



## Estudo toxicológico pré-clínico (agudo) do extrato do *Syzygium aromaticum* (L) em roedores

Rômulo O. H. Valente,<sup>1</sup> Fábio C. Sampaio,<sup>\*1</sup> Ivone A. Souza,<sup>2</sup> Jane S. Higino<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa Integrado de Pós-Graduação em Odontologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900 João Pessoa-PB, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Arthur de Sá, s/n, 50740-521 Recife-PE, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Arthur de Sá, s/n, 50740-521 Recife-PE, Brasil

**RESUMO:** O objetivo desta pesquisa foi estimar a toxicidade aguda do extrato do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* Linné) em roedores. O extrato hidro-alcoólico a 80% foi concentrado em evaporador rotativo obtendo-se uma mistura final de extrato pilular. Camundongos albinos (*Mus musculus*) fêmeas, divididos em 13 lotes de seis animais foram observados por 24 horas a partir da administração do extrato diluído em solução fisiológica a 0,9% nas dosagens de 137,5; 180; 187,5; 250; 375; 437,5; 500 e 1.000 mg/kg para via intraperitoneal e 1.000; 2.400; 2.880; 4.000 e 5.000 mg/kg para via oral. O cálculo proporcional foi realizado a fim de se obter a mesma dose para todos os animais de cada grupo. As punções foram por via intraperitoneal sendo respeitados intervalos de cinco minutos entre as administrações individuais. Nos ensaios de toxicidade por via oral a solução foi introduzida no trato digestório dos animais através de cânula metálica acoplada a seringa (gavagem). Os animais apresentaram alguns sinais de toxicidade, porém não letais até a dose de 5.000 mg/kg. A DL<sub>50</sub> para via intraperitoneal foi calculada pelo método de Karber e Behrens (1964), sendo estabelecida em 255 mg/kg ( *muito tóxico*, grau 4). Conclui-se que sob condições agudas de exposição, o extrato do cravo-da-índia é um agente tóxico, devendo ser considerado como tal, dependendo da dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição e vias de administração.

**Unitermos:** *Syzygium aromaticum*, Myrtaceae, toxicologia, fitoterapia.

**ABSTRACT: "Preclinical (acute) toxicologic study of the extract of *Syzygium aromaticum* (L) in rodents".** The objective of this research was to estimate the acute toxicity of the extract of clove (*Syzygium aromaticum* Linné) in rodents. The 80% hidro-alcoholic extract was concentrated in rotary evaporator until a final resinous mixture extract was obtained. Albino female mice (*Mus musculus*), divided in 13 lots of six animals were observed for 24 hours. The extract diluted in 0.9% physiologic solution was administrated at the dosages of 137.5; 180.0; 187.5; 250.0; 375.0; 437.5; 500.0 and 1,000 mg/kg through intraperitoneal route and 1000; 2,400; 2,880; 4,000 and 5,000 mg/kg through oral route. A proportional calculation was carried out in order to have the same dose for the animals in each group. The punctures were gotten by intraperitoneal route in intervals of five minutes among the individual doses. For the oral toxicity the solution was introduced in the digestive system of the animals through coupled metallic stem syringe (gavage). The animals presented non lethal toxic signs up to 5,000 mg/kg. DL<sub>50</sub> was established by the method of Karber and Behrens (1964). LD50 was estimated in 255 mg/kg (highly poisonous, degree 4). It can be concluded that under acute conditions of exposure, the extract of clove is a poisonous agent and it should be considered as such, depending on the administered or absorbed dose, time and frequency exhibition and administration routes.

**Keywords:** *Syzygium aromaticum*, Myrtaceae, toxicology, phytotherapy.

### INTRODUÇÃO

O *Syzygium aromaticum* Linné (cravo-da-índia) é popularmente utilizado nas odontalgias e serve de fonte para extração do eugenol que manipulado com o óxido de zinco resulta em material restaurador para vedação de cavidades

dentárias abertas (Leal, 1991; Oliveira et al., 2007; Agra et al., 2008). Apesar do uso freqüente na odontologia, o eugenolé neurotóxico e irritante das mucosas, especialmente quando administrado em doses inadequadas (Alonso, 1998).

