr) ν_{max} : 3382 (OH), 1697 (C=O), 1606, 1522 (C=C do anel aromático). LC-ESI-MS (modo negativo) m/z 359 $[\text{M}-\text{H}]^+$ ($\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$).

Ácido 3-O-metil-rosmarínico (**4**), $[\alpha]_D = +20$ (c 0.001, MeOH), UV λ_{max} 253, 340. IR (KBr) ν_{max} : 3394 (OH), 1692 (C=O), 1603, 1520 (C=C do anel aromático). LC-ESI-MS (modo negativo) m/z 373 $[\text{M}-\text{H}]^+$ ($\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_8$).

Etil caffeoato (**5**) UV λ_{max} 283, 337. IR (KBr) ν_{max} : 3397 (OH), 1678 (C=O), 1605, 1520 (C=C do anel aromático). LC-ESI-MS (modo negativo) m/z 207 $[\text{M}-\text{H}]^+$ ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4$).

Nepetoidina A (**6**) UV λ_{max} 249, 340. IR (KBr) ν_{max} : 3418 (OH), 1680 (C=O), 1603, 1520 (C=C do anel aromático). LC-ESI-MS (modo negativo) m/z 313 $[\text{M}-\text{H}]^+$ ($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$).

Nepetoidina B (**7**) UV λ_{max} 251, 340. IR (KBr) ν_{max} : 3382 (OH), 1701 (C=O), 1604, 1516 (C=C do anel aromático). LC-ESI-MS (modo negativo) m/z 313 $[\text{M}-\text{H}]^+$ ($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$).

Cirsiliol (**8**) UV λ_{max} 272, 346. IR (KBr) ν_{max} : 3419 (OH), 1650 (C=O), 1600, (C=C do anel aromático). LC-ESI-MS (modo negativo) m/z 329 $[\text{M}-\text{H}]^+$ ($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$).

Circimaritina (**9**) UV λ_{max} 274, 336. IR (KBr) ν_{max} : 3434 (OH), 1652 (C=O), 1599, (C=C do anel aromático). LC-ESI-MS (modo negativo) m/z 313 $[\text{M}-\text{H}]^+$ ($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$).

7-O-metilluteolina (**10**) UV λ_{max} 254, 349. IR (KBr) ν_{max} : 3397 (OH), 1664 (C=O), 1601, 1507 (C=C do anel aromático). LC-ESI-MS (modo negativo) m/z 299 $[\text{M}-\text{H}]^+$ ($\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$).

Genkwanin (**11**) UV λ_{max} 267, 338. IR (KBr) ν_{max} : 3445 (OH), 1670 (C=O), 1608, 1504 (C=C do anel aromático). LC-ESI-MS (modo negativo) m/z 283 $[\text{M-H}]^+$ ($\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$).

Ensaio in vitro contra *Leishmania braziliensis*

A forma promastigota da *Leishmania braziliensis* foi mantida *in vitro* em meio Schneider, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS) e 2% de urina humana. Soluções estoques do extrato EtOH, frações hexânica, AcOEt, MeOH:H₂O, bem como os compostos **1-5** e **7** de *H. pectinata* e pentamidina (droga de referência para tratamento da Leishmaniose) foi preparada em DMSO, imediatamente antes do uso. A citotoxicidade do extrato, frações e compostos contra promastigotas foi determinada previamente. A fase estacionária de *L. braziliensis* promastigotas foi plaqueada em placa de 96 poços (Nunc) a 1×10^5 células por poço, em meio Schneider, suplementado com 10% FBS e 2% de urina humana. Os compostos foram adicionados a placa em concentrações crescentes (0.001 – 100 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato e as frações e 0.001 – 100 μM para os compostos). As células foram cultivadas em meio livre de compostos e veículos (controle de crescimento basal); e com DMSO a 0,1% (veículo controle) Após 48 h, a carga extracelular de promastigotas de *L. braziliensis* foi estimada pela contagem do parasita em meio Schneider no contador de células automático CELM (modelo CC530) [35].

Conclusão

O estudo químico de folhas de *Hyptis pectinata* resultaram no isolamento de dois novos compostos, ácido sambacaitárico (**1**) e ácido 3-O-metil-sambacaitárico (**2**), e nove compostos, ácido rosmarínico (**3**), ácido 3-O-metil-rosmarínico (**4**), etil cafeoato (**5**), nepetoidina A (**6**), nepetoidina B (**7**), cirsiol (**8**), circimaritina (**9**), 7-O-metilluteolina (**10**) e genkwanina (**11**). O extrato EtOH, frações Hexânica, AcOEt, MeOH:H₂O e os compostos **1**, **2** e **4** exibiram atividade leishmanicida sendo **1** tão potente quanto a pentamidina. Ao contrário, os compostos **3**, **5** e **7** não apresentam atividade contra formas promastigotas de *L. braziliensis* na concentração de 100 μM . Parte da atividade da fração EtOAc pode ser atribuída a ação dos compostos isolados **1**, **2** e **4**.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não existe conflito de interesses.

Contribuição dos autores

TMSS e CAC realizaram a análise química e elucidação de estruturas; TMG realizou os estudos químicos; SAS PLAN e TMG desenvolveram os ensaios químicos diversos de extração e isolamento; MSAM, ACQ, CBBM e RAF conceberam o estudo de atividade biológica. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq (TMSS e CAC bolsistas de pesquisa), CAPES e FACEPE (PRONEM APQ-1232.1.06/10) pelo suporte financeiro, CENAPESQ e CETENE centro de análises, pelos dados gravados gentilmente fornecidos por eles. TMSS agradece a PRPPG-UFRPE pela gentil parceria. Os autores também agradecem ao Dr. Clecio de Souza Ramos pela análise CD.

Referências

1. Heywood VH (1993): Flowering plants of the world. Oxford;
2. Raymundo LJ, Guilhon CC, Alviano DS, Matheus ME, Antonioli AR, Cavalcanti SC, Alves PB, Alviano CS, Fernandes PD (2011): Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. J Ethnopharmacol, 134:725-732.
3. Harley RF, França F, Santos JS: Lamiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. [<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB008183>]
4. Almeida CFA, Albuquerque UP (2002): Check-list of the family Lamiaceae in Pernambuco, Brazil. Braz Arch Biol and Techn, 45:343-353.
5. Basilio IJLD, Agra MF, Rocha EA, Leal CKA, Abrantes HF (2006): Estudo farmacobotânico comparativo das folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit e *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae). Acta Farm Bonaerense, 25:518-525.
6. Pereda-Miranda R, Hernandez L, Villavicencio MJ, Novelo M, Ibarra P, Chai H, Pezzuto JM (1993): Structure and stereochemistry of pectinolides A-C, novel antimicrobial and cytotoxic 5,6-dihydro-alpha-pyrone from *Hyptis pectinata*. J Nat Prod, 56:583-593.
7. Nascimento PF, Alviano WS, Nascimento AL, Santos PO, Arrigoni-Blank MF, de Jesus RA, Azevedo VG, Alviano DS, Bolognese AM, Trindade RC (2008): *Hyptis pectinata* essential oil: chemical composition and anti-*Streptococcus mutans* activity. Oral Dis, 14:485-489.
8. Malan K, Pelissier Y, Marion C, Blaise A, Bessiere JM (1988): The essential oil of *Hyptis pectinata*. Planta Med, 54:531-532.
9. Lisboa AC, Mello IC, Nunes RS, Dos Santos MA, Antonioli AR, Marcal RM, Cavalcanti SC (2006): Antinociceptive effect of *Hyptis pectinata* leaves extracts. Fitoterapia, 77:439-442.
10. Rojas A, Hernandez L, Pereda-Miranda R, Mata R (1992): Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. J Ethnopharmacol, 35:275-283.
11. Melo GB, Silva RL, Melo VA, Antonioli AR, Michellone PR, Zucoloto S, Souza ME, Gomes MC, Correia RB, Silva OC (2006): Proliferative effect of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. Acta Cir Bras, 1:33-36.

12. Bispo MD, Mourao RH, Franzotti EM, Bomfim KB, Arrigoni-Blank MF, Moreno MP, Marchioro M, Antonioli AR (2001): Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. J Ethnopharmacol, 76:81-86.
13. Arrigoni-Blank MF, Silva-Mann R, Campos DA, Silva PA; Antonioli A R, Caetano LC, Sant'Ana AEG, Brank AF (2005): Morfological, agronomical and pharmacological characterization of *Hyptis pectinata* (L.) Poit germplasm. Braz J Pharmacog, 15:298-303.
14. Iwu MM, Jackson JE, Schuster BG (1994): Medicinal plants in the fight against Leishmaniasis. Parasitol Today, 10:65-68.
15. Amato VS, Tuon FF, Bacha HA, Neto VA, Nicodemo AC (2008): Mucosal leishmaniasis . Current scenario and prospects for treatment. Acta Trop, 105:1-9.
16. Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Leal CA, Pires MQ, Oliveira FS, Conceicao-Silva F, Rosalino CM, Salgueiro MM, Pacheco RS (2009): *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. Exp Parasitol, 121:317-322.
17. Rodrigues EH, Felinto de Brito ME, Mendonca MG, Werkhauser RP, Coutinho EM, Souza WV, Militao de Albuquerque MF, Jardim ML, Abath FG (2002): Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. J Clin Microbiol, 40:3572-3576.
18. Silva ACTC, Cupolillo E, Volpini AC, Almeida R, Romero GAS (2006): Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. Trop Med Int Health, 11:1388-1398.
19. Mishra JS, Saxene A, Singh S (2007): Chemoterapy of Leishmaniasis: Past, Present and Future. Curr Med Chem, 14:1153 - 1169.
20. Garcia M, Monzote L, Montalvo AM, Scull R (2010): Screening of medicinal plants against *Leishmania amazonensis*. Pharmaceutical Biology, 48:1053-1058.
21. Baba S, Osakabe N, Natsume M, Terao J (2004): Orally administered rosmarinic acid is present as the conjugated and/or methylated forms in plasma, and is degraded and metabolized to conjugated forms of caffeic acid, ferulic acid and m-coumaric acid. Life Sci, 75:165-178.

22. Xiang MS, Su H, Hu J, Yan Y (2011): Isolation, identification and determination of methyl caffeate, ethyl caffeate and other phenolic compounds from *Polygonum amplexicaule* var. *sinense*. J Med Plants Res, 5:1685-1691.
23. Nakanishi T, Nishi M, Inada A, Obata H, Tanabe N, Abe S, Wakashiro M (1990): Two new potent inhibitors of xanthine oxidase from leaves of *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo. Chem Pharm Bull, 38:1772-1774.
24. Abdelshafeek KA, Abdelrahem F, Elwahsh MA, Abdelkhalek IA (2009): Investigation of the flavonoidal constituents and insecticidal activity of *Teucrium zanonii*. Pharmacol Res, 1:410-416.
25. Masterova I, Uhrin D, Kettmann V, Suchy V (1989): Phytochemical study of *Salvia officinalis* L. Chem. Papers, 43:797-803.
26. Noro T, Oda Y, Miyase T, Ueno A, Fukushima S (1983): Inhibitors of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*. Chem Pharma Bull, 31:3984-3987.
27. Silva TMS, Carvalho MG, Braz-Filho R (2009): Spectroscopy study on structural elucidation of flavonoids from *Solanum jabrense* Agra & Nee and *S. paludosum* Moric. Quim. Nova, 32:1119-1128.
28. Grayer RJ, Eckert MR, Veitch NC, Kite GC, Marin PD, Kokubun T, Simmonds MS, Paton AJ (2003): The chemotaxonomic significance of two bioactive caffeic acid esters, nepetoidins A and B, in the Lamiaceae. Phytochemistry, 64:519-528.
29. Tomas-Barberan FA, Wollenweber E (1990): Flavonoid aglycones from the leaf surfaces of some *Labiatae* species. Syst Evol, 173:109-118.
30. Isobe T, Doe M, Morimoto Y, Nagata K, Ohsaki A (2006): The anti-*Helicobacter pylori* flavones in a Brazilian plant, *Hyptis fasciculata*, and the activity of methoxyflavones. Biol Pharm Bull, 29:1039-1041.
31. Hay AE, Merza J, Landreau A, Litaudon M, Pagniez F, Le Pape P, Richomme P (2008): Antileishmanial polyphenols from *Garcinia vieillardii*. Fitoterapia, 79:42-46.
32. Abdel-Hady NM, Dawoud GT, El-Hela AA, Morsy TA (2011): Interrelation of antioxidant, anticancer and antileishmania effects of some selected Egyptian plants and their phenolic constituents. J Egypt Soc Parasitol, 41:785-800.
33. Radtke OA, Foo LY, Lu Y, Kiderlen AF, Kolodziej H (2003): Evaluation of sage phenolics for their antileishmanial activity and modulatory effects on

- interleukin-6, interferon and tumour necrosis factor- α -release in RAW 264.7 cells. Zeitschrift fur Naturforschung. C, J Biosc, 58:395-400.
34. Cabanillas BJ, Le Lamer AC, Castillo D, Arevalo J, Rojas R, Odonne G, Bourdy G, Moukarzel B, Sauvain M, Fabre N (2010): Caffeic acid esters and lignans from *Piper sanguineispicum*. J Nat Prod, 73:1884-1890.
 35. Rangel H, Dagger F, Hernandez A, Liendo A, Urbina JA (1996): Naturally azole-resistant *Leishmania braziliensis* promastigotes are rendered susceptible in the presence of terbinafine: comparative study with azole-susceptible *Leishmania mexicana* promastigotes. Antimicrob Agents and Chemother, 40:2785-2791.

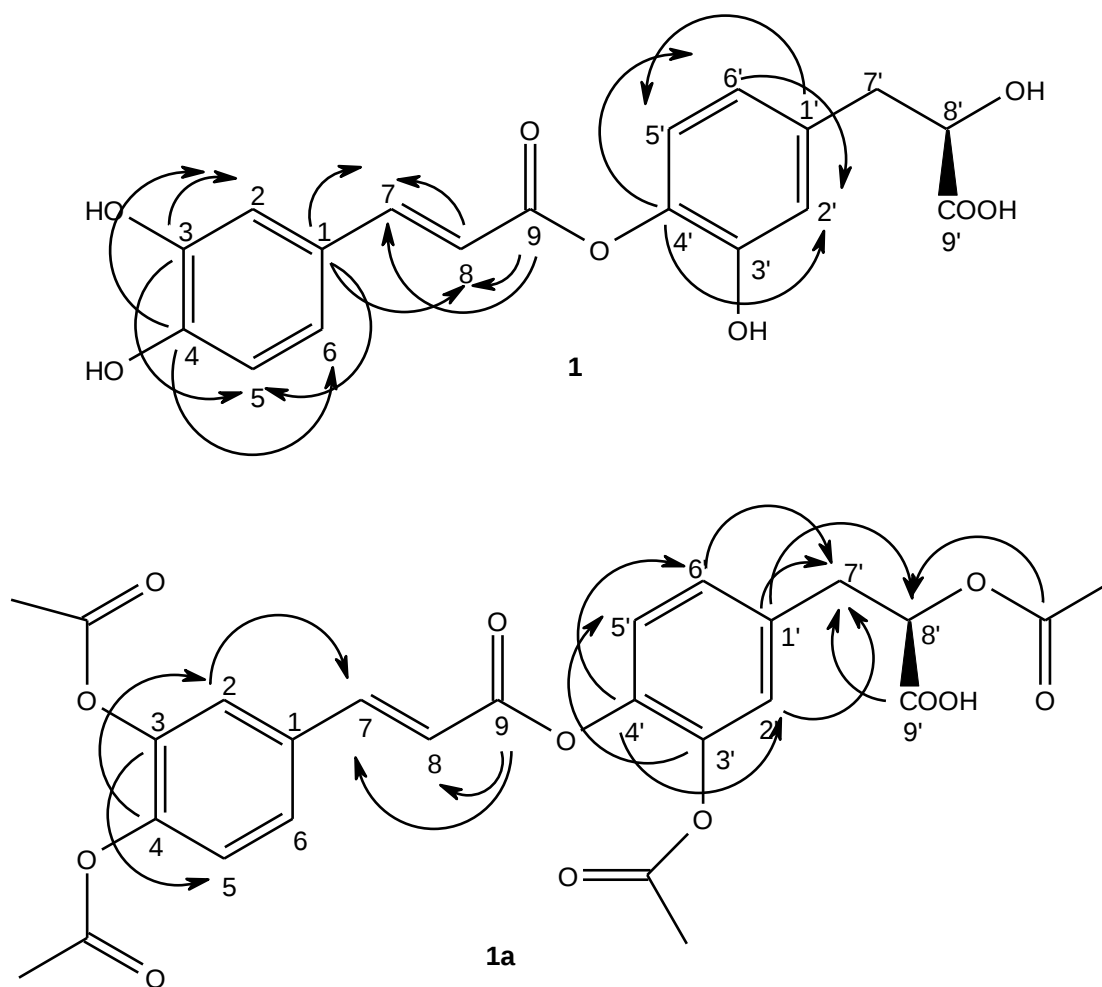


Figura 4. Chave HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) com a correlação entre (1) ácido sambacaitárico (1a)

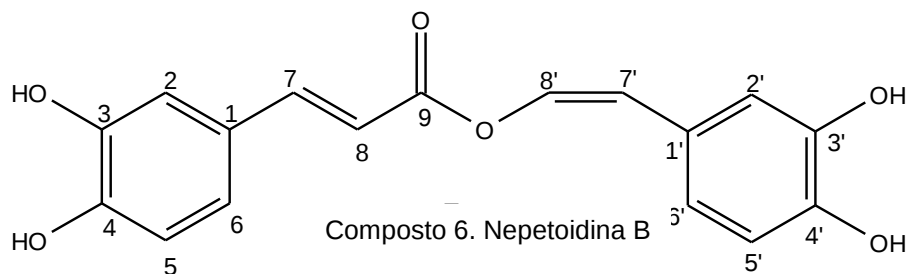
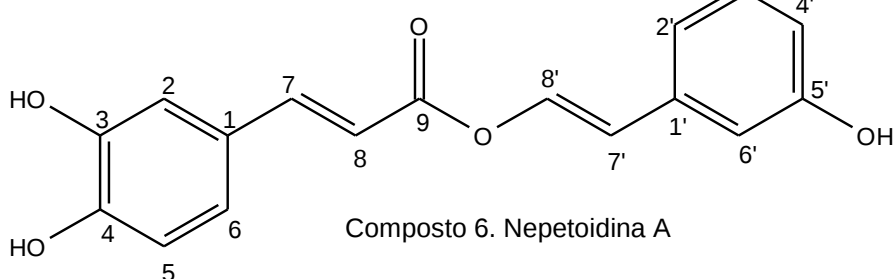
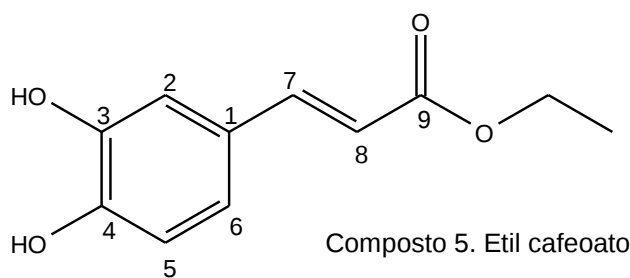
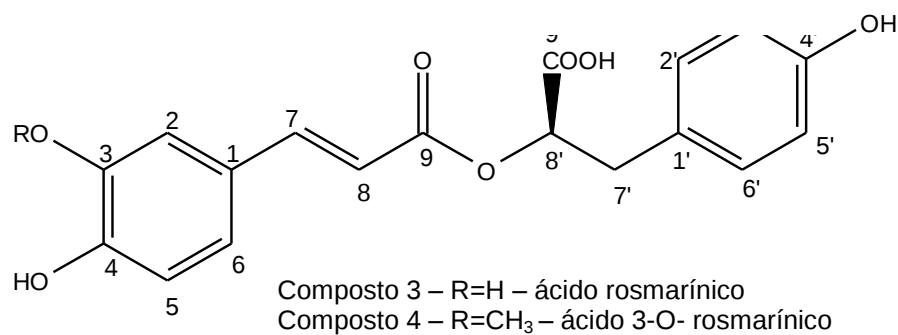
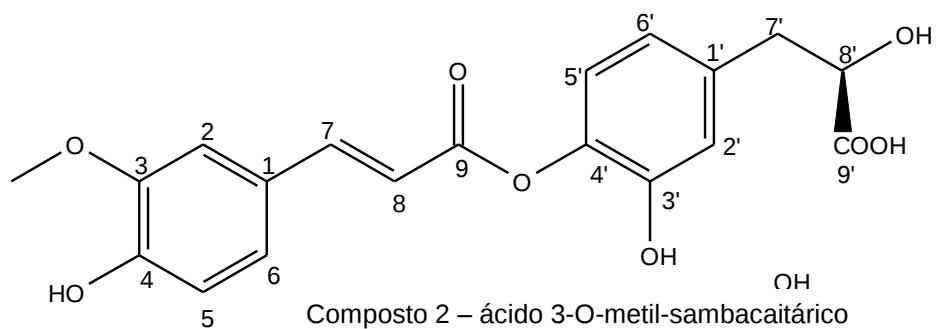


Figura 5. Estrutura química dos compostos- (2-7) isolados de *H. pectinata*

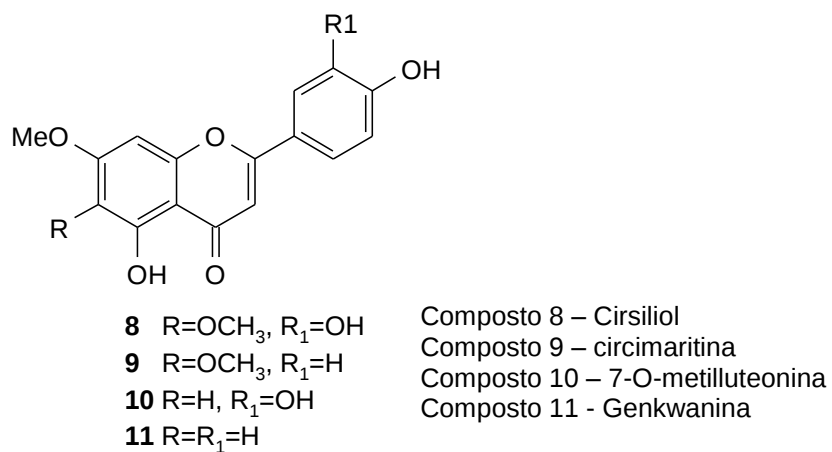


Figura 6. Estrutura química dos compostos isolados (8-11)

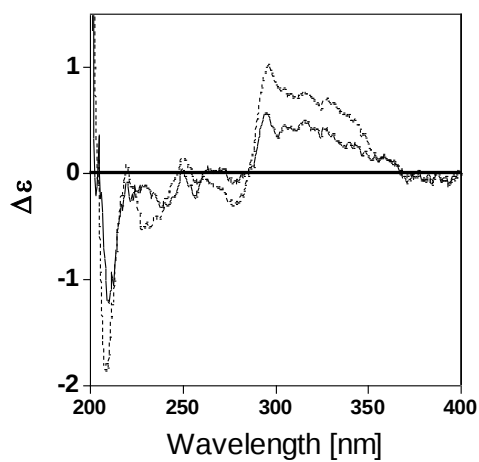


Figura 7. Espectro Dicroísmo Circular de ácido sambacaitárico (linha pontilhada e ácido rosmarínico (linha sólida)

