

# TRIAGEM TOXICOLÓGICA DE EXTRATOS DE *PIMENTA PSEUDOCARYOPHYLLUS* (GOMES) L.R. LANDRUM FRENTE À *ARTEMIA SALINA* LEACH

TOXICOLOGICAL SCREENING OF *PIMENTA PSEUDOCARYOPHYLLUM* (GOMES) L.R. LANDRUM EXTRACTS USING *ARTEMIA SALINA* BIOASSAY

Daniela de Alencar Menezes<sup>1</sup>, Artur Danilo Novaes da Silva<sup>1</sup>, Gabriela Saraiva Dantas<sup>1</sup>, Helder Carvalho Souza Lima Silva<sup>1</sup>, Ricardo Prado Lyra<sup>1</sup>, Bruno Lucêna de Lima<sup>1</sup>, Fabiana Lima Silva<sup>2</sup>, Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno<sup>3</sup>, Thárcia Kiara Beserra de Oliveira<sup>4,5</sup>; Joelmir Lucena Veiga da Silva<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Medicina/FMO, <sup>2</sup> PhD. Professor/Instituto de Ciências da Saúde/UNIP, <sup>3</sup> PhD. Professor/Instituto de Química/USP, <sup>4</sup> PhD. Professora/Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande, <sup>5</sup> PhD. Professor/FMO

## RESUMO

**Objetivo:** Verificar e comparar a toxicidade aguda de extratos das folhas (Ppf) e do caule (Ppc) de *pimenta pseudocaryophyllus* em *artemia salina*. **Métodos:** Os extratos Ppf e Ppc, nas concentrações de 1, 10, 100 e 1.000 µg/mL, foram empregados nos ensaios de toxicidade aguda realizados em triplicata, utilizando microcrustáceos conhecidos como *artemia salina* incubados por um período de 24 e 48 horas. O número de náuplios mortos foram quantificados e a concentração letal média (CL<sub>50</sub>) foi calculada por regressão não linear. **Resultados:** O extrato Ppc apresentou toxicidade apenas em 48 horas (CL<sub>50</sub> = 140,2 ± 76,7 µg/mL), considerada moderada. Já o extrato Ppf se mostrou tóxico tanto na exposição por 24 horas (CL<sub>50</sub> = 372,0 ± 58,1 µg/mL) quanto por 48 horas (CL<sub>50</sub> = 0,8 ± 0,1 µg/mL), apresentando toxicidade moderada e alta, respectivamente. **Conclusão:** Caule e folhas de *pimenta pseudocaryophyllus* possuem metabólitos ativos que levam toxicidade à *artemia salina*, que provavelmente são substâncias diferentes ou estão mais concentrados nas folhas.

**Palavras-chave:** Planta medicinal; Extrato vegetal; Toxicidade

## ABSTRACT

**Objectives:** To evaluate and compare the acute toxicity of leaf (Ppf) and stem (Ppc) extracts of *Pimenta pseudocaryophyllum* in *Artemia salina*. **Methods:** The Ppf and Ppc extracts were tested at concentrations of 1, 10, 100, and 1000 µg/mL in acute toxicity assays using the microcrustacean *Artemia salina*. Nauplii were incubated for 24 and 48 hours, and all experiments were performed in triplicate. Nauplii mortality was recorded, and LC<sub>50</sub> values were calculated using nonlinear regression analysis. **Results:** The Ppc extract exhibited moderate toxicity only after 48h (LC<sub>50</sub> = 140.2 ± 76.7 µg/mL). In contrast, the Ppf extract showed moderate toxicity at 24 hour (LC<sub>50</sub> = 372.0 ± 58.1 µg/mL) and high toxicity at 48 hours (LC<sub>50</sub> = 0.8 ± 0.1 µg/mL). **Conclusion:** Both stem and leaves of *P. pseudocaryophyllum* contain bioactive metabolites that induce toxicity in *A. salina*, which are likely different compounds or present at higher concentrations in the leaves.

