

RÔMULO OLIVEIRA DE HOLLANDA VALENTE

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES TÓXICAS, ANTIINFLAMATÓRIAS
E CICATRIZANTES DO EXTRATO DE CRAVO-DA-ÍNDIA –
*SYZYGIUM AROMATICUM (L) Merr.& LM Perry***



**PROGRAMA INTEGRADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

**JOÃO PESSOA
2006**

RÔMULO OLIVEIRA DE HOLLANDA VALENTE

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES TÓXICAS, ANTIINFLAMATÓRIAS E
CICATRIZANTES DO EXTRATO DE CRAVO-DA-ÍNDIA –
*SYZYGIUM AROMATICUM (L) Merr.& LM Perry***

Tese apresentada ao Programa Integrado de
Doutorado em Odontologia da Universidade
Federal da Paraíba e Universidade Federal da
Bahia em cumprimento às exigências para a
obtenção do título de Doutor em Odontologia.
Área de concentração: Estomatologia.

Orientador: Prof. Dr.Fábio Correia Sampaio
Orientadoras externas: Prof^a. Dr.^a Ivone Antônia de Souza
Prof^a. Dr.^a Jane Sheila Higino

JOÃO PESSOA
2006

RÔMULO OLIVEIRA DE HOLLANDA VALENTE

AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES TÓXICAS, ANTIINFLAMATÓRIAS E
CICATRIZANTES DO EXTRATO DE CRAVO-DA-ÍNDIA –
SYZYGIUM AROMATICUM (L) Merr.& LM Perry.

DATA DA DEFESA: 18/12/2006

Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio
Orientador.

Prof^a. Dra. Jane Sheila Higino
Examinadora.

Prof^a. Dra. Maria Carméli Correia Sampaio
Examinadora.

Prof^a. Dra. Fálba Bernadete Ramos dos Anjos
Examinadora.

Prof. Dr. Fabiano Gonzaga Rodrigues
Examinador.

JOÃO PESSOA
2006

V154a Valente, Rômulo Oliveira de Hollanda.

Avaliação das propriedades tóxicas antiinflamatórias e cicatrizantes do extrato de cravo-da-Índia – *Syzygium aromaticum* (L) Merr. & LM Perry / Rômulo Oliveira de Hollanda Valente. João Pessoa, 2006.

126p.: il.

Orientador: Fábio Correia Sampaio

Tese (doutorado) UFPB-UFBA.

1. Odontologia. 2. Fitoterápicos. 3; Cravo-da-índia – toxicidade – avaliação. 4. toxicologia.

UFPB/BC

CDU: 616.314(043)

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

“À **Inteligência Suprema**, causa primária de todas as coisas, que me dá forças para modificar o que pode ser modificado, resignação para aceitar o que não posso modificar e sabedoria para distinguir umas das outras”.

Ao Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio pelo imenso desprendimento e grandeza de espírito em aceitar ser meu orientador, e principalmente pela paciência e dedicação frente às adversidades que tantas vezes quase comprometeram o andamento dos nossos trabalhos.

À Prof^a Dr^a. Ivone Antônia de Souza, dedicada pesquisadora, professora e amiga, sem deslumbres acadêmicos, característica inconfundível dos espíritos verdadeiramente grandes e sábios.

A Prof^a Dra. Jane Sheila Higino do Curso de Farmácia da UFPE pela orientação na produção dos fitomedicamentos utilizados neste trabalho, além das muitas tardes agradáveis que passamos nos laboratórios do LABDEFF do Curso de Farmácia da UFPE desenvolvendo esta pesquisa. Pessoa extremamente solícita, sempre buscando atender a todas as necessidades frente às dificuldades em fazer a pesquisa acontecer de fato.

Ao Dr. Horácio Mário Fittipaldi Júnior pela inestimável ajuda na leitura e interpretação das lâminas desta pesquisa, sem a qual a realização de todo o trabalho sobre inflamação e cicatrização teria sido impossível.

Aos Professores Doutores Diógenes Luís da Mota e Fálba Bernadete Ramos dos Anjos, do Departamento de Histologia da UFPE pela colaboração na confecção das lâminas histológicas desta pesquisa.

Aos professores do Programa Integrado de Doutorado em Estomatologia (PIDO) da UFPB – UFBA, pela multiplicidade de experiências compartilhadas, permitindo-nos

aprender a partir de visões diferenciadas, o nosso papel enquanto profissional, na sociedade.

À minha amada família, nas pessoas dos meus pais Everaldo e Maria de Nazareth, fontes de luz que transbordam na escuridão, e meus irmãos e irmãs, que me deram oportunidade de sermos uma família na mais ampla e verdadeira acepção do termo.

À Tatiana Martins Caloi pelo apoio amplo, irrestrito e incondicional, independentemente das intempéries e desencontros que nos distanciaram enquanto casal.

À Vladimir e Paulo Henrique Wanderley pela gentileza em ceder os botões florais de cravo-da-índia utilizados neste trabalho, além de outros vegetais empregados em outras pesquisas, através da sua fábrica de beneficiamento de especiarias.

Aos colegas de Doutorado e Mestrados - Diagnóstico Bucal e Odontologia Preventiva e Infantil (OPI) - pelo período em que dividimos os mesmos sonhos e anseios em busca de um ideal comum.

Ao meu amigo de jornada Sérgio Bartolomeu de Farias Martorelli, a quem tive o prazer de compartilhar muitos momentos na realização deste trabalho, além da grande amizade e estima que nasceu do nosso convívio quase cotidiano.

Ao meu primo Danilo Sabino pela acolhida e excelente companhia que sempre me proporcionou na minha estada em João Pessoa. Este período acadêmico foi excelente para criarmos muito mais que laços familiares, mas uma grande amizade.

A Coordenação e Funcionários do Programa Integrado de Doutorado em Odontologia pelo suporte ofertado para que todo o projeto se transformasse em realidade.

À Nildo e Dona Carminha da Cantina Elefante Branco do Centro de Ciências da Saúde da UFPB pelo período agradável e da amizade proporcionada entre muitos cafezinhos, almoços e lanches.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho na rotina diária dos laboratórios: Rosilma, Christiana, Elisângela (Elis), Jackeline, Aldo, Mirella Marques, Ana Pavla, Tiago, Pedro, Braz, Renato Barreto, etc.

E se por acaso a memória me falha e esqueço alguém, perdoem-me, mas saibam que a gratidão é sempre um bom motivo para lembrar àqueles que nos são caros.

“A opção pela verdade deve ser refeita
diariamente, entre as hesitações e
dúvidas que constituem o preço da
dignidade humana”.

Olavo de Carvalho

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade aguda do extrato de cravo-da-índia através do cálculo da DL_{50} pelo método de *Karber e Behrens (1964)* para as vias de administração intraperitoneal e oral, em camundongos (*Mus musculus*). A avaliação da inflamação e cicatrização foi realizada em feridas elétricas produzidas com eletrocautério no dorso de ratos albinos wistar (*Rattus norvegicus*), tratados com creme dermatológico contendo extrato de cravo-da-índia a 5% comparativamente a outros dois grupos: placebo e dexpantenol a 5% (controle-positivo). Os animais foram sacrificados em grupos no 2º, 7º e 14º dia de tratamento. Os resultados dos testes toxicológicos evidenciaram elevada toxicidade para via intraperitoneal ($DL_{50} = 255 \text{ mg/kg}$) e atóxica para via oral a partir da diluição complementar da porção lipofílica do extrato com óleo de girassol. A avaliação histológica da pele do dorso dos animais demonstrou que o creme dermatológico contribuiu na redução do infiltrado inflamatório de células polimorfonucleares, e com grande aumento da fibroplasia entre o 2º e o 7º dia de tratamento, quando comparado ao placebo e ao dexpantenol a 5%. Conclui-se que o cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) apresenta potencial para desenvolvimento de produto fitoterápico antiinflamatório e cicatrizante para utilização humana, com reduzida toxicidade.

Palavras-chaves: Odontologia; Fitoterápicos; Inflamação; Cicatrização; Toxicologia.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the acute toxicity of the extract of clove. It was established through the calculation of LD₅₀ by the method of Karber and Behrens (1964) through intraperitoneal and oral routes in mice (*Mus musculus*). The inflammation and wound-healing process (cicatrizantion) were evaluated using electric burns in the back of mice albino wistar (*Rattus norvegicus*) treated with a dermatologic cream with 5% clove extract compared with other two groups: placebo and 5% dexpanthenol (positive-control). The animals were sacrificed in groups in the 2nd, 7th and 14th day of treatment. The results of the study demonstrated the toxicological tests evidenced high toxicity for intraperitoneal route (LD₅₀ = 255 mg/kg) and nontoxic for oral route after complementary dilution of the lipophilic portion of the extract in sunflower oil. The histological evaluation of the surgical specimens demonstrated that the dermatologic cream contributed to the reduction of the infiltrated polymorphonuclear inflammatory cells, and with a great increase of fibroplasias between the 2nd and 7th day of treatment, when compared to placebo and 5% dexpanthenol group. It can be concluded that clove (*Syzygium aromaticum* L.) has potential for the development of a cutaneous phytotherapeutic agent that can be used as anti-inflammatory and wound-healing drug (cicatrizant) with reduced toxicity.

Key words: Dentistry; Phytotherapeutic agents; Inflammation; Healing; Toxicology.

LISTA DE ABREVIATURAS

DL₅₀: dose letal para 50% do grupo de animais estudados

D1: maior dose de sobrevivência

D2: menor dose de letalidade

mL: mililitro

mg: miligrama

kg: quilograma

g: Grama

GL: Gay-Lussac

HE: Hematoxilina / Eosina

mm: Milímetro

°C: Grau Celsius

%: percentual ou porcentagem

VO: Via Oral

VIP: via intraperitoneal

®: Marca Registrada

OMS: Organização Mundial da Saúde

LABDEFF: Laboratório de Desenvolvimento de Fitomedicamentos e Fitocosméticos

UFPE: Universidade Federal de Pernambuco

EUA: Estados Unidos da América

CM: cabeça marcada

RM: rabo marcado

LM: lombo marcado

CR: cabeça e rabo marcados

SM: sem marca

CRL: cabeça, rabo e lombo marcados

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Classificação da toxicidade dos agentes químicos de acordo com a DL_{50} ..	60
Tabela 02. Toxicidade aguda na dose de 1.000 mg/kg por via intraperitoneal (VIP).....	61
Tabela 03. Toxicidade aguda na dose de 500 mg/kg por via intraperitoneal (VIP).....	63
Tabela 04. Toxicidade aguda na dose de 250 mg/kg por via intraperitoneal (VIP).....	65
Tabela 05. Toxicidade aguda na dose de 125 mg/kg por via intraperitoneal (VIP).....	67
Tabela 06. Toxicidade aguda na dose de 187,5 mg/kg por via intraperitoneal (VIP).....	69
Tabela 07. Toxicidade aguda na dose de 375,0 mg/kg por via intraperitoneal (VIP).....	72
Tabela 08. Toxicidade aguda na dose de 137,5 mg/kg por via intraperitoneal (VIP).....	75
Tabela 09. Toxicidade aguda na dose de 437,5 mg/kg por via intraperitoneal (VIP).....	77
Tabela 10. Toxicidade aguda na dose de 180,0 mg/kg por via intraperitoneal (VIP).....	79
Tabela 11. Aplicação do método de Karber e Behrens (1964) para cálculo da DL_{50}	81
Tabela 12. Curva dose-resposta: correlação entre o logaritmo decimal das doses administradas e o percentual de letalidade das mesmas.....	82
Tabela 13. Toxicidade aguda na dose de 1.000 mg/kg por via oral (VO).....	83
Tabela 14. Toxicidade aguda na dose de 2.400 mg/kg por via oral (VO).....	85
Tabela 15. Toxicidade aguda na dose de 2.880 mg/kg por via oral (VO).....	87
Tabela 16. Toxicidade aguda na dose de 4.000 mg/kg por via oral (VO).....	89
Tabela 17. Toxicidade aguda na dose de 5.000 mg/kg. por via oral (VO).....	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Adição da solução hidroalcoólica a 80% aos botões florais previamente pesados.....	43
Figura 02. Filtração das soluções hidroalcoólicas após 141 dias de extração sob refrigeração a 23° C.....	44
Figura 03. Evaporação da porção hidroetanólica do extrato através de evaporador rotativo.....	44
Figura 04. Animais com marcas diferenciadoras em ácido pícrico.....	46
Figura 05. Injeção intraperitoneal do extrato diluído em solução fisiológica.....	48
Figura 06. Administração via oral do extrato diluído em solução fisiológica.....	49
Figura 07. Aquecimento dos componentes para confecção do creme dermatológico.....	50
Figura 08. Creme dermatológico em fase de resfriamento para obtenção da consistência final.....	51
Figura 09. Creme dermatológico após a adição do extrato pilular de cravo-da-índia.....	52
Figura 10. Drogas utilizadas na anestesia dos animais conforme preconizado pelo COBEA.....	53
Figura 11. Tricotomia do dorso do animal.....	54
Figura 12. Ferida cirúrgica produzida com ponta ativa esférica de bisturi elétrico.....	54
Figura 13. Diâmetro das feridas avaliadas pela própria ponta ativa do bisturi elétrico.....	55
Figura 14. Ferida (queimadura) elétrica no dorso do animal ao término do procedimento cruento.....	55
Figura 15. Aplicação tópica do creme dermatológico - tratamento diário - até a morte pré-estabelecida para cada grupo.....	56
Figura 16. Deslocamento cervical após sedação do animal conforme preconizado pelo COBEA.....	57
Figura 17. Remoção da peça operatória.....	58
Figura 18: Aspecto da peça operatória.....	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 01. Efeitos da toxicidade aguda na dose de 1.000 mg/kg por via intraperitoneal (VIP).....	62
Quadro 02. Efeitos da toxicidade aguda na dose de 500 mg/kg por via intraperitoneal (VIP).....	64
Quadro 03. Efeitos da toxicidade aguda na dose de 250 mg/kg por via intraperitoneal (VIP).....	66
Quadro 04. Efeitos da toxicidade aguda na dose de 125 mg/kg por via intraperitoneal (VIP).....	68
Quadro 05 – Efeitos da toxicidade aguda na dose de 187,5 mg/kg por via intraperitoneal (VIP).....	70
Quadro 06. Efeitos da toxicidade aguda na dose de 375,0 mg/kg por via intraperitoneal (VIP).....	73
Quadro 07. Efeitos da toxicidade aguda na dose de 137,5 mg/kg por via intraperitoneal (VIP).....	76
Quadro 08. Efeitos da toxicidade aguda na dose de 437,5 mg/kg por via intraperitoneal (VIP).....	78
Quadro 09. Efeitos da toxicidade aguda na dose de 180,0 mg/kg por via intraperitoneal (VIP).....	80
Quadro 10. Efeitos da toxicidade aguda na dose de 1.000 mg/kg por via oral (VO).....	84
Quadro 11. Efeitos da toxicidade aguda na dose de 2.400 mg/kg por via oral (VO).....	86
Quadro 12. Efeitos da toxicidade aguda na dose de 2.880 mg/kg por via oral (VO).....	88
Quadro 13. Efeitos da toxicidade aguda na dose de 4.000 mg/kg por via oral (VO).....	90
Quadro 14. Efeitos da toxicidade aguda na dose de 5.000 mg/kg por via oral (VO).....	92

LISTA DE PRANCHAS

Prancha 01. Placebo (2 dias): Úlcera ativa. Infiltrado inflamatório acentuado, rico em polimorfonucleares no derma e subcutâneo. Infiltrado inflamatório misto na musculatura. Não há proliferação fibroblástica. (Hematoxilina-Eosina). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006).....	93
Prancha 02. Placebo (2 dias): Úlcera ativa. Infiltrado inflamatório acentuado, rico em polimorfonucleares no derma e subcutâneo. Infiltrado inflamatório misto na musculatura. Não há proliferação fibroblástica. (Tricrômio de Masson) (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006).....	94
Prancha 03. Placebo (7 dias): Úlcera ativa com crosta. Infiltrado inflamatório moderado predominantemente polimorfonuclear no derma e subcutâneo. Infiltrado mononuclear na musculatura. Migração neutrofílica para o interstício. Discreta proliferação fibroblástica (Hematoxilina-Eosina). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006).....	95
Prancha 04. Placebo (7 dias): Úlcera ativa com crosta. Infiltrado inflamatório moderado predominantemente polimorfonuclear no derma e subcutâneo. Infiltrado mononuclear na musculatura. Migração neutrofílica para o interstício. Discreta proliferação fibroblástica (Tricrômio de Masson). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006).....	96
Prancha 05. Placebo (14 dias): Úlcera cicatrizada com reepitelização. Infiltrado dérmico leve, predominantemente mononuclear, incluindo alguns neutrófilos. Proliferação moderada de fibroblastos com deposição de colágeno (Hematoxilina-Eosina). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006).....	97
Prancha 06. Placebo (14 dias): Úlcera cicatrizada com reepitelização. Infiltrado dérmico leve, predominantemente mononuclear, incluindo alguns neutrófilos. Proliferação moderada de fibroblastos com deposição de colágeno (Tricrômio de Masson). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006).....	98
Prancha 07. Cravo-da-Índia (02 dias): Úlcera ativa. Infiltrado inflamatório acentuado rico em polimorfonucleares no derma e subcutâneo. Infiltrado mono e polimorfonuclear na musculatura. Marginação neutrofílica e migração para o interstício. Não se observa proliferação fibroblástica (Hematoxilina-Eosina). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006).....	99
Prancha 08. Cravo-da-Índia (02 dias): Úlcera ativa. Infiltrado inflamatório acentuado rico em polimorfonucleares no derma e subcutâneo. Infiltrado mono e polimorfonuclear na musculatura. Marginação neutrofílica e migração para o interstício. Não se observa proliferação fibroblástica (Tricrômio de Masson). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006).....	100

