

Atividade larvicida de extratos, frações e substâncias isoladas de espécies de Piperaceae do Estado do Rio de Janeiro

Larvicidal activity from extract, fractions and pure compounds of the Piperaceae species from Rio de Janeiro State

Monica P. Siqueira¹, Felipe S. Candido², Thadeu M. do Amaral² e Davyson de Lima Moreira^{1,2*}

¹Laboratório de Toxicologia Ambiental, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

²Instituto de Tecnologia em Fármacos, Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

* Autor correspondente

Endereço: Avenida Sizenando Nabuco, 100, Mangueiras, Rio de Janeiro, CEP. 21041-250.

E-mail: davysonmoreira@hotmail.com

RESUMO

Com boa ocorrência no Estado do Rio de Janeiro, a família Piperaceae é formada por 5 gêneros e aproximadamente 1400 espécies que possuem distribuição cosmopolita. A atividade biológica e farmacológica obtidas para extratos, frações e substâncias puras de Piperaceae motivaram a realização desse trabalho. *Artemia salina* Leach é um microcrustáceo amplamente conhecido como indicador de toxicidade. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade larvicida de extratos, frações e substâncias isoladas de espécies de Piperaceae. Folhas e/ou inflorescências das espécies selecionadas foram coletadas próximo ao município de Teresópolis/ RJ e na cidade do Rio de Janeiro/ RJ. Posteriormente, foi feito um extrato metanólico do material vegetal seco e a partir desse, foram preparadas partições em *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol. Em estudos prévios foram isolados eupomatenoide-6 (EUP-6) e sitosterol (SIT), que também foram testados. Cerca de 25 mg dos extratos metanólicos e de suas frações e 5 mg das substâncias puras foram solubilizados em DMSO/ água salinizada até concentrações finais iguais a 12,5; 25; 50; 100 e 500 µg/mL. Larvas de *A. salina* em estágio metanauplio foram separadas (n=10) e incubadas na presença dos extratos (triplicata) e mantidas no escuro. Após 24h, as larvas sobreviventes foram contadas, permitindo a obtenção da CL₅₀. Das amostras testadas, destacam-se o extrato metanólico das folhas de *Piper cernuum* e das inflorescências de *P. solmsianum*, as partições em *n*-hexano, diclorometano e acetato de etila do extrato metanólico das folhas de *P. solmsianum*, e EUP-6 que apresentaram alta toxicidade frente às larvas de *A. salina* (CL₅₀ entre 6,5 e 25 µg/ml). Com base nos resultados obtidos, alguns extratos e frações testados mostraram resultados positivos e podem ser usados na busca de novos fitomedicamentos com ação citotóxica e anti-parasitária.

Palavras-chave: Plantas medicinais; *Piper*; *Artemia salina*; Eupomatenoide-6; Sitosterol.

ABSTRACT

Piperaceae family has a great occurrence in the state of Rio de Janeiro and is composed by 5 genera and about 1400 species with cosmopolitan distribution. The biological and pharmacological activities obtained for extracts, fractions and pure compounds from Piperaceae guided us to perform this study. *Artemia salina* Leach is a microcrustacean widely known as an indicator of toxicity. The present study aimed to evaluate the larvicidal activity of extracts, fractions and isolated compounds from Piperaceae species. Leaves and / or inflorescences of selected species were collected near the city of Teresopolis/RJ and the city of Rio de Janeiro/ RJ. Subsequently, it was made an extract in methanol of the dried plant material and from this, partitions were prepared in *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol. In previous studies, eupomatenoid-6 (EUP-6) and sitosterol (SIT) were isolated. These compounds were also tested. About 25 mg of methanol extracts and fractions and 5 mg of pure substances were solubilized in DMSO / salinized water to final concentrations of 12.5; 25; 50; 100 and 500 µg/ mL. *A. salina* larvae in metanaupliar stage were separated (n = 10) and incubated in the presence of extracts (triplicate) and kept in the dark. After 24h, the surviving larvae were counted to provide the LC₅₀. Among the tested material stand out from the methanol extract of the leaves of *Piper cernuum* and inflorescences of *P. solmsianum*, partitions in *n*-hexane, dichloromethane and ethyl acetate from methanol extract of the leaves of *P. solmsianum* and EUP-6 that showed high toxicity against *A. salina* larvae (LC₅₀ of 6.5 to 25 mg/ ml). Based on the obtained results, some extracts and fractions tested showed positive results and can be used in the search for new phyto-medicines with cytotoxic and anti-parasitic action.

Keywords: Medicinal plants; *Piper*; *Artemia salina*; Eupomatenoid-6; Sitosterol.

INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, plantas medicinais são utilizadas para o tratamento de diversas doenças. Dados científicos revelam que entre os anos de 5.000 e 2.800 a.C, o homem já realizava o cultivo de cereais e fazia uso de algumas plantas medicinais. As plantas medicinais têm sido uma rica fonte para obtenção de moléculas com propriedades farmacológicas. Diversos constituintes isolados de plantas são usados na produção de medicamentos como, por exemplo, os glicosídeos cardiotônicos obtidos da dedaleira, usados no tratamento da insuficiência cardíaca, e os alcalóides da vinca, usados no combate à leucemia (SEIDL 2003; FOGLIO et al., 2006; CARNAVAL et al., 2009).