**Keywords:** Medicinal plant. Vegetal extract. Toxicity.

## INTRODUÇÃO

O uso da medicina tradicional e das plantas medicinais em países em desenvolvimento tem sido amplamente observado como base normativa para a manutenção da saúde<sup>1</sup>. Segundo o sistema de informação tóxico-farmacológico, a intoxicação por plantas medicinais é a segunda maior causa de morte por intoxicação em seres humanos. Existem vários fatores que levam a esse cenário, como a falta de

conhecimento sobre o cultivo, a não identificação correta da planta, reações adversas, interação medicamentosa, concentração e frequência do uso do fitoterápico<sup>2</sup>.

O mais recente instrumento de normatização produzido para orientar e potencializar as iniciativas de saúde no Brasil foi a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde<sup>3</sup> contemplando, inicialmente, as

áreas de plantas medicinais e fitoterapia, homeopatia, medicina tradicional chinesa/acupuntura e medicina antroposófica. Em uma área mais específica, foi elaborada também a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos<sup>4</sup>.

Nesse cenário, a família *Myrtaceae* compreende 121 gêneros e de 3.800 a 5.800 espécies de arbustos e árvores, encontrada principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo<sup>5</sup>. No Brasil, ela está representada por cerca de 23 gêneros e mil espécies<sup>6</sup>. Nessa família, encontra-se a pimenta *pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum, popularmente conhecida como “pau-cravo”, “craveiro-do-mato”, “louro-cravo” ou “erva-de-bugre”. Os chás preparados com suas folhas são comumente usados como tranquilizantes, reguladores digestivos e para aliviar sintomas da gripe<sup>7</sup>. Estudos fitoquímicos mostram que as folhas de pimenta *pseudocaryophyllus* apresentam compostos polifenólicos, como os taninos e flavonoides<sup>8,9</sup>, e seu óleo essencial contém fenilpropanoides<sup>10,11</sup>. As atividades antioxidante<sup>12,13</sup>, ansiolítica<sup>14</sup>, antifúngica<sup>15,16</sup>, antidepressiva<sup>9</sup>, anti-inflamatória e anti-hiperuricêmica<sup>17</sup>, inseticida<sup>18</sup> e antimicrobiana<sup>19,20</sup> foram descritas para essa espécie. Apesar dessas propriedades, não há relatos sobre toxicidade em relação a ela.

A ausência de estudos que comprovem ou relatem a toxicidade da pimenta *pseudocaryophyllus* estimulou esta pesquisa a fim de verificar e comparar a toxicidade aguda de extratos das folhas (Ppf) e do caule (Ppc) dessa espécie vegetal em artemia salina.

## MATERIAL E MÉTODOS

As folhas e o caule de pimenta *pseudocaryophyllus* foram macerados em etanol (95%) e os extratos foram obtidos após a eliminação desse solvente em rotaevaporador. Esses extratos foram cedidos pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os extratos utilizados nos ensaios foram solubilizados com cremofor (0,1%) e diluídos em água destilada (2,5 mg/mL) para preparação das suas soluções. No momento da realização dos experimentos, eles foram diluídos em série a fim de se obter concentrações adequadas para os ensaios.

Para a determinação da toxicidade aguda, foi utilizado o método com artemia salina<sup>21</sup>. Uma quan-