A DL<sub>50</sub> do óleo essencial de cravo-da-índia em ratos, por via oral, foi estabelecida em 2.650 mg/kg, e, em

\* E-mail: fabios@ccs.ufpb.br; Tel. +55-83-3216-7795

humanos, a estimativa de dose diária máxima permitida de eugenol é de 2,5 mg/kg (Alonso, 1998).

Do ponto de vista toxicológico, toda substância pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição: dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição e vias de administração (Barros & Davino, 1996).

Wright et al. (1995) estudaram o efeito da injeção intravenosa de eugenol em ratos como causa de edema pulmonar não-cardiogênico, de fisiopatologia pulmonar desconhecida. A injeção em doses de 4 e 8 µL (6,52 mol/l) causaram dificuldade respiratória aguda por edema pulmonar hemorrágico. Os espécimes histológicos exibiram edema perivascular, intersticial e alveolar, extravasamento de hemácias e neutrófilos no espaço alveolar, captura de neutrófilos pelos capilares alveolares. O quadro histológico demonstrou que a infusão intravenosa de eugenol provoca edema pulmonar hemorrágico, com seqüestro intrapulmonar de neutrófilos.

Saeed & Gilani (1994) observaram ação antitrombótica do óleo essencial de cravo-da-índia por interferência sobre a agregação plaquetária induzida pelo ácido araquidônico e pelo fator de ativação plaquetária e, em grau menos acentuado, atuando sobre o colágeno.

A hipersensibilidade cutânea do eugenol e do óleo de cravo-da-índia foi testada por Rothenstein et al. (1983) observando-se a reação local da pele. A amostra foi obtida entre 11.632 emplastos com eugenol, utilizados em consumidores de produtos que contêm eugenol ou óleo de cravo-da-índia. A hipersensibilidade induzida e a sensibilização pré-existente foram testadas nas concentrações de 0,05 % e 0,09 %, respectivamente. O resultado indicou que o eugenol puro ou como parte do óleo de cravo-da-índia, mesmo na concentração encontrada nos produtos de consumo, tem baixo potencial de desencadear reações alérgicas por sensibilização prévia ou de induzir hipersensibilidade.

Daniel et al. (2009) avaliaram as atividades antiinflamatória e antinociceptiva do eugenol, administrado oralmente, em modelos experimentais in vivo. O eugenol (200 e 400 mg/kg) reduziu o volume de exsudato pleural sem interferir na contagem de leucócitos totais presentes na pleura. Na dose de 200 mg/kg, o eugenol inibiu significativamente o edema de pata, 2-4 h após a injeção do agente flogístico. No teste da placa quente, a administração do eugenol (100 mg/kg) mostrou atividade significativa à reação de desconforto-tempo dependente, avaliada como a latência da resposta, inibida pela meperidina. Eugenol nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg apresentou efeito antinociceptivo significativo no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em comparação com o grupo controle. Os dados obtidos indicam que o eugenol apresenta atividade antiinflamatória e antinociceptiva periférica.

O objetivo desta pesquisa foi estimar a toxicidade aguda do extrato do cravo-da-índia em roedores

para viabilizar o desenvolvimento de apresentações farmacêuticas que preservem as propriedades farmacologicamente úteis do vegetal, com menores riscos de efeitos tóxicos e adversos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material botânico e obtenção da matéria-prima

Foram adquiridos botões florais de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) em fábrica de beneficiamento de especiarias em Olinda, PE. O material foi identificado e encaminhado para o Laboratório de Desenvolvimento de Fitomedicamentos e Fitocosméticos (LABDEFF) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife (UFPE). O material foi pesado em balança eletrônica semi-analítica (modelo BG 400, Gehaka®), se obtendo 534,549 g, que foram lavados em água corrente, e secos em estufa a 33 °C por uma semana.

### Extração

Foram preparados 2 litros de solução extrativa hidroalcoólica a 80%. A mistura foi mantida sob refrigeração a 23 °C durante 140 dias e posteriormente filtrada com filtro de celulose adaptado a funil montado em suporte específico. O volume final obtido de extrato hidro-etanólico foi de 1,35 litros.