Tabela 7. ^1H (300 MHz) e ^{13}C RMN (75 MHz) dados espectroscópicos de **1 e **1a** (DMSO- d_6 em ppm)**

Position	1				1a			
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
9'	172.1				172.5		H-8'	H-7'
9	166.2		H-8	H-7	166.3		H-8	H-7
4	148.4		H-5	H-2, H-6	149.4			H-2
3	145.81		H-2	H-5	138.53		H-2	H-5
4'	144.9		H-5'	H- 2',H- 6'	141.8			H- 2',H-6'
3'	143.5				141.0		H-2'	H-5'
1'	129.9			H-5'	134.8		H-7'	H-8'
1	125.6		H-7	H-5, H-8	127.4		H-2, H- 6, H-7	H-5, H-8
7	144.34	7.34(d, 16.0)	H-6	H-2, H-8	145.3	7.56 (d, 16.0)		
6	120.8	6.92 (dd, 8.5; 2,0)		H-2, H-7	126.6	7.24 (sl)		
6'	119.7	6.48 (dd, 8.0; 2.0)			127.6	7.14 (sl)		H-7'
2'	116.6	6.66 (d, 2.0)		H-6'	124.2	7.16 (s)		H-2', H-7'
5	115.9	6.74 (dd, 8.5; 2,0)			117.9	6.32 (d, 8.0)		
5'	115.4	6.59 (dd, 8.5; 2,0)			117.1	7.11 (m)		
2	114.9	7.03 (d, 2.0)			123.38	7.11 (m)		H-7
8	114.9	6.18 (d, 16.0)	H-7		115.3	6.29 (d, 16.0)		
8'	75.9	4.85 (m)			72.3	(5.4 m)	H-8'	
7'	37.2	3.01 (m), 2.74 (m)			36.6	3.24 (m)		
$\text{O}\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$					168.3- 169.1			
$\text{OCO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$					20.7- 20.9	2.26- 2.34 (s)		

Tabela 8. Efeito do extrato, frações e compostos isolados de *H. pectinata* contra promastigotas de *L. braziliensis* *

Tratamento	IC ₅₀ ^a (Concentração ± E.P.M.)	Efeito Máximo (% ± E.P.M.)
Pentamidina	0,9 ± 0,03 µM/ 0,3 ± 0,01 µg/mL	9,5 ± 0,7**
Extrato EtOH	0,7 ± 0,1 µg/mL	91,6 ± 2,5**
Fração MeOH:H ₂ O	3,9 ± 1,5 µg/mL	61,5 ± 1,2**
Fração AcOEt	0,4 ± 0,1 µg/mL	81,5 ± 5,9**
Fração Hexânica	0,2 ± 0,1 µg/mL	90,0 ± 3,6**
Ácido Sambacaitárico	6,9 ± 0,7 µM/ 2,5 ± 0,04 µg/mL	56,0 ± 0,8**
Ácido 3-O-metil-sambacaitárico	>100 µM/>36,0 µg/mL	48,8 ± 1,7**
Ácido rosmarínico	>100 µM/>36,0 µg/mL	NA
Ácido 3-O-metil-rosmarínico	5,4 ± 0,8 µM/2,0 ± 0,3 µg/mL	69,1 ± 2,7**
Etil caffeoato	>100 µM/>20,8 µg/mL	NA
Nepetoidina B	>100 µM/>31,4 µg/mL	NA

*Os dados são apresentados como média ± S.E.M. Diferenças com um valor de * p <0,05 foram considerados significativos em relação de grupo DMSO 0,1%.

A IC₅₀ é a concentração necessária para dar 50% de mortalidade, calculada por análise de regressão linear a partir dos valores de Kc nas concentrações empregadas.

NA: quando o composto não está ativo.

5. CAPÍTULO 2

Artigo 2 – Atividade antinociceptiva da fração acetato de etila das folhas de *Hyptis pectinata* (Lamiaceae)³

³Artigo a ser submetido a revista Journal of Ethnopharmacology

Atividade antinociceptiva da fração acetato de etila das folhas de *Hyptis pectinata* (Lamiaceae)

Rosângela A. Falcão, Magna Suzana A. Moreira, Luis Henrique Agra Cavalcante Silva, Maria Alice Falcão, Diego Farias, Jullyana S. S. Quintans, Tereza dos S. Correia, Silvana A. de Souza, Leonardo R. Bonjardim, Celso A. Camara, Tania M. S. Silva Lucindo J. Quintans-Júnior*

^aDepartamento de Fisiologia. Universidade Federal de Sergipe (DFS/UFS). Campus Universitário “Prof. Aloísio de Campos” CEP: 49100-000, São Cristóvão, SE, Brazil.

^bLaboratório de Bioprospecção Fitoquímica, Departamento de Ciências Moleculares, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP 52171-900, Pernambuco, Brazil.

¹These authors contributed equally to the present work.

*Corresponding author. Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe, 49.100-000, São Cristóvão-SE, Brazil, Tel/Fax: +55-79-2105-6474; E-mail: lucindojr@gmail.com, lucindo@pq.cnpq.br

Resumo

Hyptis pectinata (L.) Poit, popularmente conhecida no Brasil como “sambacaitá” é uma planta arbustiva aromática muito cultivada no Nordeste do Brasil e é particularmente utilizada na medicina popular para várias condições dolorosas em particular para dor orofacial. O presente estudo investigou o efeito antinociceptivo da fração acetato de etila (AcOEt) obtido das folhas de *H. pectinata* em formalina (2%), glutamato (25 μ M) e capsaicina (2,5 μ g)-e ácido acético (0,6%) induzindo processos de nocicepção orofacial, intraplantar, bem como contorção abdominais em camundongos. Camundongos machos foram pré-tratados com a fração acetato de etila (100, 200, e 400 mg/kg, p.o.), morfina (5 mg/kg, i.p.) dipirona (33,3 mg / kg, p.o.) e indometacina (35,7 mg / kg, p.o.), bem como veículo (água destilada + Tween 80 0.2%), antes da injeção do agente algogênico. A fração acetato de etila reduziu o comportamento nociceptivo em todos os testes com formalina e produziu efeito antinociceptivo significativo na capsaicina e glutamato. Além disso, a fração acetato de etila obteve sucesso ao diminuir a resposta nociceptiva de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Pode ser observado um resultado bastante promissor no uso pela população da *Hyptis pectinata* para casos de dor, em particular como antinociceptivo orofacial.

Palavras-chave: *Hyptis pectinata*, dor, antinociceptivo

Introdução

A dor é um complexo biológico que surge a partir da interação de múltiplos sistemas neuroanatômicos e neuroquímicos., dentre a classificação da dor, a nocicepção é o processo pelo qual a informação sobre a lesão real (ou potencial de tais danos, no caso de estímulo nocivo a ser aplicado) é retransmitido ao cérebro (Garland, 2012). O processo de dor envolve uma série de interações celulares e respostas de células imunes, glia e neurônios (Foley et al., 2011). A dor na região oral e craniofacial representa um grande problema médico e social (Hargreaves, 2011). Um relatório publicado por U.S. Surgeon General sobre a saúde orofacial conclui que "saúde oral significa muito mais do que os dentes saudáveis. Significa estar livre de doenças crônicas e da dor oral-facial..." (US-DHHS, 2000). Assim, a gestão ou o tratamento de condições de dolorosas representa um problema significativo de cuidados de saúde e um desafio para a indústria farmacêutica.

Embora nas últimas décadas, um importante progresso tenha sido feito no desenvolvimento de terapias naturais, há uma necessidade urgente de descobrir agentes analgésicos eficazes e potentes(Calixto et al., 2000). Uma abordagem atual é a de desenvolver novos compostos biológicos que tratem a dor orofacial a partir de produtos naturais, tais como plantas medicinais ou seus metabolitos secundários, que possuam maior eficácia e efeitos colaterais mínimos(Quintans et al., 2011; Venâncio, 2011; Bonjardim et al., 2011; Guimaraes et al., 2013).

Hyptis pectinata L. Poit (Laminaceae) é um arbusto comum conhecido como "sambacaitá" "sambacaeté" ou "canudinho" no Nordeste do Brasil amplamente utilizado na medicina popular para distúrbios gastrointestinais, infecções de pele, congestão nasal, febre, cólicas, inflamação e dor (Bispo et al., 2001; Raymundo et al., 2011). Alguns estudos tem demonstrado que *H. pectinata* possui atividades antinociceptiva e anti-inflamatória (Bispo et al, 2001; Lisboa et al, 2006; Raymundo et al, 2011). Nascimento et al. (2008) descreveram que as folhas de *H. pectinata* são utilizadas para o tratamento de vários tipos de doenças orais, tais como a cárie dentária e dor orofacial. Curiosamente, há alguns estudos sobre as propriedades farmacológicas do óleo essencial obtido a partir de *H. pectinata* (Malal et al., 1988; Nascimento et al., 2008; Arrigoni-Blank, 2008)no entanto não foram encontrados trabalhos utilizando trabalhos com extrações em etanol ou acetato de etila.

Assim, o presente estudo tem como objetivo verificar a propriedade antinociceptiva da fração acetato de etila obtida das folhas de *H. pectinata* (AcOEt) utilizando nocicepção induzida pela formalina, capsaicina e glutamato em camundongos, em particular na região orofacial.

Material e métodos

As folhas de *Hyptis pectinata* foram coletadas na cidade de Garanhuns, Pernambuco, Brasil, de abril a julho de 2010. A planta foi identificada pelo IPA - Instituto de Pesquisa Agropecuária - Pernambuco - Brasil. O material vegetal foi extraído sucessivamente com EtOH. A solução extrativa foi evaporada em rotaevaporador para obtenção de 7,0 g de extrato EtOH. Este extrato foi dissolvido em MeOH:H₂O (1:1) e fracionado com hexano e AcOEt. Os solventes foram evaporados e obtidas as frações hexânica e AcOEt. A fração AcOEt foi cromatografada em HPLC-DAD (Figura 7). Desta fração foram isoladas as substâncias: ácido sambacaitárico(1), ácido 3-O-metil-sambacaitárico (2), ácidorosmarínico(Weber), ácido 3-O-metil rosmarínico (4),cafeato de etila (5), nepetoidina A (6), nepetoidina B (7),cirsiliol (8), circimaritina (9), 7-O-metilluteolina (10) e genkwanina (11).

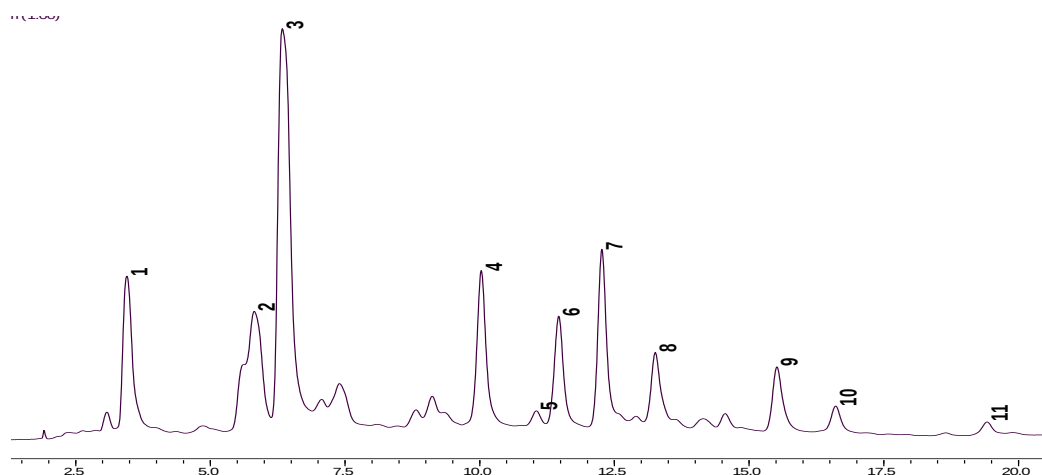


Figura 8 Cromatograma obtido por HPLC-CAD (290nm) da fração AcOEt das folhas de *H. pectinata*

Animais

Camundongos machos suíços (28- 34g) com 2-3 meses de idade foram utilizados no estudo nas Universidades Federais de Alagoas e Sergipe. Os animais foram aleatoriamente colocados em gaiolas adequadas a 22 ± 2 °C em um fotoperíodo de 12h com acesso livre a comida e água. Todos os experimentos foram realizados entre 9-14 h em uma sala silenciosa. Todos os testes de nocicepção foram realizados pelo mesmo observador visual e testes comportamentais foram realizados sob condições cegas. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê Animal Experimentação e Proteção Animal da Universidade Federal de Sergipe (CEPA / UFS # 10/11).

Drogas

Foram utilizados cloridrato de morfina (União Química, Brasil) dipirona e indometacina (Pharmanostra, Brasil) diazepam (Roche, Brasil) como analgésicos. Formaldeído 37%, ácido acético (Vetec, Brasil), glutamato e capsaicina (Sigma, EUA) como substâncias alogênicas. Nos protocolos o extrato, analgésicos e agentes alogênicos foram injetados por via oral (p.o.), intraperitoneal (i.p.), subcutânea ou intraperitoneal (i.p.) em dose de 0,1 ml/10 g, com

Screening com o extrato e frações da folha de *H. pectinata* -Indução de contorções por ácido acético

O teste foi realizado utilizando o método previamente descrito por Collier et al. (1968). Contorções abdominais em camundongos foram induzidas através de injeção intraperitoneal de ácido acético (solução de 0,6%, 0,1 mL/10 g). Os animais foram pré-tratados com a o extrato bruto etanólico, frações acetato de etila (AcOEt), hexânica e metanol: água (MeOH:H₂O) (100 mg / kg, p.o.), veículo (salina e Tween 80) e dipirona (33,3 mg / kg, p.o.) 40 minutos antes de se iniciar a estimulação (n = 6/grupo). A resposta de contorção, que consiste de uma contração da musculatura abdominal, juntamente com um alongamento dos membros posteriores, foi determinada durante 20 min, após um período de latência de 5 min.

Ensaio de nocicepção induzida por formalina em pata

O procedimento descrito por Hunskaar e Hole (1987) foi seguido com ligeiras modificações. Os camundongos foram pré-tratados com a fração AcOEt (100 mg / kg, p.o.), indometacina (35,7 mg / kg, po) ou veículo (salina e Tween 80), 40 minutos antes da injeção intraplantar de solução de formalina a 2,5% (20 µl) na pata traseira direita do animal (n = 6/grupo). A resposta foi calculada a partir do tempo que os animais passaram a lamber a pata injetada. Dois períodos distintos da atividade de lamber podem ser identificados, uma fase neurogênica durante os primeiros 5 minutos e uma fase inflamatória com duração entre 15 e 30 min após a injeção de formalina.

Ensaio orofacial com formalina

A nocicepção orofacial foi induzida em camundongos por via subcutânea de 20 µl de formalina a 2% para o lábio superior direito (área perinasal), utilizando uma agulha de calibre 27 (Luccarini et al., 2006; Pelissier et al., 2002) com modificações (Quintans et al., 2010b). Esta concentração de volume e percentual de formalina foi escolhido a partir de estudos pilotos que mostraram uma resposta relacionada a nocicepção bifásica comportamental (face-fricção) de grande intensidade, em períodos de 0-5 min (primeira fase) e 15-40 min (segunda fase) (Rozisky et al., 2011). As duas fases foram quantificadas pelo número de vezes que os camundongos executaram a fricção da face com as patas traseiras ou dianteiras (Luccarini et al., 2006). Para avaliar os efeitos dos fármacos-teste, os grupos de camundongos (n = 8 por grupo) foram pré-tratados sistematicamente com veículo (água destilada + 2 gotas de Tween 80), AcOEt (100, 200 ou 400 mg / kg, p.o.), 1 h antes da injeção local de formalina. A morfina (MOR, 5 mg / kg, i.p.), administrado 1 h antes do algogênico e foi incluído como controle positivo.

Ensaio de indução orofacial nociceptiva por capsaicina e glutamato

A nocicepção orofacial foi induzida pela capsaicina e glutamato em roedores como descrito anteriormente (Quintans et al., 2010b) Os camundongos (n = 8 por grupo) receberam capsaicina (20 µL, 2,5 ug) e glutamato (25 µM) preparadas em tampão fosfato salino), subcutânea, no lábio superior direito (área perinasal),

utilizando-se agulha de calibre 27. A capsaicina foi dissolvida em sulfóxido de etanol, dimetilsulfóxido e água destilada (1:1:8). A quantificação de nocicepção foi efetuada no período de medição do tempo (s) que os animais passaram esfregando a área injetada com patas dianteiras ou patas traseiras. A fração AcOEt (100, 200 ou 400 mg / kg) ou veículo (água destilada + 2 gotas de Tween 80) foram dados (por via oral) para os animais, tal como descrito para o teste de formalina, 1 h antes da injeção local de capsaicina ou glutamato. Morfina (5 mg kg, i.p. fármaco de referência) foi administrada 1 h antes do algogênico sendo foi incluído como um controle positivo.

Avaliação da atividade motora

De modo a identificar algum efeito não específico possível como o relaxamento muscular ou sedativo causado pelo extrato, os camundongos foram submetidos ao aparelho de Rota-Rod(AVS ®, Brasil),, segundo descrito por (Quintans et al., 2010a). Inicialmente, os ratos capazes de permanecer no aparelho de Rota-rod mais de 180 rpm s (9) foram selecionados 24 h antes do ensaio. Os camundongos foram tratados com a fração AcOEt(100, 200 ou 400 mg / kg, v.o.), veículo ou diazepam (3 mg / kg, i.p.) em intervalos de 1, 2 e 4 h antes. Cada animal foi testado no aparelho Rota-rod e avaliou-se o tempo (s) de permanência no equipamento.

Análise estatística

Os dados obtidos a partir dos ensaios com os animais foram expressos como média e erro padrão da média (média $\pm$ SEM). Diferenças estatísticas significativas entre os tratados e os grupos de controle foram avaliados por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Prism Software Inc., San Diego, CA, EUA).

Resultados

Como mostrado na Figura 8, as frações hexânica, metanol:água não inibiram de forma significativa a resposta nociceptiva dos camundongos. Entretanto, a fração acetato de etila induziu uma inibição significativa (35,5%) no número de contorções

abdominais na concentração de 100 mg/kg. O uso de uma concentração superior de 300mg/kg não produziu redução significativa no número de contorções.

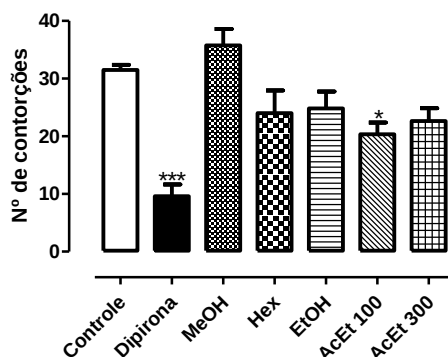


Figura 9. Efeito do extrato etanólico bruto e das frações hexano, metanol:água (100 mg/kg, v.o.) e acetato de etila (100 e 300 mg/kg, v.o.) de *H. pectinata* no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão da média após análise por ANOVA One Way seguido do teste de Dunnet. * $p < 0,05$; *** $p < 0.0001$.

Baseado nos resultados obtidos no ensaio de contorção abdominal, a fração acetato de etila foi selecionada para dar continuidade aos estudos. Realizou-se, então, o ensaio de nocicepção induzida por formalina em região intraplantar, um ensaio caracterizado por permitir a observação de duas fases distintas: uma fase neurogênica (1ª fase) e outra inflamatória (2ª fase) (Hunskar, 1987). Neste ensaio, a fração acetato de etila inibiu de forma significativa apenas a 2ª fase do ensaio (36,5%) não produzindo resultados consideráveis na fase neurogênica inicial. Como descrito na literatura, a indometacina, anti-inflamatório padrão utilizado, inibiu de forma significativa apenas a 2ª fase (74,3%) (Figura 9).

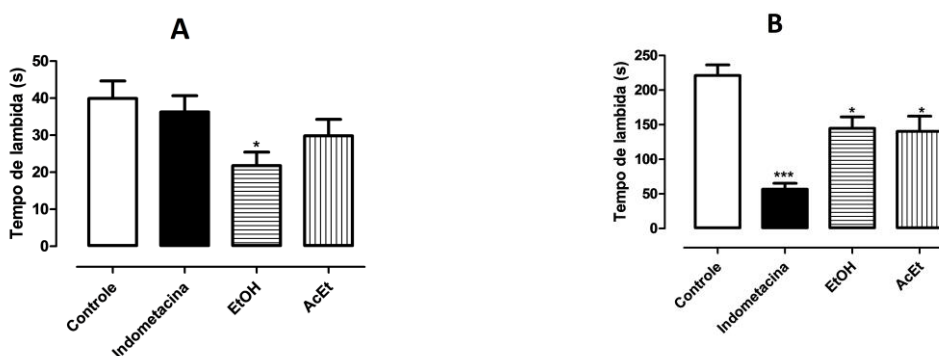


Figura 10. Efeito do extrato etanólico e da fração acetato de etila (100 mg/kg, p.o.) de *H. pectinata* no ensaio de nocicepção induzido por formalina. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão da média após análise por ANOVA One Way seguido do teste de Dunnet. A fase A corresponde a fase neurogênica e a Fase B a fase posterior denominada inflamatória.

Com relação a indução nociceptiva em região orofacial, o tratamento agudo com a fração AcOEt (100, 200 ou 400 mg / kg, p.o.) produziu um resultado significativamente menor ($p < 0,05$ ou $p < 0,001$) do comportamento de fricção da face (Figura 10) Todas as doses testadas da fração AcOEt produziram antinocicepção, tanto na primeira como na segunda fase do teste de formalina, quando comparado com o controle (veículo). Como esperado, a morfina foi capaz de reduzir o comportamento nociceptivo em ambas as fases.