Apesar da grande biodiversidade mundial, apenas 20% das plantas foram submetidas a testes farmacológico ou biológico (NINO et al., 2006) e boa parte das espécies nativas brasileiras não possuem estudos para permitir a elaboração de monografias completas e atuais (FOGLIO et al., 2006; RIBEIRO et al., 2009). Além disso, pouco se conhece sobre a composição química dessas plantas. Estima-se que aproximadamente 50% das espécies vegetais existentes no Brasil possuem alguma propriedade medicinal (PEIXOTO & MORIM, 2003; MONT'ALVERNE & ANDRADE, 2011). Com o crescente uso de plantas medicinais, muitas espécies são usadas sem respaldo científico quanto à eficácia e à segurança, o que pode acarretar sérios problemas. Desta forma, novos estudos são necessários visando à busca de moléculas e princípios ativos que possam ser utilizados como recurso terapêutico eficaz e seguro (GRAHAN et al., 2000; FOGLIO et al., 2006).

Dentro desse contexto, espécies de Piperaceae tem despertado grande interesse da comunidade científica, devido à propriedades farmacológicas comprovadas. A família Piperaceae pertencente à superordem Nymphaeiflorae, ordem Piperales (*sensu* Dahlgren, 1985), sendo composta por 5 gêneros (*Piper*, *Peperomia*, *Manekia*, *Zippelia* e *Verhuellia*) e 1400 espécies, com hábito herbáceo (ervas, trepadeiras e arbustos) ou arbóreo de pequeno porte (ex. *Piper arboreum* Aub. e suas variedades). Seus representantes apresentam distribuição cosmopolita, sendo muito encontrados na América Central e na América do Sul. No Brasil, as espécies de Piperaceae são localizadas de Norte a Sul, com boa ocorrência no Estado do Rio de Janeiro.

(YUNKER, 1972; JOLY, 1985; TEBBS 1993; PARMAR et al., 1997; MOREIRA 1999; JARAMILLO & MANOS 2001; SUNILA & KUTTAN, 2004; APG III 2009).

Estudos fitoquímicos de espécies de Piperaceae têm levado ao isolamento de metabólitos especiais das vias biossintéticas do chiquimato, acetato-mevalonato e mista, com destaque para as substâncias isoladas do gênero *Piper* (amidas, lignanas, neolignanas, arilpropanoides, flavonoides, cromenos). Na literatura, registra-se, também, a ocorrência de derivados do ácido benzoico e seconeolignanas (*Peperomia*), e derivados catecólicos (*Piper*, seção *Pothomorphe*) (PARMAR et al., 1997; MOREIRA et al., 1998a, 1998b, 2000; MOREIRA, 1999; VELOZO, 2004; VELOZO et al., 2006, 2009; MARQUES et al., 2010, 2011).

Importantes propriedades farmacológicas estão associadas às espécies de Piperaceae (GUADALUPE-ROJAS et al., 1999). Pode-se citar como exemplo, *Piper methysticum* G. Forst, cujos rizomas são ricos em kavaína. Essa planta é usada tradicionalmente pelos habitantes da Polinésia como uma bebida entorpecente. Atualmente, essa espécie é de interesse para as indústrias nas formulações com atividade ansiolítica. Outras plantas como, *Piper nigrum* L., *Piper cubeba* L., *Piper longum* Linn. e *Piper auritum* Kunt (falsa kava) são usadas como condimentos ou como medicinais (DYER & PALMER, 2004; VELOZO, 2004).

A diversidade química de Piperaceae tem se revelado promissora na descoberta de diferentes atividades biológicas, tais como, antiinflamatória e analgésica, depressora e estimulante do SNC, bactericida, citotóxica e leishmanicida. A realização de ensaios biológicos com extratos e frações semi-purificadas dessa família constitui oportunidade ímpar na busca biomonitorada por novas substâncias (MOREIRA et al., 2010; MARQUES et al., 2010, 2011). Uma primeira abordagem cientificamente válida é o teste larvicida com *Artemia salina* Leich., um microcrustáceo da família Artemiidae (CORRÊA & PENAFORT, 2011).

Na busca por substâncias bioativas em extratos vegetais, diversos laboratórios de Produtos Naturais têm inserido em suas rotinas de isolamento e purificação, ensaios biológicos simples. Além disso, os regulamentos éticos internacionais sugerem o uso criterioso de animais de laboratórios e o desenvolvimento de técnicas experimentais alternativas. Nesse contexto, o bioensaio com *A. salina* é considerado um excelente modelo experimental, pois o mesmo é caracterizado pelo seu baixo

custo, simplicidade, rapidez e por não exigir técnicas assépticas. Assim, com o crescente uso de produtos naturais torna-se importante o estudo das prováveis propriedades farmacológicas e seus efeitos tóxicos. O ensaio larvicida com *A. salina* é muito utilizado em análises preliminares de toxicidade geral (SIQUEIRA et al., 1998; LOPES, et al., 2002; CORRÊA & PENAFORT, 2011).

