



Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L.

Pergentino J. C. Sousa,^{*1} Carlos A. L. Barros,¹ José Carlos S. Rocha,¹ Denisléia S. Lira,¹
Gisele M. Monteiro,¹ José Guilherme S. Maia²

¹Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, 66075-110
Belém-PA, Brasil,

²Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Centro Tecnológico, Universidade Federal do Pará,
66075-900 Belém-PA, Brasil

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo a avaliação da toxicidade aguda e subaguda do óleo essencial de *Piper aduncum* pela determinação da DL₅₀ em camundongos e a análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratos. A planta é utilizada na medicina popular da região amazônica em diversas doenças e no seu óleo essencial o constituinte majoritário é o fenilpropanóide dilapiol, com propriedades inseticida, fungicida, bactericida, larvicida e moluscicida. A DL₅₀ foi de 2,400 ± 191,7 mg/kg. O óleo essencial não alterou de maneira significativa os parâmetros hematológicos e bioquímicos em relação ao controle no tratamento subagudo, exceto a redução da creatinina. O valor da DL₅₀ e os resultados observados nos parâmetros hematológicos e bioquímicos sugerem que o óleo essencial apresenta toxicidade baixa.

Unitermos: *Piper aduncum*, Piperaceae, óleo essencial, toxicidade aguda, toxicidade subaguda.

ABSTRACT: “Toxicological evaluation of the essential oil of *Piper aduncum* L.” The aim of this work was the acute and subacute toxicological evaluation of the essential oil of *Piper aduncum* with the determination of the LD₅₀ in mice and the analysis of their hematological and biochemical parameters in rats. The plant is used in the Amazon folk medicine for several diseases and the phenylpropanoid dilapiolle is the main constituent of its essential oil, possessing insecticidal, fungicidal, bactericidal, larvicidal and molluscicidal properties. The LD₅₀ was 2.400 ± 191.7 mg/kg. The essential oil did not change the hematological and biochemical parameters in a significant manner when compared with the control in the subacute treatment, excepting the reduction of creatinine. The LD₅₀ and the hematological and biochemical results have suggested that the essential oil presents low toxicity.

Keywords: *Piper aduncum*, Piperaceae, essential oil, acute toxicity, subacute toxicity.

INTRODUÇÃO

Piper é o maior gênero da família Piperaceae com mais de 700 espécies, dos quais cerca de 170 crescem de forma nativa no Brasil (Yuncker, 1972). Além de *P. nigrum*, a espécie mais popular e usada largamente como condimento, muitas outras espécies possuem atividades farmacológica, inseticida, ou outros usos econômicos (Amorim et al., 2007; Agra et al., 2007; Brandão et al., 2006 & 2008). Como parte de um extensivo levantamento das plantas aromáticas da região amazônica, foram coletados espécimes de *P. aduncum* L., que é um arbusto de ampla distribuição tropical, com ocorrência em solos areno-argilosos, conhecido popularmente como “pimenta-de-macaco” e “aperta-ruão”. Esta espécie é considerada uma planta oportunista que invade áreas desflorestadas após exploração de madeira, de alta rusticidade e elevada resistência às mudanças climáticas.

O uso medicinal de “pimenta-de-macaco” tem

sido relatado: em doenças ginecológicas e distúrbios intestinais (Van den Berg, 1993), como diurético, antienfame, carminativo, excitante digestivo, para males do fígado, no combate a erisipela e tratamento de úlceras crônicas (Coimbra, 1994). Extratos orgânicos das folhas de *P. aduncum* apresentaram atividades moluscicida, citotóxica e antibacteriana, para as quais se associou a presença de dihidrochalconas e derivados prenilados do ácido benzóico (Orjala et al., 1993 & 1994). O óleo essencial de *P. aduncum* foi testado contra o fungo *Clinipellis pernicioso*, conhecido como “vassoura-de-bruxa”, responsável por ataque patogênico ao cacau e cupuaçu. Na concentração de 50 a 100 ppm inibiu 100% o crescimento e a germinação deste fungo (Bastos, 1997). O óleo essencial de *P. aduncum* apresentou atividade inseticida e larvicida contra insetos fitófagos e mosquitos transmissores de dengue e malária, eliminando-os totalmente em baixas concentrações (Bernard et al., 1995; Souto, 2006).