### Concentração do extrato

A vaporização da porção hidro-etanólica através de evaporador rotativo (TE 120, Tecnal®, Brasil), acoplada a uma bomba a vácuo sob temperatura constante de 45 °C - obtendo-se assim extrato pilular, com consistência resinosa, cor âmbar escura, bem dispersível em soro fisiológico nas dosagens abaixo de 2000 mg/kg. Acima de 2000 mg/kg foi observada a persistência de um composto sólido decantado, cuja diluição completa foi obtida com a adição de duas gotas de óleo de girassol à solução.

### Toxicidade aguda do extrato pilular e determinação da DL<sub>50</sub>

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba e aprovada sob o número de protocolo 0511/06. O trabalho experimental foi desenvolvido no Biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE, utilizando camundongos albinos (*Mus musculus*) fêmeas, com pesos e idade aproximados, divididos em treze lotes de seis animais cada (tanto para os estudos por via oral como intraperitoneal) e período de observação de 24 horas a partir da administração dos fármacos. Cada procedimento foi realizado separadamente, obedecendo

rigorosamente a mesma metodologia. Os espécimes foram mantidos em local adequado, em condições ideais de temperatura, em gaiolas plásticas individuais forradas com maravalha, trocadas regularmente a cada dois dias. A dieta foi livre, através de ração balanceada (Labina - Purina®) e água mineral comercial, sendo a alimentação suspensa apenas 12 horas antes do início de cada experimento e oferta de água à vontade.

Os animais foram diferenciados entre si com solução corante de ácido pícrico, pesados em balança (Ohaus®, Estados Unidos) e realizado o somatório da massa de cada grupo individualmente, estabelecendo a quantidade de extrato necessária para diluição em cada dose administrada. Os extratos foram pesados em balança analítica (Scaltec®, modelo SBA 31). O extrato foi diluído em solução fisiológica a 0,9%. O espécime mais pesado de cada grupo recebeu um mililitro de solução. O cálculo proporcional foi realizado para cada indivíduo, a fim de se obter a mesma dose para todos os animais em cada grupo. As punções foram realizadas por via intraperitoneal do lado esquerdo, após antissepsia da pele com álcool etílico a 70 °GL, sendo respeitados intervalos de 5 min entre as administrações individuais.

Nos ensaios de toxicidade por via oral a solução foi introduzida no trato digestório dos animais através de cânula metálica acoplada a seringa (gavagem), seguindo a mesma metodologia, com intervalos de cinco minutos entre cada animal, para se observar o comportamento dos mesmos.

A DL<sub>50</sub> foi estabelecida pelo método de Karber & Behrens (1964) a partir da determinação de D1 (maior dose de sobrevivência) e D2 (menor dose de letalidade), traduzidos pela seguinte fórmula:

$$DL_{50} = \frac{DF - \Sigma (A.B)}{n}$$

Onde:

DF = dose mínima capaz de matar todos os animais

A = diferença entre duas doses consecutivas

B = animais mortos entre duas doses consecutivas

n = número total de animais por lote

A classificação da toxicidade relativa dos agentes químicos de acordo com a DL<sub>50</sub> seguiu a proposta de Silva (2006): grau 6 (DL<sub>50</sub> < 5 mg/kg) = supertóxico; grau 5 (DL<sub>50</sub> = 5-50 mg/kg) = extremamente tóxico; grau 4 (DL<sub>50</sub> = 50-500 mg/kg) = muito tóxico; grau 3 (DL<sub>50</sub> = 0,5-5 g/kg) = moderadamente tóxico; grau 2 (DL<sub>50</sub> = 5-15 g/kg) = pouco tóxico; grau 1 (DL<sub>50</sub> >15 g/kg) = praticamente atóxico.

A verificação da letalidade progressiva pelo extrato pilular de cravo-da-índia diluído em solução fisiológica para via intraperitoneal foi promovida pelas dosagens de 137,5; 180; 187,5; 250; 375; 437,5; 500 e 1.000 mg/kg.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das dosagens aplicadas, e com o cálculo da fórmula de Karber & Behrens (1964) obteve-se a DL<sub>50</sub> de 255 mg/kg. Neste caso, segundo Schuartsman (1980) o cravo-da-índia para uso intraperitoneal está classificado como muito tóxico (grau 4). Silva (2006) também se baseou na classificação de Schuartsman (1980) para avaliar a toxicidade do extrato etanólico bruto de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) pela via intraperitoneal. Em virtude da praticidade e correlação direta com o cálculo da DL<sub>50</sub>, optou-se por aplicar a mesma metodologia na avaliação da toxicidade do extrato do *Syzygium aromaticum* L.