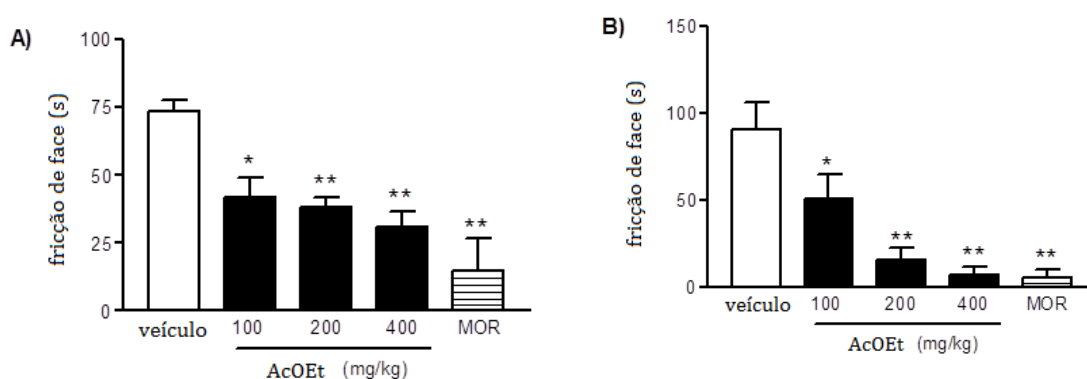


Figura 11. Efeito da fração AcOEt (*H. pectinata*) e morfina (MOR) em ensaio orofacial com formalina em camundongos, Veículo, fração AcOEt (100, 200, 400 mg/kg v.o.) e MOR (5mg/kg i.p.g) administrados 1h antes da formalina, (A) primeira fase (0-5 min) e (B) segunda fase (15-40 min) cada coluna representa média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ ou ** $p < 0,001$ vs. Controle (ANOVA seguido por teste de Tukey)

Como mostrado na Fig. 11.A o pré-tratamento com a fração AcOEt (100, 200 ou 400 mg / kg, po) reduziu de forma significativa ($p < 0,001$) o comportamento de fricção de face induzida pela administração de capsaicina. A morfina produziu um efeito antinociceptivo superior ($p < 0,001$). Como esperado, o grupo que recebeu apenas os diluentes de capsaicina (capsaicina grupo veículo) não apresentou qualquer comportamento nociceptivo (dados não mostrados). Além disso, a fração produziu um efeito antinociceptivo significativo ($p < 0,05$ ou $p < 0,001$) reduzindo o comportamento de fricção da face quando comparado com o grupo de controle (veículo) (Figura. 11B).

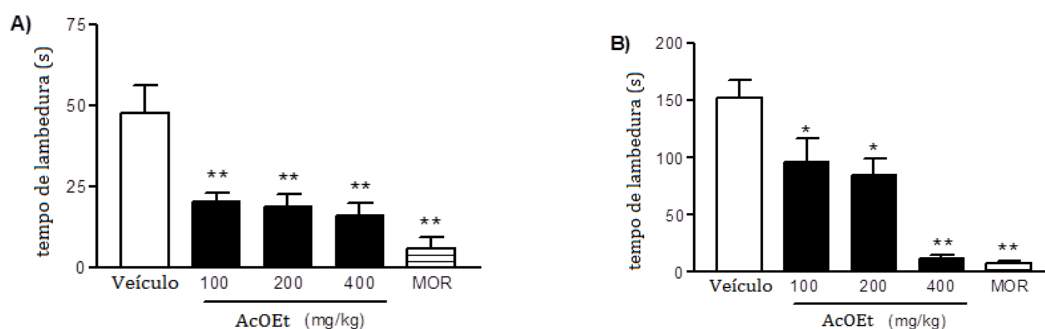


Figura 12. . Efeito da fração AcOEt (*H. pectinata*) sob a capsaicina- (A) e glutamato- (B) na indução orofacial. Veículo (controle), fração AcOEt (100, 200 or 400 mg/kg, p.o.), e MOR (5 mg/kg, i.p.) foram administrados 1h antes da injeção de capsaicina e glutamato. Cada coluna representa média $\pm$ E.P.M.. (n = 8, por grupo). *p < 0.05 or **p < 0.001 vs. controle (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

No teste de rota-rod, os camundongos tratados com a fração AcOEt não mostraram qualquer alteração significativa do desempenho motor (Figura12).

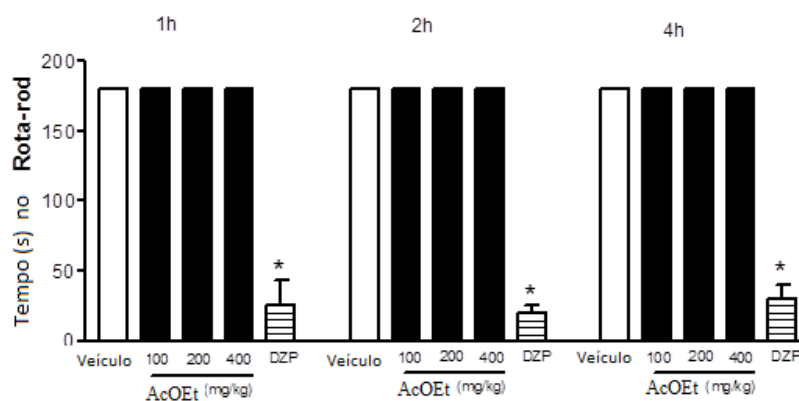


Figura 13. . Tempo observado dos camundongos no Rota Rod após tratamento com veículo, fração AcOEt (100, 200 e 400 mg/kg p.o.) e diazepam (3mg/kg p.o.). a resposta do motor foi gravada por 1h, 2h e 4h após a administração das drogas. Diferenças estatísticas vs grupo controle foi calculando utilizando ANOVA seguido por Turkey test. * p < 0.001

Discussão

Na medicina popular do Nordeste do Brasil, *Hyptis pectinata* ("sambacaitá") é amplamente utilizada para o tratamento de vários distúrbios orofaciais patológicos, incluindo dor orofacial. No entanto, não há estudos farmacológicos relatando este efeito. Neste trabalho, pela primeira vez, foi demonstrado que a administração oral

da fração AcOEt exerce efeitos protetores contra formalina, capsaicina e glutamato em nocicepção orofacial em roedores.

De acordo Luccarini et al. (2006) o teste orofacial de formalina é o método mais importante para a avaliação de fármacos com efeito antinociceptivos para dor orofacial, e para elucidar seu mecanismo de ação. Durante o teste de formalina, as duas fases podem, identificar parcialmente mecanismos distintos de nocicepção. A primeira fase está associada a uma estimulação direta de C-nociceptores, ao passo que na segunda fase se reflete a integração entre sinalizadores periféricos (nociceptores) e a região tronco cerebral (Dallel et al., 1995; Capuano et al., 2009). Além disso, tem sido relatado que o desenvolvimento de hiperalgesia devido a injeção de formalina envolve sistema glutamatérgico, tais como *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA) (Luccarini et al., 2006). Assim, o tratamento agudo com a fração AcOEt, em todas as doses, foi capaz de reduzir o comportamento nociceptivo orofacial em ambas as fases do teste da formalina.

De forma controversa, Bispo et al (2001) demonstraram que o pré-tratamento com o extrato aquoso de *H. pectinata* nas doses de 200 e 400 mg / kg não teve efeito significativo na primeira fase do teste de formalina.

Como mostrado na figura 11A., no pré-tratamento agudo com a fração AcOEt, todas as doses, produziram uma redução significativa do comportamento nociceptivo induzido pela administração de capsaicina. O efeito antinociceptivo mostrado pela fração AcOEt sobre comportamento nociceptivo orofacial induzido pela capsaicina pode ser resultado da sua possível inibição da liberação de substância P, ou devido a uma ação direta de bloqueio do seu receptor da neuroquinina-1 (NK-1) (Quintans-Júnior et al., 2010). Além disso, receptor transiente potencial vanilloid 1 (TRPV1), sensível a capsaicina, desempenha um papel importante na transdução de dor e é um dos canais de influxo de Ca^{2+} envolvidos na migração de células (Waning et al., 2007).

Quando injetado no lábio superior direito (área perinasal), o glutamato provocou um estímulo nocivo caracterizado por uma resposta de comportamento como lambendo ou esfregar a região orofacial (Quintans et al., 2010b; Siqueira et al., 2010). O glutamato está presente em ambos os terminais centrais e periféricos dos neurônios do gânglio da raiz dorsal e trigeminais. A estimulação nociva de fibras aferentes primárias resulta na liberação de glutamato pelos terminais periféricos, bem como terminais centrais do trigêmeo e fibras aferentes espinhais (Keast e

Stephensen, 2000; Lam et al., 2005). A este respeito, aparentemente os receptores NMDA no terminal de fibras aferentes primárias induz a libertação de substância P e subsequente ativação dos seus receptores, como neuroquinina 1 (NK1R) (Liu et al., 1997). Os resultados demonstraram que o tratamento agudo com AcOEt provocou uma proteção dose dependente ($p < 0,05$ ou $p < 0,001$), quando comparado com o grupo controle (veículo)(Figura. 11B). Assim, a supressão da nocicepção induzida por glutamato pelo tratamento com a fração AcOEt pode ser associado com a sua interação com o sistema glutamatérgico.

Analizados em conjunto, os dados mostram que a hipótese de que a fração AcOEt produz um papel protetor na nocicepção em camundongos e também que *H. pectinata* tem um potencial terapêutico para a dor facial, e talvez desordens dentais; bem como atua como antinociceptivo geral, comprovado nos ensaios com a formalina, sua ação na fase inflamatória tanto no ensaio interplantar com orofacial, pressupõe uma ação no processo inflamatório que acompanha a nocicepção, da mesma forma como os fármacos que utilizam compostos esteróides. No entanto, estudos adicionais devem ser realizados para determinar o mecanismo de ação.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / CNPq / Brasil - número 555076/2010-5) pelo apoio financeiro.

Referências

- Bispo, M.D., Mourao, R.H., Franzotti, E.M., Bomfim, K.B., Arrigoni-Blank, M.F., Moreno, M.P., Marchioro, M., Antonioli, A.R., 2001. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. *Journal of ethnopharmacology* 76, 81-86.
- Bonjardim, L.R., Silva, A.M., Oliveira, M.G., Guimaraes, A.G., Antonioli, A.R., Santana, M.F., Serafini, M.R., Santos, R.C., Araujo, A.A., Estevam, C.S., Santos, M.R., Lyra, A., Carvalho, R., Quintans-Junior, L.J., Azevedo, E.G., Botelho, M.A., 2011. *Sida cordifolia* leaf extract reduces the orofacial nociceptive response in mice. *Phytotherapy research : PTR* 25, 1236-1241.
- Calixto, J.B., Beirith, A., Ferreira, J., Santos, A.R., Filho, V.C., Yunes, R.A., 2000. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytotherapy research : PTR* 14, 401-418.
- Capuano, A., De Corato, A., Treglia, M., Tringali, G., Dello Russo, C., Navarra, P., 2009. Antinociceptive activity of buprenorphine and lumiracoxib in the rat orofacial formalin test: a combination analysis study. *European journal of pharmacology* 605, 57-62.
- Dallel, R., Raboisson, P., Clavelou, P., Saade, M., Woda, A., 1995. Evidence for a peripheral origin of the tonic nociceptive response to subcutaneous formalin. *Pain* 61, 11-16.
- Foley, J.C., McIver, S.R., Haydon, P.G., 2011. Gliotransmission modulates baseline mechanical nociception. *Molecular pain* 7, 93.
- Garland, E.L., 2012. Pain processing in the human nervous system: a selective review of nociceptive and biobehavioral pathways. *Primary care* 39, 561-571.
- Guimaraes, A.G., Quintans, J.S., Quintans-Junior, L.J., 2013. Monoterpenes with analgesic activity-a systematic review. *Phytotherapy research : PTR* 27, 1-15.
- Hargreaves, K.M., 2011. Orofacial pain. *Pain*, S25-S32.
- Hunskar, S.H., K., 1987. The formalin test in mice: Dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30.
- Keast, J.R., Stephensen, T.M., 2000. Glutamate and aspartate immunoreactivity in dorsal root ganglion cells supplying visceral and somatic targets and evidence for peripheral axonal transport. *The Journal of comparative neurology* 424, 577-587.
- Lam, D.K., Sessle, B.J., Cairns, B.E., Hu, J.W., 2005. Neural mechanisms of temporomandibular joint and masticatory muscle pain: a possible role for peripheral glutamate receptor mechanisms. *Pain research & management : the journal of the Canadian Pain Society = journal de la societe canadienne pour le traitement de la douleur* 10, 145-152.
- Liu, H., Mantyh, P.W., Basbaum, A.I., 1997. NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. *Nature* 386, 721-724.
- Luccarini, P., Childeric, A., Gaydier, A.M., Voisin, D., Dallel, R., 2006. The orofacial formalin test in the mouse: a behavioral model for studying physiology and modulation of trigeminal nociception. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 7, 908-914.
- Pelissier, T., Pajot, J., Dallel, R., 2002. The orofacial capsaicin test in rats: effects of different capsaicin concentrations and morphine. *Pain* 96, 81-87.
- Quintans, B., Prieto, M.F., Carracedo, A., Sobrido, M.J., 2011. Genetic counselling in neurology: a complex problem that requires regulation. *Neurologia* 26, 129-136.
- Quintans, F., Scasso, F., Defeo, O., 2010a. Unsuitability of *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) for mosquito control in Uruguay: evidence from

food-preference experiments. *Journal of vector ecology : journal of the Society for Vector Ecology* 35, 333-338.

Quintans, L.J., Jr., Silva, D.A., Siqueira, J.S., Araujo, A.A., Barreto, R.S., Bonjardim, L.R., Desantana, J.M., De Lucca, W., Jr., Souza, M.F., Gutierrez, S.J., Barbosa-Filho, J.M., Santana-Filho, V.J., Araujo, D.A., Almeida, R.N., 2010b. Bioassay-guided evaluation of antinociceptive effect of N-salicyloyltryptamine: a behavioral and electrophysiological approach. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010, 230745.

Raymundo, L.J., Guilhon, C.C., Alviano, D.S., Matheus, M.E., Antonioli, A.R., Cavalcanti, S.C., Alves, P.B., Alviano, C.S., Fernandes, P.D., 2011. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. *Journal of ethnopharmacology* 134, 725-732.

Rozisky, J.R., Medeiros, L.F., Adachi, L.S., Espinosa, J., de Souza, A., Neto, A.S., Bonan, C.D., Caumo, W., Torres, I.L., 2011. Morphine exposure in early life increases nociceptive behavior in a rat formalin tonic pain model in adult life. *Brain research* 1367, 122-129.

Siqueira, R.S., Bonjardim, L.R., Araujo, A.A., Araujo, B.E., Melo, M.G., Oliveira, M.G., Gelain, D.P., Silva, F.A., DeSantana, J.M., Albuquerque-Junior, R.L., Rocha, R.F., Moreira, J.C., Antonioli, A.R., Quintans-Junior, L.J., 2010. Antinociceptive activity of atranorin in mice orofacial nociception tests. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences* 65, 551-561.

Venâncio, A.M.M., M.; Estevam, C.S.; Melo, M.S.; Santana, M.T.; Onofre, A.S.C.; Guimarães, A.G.; Oliveira, M.G.B.; Alves, P.B.; Pimentel, H.C.; Quintans-Júnior, L.J., 2011. *Ocimum basilicum* (Lamiaceae) leaf essential oil and (-)-linalool reduce orofacial nociception in rodents - a behavioral and electrophysiological approach. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21, 1043-1051.

Waning, J., Vriens, J., Owsianik, G., Stuwe, L., Mally, S., Fabian, A., Frippliat, C., Nilius, B., Schwab, A., 2007. A novel function of capsaicin-sensitive TRPV1 channels: involvement in cell migration. *Cell calcium* 42, 17-25.

Weber, E.S., 3rd, 2011. Fish analgesia: pain, stress, fear aversion, or nociception? *The veterinary clinics of North America. Exotic animal practice* 14, 21-32.

6.0. CAPÍTULO 3

Artigo 3 – Avaliação do potencial antioxidante e capacidade protetora do DNA das folhas de *Hyptis pectinata* (L) Poit

Avaliação do potencial antioxidante e capacidade protetora do DNA das folhas de *Hyptis pectinata* (L) Poit

Rosângela E. A.Falcão, Silvana A de Souza, Clovis Macedo Bezerra Filho, Girliane Regina da Silva, Luis Cláudio Nascimento da Silva, Wellington de Melo Pereira, Maria Tereza dos Santos Correia, Celso Amorin Camara, Tania Maria Sarmento da Silva.

Resumo

Uma das conhecidas propriedades das plantas são os compostos secundários. Estes compostos podem possuir ação antioxidante, que atua em processos onde o estresse oxidativo desencadeia problemas no metabolismo animal tais como danos à molécula de DNA e oxidação lipídica. Espécies da família Lamiaceae tem sido investigadas por sua ação antioxidante através de testes colorimétricos que identificam seu potencial, tais como ABTS (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico), DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) ou sistema β -caroteno/ácido linoleico. *Hyptis pectinata* é uma Lamiaceae utilizada com frequência por comunidades indígenas no nordeste do Brasil e problemas de saúde tais como edemas, dores, inflamações. O presente estudo tem como objetivo avaliar a capacidade antioxidante do extrato etanólico da *H. Pectinata* e das frações acetato de etila, hexânica e metanol: H₂O, bem como analisar a ação do extrato e das frações em molécula de DNA e eritrócitos sujeitos à ação de radicais livres tais como o Reagente de Fenton e do 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH).

Palavras-chave: *Hyptis pectinata*, antioxidantes, DNA

Abstract

One of the known properties of plants are secondary metabolites. These compounds may possess antioxidant activity, which current processes where oxidative stress trigger in animal metabolism problems such as damage to the DNA molecule and lipid oxidation. Species of Lamiaceae family have been investigated for their antioxidant activity by colorimetric tests that identify their potential, such as ABTS (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) or system β -caroteno/ácido linoleic acid. The Lamiaceae *Hyptis pectinata* is often used by indigenous communities in northeastern Brazil, and health problems such as swelling, pain, inflammation. The present study aims to evaluate the antioxidant capacity of the ethanol extract of *H. Pectinata* and fractions of ethyl acetate, hexane and methanol: H₂O and analyze the activity of the extract and fractions of the DNA molecule in red blood cells and subjected to the action of free radicals such as the Fenton reagent and 2,2'-Azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH).

Introdução

Um grande número de processos bioquímicos que acontecem no interior dos animais tem como resultado a produção de radicais livres (Valko et al., 2007). Estes radicais livres podem provocar danos em biomoléculas e doenças como aterosclerose, câncer, diabetes, e outras doenças degenerativas em humanos (Renaud, 2012)(Mahne et al., 2012) como, por exemplo, cirrose (Sabu and Kuttan, 2002). Existem estudos que investigam a relação entre antioxidantes específicos e processos inflamatórios (Al-Akwa et al., 2009) bem como a ação neutralizante de extratos de plantas em radicais livres e o estresse oxidativo causado pelos radicais (Kestwal et al., 2012).

Antioxidantes endógenos ou exógenos, sintéticos ou naturais podem ser efetivos na prevenção da formação de radicais livres (Souri, 2008). Encontrar compostos antioxidantes que possam reduzir o risco causado por estes radicais tem sido objeto da farmacologia em particular da pesquisa com plantas de reconhecido uso na medicina tradicional de vários países (Bulk et al., 2010) uma vez que muitos estudos tem demonstrado a relação direta entre o consumo de antioxidantes encontrados em plantas e a incidência de doenças em seres humanos. (Al-Fatimi et al., 2007; Hu and Willett, 2001; Loganayaki et al., 2012; Stagos et al., 2012) . Uma dieta a base de antioxidantes, incluindo compostos polifenólicos, vitamina E e C, carotenoides, pode ser efetivo na prevenção do processo de estresse oxidativo encontrado em alterações responsáveis pelo aparecimento de doenças (Chang et al., 2005). Substâncias fenólicas funcionam como sequestradores de radicais e algumas vezes quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como de propagação do processo oxidativo, sendo seu uso, em alguns casos, eficientes na prevenção da oxidação lipídica desde que não seja comprovada alguma toxicidade (Halliwell, 2011).

O gênero *Hyptis* pertence a família Lamiaceae que apresenta em torno de 400 espécies distribuídas pelas Américas, oeste da África, Ilha Fiji na Oceania e Nordeste da Índia. Muitas espécies de *Hyptis* são usadas na medicina popular de diferentes países (Agra, 2007). No México, *Hyptis pectinata* tem sido utilizada pela população para desordens gastrointestinais, processos inflamatórios e problemas de tumores de pele (Alonso-Castro et al.,

2011). No Brasil é conhecida como "Sambacaitá" (Santos et al., 2007). É uma planta herbácea, com folhas aromáticas, flores pequenas e bilabiais, posicionadas axilarmente em inflorescências, hermafrodita, pentâmera e zigomorfas (Souza, 2005) usada extensivamente na medicina tradicional de populações locais. A planta é encontrada no interior do Nordeste brasileiro. Estudos tem demonstrado que o extrato aquoso de *H. Pectinata* apresenta efeito na diminuição de edemas e dor (Bispo et al., 2001). O óleo essencial da planta mostrou 33 componentes (Malan et al., 1988), sendo o timol o principal composto com propriedade antisséptica, em particular contra bactérias Gram (+) (Alejandra Rojas, 1992; Fragoso-Serrano et al., 2005) . O óleo essencial também apresentou atividade anti-inflamatória (Raymundo et al., 2011).

O presente estudo tem como objetivo investigar o potencial antioxidante e atividade protetora do DNA e eritrócitos das folha da *Hyptis pectinata*.

Métodos

Material vegetal

As folhas de *Hyptis pectinata* foram coletadas entre os meses de abril e julho na região do agreste meridional de Pernambuco, nordeste do Brasil. A identificação botânica foi realizada pelo IPA – Instituto de Pesquisa Agropecuária – Pernambuco - Brasil.

Equipamentos e reagentes

Para realização dos ensaios foram utilizados 2,2 –difênil-1-picril- hidrazil (Alfa Aesas EUA), ácido gálico (Fluka), Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich); ácido ascórbico (Nuclear), 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzothiazoline-6-sulfônico) (Fluka), trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2- ácido carboxílico 97% (Aldrich) ácido linolêico (Fluka). Todos os outros reagentes são de grau analítico As leitura de absorbância foram feitas em espectrofotômetro UV-visível (Agilent, 8453).

Obtenção do extrato e frações

A obtenção do extrato e frações foi realizado de acordo com antigo enviado, o material vegetal foi extraído sucessivamente com EtOH. A solução extrativa foi evaporada em rotaevaporador para se obtenção de 7,0 g de

extrato EtOH. Este extrato foi dissolvido em MeOH:H₂O (1:1) e fracionado com hexano e AcOEt. Os solventes foram evaporados e obtidas as frações hexânica e AcOEt.

Determinação do teor de fenólicos totais

Inicialmente, uma alíquota de 500 µL do extrato EtOH e frações Hexânica, AcOEt e MeOH:H₂O todas a 1,0 mg/mL) solubilizados em EtOH e adicionado 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 3 mL de água destilada, agitando-se por 1 min. Em seguida, 300 µL de Na₂CO₃ (15%) foram acrescentados à mistura e agitados por 30 segundos. A solução teve seu volume acertado para 5 mL com água destilada. Após duas horas, a absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro de UV-Vis em 760 nm. O teor de Fenólicos Totais (FT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico e expressos como miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g), considerando-se o Erro Padrão da Média (E.P.M.)

Atividade seqüestradora do radical livre DPPH

O teste foi realizado seguindo a metodologia descrita por Silva et al. (2006). Todas as soluções estoque, extrato e frações, foram preparadas a 1,0 mg/mL. Através de triagem preliminar quantidades apropriadas da solução de DPPH· (23,6 µg/mL em EtOH) foram adicionadas às amostras afim de obter concentrações finais que variaram de 1,0 a 80,0 µg/mL.