Prancha 09. Cravo-da-Índia (07 dias): Úlcera cicatrizada com reepitelização. Infiltrado predominantemente mononuclear discreto. Proliferação fibroblástica moderada com deposição de colágeno (Hematoxilina-Eosina). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006).....	101
Prancha 10. Cravo-da-Índia (07 dias): Úlcera cicatrizada com reepitelização. Infiltrado predominantemente mononuclear discreto. Proliferação fibroblástica moderada com deposição de colágeno. (Tricrômio de Masson). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006).....	102
Prancha 11. Cravo-da-Índia (14 dias): Úlcera cicatrizada com reepitelização. Infiltrado inflamatório mínimo, rico em mononucleares com neutrófilos ocasionais. Marcante proliferação fibroblástica com deposição de colágeno (Hematoxilina-Eosina). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006).....	103
Prancha 12. Cravo-da-Índia (14 dias): Úlcera cicatrizada com reepitelização. Infiltrado inflamatório mínimo, rico em mononucleares com neutrófilos ocasionais. Marcante proliferação fibroblástica com deposição de colágeno (Tricrômio de Masson). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006).....	104
Prancha 13. Dexpantenol (02 dias): Úlcera ativa. Infiltrado inflamatório acentuado, rico em polimorfonucleares no derma e subcutâneo. Infiltrado mononuclear na musculatura. Não há proliferação fibroblástica (Hematoxilina-Eosina). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006).....	105
Prancha 14. Dexpantenol (02 dias): Úlcera ativa. Infiltrado inflamatório acentuado, rico em polimorfonucleares no derma e subcutâneo. Infiltrado mononuclear na musculatura. Não há proliferação fibroblástica. (Tricrômio de Masson). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006).....	106
Prancha 15. Dexpantenol (07 dias): Úlcera ativa. Intenso infiltrado inflamatório no derma, subcutâneo e musculatura, rico em polimorfonucleares. Migração neutrofílica para o interstício. Proliferação fibroblástica discreta (Hematoxilina-Eosina). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006).....	107
Prancha 16. Dexpantenol (07 dias): Úlcera ativa. Intenso infiltrado inflamatório no derma, subcutâneo e musculatura, rico em polimorfonucleares. Migração neutrofílica para o interstício. Proliferação fibroblástica discreta (Tricrômio de Masson). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006).....	108
Prancha 17. Dexpantenol (14 dias): Úlcera em cicatrização. Infiltrado dérmico moderado mono e polimorfonuclear, com tecido de granulação. Proliferação fibroblástica moderada com deposição de colágeno. (Hematoxilina-Eosina). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006).....	109
Prancha 18. Dexpantenol (14 dias): Úlcera em cicatrização. Infiltrado dérmico moderado mono e polimorfonuclear, com tecido de granulação. Proliferação fibroblástica moderada com deposição de colágeno. (Tricrômio de Masson). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006).....	110

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 PROPOSIÇÃO.....	22
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	23
3.1 Os Eventos do Processo Inflamatório e de Reparo.....	23
3.2 Antiinflamatórios.....	31
3.2.1 Mecanismos de ação.....	31
3.3 Fitoterápicos.....	33
3.3.1 Definições, Histórico e Legislação.....	33
3.4 Ação tóxica dos fitoterápicos.....	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1 Obtenção dos extratos vegetais.....	43
4.2 Toxicidade aguda dos extratos secos e determinação da DL₅₀.....	46
4.3 Estudo farmacotécnico na preparação do creme dermatológico.....	50
4.4 Ação antiinflamatória e cicatrizante do creme dermatológico.....	52
4.5 Metodologia da avaliação histológica.....	59
5 RESULTADOS.....	60
5.1 Toxicidade aguda do extrato pilular e determinação da DL₅₀.....	60
5.2 Toxicidade aguda via intraperitoneal (VIP).....	61
5.3 Toxicidade aguda via oral (VO).....	83
5.4 Ação antiinflamatória e cicatrizante do creme dermatológico à base de extrato de cravo-da-índia.....	93
6 DISCUSSÃO.....	111
6.1 Toxicidade aguda do extrato pilular e determinação da DL₅₀.....	111

6.2 Ação antiinflamatória e cicatrizante do creme dermatológico à base de extrato de cravo-da-índia.....	113
7 CONCLUSÕES.....	117
REFERÊNCIAS.....	118
ANEXO - Certidão do Comitê de Ética em Pesquisa Animal.....	126

1 INTRODUÇÃO

Contradizendo ao nome, a história reconhece ser da China a primeira indicação do uso do cravo-da-índia como condimento, antisséptico, remédio e elemento básico para elaboração de perfumes especiais e incensos aromáticos. Na dinastia Han (206 a.C. - 220 d.C.), seus frutos já eram levados para a corte do imperador por enviados da Ilha de Java, sendo que os próprios javaneses, segundo conta a história, mantinham um pequeno fruto na boca para melhorar o hálito, antes de irem falar pessoalmente com o imperador. (ALONSO, 1998).

Na culinária da Idade Média, o cravo-da-índia era usado como aromatizante para conservas e como adorno para pratos selecionados. No reinado de Ricardo II, era ingrediente do *Hippocras*, um vinho quente consumido costumeiramente pelos nobres. No século XVI, quando chegaram às Ilhas Molucas, os portugueses dominaram as plantações e estabeleceram monopólio do consumo de cravo-da-índia, fazendo com que o preço do mesmo subisse bastante. Os holandeses que sucederam aos portugueses agiram da mesma forma, até que, em meados de 1770, o monopólio foi rompido pelas colônias francesas e o cravo-da-índia se espalhou pelo mundo (http://geocities.yahoo.com.br/ervas_dilenemaia).

Os condimentos e temperos exibem uma vasta gama de propriedades farmacológicas, que passam pelas ações antioxidantes, anticarcinogênicas e antiinflamatórias, e segundo Shymala, Venukumar e Latha (2003) são amplamente difundidos e utilizados na culinária no mundo, sendo o cravo-da-índia, um dos principais representantes deste grupo. Os autores descrevem o cravo-da-índia com propriedades aromáticas e estimulantes, além de atuação benéfica sobre a dispepsia e a irritação gástrica, ressaltando também a sua excelente atividade analgésica, de amplo uso no tratamento das odontalgias.

O óleo essencial de cravo-da-índia, com seu elevado teor de eugenol, apresenta propriedades antissépticas, bactericidas, fungicidas, e parasiticidas (ALONSO, 1998). O eugenol constitui a maior porcentagem (60 a 80%) da composição química do extrato de cravo-da-índia sendo amplamente empregado na Odontologia no tratamento das odontalgias; como parte constituinte dos cimentos de obturação dos canais radiculares; nos curativos periodontais e combinado ao óxido de zinco na vedação das cavidades dentárias abertas ou em tratamento, além do

seu amplo uso na indústria de cosméticos, perfumes e de produtos de higiene pessoal (ROTHENSTEIN *et al.*, 1983); (LEAL, 1991).

Trummel (1991) descreve que remonta à Antigüidade as tentativas de modificar o processo inflamatório, através do emprego de agentes químicos. Embora, na maioria dos casos, o objetivo fosse reduzir a inflamação, o autor observa que várias substâncias químicas também foram utilizadas para aumentar a intensidade da mesma. O uso de linimentos, contra-irritantes e “antiflogísticos”, na realidade, intensifica as reações inflamatórias, acelerando o fechamento da lesão e sua subsequente cicatrização. Embora a maioria destas condutas tenha caído em desuso, a prática conhecida como *facilitação* ainda é empregada - reagudização de uma inflamação crônica, a fim de ativar o reparo tecidual. A adição do eugenol a curativos periodontais, e a inalação de vapores irritantes no tratamento de congestão brônquica, segundo o autor, são manobras envolvendo esta filosofia de tratamento.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial utilizem plantas medicinais como principal recurso no atendimento básico de saúde, incluindo-se as populações que as usam *in natura* (por opção ou simplesmente por falta dela), e os sistemas alternativos de medicina que empregam plantas processadas em formulações medicamentosas, como a medicina chinesa e ayurvédica (tradicional indiana). Os medicamentos fitoterápicos são reconhecidos oficialmente pela OMS como recurso terapêutico desde 1978 e amplamente consumidos no mundo todo, tendo movimentado U\$ 19,6 bilhões só no ano 2000. Apesar de o Brasil ser considerado um dos países com maior diversidade vegetal, abrigando 55.000 espécies catalogadas, de onde se estima que 4.000 delas sejam utilizadas com fins medicinais, poucos estudos são desenvolvidos nesta área (ELISABETSKY, 2002).

A pesquisa na produção de substâncias capazes de agir topicamente sobre o reparo das feridas, reduzindo a dor, a inflamação e principalmente, controlando a invasão bacteriana da área cruenta pela microbiota local é importante para a Odontologia. A idéia central na indicação do uso de fitoterápicos na medicina humana, segundo Lapa *et al.*, (2001), não é substituir medicamentos registrados e já comercializados, mas sim aumentar a opção terapêutica dos profissionais de saúde ofertando medicamentos equivalentes, também registrados, talvez mais baratos, com espectros de ação mais adequados e, quiçá, com indicações terapêuticas

complementares às medicações existentes, mas sempre em estrita obediência aos preceitos éticos que regem o emprego de xenobióticos na espécie humana.

Na farmacopéia alopática, entre os antissépticos empregados em cirurgia bucal, destaca-se a clorexidina a 0,12% por ser um medicamento eficaz e seguro, embora apresente efeitos colaterais indesejáveis como a coloração dos dentes, descamação da mucosa, úlceras e um sabor desagradável persistente (NEWBRUN, 1991). Já o digluconato de clorexidina na concentração de 10 mg/mL (Merthiolate®) é indicado para assepsia da pele e de feridas de pequena extensão, e a clorexidina a 4% (Hibitane® cirúrgico) é utilizada na degermação das mãos do cirurgião no ato pré-operatório ou nas enfermarias, como forma de prevenir as infecções hospitalares.

Já o peróxido de hidrogênio com água morna é descrito como tratamento adjuvante da ferida cirúrgica bucal ou em terapias periodontais, como meio complementar a escovação; mas segundo Deuben e Desjardins (1991) esta solução é um fraco antisséptico quando aplicado aos tecidos, pois a abundância de peroxidases associadas aos tecidos rapidamente inativam o peróxido, liberando concomitantemente oxigênio gasoso. Logo, a sua ação na antissepsia das feridas se dá provavelmente pela liberação do oxigênio efervescente sobre resíduos alimentares e de bactérias aprisionadas tanto à ferida quanto ao fio de sutura.

Não obstante, é lícito dizer que a obtenção de conhecimento sobre a atividade microbicida, antiinflamatória, cicatrizante e tóxica do cravo-da-índia - tanto para uso parenteral como tópico - subsidia e viabiliza o desenvolvimento de apresentações farmacêuticas, com aplicação clínica, que preservem as propriedades farmacologicamente úteis do mesmo, com menores riscos de efeitos tóxicos e adversos.

2 PROPOSIÇÃO

A proposta deste trabalho foi verificar a toxicidade aguda do extrato pilular de cravo-da-índia diluído em solução fisiológica, através da determinação da DL₅₀ ou dose letal para 50% da amostra. Foram utilizados camundongos fêmeas, albinos suíços (*Mus musculus*), para o estabelecimento da dose tóxica pelas vias intraperitoneal e oral, relacionada ao período de observação de 24 horas (toxicidade aguda).

Conhecido o perfil toxicológico dos fitoterápicos trabalhados, estabeleceu-se a manipulação farmacotécnica de creme dermatológico para realização da pesquisa sobre ação antiinflamatória e cicatrizante do fitomedicamento confeccionado sobre queimaduras (bisturi elétrico) no dorso de ratos albinos wistar (*Rattus norvegicus*). Foi realizada avaliação histológica dos tipos celulares presentes no infiltrado inflamatório e no reparo tecidual sobre os grupos tratados com o fitomedicamento em creme a 5%, creme sem extrato (placebo) e o grupo do dexpanthenol a 5% (controle-positivo); em períodos de morte dos animais previamente estabelecidos em 02, 07 e 14 dias.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Os Eventos do Processo Inflamatório e de Reparo

Os sinais da inflamação foram descritos, primeiramente, em um papiro egípcio datado de 3.000 a.C. Celsius, escritor romano do primeiro século d.C. foi o primeiro a citar os quatro sinais cardinais da inflamação: rubor, tumor, calor e dor. Um quinto sinal clínico foi apresentado por Virchow, como sendo perda de função das partes envolvidas. Em 1793, o cirurgião escocês John Hunter observou o que atualmente é considerado um fato óbvio: que a inflamação não é uma doença, mas uma resposta inespecífica com efeito salutar sobre seu hospedeiro (Collins, 2001).

A inflamação, segundo Silva e Carvalho (2004), é uma resposta protetora imediata que ocorre nos tecidos circunjacentes a uma lesão ou área de destruição celular. A reação inflamatória resulta da produção local de inúmeros mediadores a partir de fontes humorais ou celulares, e estes são os responsáveis pela uniformidade quase estereotipada da reação inflamatória, independente da natureza do agente agressor. Subdividem estes mediadores em: *mediadores derivados do complemento, mediadores derivados dos lipídeos, citocinas e aminas biologicamente ativas*. Analisam que o processo inflamatório envolve uma série de fenômenos que podem ser desencadeados não apenas por agentes infecciosos, mas também por agentes físicos (radiação, queimadura, trauma), químicos (substâncias cáusticas), isquemia e interações antígeno-anticorpo. Os autores concluem que cada estímulo provoca um padrão característico de resposta, e que, apesar da diversidade e complexidade dos mediadores químicos, apresentam variação relativamente pequena.

Gregori (1996), ratifica tal raciocínio ao concluir que a resposta inflamatória reparativa decorrente de diferentes tipos de trauma manifesta-se, de forma geral, com similaridades em suas características, sendo variável, entretanto, quanto à sua amplitude de manifestação, em uma dependência direta da própria intensidade da agressão recebida. Uma afirmação que por si evidencia quão estreita é a relação da prática cirúrgica com os fenômenos inflamatórios, pois exhibe uma relação direta da intensidade da resposta inflamatória e o trauma tecidual decorrente dos procedimentos cirúrgicos.

Segundo Gillmann (1968) a reparação da ferida cirúrgica apresenta uma evolução de cinco fases distintas e sucessivas às quais denominou de fases: *não-proliferativa, de ativação, proliferativa, de síntese e de remodelação*. (GREGORI, 1996 apud Gillmann, 1968)¹ Segundo o autor, a *fase I ou fase não-proliferativa* tem início concomitante com o trauma cirúrgico e perdura por um período máximo de até 48 horas. Esta fase caracteriza-se pela liberação tecidual de diversas substâncias autacóides vasoativas, mas principalmente histamina e serotonina, que atuam diretamente no diâmetro vascular endotelial e na degradação do tecido conjuntivo perivascular que se torna desestruturado e flácido, favorecendo assim a exsudação plasmática intersticial. Com a redução do fluxo sanguíneo regional, ocorre uma aderência de leucócitos ao endotélio vascular e sua conseqüente passagem para os tecidos (diapedese) constituindo o quadro histopatológico de infiltrado leucocitário. As proteínas plasmáticas também acompanham este movimento, numa seqüência de albuminas, globulinas e fibrinogênio, que por ação osmótica aumentam o volume de líquido intersticial, formando o quadro clínico e histopatológico do edema. Nesta fase, algumas das principais funções da resposta inflamatória são: o aumento no aporte regional de oxigênio e de células de defesa, exacerbação na atividade linfática de drenagem, bloqueio funcional regional que em associação com o infiltrado leucocitário e rede de fibrina intersticial, que restringe o dano e estabelece um limite ao comprometimento tecidual.

A *fase II ou fase de ativação* é subclínica, inicia-se concomitantemente com o quadro inflamatório e perdura por 72 horas. Caracteriza-se pela elevação numérica infiltrativa de células no tecido conjuntivo, marcado pela presença tanto de macrófagos quanto de fibroblastos.

A *fase III ou fase proliferativa* tem início no terceiro dia do pós-operatório e evolui até o sexto dia. Esta fase é marcada por um significativo aumento regional na população macrofágica e fibroblástica, pela estabilização definitiva do “coágulo organizado” que evolui para a união das bordas da ferida através do chamado tecido de granulação. Este tecido é constituído por fibrina do coágulo, pelo infiltrado leucocitário, por restos celulares ou pequenos corpos estranhos lançados em profundidade durante a manipulação cirúrgica dos tecidos, por macrófagos e fibroblastos, e principalmente por uma intensa presença de capilares neoformados.