O óleo essencial de *P. aduncum* apresenta

* E-mail: pjcsou@ufpa.br; Tel./Fax +55-91-32017204

excelente rendimento (2,5 a 3,5%) e é rico em dilapiol (31,5 a 91,1%), um éter fenílico com elevado padrão de oxigenação (Maia et al., 1998). Este composto com grau de pureza de 99,0% (Almeida, 2004) foi testado e comprovou ser o responsável pelas atividades fungicida, larvicida, inseticida e moluscicida, citadas acima.

Em virtude da utilização do *P. aduncum* na medicina popular avaliou-se a toxicidade aguda e sub-aguda do seu óleo essencial, determinando o valor da DL₅₀ em camundongos e avaliando os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos ratos tratados com o óleo essencial durante 30 dias.

MATERIAL E MÉTODOS

Planta

As partes aéreas (folhas e ramos finos) da planta foram coletadas no Município de Ananindeua, Estado do Pará. Um exemplar da planta (#155.664) foi identificado como *Piper aduncum* L. e incorporado ao herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, PA.

Processamento

As partes aéreas da planta (150 g), secas ao ar livre por 5 dias, foram submetidas à hidrodestilação por 4 horas usando-se aparelhos do tipo Clevenger, como recomendado pela Farmacopéia Britânica (British Pharmacopoeia Commission, 2003). O óleo (OEPA) foi seco na presença de sulfato de sódio, apresentando rendimento de 2,5%. Em seguida, o óleo foi armazenado em frasco âmbar e mantido no refrigerador.

Análise cromatográfica do óleo

Os dados quantitativos do óleo foram obtidos por integração da área dos picos do cromatograma usando-se cromatógrafo de gás HP 5890, operando com uma coluna capilar de sílica WCOT CP-Sil CB (25 m x 0,25 mm; 0,25 µm espessura do filme) em temperatura programada para 60-240 °C (3 °C/min), temperatura do injetor a 220 °C, temperatura do detector de ionização de chamas a 250 °C e injeção do tipo splitless (1 µL, of a 2:1000 sol.hexano). Nestas condições o dilapiol, componente principal do óleo, apresentou um teor de 88,9% e foi identificado por comparação de seu tempo de retenção com aquele de uma amostra autêntica.

Animais

Foram utilizados camundongos Swiss albinos, machos, pesando entre 20 e 30 g, além de ratos (*Rattus norvegicus*) jovens, machos e fêmeas, pesando entre 80 e 100 g, provenientes do Biotério da Fundação Instituto Evandro Chagas (Belém, PA) e mantidos no Laboratório de Farmacodinâmica da UFPA, em ambiente climatizado,

com ciclos de 12 h no claro e 12 h no escuro, tratados com água e ração *ad libitum*. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPAN) da UFPA, através do parecer FM001/2005.

Determinação da DL₅₀

Neste estudo foram utilizados 60 camundongos Swiss albinos, machos, divididos em grupos de 10 animais. Cada grupo, em jejum de 12 horas, recebeu por via oral (cânula oro-gástrica) doses do OEPA que variaram de 1000 a 3000 mg/kg. Em seguida, os animais foram colocados em gaiolas com ração e água *ad libitum* e observados durante 72 horas para observação dos parâmetros comportamentais, segundo teste hipocrático descrito por Malone & Robichaud (1962). O número de mortes de cada grupo foi expresso como o percentual do número total de animais que receberam o OEPA. A determinação da DL₅₀ foi feita através da interpolação semi-logarítmica, sendo postos no eixo das ordenadas os valores dos probitos correspondentes ao percentual de mortes e, no eixo das abcissas, as doses administradas de OEPA (Miller & Tainter, 1994).

Toxicidade sub-aguda

Neste estudo foram utilizados ratos albinos, machos e fêmeas, divididos em grupos de 12 animais (6 machos e 6 fêmeas) e separados em gaiolas de acordo com o sexo. Os grupos receberam por via oral (cânula oro-gástrica), durante 30 dias (Jong et al., 1999., Toyoda et al., 2000., Vijayalakshmi et al., 2000., Yanagisawa et al., 1998), doses de OEPA. O grupo controle recebeu água destilada correspondente a 0,1 mL/100 g de peso vivo e Tween 80 a 1%. Os grupos tratados receberam as doses de 1/10 e 1/20 da DL₅₀ do OEPA, além de água destilada e Tween 80 a 1% em concentração suficiente para solubilizar o óleo. Nos 30 dias de experimentos os animais foram monitorados quanto a eventuais alterações comportamentais ou de natureza tóxica. Em intervalos de 2 dias os animais foram pesados e, diariamente, tanto água quanto ração, medidos e pesados. A avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Farmácia da UFPA. Os animais foram anestesiados com éter etílico e a coleta do sangue foi realizada por punção cardíaca ventricular ou punção do plexo venoso orbital, utilizando-se agulhas e seringas e tubos de microhematócrito.