Após 30 minutos de agitação em aparelho de ultrassom a quantidade de radicais de DPPH foi registrada em aparelho UV-Visível no comprimento de onda de 517 nm, utilizando-se cubetas de quartzo. Como controle positivo foi empregado o ácido ascórbico. A percentagem de atividade seqüestradora (% AS) foi calculada pela equação:

$$\% AS = 100 \times (A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}}$$

onde *A_{controle}* é a absorbância do controle, contendo apenas a solução etanólica do radical DPPH, e *A_{amostra}* é a absorbância do radical na presença do extrato, frações ou do padrão ácido ascórbico. A eficiência anti-radicalar foi

estabelecida utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) obtido pelo programa estatístico GraphPad Prism 5.0 (DEMO). Os resultados foram expressos através da $CE_{50} \pm E.P.M.$, que representa a concentração da amostra necessária para obter metade da atividade sequestradora dos radicais DPPH. Como controle positivo foi utilizado o ácido ascórbico.

Atividade sequestradora do radical livre ABTS

O cátion radical $ABTS^{\cdot+}$ foi preparado pela mistura de uma solução de ABTS com uma solução de persulfato de potássio em água destilada, a fim de obter concentrações finais de 7 mM e 140 mM, respectivamente. A solução foi mantida no escuro à temperatura ambiente durante um período de 12-16 horas antes do uso. Então a solução do radical $ABTS^{\cdot+}$ foi diluída com etanol (1:100 v/v, aproximadamente) até uma absorbância (A) de $0,7 \pm 0,05$ no comprimento de onda de 734 nm, em UV-Visível, a uma temperatura de equilíbrio de 30 °C. As soluções estoque do extrato EtOH, das frações hexânica, AcOEt e MeOH/H₂O foram preparadas em EtOH a concentração de 1,0 mg/mL. As soluções foram agitadas e, após 10 minutos de reação, a absorbância das amostras e do padrão foram medidas em um espectrofotômetro de UV-Visível em comprimento de onda de 734 nm, utilizando-se cubetas de quartzo. A percentagem de atividade sequestradora (% AS) foi calculada pela equação:

$$\% AS = 100 \times (A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}}$$

onde A_{controle} é a absorbância do controle, contendo apenas a solução alcoólica do radical $ABTS^{\cdot+}$, e A_{amostra} é a absorbância do radical na presença do extrato, frações ou do padrão trolox. A eficiência anti-radicalar foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) obtido pelo programa estatístico GraphPad Prism 5.0 (DEMO). Os resultados foram expressos através da $CE_{50} \pm E.P.M.$, que representa a concentração da amostra necessária para obter metade da atividade sequestradora dos radicais $ABTS^{\cdot+}$. A determinação da CE_{50} do extrato EtOH e das frações hexânica, AcOEt e MeOH/H₂O foi realizada pela

metodologia descrita por Reet *al.* (1999), utilizando o Trolox como composto padrão, um análogo da vitamina E solúvel em água.

Determinação da atividade antioxidante com o sistema β -caroteno/ácido linolêico

A solução do sistema β -caroteno/ácido linolêico foi preparada adicionando-se uma alíquota de 50 μ L da solução de β -caroteno (20 mg/mL em clorofórmio) 80 μ L de ácido linolêico e 660 μ L de Tween 20 (monopalmitato de polioxietileno sorbitan). Foram adicionados 90 mL de água destilada (previamente submetida a tratamento em atmosfera de oxigênio, durante 30 minutos). A absorbância da emulsão foi ajustada entre 0,7 a 0,6 nm a 470 nm. Alíquotas dos extratos (50 μ g/mL) foram comparadas ao controle (sem antioxidante) e ao Trolox (16 μ g/mL), utilizado como antioxidante padrão. Uma leitura inicial da absorbância foi feita imediatamente após a adição das amostras e do padrão ao sistema visando à determinação do tempo zero. Posteriormente, a absorbância foi monitorada a cada 20 minutos, durante o período de 120 minutos. As amostras foram mantidas em banho-maria a 40 °C durante as leituras. A capacidade antioxidante foi expressa em porcentagem de inibição da oxidação. O decréscimo da leitura da absorbância das amostras foi comparado com o sistema e estabelece a porcentagem de oxidação:

$$\begin{aligned} \text{Redução da absorbância} &= Abs_{\text{inicial}} - Abs_{\text{final}} \\ \% \text{ Oxidação} &= [(Redução da Abs)_{\text{amostra}} \times 100] / (Redução Abs)_{\text{sistema}} \\ \% \text{ Proteção} &= 100 - (\% \text{ Oxidação}) \end{aligned}$$

Ensaio de proteção a molécula de DNA

O ensaio para identificar a proteção ao dano ao DNA causada pelo reagente de Fenton foi realizada a partir do descrito por (Silva, 2011), sendo a escolha das frações aquelas que nas atividades antioxidantes colorimétricas apresentaram melhor resultado com pequenas adaptações. Foram preparadas diluições das frações acetato de etila, e metanol/H₂O na concentração de 300 μ g/mL. Foram acrescentadas 0,125 μ g do DNA Plasmid PBr 322 (0,5 μ L) sendo incubado por 30 minutos a 37° C. Após o período de incubação, foi colocado o

reagente de Fenton (30 mM H₂O₂, 50 mM ácido ascórbico e 80 mM de FeCl₃) seguido de novo período de incubação de 30 minutos a 37° C. O DNA foi analisado em Gel de agarose a 1%, e o DNA mensurado através do TotalLab Quant.**2.9**

Ensaio de proteção contra oxidação lipídica em membrana de eritrócito

O ensaio foi baseado no descrito por (Santos et al., 2011) onde foi retirado 5mL de sangue por venopunção em EDTA após a assinatura do termo de consentimento, que em seguida foi centrifugado a 1500 rpm/10 minutos a 4° C para remoção do plasma. Os eritrócitos foram lavados 3 vezes em tampão fosfato (PBS) pH 7,4 e resuspenso no mesmo tampão a 2%. Foi adicionado em tubo de ensaio 80 µL da fração Acetato de metila, metanol e quercetina, como controle positivo e 1,5 mL da suspensão de eritrócitos e submetido a agitação a 37° C por 30 minutos, após este intervalo de tempo foi induzido a oxidação pela decomposição do AAPH () dissolvido em PBS com concentração final 50 mM. A solução foi incubada por 3h a 37° C com leve agitação. Após as 3h de incubação, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos para separação dos eritrócitos. O percentual de hemólise foi determinado medindo-se a absorbância do sobrenatante a 545 nm das frações e da quercetina (A) comparada com a completa hemólise (B) pelo tratamento de alíquota com o mesmo volume das amostras submetidas com água destilada. O percentual de hemólise foi calculado utilizando a fórmula $A/B \times 100$. O ensaio descrito foi realizado em triplicata.

Atividade citotóxica do extrato e das frações das folhas de *H pectinata*

A viabilidade celular foi avaliada utilizando o ensaio de MTT, que mede a conversão metabólica do ácido 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil-sal (MTT) para o corante de formazano colorido (Abid Nabil Ben, 2012) . Células Vero (1 x 10⁵/mL) foram incubadas em placas de 96 poços em quadruplicado, durante 24 h. As células foram então tratadas com o extrato etanólicos e as frações AcOEt, MeOH/ H₂O e Hexano na concentração de 80 µg/mL durante 30 min e

em seguida com H₂O₂ (1 mM) durante 24 h. No final da incubação, o meio foi removido e uma solução de MTT (5 mg / mL em meio RPMI) foi adicionado às células que foram ainda incubadas durante 3 h. Em seguida, o meio foi removido e o produto intracelulares formados foram dissolvidos em DMSO. A densidade óptica (OD) foi medida a 595 nm num leitor de microplacas). A viabilidade celular foi calculada em comparação com a densidade óptica obtida por célula de controle, considerada como 100%.

.Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio dos programas MS Office MICROSOFT Excel (2007) e GraphPad Prism versão 5.0. (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA). Foi realizada a análise por ANOVA e o teste de Turkey para determinar as diferenças entre as amostras ($p < 0,05$).

Resultados e discussão

Teor de fenólicos totais, atividade sequestradora de radical livre e atividade antioxidante do extrato e frações das folhas de *H. pectinata*

O teor de fenólicos totais encontrados nas frações apresenta-se no (Figura 14) como indicador da presença de polifenóis, compostos que possuem atividade antioxidante como já descrito . A fração AcOEt apresenta um teor maior destes fenólicos ($191, 84 \pm 1,2$), selecionada para identificação dos compostos encontrados em seu extrato, seguido pela fração MeOH/ H₂O ($173,45 \pm 3,6$). Os resultados apresentados apontam a presença de compostos fenólicos, tanto na fração AcOEt como na fração MeOH/ H₂O Apesar de bastante estudado o potencial antioxidante das Lamiaceae (Grayer et al., 2003; Lee, 2010), não há registro de outros trabalhos que quantificassem o teor de fenólicos da *H. Pectinata*.

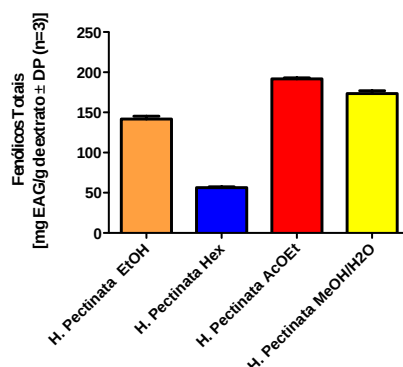


Figura 14 Teor de Fenólicos Totais (FT) do extrato EtOH e das frações Hexânica, AcOEt e MeOH:H₂O (100 µg/mL)

O ensaio utilizando o DPPHO visa avaliar a capacidade sequestradora do radical DPPH (1,1-difenil-picril-hidrazil) que possui a coloração púrpura e que absorveem um comprimento de onda de 517 nm por ação de antioxidantes é reduzido para DPPH-H (hidrazina) que possui a coloração amarela (Brand-Williams, 1995). A Figura 14 representa em a quantidade em µg/mL de cada extrato capaz de reduzir capturar 50% do radical DPPH. A fração AcOEt apresenta maior capacidade sequestradora de radicais livres ($38,90 \pm 0,12$) apresentando resultados no extrato etanólico ($45,13 \pm 0,49$) equivalente ao encontrado na fração. Também possui relativa atividade antioxidante a fração metanol/H₂O ($38,90 \pm 0,64$). A fração hexânica possui capacidade antioxidante escassa ($190,0 \pm 1,22$), o que pode ser justificado pela ausência de flavonoides e terpenóides na fração. Resultados do ensaio do sequestro do DPPH com plantas da mesma família da *Hyptis pectinata* – Lamiaceae mostram que plantas das mesma família como *Salvia sclarea*, *Salvia glutinosa*, *Salvia pratensis* possuem um alto grau de inibição quando fracionadas em Acetato de Etila e Metanol (Miliauskas et al., 2004). Da família Lamiaceae do gênero *Hyptis*, apresentam estudos que apontam o Ec₅₀ dos extratos etanólicos da *Hyptis elegans* (89.91 ± 4.30) e *Hyptis tetraphala* ($36,06 \pm 3,43$) com resultados próximos ao encontrado na *Hyptis pectinata* (Mensor et al., 2001) (Mensor et al., 2001).

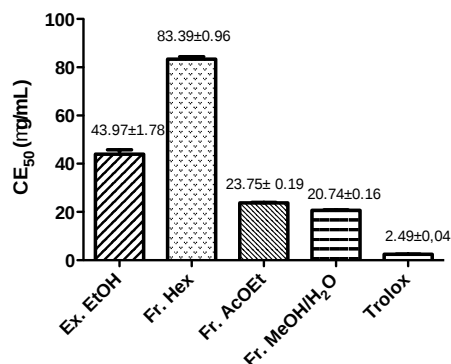


Figura 15 Resultado da atividade sequestradora do radical DPPH do extrato EtOH e das frações Hex., AcOEt e MeOH:H₂O

O método colorimétrico que monitora a diminuição do radical ABTS na presença de compostos antioxidantes produzido pela oxidação do 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazilina-6-sulfonato) . Este método tanto indica a presença de antioxidantes lipofílicos como hidrofílicos em mesma amostra (Figura 15). Nas amostras de *Hyptis pectinata*, observa-se nas frações AcOEt ($23,75 \pm 0,19$) e MeOH/ H₂O, ($20,74 \pm 0,16$) uma alta capacidade de reagir com o radical ABTS, o que não se percebe na fração Hexânica ($83,39 \pm 0,96$). Este resultado levanta a possibilidade dos compostos encontrados nas frações AcOEt e MeOH/ H₂O possuírem atividade antioxidantes nos processos de lipoxidação de membranas. Na literatura encontra-se o percentual de inibição de algumas Lamiaceae bem inferiores ao encontrados no gênero *Hyptis* (Dudonné, 2009).

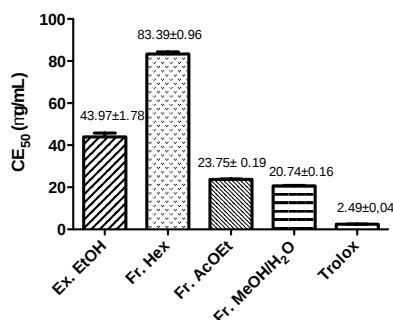


Figura 16 Resultado da atividade sequestradora do radical ABTS

A oxidação lipídica em alimentos durante seu processamento, causa problemas como a diminuição do valor nutricional e consequentemente perdas financeiras. Substâncias antioxidantes, como o trolox, são indicadas para

retardar esta oxidação lipídica. O β -caroteno, ao interagir sinergicamente com a vitamina E causa a inibição do oxigênio singlete, retardando a oxidação.

O método utilizado nesse ensaio avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico. A figura 17 apresenta o efeito do extrato EtOH bruto apresenta o efeito da *Hyptis pectinata* na inibição de radicais demonstrando um efeito superior a 50% nos primeiros 20 minutos da reação e reduzindo progressivamente esta ação até que aos 120 minutos possuir um efeito reduzido, inferior a 40%.

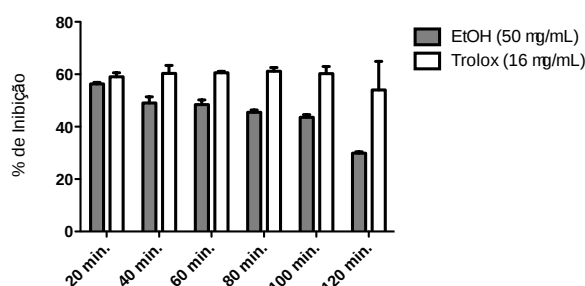


Figura 19 Resultado demonstrando a ação do extrato EtOH, tendo como referência o trolox

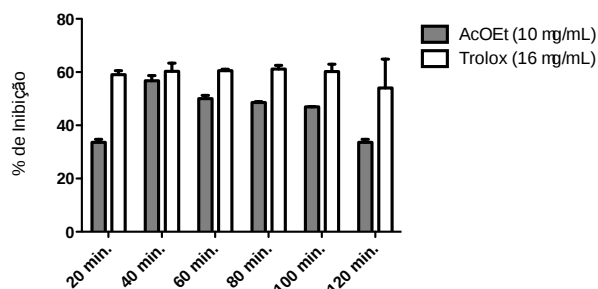


Figura 18 Resultado demonstrando a ação da fração AcOEt tendo como referência o trolox

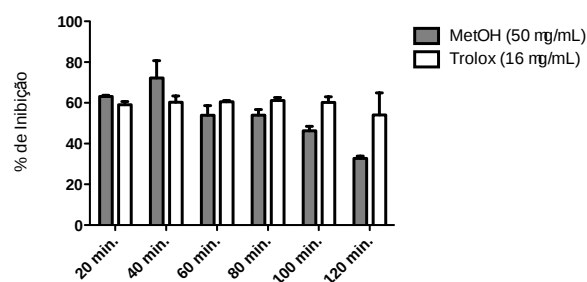


Figura 17 Resultado demonstrando a ação da fração MetOH, tendo como referência o trolox

Ao se observar a fração AcOEt (Figura 19) percebe-se um resultado interessante em pequena concentração (10 μ g/mL) contra o trolox (16 μ g/mL) chegando a se igualar ao controle no tempo de 40 minutos: $57.30 \pm 0,1$ da fração AcOEt contra 58.07 ± 2.5 , conclui-se que a ação da fração AcOEt é capaz de interferir no processo de peroxidação do ácido linoléico acima de 50% aos 40 minutos da reação. A fração metanólica (Figura 18) também apresentou capacidade inibitória, no entanto, em concentração mais elevada que a fração etanólica.

Não existem outros trabalhos que avaliem a ação de extrato etanólico e as frações AcOEt, MeOH/ H₂O e hexano publicados no entanto, existem trabalhos que avaliam a atividade antioxidante através do Sistema β caroteno/ ácido linolêico em outras espécies da família Lamiaceae (Falé et al., 2009) *Salvia verticillata* (Tepe et al., 2007) *Teucrium polium* L. (Sharififar et al., 2009) .

Ensaio de dano ao DNA

Uma das formas mais expressivas de atuação danosa dos radicais livres é através de dano ao DNA, que é causado pela ação dos radicais OH com o açúcar desoxirribose, em seu grupamento amina formando moléculas de água, hidrogênio, hidroxila e carbonila, o que leva a formação de um orifício no anel da desoxirribose (Abolfath et al., 2011). Ao se utilizar 300 μ g/mL das frações acetato de etila e metanol, por serem aquelas que apresentaram nos testes colorimétricos melhores resultados e ao se traçar um comparativo com a mesma concentração de quercetina, um flavonóide reconhecidamente antioxidante, observa-se um efeito protetor dos referidos extratos, sendo a fração AcOEt a que gera um efeito de Proteção mais evidente (Figura 20).

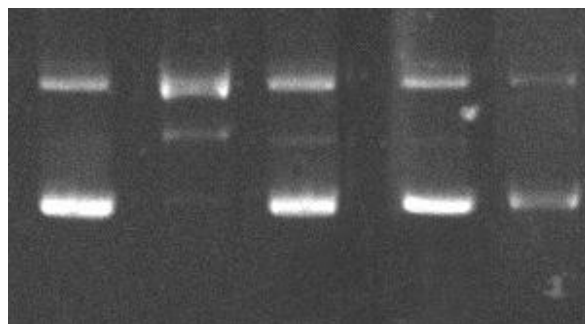


Figura 20. ensaio com DNA linha1 : DNA+ água destilada, linha 2: DNA + reagente de Fenton, linha 3: DNA+Quercetina+ Reagente de Fenton, linha 4: DNA +fração AcOEt + reagente de Fenton, linha 5: DNA +fração MetOH + reagente de Fenton

Ensaio de efeito eritrocítico

Mesmo todos os componentes celulares sendo susceptíveis a ação de radicais livres, as membranas celulares são criticamente sensíveis graças a peroxidação lipídica onde os radicais livres agem em ácidos graxos polinsaturados e colesterol iniciando uma cadeia de eventos que geram radical

alquila, alcoila e peroxila, que alteram a estrutura da membrana levando a célula a morte. As frações acetato de etila e metanol: H₂O em concentrações de 80 µg/mL são capazes de reduzir a lipoperoxidação causada pelo AAPH de forma a proteger os eritrócitos da hemólise de forma efetiva. Observando-se o gráfico pode-se observar que o efeito dos frações AcOEt e MeOH/ H₂O aparecem superiores aos encontrados no controle positivo quercetina, demonstrando um resultado significativo do efeito protetor das frações sob os ácidos graxos e colesterol encontrado na superfície da membrana plasmática dos eritrócitos (Figura 21).

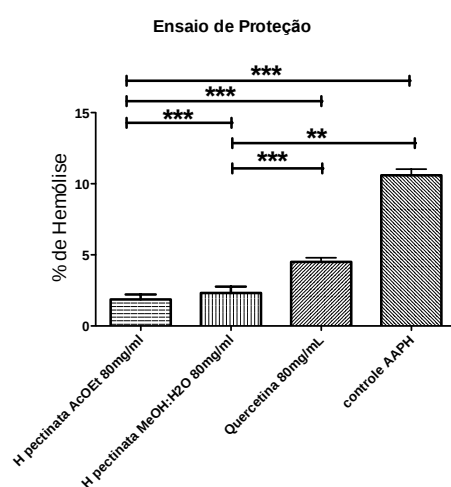


Figura 21. Percentual de hemólise encontrado na ação das frações AcOEt e MeOH: H₂O e quercetina

Efeito Citotóxico dos extratos

Para que extrato e frações possam ser utilizados pela população como chás e infusões, como é feito hoje, é necessário avaliar a existência de toxicidade de seu extrato e de suas frações. Foram considerados adequados os resultados com percentuais superiores 50% de células viáveis (Bouaziz et al., 2012). No ensaio de citotoxicidade, utilizando-se concentrações de 80 µg/mL para o extrato EtOH e frações AcOEt, MeOH/ H₂O e Hexânica não foi observado efeito tóxico sob a cultura de células possuindo todos percentuais acima de 50% (Figura 10).

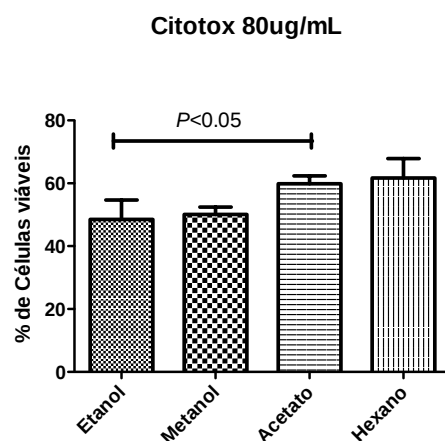


Figura 22. . Percentual de células viáveis encontradas após a incubação com o extrato etanólico e as frações metanol: H₂O, Acetato e Hexano.

Discussão

Assim como outras espécies de Lamiaceae (Khomdram, 2011), a *Hyptis pectinata* apresenta um quantitativo de compostos fenólicos que atribuem aos chás preparados com as folhas um efeito antioxidante importante. O efeito protetor encontrado pelos extratos acetato de etila e MeOH/ H₂O se confirmam nos ensaios para avaliar a proteção destes tanto em membrana plasmática de eritrócito, o que se confirma na diminuição pro processo de peroxidação lipídica e consequente diminuição da hemólise das amostras submetidas aos extratos, como na prevenção da quebra da molécula de DNA pelo Reagente de Fenton no ensaio de proteção ao DNA. Estudos mostram que a presença do ácido rosmarínico, presente na fração acetato de etila pode estar envolvida como efeito protetor encontrado (Falé et al., 2009). Também, constituintes presentes na fração acetato de etila da *H. Pectinata* como neptetoidinas A e B comuns em Lamiaceae em particular no gênero *Hyptis*, como *H. Eriosephala*, *H. Lanceolata*, *H. Ramosa*, *H. Urticoides* possuem atividade antioxidante (Grayer et al., 2003) principalmente a neptetoidina B.

Conclusão

O uso doméstico da *Hyptis pectinata*, na forma de chá ou infusão, é comum no nordeste do Brasil e por não possuir efeito tóxico relevante, é de

fato, um importante recurso para consumo de antioxidantes capazes de promover a proteção de estruturas celulares importantes.