O bioensaio com *A. salina* (*Brine Shrimp Test*) consiste em avaliar a susceptibilidade desses microcrustáceos frente à exposição de um determinado constituinte (extratos, substâncias químicas, pesticidas, entre outros). A análise de toxicidade é feita empregando-se a concentração média letal (CL₅₀) como parâmetro de avaliação da atividade biológica (MEYER, 1982; DOLABELA, 1997). Extratos de espécies vegetais e derivados que apresentam alta toxicidade contra *A. salina*, geralmente, indicam um potencial elevado para atividades biológicas. Assim, a utilização deste microcrustáceo pode ser importante no direcionamento de estudos fitoquímicos e na busca de novos compostos bioativos (AMARANTE et al., 2011). Registros na literatura mostram uma correlação entre o ensaio larvicida usando *A. salina* com a atividade citotóxica e a anti-parasitária (DOLABELA, 1997; MCLAUGHLIN, 1998).

Este estudo teve por objetivo avaliar a atividade tóxica de extratos, frações e substâncias puras de espécies de Piperaceae do Estado do Rio de Janeiro, a partir do ensaio biológico com *Artemia salina* Leach. As espécies selecionadas para estudo foram *Piper cabralanum* C.DC., *Piper cernuum* Vell. var. *cernuum* Yunker e *Piper solmsianum* C.D.C:

Piper cabralanum C.DC (Fig. 1) possui porte arbustivo, mede entre 1,5 e 3,0 m de altura e ocorre em fragmentos de Mata Atlântica, próximo a encostas e locais frescos e sombrios (YUNKER, 1972). O primeiro registro de estudo químico e de atividade biológica com essa planta foi publicado por Moreira e colaboradores (2010). *Piper Cernuum* (Fig. 2) é um arbusto com até 6,0 m de altura, folhas grandes, pecíolo longo e bainha alada. Apresenta flores inseridas numa espiga que formam inflorescências com até 60 cm de comprimento e um pendúnculo de 3 a 5 cm de comprimento. É relativamente comum em florestas primárias e secundárias, nas quais há solos úmidos e constante formação de clareiras para germinação de sementes. Essa espécie é bastante conhecida como “parioparoba”, “João-guarandi-do-grato” e “pimenta de morcego”. Suas folhas são empregadas na medicina popular como analgésico, especialmente para

dores do estômago, contra problemas do fígado, dos rins e da circulação (YUNKER, 1972; MARIOT et al., 2003).

Piper solmsianum C.DC. (Fig. 3) é uma espécie arbustiva que mede entre 1,0 e 3,0 m de altura, comumente encontrada no Sudeste do Brasil. Não há usos medicinais descritos para esta planta. Análise do óleo essencial dessa espécie mostrou a presença de monoterpenos, sesquiterpenos e como componente principal um derivado arilpropanoide (sarisano ou asaricina - 39,2%). O óleo essencial das folhas de *Piper solmsianum* e seu constituinte majoritário (sarisano) apresentaram efeitos excitantes e depressores em testes realizados em camundongos (MOREIRA et. al., 2001). Em 2006, pesquisadores patentearam um biocida para o combate da dengue produzido a partir de uma lignana presente em *Piper solmsianum* (FERREIRA, 2007). Um estudo recente demonstrou propriedade antinoceptiva para duas substâncias isoladas dessa planta (conocorpano e o orientina). Essas substâncias demonstraram ser várias vezes mais eficazes do que os medicamentos de referência testados (SILVA et al., 2010).

Figura 1 - *P. cabralanum* C.DC.: A- ramos, B e C folhas, faces dorsal e ventral, respectivamente



Fonte: Coleção particular de Davyson de Lima Moreira.

Figura 2 – *Piper cernum* Vell.



Fonte: Coleção Particular de Davyson de Lima Moreira.

Figura 3 – *Piper solmsianum* C.DC.



Fonte: coleção particular de Davyson de Lima Moreira

MATERIAL E MÉTODOS:

Coleta do Material Vegetal: Folhas de *Piper cabralanum* (PCA), *Piper cernuum* (PC) e folhas e inflorescências de *Piper solmsianum* (PSin e PSfo), foram coletadas em áreas particulares nos municípios de Teresópolis/ RJ e na cidade do Rio de Janeiro, em 2009. As espécies foram identificadas pela especialista em Piperaceae Dra. Élsie Franklin Guimarães do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ). Amostras herborizadas foram depositadas no herbário do JBRJ. Essas espécies fazem parte do Projeto de Pesquisa do Dr. Davyson Moreira, registrado em Farmanguinhos/ FIOCRUZ com o título “*Estudo de Espécies de Piperaceae para a Proposição de Novos Fitomedicamentos contra a Leishmaniose*” (MOREIRA et al., 2010).