Nas dosagens 500 mg/kg e 437,5 mg/kg, respectivamente, foram observadas piloereção, edema de focinho, proptose, contorções abdominais, baixas excreções urinárias, e fecais com muco, redução da frequência respiratória, distensão abdominal e agressividade, além de mortalidade acima de 80% dos grupos.

Nas doses entre 187,5; 250 e 375 mg/kg também se observaram piloereção, e ainda palidez generalizada, agitação motora e posterior sonolência, lacrimejamento, convulsões, contorções abdominais e dispnéia. Baixa diurese e excreção fecal intensa, com mortalidade entre 33 e 67% das amostras.

Nas dosagens de 137,5 e 180 mg/kg foi observada ausência de diurese, excreção fecal abundante, redução da frequência respiratória, alterações de marcha e tremores leves, além de baixa mortalidade das amostras (abaixo de 17%).

O ensaio de toxicidade oral aguda foi realizado com doses de 1000; 2400; 2880; 4000 e 5000 mg/kg, sendo observada baixa diurese, excreção fecal variável, aumento da frequência respiratória, palidez, proptose, agressividade, agitação e edema de focinho. Foram também observados muitos sinais de neurotoxicidade - tremores, alterações de marcha, convulsões, alienação - porém, sem indícios de mortalidade, mesmo nas doses mais altas (5000 mg/kg) preconizadas por Zaupa et al (2002), impossibilitando o cálculo da DL50 pela metodologia proposta.

O cravo-da-índia, amplamente consumido pela espécie humana por via oral, através da culinária, pode apresentar graves efeitos tóxicos pela ingestão em doses inadequadas, como descrito por Lane et al. (1991), Brown et al. (1992) e Hartnoll et al. (1993), incluindo depressão do sistema nervoso central e coma, anormalidades urinárias, lesões hepáticas e distúrbios de coagulação. Em um ensaio pré-clínico em ratos submetidos a uma injeção endovenosa nas doses de 4 e 8 microlitros (6,52 mol/l) realizada por Wright et al. (1995), observou-se dificuldade respiratória aguda por edema pulmonar hemorrágico.

O eugenol e o óleo de cravo-da-índia quando adicionados à composição de produtos de higiene pessoal e perfumes, demonstram boa tolerabilidade em contato com a pele, com baixa alergenicidade. Segundo Rothenstein et

al. (1983), estes aspectos facilitam o desenvolvimento de um fitomedicamento para uso tópico para a pele. No caso de uso na odontologia, ou seja, na cavidade bucal, deve-se levar em consideração a possibilidade de reações adversas uma vez que se trata de contato do produto com mucosas.

Problemas de toxicidade pelo uso de botões florais de cravo-da-índia nas odontalgias não foram relatados na literatura. Quanto ao uso do extrato do *Syzygium aromaticum* L. em formulações terapêuticas para uso odontológico, deve-se levar em consideração os resultados de toxicidade apresentados neste trabalho. No caso do uso do extrato nas composições de materiais restauradores certamente o risco de ingestão aguda é reduzido do mesmo modo como a toxicidade se aplica para outros materiais restauradores. Além disso, há indícios que o risco de toxicidade por ingestão de 150 mg de eugenol por um período de sete dias é baixo (Rompelberg et al., 1996). Desta forma, existe um baixo risco de toxicidade por ingestão de eugenol na saliva quando originário de cimentos restauradores provisórios a base de eugenol porque estes cimentos restauradores não liberam elevadas quantidades deste composto para a saliva de forma prolongada.

Em todo o caso, o uso de produtos restauradores a base de eugenol merece cuidados por parte da odontopediatria já que o risco de ingestão é maior e o baixo peso do indivíduo aumenta o risco. Hartnoll et al. (1993) descrevem a ingestão acidental de óleo de cravo-da-índia por uma criança, resultando em coma, coagulopatias e lesão hepática aguda, observando que em estágios tardios a intoxicação produziu um quadro similar à overdose de paracetamol. Brown et al. (1992) descrevem caso de coagulação intravascular disseminada e necrose hepatocelular provocado pela ingestão de óleo de cravo-da-índia em uma criança de dois anos.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo mostram o extrato de cravo-da-índia como um agente tóxico sob condições agudas de exposição, devendo ser considerado como tal, dependendo da dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição e vias de administração.