¹ GILLMANN, T. Treatise on collagen. In: RAMACHANDRAM, G. N. *Conformation of Biopolymers*. London, Academic Press, Volume II, 1968.

A *fase IV ou fase de síntese* é caracterizada pela deposição extracelular de ácido hialurônico e de colágeno sintetizados pelos fibroblastos. Normalmente, esta fase se inicia no sexto dia do pós-operatório e perdura até que a quantidade de colágeno sintetizado seja suficiente para a reposição dos tecidos lesados. Em função da participação interferencial de um grande número de fatores, a duração desta fase é muito variável.

Na *fase V ou fase de remodelação* ocorre uma queda no número de fibroblastos; desaparecem os leucócitos e macrófagos; restabelece-se a microcirculação regional pela redução do número de capilares neoformados; estabelece-se uma definição histológica clara entre os tecidos pré-existentes e o tecido neoformado, cujas fibras não acompanham a disposição já pré-existente. Estas sofrerão a ação lítica da collagenase tecidual, para que novas fibras sejam dispostas em uma relação adequada com as fibras pré-existentes.

Balbino, Pereira e Curi (2005) consideram que os mecanismos envolvidos no processo de reparo tecidual ocorrem fundamentalmente em três fases, onde os eventos celulares e tissulares de cada uma delas estão relacionadas à participação de fatores de crescimento. Dividem o processo cicatricial em apenas três estágios: inflamatório, proliferação e remodelação. Outras classificações mais complexas identificam cinco estágios, mesmo que com nomenclaturas distintas entre os diferentes autores para descrição dos mesmos fenômenos. Por exemplo, Souza e Freitas (2006), assim como Gillmann (1968), também descrevem o reparo tecidual em cinco fases, ainda que sob outros nomes: inflamatória, granulação, epitelização, fibroplasia e de contração.

Para Fazio, Zitelli e Goslen (2000) em determinado tempo essa seqüência de eventos coincide e ocorrem simultaneamente permitindo, assim, o processo de cicatrização.

Cândido *et al.*, (2001) observam durante a fase inflamatória ou exsudativa um predomínio dos mesmos eventos relacionados com a coagulação sangüínea (fase trombocítica): vasoconstricção, agregação plaquetária e a ativação dos sistemas de coagulação. Ênfase deve ser atribuída à atividade plaquetária, na medida em que estas são as primeiras células a produzirem citocinas essenciais à modulação da maioria dos eventos cicatriciais subseqüentes. Nesta fase, além da hemostasia, ainda se verificam os eventos inflamatórios, com predomínio de

atividade fagocitária, através de células granulocíticas (polimorfonucleares) e macrófagos nas fases granulocítica e macrofágica, respectivamente. Os macrófagos, além da fagocitose, iniciam o reparo através da secreção de proteases, citocinas e substâncias vasoativas, dando continuidade às fases cicatriciais subseqüentes.

Os processos de granulação, contração e epitelização caracterizam a fase proliferativa. A granulação é a formação de um tecido composto de capilares, colágeno e proteoglicanos. A neoformação capilar nesta fase resulta da liberação de fatores angiogênicos secretados pelos macrófagos, que atuam estimulando a proliferação de células endoteliais dos vasos sangüíneos adjacentes à ferida. Nessa etapa ocorre produção de colágeno pelos fibroblastos associadamente à granulação, ocorrendo reepitelização com migração e divisão mitótica das células basais das bordas da ferida. (DE NARDI *et al.*; 2004). O terceiro evento dessa etapa da cicatrização é a contração, onde ocorre o fechamento espontâneo das feridas, através da ação dos miofibroblastos. Cândido *et al.*; (2001) observaram que a fase proliferativa é mais ativa, em média, durante 12 dias.

A fase de maturação ou de remodelação perdura meses ou anos quando as células inflamatórias agudas e crônicas diminuem gradualmente e cessam a angiogênese e a fibroplasia. Nesta fase também se observa o equilíbrio entre a síntese e a degradação do colágeno, sendo que esta remodelação é responsável pelo aumento da força tênsil do tecido cicatricial. (BOSQUEIRO *et al.*; (1999); CÂNDIDO *et al.*; (2001); DE NARDI *et al.*; (2004).

Na classificação de 05 estágios, a coagulação tem início imediato, logo após o surgimento da ferida, dependendo da atividade plaquetária e da cascata de coagulação. Substâncias vasoativas, proteínas adesivas, fatores de crescimento e proteases são liberadas e ditam o desencadeamento de outras fases subseqüentes. A formação do coágulo serve não apenas para a coaptação dos bordos da ferida, mas também para cruzar a fibronectina, oferecendo uma matriz provisória por onde fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos podem ingressar na ferida. (TERKELTAUB e GINSBERG, 1998).

A inflamação, intimamente ligada à fase anterior, depende, além de vários mediadores químicos, das células inflamatórias (polimorfos nucleares neutrofilos, macrófagos e linfócitos). Os neutrófilos chegam imediatamente após a injúria tissular e perduram por um período que varia de três a cinco dias, sendo os responsáveis

pela fagocitose das bactérias. O macrófago é a célula mais importante nesta fase. Permanece do terceiro ao décimo dia, fagocitando bactérias e debridando corpos estranhos, e ainda direciona o desenvolvimento do tecido de granulação. Uma alta atividade fagocitária dos macrófagos é percebida logo após o trauma, diferentemente dos linfócitos que aparecem na ferida apenas em torno de uma semana. Muito embora seu papel seja pouco definido, sabe-se que a liberação de suas linfocinas, tem importante influência sobre a atuação dos macrófagos. (MANDELBAUN; DI SANTIS e MANDELBAUN, 2003).

Além das células inflamatórias e dos mediadores químicos, a fase inflamatória conta com importante participação da fibronectina, sintetizada por uma série de células (fibroblastos, queratinócitos, e células endoteliais), ela adere, simultaneamente à fibrina, às células e aos componentes da matriz. Além de formar essa base para a matriz extracelular, tem propriedades quimiotáticas e promove a opsonização e fagocitose de corpos estranhos e bactérias. (CLARK, 1985).

A proliferação é responsável pelo fechamento da lesão propriamente dita, e composta por três fases distintas: A) a reepitelização, onde se observa migração de queratinócitos não-danificados das bordas da ferida e dos anexos epiteliais quando a ferida é de espessura parcial, ou apenas das margens, quando a ferida é de espessura total. Os fatores de crescimento são os responsáveis pelo aumento das mitoses e pela hiperplasia do epitélio; B) a fibroplasia e a formação da matriz, que é de vital importância na formação do tecido de granulação (coleção de elementos celulares, incluindo fibroblastos, células inflamatórias e componentes neovasculares e da matriz, como a fibronectina, as glicosaminoglicanas e o colágeno). A formação do tecido de granulação depende dos fibroblastos - essenciais na formação da matriz – ainda produzem colágeno, elastina, fibronectina, glicosaminoglicana e proteases, sendo estas últimas responsáveis pelo debridamento e remodelamento fisiológico da ferida. C) a angiogênese, essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes para a cicatrização. Inicialmente as células endoteliais migram para a área da ferida e posteriormente ocorre proliferação celular endotelial, permitindo o acesso para as células responsáveis pelas fases subseqüentes (MANDELBAUN; DI SANTIS e MANDELBAUN, 2003).

A contração da ferida é o movimento centrípeto das bordas da ferida (espessura total). As feridas de espessura parcial não contam com essa fase. Uma ferida de espessura total tem contração mesmo quando há enxertos, que diminuem

em 20 % o tamanho da ferida. Em cicatrizes por segunda intenção a contração pode reduzir 62% da área de superfície do defeito cutâneo. A remodelação é a última das fases. Ocorre no colágeno e na matriz e perdura por vários meses, sendo responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema. A neovascularização diminui e numa fase tardia a cicatriz é considerada avascular. Uma área com cicatrização adequada tem aproximadamente 80% da força de tensão da pele normal, não se apresenta volumosa e deve ser plana. A fase final da cura de uma ferida é marcada pela maturação e remodelagem da matriz extracelular. É durante essa fase que a cicatriz adquire sua máxima resistência tênsil. A característica mais marcante desta fase do reparo é a grande e acelerada deposição do colágeno na região da ferida. (BALBINO; PEREIRA e CURI, 2005).

As citocinas são substâncias responsáveis pela comunicação nas interações celulares e representam a descoberta mais interessante na cicatrização de feridas da década. As citocinas parecem participar na regulação da vascularização, fibroplasia e maturação das feridas crônicas. As células como as plaquetas, neutrófilos, macrófagos, linfócitos, mastócitos, fibroblastos e outras, constituem importantes fontes de citocinas. O emprego clínico em potencial dessas substâncias começa a ser avaliado, pois as citocinas poderão vir a ser fármacos importantes no tratamento das feridas. (DE NARDI *et al.*; 2004).

Por outro lado, é necessária a compreensão de que o uso de determinados fármacos, mesmo de uso tópico, atrapalham o processo de cicatrização e migração epitelial. O autor descreve o acetinado de triancinolona 0,1%, por exemplo, como retardante em até 34% a taxa relativa de cura da ferida. (FAZIO; ZITELLI e GOSLEN, 2000).

Pelo acima exposto, pode-se concluir que a indução de processo inflamatório e cicatricial segue um padrão definido, independentemente do tipo de agressão desencadeadora do processo. Estudos histológicos revelam que não há nenhum mecanismo diferente entre o reparo de feridas por queimadura e de feridas cortantes (BAYAT *et al.*; 2005).

Já Gomes (1997) enuncia que, ao analisar o corte de um tecido queimado, encontram-se três zonas distintas. A zona mais próxima do agente térmico, segundo o autor, é denominada zona de coagulação ou necrose de coagulação, local onde há coagulação intravascular. Na parte do tecido imediatamente adjacente a esta, forma-

se uma zona de estase, onde se observam depósitos nas paredes dos vasos. Na região mais distal ao agente térmico, forma-se uma zona de hiperemia, onde se observa uma área de vasodilatação.

A importância da colonização da ferida cirúrgica por bactérias nativas da área operada é descrita por Bertolami e Messadi (1997) que enfatizam as infecções bacterianas como a maior causa de comprometimento na cicatrização tecidual após procedimentos cirúrgicos. A colonização de tecidos ainda comprometidos pela inflamação leva a mais danos teciduais, e clinicamente, a infecção se manifesta como hiperemia, calor, edema, leucocitose, febre e dor. As toxinas bacterianas causam a inativação das proteases neutrofílicas e dos radicais de oxigênio causando lise celular; e ainda provocam destruição da matriz extracelular, impedindo o processo de cicatrização normal. Segundo os autores a adequação do meio e a estabilidade hemodinâmica da área afetada por uma ferida são necessárias na prevenção de infecções durante a cicatrização. O debridamento de tecidos necróticos, adequados cuidados pós-operatórios, nutrientes e suplementos vitamínicos são fatores essenciais para que ocorra adequada cicatrização. Concluem que em feridas superficiais, diversos curativos antimicrobianos, como a sulfadiazina de prata, têm sido efetivos no decréscimo do risco de infecções.

Goldberg (1997) analisa que a localização e a duração das feridas também influenciam a taxa de infecção. Em geral, as feridas da face e da boca tendem a reparar-se com baixas taxas de infecção devido ao seu excelente suprimento vascular. Se os ferimentos da face se comunicam com a boca ou a bucofaringe, contudo, a infecção é muito mais provável. O traumatismo moderado dos lábios causando laceração da pele, da mucosa e do músculo orbicular, ou a secção destes planos teciduais pelos incisivos centrais representa uma situação extremamente comum em traumatologia maxilofacial. O autor conclui que em feridas que envolvam a microbiota da pele e da cavidade bucal são prontamente infectadas se mal debridadas ou deixadas sem tratamento por mais de seis horas.

Helfrick (1997) cita um texto publicado pela Associação Norte-Americana de Cirurgiões Buco-Maxilo-Faciais intitulado os "*Parâmetros de Tratamento para Cirurgia Buco-Maxilo-Facial*". Um componente importante deste documento é a seção devotada à identificação dos fatores de risco que elevam o potencial para complicações. Com relação às infecções odontogênicas, os fatores de risco são citados como se segue:

- A) *Presença de doença sistêmica importante coexistente, que eleve o risco cirúrgico do paciente;*
- B) *Adequação do preparo clínico pré-operatório: Preparo clínico do paciente (anamnese, exames físico e complementares; diagnósticos completos); e estado de anuência consciente (completo ou incompleto);*
- C) *Objetivos restauradores dentários;*
- D) *Presença ou ausência de dentes associados sem vitalidade pulpar;*
- E) *Extensão da infecção (localizada ou difusa);*
- F) *Direção/Grau de extensão da infecção;*
- G) *Risco às estruturas vitais adjacentes;*
- H) *Presença de obstrução das vias aéreas;*
- I) *Virulência do microorganismo;*
- J) *Suscetibilidade do microorganismo a antibióticos;*
- K) *Presença de condições sistêmicas não-controladas que possam interferir com o processo normal de regeneração e subsequente reparo tecidual;*
- L) *Presença de desequilíbrios comportamentais, psicológicos, psiquiátricos ou vícios, que possam afetar a cirurgia, o reparo ou a resposta à terapia;*
- M) *Grau de cooperação e/ou concordância do paciente.*

Na prática clínica estes fatores podem ser monitorados diretamente pelo profissional, mas no que concerne ao item M, o próprio autor alerta que: *“O repouso, a manutenção de uma nutrição adequada, os cuidados locais e o uso racional de antibióticos são fundamentais ao tratamento do paciente. Em um meio controlado como o hospital, isto em geral não é um problema, mas no ambiente ambulatorial, de certo modo não-controlado, o paciente que não segue as instruções pós-operatórias corretamente eleva seu potencial para complicações”*.

Melo Júnior (2002) observa que o uso de pastas à base de óxido de zinco e eugenol, com pequenas variações na sua formulação, depois da limpeza do alvéolo por irrigação com soro fisiológico aquecido, aparentam ser o método mais usual de tratamento das alveolites secas. Esses curativos, segundo o autor, têm como função proteger o osso exposto e prevenir a penetração de resíduos alimentares; são ainda antissépticos, controlando a proliferação bacteriana, e obtundentes, absorvendo a produção local de quininas, provavelmente responsáveis

pela sintomatologia dolorosa. Estabelece que no tratamento da alveolite seca, indica-se a anestesia regional, irrigação com água fenolada ou soro fisiológico, curativo com pasta à base de óxido de zinco e eugenol com troca após 96 horas conforme a necessidade, além do uso de analgésicos, antiinflamatórios e antibióticos sistêmicos. O autor conclui que o tratamento cirúrgico reserva-se aos casos de alveolite por corpo estranho (supurativa) na qual estão presentes fragmentos ósseos, dentários, restos císticos ou granulomatosos, necessitando assim de curetagem, irrigação e sutura, diferentemente dos casos de alveolite seca onde apenas aplicam-se esferas de algodão embebidas em eugenol e o curativo supracitado.

Assim, é importante conhecer a ação dos medicamentos e suas interações no processo de cura das feridas para escolha acertada do tratamento.

López, Capó e González (1998) avaliaram a atividade analgésica e antipirética, e mais a toxicidade oral aguda, do extrato fluido de *Pimenta dioica* L., elaborado a partir de folhas do vegetal. Os autores observam que o extrato fluido de *Pimenta dioica* apresentou um potente efeito analgésico e antipirético em razão do **eugenol** ser um potente inibidor da liberação de prostaglandinas. Os resultados levaram os autores a sugerir que a administração oral do extrato nas doses de 1.650 mg/kg para analgesia e 406 mg/kg como antipirético têm eficácia similar ao uso de 200 mg de ibuprofeno com os mesmos fins, além de ser atóxica, mas com a DL₅₀ calculada em 2.560 mg/kg (2,56 g/kg).

3.2 Antiinflamatórios

3.2.1 Mecanismos de ação

Fisiologicamente, a inflamação caracteriza-se por: vasodilatação, com subsequente aumento do aporte sanguíneo local; aumento da permeabilidade dos capilares, permitindo o extravasamento de grande quantidade de líquidos para os espaços intersticiais; migração de inúmeros granulócitos e monócitos para o tecido (diapedese); e edema intracelular. Alguns dos inúmeros produtos teciduais que causam tais reações incluem a histamina, a bradicinina, a serotonina, as prostaglandinas, os produtos da reação do sistema de coagulação sanguínea e as linfocinas (GUYTON e HALL, 2002).

Como citado anteriormente, neste processo, cada estímulo provoca um padrão característico de resposta que, apesar da diversidade e complexidade dos mediadores químicos, apresentam variação relativamente pequena, logo é de se esperar que os mecanismos farmacológicos necessários ao antagonismo deste processo fisiológico também não sofram grandes variações nos seus mecanismos de ação, e a evolução destas drogas desembocam naturalmente no desenvolvimento de apresentações farmacológicas mais eficazes, seguras e posologicamente confortáveis ao uso durante o tratamento com as mesmas.