Preparação dos Extratos: As folhas e/ou inflorescências das espécies selecionadas foram secas em estufa com circulação de ar a 40°C, por 7 dias, rendendo 200g de PCA, 300g de PC, 80g de PSin e 350g de PSfo. O material obtido foi moído em moinho de facas e, em seguida, foi submetido, separadamente, à extração com metanol por maceração estática. O solvente foi trocado a cada 24h ou 48h até completa exaustão do material vegetal. O extrato metanólico foi concentrado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida. O extrato bruto concentrado (PCA = 20g; PC = 28g; PSin = 7g; PSfo = 34g) foi ressuspenso em solução de metanol/ água 3:7, sendo obtidas frações por partição líquido-líquido em *n*-hexano (800 ml), diclorometano (800ml), acetato de etila (1000 ml) e *n*-butanol (400ml). O resíduo aquoso final foi desprezado. Todas as frações obtidas foram concentradas em evaporador rotatório, sob pressão reduzida. Estudos fitoquímicos prévios levaram ao isolamento das substâncias puras eupomatenoide-6 (EUP-6) e sitosterol (SIT) da fração em *n*-hexano do extrato metanólico das folhas de *P. solmsianum* e da fração em *n*-hexano de *P. cabralanum*, respectivamente (MOREIRA et al., 1995; 2010).

Cultura de *Artemia salina*: A cultura de *A.*

salina foi feita em recipiente (mini-tanque) preparado a partir de garrafa PET limpa (Fig. 4). Inicialmente, 35g de sal marinho da marca *Mar Morto* (Red sea SA) foram solubilizados em 900 ml de água destilada. A densidade da solução salina foi mantida entre 1.020 e 1.030, com o auxílio de um densímetro *Professional Aquarium System* (ISTA, Brasil). A solução marinha sintética foi transferida para o recipiente e, em seguida, foram adicionados os cistos de *A. salina* obtidos da empresa Maramar Aquac. Com. In. Exp. Ltda. Os cistos foram incubados em temperatura de 26-28 °C, com luz constante (fornecida por luminária de 20W) e sob saturação de oxigênio, conseguida com auxílio de uma bomba de ar conectada ao fundo da garrafa (Fig. 4).

Figura 4 – Mini-tanque utilizado para eclosão dos cistos de *A. salina*



Fonte: Coleção Particular de Mônica Siqueira

Avaliação da Atividade Larvicida: A avaliação tóxica das espécies de Piperaceae foi testada conforme o método de Meyer (1982), modificado para se adequar às condições do laboratório. Resumidamente, cerca de 25 mg dos extratos e frações e 5 mg das substâncias puras foram solubilizados em até 1% de dimetilsulfóxido (DMSO) e com água salinizada até concentrações finais dos extratos ou das substâncias puras iguais a 12,5; 25; 50; 100 e 500 µg/ml. Após 48h da eclosão dos cistos de *A. salina*, larvas em estágio metanaúpio foram separadas (n=10) e incubadas na presença dos extratos. As análises foram realizadas em triplicata. Os tubos de ensaio ficaram mantidos no escuro. Após 24h, com o auxílio de uma pipeta e uma espátula, as larvas sobreviventes foram contadas, o que permitiu a obtenção da concentração média letal (CL₅₀). Um grupo controle contendo apenas uma solução aquosa salina e DMSO (até 1%) foi submetido ao mesmo procedimento experimental que os grupos tratados com os extratos e frações, contendo idênticos números de larvas, para efeitos

comparativos do veículo.

RESULTOS E DISCUSSÃO

A partir da pesquisa na literatura foi possível estabelecer um sistema de criação do microcrustáceo *A. salina* no laboratório. Esse sistema mostrou-se adequado para produzir artêmias em estágio de metanauplios para serem usadas nos ensaios (Fig. 4). O custo do sistema de criação do microcrustáceo pode ser considerado bastante adequado, pois utilizou-se uma garrafa PET de 2L, uma mini-bomba de aquário, sistema de iluminação (luminária de 20W), sal marinho, além dos equipamentos para medir densidade da água e temperatura.

Meyer e colaboradores (1982) estabeleceram uma relação entre a concentração média letal e o grau de toxicidade apresentado por extratos vegetais sobre larvas de *A. salina*, sendo então, considerados ativos ou detentores de substâncias bioativas aqueles que tiverem $CL_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$. Segundo a relação proposta por Meyer e colaboradores (1982), os extratos e frações obtidos a partir de *Piper cernuum* e *Piper solmsianum*, a fração em *n*-butanol de *Piper cabralanum* (PCA-BuOH) e as substâncias puras, eupomatenoide-6 e sitosterol (Fig. 5) foram considerados ativos, uma vez que mostraram uma concentração média letal até $500 \mu\text{g/ml}$ (Tabela 1).