Análise estatística

A análise estatística foi expressa como média ± erro padrão da média (EPM.) e os resultados comparados pelo teste "t" de Student (não pareado), utilizando-se o programa Sigma Stat. Valores com p < 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Os

Tabela 1. Desenvolvimento ponderal dos ratos tratados com OEPA 120 e 240 mg/kg/dia, durante 30 dias.

Grupos	Média ± E.P.M. (expresso em gramas)
Controle (n = 10)	80,8 ± 11,50g
OEPA 120 mg/kg (n = 10)	57,6 ± 8,40g*
OEPA 240mg/kg (n = 10)	59,5 ± 8,84g*

Os valores acima (média ± EPM), representam a variação de peso dos ratos durante 30 dias de tratamento.

* p < 0,05 ANOVA, seguida do teste de Student - Newmann - Keuls.

n representa o número de animais em cada grupo.

Tabela 2. Parâmetros hematológicos de ratos tratados com OEPA 120 e 240 mg/kg/dia, durante 30 dias.

Parâmetros	Controle (n = 10)	OEPA 120 mg/kg (n=10)	OEPA 240 mg/kg (n = 10)
Hemácias (mm ³)	6,52 ± 0,66 (5,20 - 7,83)	5,56 ± 0,76	5,74 ± 0,52
Hemoglobina (g/dL)	14,02 ± 1,02 (11,98 - 16,05)	12,15 ± 1,89	13,00 ± 1,02
Hematócrito (%)	43,60 ± 2,36 (38,89 - 48,31)	41,48 ± 3,80	43,16 ± 2,35
VCM (fL)	67,20 ± 4,44 (58,34 - 76,06)	75,4 ± 7,83	75,7 ± 7,11
HCM (pg)	21,58 ± 0,92 (19,74 - 23,42)	21,42 ± 1,13	22,78 ± 1,63
CHCM (g/dL)	32,11 ± 1,02 (30,07 - 34,14)	30,15 ± 1,35	30,19 ± 1,87
RDW (%)	15,47 ± 1,74 (12,00 - 18,94)	14,85 ± 1,15	15,71 ± 1,19
Plaquetas (mm ³)	641,50 ± 157,03 (328,07 - 954,93)	510,70 ± 129,81	579,00 ± 110,10
Leucócitos totais (mm ³)	6,32 ± 1,52 (3,29 - 9,35)	7,74 ± 2,21	5,98 ± 1,40

Os valores representam a média ± DPM (desvio padrão da média).

O intervalo de confiança, calculado a partir do DPM do controle x 1,996, é fornecido entre parênteses.

n representa o número de animais em cada grupo.

Tabela 3. Parâmetros bioquímicos de ratos tratados com OEPA 120 e 240 mg/kg/dia, durante 30 dias.

Parâmetros	Controle (n = 10)	OEPA 120 mg/kg (n = 10)	OEPA 240 mg/kg (n = 10)
Glicose (mg/dL)	99,00 ± 8,61 (81,81 - 116,18)	115,20 ± 11,56	94,90 ± 17,70
Uréia (mg/dL)	49,40 ± 6,90 (35,62 - 63,17)	49,43 ± 4,82	48,04 ± 7,65
Creatinina (mg/dL)	1,03 ± 0,06 (0,91 - 1,42)	0,84 ± 0,39*	0,55 ± 0,32*
Triglicérides (mg/dL)	72,22 ± 28,08 (16,17 - 128,26)	73,80 ± 28,71	66,11 ± 24,39
TGO (U/mL)	55,40 ± 22,74 (10,01 - 100,79)	69,70 ± 18,23	64,60 ± 24,15
TGP (U/mL)	61,30 ± 8,07 (45,19 - 77,41)	63,40 ± 8,90	64,40 ± 8,22
Fosfatase alcalina (U/I)	97,48 ± 18,14 (61,27 - 133,68)	98,70 ± 16,08	85,99 ± 27,70

Os valores representam média ± DPM (desvio padrão da média).