Trummel (1991) analisa que as drogas antiinflamatórias para uso sistêmico utilizadas na prática clínica apresentam a inconveniente incapacidade de eliminar especificamente o estímulo inflamatório localizado, onde através da supressão inflamatória, alguns destes fármacos podem comprometer gravemente os mecanismos de defesa do organismo. O autor conclui que neste grupo farmacológico, a eficácia e a toxicidade geralmente estão intimamente associadas, e o seu uso crônico contribui ainda mais para a possibilidade de ocorrência de efeitos tóxicos.

Gregori *et al.*; (1996) dividem as drogas antiinflamatórias em três grandes grupos: *antiinflamatórios não-esteróides e não-enzimáticos (AINEs)*; *antiinflamatórios esteróides* e *antiinflamatórios enzimáticos*. No primeiro grupo incluem: salicilatos, derivados da 5-pirazolona, derivados do ácido arilacético, fenamatos, oxicanos e compostos heterocíclicos não-ácidos. Os corticóides são considerados bons agentes na redução do edema pós-operatório. Entretanto, interferem desfavoravelmente sobre a evolução do reparo tecidual, já que atuam sobre o metabolismo das proteínas e, portanto, na produção de anticorpos. Já os antiinflamatórios enzimáticos exercem ações farmacológicas, segundo os autores, sobre o exsudato intersticial, ou seja, em uma fase em que o edema já se manifestou não representando o que mais se espera de um antiinflamatório em cirurgia bucal, que é a intensidade da resposta inflamatória.

A cicloxigenase catalisa a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas H_2 , que são precursores comuns para a síntese de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos. Atualmente é sabido que a cicloxigenase existe em duas isoformas, as quais exibem propriedades catalisadoras similares, mas diferem em termos de regulação da expressão. A COX-1 é responsável pela síntese de vários mediadores, incluindo as prostaglandinas que protegem a mucosa gástrica e

regulam a homeostase renal, e os tromboxanos que iniciam a agregação plaquetária. Os leucotrienos também promovem a inflamação e podem causar broncoespasmo. Já o tecido lesado, resultante de cirurgia, irá induzir a produção de COX-2, que em termos, leva a síntese de prostaglandinas que sensibilizam a fibras da dor e promovem a inflamação (RIENDEAU *et al.*; 2001; HAAS, 2002).

A família dos *oxicams*, ou mais especificamente o tenoxicam, é apresentado pelo fabricante como um potente inibidor da biossíntese de prostaglandinas tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Testes realizados *in vitro* com peroxidase de leucócitos sugerem que o tenoxicam pode neutralizar o oxigênio livre produzido no local da inflamação, explicando, em parte, a eficácia da droga no tratamento das doenças inflamatórias e degenerativas dolorosas do sistema músculo-esquelético (DEF, 2006).

3.3 Fitoterápicos

3.3.1 Definições, Histórico e Legislação

Ao final da década de 1970, a OMS criou o Programa de Medicina Tradicional que recomenda aos estados-membros o desenvolvimento de políticas públicas para facilitar a integração da medicina tradicional e da medicina complementar alternativa nos sistemas nacionais de atenção à saúde, assim como promover o uso racional dessa integração. Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do mundo, a OMS reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária, tendo em vista que 80% desta população utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% destes utilizam plantas ou preparações destas. Em sua estratégia global sobre medicina tradicional e medicina complementar e alternativa para o período 2002/2005, a OMS reforçou o compromisso em estimular o desenvolvimento de políticas com objetivo de inseri-las no sistema oficial de saúde dos seus 191 estados-membros. Tal propósito é firmado porque atualmente apenas 25 estados-membros, entre os quais não se inclui o Brasil, desenvolveram uma política nacional de medicina tradicional como forma de

fortalecer a atenção sanitária e de contribuir para a reforma do setor saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

É reconhecida a importância dos produtos naturais, incluindo aqueles derivados de plantas, no desenvolvimento de modernas drogas terapêuticas. As plantas medicinais são importantes para pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de drogas, não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas para a síntese, ou modelos para compostos farmacologicamente ativos. Das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela OMS, 11% são originárias de plantas e um número significativo são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais. No Brasil, estima-se que 25% dos US\$ 8 bilhões do faturamento da indústria farmacêutica, no ano de 1996, foram originados de medicamentos derivados de plantas. Estados Unidos e Alemanha estão entre os maiores consumidores dos produtos naturais brasileiros, e entre 1994 e 1998, importaram, respectivamente, 1.521 e 1.466 toneladas de plantas que seguem para esses países sob o rótulo genérico de “material vegetal do Brasil”, de acordo com o próprio Ibama. Embora possua a maior diversidade vegetal do mundo, com cerca de 60.000 espécies vegetais superiores catalogadas, apenas 8% foram estudadas para pesquisas de compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Souto (2004) discorre que no mundo contemporâneo, há uma tendência ao uso dos produtos naturais, pois a OMS recomenda que os países membros, especialmente os países pobres, procurem ampliar seus arsenais terapêuticos para a saúde pública através do aproveitamento das práticas da medicina caseira empregadas pelo povo. O autor resume essas recomendações em quatro itens:

- Proceder a levantamentos regionais das plantas usadas nas práticas caseiras de medicina popular ou tradicional e identifica-las cientificamente;
- Apoiar o uso das práticas úteis selecionadas por sua eficácia e segurança terapêuticas;
- Suprimir o uso de práticas consideradas inúteis ou prejudiciais;

- Desenvolver programas governamentais que permitam cultivar e utilizar as plantas selecionadas

Araújo (2002) discorre sobre a implantação da fitoterapia na rede municipal de saúde de Londrina, cita oportunamente, que as práticas de cura com ervas medicinais, longe de representarem reminiscências de um passado rural, são modos de pensar e agir absolutamente contemporâneos, reinterpretações das novas condições de vida encontradas no meio urbano, tendo como base um sistema lógico que ordena e dá sentido aos cuidados corporais, às relações interpessoais e à vida como um todo. Mais que isso: essas práticas não apenas permanecem no contexto urbano, mas a lógica que lhes orienta, ordena as novas experiências a que são expostos os migrantes rurais e seus descendentes. Analisa ainda que no saber popular, ao contrário do que ocorre nas ciências biomédicas, não se define um limite, no que diz respeito à atribuição de uma causa para as doenças, entre natural e sobrenatural. As doenças, de acordo com as concepções populares, são classificadas como materiais e espirituais, sem que haja, no entanto, um padrão pré-estabelecido de sinais e sintomas específicos a cada uma das causas. Conclui que, na fase inicial da pesquisa de campo quando perguntava sobre pessoas conhecedoras das ervas medicinais, obtinha apenas indicações de mulheres envolvidas com curas religiosas.

Sonaglio *et al.*; (2001) definem produto fitoterápico em consonância com a Portaria nº. 6 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde do Brasil², cuja definição deixa entrever que a transformação de uma planta em medicamento deve visar à preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e a segurança de utilização, além de valorizar o seu potencial terapêutico. Os autores concluem que para alcançar estes objetivos, a produção de fitoterápicos requer necessariamente, estudos prévios relativos a aspectos botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, de metodologias analíticas e tecnológicas.

Sarti e Carvalho (2004) remontam a um axioma hipocrático referente à aplicação dos medicamentos que era expresso por duas leis - *similia similibus*

² BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 6. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, v. 133, n. 26, seção 1, p.3176-3179, 31 jan. 1995.

curantur (semelhante cura semelhante) e *contraria contradis curantur* (contrário leva à cura) – para demonstrar que das mesmas nasceram dois sistemas terapêuticos: homeopatia e alopatia. Definem a homeopatia como um sistema de tratamento de doenças por meio de medicamentos capazes de produzir, em indivíduos sadios, sintomas semelhantes aos da doença que está sendo tratada; enquanto que a alopatia é um outro sistema da medicina que combate às doenças por meios contrários a elas, procurando combater as causas. Concluem os autores o porquê dos medicamentos empregados nestes dois sistemas receberem os nomes de homeopáticos e alopáticos e, por inferência direta, afirmam que a fitoterapia é: “*um ramo da ciência médica alopata que utiliza plantas, drogas vegetais, e preparados, delas obtidos, para o tratamento de enfermidades*”.

Alonso (1998) traça um perfil histórico, botânico, fitoquímico, farmacológico, toxicológico e acerca do uso etnomedicinal do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). Inicialmente descreve o vegetal como uma árvore perene, pertencente à família das Mirtáceas (*Mirtaceae*), originário do sudeste asiático, em especial as Ilhas Molucas (Indonésia), sendo também cultivado nas Ilhas de Zanzibar e Pemba (Tanzânia), Madagascar Sri Lanka, Sumatra e Ilha de Santa Maria. Posteriormente foi introduzido na América (Antilhas e Brasil), zona oriental da África tropical e China. Observa que a parte utilizada são os botões florais, ou gemas, sem abrir, secos, e em muito menor escala se utilizam folhas.

A composição fitoquímica do extrato de cravo-da-índia revela a presença de três grandes grupos e suas respectivas subdivisões: *óleo essencial, fitoesteróis e outros*. O óleo essencial (15-20%) é composto fundamentalmente por *eugenol* (60-80%), *eugenil-acetato* (2-27%), *chavicol*, *4-alil-fenol*, *ésteres* (20%), *sesquiterpenos*, (5-6%) tais como α e β -*cariofileno* (5-12%) e α e β -*humuleno*, *calacoreno*, *calameneno*, α -*muruleno*, α -*amorfenol*; *óxido de cariofileno*, *epóxido de humuleno*, *salicilato de metila*, β -*amirina* e outros componentes. Entre os fitoesteróis presentes no extrato encontram-se: β -*sitosterol*, *estigmasterol* e o *campesterol*; e categorizados como *outros* se observa a presença de: *ácido protocatéquico*, *ácido gálico*, *ácido cratególico*, *ácido oleânico*, *ácido 18-dihidro-ursólico*, *salicilato de metila*, β -*amirina*, *metil-eugenol*, *benzaldeído*, *metil-amil-cetona*, α -*elangeneno*, *flavonóides derivados do quercetol* e *kempferol*, *carboidratos*, *traços de vitaminas* e *taninos elágicos* (10-13%) (ALONSO, 1998).

Na Odontologia, e mais especificamente na Endodontia, os cimentos obturadores à base de eugenol e óxido de zinco são empregados correntemente, e segundo Leal (1991) estes cimentos apresentam propriedades físico-químicas bem razoáveis. Entretanto, salienta que ao estudar as propriedades gerais destes agentes deve-se levar em consideração a proporção pó/líquido utilizada já que podem ser muitas as influências que estas variações possam vir a apresentar. Revela que tais cimentos têm demonstrado uma ação agressiva sobre os tecidos vivos, marcada pela necrose do coto pulpar e pelo infiltrado inflamatório de polimorfonucleares nos tecidos periapicais em períodos que variam amplamente, assumindo em alguns casos, um caráter de cronicidade que pode perdurar por vários anos. No que diz respeito à proporção pó/líquido, utilizada na clínica de forma empírica, observa que as misturas mais fluidas levam a uma resposta inflamatória tecidual mais intensa, mas do mesmo modo, apresenta uma maior ação inibitória antimicrobiana.

Os fitoterápicos comumente empregados em Odontologia podem possuir além de compostos orgânicos (de atividade bactericida e bacteriostática), glicosídeos cianogênicos, alérgenos, glucosinolatos e polissacarídeos fibrosos, saponinas tóxicas, lectinas, hemolisinas/coagulantes, ou mesmo, substâncias de atividade neurotóxica como as micotoxinas, originadas de fungos contaminantes de culturas vegetais. O conhecimento dos níveis toleráveis de consumo de determinados compostos é essencial, uma vez que a relação entre o consumo de componentes tóxicos e produção de efeitos adversos serve de base ao estabelecimento de concentrações organicamente toleráveis (NUNES *et al.*; 1999).

3.4 Ação tóxica dos fitoterápicos

Toda substância, do ponto de vista da Toxicologia, pode ser considerada como um agente tóxico, dependendo das condições de exposição, como dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição e vias de administração. Desta forma, faz-se necessário conhecer as condições de uso seguro de substâncias químicas para a saúde humana e ambiental, pois se por um lado todas as substâncias podem ser potencialmente tóxicas, por outro também podem ser usadas de forma segura desde que as condições de exposição sejam mantidas

abaixo dos níveis de tolerância. Quando não for possível estabelecer um limite de tolerância, deve-se evitar a exposição (BARROS e DAVINO, 1996).

Carvalho (2002) pondera sobre a necessidade de pesquisar em animais de laboratório a utilização de novos fármacos através do emprego de ensaios pré-clínicos, avaliando a sua eficácia e toxicidade. Os ensaios pré-clínicos devem ser baseados, segundo o autor, nas Normas para Estudo da Toxicidade de Produtos Fitoterápicos segundo a Portaria nº. 116/MSSNVS, de 8 de agosto de 1996 da Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Analisa ainda que nos experimentos toxicológicos devem-se utilizar animais jovens, saudáveis, pesos e idade aproximados; vivendo em condições ambientais e alimentares constantes durante os experimentos. O autor, ao avaliar a toxicidade da *Psidium guajava* Linn. (goiabeira vermelha), estabeleceu, através do método de Karber e Behrens (1964)³, a DL₅₀ do referido extrato em 779,17 mg/kg.

Utilizando metodologia similar, Melo (2002) avaliou a toxicidade aguda do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), onde o autor percebeu que a mesma foi precisamente calculada em 1.105,14 mg/kg para via intraperitoneal.

Silva *et al.*; (2006), ao avaliar a toxicidade do extrato etanólico bruto de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), basearam-se na classificação de Schuartsman (1980)⁴ para descrever o extrato estudado como moderadamente tóxico pela via intraperitoneal, sendo o método de classificação toxicológica a ser empregado doravante nesta pesquisa.

Zaupa *et al.*; (2002) testaram a toxicidade aguda e subaguda de um medicamento “fitoterápico” misto composto de mel e tinturas de própolis, agrião (*Nasturtium officinale* R. Br.) e malva (*Malva sylvestris* L.); apresentado na forma de spray bucal e indicado para afecções da cavidade bucal e da orofaringe. No teste agudo não foi possível estabelecer a DL₅₀, mesmo empregando-se as doses máximas sugeridas pela literatura (5.000 mg/kg para via oral e 2.500 mg/kg para via intraperitoneal), porém observaram uma significativa redução no peso do coração destes animais, de forma dose-dependente, o que leva a crer que a droga, embora

³ KARBER, G. BEHRENS, B. *Statistical methods in biological assays*. Londres: Griffin Ch. An. C. 1964.

⁴ SCHUARTSMAN, S. *Produtos químicos de uso domiciliar – segurança e riscos toxicológicos*. São Paulo: Almed, p. 92. 1980.

não promova mortalidade, interfere efetivamente no desenvolvimento normal dos órgãos dos roedores. Concluem que utilização da substância nas doses terapêuticas (25 mg/kg) e doses menores não produziram qualquer alteração cardíaca ou em qualquer outro órgão. No teste subagudo encontraram baixa mortalidade, porém sem significância estatística quando comparado ao grupo-controle.

Alonso (1998) reporta que o óleo essencial de cravo-da-índia demonstrou ser neurotóxico e irritante das mucosas, especialmente quando administrado em doses inadequadas. Refere ainda que a DL_{50} do óleo essencial em ratas por via oral alcança 2.650 mg/kg, e, em humanos, a estimativa de dose diária permitida de eugenol é de 2,5 mg/kg.

Entre as propriedades farmacológicas estudadas no cravo-da-índia, a ação antitrombótica foi observada no estudo de Saeed e Gilani (1994). Constataram que o óleo de cravo-da-índia atua na agregação plaquetária induzida pelo ácido araquidônico, pelo fator de ativação plaquetária ou pelo colágeno, mas sua ação se concentra principalmente nos dois primeiros mecanismos.

Esta atividade farmacológica pode ser observada na experiência clínica de Hartnoll, Moore e Douek (1993) quando a ingestão acidental de óleo de cravo-da-índia por uma criança resultou em coma, grave coagulopatia e lesão hepática aguda. Afirmam que a síndrome em estágios tardios produziu um quadro similar à overdose de paracetamol e o regime terapêutico proposto foi o mesmo para este caso.

Experiência similar é relatada por Lane *et al.*; (1991) onde a ingestão de óleo de cravo-da-índia por uma criança de sete meses levou-a a desenvolver depressão do sistema nervoso central, anormalidades urinárias e grave acidose metabólica. Referem que os cuidados de suporte e lavagem gástrica foram suficientes para total recuperação do paciente.

Um caso de coagulação intravascular disseminada e necrose hepatocelular foi descrito por Brown, Biggerstaff e Savidge (1992) relacionado com ingestão acidental de óleo de cravo-da-índia por uma criança de dois anos. Os autores relataram que o paciente foi tratado com heparina e plasma fresco e após os testes específicos de hemostasia, a terapêutica foi complementada com concentrados de fatores de coagulação e inibidores específicos da mesma.