Referências

- Abid Nabil Ben, S., 2012. Cytotoxic effect of nanoparticles synthesized from *Salvia officinalis* L. and *Ricinus communis* aqueous extracts against vero cell line and evaluation of their antioxidant activities. African Journal of Biotechnology 11.
- Abolfath, R.M., van Duin, A.C., Brabec, T., 2011. Reactive molecular dynamics study on the first steps of DNA damage by free hydroxyl radicals. The journal of physical chemistry. A 115, 11045-11049.
- Agra, M.d.F.F., Patricia França de; Barbosa Filho, JOsé Maria, 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. Rev. bras. farmacogn. 17.
- Al-Akwa, A.A., Shaher, M., Al-Akwa, S., Aleryani, S.L., 2009. Free radicals are present in human serum of *Catha edulis Forsk* (Khat) abusers. Journal of ethnopharmacology 125, 471-473.
- Al-Fatimi, M., Wurster, M., Schroder, G., Lindequist, U., 2007. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. Journal of ethnopharmacology 111, 657-666.
- Alejandra Rojas, L.H., Rogelio Pereda-Miranda, Rachel Mata, 1992. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, 35, 275-283.
- Alonso-Castro, A.J., Villarreal, M.L., Salazar-Olivo, L.A., Gomez-Sanchez, M., Dominguez, F., Garcia-Carranca, A., 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. Journal of ethnopharmacology 133, 945-972.
- Auderset, F., Schuster, S., Coutaz, M., Koch, U., Desgranges, F., Merck, E., MacDonald, H.R., Radtke, F., Tacchini-Cottier, F., 2012. Redundant Notch1 and Notch2 signaling is necessary for IFN γ secretion by T helper 1 cells during infection with *Leishmania major*. PLoS pathogens 8, e1002560.
- Bispo, M.D., Mourao, R.H., Franzotti, E.M., Bomfim, K.B., Arrigoni-Blank, M.F., Moreno, M.P., Marchioro, M., Antonioli, A.R., 2001. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. Journal of ethnopharmacology 76, 81-86.
- Bouaziz, C., Bouslimi, A., Kadri, R., Zaied, C., Bacha, H., Abid-Essefi, S., 2012. The in vitro effects of zearalenone and T-2 toxins on Vero cells. Experimental

and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie.

Brand-Williams, W.C., M.E.; Berset, C., 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Science and Technology 28, 25-30.

Bulku, E., Zinkovsky, D., Patel, P., Javia, V., Lahoti, T., Khodos, I., Stohs, S.J., Ray, S.D., 2010. A novel dietary supplement containing multiple phytochemicals and vitamins elevates hepatorenal and cardiac antioxidant enzymes in the absence of significant serum chemistry and genomic changes. Oxidative medicine and cellular longevity 3, 129-144.

Chang, J.X., Chen, S., Ma, L.P., Jiang, L.Y., Chen, J.W., Chang, R.M., Wen, L.Q., Wu, W., Jiang, Z.P., Huang, Z.T., 2005. Functional and morphological changes of the gut barrier during the restitution process after hemorrhagic shock. World journal of gastroenterology : WJG 11, 5485-5491.

Dudonné, S.V., X.; Coutiere, P.; Woillez, M.; Merillon, J.M., 2009. comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. J. Agric. Food Chem. 57, 1768-1774.

Falé, P.L., Borges, C., Madeira, P.J.A., Ascensão, L., Araújo, M.E.M., Florêncio, M.H., Serralheiro, M.L.M., 2009. Rosmarinic acid, scutellarein 4'-methyl ether 7-O-glucuronide and (16S)-coleon E are the main compounds responsible for the antiacetylcholinesterase and antioxidant activity in herbal tea of *Plectranthus barbatus* ("falso boldo"). Food Chemistry 114, 798-805.

Fragoso-Serrano, M., Gibbons, S., Pereda-Miranda, R., 2005. Anti-staphylococcal and cytotoxic compounds from *Hyptis pectinata*. Planta medica 71, 278-280.

Grayer, R.J., Eckert, M.R., Veitch, N.C., Kite, G.C., Marin, P.D., Kokubun, T., Simmonds, M.S.J., Paton, A.J., 2003. The chemotaxonomic significance of two bioactive caffeic acid esters, nepetoidins A and B, in the Lamiaceae. Phytochemistry 64, 519-528.

Halliwell, B., 2011. Free radicals and antioxidants - quo vadis? Trends in pharmacological sciences 32, 125-130.

Hu, F.B., Willett, W.C., 2001. Diet and coronary heart disease: findings from the Nurses' Health Study and Health Professionals' Follow-up Study. The journal of nutrition, health & aging 5, 132-138.

- Kaur, R., Arora, S., Singh, B., 2008. Antioxidant activity of the phenol rich fractions of leaves of *Chukrasia tabularis* A. Juss. Bioresource technology 99, 7692-7698.
- Kestwal, R.M., Bagal-Kestwal, D., Chiang, B.H., 2012. Analysis and enhancement of nutritional and antioxidant properties of *Vigna aconitifolia* sprouts. Plant Foods Hum Nutr 67, 136-141.
- Khomdram, S.D.S., P.K., 2011. polyphenolic Compounds and Free Radical Scavenging Activity in Eight Lamiaceae Herbs of Manipur. Notulae Scientia Biologicae 3, 108-113.
- Kuskoski, E.M.A., A.G.; Troncoso, A.M.; Mancini-Filho, J.; Fett, R., 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Ciência e Tecnologia de Alimentos 25, 726-732.
- Lee, J., 2010. Caffeic acid derivatives in dried Lamiaceae and *Echinacea purpurea* products. Journal of Functional Foods 2, 158-162.
- Loganayaki, N., Siddhuraju, P., Manian, S., 2012. Antioxidant, anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of *Ammannia baccifera* L. (Lythraceae), a folklore medicinal plant. Journal of ethnopharmacology 140, 230-233.
- Mahne, S., Chuang, G.C., Pankey, E.A., Kiruri, L., Kadowitz, P.J., Dellinger, B., Varner, K.J., 2012. Environmentally Persistent Free Radicals Decrease Cardiac Function and Increase Pulmonary Artery Pressure. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology.
- Malan, K., Pelissier, Y., Marion, C., Blaise, A., Bessiere, J.M., 1988. The essential oil of *Hyptis pectinata*. Planta medica 54, 531-532.
- Marco, G.J., 1968. A rapid method for evaluation of antioxidants. Journal of the American Oil Chemists Society 45, 594-598.
- Mensor, L.L., Menezes, F.S., Leitao, G.G., Reis, A.S., dos Santos, T.C., Coube, C.S., Leitao, S.G., 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. Phytotherapy research : PTR 15, 127-130.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., van Beek, T.A., 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food chemistry 85, 231-237.
- Miller, H.E., 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidants. Journal of the American Oil Chemists Society 48, 91.

- Raymundo, L.J., Guilhon, C.C., Alviano, D.S., Matheus, M.E., Antonioli, A.R., Cavalcanti, S.C., Alves, P.B., Alviano, C.S., Fernandes, P.D., 2011. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. *Journal of ethnopharmacology* 134, 725-732.
- Renaud, P., 2012. Organic free radicals. *Chimia* 66, 361.
- Sabu, M.C., Kuttan, R., 2002. Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. *Journal of ethnopharmacology* 81, 155-160.
- Sánchez-Moreno, C.L., J.A.; Saura-Calixto, F., 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Science of Food and Agriculture* 76, 270-276.
- Santos, R.P., Mendes, L.S., Silva, B.M., Pinho, P.G.d., Valentão, P., Andrade, P.B., Pereira, J.A., Carvalho, M., 2011. Phytochemical profiles and inhibitory effect on free radical-induced human erythrocyte damage of *Dracaena draco* leaf: A potential novel antioxidant agent. *Food chemistry* 124, 927-934.
- Santos, T.C., Marques, M.S., Menezes, I.A., Dias, K.S., Silva, A.B., Mello, I.C., Carvalho, A.C., Cavalcanti, S.C., Antonioli, A.R., Marcal, R.M., 2007. Antinociceptive effect and acute toxicity of the *Hyptis suaveolens* leaves aqueous extract on mice. *Fitoterapia* 78, 333-336.
- Sharififar, F., Dehghn-Nudeh, G., Mirtajaldini, M., 2009. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry* 112, 885-888.
- Silva, L.C.N.S.-J., C.A.; Souza, R.M.; Macedo, A.J.; Silva, M.V.; Correia, M.T.S., 2011. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities os *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. *Food and Chemical Toxicology* 49, 2222-2228.
- Singleton, V.L.R., J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158.
- Souri, E.A., G; Farsam, H; Barazandeh, TM, 2008. Screening of antioxidant activity and phenolic content of 24 medicinal plant extracts. *DARU* 16, 83-87.
- Souza, V.C.L.H., 2005. Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, São Paulo.

Stagos, D., Portesis, N., Spanou, C., Mossialos, D., Aligiannis, N., Chaita, E., Panagoulis, C., Reri, E., Skaltsounis, L., Tsatsakis, A.M., Kouretas, D., 2012. Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association 50, 4115-4124.

Tepe, B., Eminagaoglu, O., Akpulat, H.A., Aydin, E., 2007. Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. verticillata and *S. verticillata* (L.) subsp. amasiaca (Freyn & Bornm.) Bornm. Food Chemistry 100, 985-989.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The international journal of biochemistry & cell biology 39, 44-84.

7.0. ANEXOS

Antileishmanial compounds from Leaves of *Hyptis pectinata* (L.) Poit

Rosangela Alves Falcao¹ (rosangela.estevao.falcao@hotmail.com)

Patricia Lins Azevedo do Nascimento¹ (patricialanascimento@hotmail.com)

Silvana Alves de Souza¹ (silvanaalvesp@hotmail.com)

Telma Maria Guedes da Silva¹ (thelguel@bol.com.br)

Aline Cavalcanti de Queiroz² (alycq_farmacia@hotmail.com)

Carolina Barbosa Brito da Matta² (caroll_brito@hotmail.com)

Magna Suzana Alexandre Moreira² (suzana.magna@gmail.com)

Celso Amorim Camara¹ (ccelso@dcm.ufrpe.br)

Tania Maria Sarmiento Silva^{1§} (taniasarmento@dcm.ufrpe.br)

1-Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica, Departamento de Ciências Moleculares, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP 52171-900, Pernambuco, Brazil.

2-Laboratório de Farmacologia e Imunidade, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970, Alagoas, Brazil.

*Corresponding author: Tel.: +55 81 33206382; fax: +55 81 33206374
E-mail: taniasarmento@dcm.ufrpe.br (TMS Silva)

Abstract

Background: *Hyptis pectinata* (L.) Poit is popularly known in Brazil as “sambacaitá” or “canudinho”, is a aromatic shrub largely grown in the northeastern of Brazil. The leaves and barks are used as infusion for the treatment of throat and skin inflammations, bacterial infections, pain and cancer.

Results: Analogues of rosmarinic acid and flavonoids were obtained from leaves of *Hyptis pectinata*, consisting of two new compounds, sambacaitaric acid (**1**) and 3-O-methyl-sambacaitaric acid (**2**) and nine known compounds, rosmarinic acid (**3**), 3-O-methyl-rosmarinic acid (**4**), ethyl caffeoate (**5**), nepetoidin A (**6**), nepetoidin B (**7**), cirsiol (**8**), circimaritin (**9**), 7-O-methyluteolin (**10**) and genkwanin (**11**). The structures of these compounds were determined on the basis of spectroscopic methods. The compounds **1-5** and **7** were evaluated *in vitro* against promastigotes forms of *L. braziliensis*, and were also evaluated ethanolic extract, hexanic, ethyl acetate and methanol-water fractions.

Conclusions: From the leaves of *Hyptis pectinata* were isolated seven phenylpropanoids and four flavonoids. The EtOH extract, Hexane, AcOEt, MeOH:H₂O fractions and compounds **1**, **2** and **4** exhibited antileishmanial activity, compounds **1** were as potent as pentamidine. In contrast, the compounds **3**, **5**, and **7** did not present activity against promastigote forms of *L. braziliensis* until 100 µM. As long as we know, compounds **1** and **2** are being described for the first time.

Keywords: *Hyptis pectinata*, phenylpropanoids, flavonoids, antileishmanial activity

Background

The Lamiaceae family is cosmopolitan and comprises 236 genera and 7173 species [1]. This group is well known for its essential oils [2], which are rich in terpenoids, especially in the subfamily Nepetoideae. In South America, *Hyptis* is one of the main genera of this subfamily and comprises 280 species. Of these species, occur in Brazil and 146 are endemic to this country [3].

Hyptis pectinata (L.) Poit, subfamily Nepetoideae, popularly known in Brazil as “sambacaitá” or “canudinho”, is a widespread, aromatic shrub largely grown in the northeastern of Brazil [4], is an herbaceous plant with aromatic leaves, and small bilabial flowers, clustered into axillar inflorescences [5]. Although there are some reports on the constituents of *H. pectinata*, those studies [6] mainly focused on the essential oil composition [7]. It is particularly used in folk medicine for various conditions, such as rhinopharyngitis, nasal congestion, certain skin diseases [8], gastric disorders, fever [9] and bacterial infections [10]. The leaves and barks are used as an infusion for the treatment of throat and skin inflammations, bacterial infections, pain, and cancer [11-13].

The healing effect of *H. pectinata* suggests that the plant may have antileishmanial action. The Leishmaniasis is a major global public health problem, with three million cases annually [14]. American tegumentary leishmaniasis (ATL) is a serious zoonosis, endemic throughout considerable areas of Latin America [15]. The main clinical forms of ATL are cutaneous leishmaniasis, mucosal or mucocutaneous leishmaniasis, and diffuse cutaneous leishmaniasis. In Brazil, ATL is found in all states and has shown a high incidence over the last 20 years and the genetic diversity among the *Leishmania* parasites is great, at least seven *Leishmania* species have been described as the etiological agent of human cutaneous disease, with most cases being caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* [16-18].

The drugs commercially found for the treatment of Leishmaniasis have a high degree of toxicity, requiring hospital monitoring because they may lead to death [19]. This has been encouraged by WHO (World Health Organization) through the Program of Tropical Diseases research of natural products capable of acting in the treatment of leishmaniasis [20].

The current work led to the isolation of two new compound named sambacaitaric acid (**1**) and 3-O-methyl-sambacaitaric acid (**2**) (Figure 1) and nine

known compounds from *H. pectinata*. **1-7** were phenylpropanoids and **8-11** were flavonoids (Figure 2 and 3). The extract EtOH, Hexane, AcOEt, MeOH:H₂O and the compounds **1-5** and **7** were evaluated *in vitro* against promastigotes forms of *L. braziliensis*.

Results and discussion

The leaves of *Hyptis pectinata* upon extraction and fractionation yielded compounds **1-11**. (Figures 1-3). The compound **1** and **2** were identified as a new compounds, a rosmarinic acid analogues, based on a detailed analysis of NMR as described below (Table 1). Compound **1** was obtained as a yellowish amorphous powder and its optical rotation was $[\alpha]_D = +30$ (c 0.001, MeOH). Its molecular formula was deduced to be C₁₈H₁₆O₈ by HRESIMS, which showed a molecular ion peak $[M-H]^+$ at m/z 359.0759 (Calcd for C₁₈H₁₅O₈, 359.0761). The UV spectrum exhibited signals at 322, 296 and 239 nm, IR spectrum showed signals at 3435, 1628, 1524 and 1405 cm⁻¹. The ¹H and ¹³C NMR spectra of **1** were similar to those of rosmarinic acid.

In the ¹H-NMR spectrum of **1**, two sets of ABX proton signals at (δ 7.03, d, $J=2.0$ Hz; 6.74, d, $J=8.5$ Hz; 6.92, dd, $J=8.5, 2.0$ Hz) and (δ 6.66, d, $J=2.0$ Hz; 6.59, d, $J=8.5$ Hz; 6.48, dd, $J=8.5, 2.0$ Hz), and two olefinic proton signal at δ 7.34 (d, $J=17.0$ Hz) and 6.18 (d, $J=17.0$ Hz) were observed. In the aliphatic region, there were three proton signals at δ 4.85 (m), 3.01 (m) and 2.74 (m). The ¹³C-NMR spectrum showed 18 carbon signals. The H-7 proton signal (δ 7.34) was long range coupled with aromatic carbons at δ 125.58 (C-1), 114.23 (C-2), and 119.4 (C-6) and an olefinic carbon at δ 114.90 (C-8) and the carbonyl carbon at δ 166.22 (C-9) in the heteronuclear multiple bond correlation (HMBC) spectrum (Figure 1). The absolute configuration of **1** was determined by CD spectroscopy. As the chiral center and its immediate environment are identical to that of rosmarinic acid **3** (Figure 4) one would expect a similar CD spectrum if the configuration around C-8' is the same as in **1**. On the basis of these observations, the structure of compound (**1**) was established to be isoferuloyl-4'-(3'-hydroxyphenyl)-(8'*R*)-lactic acid named sambacaitaric acid.

The sambacaitaric acid (**1**) was treated with Ac₂O/pyridine to yield the peracetyl derivative (**1a**). The ¹H and ¹³C NMR spectral data of **1a**, obtained through the analysis of extensive 1D and 2D NMR experiments (Figure 1 and Table 1) was

also used to confirm the structures postulated to **1**. The **1a** showed the $[M-H]^+$ at m/z 527 in its electrospray ionization mass spectroscopy (ESI-MS) corresponding to the molecular formula $C_{26}H_{24}O_{12}$.

The compound **2** was obtained as a yellowish amorphous powder and showed a positive optical rotation $[\alpha]_D = +10$ (c 0.1, MeOH). Its molecular formula was deduced to be $C_{19}H_{18}O_8$, which revealed the $[M-H]^+$ peak at m/z 373. The UV spectrum exhibited signal at 340 nm and IR spectrum showed signals at 3420, 1680 and 1607 cm^{-1} . The ^1H and ^{13}C NMR spectra were similar to those **1** plus the presence of a methoxyl group on the 3 position. Thus, the structure of this new compound was established as 3-O-methyl-sambacaitaric acid.

Known compounds were identified from spectroscopic data (UV, IR, ESIMS and NMR) as rosmarinic acid (**3**), 3-O-methyl-rosmarinic acid (**4**) [21], Ethyl caffeate (**5**) [22], Nepetoidin A (**6**), Nepetoidin B (**7**) [23], cirsiol (**8**) [24], circimaritin (**9**) [25], 7-O-methyluteolin (**10**) [26] and genkwanin (**11**) [27].

The compounds **6** and **7** (nepetoidins A and B, respectively). According Grayer et al [28], the presence of this pair of caffeic acid esters presents chemotaxonomic significance distinguishing the Nepetoideae from the other subfamilies of Lamiaceae and related families.

The flavonoid **8** (cirsiol) is the first related in the *Hyptis* genus, however has been found in the Labiateae family as *Sideritis*, *Stachys*, *Teucrium* and *Rosmarinus* genera. According Tomas-Barberan et al [29] these compounds are located externally, dissolved in a terpenoid matrix, and they have been found in larger amounts in the species which grow in xerix habitats. The flavonoids **9** (circimaritin) and **11** (genkwanin) were isolated from *Hyptis fasciculata*, a native species to Brazil, Argentina and Uruguay [30]. **10** (7-O-methyluteolin) being reported for the first time in the genus *Hyptis*.

To evaluate and compare the leishmanicidal profile of *H. pectinata*, EtOH extract Hexane, AcOEt and MeOH:H₂O fractions as well as isolated compounds in major quantity **1-5** and **7** were evaluated *in vitro* against promastigotes forms of *L. braziliensis*. As parameter for antileishmanial activity, the maximum effect and IC₅₀ value (the concentration of sample causing 50% reduction in survival/viability of the parasites) were used (Table 2).

The EtOH extract, Hexane, AcOEt and MeOH:H₂O fractions and compounds **1**, **2** and **4** exhibited antileishmanial activity, with the maximum effect of 91.6 ± 2.5 , 61.5 ± 1.2 , 81.5 ± 5.9 , 90.0 ± 3.6 , 56.0 ± 0.8 , 48.8 ± 1.7 and $69.1 \pm 2.7\%$, respectively. Moreover the EtOH extract ($IC_{50} = 0.7 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$), AcOEt fraction ($IC_{50} = 0.4 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$), Hexane fraction ($IC_{50} = 0.2 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$), compounds **1** ($IC_{50} = 6.9 \pm 0.7 \mu\text{M}/2.5 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$) and **4** ($IC_{50} = 5.4 \pm 0.8 \mu\text{M}/2.0 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$) were as potent as pentamidine (with efficacy of $93.5 \pm 0.7 \%$ and $IC_{50} = 0.9 \pm 0.03 \mu\text{M}/0.3 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$). In contrast, the compounds **3**, **5**, and **7** did not present activity against promastigote forms of *L. braziliensis* until 100 μM .

Several polyphenols have been reported by the promising antileishmanial effects [31, 32]. Concerning structure-activity relationships, it would appear that methoxylation of sambacaitaric acid on C₃ diminished the efficacy and potency. On other hand, the absence of methoxyl group on the **3** position in rosmarinic acid (**3**) abolished leishmanicidal activity against promastigote form of *L. braziliensis*. Moreover Radtke [33] demonstrated that rosmarinic acid did not show selective toxicity when tested against the promastigote stages of the other *Leishmania* species (*L. major*, *L. donovani*, *L. guyanensis* and *L. killicki*), but exhibited moderate antileishmanial activity against intracellular amastigotes.

Although caffeic acid esters assessed in this study (**5** and **7**) haven't been shown leishmanicidal activity against promastigote of *L. braziliensis* [34] showed that other caffeic acid esters 1-methylbutyl caffeate, 1'-methylhexyl caffeate and 1'-methyloctyl caffeate were active against axenic amastigote forms of *L. amazonensis*, with IC_{50} of 2.0 ± 0.1 , 10.0 ± 0.4 and $1.8 \pm 0.1 \mu\text{M}$, respectively.

Materials and methods

General

Melting points were determined on a Kofler hot stage and are uncorrected. The infrared absorption spectra were recorded in KBr pellets, using a Varian 640 FT-IR spectrophotometer with a PIKE ATR accessory operating in the 4000-400 cm^{-1} range. The LC-ESI-MS was obtained in negative electrospray mode using an Esquire 3000 Plus (Bruker) and HRESIMS was obtained in MicroTOF (Bruker). Silica gel 60 F₂₅₄ (E. Merck) for TLC plates. Sephadex[®] LH-20 (Sigma) was employed for gel permeation chromatography. ¹H and ¹³C NMR spectra were obtained using a Bruker

DRX 500 (500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C) and Bruker DPX300 (300 MHz for ^1H and 75 MHz for ^{13}C) in $\text{DMSO}-d_6$. The CD was recorded with a Jasco J-515 CD spectrometer. The optic rotation was determined in a KRUESS OPTRONIC spectrometer. All solvents used are of commercial HPLC grade.

Plant Material

The leaves of *Hyptis pectinata* were collected in Garanhuns city, State of Pernambuco, Brazil in April to July 2010. Voucher specimen is deposited at Instituto de Pesquisa Agropecuária (IPA), Pernambuco, Brazil.