Dolabela (1997) estabeleceu uma classificação de toxicidade mais rígida, com base nos valores de CL_{50} em *A. salina*. Os extratos para serem considerados **altamente tóxicos**, devem apresentar $CL_{50} < 80 \mu\text{g/ml}$; **moderadamente tóxicos** são aqueles extratos, frações e/ou substâncias que apresentam $CL_{50} > 80 \mu\text{g/ml}$ e $< 250 \mu\text{g/ml}$; e com **baixa toxicidade** ou **atóxicos** os que apresentam $CL_{50} > 250 \mu\text{g/ml}$. Dos extratos vegetais e substâncias testadas, a maior parte apresentou a concentração média letal entre 6,5 e $100 \mu\text{g/ml}$ (Tabela 1), logo, de acordo com a classificação de Dolabela, estariam classificados como altamente tóxicos ou moderadamente tóxicos. Apenas as frações em acetato de etila de *P. cernuum* (PC-AcOEt), fração em *n*-butanol de *P. solmsianum* (PS-BuOH) e os extratos obtidos a partir de *Piper cabralanum* (PCA-X) foram considerados de baixa toxicidade ou atóxicos, pois mostraram CL_{50} maior ou igual a $500 \mu\text{g/ml}$ (Tabela 2).

A atividade larvicida usando o bioensaio com *A. salina* demonstrou que o extrato metanólico das inflorescências de *P. solmsianum*

(PSin-MeOH) e as frações em *n*-hexano (PS-Hex), diclorometano (PS-DCM) e acetato de etila (PS-AcOEt) e a substância pura eupomatenoide-6 (Fig. 5), obtidas das folhas dessa espécie, podem ser consideradas **altamente tóxicas** (CL_{50} entre 25 e $6,5 \mu\text{g/ml}$). Das frações de *P. solmsianum* testadas, apenas a obtida com *n*-butanol (PS-BuOH) apresentou CL_{50} igual a $500 \mu\text{g/ml}$, sendo considerada de **baixa toxicidade** ou **atóxica**. Os resultados obtidos estão dispostos no gráfico 1. A substância majoritária (eupomatenoide-6) da fração em *n*-hexano do extrato metanólico das folhas de *P. solmsianum* apresentou baixo CL_{50} ($6,5 \mu\text{g/ml}$). A partir desses dados pode-se supor que a neolignana eupomatenoide-6 deve estar ligada diretamente à toxicidade da fração em *n*-hexano de *P. solmsianum*. Essa substância é uma forte candidata à triagem de substâncias com ação biológica.

Tabela 1 - Toxicidade aguda de extratos, frações e substâncias de Piperaceae em *A. salina*: amostras tóxicas segundo Dolabela (1997).

Extrato/Fração	Espécie vegetal	Parte Usada	CL_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
EUP-6	<i>P. solmsianum</i>	Folhas	6,5
PSin-MeOH	<i>P. solmsianum</i>	Inflorescências	12,5
PS-Hex	<i>P. solmsianum</i>	Folhas	12,5
PS-DCM	<i>P. solmsianum</i>	Folhas	12,5
PS-AcOEt	<i>P. solmsianum</i>	Folhas	25
PC-MeOH	<i>P. cernuum</i>	Folhas	25
SIT	<i>P. cabralanum</i>	Folhas	100
PC-Hex	<i>P. cernuum</i>	Folhas	100
PC-DCM	<i>P. cernuum</i>	Folhas	100
PC-BuOH	<i>P. cernuum</i>	Folhas	100

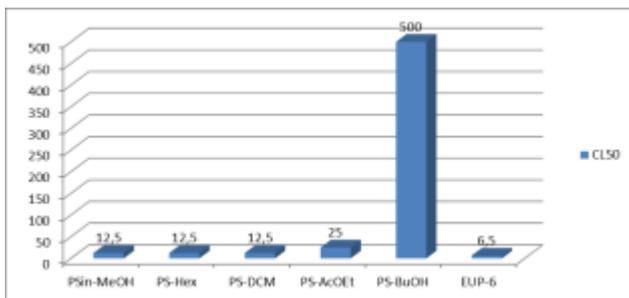
EUP-6 = eupomatenoide-6; SIT = sitosterol; PS = *P. solmsianum*; PC = *P. cernuum*.

Tabela 2- Toxicidade aguda de extratos e frações de Piperaceae em *A. salina*: amostras atóxicas segundo Dolabela (1997)

Extrato/Fração	Espécie vegetal	Parte Usada	CL_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
PC-AcOEt	<i>P. cernuum</i>	Folhas	500
PS-BuOH	<i>P. solmsianum</i>	Folhas	500
PCA-MeOH	<i>P. cabralanum</i>	Folhas	>500
PCA-Hex	<i>P. cabralanum</i>	Folhas	>500
PCA-DCM	<i>P. cabralanum</i>	Folhas	>500
PCA-AcOEt	<i>P. cabralanum</i>	Folhas	>500
PCA-BuOH	<i>P. cabralanum</i>	Folhas	500

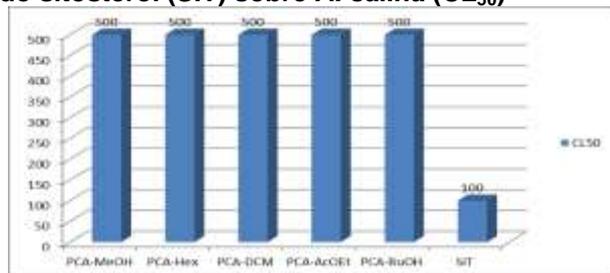
PS = *P. solmsianum*; PC = *P. cernuum*; PCA = *P. cabralanum*.