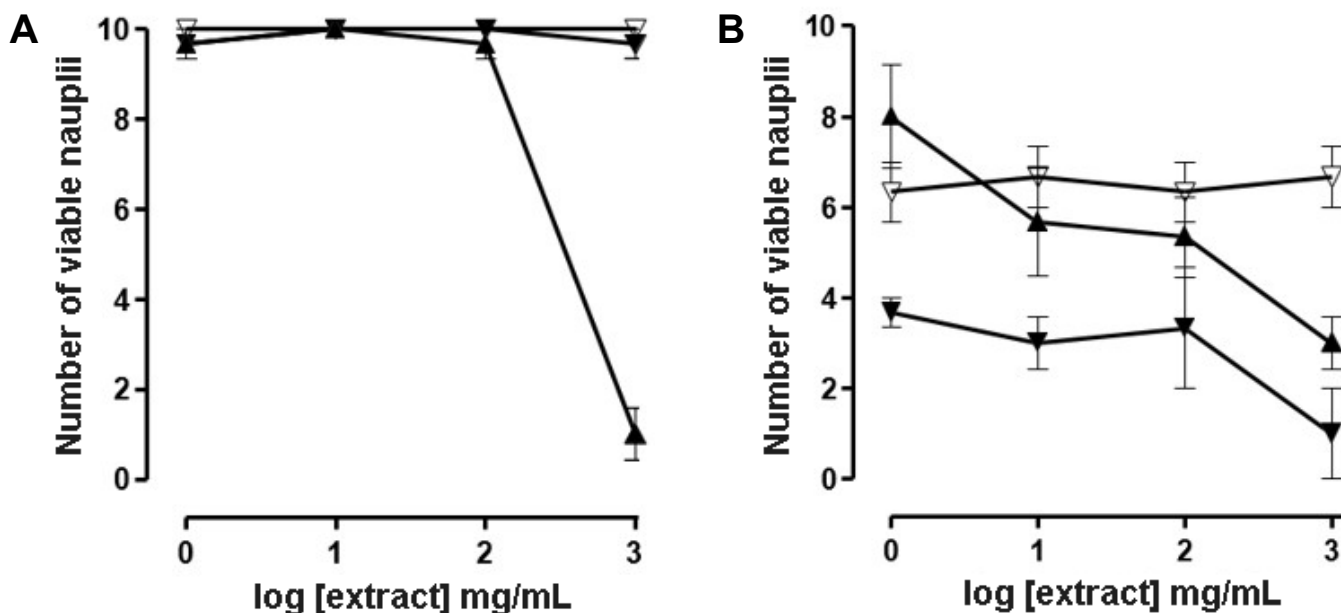
tidade de 0,3 g de cistos do microcrustáceo foi mantida em água marinha sintética e incubada por 24 a 36 horas sob iluminação artificial e temperatura de 22°C. Após a eclosão, 10 náuplios foram coletados e incubados em tubos de ensaio contendo a solução dos extratos (1, 10, 100 e 1.000 µg/mL) e o controle (salina). Após 24 e 48 horas, foi realizada a leitura do número de sobreviventes e mortos. Consideraram-se larvas mortas todas que não apresentavam qualquer movimento ativo em cerca de 20 segundos de observação. A determinação da concentração letal média (CL<sub>50</sub>) dos extratos foi obtida por regressão não linear do número de náuplios viáveis para cada concentração do extrato. O ensaio foi realizado em triplicata para cada concentração dos extratos.

Todos os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média ( $X \pm e.p.m.$ ) e analisados estatisticamente empregando-se o Teste-t de Student, onde os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes e analisados pelo programa *GraphPad Prism (Prism, California, EUA)*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de conhecer possíveis atividades tóxicas de produtos vegetais, ensaios utilizando o microcrustáceo artemia salina são bastante aplicados para um conhecimento prévio e segurança terapêutica. Por se tratar de um animal de fácil manutenção em condições de laboratório e de ampla distribuição, tem sido largamente empregado em testes de toxicidade<sup>22,23</sup>. A ausência de citotoxicidade de extratos testados em artemia salina é um indicador de que a planta é bem tolerada pelo sistema biológico.

A incubação do extrato Ppc durante 24 horas, nas concentrações usadas, não diminuiu a viabilidade desse microcrustáceo quando comparado com o controle, não apresentando toxicidade (Figura 1A). No entanto, quando o extrato Ppc foi incubado nas amostras por 48 horas (Figura 1B), ele foi capaz de diminuir a viabilidade, apresentando CL<sub>50</sub> de  $140,2 \pm 76,7 \mu\text{g/mL}$ , o que representa toxicidade moderada<sup>21</sup> ( $100 < \text{CL}_{50} \leq 500 \mu\text{g/mL}$ ). Esses resultados mostram que o caule possui princípios ativos, os quais, provavelmente, não são totalmente eliminados pelo metabolismo da artemia salina, causando-lhes toxicidade.



**Figura 1.** Viabilidade de *artemia salina* na ausência ( $\nabla$ ) ou presença dos extratos das folhas ( $\triangle$ ) e dos caules ( $\blacktriangle$ ) durante período de incubação por 24 horas (A) ou 48 horas (B).