Extraction and Isolation

The plant material was extracted successively with EtOH to give 7.0 g of dry extract. This extract was dissolved in $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1) and successively fractionated with hexane and AcOEt. The portion of AcOEt fraction (3.5 g) was chromatographed on a Sephadex LH-20 column using methanol as the mobile phase. Compounds **1** (44.2 mg), **2** (54.0 mg), **3** (97.9 mg), **4** (26.0), **5** (24.9 mg), **6** (20.0 mg), **7** (28.3 mg), **8** (22.4 mg), **9** (14.0 mg), **10** (11.0 mg) and **11** (7.4 mg) were then purified by semi-preparative HPLC on a Luna Phenomenex RP-18 column (21 mm x 250 mm x 5 μm) at a flow rate of 16 mL/min using a mobile phase of H_2O (A) and methanol (B): 0-10 min: 40-60 % B, 25 min 80 % B, 28 min, 100 % at 320 nm. The purity of the compounds was examined using analytical HPLC with diode array detection.

Sambacaitaric acid (**1**), $[\alpha]_D = +50$ (c 0.001, MeOH), IR (KBr) ν_{max} : 3435 (OH), 1658 (C=O), 1524, (C=C from aromatic rings). ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz, see Table 1), ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz, see Table 1). HRESIMS (negative mode) m/z 359.0761 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ($\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{O}_8$).

3-O-methyl-sambacaitaric acid (**2**), $[\alpha]_D = +10$ (c 0.001, MeOH), ^1H NMR (300Mz, DMSO): δ 7.35 (1H, d, $J=15.9$ Hz, H-7); 7.01 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-2), 6.91 (1H, dd, $J=8.1;2.1$ Hz, H-6), 6.73 (1H, d, $J=8.1$ Hz, H-5), 6.66 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-2'), 6.58 (1H, d, $J=8.1$ Hz, H-5'), 6.48 (1H, dd, $J=8.1;2.1$ Hz, H-6'), 6.18 (1H, d, $J=15.9$ Hz, H-8), 8.83 (1H, m; H-8'), 3.02 and 2.73 (2H, m, H-7'). ^{13}C NMR (75Mz, DMSO): δ 172.6 (C-9'), 166.7 (C-9), 148.2 (C-4), 146.3 (C-3), 145.3 (C-3'), 144.5 (C-7), 143.89 (C-4'),

130.5 (C-1'), 126.1 (C-1), 121.3 (C-6), 120.1 (C-6'), 116.9 (C-2'), 116.3 (C-5), 115.8 (5'), 115.5 (C-2), 115.3 (C-8), 76.6 (C-8'), 56.9 (OCH₃), 37.8 (C-7').

Rosmarinic acid (**3**), $[\alpha]_D = +10$ (c 0.001, MeOH), UV $\lambda_{\max}$ 242, 324. IR (KBr) $\nu_{\max}$: 3382 (OH), 1697 (C=O), 1606, 1522 (C=C from aromatic rings). LC-ESI-MS (negative mode) m/z 359 $[M-H]^+$ (C₁₈H₁₆O₈).

3-O-methyl-rosmarinic acid (**4**), $[\alpha]_D = +20$ (c 0.001, MeOH), UV $\lambda_{\max}$ 253, 340. IR (KBr) $\nu_{\max}$: 3394 (OH), 1692 (C=O), 1603, 1520 (C=C from aromatic rings). LC-ESI-MS (negative mode) m/z 373 $[M-H]^+$ (C₁₉H₁₈O₈).

Ethyl caffeate (**5**) UV $\lambda_{\max}$ 283, 337. IR (KBr) $\nu_{\max}$: 3397 (OH), 1678 (C=O), 1605, 1520 (C=C from aromatic rings). LC-ESI-MS (negative mode) m/z 207 $[M-H]^+$ (C₁₁H₁₂O₄).

Nepetoidin A (**6**) UV $\lambda_{\max}$ 249, 340. IR (KBr) $\nu_{\max}$: 3418 (OH), 1680 (C=O), 1603, 1520 (C=C from aromatic rings). LC-ESI-MS (negative mode) m/z 313 $[M-H]^+$ (C₁₇H₁₄O₆).

Nepetoidin B (**7**) UV $\lambda_{\max}$ 251, 340. IR (KBr) $\nu_{\max}$: 3382 (OH), 1701 (C=O), 1604, 1516 (C=C from aromatic rings). LC-ESI-MS (negative mode) m/z 313 $[M-H]^+$ (C₁₇H₁₄O₆).

Cirsiliol (**8**) UV $\lambda_{\max}$ 272, 346. IR (KBr) $\nu_{\max}$: 3419 (OH), 1650 (C=O), 1600, (C=C from aromatic rings). LC-ESI-MS (negative mode) m/z 329 $[M-H]^+$ (C₁₇H₁₄O₇).

Circimaritin (**9**) UV $\lambda_{\max}$ 274, 336. IR (KBr) $\nu_{\max}$: 3434 (OH), 1652 (C=O), 1599, (C=C from aromatic rings). LC-ESI-MS (negative mode) m/z 313 $[M-H]^+$ (C₁₇H₁₄O₆).

7-O-methyluteolin (**10**) UV $\lambda_{\max}$ 254, 349. IR (KBr) $\nu_{\max}$: 3397 (OH), 1664 (C=O), 1601, 1507 (C=C from aromatic rings). LC-ESI-MS (negative mode) m/z 299 $[M-H]^+$ (C₁₆H₁₂O₆).

Genkwanin (**11**) UV $\lambda_{\max}$ 267, 338. IR (KBr) $\nu_{\max}$: 3445 (OH), 1670 (C=O), 1608, 1504 (C=C from aromatic rings). LC-ESI-MS (negative mode) m/z 283 $[M-H]^+$ (C₁₆H₁₂O₅).

In vitro activity against *Leishmania braziliensis*

Promastigotes of *L. braziliensis* (MHOM/BR/87/BA125) were obtained from Dra. Valéria de Matos Borges at Gonçalo Moniz Research Center. The parasites were maintained *in vitro* in Schneider's medium, supplemented with 10% FBS and 2% human urine. Stock solutions of EtOH extract, hexane, AcOEt, MeOH:H₂O fractions as well as compounds **1-5** and **7** from *H. pectinata* and pentamidine (reference leishmanicidal drug) were prepared in DMSO immediately before use. The

cytotoxicity of extract, fractions and compounds against promastigotes were determined. Stationary phase *L. braziliensis* promastigotes were plated in 96-well vessels (Nunc) at 1×10^5 cells per well, in Schneider's medium, supplemented with 10% FBS and 2% human urine. Each compound solution was added at increasing concentrations (0.001 – 100 $\mu\text{g/mL}$ to extract and fractions or 0.001 – 100 μM to compounds). Cells were also cultured in a medium free of compounds or vehicle (basal growth control) or with DMSO 0.1% (vehicle control). After 48 h, extracellular load of *L. braziliensis* promastigotes was estimated by counting the promastigotes in Schneider's medium in a CELM automatic cell counter (model CC530) [35].

Conclusion

The chemical study of leaves from *Hyptis pectinata* resulted in the isolation of two new compounds, sambacaitaric acid (**1**) and 3-O-methyl-sambacaitaric acid (**2**), and nine known compounds, rosmarinic acid (**3**), 3-O-methyl-rosmarinic acid (**4**), ethyl caffeate (**5**), nepetoidin A (**6**), nepetoidin B (**7**), cirsiol (**8**), circimaritin (**9**), 7-O-methyluteolin (**10**) and genkwanin (**11**). The EtOH extract, Hexane, AcOEt, MeOH:H₂O fractions and compounds **1**, **2** and **4** exhibited antileishmanial activity, compounds **1** were as potent as pentamidine. In contrast, the compounds **3**, **5**, and **7** did not present activity against promastigote forms of *L. braziliensis* until 100 μM . Part of the activity from the EtOAc fraction can be attributed to the isolated compounds **1**, **2** and **4**.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

TMSS and CAC carried out the chemical analysis-structure elucidation, drafted the Manuscript and engaged in the part of chemical analysis-structure elucidation; TMGS carried out the chemical studies; SAS, PLAN and TMGS employed in the several chemical assays of extraction and isolation; MSAM, ACQ, CBBM and RAF conceived of the study of biological activity. All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors thank CNPq (TMSS and CAC research fellowships), CAPES and FACEPE (PRONEM APQ-1232.1.06/10 grant number) for financial support, CENAPESQ and CETENE analytical centers for the recorded data kindly provided by them. TMSS also thanks PRPPG-UFRPE for kindly fellowship support. The authors also thanks to Dr. Clecio de Souza Ramos for CD analysis.

References

1. Heywood VH (1993): Flowering plants of the world. Oxford;
2. Raymundo LJ, Guilhon CC, Alviano DS, Matheus ME, Antonioli AR, Cavalcanti SC, Alves PB, Alviano CS, Fernandes PD (2011): Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. J Ethnopharmacol, 134:725-732.
3. Harley RF, França F, Santos JS: Lamiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. [<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB008183>]
4. Almeida CFA, Albuquerque UP (2002): Check-list of the family Lamiaceae in Pernambuco, Brazil. Braz Arch Biol and Techn, 45:343-353.
5. Basilio IJLD, Agra MF, Rocha EA, Leal CKA, Abrantes HF (2006): Estudo farmacobotânico comparativo das folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit e *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae). Acta Farm Bonaerense, 25:518-525.
6. Pereda-Miranda R, Hernandez L, Villavicencio MJ, Novelo M, Ibarra P, Chai H, Pezzuto JM (1993): Structure and stereochemistry of pectinolides A-C, novel antimicrobial and cytotoxic 5,6-dihydro-alpha-pyrone from *Hyptis pectinata*. J Nat Prod, 56:583-593.
7. Nascimento PF, Alviano WS, Nascimento AL, Santos PO, Arrigoni-Blank MF, de Jesus RA, Azevedo VG, Alviano DS, Bolognese AM, Trindade RC (2008): *Hyptis pectinata* essential oil: chemical composition and anti-Streptococcus mutans activity. Oral Dis, 14:485-489.
8. Malan K, Pelissier Y, Marion C, Blaise A, Bessiere JM (1988): The essential oil of *Hyptis pectinata*. Planta Med, 54:531-532.
9. Lisboa AC, Mello IC, Nunes RS, Dos Santos MA, Antonioli AR, Marcal RM, Cavalcanti SC (2006): Antinociceptive effect of *Hyptis pectinata* leaves extracts. Fitoterapia, 77:439-442.
10. Rojas A, Hernandez L, Pereda-Miranda R, Mata R (1992): Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. J Ethnopharmacol, 35:275-283.
11. Melo GB, Silva RL, Melo VA, Antonioli AR, Michellone PR, Zucoloto S, Souza ME, Gomes MC, Correia RB, Silva OC (2006): Proliferative effect of the

- aqueous extract of *Hyptis pectinata* on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Acta Cir Bras*, 1:33-36.
12. Bispo MD, Mourao RH, Franzotti EM, Bomfim KB, Arrigoni-Blank MF, Moreno MP, Marchioro M, Antonioli AR (2001): Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. *J Ethnopharmacol*, 76:81-86.
 13. Arrigoni-Blank MF, Silva-Mann R, Campos DA, Silva PA; Antonioli A R, Caetano LC, Sant'Ana AEG, Brank AF (2005): Morfological, agronomical and pharmacological characterization of *Hyptis pectinata* (L.) Poit germplasm. *Braz J Pharmacog*, 15:298-303.
 14. Iwu MM, Jackson JE, Schuster BG (1994): Medicinal plants in the fight against Leishmaniasis. *Parasitol Today*, 10:65-68.
 15. Amato VS, Tuon FF, Bacha HA, Neto VA, Nicodemo AC (2008): Mucosal leishmaniasis . Current scenario and prospects for treatment. *Acta Trop*, 105:1-9.
 16. Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Leal CA, Pires MQ, Oliveira FS, Conceicao-Silva F, Rosalino CM, Salgueiro MM, Pacheco RS (2009): *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. *Exp Parasitol*, 121:317-322.
 17. Rodrigues EH, Felinto de Brito ME, Mendonca MG, Werkhauser RP, Coutinho EM, Souza WV, Militao de Albuquerque MF, Jardim ML, Abath FG (2002): Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. *J Clin Microbiol*, 40:3572-3576.
 18. Silva ACTC, Cupolillo E, Volpini AC, Almeida R, Romero GAS (2006): Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Trop Med Int Health*, 11:1388-1398.
 19. Mishra JS, Saxene A, Singh S (2007): Chemoterapy of Leishmaniasis: Past, Present and Future. *Curr Med Chem*, 14:1153 - 1169.
 20. Garcia M, Monzote L, Montalvo AM, Scull R (2010): Screening of medicinal plants against *Leishmania amazonensis*. *Pharmaceutical Biology*, 48:1053-1058.

21. Baba S, Osakabe N, Natsume M, Terao J (2004): Orally administered rosmarinic acid is present as the conjugated and/or methylated forms in plasma, and is degraded and metabolized to conjugated forms of caffeic acid, ferulic acid and m-coumaric acid. *Life Sci*, 75:165-178.
22. Xiang MS, Su H, Hu J, Yan Y (2011): Isolation, identification and determination of methyl caffeate, ethyl caffeate and other phenolic compounds from *Polygonum amplexicaule* var. *sinense*. *J Med Plants Res*, 5:1685-1691.
23. Nakanishi T, Nishi M, Inada A, Obata H, Tanabe N, Abe S, Wakashiro M (1990): Two new potent inhibitors of xanthine oxidase from leaves of *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo. *Chem Pharm Bull*, 38:1772-1774.
24. Abdelshafeek KA, Abdelrahem F, Elwahsh MA, Abdelkhalek IA (2009): Investigation of the flavonoidal constituents and insecticidal activity of *Teucrium zanonii*. *Pharmacol Res*, 1:410-416.
25. Masterova I, Uhrin D, Kettmann V, Suchy V (1989): Phytochemical study of *Salvia officinalis* L. *Chem. Papers*, 43:797-803.
26. Noro T, Oda Y, Miyase T, Ueno A, Fukushima S (1983): Inhibitors of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*. *Chem Pharma Bull*, 31:3984-3987.
27. Silva TMS, Carvalho MG, Braz-Filho R (2009): Spectroscopy study on structural elucidation of flavonoids from *Solanum jabrense* Agra & Nee and *S. paludosum* Moric. *Quim. Nova*, 32:1119-1128.
28. Grayer RJ, Eckert MR, Veitch NC, Kite GC, Marin PD, Kokubun T, Simmonds MS, Paton AJ (2003): The chemotaxonomic significance of two bioactive caffeic acid esters, nepetoidins A and B, in the Lamiaceae. *Phytochemistry*, 64:519-528.
29. Tomas-Barberan FA, Wollenweber E (1990): Flavonoid aglycones from the leaf surfaces of some Labiatae species. *Syst Evol*, 173:109-118.
30. Isobe T, Doe M, Morimoto Y, Nagata K, Ohsaki A (2006): The anti-*Helicobacter pylori* flavones in a Brazilian plant, *Hyptis fasciculata*, and the activity of methoxyflavones. *Biol Pharm Bull*, 29:1039-1041.
31. Hay AE, Merza J, Landreau A, Litaudon M, Pagniez F, Le Pape P, Richomme P (2008): Antileishmanial polyphenols from *Garcinia vieillardii*. *Fitoterapia*, 79:42-46.

32. Abdel-Hady NM, Dawoud GT, El-Hela AA, Morsy TA (2011): Interrelation of antioxidant, anticancer and antileishmania effects of some selected Egyptian plants and their phenolic constituents. *J Egypt Soc Parasitol*, 41:785-800.
33. Radtke OA, Foo LY, Lu Y, Kiderlen AF, Kolodziej H (2003): Evaluation of sage phenolics for their antileishmanial activity and modulatory effects on interleukin-6, interferon and tumour necrosis factor- α -release in RAW 264.7 cells. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, J Biosc*, 58:395-400.
34. Cabanillas BJ, Le Lamer AC, Castillo D, Arevalo J, Rojas R, Odone G, Bourdy G, Moukarzel B, Sauvain M, Fabre N (2010): Caffeic acid esters and lignans from. *J Nat Prod*, 73:1884-1890.
35. Rangel H, Dagger F, Hernandez A, Liendo A, Urbina JA (1996): Naturally azole-resistant *Leishmania braziliensis* promastigotes are rendered susceptible in the presence of terbinafine: comparative study with azole-susceptible *Leishmania mexicana* promastigotes. *Antimicrob Agents and Chemother*, 40:2785-2791.

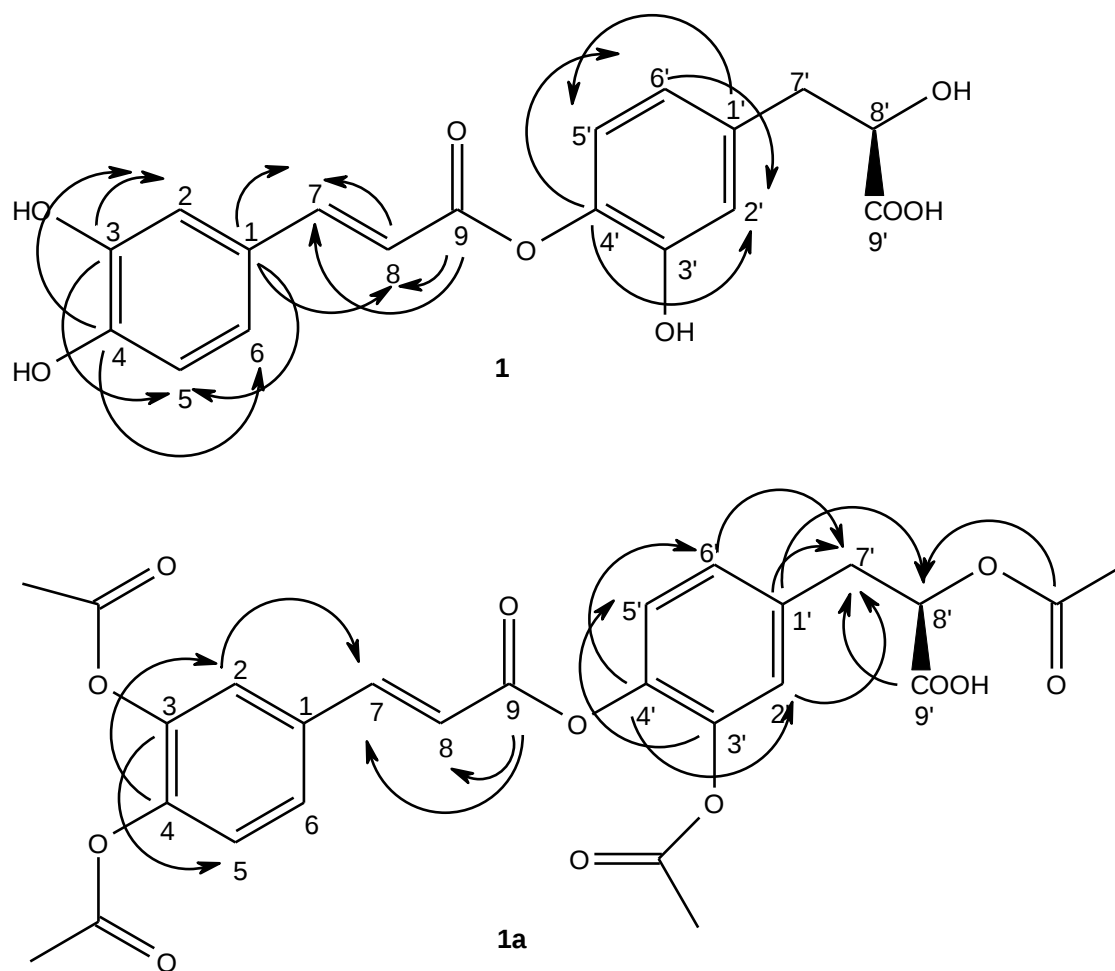


Figure 1. Key HMBC correlations of compound **1** and **1a**.

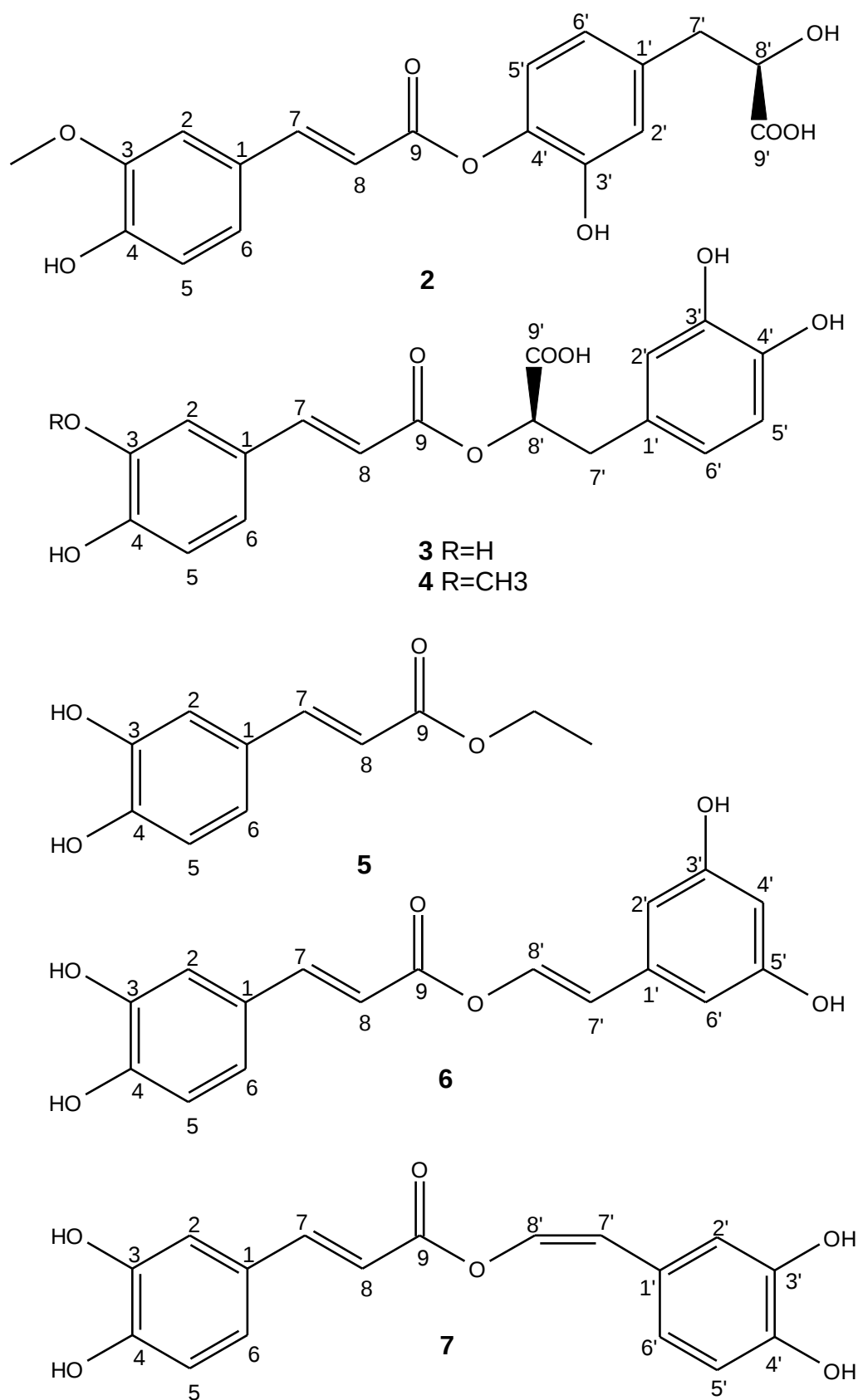
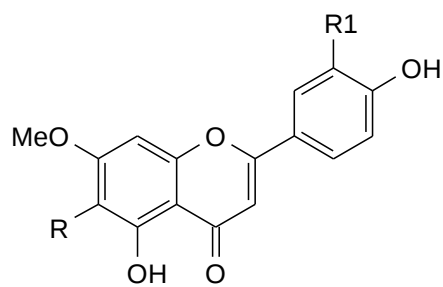


Figure 2. Chemical structures of compounds (**2-7**) isolated from *H. pectinata*.