Figura 5 - Toxicidade de extratos de *P. solmsianum* e do eupomatenoide-6 (EUP-6) sobre *A. salina* (CL_{50})



Segundo a classificação de Dolabela (1997), o extrato metanólico de *P. cabralanum* (PCA-MeOH) e suas frações em *n*-hexano (PCA-Hex), diclorometano (PCA-DCM), acetato de etila (PCA-AcOEt) e *n*-butanol (PCA-BuOH) demonstraram **ser atóxicas** para os metanaúplios de *A. salina*, uma vez que a concentração média letal encontrada foi igual ou superior a 500 µg/ml, conforme mostrado no gráfico 2. A substância pura sitosterol, isolada da fração em *n*-hexano de *P. cabralanum* (PCA-Hex) (MOREIRA et al., 2010), demonstrou **moderada toxicidade** frente às larvas de *A. salina* (gráfico 2).

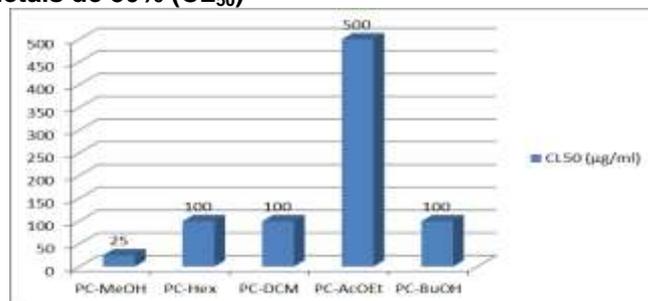
Figura 6 – Toxicidade de extratos de *P. cabralanum* e do sitosterol (SIT) sobre *A. salina* (CL₅₀)



Sabe-se que o sitosterol (Fig. 5), um esteroide comum em plantas, apresenta baixa toxicidade em humanos e possui atividade antiinflamatória. Por isso, junto com seu derivado glicosilado é usado em muitos países, como a Alemanha para o tratamento de hiperplasia prostática benigna (HPB). Desde 1974, o Harzol® é amplamente comercializado na Alemanha, para o tratamento da HPB. Esse medicamento consiste na combinação de sitosterol (SIT) com o seu derivado 3-O-glicosilado (SITG) na proporção de 10,0 mg de SIT para 0,1 mg SITG por cápsula, e a dose diária recomendada para o tratamento é de 2 cápsulas, 3 vezes ao dia, ou seja, cerca de 6 mg de fitoesteróides/ dia (PEGEL, 1997; NAIR & KANFER, 2008). Nossos achados são muito importantes, pois ensaios realizados previamente pelo grupo (MOREIRAL et al., 2010) demonstraram uma excelente atividade leishmanicida para o extrato metanólico das

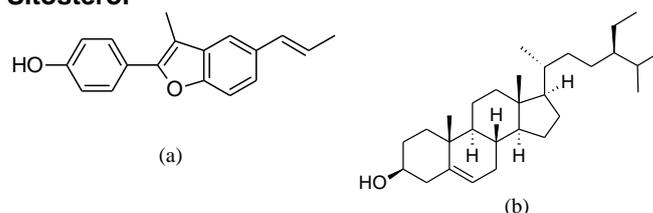
folhas e para a partição em *n*-hexano desse extrato. Esses dados são muito relevantes quando se busca alternativas para o tratamento de leishmaniose: substâncias ativas x ausência de toxicidade.

Figura 7 – Toxicidade de extratos de *P. cernuum* sobre *A. salina*, expressas em concentrações letais de 50% (CL₅₀)



Na avaliação do extrato metanólico de *Piper cernuum* (PC-MeOH) verificou-se uma **alta toxicidade** frente às larvas de *A. salina* (CL₅₀ = 25 µg/ml). Já suas frações em *n*-hexano (PC-Hex), diclorometano (PC-DCM), e *n*-butanol (PC-BuOH) apresentaram concentração média letal de 100 µg/ml, podendo ser consideradas **moderadamente tóxicas**. Esses resultados colocam essa planta dentre uma das fortes candidatas na triagem por substâncias antitumorais. A fração em acetato de etila (PC-AcOEt) foi a única que se mostrou **fracamente tóxica** ou **atóxica**, com um CL₅₀ igual a 500 µg/ml (Gráfico 3).