Wright, Baron e Heffner (1995) estudaram o efeito da injeção intravenosa de eugenol em ratos. Observam que apesar deste componente fenólico do óleo de cravo-da-índia ter sido implicado como causa de edema pulmonar não-cardiogênico, o mecanismo de injúria pulmonar é desconhecido. Verificaram os efeitos da injeção intravenosa de eugenol em grupos de 4 e 8 microlitros (6,52 mol/l) e perceberam que ambas causaram dificuldade respiratória aguda com edema pulmonar hemorrágico. Os achados histológicos incluem edema perivascular, intersticial e alveolar, com extravasamento de hemácias e neutrófilos no espaço alveolar, e captura de neutrófilos pelos capilares alveolares. Os autores concluem que a infusão intravenosa de eugenol causa edema pulmonar hemorrágico com seqüestro intrapulmonar de neutrófilos e sugerem que a lesão pode ser ao menos em parte, mediada por ação oxidativa.

A avaliação do grau de alergenicidade do eugenol e do óleo de cravo-da-índia foi objeto de estudo por Rothenstein *et al.*; (1983). Citam que o potencial do eugenol e do óleo de cravo-da-índia na indução de hipersensibilidade cutânea tardia ou no desencadeamento de reações devido à sensibilização cutânea prévia foi avaliado em humanos através de emplastos, observando-se a reação local da pele. Os resultados foram obtidos de 11.632 testes de emplastos apenas com eugenol, em sabidos consumidores de produtos que contém eugenol e/ou óleo de cravo-da-índia ou de misturas aromáticas contendo as mesmas substâncias, coletadas a partir da fragrância e das formulações utilizadas pelas companhias. Uma situação de hipersensibilidade induzida e outra de sensibilização pré-existente foram testadas nas concentrações de 0,05 % e 0,09 %, respectivamente. Em ambos os casos, testes subseqüentes com emplastos exibiram reações cutâneas às misturas de eugenol e isoeugenol, mas não foram realizados estudos no intuito de definir o agente causal. O resultado da pesquisa indica que, na concentração presente nos produtos de consumo, o eugenol isoladamente ou como parte do óleo de cravo-da-índia tem um potencial muito baixo de desencadear reações alérgicas por sensibilização prévia (“reações evocadas”) ou para induzir hipersensibilidade (“reações induzidas”).

A presença de substâncias derivadas de plantas em produtos de largo consumo, como a canela em chicletes, foi estudada e apresentada como agente etiológico de estomatites, leucoplasias e carcinoma de células escamosas, em

estudos respectivos de Miller, Gould e Bernstein (1992), Mihail (1992) e Westra *et al.*; (1998). No primeiro caso, os achados histopatológicos lesionais exibiram hiperqueratose, mucosite liquenóide crônica com infiltrado linfoplasmocitário e acentuada perivasculite crônica. No segundo caso, há características incomuns entre a patologia observada e a sua etiologia, já que uma leucoplasia é rara de ser vista em tais condições, e a maioria dos estudos consultados pelo autor descrevem reações eritematosas à presença crônica de canela. Na última situação descrita, os autores observam que os aldeídos cinâmicos encontrados nos flavorizantes de chicletes podem incitar alterações na mucosa bucal, que habitualmente se traduzem por inflamação e proliferação epitelial, mas que, geralmente, se resolve com a descontinuação do uso. Citam um caso de uma mulher de 24 anos de idade que desenvolveu um carcinoma de células escamosas na língua pela exposição persistente e prolongada aos flavorizantes de canela.

A indução tumoral por elementos constituintes da dieta foi testada por Balachandran e Sivaramkrishnan (1995) através da alimentação via oral de ratos suíços em uma proporção de 100mg/animal/dia de cada substância, por um período de 12 meses e observação clínica dos animais por dois anos. Entre outras substâncias mutagênicas, a canela crua demonstrou ser tumorogênica, induzindo papilomas escamosos em alguns animais e carcinomas pouco diferenciados em outros.

Sainio e Kanerva (1995) ponderam que os cremes dentais não são totalmente seguros do ponto de vista toxicológico para uso indiscriminado, porque observam que quase 50% dos produtos que analisou contêm um total de 30 constituintes amplamente reconhecidos como alergênicos. Concluem que os compostos alergênicos mais comuns nos cremes dentais são os flavorizantes (aldeído cinâmico, óleo de canela e menta) e os conservantes do produto. Os sintomas mais observados à exposição de tais elementos incluem estomatite, queilite, glossite, gengivite, dermatite peribucal e hipersensibilidade imediata.

Perry, Dean e Krenzelok (1990) registraram que no período de cinco meses foram documentados 32 casos de abuso de óleo de canela, no Centro Toxicológico de Pittsburgh. Todos os casos envolveram meninos entre 11 e 16 anos de idade, onde o modo primário de abuso foi pela sucção de palitos ou de dedos mergulhados em óleo de canela. Uma sensação de calor, rubor facial e queimação

bucal foram as principais experiências referidas pelos pacientes. Alguns pacientes se queixaram de náusea ou dor abdominal, mas não foram notados efeitos sistêmicos. Oito pacientes com exposição cutânea tiveram irritações que variaram desde eritemas até pápulas, mas que foram resolvidas mediante lavagem com água e sabão. Duas exposições oculares resultaram em irritação leve e foram adequadamente tratadas com irrigação e diluição do agente irritante.

Soudamini *et al.*; (1995) avaliaram a mutagenicidade e antimutagenicidade de diversos extratos vegetais usados como temperos, através do uso de linhagens de *Salmonella typhimurium* (seqüência gênica de TA 100 à TA 1535). Os resultados indicaram que extratos como pimenta, mostarda e gengibre apresentaram potencial mutagênico. Já o extrato de alho foi eficaz na inibição da mutagenicidade produzida pela ação direta de agentes mutagênicos como o N-Metil N'-Nitro-N-Nitrosoguanidina e Azida de Sódio. Os extratos de cravo-da-índia e de açafrão atuaram como agentes antimutagênicos pela inibição da atividade microssomal dependente na mutagenicidade ocasionada pela substância 2-acetamidofluorene, e resultados similares foram obtidos utilizando o curcumim e o eugenol, que são fenóis presentes no açafrão e no cravo-da-índia, respectivamente.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos extratos vegetais

Inicialmente foram adquiridos, junto a um fornecedor de especiarias, botões florais secos de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). A sua origem remonta a plantações na Bahia segundo informações do próprio fornecedor durante a aquisição, não sabendo, porém, o mesmo, precisar a origem exata de tais plantações. O material foi encaminhado para o Laboratório de Desenvolvimento de Fitomedicamentos e Fitocosméticos (LABDEFF) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), e pesado em balança eletrônica semi-analítica modelo BG 400, marca Gehaka[®]. A pesagem do material resultou em 534,549 gramas de botões florais de cravo-da-índia. Utilizando um balão volumétrico, com capacidade para 6.000 mililitros, foram adicionados os botões previamente pesados e 2.000 mililitros de solução hidroalcoólica a 80%. A proporção obedeceu a 1.800 mililitros de álcool etílico a 96° GL para 200 mililitros de água destilada aferidos em uma proveta graduada de 2.000 mililitros (figura 01).



Figura 01: Adição da solução hidroalcoólica a 80% aos botões florais previamente pesados

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 para este fim (figura 02 e 03).



Figura 02. Filtração das soluções hidroalcoólicas após 141 dias de extração sob refrigeração a 23° C



Figura 03. Evaporação da porção hidroetanólica do extrato através de evaporador rotativo

Após a filtração do extrato foi realizada nova aferição volumétrica para se obter o volume final após a evaporação, que é esperada neste tipo de processo extrativo. O volume final de extrato hidroalcoólico de cravo-da-índia foi de 1.350 mililitros.

Considerando o produto sólido que foi utilizado no preparo dividido pelo volume final da solução, obtivemos:

Vegetal	Massa (g)	Volume inicial (mL)	Volume final (mL)
Cravo-da-índia	534,549	2.000	1.350

Considerando que a concentração de uma solução corresponde à divisão da massa sólida pelo volume ($C = m/v$), temos:

Cravo-da-índia: $534,549 \text{ g} / 1.350 \text{ mL} = 0,3959 \text{ ou } 0,396 \text{ g/mL}$. **C = 396 mg/mL.**

Do montante total do extrato de cravo-da-índia obtido após a filtração – 1.350 mL – 200 mililitros foram separados e acondicionados em frascos de cor âmbar, devidamente vedados, para utilização em estudos microbiológicos de atividade bactericida, não contemplados nesta pesquisa.

Do volume restante da solução (1.150 mL) procedeu-se à vaporização da porção hidroetanólica através de aparelho específico para este fim – evaporador rotativo modelo TE 120, marca Tecnal[®], acoplada a uma bomba a vácuo - obtendo-se assim extrato sólido, de consistência resinosa, cor âmbar escura, e bem dispersível em soro fisiológico, com completa diluição apenas neste veículo nas doses abaixo de 2.000 mg/kg (figura 04).



Figura 04. Animais com marcas diferenciadoras em ácido pícrico

Quando se trabalhou com dosagens acima de 2.000 mg/kg (apenas no ensaio de toxicidade oral aguda) foi observada a persistência de um composto sólido decantado cuja diluição foi completada com a adição de duas a três gotas de óleo de girassol todas as vezes que tais doses elevadas foram trabalhadas.

4.2 Toxicidade aguda dos extratos secos e determinação da DL₅₀

Após apreciação do projeto pelo Programa de Doutorado em Odontologia da UFPB/UFBA foi dado início ao experimento propriamente dito, respeitando as normas propostas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), quando estes são utilizados em pesquisas, visando adequar os animais ao menor desconforto, angústia ou dor. Considerando que os animais submetidos a tais estudos são indefesos e não podem escapar aos procedimentos, foram respeitadas as normas para prática didático-científica da vivisseção de animais de acordo com a Lei Federal nº. 6638 de maio de 1979. (MASSONE, 2003).

Esta pesquisa foi desenvolvida no Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, onde os experimentos de toxicidade aguda foram realizados para o extrato testado. O estudo consistiu em ensaios biológicos utilizando camundongos albinos (*Mus musculus*) fêmeas, com pesos e idade aproximados, divididos em grupamentos de seis animais para diferentes doses administradas via intraperitoneal e oral, visando obter a DL₅₀ do referido extrato e os efeitos comportamentais dos animais submetidos às respectivas doses analisadas. O período de observação deste estudo foi de 24 horas a partir da administração dos fármacos, sendo necessário, porém, ser realizado com diversas doses distintas para que se obtenha o índice exato de toxicidade do produto.

Cada procedimento foi realizado separadamente, obedecendo rigorosamente a mesma metodologia. Os animais tiveram sua alimentação suspensa até 18 horas antes do início de cada experimento, sendo mantida a oferta de água à vontade, temperatura ambiente de 25° C e fotoperíodo de 06.30 às 18:30 horas. Os pesquisadores durante seus trabalhos no laboratório do supracitado biotério utilizaram equipamentos de proteção individual – jaleco e luvas de procedimento. Os procedimentos preliminares do estudo envolvem a separação de seis animais para cada experimento, conferindo-lhes marcações específicas que os diferenciem entre si na gaiola. As marcações sempre realizadas com um pincel embebido em solução de ácido pícrico conferem uma cor amarela na pelagem dos animais, seguindo o padrão já adotado nos experimentos de toxicologia realizados no referido biotério. As marcas diferenciadoras dos animais são: **cabeça marcada (CM)**; **rabo marcado (RM)**; **lombo marcado (LM)**; **cabeça e rabo marcados (CR)**; **sem marca (SM)**; e **cabeça, rabo e lombo marcados (CRL)** (figura 05). A utilização do termo “rabo” marcado (RM) como sinônimo de cauda veio para diferenciar a abreviatura utilizada junto aos animais com cabeça marcada (CM).



Figura 05. Injeção intraperitoneal do extrato diluído em solução fisiológica

Os animais foram pesados em balança (“triple beam balance” ou balança de três traves) da marca Ohaus® (EUA) com capacidade para 2.610 gramas; e posteriormente devolvidos à gaiola de origem. Conhecido o peso dos animais, realizou-se o somatório das suas massas para calcular a quantidade de extrato necessária na diluição em solução fisiológica, obtendo-se assim a dose específica desejada.

Os extratos sólidos foram pesados sobre folhas de papel laminado apoiadas em balança analítica da marca Scaltec® modelo SBA 31, com capacidade para 220 g e desvio-padrão de 0,0001g. A aferição sempre foi cautelosamente precedida da tara da balança com o papel laminado já apoiado sobre a sua superfície, de modo a se obter com precisão as pequenas porções sólidas de extrato necessárias às diluições.

A diluição do meio sólido em soro fisiológico obedece a uma relação de proporcionalidade entre a quantidade total de extrato e o volume de solução que deve ser preparado. Toma-se por convenção que o animal mais pesado de cada lote da amostra recebe um mililitro de volume e daí se infere proporcionalmente a quantidade de solução a infundir em cada um deles. As punções foram realizadas

por via intraperitoneal do lado esquerdo após antissepsia da pele com álcool etílico a 70° GL, sendo respeitados intervalos de cinco minutos entre as administrações individuais, observando-se as alterações comportamentais e orgânicas de cada animal (figura 06).



Figura 06. Administração via oral do extrato diluído em solução fisiológica

Nos ensaios de toxicidade por via oral a solução foi introduzida no trato digestório dos animais através de cânula metálica acoplada a seringa, onde cada um também recebeu um volume proporcional a sua massa corporal, sempre respeitando também intervalos de cinco minutos entre cada aplicação (figura 07).



Figura 07. Aquecimento dos componentes para confecção do creme dermatológico

4.3 - Estudo farmacotécnico na preparação do creme dermatológico

O desenvolvimento do creme dermatológico proposto nesta pesquisa compreende etapas de produção específicas à atividade farmacêutica através da Farmacognosia e da Toxicologia. O estudo da origem, composição, propriedades e as indicações das substâncias usadas nos medicamentos aliado ao conhecimento da toxicidade destes compostos conferem uma boa margem de segurança na utilização dos mesmos como fitomedicamentos a serem testados.

O ensaio para obtenção do creme dermatológico foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento de Fitomedicamentos e Fitocosméticos (LABDEFF) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). A base escolhida para veículo dos extratos vegetais consistiu de um creme dermatológico que pode ser dividido em três fases conforme os constituintes utilizados.

Os elementos constituintes do creme dermatológico passaram por manipulação farmacotécnica, onde após ensaios de diluições centesimais para

obtenção da melhor consistência do creme, foram confeccionados aproximadamente 200 gramas do mesmo para realização do experimento.

Durante a manipulação, os compostos foram adicionados a béqueres aquecidos sobre uma placa elétrica a 76° C e gradativamente misturados em gral de porcelana com pistilo, conforme demonstrado nas figuras 08 e 09.



Figura 08. Creme dermatológico em fase de resfriamento para obtenção da consistência final



Figura 09. Creme dermatológico após a adição do extrato pilular de cravo-da-índia

O creme dermatológico obtido ao final foi acondicionado em recipientes plásticos diferentes e estes rotulados com a inscrição do princípio ativo e as suas respectivas concentrações – cravo-da-índia a 5% e dexpanthenol a 5% - e mais o placebo, para posterior utilização no experimento acerca da sua ação antiinflamatória e cicatrizante sobre feridas elétricas no dorso de ratos albinos wistar (*Rattus norvegicus*).

4.4 Ação antiinflamatória e cicatrizante do creme dermatológico

Os animais foram submetidos às intervenções cirúrgicas conforme preconizado pelo COBEA, sem angústia ou sofrimento para os mesmos. Após serem identificados pelas marcas previamente descritas - **cabeça marcada (CM); rabo marcado (RM); lombo marcado (LM); cabeça e rabo marcados (CR); sem marca (SM)** (à exceção da CRL) – os animais foram anestesiados conforme preconizado por MASSONE, 2003 - através da mistura de cloridrato de ketamina a 5% (Vetanarcol®, König) e cloridrato de xilazina a 2% (Kensol®, König) (figura 10) diluídas na proporção de 1:1 (figura 10). A partir desta solução calculou-se a dose

individual de cada animal obedecendo à proporção de 0,2 mL da referida mistura para cada 100 gramas de peso animal, injetados profundamente na musculatura das patas traseiras. Após um período de latência médio de 7 minutos foi observada a prostração completa de cada animal, a confirmar pela diurese espontânea e abolição total de reflexos palpebrais. Confirmados estes parâmetros, foram realizadas a tricotomia (figura 11) e feridas circulares no dorso de cada animal com bisturi elétrico Deltronix®, modelo BO – 1200, em modo de coagulação (potência 6), eletrodo esférico de 5 mm de diâmetro, com tempo de aplicação de dois segundos, garantindo, assim, homogeneidade no diâmetro e profundidade das mesmas (figuras 12, 13 e 14).



Figura 10. Drogas utilizadas na anestesia dos animais conforme preconizado pelo COBEA



Figura 11. Tricotomia do dorso do animal



Figura 12. Ferida cirúrgica produzida com ponta ativa esférica de bisturi elétrico



Figura 13. Diâmetro das feridas avaliadas pela própria ponta ativa do bisturi elétrico



Figura 14. Ferida (queimadura) elétrica no dorso do animal ao término do procedimento cruento

Os grupos com cinco animais fêmeas cada, adultos, foram tratados diariamente com uso tópico de creme a 5% de extrato de cravo-da-índia, creme sem extrato (grupo-controle ou placebo) e o grupo do dexpanthenol a 5% como controle-positivo (Bepantol[®], como droga já comercializada), porém com o mesmo veículo em todos os cremes testados, pela obtenção dos princípios ativos isoladamente e a manipulação farmacotécnica dos mesmos (figura 15). Os ciclos de morte dos animais foram estabelecidos entre 2, 7 e 14 dias por deslocamento cervical após sedação leve com xilazina (figura 16).