8 R=OCH₃, R₁=OH

9 R=OCH₃, R₁=H

10 R=H, R₁=OH

11 R=R₁=H

Figure 3. Chemical structures of compounds (**8-11**) isolated from *H. pectinata*.

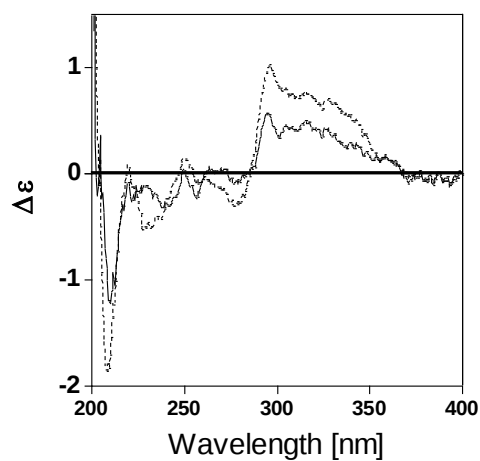


Figure 4. CD spectra of **1** (dotted line) and **3** (solid line)

Table 1. ^1H (300 MHz) and ^{13}C NMR (75 MHz) spectroscopic data for **1** and **1a** (DMSO- d_6 , δ in ppm).

Position	1				1a			
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
9'	172.1				172.5		H-8'	H-7'
9	166.2		H-8	H-7	166.3		H-8	H-7
4	148.4		H-5	H-2, H-6	149.4			H-2
3	145.81		H-2	H-5	138.53		H-2	H-5
4'	144.9		H-5'	H- 2',H- 6'	141.8			H- 2',H-6'
3'	143.5				141.0		H-2'	H-5'
1'	129.9			H-5'	134.8		H-7'	H-8'
1	125.6		H-7	H-5, H-8	127.4		H-2, H- 6, H-7	H-5, H-8
7	144.34	7.34(d, 16.0)	H-6	H-2, H-8	145.3	7.56 (d, 16.0)		
6	120.8	6.92 (dd, 8.5; 2.0)		H-2, H-7	126.6	7.24 (sl)		
6'	119.7	6.48 (dd, 8.0; 2.0)			127.6	7.14 (sl)		H-7'
2'	116.6	6.66 (d, 2.0)		H-6'	124.2	7.16 (s)		H-2', H-7'
5	115.9	6.74 (dd, 8.5; 2.0)			117.9	6.32 (d, 8.0)		
5'	115.4	6.59 (dd, 8.5; 2.0)			117.1	7.11 (m)		
2	114.9	7.03 (d, 2.0)			123.38	7.11 (m)		H-7
8	114.9	6.18 (d, 16.0)	H-7		115.3	6.29 (d, 16.0)		
8'	75.9	4.85 (m)			72.3	(5.4 m)	H-8'	
7'	37.2	3.01 (m), 2.74 (m)			36.6	3.24 (m)		
$\text{O}\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$					168.3- 169.1			
$\text{OCO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$					20.7- 20.9	2.26- 2.34 (s)		

Tabela 2. Effect of extract, fractions and compounds isolated from *H. pectinata* against promastigotes of *L. braziliensis*

Treatment	IC ₅₀ ^a (Concentration ± S.E.M.)	Maximum effect (% ± S.E.M.)
Pentamidine	0.9 ± 0.03 µM/0.3 ± 0.01 µg/mL	93.5 ± 0.7**
EtOH extract	0.7 ± 0.1 µg/mL	91.6 ± 2.5**
MeOH:H ₂ O fraction	3.9 ± 1.5 µg/mL	61.5 ± 1.2**
AcOEt fraction	0.4 ± 0.1 µg/mL	81.5 ± 5.9**
Hexane fraction	0.2 ± 0.1 µg/mL	90.0 ± 3.6**
1	6.9 ± 0.7 µM/2.5 ± 0.04 µg/mL	56.0 ± 0.8**
2	>100 µM/>36.0 µg/mL	48.8 ± 1.7**
3	>100 µM/>36.0 µg/mL	NA
4	5.4 ± 0.8 µM/2.0 ± 0.3 µg/mL	69.1 ± 2.7**
5	>100 µM/>20.8 µg/mL	NA
7	>100 µM/>31.4 µg/mL	NA

Data are reported as means ± S.E.M. Differences with a **p* value <0.05 were considered significant in relation of DMSO 0.1% group.

^aIC₅₀ is the concentration required to give 50% of mortality, calculated by linear regression analysis from the Kc values at concentrations employed.

NA: when the compound isn't active.

Evaluation of the orofacial antinociceptive profile of the ethyl acetate fraction and the major constituent rosmarinic acid from the leaves of *Hyptis pectinata* on rodents

Rosângela Estevão Alves Falcão^a, Silvana Alves de Souza^a, Celso Amorim Camara^a, Leonardo Rigoldi Bonjardim^c, Maria Tereza dos Santos Correia, Jullyana de Souza Siqueira Quintans^c, Lucindo José Quintans-Júnior^c, Tania Maria Sarmento Silva^{a,*}

^aLaboratório de Bioprospecção Fitoquímica, Departamento de Ciências Moleculares, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP 52171-900, Pernambuco, Brazil.

^bLaboratório de Farmacologia e Imunidade, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970, Alagoas, Brazil.

^cDepartamento de Fisiologia. Universidade Federal de Sergipe, Campus Universitário “Prof. Aloísio de Campos”, CEP: 49100-000, São Cristóvão, SE, Brazil.

*Corresponding author: taniasarmento@dcm.ufrpe.br

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Hyptis pectinata* (L.) Poit, popularly known in Brazil as “sambacaitá” is a widespread, aromatic shrub largely grown in the northeastern parts of Brazil and it is particularly used in folk medicine for various conditions, such as certain painful conditions and orofacial pain.

Objective: The present study investigated the antinociceptive effects of ethyl acetate (EtOAc) fraction obtained from the leaves of the *H. pectinata* in formalin (2%)-, glutamate (25 μ M)- and capsaicin (2.5 μ g)- induced orofacial nociception on mice.

Material and methods: Male mice (n=8/per group) were pretreated with EtOAc (100, 200, or 400 mg/kg, p.o.) or RA (10 or 20 mg/kg, p.o.), morphine (5 mg/kg, i.p.), or vehicle (distillated water + Tween 80 0.2%), before injection of an algogen agent into the right upper lip (perinasal area).

Results: The EtOAc reduced the nociceptive face-rubbing behavior in both phases on formalin test, but RA decrease pain behavior in inflammatory phase. EtOAc-treated mice produced significantly antinociceptive effect in the capsaicin and glutamate tests.

Conclusions: The present study showed that oral administration of EtOAc produced potent and long-lasting antinociceptive effect related with rosmarinic acid presence.

Keywords: *Hyptis pectinata*, rosmarinic acid, orofacial pain, nociception.

1. Introduction

Pain in the oral and craniofacial system represents a major medical and social problem (Hargreaves, 2011). Indeed, a U.S. Surgeon General's report on orofacial health concludes that, "...oral health means much more than healthy teeth. It means being free of chronic oral-facial pain conditions..." (U.S.-DHHS, 2000). Moreover, orofacial pain is derived from many unique target tissues, such as the meninges, cornea, tooth pulp, oral/ nasal mucosa, and temporo mandibular joint, and thus has several unique physiologic characteristics compared with the spinal nociceptive system (Bereiter et al., 2008; Hargreaves, 2011). Thus, the management or treatment of orofacial pain conditions represents a significant health care problem and a challenge for the pharmaceutical industry.

Although in last decades, important progress has been made regarding the development of natural therapies. There is an urgent need to discover effective and potent analgesic agents (Calixto et al., 2000). An actual approach is to develop a new biological compound that manages orofacial pain from natural products, such as medicinal plants or its secondary metabolites, with enhanced efficacy and minimal side-effects (Quintans-Júnior et al., 2010; Bonjardim et al., 2011; Venâncio et al., 2011; Guimarães et al., 2012).

Hyptis pectinata L. Poit (Lamiaceae) is a medicinal plant known as "Sambacaitá" or "Canudinho" in the Northeast of Brazil widely used to treat gastrointestinal disorders, skin infections, nasal congestion, fever, cramps, inflammation and pain (Bispo et al., 2001; Raymundo et al., 2011). Some studies demonstrated that *H. pectinata* possess antinociceptive and anti-inflammatory activities (Bispo et al., 2001; Lisboa et al., 2006; Raymundo et al., 2011). Nascimento et al. (2008) described that *H. pectinata* leaves are used as treatment for several

types of oral diseases, such as dental caries and orofacial pain. This pharmacological profile was corroborated by Paixão et al. (2013) that demonstrate an important neurogenic and inflammatory orofacial antinociceptive profile of the crude aqueous extract obtained from *H. pectinata* leaves. Interestingly, despite the widespread use by practitioners of folk medicine in the Northeast of Brazil, there are few studies about pharmacological and chemical properties of *H. pectinata* (Falcão et al., 2013) and their possible effect on different painful conditions basically is unexplored.

So, present study proposed to verify the antinociceptive property of the ethyl acetate leaves fraction of *H. pectinata* (EtOAc) and the rosmarinic acid (RA), the major compound isolated, using orofacial nociception induced by -formalin, -capsaicin and -glutamate on mice. Besides the rosmarinic acid others phenylpropanoids and flavonoids were isolated from EtOAc fraction of *H. pectinata* (Falcão et al., 2013).

2. Materials and Methods

2.1 Plant material

The plant material was obtained and extracted according Falcão et al. (2013). Briefly the leaves dried and crushed were successively extracted with EtOH to obtain 7.0 g of dry extract. This extract was dissolved in MeOH:H₂O (1:1) and successively fractionated with hexane and AcOEt. A portion of the AcOEt fraction (3.5 g) was subjected to chromatography on a Sephadex LH-20 and the compounds were purified by semi-preparative HPLC column. This fraction were isolated the compounds sambacaitaric acid, 3-O-methyl-sambacaitaric acid, rosmarinic acid, 3-O-

methyl-rosmarinic acid, Ethyl caffeoate, Nepetoidin A, Nepetoidin B, cirsiol, circimaritin, 7-O-methyluteolin and genkwanin (Falcão et al., 2013). Rosmarinic acid was the major compound showed in the AcOEt fraction as shown in the chromatogram (Fig. 1) obtained by HPLC-DAD.

2.2 Animals and drug treatment protocol

Male Swiss mice (28-34g), 2-3 months of age, were used throughout this study. The animals were randomly housed in appropriate cages at $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ on a 12h light/dark cycle (lights on 06:00-18:00 h) with free access to food and water. All experiments were carried out between 09:00 am and 14:00 pm in a quiet room. All nociception tests were carried out by the same visual observer and behavioral tests were performed under blind conditions. Experimental protocols were approved by the Animal Care and Use Committee at the Federal University of Sergipe (CEPA/UFS # 10/11). Morphine hydrochloride (União Química, Brazil), 37% formaldehyde (Vetec, Brazil), diazepam (Roche, Brazil), Tween 80 (polyoxyethylene-sorbitan monolate), glutamate, capsaicin and rosmarinic acid (RA) (Sigma, USA). In those protocols the extract or agents were injected orally route (p.o., *per os*) or intraperitoneally (i.p.) at a dose volume of 0.1 ml/10 g, with exception of algogen agents, such as formalin, glutamate and capsaicin, which were injected subcutaneously (s.c.) into the right upper lip

2.3 Nociception studies

2.3.1 Formalin test

Orofacial nociception was induced in mice by s.c. injection of 20 μ l of 2% formalin into the right upper lip (perinasal area), using a 27-gauge needle (Pellisier et al., 2002; Luccarini et al., 2006), with changes (Quintans-Júnior et al., 2010). This volume and percentage concentration of formalin was selected from our pilot studies that showed a nociception-related biphasic behavioral response (face-rubbing) of intensity at periods of 0-5 min (first phase) and 15-40 min (second phase) (Quintans-Júnior et al., 2010). Nociceptive behavior was quantified at those periods by measuring the time (s) that the mice spent face-rubbing in the injected area with its fore- or hindpaws (Luccarini et al., 2006). To assess the effects of test drugs, groups of mice (n=8, per group) were pretreated systemically with vehicle (distilled water + 2 drops of tween 80), EtOAc (100, 200 or 400 mg/kg, p.o.), and RA (10 or 20 mg/kg, p.o.) 1 h before the local injection of formalin. Morphine (MOR, 5 mg/kg, i.p.), administered 1 h before the algogen, was included as positive control.

2.3.2 Capsaicin and glutamate tests

The orofacial nociception was induced by capsaicin or glutamate in rodents as described earlier (Quintans-Júnior et al., 2010). Mice (n=8, per group) were injected with capsaicin (20 μ l, 2.5 μ g) or glutamate (25 μ M/paw prepared in phosphate buffered saline) subcutaneously into the right upper lip (perinasal area), using a 27-gauge needle. Capsaicin was dissolved in ethanol, dimethyl sulfoxide and distilled water (1:1:8). An additional group received a similar volume of capsaicin vehicle (data not shown). Therefore, nociception quantification was performed at this period

measuring the time (s) that the animals spent face-rubbing the injected area with fore- or hindpaws. EtOAc (100, 200 or 400 mg/kg) or vehicle (distilled water + 2 drops of tween 80) were given (by gavage route) to animals as described for formalin test, 1 h before the local injection of capsaicin or glutamate. MOR (5 mg/kg, i.p., reference drug), administered 1 h before the algogen, was included as a positive control.

2.4 Evaluation of the motor activity

In order to evaluate a possible non-specific muscle-relaxant or sedative effect of the extract, mice were submitted to the rota-rod apparatus, according described by Quintans-Júnior et al. (2010). Initially, the mice able to remain on the Rota-rod apparatus (AVS[®], Brazil) longer than 180 s (9 rpm) were selected 24 h before the test. Mice were treated with EtOAc (100, 200 or 400 mg/kg, p.o.), vehicle or diazepam (3 mg/kg, i.p.) 1, 2 and 4 h beforehand, each animal was tested on the Rota-rod apparatus and the time (s) remained on the bar for up to 180 s.

2.5 Statistical analysis

Data obtained from animal experiments were expressed as mean and standard error of the mean (mean $\pm$ S.E.M.). Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA followed by Tukey test. Differences were considered to be statistically significant when $p < .05$. All statistical analyses were done using Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Prism Software Inc., San Diego, CA, USA).

3. Results

The chemical study with the EtOAc fraction from *H. pectinata* showed the presence of eleven compounds that were isolated and identified according Falcão et

al., 2013. The chromatogram (HPLC-DAD) is on Figure 1. As seen in the chromatogram the rosmarinic acid (**3**) is the main component of this fraction.

Acute treatment with EtOAc (100, 200 or 400 mg/kg, p.o.) produced a significant reduction ($p < 0.05$ or $p < 0.001$) of face rubbing behavior (Fig. 2 A and B). All tested doses of EtOAc produced antinociception in both the first and second phase, of formalin test when compared to control (vehicle). Another way, rosmarinic acid was effective in reducing significantly inflammatory pain. As expected, morphine was able to reduce nociceptive behavior in both phases.

INSERT FIGURE 2

As showed in Fig. 3A, pretreatment with EtOAc (100, 200 or 400 mg/kg, p.o.) significantly ($p < 0.001$) reduced the face rubbing behavior induced by the administration of capsaicin. Morphine produced a higher antinociceptive effect ($p < 0.001$). As expected, the group that received only the diluents of capsaicin (capsaicin vehicle group) did not present any nociceptive behavior (data not shown). Additionally, extract produced a significantly antinociceptive effect ($p < 0.05$ or $p < 0.001$) reducing face rubbing behavior when compared with the control animals (vehicle) (Fig. 3B).

INSERT FIGURE 3

At the rota-rod test, EtOAc-treated mice did not demonstrate any significant motor performance changes (Figure 4).

INSERT FIGURE 4

4. Discussion

In folk medicine used in Northeastern Brazil the *Hyptis pectinata* (“sambacaita”) is ample used for the treatment of several orofacial pathological disorders, including orofacial pain. However, there are no pharmacological studies reporting this effect. In regards to this, for the first time, we demonstrate that oral administration of EtOAc fraction exerts protective effects against formalin-, capsaicin-, and glutamate-induced orofacial in mice maybe related with rosmarinic acid presence.

According to Luccarini et al. (2006) the orofacial formalin test is a most important method for to evaluate news the results of antinociceptive drugs to treatment of orofacial pain, and to elucidate its action mechanism. During the formalin test, two phases can at least partially distinct mechanisms of nociception. The first phase is associated with direct stimulation of C-nociceptors, whereas the second phase reflects integration between peripheral (nociceptors) and central (spinal/ brainstem) signaling (Dallel et al., 1995; Capuano et al., 2009). Furthermore, it has been reported that the development of hyperalgesia due to injection of formalin involves glutamatergic system, such as *N*-methyl-*D*-aspartate (NMDA) receptors (Luccarini et al., 2006). So, acute pretreatment with EtOAc, all doses, were able to reducing nociceptive behavior in both of the formalin test.

Interestingly, Bispo et al (2001) demonstrated that pretreatment with the aqueous extract of *H. pectinata* at the doses of 200 and 400 mg/kg had no significant effect during the first phase of the formalin test. However, Paixao et al (2013) showed a marked antinociceptive profile of the aqueous extract of *H. pectinata* in both phases of orofacial formalin test and assigned this profile due a possible antioxidant effect of the extract. These discrepant results between findings of Bispo et al (2001) and

Paixao et al (2013) may have relation with a greater sensitivity of the orofacial region well as the involvement of the trigeminal pathway (Sessle, 2011).

When we proceed to chemical study, we demonstrated that four of the eleven isolated compounds are derived from rosmarinic acid, and the compounds **1** and **2** were identified as new natural compounds (Falcão et al., 2013). It is known in the literature that the rosmarinic acid and analogues possess anti-inflammatory activity (Kim et al., 2011) and was also observed that not only rosmarinic acid but also some of its analogues from specie *Glechoma hederacea* var. *longituba* could be useful resources for the prevention and treatment of diseases related to inflammation (Kim et al., 2011). Sabongi et al. (2003) observed that rosmarinic acid inhibited pathophysiological changes such as neutrophilic inflammation and edema in lung of mice treated with rosmarinic acid. Many authors reported that caffeic acid, which is considered as a breakdown product of sambacaitaric acid (**1**), rosmarinic acid (**3**), ethyl caffeoate (**5**), nepetoidin A (**6**) and nepetoidin B (**7**) as an anti-inflammatory effect (Sabongi et al., 2003; Michaluart et al., 1999). Further study is required to establish relationship between chemical structure of the compounds and the anti-inflammatory activity.

To evaluate our hypothesis of rosmarinic acid be one of the main active compounds of EtOAc, we performed the orofacial formalin test in mice with two pretreated doses (10 or 20 mg/kg, p.o.) of rosmarinic acid. As demonstrated in Fig 2 A and B, pretreatment with rosmarinic acid prevent only the second phase of formalin test, which has a greater relationship with inflammatory pain (Luccarini et al., 2006).

As showed in Fig. 3A, acute pretreatment with EtOAc, all doses, produced a significantly reduction of nociceptive behavior induced by administration of capsaicin. The antinociceptive effect showed by EtOAc on the capsaicin-induced

orofacial nociceptive behavior may be a result of its possible inhibition of substance P release or due to a direct blocking action of its receptor neurokinin-1 (NK-1) (Quintans-Júnior et al., 2010). Additionally, capsaicin-sensitive transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) plays an important role in pain transduction and is one of the Ca^{2+} influx channels involved in cell migration (Waning et al., 2007).

When injected in the right upper lip (perinasal area), glutamate elicited a noxious stimulus characterized by a behavior response (licking or rubbing of the orofacial region) (Quintans-Júnior et al., 2010; Siqueira et al., 2010). Glutamate is present in both central and peripheral terminals of trigeminal and dorsal root ganglion neurons. Noxious stimulation of primary afferent fibers results in the release of glutamate from the peripheral as well as central terminals of trigeminal and spinal afferent fibers (Keast and Stephensen, 2000; Lam et al., 2005). In this regard, apparently the NMDA receptors in primary afferents terminal induces substance P release and subsequent activation of its receptors, the neurokinin 1 receptors (NK1R) (Liu et al., 1997). Our results demonstrated that acute treatment with EtOAc elicited a dose-dependent protection ($p < 0.05$ or $p < 0.001$), when compared with the control group (vehicle; Fig. 3B). Thus, the suppression of glutamate-induced nociception by EtOAc treatment can be associated to its interaction with the glutamatergic system. These results are similar to those found by Guginko et al (2009) which demonstrate that rosmarinic acid can blocked pain induced by glutamate.

Drugs that act in central nervous system (CNS), such as diazepam or morphine, can impair motor coordination and invalidate the overall result obtained in orofacial nociceptive behavioral test (Quintans-Júnior et al., 2010). So, we evaluated if pre-treatment with EtOAc can impair motor coordination of mice in rota-rod

apparatus, however, in tested doses EtOAc was ineffective in produces motor changes.

Taken altogether, our data lead to the hypothesis that EtOAc produced a protective role in orofacial nociception in mice. Theses effects may be related with presence of rosmarinic acid and other compounds that may act centrally. These finds also supports that *H. pectinata* has a therapeutic potential for painful facial, and may be dental disorders. Nevertheless, further studies need to be performed to determine the precise mechanism of action.

Acknowledgements

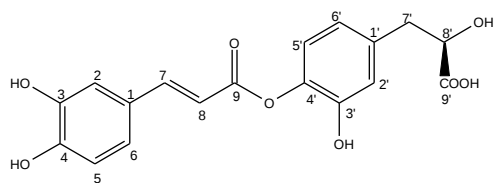
We would like to thanks to the National Council of Technological and Scientific Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq/Brazil - Grant number 555076/2010-5) and FACEPE (PRONEM APQ-1232.1.06/10 grant number) for financial support for their financial support.