O intervalo de confiança, calculado a partir do DPM do controle x 1,996, é fornecido entre parênteses.

*Significativo em relação ao grupo controle.

n representa o número de animais em cada grupo.

resultados dos parâmetros bioquímicos e hematológicos foram expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM.) e comparados pelo intervalo de confiança (IC = D.P.M. \times 1,96) obtido do grupo controle, sendo considerados significativos os valores que ficaram fora deste intervalo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na determinação da DL₅₀ os camundongos que receberam por via oral doses de 1000, 2000, 2350, 2500, 2700 e 3000 mg/kg do óleo essencial de *Piper aduncum* apresentaram um percentual de mortalidade variando de 0, 30, 40, 60, 80 e 100%, respectivamente. O valor da DL₅₀, obtido por interpolação semi-logarítmica, correspondeu a 2.400 \pm 191,7 mg/kg de massa corpórea. Segundo a Organização da Cooperação Econômica e Desenvolvimento (2001) o óleo de *P. aduncum* pertence à classe dos agentes xenobióticos, de baixa toxicidade. Após administração das doses diárias constatou-se que em todas as doses os animais apresentaram perda de equilíbrio, respiração abdominal e ausência de coordenação motora. Em doses entre 200 e 2000 mg/kg os camundongos apresentaram aumento na excreção de fezes e urina e a partir da dose de 3500 mg/kg os animais ficaram momentaneamente paralisados e com redução na excreção de fezes e urina.

No estudo da toxicidade sub-aguda do óleo essencial de *Piper aduncum* em ratos observou-se que não houve alteração no comportamento dos animais ou no consumo de água e ração. No entanto, em relação ao desenvolvimento ponderal observou-se diferença estatisticamente significativa entre os animais do grupo controle e os animais administrados com doses de 1/10 (240 mg/kg) e 1/20 (120 mg/kg) da DL₅₀, cujos valores encontram-se na Tabela 1.

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue obtidos no final do tratamento encontram-se nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. Conforme pode ser observado na Tabela 3, somente a creatinina apresentou alteração significativa dentre os parâmetros bioquímicos.

Os sintomas que parecem depender da ação do OEPA sobre o Sistema Nervoso Central provavelmente não ocorrem como consequência destes efeitos, uma vez que no teste da placa aquecida (modelo experimental para avaliação de fármacos com ação central) o OEPA não apresentou nenhuma atividade (Sousa et al., 2003).

As avaliações do desenvolvimento ponderal e dos parâmetros hematológicos e bioquímicos observadas após o uso das doses correspondentes a 1/10 (240 mg/kg) e 1/20 (120 mg/kg) da DL₅₀ mostraram que, com exceção da perda do peso corporal e da redução do valor da creatinina, não houve alteração significativa nos outros parâmetros. Segundo Megan (1998) a creatinina forma-se no músculo pela remoção irreversível de água do fosfato de creatina. O valor sérico da creatinina influencia na

massa muscular, na nutrição e na ocorrência de edema (Soares et al., 2002). Como pode ser observado houve uma significativa perda de peso nos animais tratados com as doses de 120 e 240 mg/kg. Como a creatinina é a principal reserva de energia muscular justifica-se a diferença ponderal entre os animais tratados com as doses de OEPA e o grupo controle.

Os resultados obtidos nos levam a concluir que o óleo essencial de *Piper aduncum*, nas doses utilizadas, possui uma margem elevada de segurança, com efeitos tóxicos mínimos sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos.

AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos ao Programa de Biodiversidade do Ministério da Ciência e Tecnologia (PPBio/MCT) pelo suporte financeiro e ao Instituto Evandro Chagas pelo fornecimento dos animais.