Figura 8 - (a) Fórmula estrutural do eupomatenoide-6; (b) Fórmula estrutural do Sitosterol



CONCLUSÃO

Dos extratos, frações e substâncias puras testados, destacam-se os extrato de *P. solmsianum* (PSin-MeOH, PS-Hex, PS-DCM, PS-AcOEt), o extrato metanólico das folhas de *P. cernuum* (PC-MeOH) e a substância eupomatenoide-6, que apresentaram alta toxicidade frente às larvas de *Artemia salina* e serão submetidos a testes para avaliação de atividade citotóxica *in vitro*, como parte de um projeto para busca de substâncias anti-leucêmicas. As frações em *n*-hexano, diclorometano e *n*-butanol de *Piper cernuum* e o

esteróide sitosterol, isolado da fração em *n*-hexano de *Piper cabralanum*, mostraram-se moderadamente tóxicas e, por isso, podem ser detentoras de ação anti-parasitária. Os extratos e frações obtidos a partir de folhas de *Piper cabralanum* e as frações em acetato de etila de *Piper cernuum* e em *n*-butanol de *Piper solmsianum* foram considerados fracamente tóxicos ou atóxicos e, portanto, bastante seguros para aplicações em fitomedicamentos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao apoio financeiro do CNPq, CAPES, FAPERJ, Farmanguinhos e à professora Elsie F. Guimarães pelo apoio constante e pela identificação das espécies vegetais.

REFERÊNCIAS

AMARANTE, C. B. do; MULLER, A. R.; PÓVOA, M. M.; DOLABELA, M. F.; Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazônia**, v.41, n.3, p.431-434, 2011;

APGIII - STEVENS, P.F. September 28, 2013 - University of Missouri, St Louis, and Missouri Botanical Garden. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>;

CARNAVAL, A.C.; HICKERSON, M.J.; HADDAD, C.F.B.; RODRIGUES, M.T.; MORITZ, C. **Science**, v.323, n.5915, p.785-789, 2009;

CORRÊA, J. M.; PENAFORT, J. M.; Considerações sobre biologia e utilização de *Artemia* sp. (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca). **Revista Eletrônica de Veterinária**, v.12, n.12, 2011;

DOLABELA, M.F. **Triagem *in vitro* para a atividade antitumoral e anti-T. cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas**. Belo Horizonte. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, 128p, 1997;

DYER, L. A.; PALMER, A. D. N. **Piper: A Model Genus for Studies of Pytochemistry, Ecology, and Evolution**. Kluwer Academic Publisher/New York, chap 7, 2004;

FERREIRA, PABLO. **Desenvolvido um novo**

biocida para combater a dengue. AGÊNCIA FIOCRUZ DE NOTÍCIAS. 27 de fevereiro de 2007. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=725&sid=9>>. Acesso em 15/07/2014;

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. M.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multiciência: construindo a história dos Produtos Naturais**, v.7, outubro de 2006;

GUADALUPE-ROJAS, M.; MOREIRA, D.L.; PEREIRA, N.A.; KAPLAN, M.A.C. Atividade antiinflamatória de extratos de *Piper aduncum* L. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v.80, p.5-6, 1999;

GRAHAN, J.G.; QUINN, M.L.; FABRICANT, D.S.; FARNSWORTH, N.R. Plants used against cancer - an extension of the work of Jonathan Hartwell. **J. Ethnopharmacol.**, v.73,p.347–377, 2000; JARAMILLO, M.A. & MANOS, P.S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, v.88,n.4,p.706-716, 2001;

JOLY, A.B. **Introdução à Taxonomia Vegetal**. 7ª ed. São Paulo: Ed. Nacional, 777p, 1985;

LOPES, W. B.; MORONI, F. T.; BRANDEBURGO, M. I. H.; HAMAGUCHI, A. Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais. **Revista Eletrônica Horizonte Científico**, v.1, p. 1-11, 2002;

MARIOT, A.; MANTOVANI, A.; REIS, M. S. Uso e conservação de *Piper cernuum* Vell. (Piperaceae) na Mata Atlântica: I. Fenologia reprodutiva e dispersão de sementes. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.5, n.2, p.1-10, 2003;

MARQUES, A.M.; VELOZO, L.S.M.; BARRETO, A.L.; BATISTA, E.M.; CURVELO, J.A.; MOREIRA, D.L.; GUIMARÃES, E.F.; SOARES, R.M.; KAPLAN, M.A.C. Chemistry and Biological Activity of Essential Oils from *Piper clausenianum* (Miq.) C.DC. (Piperaceae). **Natural Product Communications**, v.5, p.1837-1840, 2010;

MARQUES, A.M.; VELOZO, L.S.M.; MOREIRA, D.L.; GUIMARÃES, E.F.; KAPLAN, M.A.C. Aristolactams from roots of *Ottonia anisum*