Nos ensaios utilizando o extrato Ppf, em ambos os períodos de incubação (24 e 48 horas), esse extrato foi capaz de induzir a morte das artemias (Figura 1A e 1B, respectivamente), sendo mais tóxico quando em contato por mais tempo. Dessa forma, confirmou-se maior toxicidade pelo menor valor de  $CL_{50}$  ( $p < 0,01$ ) apresentado pelo extrato Ppf durante exposição por 48 horas quando comparado ao que ficou exposto por 24 horas (Tabela 1), sendo considerada uma alta toxicidade ( $CL_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ ). A significativa toxicidade observada pelo extrato Ppf deve ser considerada como uma característica interessante para utilizar esse extrato vegetal para futuros estudos de citotoxicidade<sup>24</sup>. Assim, sugere-se que as folhas de pimenta *pseudocaryophyllus* também possuem metabólitos ativos que levam toxicidade à artemia, os quais parecem ser diferentes daqueles encontrados no caule, ou estão, de alguma maneira, mais concentrados nas folhas. Esses resultados corroboram as atividades inseticida<sup>18</sup> e antimicrobiana<sup>19,20</sup> já relatadas para a espécie pimenta *pseudocaryophyllus*.

**Tabela 1.** Valores de  $CL_{50}$  dos extratos das folhas (Ppc) e do caule (Ppf) frente à *artemia salina*.

Tempo de exposição	$LC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	Ppc	Ppf
24 horas	n.d.	$372,0 \pm 58,1$
48 horas	$140,2 \pm 76,7^*$	$0,8 \pm 0,1^{**}$

n.d. (não determinada). Teste t,  $*p < 0,05$  (Ppc vs. Ppf);  $**p < 0,01$  (Ppf 24 vs. 48 horas).

## AGRADECIMENTO

Agradecemos ao apoio técnico concedido por Rayanne R. A. Vinana na realização dos experimentos no Laboratório de Práticas Funcionais II da Faculdade de Medicina de Olinda.

## REFERÊNCIAS

1. Organização Das Nações Unidas Para A Educação, A Ciência E A Cultura (Unesco). Culture and Health: Orientation Texts: World Decade for Cultural Development 1988-1997, Document CLT/DEC/PRO. Paris, 1996;129.
2. Silveira PF, Bandeira MA, Arrais PSD. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. Rev Bras Farmacogn 2008;18(4):618-626.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC BRASIL) no Sistema Único de Saúde. D.O.U. Poder Executivo, Brasília, 04 mai. 2006a.
4. Brasil. Presidência da República. Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. D.O.U. Poder Executivo, Brasília, 2006b.
5. Wilson PG, O'Brien MM, Gadek PA, Quinn CJ. Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamilial groups. Am J Bot. 2001;88(11):2013-25.
6. Landrum LR, Kawasaki ML. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. Brittonia 1997;49(4):508-536.
7. Paula JAM, Paula JR, Bara MTF, Rezende MH, Ferreira HD. Estudo farmacognóstico das folhas de Pimenta pseudocaryophyllus (Gomes) L.R. Landrum—Myrtaceae.