Estes resultados sugerem que estudos relacionados ao consumo crônico de cravo-da-índia devem ser conduzidos para uma melhor avaliação da toxicidade do extrato.

## AGRADECIMENTOS

Parte deste trabalho recebeu suporte da CAPES e do CNPq - Processo n. 306234/2004-1.

## REFERÊNCIAS

Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, França PF, Barbosa-Filho JM 2008. Survey of medicinal plants used in the region

Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 18: 472-508.

Alonso JR 1998. *Tratado de fitomedicina - bases clínicas y farmacológicas*. Buenos Aires: ISIS.

Barros SBM, Davino SC 1996. Avaliação da toxicidade. In: Oga, S. *Fundamentos de Toxicologia*. 1.ed. São Paulo: Atheneu.

Brown SA, Biggerstaff J, Savidge GF 1992. Disseminated intravascular coagulation and hepatocellular necrosis due to clove oil. *Blood Coagul Fibrin* 3: 665-668.

Daniel AN, Sartoretto SM, Schmidt G, Caparroz-Assef SM, Bersani-Amado CA, Cuman RKN 2009. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. *Rev Bras Farmacogn* 19: 212-217.

Hartnoll G, Moore D, Douek D 1993. Near fatal ingestion of oil of cloves. *Arch Dis Child* 69: 392-393.

Karber G, Behrens B 1964. *Statistical methods in biological assays*. Londres: Griffin Ch. An. C, apud Silva, ECB. *Avaliação biológica de Caesalpinia echinata Lam. - Fabaceae/Caesalpinioideae - usos e riscos*. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas - UFPE, 2006.

Lane BW, Ellenhorn MJ, Hulbert TV, Mc Carron M 1991. Clove oil ingestion in an infant. *Hum Exp Toxicol* 10: 291-294.

Leal JM 1991. Materiais obturadores de canais radiculares. In: Leonardo MR; Leal JM. *Tratamento de Canais Radiculares*. 2.ed. São Paulo: Panamericana.

Oliveira FQ, Gobira B, Guimarães C, Batista J, Barreto M, Souza M 2007. Espécies vegetais indicadas na odontologia. *Rev Bras Farmacogn* 17: 466-476.

Rompelberg CJ, Vogels JT, de Vogel N, Bruijntjes-Rozier GC, Stenhuis WH, Bogaards JJ, Verhagen H 1996. Effect of short-term dietary administration of eugenol in humans. *Hum Exp Toxicol* 15: 129-135.

Rothenstein AS, Booman KA, Dorsky J, Kohrman KA, Schwoeppe EA, Sedlak RI, Steltenkamp RJ 1983. Eugenol and clove leaf oil. A survey of consumer patch-test sensitization. *Food Chem Toxicol* 21: 727-733.

Saeed SA, Gilani AH 1994. Antithrombotic activity of clove oil. *J Pak Med Assoc* 44: 112-115.

Schuartsman S 1980. *Produtos químicos de uso domiciliar - segurança e riscos toxicológicos*. São Paulo: Almed, apud Silva ECB. *Avaliação biológica de Caesalpinia echinata Lam. - Fabaceae/Caesalpinioideae - usos e riscos*. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas - UFPE, 2006.

Silva ECB 2006. *Avaliação biológica de Caesalpinia echinata Lam.- Fabaceae/Caesalpinioideae - usos e riscos*. Recife, 116 p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco.

Wright SE, Baron DA, Heffner JE 1995. Intravenous eugenol causes hemorrhagic lung edema in rats: proposed oxidant mechanisms. *J Lab Clin Med* 125: 257-264.

Zaupá C, Carraschi L, Tsuzuky JK, Boeira R, Dutra AL, Akimoto L, Kaneshima EN, Silva JC, Marques LC 2002. Estudo toxicológico pré-clínico (agudo e sub-agudo) do produto Propovit Plus® em roedores. *Acta Farm Bonaerense* 21: 265-272.