References

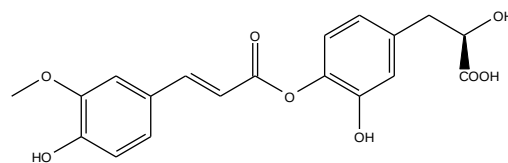
- Bereite, D.A., Hargreaves, K.M., Hu, J.W., 2008. Trigeminal mechanisms of nociception: peripheral and brainstem organization, In: Basbaum, A.I., Kaneko, A., Shepherd, G.M., Westheimer, G., Albright, T., Masland, R.H., Dallos, P., Oertel, D., Firestein, S.J., Beauchamp, G.K., Bushnell, M.C., Kaas, J.H., Gardner, E.P. (Eds.). *The senses: a comprehensive reference*. Academic Press., San Diego, pp. 435-460.
- Bispo, M.D., Mourão, R.H., Franzotti, E.M., Bomfim, K.B., Arrigoni-blank, M.F., Moreno, M.P., Marchioro, M., Antonioli, A.R., 2001. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology* 76, 81-86.
- Bonjardim, L.R., Silva, A.M., Oliveira, M.G.B., Guimarães, A.G., Antonioli, A.R., Santana, M.F., Serafini, M.R., Santos, R.C., Araújo, A.A.S., Estevam, C.S., Santos, M.R.V., Lyra, A., Carvalho, R., Quintans-Júnior, L.J., Azevedo, E.G., Botelho, M.A., 2011. *Sida cordifolia* leaf extract reduces the orofacial nociceptive response in mice. *Phytotherapy Research* 25, 1236–1241.
- Calixto, J.B., Beirith, A., Ferreira, J., Santos, A.R., Cechinel-Filho, V., Yunes, R.A., 2000. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytotherapy Research* 14, 401-418.
- Capuano, A., Corato, A., Treglia, M., Tringali, G., Russo, C.D., Navarra, P., 2009. Antinociceptive activity of buprenorphine and lumiracoxib in the rat orofacial formalin test: a combination analysis study. *European Journal Pharmacology* 605, 57-62.
- Collier, H.O.J., Dinneen, L.C., Johnson, C.A., Schneider, C., 1968. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in mice. *British Journal of Pharmacology* 32, 285–310.
- Dallel, R., Raboisson, P., Clavelou, P., Saade, M., Woda, A., 1995. Evidence for a peripheral origin of the tonic nociceptive response to subcutaneous formalin. *Pain* 61, 11-16.
- Falcao, R.A., Nascimento, P.L.A., Souza, A.S., Silva, T.M.G., Queiroz, A.C., Matta, C.B.B., Moreira, M.A.S., Camara, C.A., 2013. Antileishmanial phenylpropanoids from the leaves of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. *Chemistry Central Journal*, *in press*.
- Franco, C.R., Antonioli, A.R., Guimarães, A.G., Andrade, D.M., Jesus, H.C., Alves, P.B., Bannet, L.E., Patrus, A.H., Azevedo, E.G., Queiroz, D.B., Quintans-Júnior, L.J., Botelho, M.A., 2011. Bioassay-guided evaluation of antinociceptive properties and chemical variability of the essential oil of *Hyptis fruticosa*, *Phytotherapy Research* 25, 1693–1699.
- Granados-Soto, V., Alonso-Lopez, R., Asomoza-Espinosa, R., Rufino, M.O., Gomes-Lopes, L.D., Ferreira, S.H., 2001. Participation of COX, IL-1 β and TNF- α in formalin-induced inflammatory pain. *Western Pharmacology Society* 44, 15–17.
- Guimarães, A.G., Quintans, J.S.S., Quintans-Júnior, L.J., 2012. Monoterpenes with analgesic activity - a systematic review. *Phytotherapy Research* 12, 1-7.
- Guginski, G., Luiz, A.P., Silva, M.D., Massaro, M., Martins, D.F., Chaves, J., Mattos, R.W., Silveira, D., Ferreira, V.M., Calixto, J.B., Santos, A.R., 2009. Mechanisms involved in the antinociception caused by ethanolic extract obtained from the leaves of *Melissa officinalis* (lemon balm) in mice. *Pharmacology Biochemistry Behavior* 93, 10-6.
- Hargreaves, K.M., 2011. Orofacial pain. *Pain* 152, S25–S32,

- Hunskar, S., Hole, K., 1987. The formalin test in mice: Dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30, 103–114.
- Julius, D., Basbaum, A.I., 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203–210.
- Keast J.R., Stephensen T.M., 2000. Glutamate and aspartate immunoreactivity in dorsal root ganglion cells supplying visceral and somatic targets and evidence for peripheral axonal transport. *Journal Comparative Neurology* 424, 577–587.
- Lam, D.K., Sessle, B.J., Cairns B.E., Hu, J.W., 2005. Neural mechanisms of temporomandibular joint and masticatory muscle pain: a possible role for peripheral glutamate receptor mechanisms. *Pain Research & Management* 10, 145–152.
- Lisboa, A.C.C.D., Mello, I.C.M., Nunes, R.S., dos Santos, M.A., Antonioli, A. R., Marçal, R.M., Cavalcanti, S. C. H., 2006. Antinociceptive effect of *Hyptis pectinata* leaves extracts. *Fitoterapia* 77, 439–442.
- Liu, H., Mantyh, P.W., Basbaum, A.I., 1997. NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. *Nature* 386, 721–724.
- Luccarini, P., Childeric, A., Gaydier, A.M., Voisin, D., Dallel, R., 2006. The orofacial formalin test in the mouse: a behavioral model for studying physiology and modulation of trigeminal nociception. *Pain* 7, 908–914.
- Michaluart, P., Masferrer, J.L., Carothers, A.M., Subbarama, K., Zweifel, B.S., Koboldt, C., Mestre, J.R., Grunberger, D., Sacks, P.G., Tanabe, T., Dannenberg, A.J., 1999. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in rat model of inflammation. *Cancer Research* 59, 2347–2352.
- Nascimento, P.F., Alviano, W.S., Nascimento, A.L., Santos, P.O., Arrigoni-Blank, M.F., de-Jesus, R.A., Azevedo, V.G., Alviano, D.S., Bolognese, A.M., Trindade, R.C., 2008. *Hyptis pectinata* essential oil: chemical composition and anti-Streptococcus mutans activity. *Oral Diseases* 14, 485–489.
- Quintans-Júnior, L.J., Melo, M.S., De Sousa, D.P., Araujo, A.A.S., Onofre, A.S.C., Gelain, D.P., Gonçalves, J.C.R., Araújo, D.A.M., Almeida, J.R.G.S., Bonjardim, L.R., 2010. Antinociceptive activity of *citronellal* in formalin-, capsaicin- and glutamate-induced orofacial nociception in rodents and its action on nerve excitability. *Journal Orofacial Pain* 24, 305–312.
- Paixão, M.S., Melo, M.S., Oliveira, M.G., Santana, M.T., Lima, A.C., Damascena, N.P., Dias, A.S., Araujo, B.S., Estevam, C.S., Botelho, M.A., Quintans-Júnior, L.J., 2013. *Hyptis pectinata*: Redox Protection and Orofacial Antinociception. *Phytotherapy Research*, DOI: 10.1002/ptr.4869.
- Pellisier, T., Pajot, J., Dallel, R., 2002. The orofacial capsaicin test in rats: effects of different capsaicin concentrations and morphine. *Pain* 96, 81–87.
- Raymundo, L.J.R.P., Guilhon, C.C., Alviano, D.S., Matheus, M.E., Antonioli, A.R., Cavalcanti, S.C.H., Alves, P.B., Alviano, C.S., Fernandes, P.D., 2011. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. *Journal of Ethnopharmacology* 134, 725–732.
- Ribeiro, R.A., Vale, M.L., Thomazzi, S.M., Paschoalato, A.B., Poole, S., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., 2000. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *European Journal Pharmacology* 387, 111–118.
- Sanbongi, C., Hirohisa, T., Osakabe, N., Sasa, N., Natsume, M., Yanagisawa, R., Inoue, K., Katos, Y., Osawa, T., Yoshikawa, T., 2003. Rosmarinic acids inhibit lung

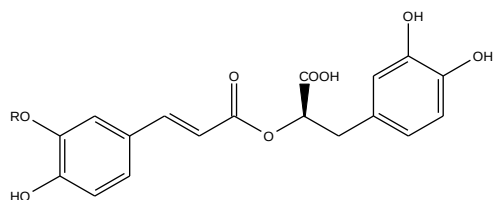
- injury induced by diesel exhaust particles. *Free Radical Biology & Medicine* 34: 1060–1069.
- Sessle, B.J., 2011. Peripheral and central mechanisms of orofacial inflammatory Pain. *International Review of Neurobiology* 97, 179-206.
- Siqueira, R.S., Bonjardim, L.R., Araújo, A.A.S., Araújo, B.E.S., Melo, M.G.D., Oliveira, M.G.B., Gelain, D.P., Silva, F.A., DeSantana, J.M., Albuquerque-Júnior, R.L.C., Rocha, R.F., Moreira, J.C.F., Antonioli, A.R., Quintans-Júnior, L.J., 2010. Antinociceptive activity of atranorin in mice orofacial nociception tests. *Zeitschrift Naturforschung C* 65, 1-11.
- U.S. Department of Health and Human Services, 2000. Oral health in America: a report of the Surgeon General. Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services. National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health.
- Venâncio, A.M., Marchioro, M., Estavam, C.S., Melo, M.S., Santana, M.T., Onofre, A.S.C., Guimarães, A.G., Oliveira, M.G.B., Alves, P.B., Pimentel, H.C., Quintans-Júnior, L.J., 2011. *Ocimum basilicum* (Lamiaceae) leaf essential oil and (-)-linalool reduce orofacial nociception in rodents - a behavioral and electrophysiological approach. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21, 1043-1051.
- Waning, J., Vriens, J., Owsianik, G., Stuwe, L., Mally, S., Fabian, A., Frippliat, C., Nilius, B., Schwab, A., 2007. A novel function of capsaicin-sensitive TRPV1 channels: involvement in cell migration. *Cell calcium* 42, 17-25.



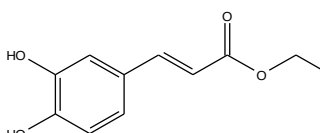
1
Sambacaitaric acid



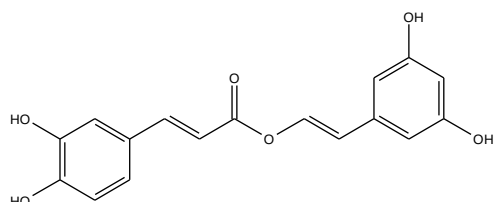
2
3-O-methyl sambacaitaric acid



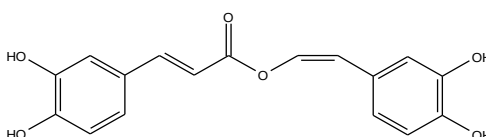
3 R=H Rosmarinic acid
4 R=CH₃ 3-O-methyl-rosmarinic acid



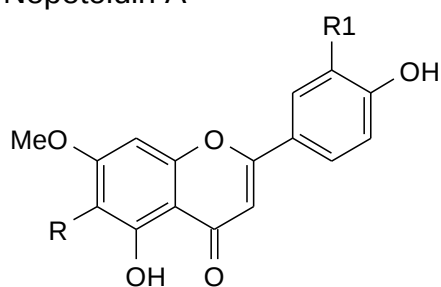
5
Ethyl caffeate



6
Nepetoidin A



7
Nepetoidin B



8 R=OCH₃, R₁=OH

9 R=OCH₃, R₁=H

10 R=H, R₁=OH

11 R=R₁=H

cirsiliol (**8**), circimaritin (**9**), 7-O-methylfluteolin (**10**) and genkwanin (**11**)

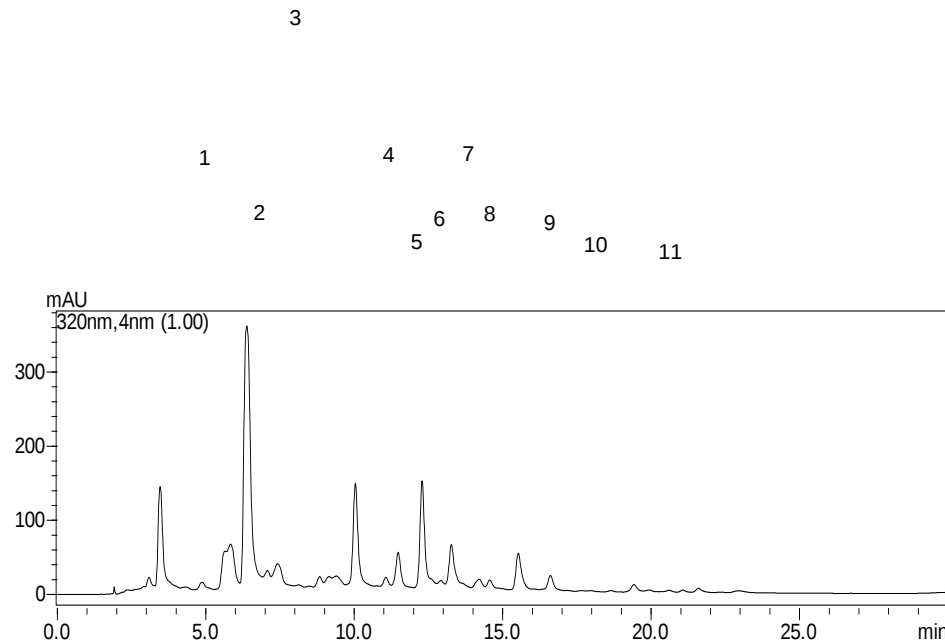
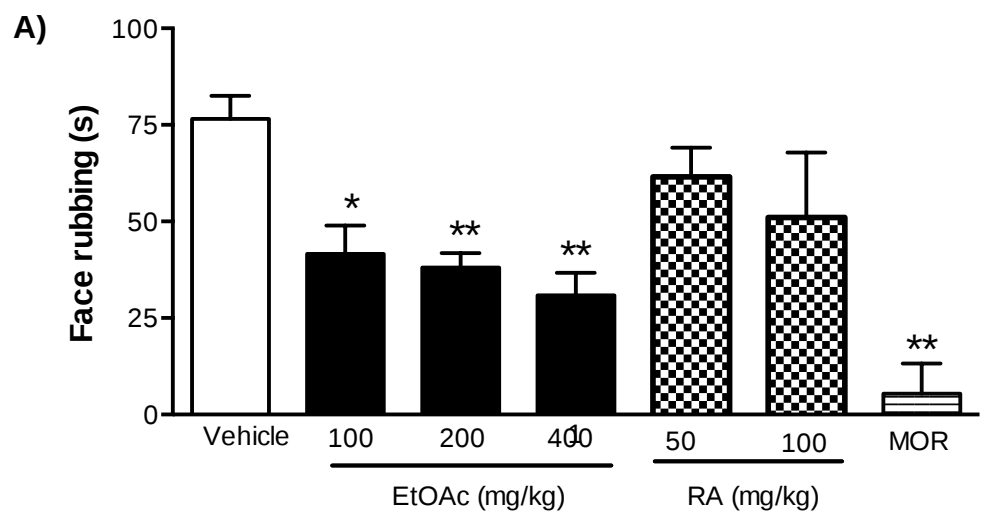


Figure 1. Chromatogram (HPLC-DAD) and compounds isolated from EtOAc fraction of the leaves of *Hyptis pectinata* (Falcão et al., 2013)



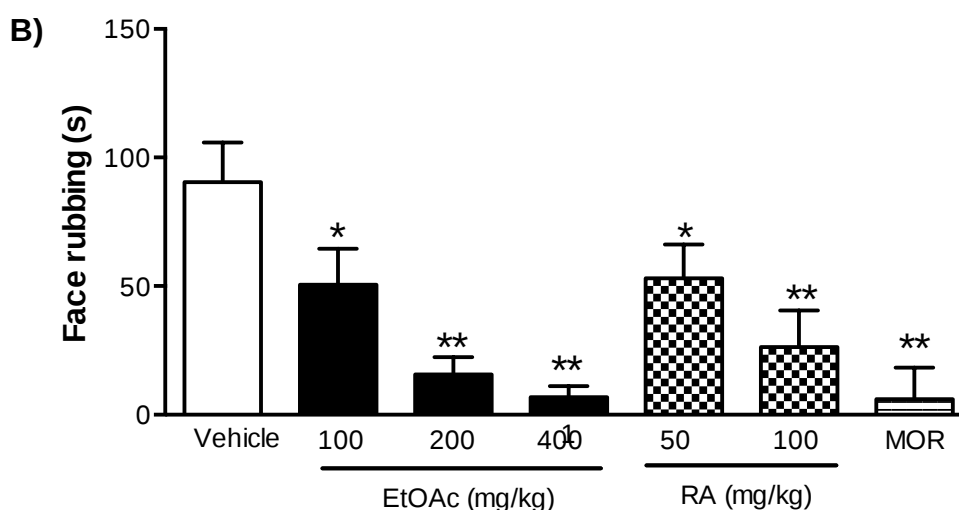


Figure 2 - Effects of EtOAc (*Hyptis pectinata*), rosmarinic acid (RA) or morphine (MOR) on the formalin induced orofacial nociception in mice. Vehicle (control), EtOAc (100, 200 or 400 mg/kg, p.o.), RA (10 or 20 mg/kg, p.o.) or MOR (5 mg/kg, i.p.) were administered 1 h before formalin injection. **(A)** First phase (0-5 min) and **(B)** Second phase (15-40 min). Each column represents mean $\pm$ S.E.M. (n = 8. Per group). *p < 0.05 or ** p < 0.001 vs. control (ANOVA followed by Tukey's test).

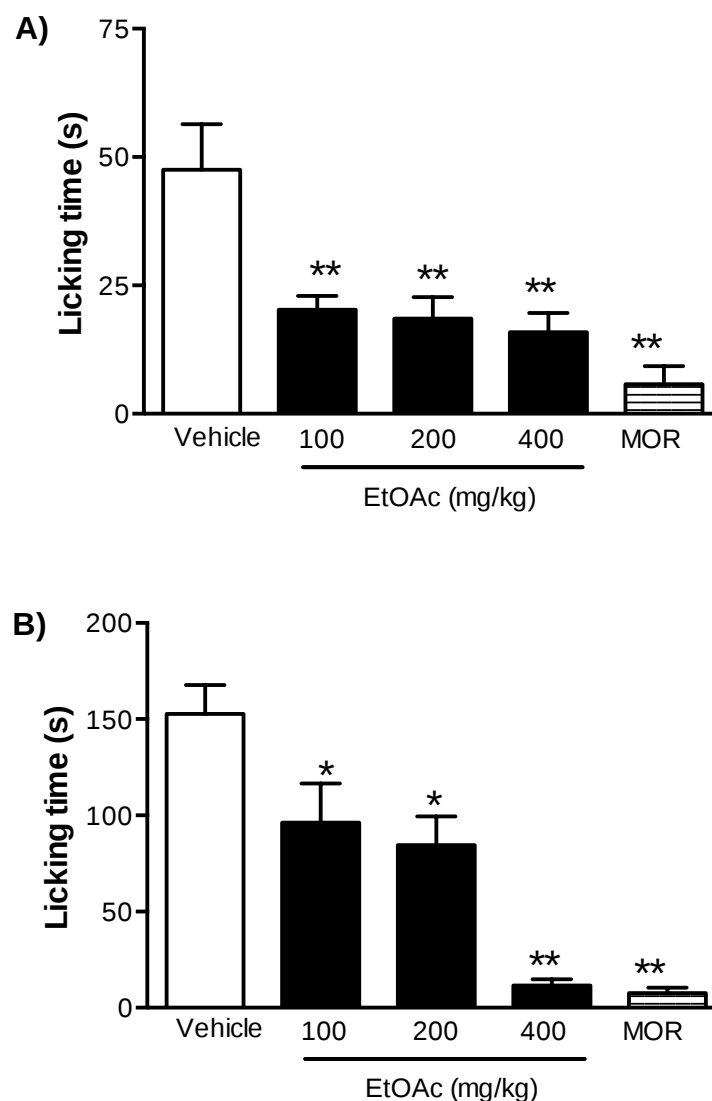


Figura 3 - Effects of EtOAc (*H. pectinata*) on the capsaicin- **(A)** or glutamate- **(B)** induced orofacial nociception in mice. Vehicle (control), EtOAc (100, 200 or 400 mg/kg, p.o.), or MOR (5 mg/kg, i.p.) were administered 1h before capsaicin or glutamate injection. Each column represents mean $\pm$ S.E.M. (n = 8, per group). *p < 0.05 or **p < 0.001 vs. control (ANOVA followed by Tukey's test).

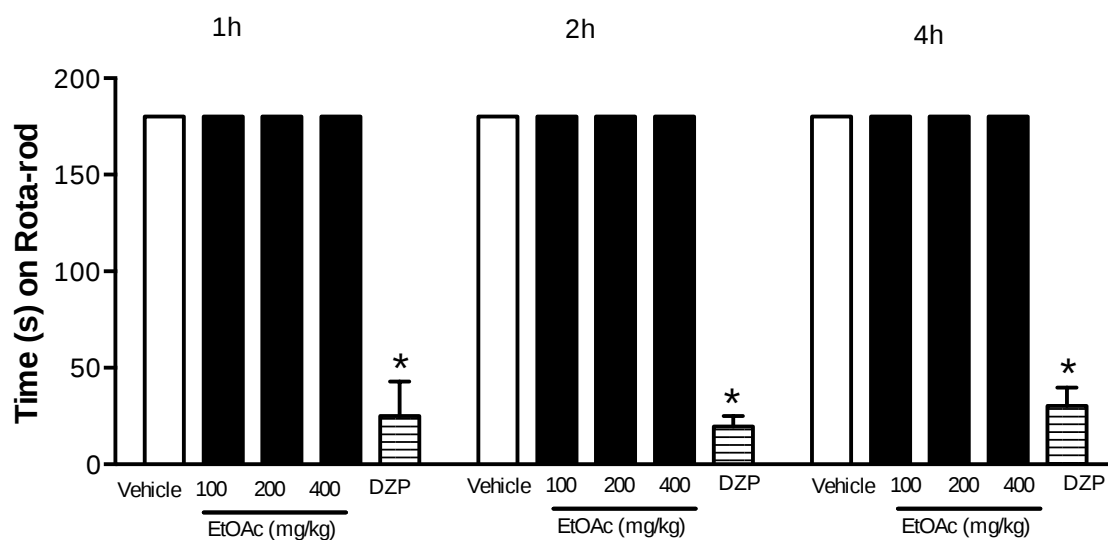


Figure 4 - Time (s) on the Rota-rod observed in mice after p.o. treatment with Vehicle (Control), EtOAc (100, 200 or 400 mg/kg, p.o.), or Diazepam (DZP, 3 mg/kg, i.p.). The motor response was recorded for the following 1h, 2h, and 4h after drug treatment and the time (s) remained on the bar for up to 180 s. Statistical differences vs control group were calculated using ANOVA, followed by Tukey's test ($n = 8$, per group). * $p < 0.001$.