Figura 15. Aplicação tópica do creme dermatológico - tratamento diário
- até a morte pré-estabelecida para cada grupo



Figura 16. Deslocamento cervical após sedação do animal conforme preconizado pelo COBEA

As áreas operadas foram então dissecadas com auxílio de tesoura e pinça e mantidas em solução de Bouin por 24 horas (figuras 17 e 18). A solução de Bouin consiste de uma mistura homogênea com os seguintes componentes e respectivas proporções: solução saturada de ácido pícrico (75%), formaldeído *pró-análise* (20%) e ácido acético glacial *pró-análise* (5%). Após 24 horas as peças cirúrgicas foram lavadas em água corrente e fixadas em álcool a 70%, para daí se iniciar o processo de emblocamento das mesmas em parafina.

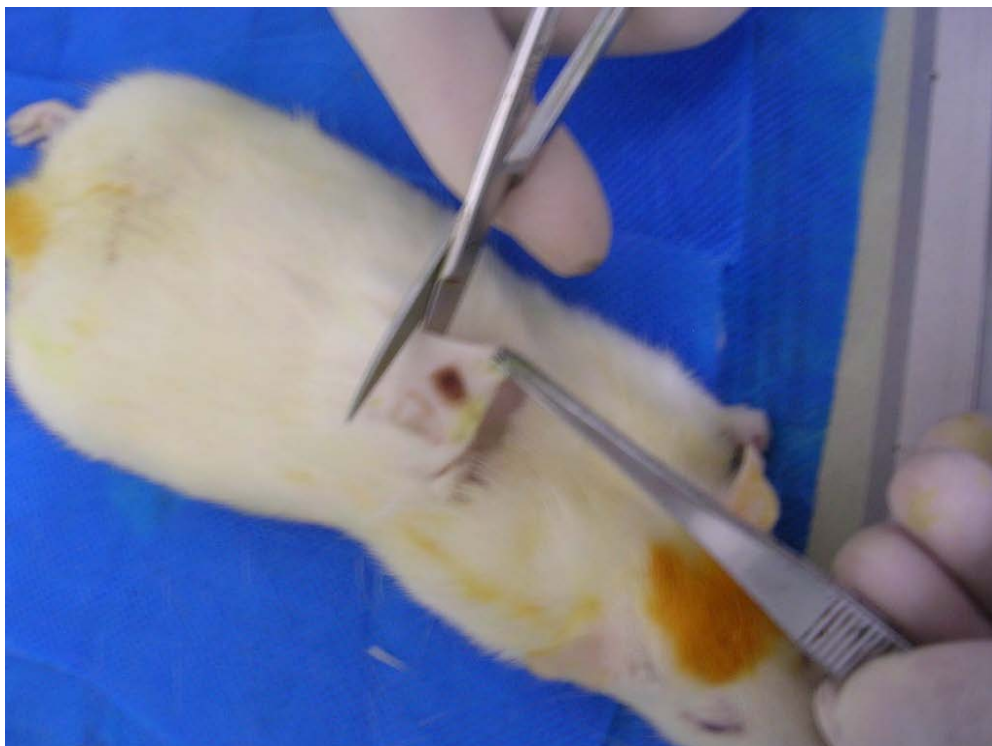


Figura 17. Remoção da peça operatória

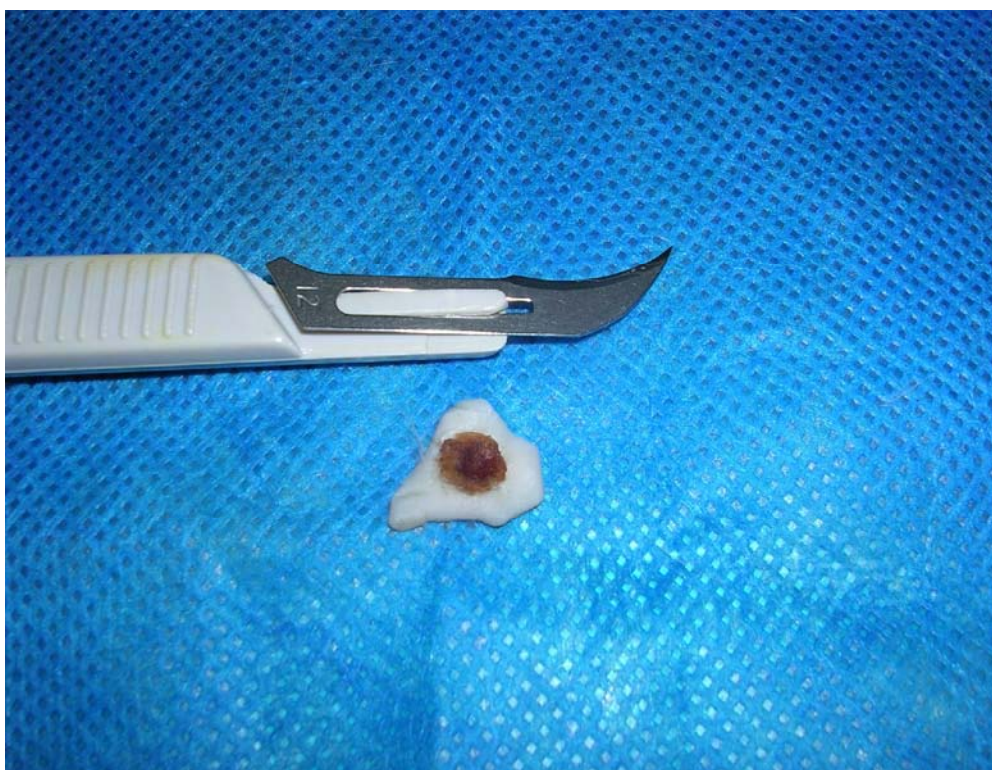


Figura 18: Aspecto da peça operatória

4.5 Metodologia da avaliação histológica

As peças cirúrgicas foram coradas em hematoxilina-eosina (H.E) para uma avaliação mais detalhada do infiltrado inflamatório propriamente dito, enquanto o tricrômio de Masson buscou prover uma adequada visualização da fibroplasia do processo cicatricial.

Foi realizada análise subjetiva, do tipo inter-observador, por três avaliadores experientes em Histologia e Anatomia Patológica realizando suas observações sobre os critérios presentes no processo inflamatório, que posteriormente foram reunidas. Na fase aguda foi esperada presença marcante de infiltrado neutrofílico, e na inflamação crônica se espera contar com maior presença de mononucleares - linfócitos, plasmócitos e histiócitos.

A cicatrização foi avaliada através do grau de reepitelização, formação de crostas, tecido de granulação depositado, organização e quantidade de fibras colágenas, presença de fibroblastos e angiogênese.

5 RESULTADOS

5.1 Toxicidade aguda do extrato pilular e determinação da DL₅₀

Seguindo a metodologia já mencionada, foram realizados estudos em dias distintos para observar a relação entre a dose e o comportamento dos animais submetidos à ação do extrato por via intraperitoneal (VIP) e via oral (VO). Os animais sobreviventes do teste de intoxicação aguda não foram mais utilizados com fins experimentais, sendo mortos por percussão nugal ou deslocamento cervical. Neste estudo a DL₅₀ foi estabelecida pelo método de *Karber e Behrens (1964)* a partir da determinação de D1 (maior dose de sobrevivência) e D2 (menor dose de letalidade). O método exige a observância de diferentes doses que induzam diferentes graus de toxicidade, obtendo-se, daí, variados números de óbitos entre os grupos, variando de um a seis. Calcula-se a mesma através da fórmula:

$$DL_{50} = Df - \Sigma (A.B)/n$$

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

Tabela 01. Classificação da toxicidade dos agentes químicos de acordo com a DL₅₀.

Grau de toxicidade	Categoria	DL ₅₀ em ratos
6	Supertóxico	< 5 mg/kg
5	Extremamente tóxico	5-50 mg/kg
4	Muito tóxico	50-500 mg/kg
3	Moderadamente tóxico	0,5-5 g/kg
2	Pouco tóxico	5-15 g/kg
1	Praticamente atóxico	>15 g/kg

Fonte: Dissertação de Mestrado da U.F.PE.

5.2 Toxicidade aguda via intraperitoneal (VIP)

Tabela 02. Toxicidade aguda na dose de 1.000 mg/kg por via intraperitoneal (VIP)

ANIMAIS	PESO (g)	DOSE ADMINISTRADA (mg)	VOLUME INFUNDIDO (ml)
CM	28,0	28,0	0,87
RM	28,5	28,5	0,89
LM	32,0	32,0	1,00
CR	24,0	24,0	0,75
SM	30,0	30,0	0,93
CRL	26,5	26,5	0,82
TOTAL	169,0	169,0 ou 170,0*	5,26 ou 6,0*

CM: cabeça marcada; RM: rabo marcado; LM: lombo marcado; CR: cabeça e rabo marcados; SM: sem marca; CRL: cabeça, rabo e lombo marcados. * valores arredondados.

QUADRO 01. Efeitos da toxicidade aguda na dose de 1.000 mg/kg por via intraperitoneal (VIP)

- CM: ereção de cauda, movimento de vibrissas, exoftalmia, agitação, piloereção, movimento circular, reação de fuga, tremores leves, movimentos estereotipados, alteração de marcha, espasmos, contorção abdominal, dispnéia, ataxia, edema de focinho, fotofobia, irritação conjuntiva ocular.
- RM: agitação, ereção de cauda, reação de fuga, movimento de vibrissas, alteração de marcha, tremores leves, piloereção, postura em garra, contorção abdominal, tremores maiores, dispnéia, excreção fecal, escurecimento do globo ocular, irritação de conjuntiva ocular, edema de focinho.
- LM: reação de fuga, agitação, movimento de vibrissas, movimentos estereotipados, piloereção, postura em garra, exoftalmia, contorção abdominal, tremores leves, alteração de marcha, tremores maiores, espasmos, convulsões, diurese, edema de focinho.
- CR: reação de fuga, movimentos estereotipados, convulsão, alteração de marcha, irritação de conjuntiva ocular, edema de focinho.
- SM: ereção de cauda, reação de fuga, movimento de vibrissas, espasmos, postura em garra, tremores maiores, movimentos estereotipados, movimentos circulares, aumento da frequência respiratória, dispnéia, convulsão.
- CRL: agitação, movimento de vibrissas, exoftalmia, reação de fuga, aumento da frequência respiratória, tremores maiores, piloereção, dispnéia.

CM: cabeça marcada; RM: rabo marcado; LM: lombo marcado; CR: cabeça e rabo marcados; SM: sem marca; CRL: cabeça, rabo e lombo marcados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS: Foi observado inicialmente que a maioria dos animais apresentou piloereção, edema de focinho, baixas excreções fecais e urinárias, alterações oculares e contorções abdominais. Todos os seis animais deste lote foram a óbito.

Tabela 03. Toxicidade aguda na dose de 500 mg/kg por via intraperitoneal (VIP)

ANIMAIS	PESO (g)	DOSE ADMINISTRADA (mg)	VOLUME INFUNDIDO (ml)
CM	28,5	14,25	1,00
RM	24,0	12,00	0,84
LM	22,0	11,00	0,77
CR	27,0	13,50	0,94
SM	25,5	12,75	0,89
CRL	23,0	11,50	0,80
TOTAL	150,0	75,0 ou 80,0*	5,24 ou 6,0*

CM: cabeça marcada; RM: rabo marcado; LM: lombo marcado; CR: cabeça e rabo marcados; SM: sem marca; CRL: cabeça, rabo e lombo marcados. * valores arredondados.

Quadro 02. Efeitos da toxicidade aguda na dose de 500 mg/kg por via intraperitoneal (VIP)

- CM: reação de fuga, ereção de cauda, piloereção, movimentos estereotipados, dispnéia, discreta excreção fecal, alteração de marcha, abaixamento de membros posteriores, diurese menor.
- RM: reação de fuga, ereção de cauda, piloereção, agitação, dispnéia, elevação de membros posteriores, diurese, movimentos estereotipados, diurese maior, espasmos, refluxo, contorção abdominal, palidez generalizada, fotofobia.
- LM: taquicardia, dispnéia, ereção de cauda, abaixamento de membros posteriores, reação de fuga, piloereção, espasmo, alteração de marcha, palidez generalizada, contorção abdominal, distensão abdominal, respiração visceral, taquipnéia.
- CR: ereção de cauda, dispnéia, agitação, movimentos estereotipados, abaixamento de membros posteriores, distensão abdominal, prostração, respiração visceral, fotofobia, taquipnéia.
- SM: reação de fuga, ereção de cauda, dispnéia, taquicardia, abaixamento de membros posteriores, palidez generalizada, espasmos, dificuldade de locomoção, movimentos estereotipados, piloereção, fotofobia.
- CRL: ereção de cauda, reação de fuga, dispnéia, abaixamento de membros posteriores, piloereção, agitação, distensão abdominal, movimentos estereotipados, taquipnéia.

CM: cabeça marcada; RM: rabo marcado; LM: lombo marcado; CR: cabeça e rabo marcados; SM: sem marca; CRL: cabeça, rabo e lombo marcados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS: boa parte dos sinais clínicos de intoxicação aguda permaneceu similar aos efeitos obtidos com a dosagem empregada anteriormente. Considerando que a dose de 250 mg/kg produziu apenas três óbitos, estabeleceu-se que a menor dose de letalidade (D_2) é de 500 mg/kg.

Logo: $D_2 = 500 \text{ mg/kg}$.

Tabela 04. Toxicidade aguda na dose de 250 mg/kg por via intraperitoneal (VIP)

ANIMAIS	PESO (g)	DOSE ADMINISTRADA (mg)	VOLUME INFUNDIDO (ml)
CM	28,5	7,12	0,89
RM	26,5	6,62	0,83
LM	29,0	7,25	0,90
CR	27,0	6,75	0,84
SM	32,0	8,00	1,00
CRL	25,0	6,25	0,78
TOTAL	168,0	41,99 ou 42,0*	5,19 ou 5,2

CM: cabeça marcada; RM: rabo marcado; LM: lombo marcado; CR: cabeça e rabo marcados; SM: sem marca; CRL: cabeça, rabo e lombo marcados. * valores arredondados.

Quadro 03. Efeitos da toxicidade aguda na dose de 250 mg/kg por via intraperitoneal (VIP)

- CM: espasmos, reação de fuga, movimento circular, ereção de cauda, alteração de marcha, piloereção, tremores finos, excreção fecal, movimentos estereotipados, postura em garra, aumento da frequência respiratória, contorções abdominais, arrastamento de membros posteriores, agitação com saltos da gaiola (09 saltos), postura de ataque, dispnéia.
- RM: agitação, reação de fuga, ereção de cauda, piloereção, abaixamento de membros posteriores, movimento circular, diurese, movimento estereotipado, alteração de marcha, espasmos, contorções abdominais, dispnéia, palidez generalizada.
- LM: ereção de cauda, aumento da frequência respiratória, reação de fuga, movimento circular, agitação, abaixamento de membros posteriores, diurese, espasmo, piloereção, postura de ataque, postura em garra, agitação com saltos da gaiola (03 saltos), tremores maiores, convulsões, contorções abdominais, alteração de marcha, excreção fecal, dispnéia.
- CR: piloereção, ereção de cauda, reação de fuga, movimento circular, tremores leves, agitação, movimentos estereotipados, postura em garra, aumento da frequência respiratória, diurese.
- SM: movimento circular, ereção de cauda, reação de fuga, agitação, postura em garra, tremores maiores, contorções abdominais, agitação com saltos da gaiola (08 saltos), elevação de membros posteriores, agressividade, tremores leves.
- CRL: reação de fuga, piloereção, agitação, agressividade, ereção de cauda, espasmos, tremores leves, postura em garra, tremores maiores, movimentos estereotipados, postura de ataque, dispnéia.

CM: cabeça marcada; RM: rabo marcado; LM: lombo marcado; CR: cabeça e rabo marcados; SM: sem marca; CRL: cabeça, rabo e lombo marcados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS: animais dispnéicos, agitados, agressivos; alguns apresentaram convulsões (CRL, SM, LM, CM); todos em postura em garra e de ataque; e palidez generalizada (SM, LM, RM). Observou-se diurese (LM, CR, RM) e excreção fecal, diferentemente dos ensaios pregressos. Foram verificados 03 óbitos neste grupo.

Tabela 05. Toxicidade aguda na dose de 125 mg/kg por via intraperitoneal (VIP)

ANIMAIS	PESO (g)	DOSE ADMINISTRADA (mg)	VOLUME INFUNDIDO (ml)
CM	25,0	3,12	0,80
RM	28,0	3,50	0,90
LM	22,5	2,81	0,72
CR	28,5	3,56	0,92
SM	31,0	3,87	1,00
CRL	26,5	3,31	0,85
TOTAL	161,5	20,17 ou 21,0*	5,19 ou 5,5*

CM: cabeça marcada; RM: rabo marcado; LM: lombo marcado; CR: cabeça e rabo marcados; SM: sem marca; CRL: cabeça, rabo e lombo marcados. * valores arredondados.