- Spreng. (Piperaceae). **Natural Product Communications**, v.6, p.939-942, 2011;
- MCLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L.; ANDERSON, J. E.; The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**, v. 32, p. 513–524, 1998;
- MEYER B.N., FERRIGNI N.R., PUTNAM L.B., JACOBSEN L.B., NICHOLS D.E., MCLAUGHLIN J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 45, p. 31-34, 1982;
- MONT'ALVERNE, T.F. & ANDRADE, D.A. O acesso justo e equitativo à biodiversidade brasileira como direito fundamental à saúde. **Constituição e garantia de direitos**, v.4,n.1,p.1-14, 2011;
- MOREIRA, D.L.; GUIMARÃES, E.F.; KAPLAN, M.A.C. Constituintes Químicos de *Piper solmsianum* C.DC. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v.76,n.4,p.106-109, 1995;
- MOREIRA, D.L.; GUIMARÃES, E.F.; KAPLAN, M.A.C. Non-Polar Constituents from *Piper lhotzkyanum*. **Phytochemistry**, v.49, n.5, p.1054-1057, 1998a;
- MOREIRA, D.L.; GUIMARÃES, E.F.; KAPLAN, M.A.C. A chromene from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v.48,n.3,p.1075-1077, 1998b;
- MOREIRA, D.L. **Aspectos químicos e farmacológicos de Piperaceae**. Tese (Doutorado em Química de Produtos Naturais) - Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999;
- MOREIRA, D.L.; GUIMARÃES, E.F.; KAPLAN, M.A.C. A C-glucosylflavone from Leaves of *Piper lhotzkyanum*. **Phytochemistry**, v.55, n.7, p. 783-786, 2000;
- MOREIRA, D.L.; CARDOSO, G.L.; SOUZA, P.O.; GUIMARÃES, E.F.; PEREIRA, N.A.; KAPLAN, M.A.C. Effect of Leaf Essential Oil from *P. solmsianum* C.DC. in Mice Behaviour. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v.73, n.1, p.33-37, 2001;
- MOREIRA, D.L.; FONSECA, V.M.; BHERING, C.A.; VASCONCELOS, F.G.; TORRES-SANTOS, E.C.; KAPLAN, M.A.C. Estudo Químico e da Atividade leishmanicida de frações de *Piper cabralanum* C.DC. (Piperaceae). **Revista Fitos (ALANAC)**, v.5,p.92-98, 2010;
- NAIR, Vipin D.P.; KANFER, I. Sterols and sterolins in *Hypoxis hemerocallidea* (African potato). **S. Afr. j. sci.**, Pretoria, v. 104, n. 7-8, 2008;
- NINO, J.; NARVÁEZ, D. M.; MOSQUERA, O. M.; CORREA, Y. M. Antibacterial, Antifungal and Cytotoxic activities of eight Asteraceae and two Rubiaceae plants from Colombian biodiversity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.566-570, 2006;
- PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; BISHT, K.S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O.D.; PRASAD, A.K.; WENGEL, J.; OLSEN, C.E.; BOLL, P.M. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v.46,n.4,p.597-673, 1997;
- PEGEL, K.H. The importance of Sitosterol and Sitosterolin in human and animal nutrition. **The South African Journal of Science**. v.93, p.263-268, 1997;
- PEIXOTO, A.L.; MORIM, M.P. Coleções botânicas: documentação da biodiversidade brasileira. **Cienc. Cult.**, v.55,n.3,p. 21-24, 2003;
- RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSENA, A.C.; PONZONIB, F.J.; HIROTA; M.M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v.142, n.6,p.1141–1153, 2009;
- SEIDL, P.R. Pharmaceuticals from natural products: current trends. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v.74, n.1, p. 145-150, 2003;
- SILVA, R. Z.; YUNES, R. A.; SOUZA, M. M.; MONACHE, F.D.; FILHO-CECHINEL, V. Antinociceptive properties of conocarpan and orientin obtained from *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* (Piperaceae). **J Nat Med**. v.64, p. 402–408, 2010;
- SIQUEIRA, de J. M.; BOMM, M.D.; PEREIRA, N. F. G.; GARCEZ, W. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Estudo Fitoquímico de *Unonopsis lindmani*-Annonaceae, Biomonitorado pelo Ensaio de Toxicidade sobre *Artemia salina* Leach. **Química Nova**. v.21, n.5, p. 557-559, 1998;
- SUNILA, E.S.; KUTTAN, G. Immunomodulatory

and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. **J. Ethnopharmacol.**, v.90, n.2-3, p.339-346, 2004;

TEBBS, M.C. Piperaceae. Pp. 516-520. In: K. Kubitzki; J. G. Rohwer; V. Bittrich. Flowering Plants Dicotyledons - The Families and Genera of Vascular Plants. vol. 2. Springer Berlin Heidelberg, 1993;

VELOZO, L.S.M. **Química e Atividade Biológica de Piperacea Brasileiras**, Tese (Doutorado em Química de Produtos Naturais) - Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 150p, 2004;

VELOZO, L.S.M.; FERREIRO, M.J.P.; SANTOS, M.I.S.; MOREIRA, D.L.; EMERECIANO, V.P.; KAPLAN, M.A.C. Unusual chromenes from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry**, v.67,n.492-496, 2006;

VELOZO, L.S.M.; FERREIRA, M.J.P.; SANTOS, M.I.S.; MORIERA, D.L.; GUIMARÃES, E.F.; EMERECIANO, V.P.; KAPLAN, M.A.C. C-glycosyl flavones from *Peperomia blanda*. **Fitoterapia**, v.80,p.119-122, 2009;

YUNKER, T.G. The Piperaceae of Brazil. *Hoehnea*, v.2,n.19,p.19-366, 1972.