- Rev Bras Farmacogn. 2008;18:265–78.
8. Paula JA, Silva MR, Costa MP, Diniz DG, Sá FA, Alves SF, Costa EA, Lino RC, Paula JR. Phytochemical Analysis and Antimicrobial, Antinociceptive, and Anti-Inflammatory Activities of Two Chemotypes of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Myrtaceae). *Evid Based Complement Alternat Med* 2012;2012:1-15.
  9. Fajemiroye JO, Martins JL, Ghedini PC, Galdino PM, Paula JA, Paula, JR; Rocha FF, Costa EA. Antidepressive-Like Property of Dichloromethane Fraction of *Pimenta pseudocaryophyllus* and Relevance of Monoamine Metabolic Enzymes. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013;2013:1-7.
  10. Niculau ES, Ribeiro LP, Ansante TF, Fernandes JB, Forim MR, Vieira PC, Vendramim JD, Silva MFGF. Isolation of Chavibetol and Methyleugenol from Essential Oil of *Pimenta pseudocaryophyllus* by High Performance Liquid Chromatography. *Molecules* 2018;23(11):1-10.
  11. Santos BC, Silva JC, Guerrero PGJR, Leitão GG, Barata LE. Isolation of chavibetol from essential oil of *Pimenta pseudocaryophyllus* leaf by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A*. 2009;1216(19):4303-6.
  12. Campanini MZ, Pinho-Ribeiro FA, Ivan AL, Ferreira VS, Vilela FM, Vicentini FT, Martinez RM, Zarpelon AC, Fonseca MJ, Faria TJ, Baracat MM, Verri JR, WA, Georgetti SR, Casagrande R. Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. *J Photochem Photobiol B* 2013;127:153-60.
  13. Campanini MZ, Custódio DL, Ivan AL, Martins SM, Paranzini MJ, Martinez RM, Verri JRWA, Vicentini FT, Arakawa NS, Faria TJ, Baracat MM, Casagrande R, Georgetti SR. Topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract: In vitro antioxidant activity and in vivo efficacy against UV-B-induced oxidative stress. *AAPS PharmSciTech* 2014;15(1):86-95.
  14. Fajemiroye JO, Galdino PM, Alves SF, Paula JAM, Paula JR, Ghedini PC, Costa EA. Involvement of 5-HT<sub>1A</sub> in the anxiolytic-like effect of dichloromethane fraction of *Pimenta pseudocaryophyllus*. *J Ethnopharmacol* 2012;141:872–7.
  15. Fernandes OFI, Costa CR, Souza Lino Junior R, Vinaud MC, Hasimoto E Souza LK, Paula JA, SILVA MRR. Effects of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum, on melanized and non-melanized *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 2012;174(5-6):421-8.
  16. El Assal FE, Paula JA, Capeletti LS, Abrão FY, Ataídes FS, Sá FA, Costa CR, Fernandes OF, Souza LK, Silva MR. *Pimenta pseudocaryophyllus* inhibits virulence factors and promotes metabolic changes in *Candida* yeast. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014;47(5):618-23.
  17. Ferrari FC, Lima RCL, Ferraz Filha ZS, Barros CH, Araújo MCPM, Saúde-Guimarães DA. Effects of *Pimenta pseudocaryophyllus* extracts on gout: Anti-inflammatory activity and anti-hyperuricemic effect through xantine oxidase and uricosuric action. *J Ethnopharmacol* 2016;180:37-42.
  18. Ribeiro LP, Ansante TF, Niculau ES, Pavarini R, Silva MF, Seffrin RC, Vendramim JD. *Pimenta pseudocaryophyllus* Derivatives: Extraction Methods and Bioactivity Against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Neotrop Entomol*. 2015;44(6):634-42.
  19. Suzuki ÉY, Baptista EB, Resende Do Carmo AM, Miranda Chaves MD, Chicourel EL, Barbosa Raposo NR. Potential of the essential oil from *Pimenta pseudocaryophyllus* as an antimicrobial agent. *Acta Pharm* 2014;64(3):379-85.
  20. Paula JAM, Paula JR, Pimenta FC, Rezende MH, Bara MTF. Antimicrobial activity of the crude ethanol extract from *Pimenta pseudocaryophyllus*. *Pharm. Biol* 2009;47:987–993.
  21. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, Maclaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Plantas Medicinai* 1982;45:31-34.
  22. Amarante CB, Müller AH, Póvoa MM, Dolabela MF. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). *Acta Amaz* 2011;41(3):431-434.
  23. Pimentel MF, Silva Junior FCG, Santaella ST, Lotufo LVC. O Uso de *Artemia* sp. como Organismo-Teste para Avaliação da Toxicidade das Águas Residuárias do Beneficiamento da Castanha de Caju Antes e Após Tratamento em Reator Biológico Experimental. *J Braz Soc Ecotoxicol* 2011;6(1):15-22.
  24. Barth EF, Pinto LS, Dileli P, Biavatti DC, Silva YL, Bor-tolucci W, Gazim ZC, Takemura OS, Romagnolo MB, Laverde- Junior A. Biological screening of extracts from leaf and stem bark of *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae). *Braz J Biol* 2018;78(4):601-608.