

# Triagem toxicológica de extratos de *Pimenta pseudocaryophyllum* (Gomes) L.R. Landrum frente à *Artemia salina* Leach

## Toxicological screening of extracts from *Pimenta pseudocaryophyllum* (Gomes) L.R. Landrum on *Artemia salina* Leach

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

### ABSTRACT

*Objective: to verify and to compare the acute toxicity of the leaves (Ppf) and stalk (Ppc) extracts from Pimenta pseudocaryophyllum on brine shrimp Artemia salina. Methods: Ppf and Ppc extracts (1, 10, 100 and 1000 µg/mL) were evaluate the assay acute toxicity on Artemia salina, incubed at 24 and 48 hours, performed at triplicate. The nauplii dead number were determined and LC<sub>50</sub> was calculated by non-linear regression. Results: Ppc extract presents toxicity only at 48hs (LC<sub>50</sub> = 140.2 ± 76.7 µg/mL), regarded as moderate toxicity. Ppf was toxic both at 24hs (LC<sub>50</sub> = 372.0 ± 58.1 µg/mL) and 48hs (LC<sub>50</sub> = 0.8 ± 0.1 µg/mL), regarded as moderate and high toxicity, respectively. Conclusion: leaf and stalk from P. pseudocaryophyllum presents active metabolites that induced toxicity Artemia salina, probably, are different substances or most concentrated on leaves.*

### Keywords

*Medicinal plant. Vegetal extract. Toxicity.*

### RESUMO

*Objetivo: verificar e comparar a toxicidade aguda de extratos das folhas (Ppf) e do caule (Ppc) de Pimenta pseudocaryophyllum em Artemia salina. Métodos: Os extratos Ppf e Ppc, nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 µg/mL, foram utilizados nos ensaios de toxicidade aguda utilizando o microcrustáceo Artemia salina, incubados por um período de 24 e 48 horas, realizados em triplicata. O número de náuplios mortos foram quantificados e a CL<sub>50</sub> foram calculadas por regressão não-linear. Resultados: o extrato Ppc apresentou toxicidade apenas em 48hs (CL<sub>50</sub> = 140,2 ± 76,7 µg/mL), considerada moderada. Já o extrato Ppf foi tóxico tanto na exposição por 24hs (CL<sub>50</sub> = 372,0 ± 58,1 µg/mL), quanto por 48hs (CL<sub>50</sub> = 0,8 ± 0,1 µg/mL), apresentando toxicidade moderada e alta, respectivamente. Conclusão: caule e folhas de P. pseudocaryophyllum possuem metabólitos ativos que levam toxicidade a Artemia salina, que provavelmente são substâncias diferentes ou estão mais concentrados nas folhas.*

### Palavras-chaves

*Planta medicinal. Extrato vegetal. Toxicidade.*

## 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 acontecimento, 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 SUS<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 Medicinais e Fitoterápicos<sup>4</sup>.

A família Myrtaceae compreende 121 gêneros e 3.800 a 5.800 espécies de arbustos e árvores, ocorrendo principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo<sup>5</sup>. No Brasil, esta família está representada por cerca de 23 gêneros e mil espécies<sup>6</sup>. Nesta família se encontra a *Pimenta pseudocaryophyllum* (Gomes) L.R. Landrum, popularmente conhecida como “paucravo”, “craveiro-do-mato”, “louro-cravo” ou “chá-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 *P. pseudocaryophyllum* apresentam compostos polifenólicos, como os taninos e flavonoides<sup>8,9</sup> e seu óleo essencial com 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>, antimicrobiana<sup>19,20</sup> foram descritas para esta espécie. Apesar dessas atividades, não há relatos sobre toxicidade desta espécie.

A ausência de estudos que comprovem ou relatem a toxicidade de *P. Pseudocaryophyllum*, estimulou verificar e comparar a toxicidade aguda de extratos das folhas (Ppf) e do caule (Ppc) desta espécie vegetal em *Artemia salina*.

## Material e Métodos

As folhas e caule de *P. pseudocaryophyllum* foram maceradas em etanol (95%) e os extratos obtidos após a eliminação deste solvente em rotaevaporador. Estes extratos foram cedidos pelo Instituto de Química/USP. Para preparação das soluções dos extratos a serem utilizados nos ensaios, os mesmos foram solubilizados com cremofor (0,1%) e diluídos em água destilada (2,5 mg/mL). No momento da realização dos experimentos, eram 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 quantidade de 0,3g de cistos de *A. salina* foi mantida em água marinha sintética e incubada por 24-36 h sob iluminação artificial e temperatura de 22°C. Após a eclosão, 10 náuplios foram coletados e incubado em tubos de ensaio contendo a solução dos extratos (1, 10, 100 e 1000 µg/mL) e o controle (salina). Após 24 e 48h foi realizada a leitura do número de sobreviventes e mortos. Consideram-se larvas mortas todas que não apresentavam qualquer movimento ativo em cerca de vinte 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 ± e.p.m.) e analisados estatisticamente empregando-se o Teste-t, onde os valores de p < 0,05 foram considerados significantes e analisados pelo programa GraphPad Prism.