Quadro 04. Efeitos da toxicidade aguda na dose de 125 mg/kg por via intraperitoneal (VIP)

- CM: ereção de cauda, piloereção, reação de fuga, abaixamento de membros posteriores, agitação, aumento da frequência respiratória, tremores leves, movimento estereotipado, movimento de vibrissas, postura em garra, taquicardia, exoftalmia, dispnéia, contorções abdominais, excreção fecal, fotofobia.
- RM: reação de fuga, piloereção, movimento estereotipado, tremores, ereção de cauda, postura em garra, discreta diurese e excreção fecal, refluxo, exoftalmia, contorções abdominais, movimentos circulares, palidez generalizada, fotofobia, dispnéia, lacrimejamento, edema de focinho.
- LM: ereção de cauda, piloereção, reação de fuga, exoftalmia, excreção fecal, diurese.
- CR: ereção de cauda, reação de fuga, movimentos estereotipados, agitação, contorções abdominais.
- SM: reação de fuga, postura de ataque, movimentos estereotipados, movimentos circulares, exoftalmia, ereção de cauda, dispnéia, contorções abdominais, movimento de vibrissas, edema de focinho.
- CRL: reação de fuga, movimentos circulares, exoftalmia, aumento da frequência respiratória, piloereção, excreção fecal, contorções abdominais, movimentos estereotipados, dispnéia, agitação.

CM: cabeça marcada; RM: rabo marcado; LM: lombo marcado; CR: cabeça e rabo marcados; SM: sem marca; CRL: cabeça, rabo e lombo marcados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS: Ao término do experimento todos os animais apresentaram: taquicardia, lacrimejamento, intensas contorções abdominais, excreção fecal abundante e edema de focinho. Todos apresentaram alterações de marcha por distensão abdominal. Não foram observados óbitos.

A dosagem deste item foi escolhida mediante a multiplicação da dose anterior ou 125 mg/kg – que não matou nenhum animal da amostra – por 1,5, chegando-se então à dose trabalhada.

Tabela 06. Toxicidade aguda na dose de 187,5 mg/kg por via intraperitoneal (VIP)

ANIMAIS	PESO (g)	DOSE ADMINISTRADA (mg)	VOLUME INFUNDIDO (ml)
CM	23,5	4,41	0,84
RM	26,0	4,87	0,93
LM	24,5	4,59	0,87
CR	25,0	4,69	0,89
SM	24,5	4,59	0,87
CRL	28,0	5,25	1,00
TOTAL	151,5	28,40 ou 29,0*	5,40 ou 6,0*

CM: cabeça marcada; RM: rabo marcado; LM: lombo marcado; CR: cabeça e rabo marcados; SM: sem marca; CRL: cabeça, rabo e lombo marcados. * valores arredondados.

Quadro 05 – Efeitos da toxicidade aguda na dose de 187,5 mg/kg por via intraperitoneal (VIP)

- CM: aumento da frequência respiratória, reação de fuga, piloereção, movimento circular, movimento estereotipado, dispnéia, agitação, movimento de vibrissas, taquicardia, palidez generalizada, postura em garra, contorções abdominais, ereção de cauda, lacrimejamento, edema de focinho, abaixamento da frequência respiratória, ataxia, refluxo.
- RM: excreção fecal, abaixamento de membros posteriores, movimentos circulares, reação de fuga, piloereção, exoftalmia, taquicardia, ereção de cauda, tremores menores, movimentos estereotipados, espasmos, contorções abdominais, dispnéia, sonolência, edema de focinho, lacrimejamento.
- LM: agitação, reação de fuga, abaixamento de membros posteriores, piloereção, movimento de vibrissas, alteração de marcha, contorções abdominais, marcha ancerina, lacrimejamento, sonolência.
- CR: discreta diurese, reação de fuga, movimentos circulares, agitação, movimento de vibrissas, alteração de marcha, ereção de cauda, aumento da frequência respiratória, espasmo, lacrimejamento, piloereção, movimento estereotipado, postura em garra, abaixamento de membros posteriores, edema de focinho, palidez generalizada.
- SM: reação de fuga, excreção fecal, exoftalmia, movimento de vibrissas, tremores menores, postura em garra, ereção de cauda, alteração de marcha (trôpego), contorções abdominais, piloereção, tremores maiores.
- CRL: movimento de vibrissas, reação de fuga, dispnéia, contorções abdominais, levantamento de membros posteriores, excreção fecal tremores menores.

CM: cabeça marcada; RM: rabo marcado; LM: lombo marcado; CR: cabeça e rabo marcados; SM: sem marca; CRL: cabeça, rabo e lombo marcados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS: Ao término do experimento todos os animais apresentaram: extrema piloereção, palidez generalizada, lacrimejamento, sonolência, contorções abdominais e dispnéia. Verificou-se excreção fecal abundante e baixa diurese (01 animal apenas). No intervalo de observação (primeiras 24 horas após o experimento) houve apenas dois óbitos.

A dosagem deste item foi escolhida mediante a multiplicação da dose de 250 mg/kg – que matou três animais da amostra – por 1,5, chegando-se então à dose trabalhada. O cálculo da DL_{50} pelo método de Karber e Behrens (1964) para ser aplicado necessita da verificação de doses letais progressivas para um até todos os seis animais de cada amostra. Logo, trabalhou-se neste ensaio com uma dose que presumivelmente matasse 04 ou 05 animais dado as impressões obtidas com os ensaios pregressos.

Tabela 07. Toxicidade aguda na dose de 375,0 mg/kg por via intraperitoneal (VIP)

ANIMAIS	PESO (g)	DOSE ADMINISTRADA (mg)	VOLUME INFUNDIDO (ml)
CM	32,5	12,18	0,89
RM	31,5	11,81	0,86
LM	34,0	12,75	0,93
CR	32,0	12,00	0,87
SM	32,5	12,18	0,89
CRL	36,5	13,68	1,00
TOTAL	199,0	74,60 ou 75,0*	5,44 ou 6,0*

CM: cabeça marcada; RM: rabo marcado; LM: lombo marcado; CR: cabeça e rabo marcados; SM: sem marca; CRL: cabeça, rabo e lombo marcados. * valores arredondados.

Quadro 06. Efeitos da toxicidade aguda na dose de 375,0 mg/kg por via intraperitoneal (VIP)

- CM: ereção de cauda, reação de fuga, agitação, espasmo, piloereção, palidez, movimentos estereotipados, movimentos circulares, aumento da frequência respiratória, postura em garra, tremores leves, movimento de vibrissas, exoftalmia, dispnéia, contorções abdominais, edema de focinho, cianose, excreção fecal, inclinação da cauda para cima, desorientação, tremores maiores, refluxo, abaixamento de membros anteriores, diurese leve.
- RM: ereção de cauda, reação de fuga, aumento da frequência respiratória, exoftalmia, movimento de vibrissas, postura em garra, piloereção, movimentos estereotipados, palidez, postura de ataque, excreção fecal, edema de focinho, contorções abdominais, dispnéia, marcha trôpega, desorientação, refluxo, distensão abdominal.
- LM: ereção de cauda, reação de fuga, exoftalmia, agitação, inclinação da cauda para cima, movimento de vibrissas, movimentos circulares, piloereção, tremores maiores, desorientação, movimentos estereotipados, ondulações de cauda, elevação de membros posteriores e anteriores, edema de focinho, convulsões, dispnéia.
- CR: movimento de vibrissas, ereção de cauda, reação de fuga, agitação, exoftalmia, piloereção, palidez, movimentos circulares, espasmos, tremores maiores, aumento da frequência respiratória, postura de ataque, movimentos estereotipado, contorções abdominais, edema de focinho.
- SM: ereção de cauda, movimentos circulares, agitação, tremores maiores, reação de fuga, movimento de vibrissas, piloereção, palidez, movimento estereotipado, exoftalmia, excreção fecal, agressividade.
- CRL: ereção de cauda, agitação, reação de fuga, piloereção, tremores maiores, postura de ataque, movimentos circulares, movimento de vibrissas, movimentos estereotipado, contorções abdominais, excreção fecal, distensão abdominal.

CM: cabeça marcada; RM: rabo marcado; LM: lombo marcado; CR: cabeça e rabo marcados; SM: sem marca; CRL: cabeça, rabo e lombo marcados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS: Observou-se que os animais apresentaram-se inicialmente demasiadamente agitados e ao término do experimento encontraram-se deprimidos, dispnéicos, com palidez generalizada, convulsões (02 animais – RM e CR), edema de focinho, excreção fecal abundante e baixa diurese (01 animal apenas – CM). Todos apresentaram intensas contorções abdominais. Foram observados quatro óbitos, entre os seis animais que compõem cada lote.

A dosagem deste item foi escolhida mediante a necessidade de se obter um resultado que levasse a um óbito apenas, considerando que na dose de 125 mg/kg não houve óbitos na amostra. Logo, a dose de 137,5 mg/kg demonstrou-se ser a maior dose que não provocou nenhum óbito na amostra testada ou **D1** (maior dose de sobrevivência).

Tabela 08. Toxicidade aguda na dose de 137,5 mg/kg por via intraperitoneal (VIP)

ANIMAIS	PESO (g)	DOSE ADMINISTRADA (mg)	VOLUME INFUNDIDO (ml)
CM	23,0	3,16	0,85
RM	27,0	3,71	1,00
LM	26,0	3,57	0,96
CR	26,0	3,57	0,96
SM	22,5	3,09	0,83
CRL	22,0	3,02	0,80
TOTAL	146,5	20,12 ou 21,0*	5,4 ou 6,0*

CM: cabeça marcada; RM: rabo marcado; LM: lombo marcado; CR: cabeça e rabo marcados; SM: sem marca; CRL: cabeça, rabo e lombo marcados. * valores arredondados.

Quadro 07. Efeitos da toxicidade aguda na dose de 137,5 mg/kg

- CM: ereção de cauda, abaixamento de membros posteriores, aumento da frequência respiratória, espasmos, movimentos circulares, redução da frequência respiratória, prostração, tremores leves, contorções abdominais, piloereção.
- RM: agitação, movimentos circulares, reação de fuga, contorções abdominais, tremores leves, espasmos, palidez, movimentos estereotipados, ereção de cauda, sonolência.
- LM: espasmos, movimentos circulares, tremores leves, alteração de marcha (trôpego), palidez, reação de fuga, ereção de cauda, agressividade, excreção fecal, piloereção.
- CR: aumento da frequência respiratória, movimentos circulares, reação de fuga, espasmos, contorções abdominais, abaixamento de membros anteriores, prostração, piloereção.
- SM: aumento da frequência respiratória, espasmos, movimentos circulares, reação de fuga, movimentos estereotipados, excreção fecal mole (diarréia).
- CRL: ereção de cauda, tremores leves, reação de fuga, movimentos estereotipados, espasmos, diarréia.

CM: cabeça marcada; RM: rabo marcado; LM: lombo marcado; CR: cabeça e rabo marcados; SM: sem marca; CRL: cabeça, rabo e lombo marcados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS: Ao término do experimento observou-se palidez, animais depressivos, excreção fecal abundante, intensas contorções abdominais, redução da frequência respiratória, abaixamento de membros anteriores, tremores leves e total ausência de diurese. Os animais do experimento sobreviveram e ficaram completamente recuperados.

A dosagem deste item foi escolhida mediante a necessidade de se obter um resultado que produzisse cinco óbitos, considerando que a dose de 375 mg/kg produziu quatro óbitos na amostra, enquanto a dose de 500 mg/kg levou à morte todos os animais do lote, sendo, pois, a D₁ ou dose mínima capaz de matar toda a amostra, conforme explicitado anteriormente.

Tabela 09. Toxicidade aguda na dose de 437,5 mg/kg por via intraperitoneal (VIP)

ANIMAIS	PESO (g)	DOSE ADMINISTRADA (mg)	VOLUME INFUNDIDO (ml)
CM	25,0	10,94	0,89
RM	24,5	10,72	0,87
LM	21,0	9,18	0,75
CR	22,5	9,84	0,80
SM	28,0	12,25	1,00
CRL	23,0	10,06	0,82
TOTAL	144,0	62,99 ou 63,0*	5,13 ou 5,5*

CM: cabeça marcada; RM: rabo marcado; LM: lombo marcado; CR: cabeça e rabo marcados; SM: sem marca; CRL: cabeça, rabo e lombo marcados. * valores arredondados.

Quadro 08. Efeitos da toxicidade aguda na dose de 437,5 mg/kg por via intraperitoneal (VIP)

- CM: alteração de marcha, movimentos estereotipados, reação de fuga, ereção de cauda, movimento circular, contorções abdominais, aumento da frequência respiratória, tremores leves, excreção fecal, edema de focinho, redução da frequência respiratória, espasmos, prostração, fotofobia, sonolência.
- RM: reação de fuga, movimento de vibrissas, agitação, tremores leves, espasmos, excreção fecal, contorções abdominais, piloereção, tremores maiores, fotofobia, redução da frequência respiratória, excreção fecal com muco, elevação de membros posteriores, alteração de marcha (trôpego), sonolência.
- LM: ereção de cauda, reação de fuga, piloereção, aumento da frequência respiratória, movimentos circulares, movimentos estereotipados, tremores leves, contorções abdominais, fotofobia, alteração de marcha, espasmos, redução da frequência respiratória, tremores maiores, sonolência.
- CR: agitação, reação de fuga, movimento de vibrissas, piloereção, postura em garra, tremores leves, contorções abdominais, movimentos circulares, movimentos estereotipados, ereção de cauda, alteração de marcha, saltos da gaiola (1), prostração, edema de focinho.
- SM: movimento de vibrissas, agitação, ereção de cauda, diurese, postura em garra, agressividade, movimentos estereotipados, contorções abdominais, tremores leves, aumento da frequência respiratória, movimentos circulares, movimento em “S” com a cauda, agressividade, saltos da gaiola (03), espasmos, sibilo, postura de ataque.
- CRL: reação de fuga, movimento de vibrissas, movimentos estereotipados, aumento da frequência respiratória, movimentos circulares, tremores leves, postura em garra, diurese.

CM: cabeça marcada; RM: rabo marcado; LM: lombo marcado; CR: cabeça e rabo marcados; SM: sem marca; CRL: cabeça, rabo e lombo marcados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS: Ao término do experimento os animais estavam reativos, com distensão abdominal e agressivos (ora sonolentos); discreta diurese e excreção fecal endurecida. Há a verificação de excreção fecal com muco ao término do experimento (CM, RM, LM), e todos os animais apresentaram redução da frequência respiratória. Constatou-se que neste período foram registrados 05 óbitos, com sobrevivência do CRL.

Tabela 10. Toxicidade aguda na dose de 180,0 mg/kg por via intraperitoneal (VIP)

ANIMAIS	PESO (g)	DOSE ADMINISTRADA (mg)	VOLUME INFUNDIDO (ml)
CM	25,0	10,94	0,89
RM	24,5	10,72	0,87
LM	21,0	9,18	0,75
CR	22,5	9,84	0,80
SM	28,0	12,25	1,00
CRL	23,0	10,06	0,82
TOTAL	144,0	62,99 ou 63,0*	5,13 ou 5,5*

CM: cabeça marcada; RM: rabo marcado; LM: lombo marcado; CR: cabeça e rabo marcados; SM: sem marca; CRL: cabeça, rabo e lombo marcados. * valores arredondados.

Quadro 09. Efeitos da toxicidade aguda na dose de 180,0 mg/kg por via intraperitoneal (VIP)

- CM: alteração de marcha, movimentos estereotipados, reação de fuga, ereção de cauda, movimento circular, contorções abdominais, aumento da frequência respiratória, tremores leves, excreção fecal, edema de focinho, redução da frequência respiratória, espasmos, prostração, fotofobia, sonolência.
- RM: reação de fuga, movimento de vibrissas, agitação, tremores leves, espasmos, excreção fecal, contorções abdominais, piloereção, tremores maiores, fotofobia, redução da frequência respiratória, excreção fecal com muco, elevação de membros posteriores, alteração de marcha (trôpego), sonolência.
- LM: ereção de cauda, reação de fuga, piloereção, aumento da frequência respiratória, movimentos circulares, movimentos estereotipados, tremores leves, contorções abdominais, fotofobia, alteração de marcha, espasmos, redução da frequência respiratória, tremores maiores, sonolência.
- CR: agitação, reação de fuga, movimento de vibrissas, piloereção, postura em garra, tremores leves, contorções abdominais, movimentos circulares, movimentos estereotipados, ereção de cauda, alteração de marcha, saltos da gaiola (1), prostração, edema de focinho.
- SM: movimento de vibrissas, agitação, ereção de cauda, diurese, postura em garra, agressividade, movimentos estereotipados, contorções abdominais, tremores leves, aumento da frequência respiratória, movimentos circulares, movimento em “S” com a cauda, agressividade, saltos da gaiola (03), espasmos, sibilo, postura de ataque.
- CRL: reação de fuga, movimento de vibrissas, movimentos estereotipados, aumento da frequência respiratória, movimentos circulares, tremores leves, postura em garra, diurese.