REFERÊNCIAS

- Agra MF, França PF, Barbosa-Filho JM 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 17: 114-140.
- Almeida RRP 2004. Isolamento, purificação e isomerização do dilapiol, componente majoritário do óleo essencial de *P. aduncum* para comprovação de sua atividade biológica. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará, Curso de Pós-Graduação em Química, Belém.
- Amorim MFD, Diniz MFFM, Araújo MST, Pita JCLR, Dantas JG, Ramalho JA, Xavier AL, Palomaro TV, Júnior NLB 2007. *Rev Bras Farmacogn* 17: 448-454.
- Bastos CN 1997. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis perniciosae* e outros fungos fitopatogênicos. *Fitopatol Brasil* 22: 441-443.
- Bernard CB, Krishnamurty HG, Chauret D, Durst T, Philogéne BJR, Sanchez-Vindas P, Hasbun
- C, Poveda L, San Román L, Arnason JT 1995. Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. *J Chem Ecol* 21: 801-814.
- Brandão MGL, Cosenza GP, Moreira RA, Monte-Mor RLM 2006. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev Bras Farmacogn* 16: 408-420.
- Brandão MGL, Zanetti NNS, Oliveira GRR, Goulart LO, Monte-Mor RLM 2008. Other medicinal plants and botanical products from the first edition of the Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev Bras Farmacogn* 18: 127-134.
- British Pharmacopoeia Commission 2003. London: The Stationery Office.
- Coimbra R 1994. *Manual de fitoterapia*. 2 ed. Belém: CEJUP.
- Jong WH, Kruese ED, Vos JG, Van Loveren H. 1999. Detection of immunotoxicity of benzo[a]pyrene in a subacute toxicity study after oral exposure in rats. *Toxicol sci* 50: 214-220
- Maia JGS, Zoghbi MGB, Andrade EHA, Santos AS, Silva, MHL, Luz AIR, Bastos CN 1998. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the

- Amazon region. *Flavour Fragr J* 13: 269-272.
- Malone MH, Robichaud RC 1962. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Lloydia* 25: 320-332.
- Megan SV 1998. Nutrição. In: Burtis, C. A.; Ashwood, E. R(eds.). *Fundamentos de Química Clínica*, 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.442-453.
- Miller LC, Tainter ML 1994. Estimation of the LD₅₀ and its error by means of logarithmic probit graph paper. *Proc Soc Exp Biol Med*.57: 261-264.
- Organization of Economic Co-operation and Development (OECD) 2001. In: The Revised Up-and-Down Procedure: A Test Method for Determining the Acute Oral Toxicity of Chemicals. *NIH Publication* No 02-4501.
- Orjala J, Erdelmeier CAJ, Wright AD, Rali T, Sticher O 1993. Chromenes and prenylated benzoic-acid derivative from *Piper aduncum*. *Phytochemistry* 34: 813-818.
- Orjala J, Erdelmeier CAJ, Wright AD, Rali T, Sticher O 1994. Cytotoxic and antibacterial dinydrochalcones from *Piper aduncum*. *J Nat Prod* 57: 18-26.
- Soares JLMF, Pasqualotto AC, Rosa DD, Leite VSR 2002. *Métodos diagnósticos-Consulta Rápida*. Porto Alegre: Artmed Editora.
- Sousa PJC, Fontes Júnior EA, Rocha JCS, Sousa RC, Carvalho RA, Maia JGS 2003 Antiedematogenic and antinociceptive effects of essential oil from *Piper aduncum* L. *XXII Congresso Ítalo-Latino-Americano de Etnomedicina*. Rio de Janeiro, Brasil.
- Souto RNP 2006. *Avaliação das atividades repelente e inseticida de óleos essenciais de Piper da Amazônia em Anopheles marajoara, Stegomyia aegypti e Solenopsis saevissima*. Belém, 221p. Tese de doutorado: Curso de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade Federal do Pará e Museu Paraense Emílio Goeldi.
- Toyoda K, Shibutani M, Tamura T, Koujitani T, Uneyama C, Hirose M 2000. Repeated dose (28 days) oral toxicity study of flutamide in rats based on the draft protocol for the “Enhanced OECD Test Guideline 407” for screening for endocrine disrupting chemicals. *Arch Toxicol* 74: 32-127.
- Van den Berg ME 1993. *Plantas medicinais na Amazônia: Contribuição ao seu conhecimento sistemático*. 2 ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi.
- Vijayalakshmi T, Muthulakshmi V, Sachdanandam P 2000. Toxic studies on biochemical parameters carried out in rats with serankottai nei, a siddha drug-milk extract of *Semecarpus anacardium* nut. *J Ethnopharmacol* 69: 9-15.
- Yanagisawa T, Maemura S, Sasaki H, Endo T, Okada M, East PW, Virgo DM, Creasy DM 1998. Subacute and chronic toxicity studies of tryethylenetetramine dihydrochloride (TJA-250) by oral administration to F-344 rats. *J Toxicol Sci* 42: 619.
- Yuncker TG 1972. The Piperaceae of Brazil I. *Piper* - Group I, II, III, IV. *Hoehnea* 2: 19-366.