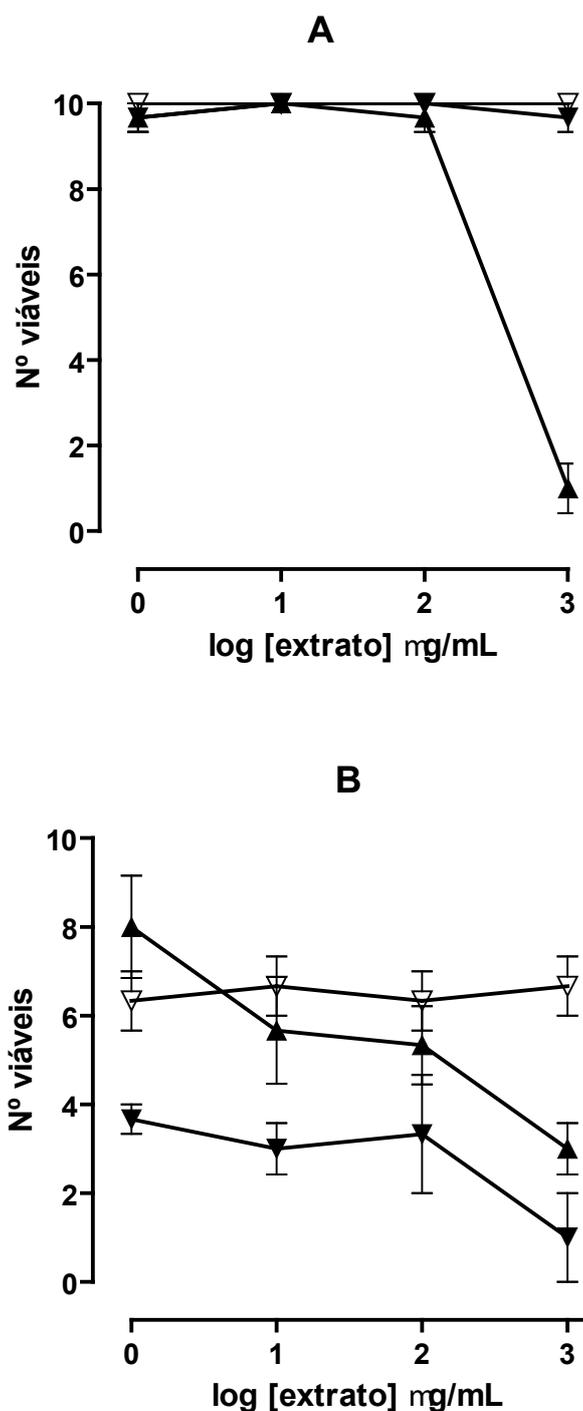
## Resultados e Discussão

A fim de conhecer possíveis atividades tóxicas de produtos vegetais, ensaios utilizando 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 utilizado em testes de toxicidade.<sup>22,23</sup> A ausência de citotoxicidade de extratos testados em *A. salina* é indicador que a planta é bem tolerada pelo sistema biológico.

A incubação do extrato Ppc, nas concentrações utilizadas, durante 24hs, não diminuiu a viabilidade do microcrustáceo *A. salina*, quando comparado com o controle, mostrando não apresentar toxicidade (Figura

1A). No entanto, quando o extrato Ppc foi incubado nas amostras por 48hs (Figura 1B), o mesmo foi capaz de diminuir a viabilidade, apresentando CL<sub>50</sub> de 140,2 ± 76,7 µg/mL, o que representa toxicidade moderada<sup>21</sup> (100 < CL<sub>50</sub> ≤ 500 µg/mL). Estes resultados mostram que o caule possui princípios ativos, os quais, provavelmente, não conseguem ser totalmente eliminados pelo metabolismo da *A. salina*, causando-lhes toxicidade.

Nos ensaios utilizando o extrato Ppf, em ambos os períodos de incubação (24 e 48hs), este extrato foi capaz de induzir morte das artemias (Figura 1A e B, respectivamente), sendo mais tóxico quando em contato por mais tempo. Confirmando-se esta maior toxicidade pelo menor valor de CL<sub>50</sub> (p < 0,01) apresentado pelo extrato Ppf durante exposição por 48hs, quando comparado a 24hs (Tabela 1), sendo considerada uma alta toxicidade (CL<sub>50</sub> < 100 µg/mL). O fato da significativa toxicidade observada pelo extrato Ppf, deve ser considerada como uma característica interessante para utilizar este extrato vegetal para futuros estudos de citotoxicidade<sup>24</sup>. Assim, sugere-se que as folhas *P. pseudocaryophyllum* também possuem metabólitos ativos que levam toxicidade a artemia, que parecem ser diferentes daqueles encontrados no caule, ou estão de alguma maneira mais concentrados nas folhas. Estes resultados corroboram com as atividades inseticida<sup>18</sup> e antimicrobiana<sup>19,20</sup> já relatadas para a espécie *Pimenta pseudocaryophyllum*.



**Figura 1** – Viabilidade de *Artemia salina* na ausência (▽) ou presença dos extratos Ppc (▲) e Ppf (▲) durante período de incubação por 24 hs (A) ou 48 hs (B).

**Tabela 1** – Valores de CL<sub>50</sub> dos extratos Ppc e Ppf frente à *Artemia salina*.

Tempo de exposição	CL <sub>50</sub> (µg/mL)	
	Ppc	Ppf
24hs	n.d.	372,0 ± 58,1
48hs	140,2 ± 76,7*	0,8 ± 0,1**

n.d. (não determinada).  
Test-t, \*p < 0,05 (Ppc vs. Ppf); \*\*p < 0,01 (Ppf 24 vs 48hs).

## 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 Mediciniais 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-HT1A in the anxiolytic-like effect of dichloromethane fraction of Pimenta pseudocaryophyllus.* *J Ethnopharmacol* 2012;141:872-7.
  15. Fernandes OFL, 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, Bortolucci 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.

## 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.