CM: cabeça marcada; RM: rabo marcado; LM: lombo marcado; CR: cabeça e rabo marcados; SM: sem marca; CRL: cabeça, rabo e lombo marcados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS: Ao término do experimento os animais estavam reativos, com distensão abdominal e agressivos (ora sonolentos); discreta diurese e excreção fecal endurecida. Há a verificação de excreção fecal com muco ao término do experimento (CM, RM, LM), e todos os animais apresentaram redução da frequência respiratória. Constatou-se que neste período foram registrados 05 óbitos, com sobrevivência do animal marcado CRL.

Tabela 11. Aplicação do método de Karber e Behrens (1964) para cálculo da DL₅₀.

$$DL_{50} = Df - \frac{\Sigma(a \times b)}{n} =$$

$$DL_{50} = 500 - \frac{1470}{6} =$$

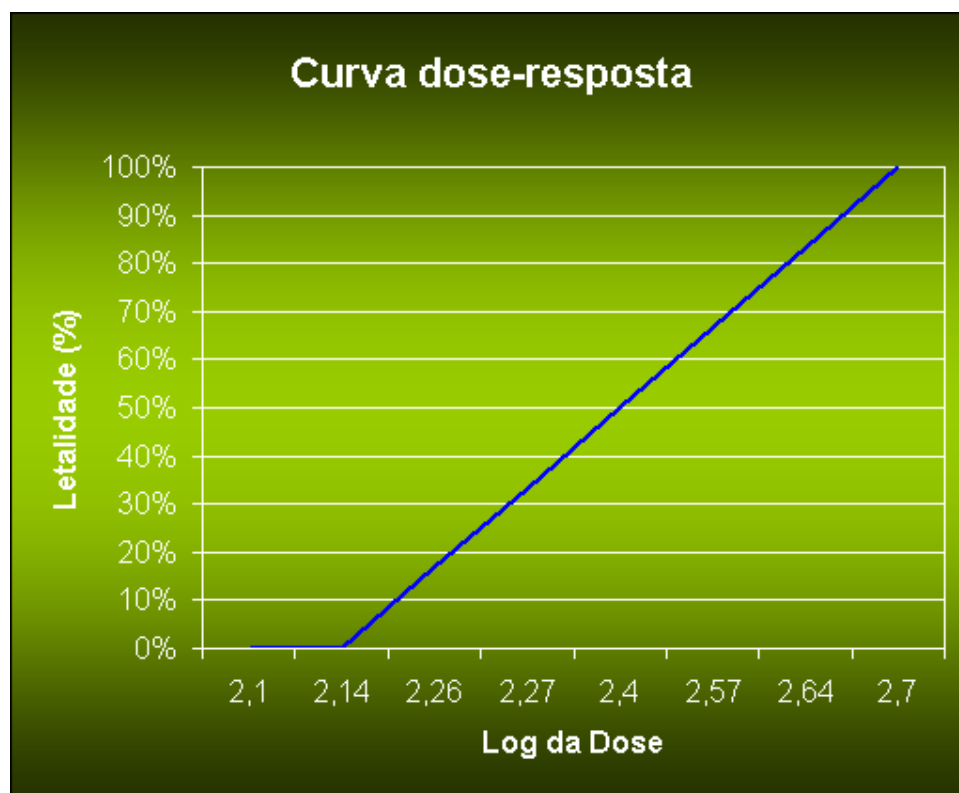
$$DL_{50} = 500 - 245 =$$

$$DL_{50} = 255 \text{ mg/kg}$$

Determinação da DL₅₀ VIA IP

DOSE (mg / Kg)	Nº de Óbitos	A	b	a x b
D1				
137,5 mg/kg	0/6	137,5 – 180 = 42,5	$\frac{0+1}{2} =$ 0,5	21,25
180 mg/kg	1/6	180 – 187,5 = 7,5	$\frac{1+2}{2} =$ 1,5	11,25
187,5 mg/kg	2/6	187,5 - 250 = 62,5	$\frac{2+3}{2} =$ 2,5	156,25
250 mg/kg	3/6	250 – 437,5 = 187,5	$\frac{3+4}{2} =$ 3,5	656,25
375 mg/kg	4/6	375 – 437,5 = 62,5	$\frac{4+5}{2} =$ 4,5	281,25
437,5 mg/kg	5/6	437,5 - 500 = 62,5	$\frac{5+6}{2} =$ 5,5	343,75
D2				
500 mg/kg	6/6	-	-	$\Sigma =$ 1470

Tabela 12. Curva dose-resposta: correlação entre o logaritmo decimal das doses administradas e o percentual de letalidade das mesmas. Observe que na ordenada entre 125 e 137,5 não houve óbitos, deixando um *Plateau* na abscissa do gráfico



5.3 Toxicidade aguda via oral (VO)

Tabela 13. Toxicidade aguda na dose de 1.000 mg/kg por via oral (VO)

ANIMAIS	PESO (g)	DOSE ADMINISTRADA (mg)	VOLUME INFUNDIDO (ml)
CM	21,0	21,0	1,00
RM	18,0	18,0	0,86
LM	16,5	16,5	0,78
CR	20,0	20,0	0,95
SM	17,0	17,0	0,81
CRL	20,5	20,5	0,98
TOTAL	113,0	113,0*	5,38 ou 5,5*

CM: cabeça marcada; RM: rabo marcado; LM: lombo marcado; CR: cabeça e rabo marcados; SM: sem marca; CRL: cabeça, rabo e lombo marcados. * valores arredondados.

Quadro 10. Efeitos da toxicidade aguda na dose de 1.000 mg/kg por via oral (VO)

- CM: aumento da frequência respiratória, refluxo, tremores leves, exoftalmia, postura estática, excreção fecal, diurese acentuada, palidez, reação de fuga, movimentos estereotipados, dispnéia, contorções, intensa dispnéia, inversão de marcha, movimento circular, fotofobia, taquipnéia, agitação, tremores maiores, edema de focinho.
- RM: ereção de cauda, inversão de marcha, espasmos, reação de fuga, movimento circular, piloereção, movimento estereotipado, postura em garra, aumento da frequência respiratória, movimento de vibrissas, postura de ataque, palidez, tremores leves, refluxo, postura estática, excreção fecal.
- LM: espasmos, agressividade, ereção de cauda, reação de fuga, movimento circular, agitação, piloereção, postura em garra, movimento estereotipado, lacrimejamento, alteração de marcha, postura de ataque, edema de focinho, exoftalmia, fotofobia, tremores maiores.
- CR: reação de fuga, movimento circular, aumento da frequência respiratória, espasmos, movimento estereotipado, dispnéia, movimento de vibrissas, agitação, exoftalmia, postura estática, agressividade fotofobia, tremores maiores.
- SM: aumento da frequência respiratória, taquicardia, exoftalmia, postura estática, agitação, movimento de vibrissas, saltos, ereção de cauda, reação de fuga, contorções, movimento circular, fotofobia, agressividade, postura em garra.
- CRL: saltos, espasmos, tremores leves, reação de fuga, movimento circular, agitação, ereção de cauda, movimento estereotipado, agressividade, fotofobia, piloereção.

CM: cabeça marcada; RM: rabo marcado; LM: lombo marcado; CR: cabeça e rabo marcados; SM: sem marca; CRL: cabeça, rabo e lombo marcados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS: foi observada discreta excreção fecal (02 animais), e baixa diurese (01 animal). Os animais se mantêm agressivos inclusive se digladiando entre si, com sucessivos espasmos, fotofobia e hiperativos. Nenhum animal deste lote foi a óbito no período observado.

Tabela 14. Toxicidade aguda na dose de 2.400 mg/kg por via oral (VO) (primeira dosagem a ser empregada diluição complementar com óleo de girassol)

ANIMAIS	PESO (g)	DOSE ADMINISTRADA (mg)	VOLUME INFUNDIDO (ml)
CM	35,0	84,00	0,97
RM	29,5	70,8	0,82
LM	34,0	81,6	0,94
CR	30,0	72,0	0,83
SM	30,0	72,0	0,83
CRL	36,0	86,40	1,00
TOTAL	194,5	466,8 ou 467,0*	5,39 ou 5,5*

CM: cabeça marcada; RM: rabo marcado; LM: lombo marcado; CR: cabeça e rabo marcados; SM: sem marca; CRL: cabeça, rabo e lombo marcados. * valores arredondados.

Quadro 11. Efeitos da toxicidade aguda na dose de 2.400 mg/kg por via oral (VO)

- CM: ereção de cauda, reação de fuga, agitação, excreção fecal, piloereção, tremores leves, espasmos, movimento de vibrissas, tetania, diurese, agressividade, postura de ataque, desorientação.
- RM: movimentos circulares, reação de fuga, aumento da frequência respiratória, frênico-vocal, excreção fecal, piloereção, alteração de marcha, palidez, tremores leves, ereção de cauda, agitação, espasticidade, postura de ataque, espasmos, aumento da libido, taquicardia, edema de focinho, movimento de vibrissas.
- LM: ereção de cauda, aumento da frequência respiratória, frênico-vocal, reação de fuga, exoftalmia, postura estática, movimento de vibrissas, movimentos circulares, palidez, convulsão.
- CR: reação de fuga, ereção de cauda, aumento da libido, agitação, movimento estereotipado, aumento da frequência respiratória, postura de ataque, refluxo.
- SM: agitação, movimento circular, movimento estereotipado, ereção de cauda, alteração de marcha, reação de fuga, tremores maiores.
- CRL: agitação, ereção de cauda, reação de fuga, alteração de marcha, tremores leves, postura de ataque, agressividade, alienação, tremores maiores.

CM: cabeça marcada; RM: rabo marcado; LM: lombo marcado; CR: cabeça e rabo marcados; SM: sem marca; CRL: cabeça, rabo e lombo marcados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS: foi observado aumento da frequência respiratória em todos os animais. Observou-se também aumento da libido em dois animais e um grande contingente de sinais de neurotoxicidade – tremores, alteração de marcha, convulsão. Verificou-se baixa diurese e baixa excreção fecal. Nenhum animal deste lote foi a óbito no período observado.

Tabela 15. Toxicidade aguda na dose de 2.880 mg/kg por via oral (VO)

ANIMAIS	PESO (g)	DOSE ADMINISTRADA (mg)	VOLUME INFUNDIDO (ml)
CM	43,0	123,84	0,99
RM	39,0	112,32	0,90
LM	43,5	125,28	1,00
CR	38,5	110,88	0,88
SM	42,5	122,40	0,98
CRL	37,0	106,56	0,85
TOTAL	243,5	701,28 ou 702,0*	5,60 ou 6,0*

CM: cabeça marcada; RM: rabo marcado; LM: lombo marcado; CR: cabeça e rabo marcados; SM: sem marca; CRL: cabeça, rabo e lombo marcados. * valores arredondados.

Quadro 12. Efeitos da toxicidade aguda na dose de 2.880 mg/kg por via oral (VO)

- CM: inversão de marcha, ereção de cauda, exoftalmia, movimento estereotipado, movimento de vibrissas, movimento circular, reação de fuga, aumento da frequência respiratória, tremores leves, postura de ataque, postura estática, espasmos, contorção, alteração de marcha, abaixamento de membros posteriores e anteriores, abaixamento da frequência respiratória, espasmos, tremores maiores, edema de focinho.
- RM: ereção de cauda, movimento circular, movimento de vibrissas, excreção fecal, inversão de marcha, reação de fuga, piloereção, movimento estereotipado, exoftalmia, diurese, espasmos, edema de focinho, postura estática, sonolência.
- LM: ereção de cauda, movimento circular, agitação, reação de fuga, tremores leves, exoftalmia, movimento de vibrissas, tremores maiores, contorções, abaixamento de membros posteriores e anteriores, postura estática, espasticidade, espasmos, dispnéia, palidez, alteração de marcha (ébria), sonolência, palidez generalizada.
- CR: excreção fecal, ereção de cauda, reação de fuga, piloereção, inversão de marcha, movimento circular, agitação, tremores leves, aumento da frequência respiratória, edema de focinho, espasmos, movimento estereotipado.
- SM: ereção de cauda, piloereção, reação de fuga, agitação, exoftalmia, alteração de marcha, palidez, contorções, movimento estereotipado.
- CRL: excreção fecal, ereção de cauda, movimento de vibrissas, piloereção, exoftalmia, movimento circular, movimento estereotipado, inversão de marcha, agitação, palidez generalizada, agressividade, aumento da frequência respiratória, tremores maiores, alienação.

CM: cabeça marcada; RM: rabo marcado; LM: lombo marcado; CR: cabeça e rabo marcados; SM: sem marca; CRL: cabeça, rabo e lombo marcados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS: Ao final do experimento a metade dos animais (LM, RM, SM) encontrou-se deprimida. Os demais animais apresentaram agressividade, agitação, alienação, palidez e edema de focinho. Foram ainda verificados tremores maiores, postura de ataque e muitos espasmos. Excreção fecal abundante e baixa diurese (01 animal apenas). Nenhum animal foi a óbito no período observado.

Tabela 16. Toxicidade aguda na dose de 4.000 mg/kg por via oral (VO)

ANIMAIS	PESO (g)	DOSE ADMINISTRADA (mg)	VOLUME INFUNDIDO (ml)
CM	36,0	144	0,95
RM	36,0	144	0,95
LM	36,0	144	0,95
CR	38,0	152	1,00
SM	33,0	132	0,87
CRL	33,5	134	0,88
TOTAL	212,5	850,0*	5,60 ou 6,0*

CM: cabeça marcada; RM: rabo marcado; LM: lombo marcado; CR: cabeça e rabo marcados; SM: sem marca; CRL: cabeça, rabo e lombo marcados. * valores arredondados.

Quadro 13. Efeitos da toxicidade aguda na dose de 4.000 mg/kg por via oral (VO)

- CM: movimento de vibrissas, ereção de cauda, tremores leves, abaixamento de membros posteriores, excreção fecal pastosa, movimento circular, reação de fuga, inversão de marcha, espasmos, agitação, palidez, diurese, refluxo, postura estática, postura de ataque.
- RM: excreção fecal, ereção de cauda, espasmos, reação de fuga, movimento de vibrissas, agitação, movimento circular, diurese, movimento estereotipado, tremores leves, postura em garra, palidez, postura de ataque, postura estática, refluxo.
- LM: movimento circular, inversão de marcha, ereção de cauda, agitação, movimento estereotipado, espasmos, tremores leves, reação de fuga, movimento de vibrissas.
- CR: movimento de vibrissas, movimento estereotipado, reação de fuga, ereção de cauda, agitação, movimento circular, espasmos, postura em garra, agitação, aumento da frequência respiratória, tremores leves, piloereção, saltos, postura de ataque, diurese.
- SM: múltiplos espasmos, exoftalmia, aumento da frequência respiratória, movimento de vibrissas, postura estática, reação de fuga, ereção de cauda, movimentos estereotipados, piloereção, movimento circular, palidez.
- CRL: agitação, aumento da frequência respiratória, reação de fuga, múltiplos espasmos, movimento estereotipado, movimento circular, postura de ataque, palidez, postura estática, piloereção, marcha ébria, edema de focinho.

CM: cabeça marcada; RM: rabo marcado; LM: lombo marcado; CR: cabeça e rabo marcados; SM: sem marca; CRL: cabeça, rabo e lombo marcados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS: Os animais apresentaram baixa excreção fecal e diurese (02 animais apenas); intensos e numerosos espasmos. Animais agressivos, apresentando postura de ataque, para em seguida ocorrer rebaixamento da frequência respiratória. Foi observada fotofobia em três animais e palidez generalizada intensa. Nenhum animal foi a óbito no período observacional de 24 horas, com plena recuperação dos mesmos.

Tabela 17. Toxicidade aguda na dose de 5.000 mg/kg por via oral (VO)

ANIMAIS	PESO (g)	DOSE ADMINISTRADA (mg)	VOLUME INFUNDIDO (ml)
CM	36,5	182,5	1,00
RM	31,4	157,0	0,86
LM	35,0	175,0	0,96
CR	33,0	165,0	0,90
SM	32,0	160,0	0,88
CRL	33,5	167,5	0,92
TOTAL	201,4	1.007,0*	5,52 ou 6,0*

CM: cabeça marcada; RM: rabo marcado; LM: lombo marcado; CR: cabeça e rabo marcados; SM: sem marca; CRL: cabeça, rabo e lombo marcados. * valores arredondados.

Quadro 14. Efeitos da toxicidade aguda na dose de 5.000 mg/kg por via oral (VO)

- CM: ereção de cauda, movimentos estereotipados, inversão de marcha, movimentos circulares, reação de fuga, piloereção, espasmos, frênico-vocal, aumento da frequência respiratória, edema de focinho, postura estática, abaixamento de membros posteriores, excreção fecal, agitação, cianose (petéquias), tremores maiores.
- RM: espasmos, inversão de marcha, movimento estereotipado, ereção de cauda, reação de fuga, movimento de vibrissas, excreção fecal, aumento da frequência respiratória, refluxo, movimento circular, exoftalmia, cianose (petéquias), edema de focinho.
- LM: ereção de cauda, piloereção, abaixamento de membros posteriores, agitação, movimento de vibrissas, movimento estereotipado, postura em garra, tremores leves, reação de fuga, espasmos, movimento circular, alteração de marcha, excreção fecal, edema de focinho, saltos, diurese, tremores maiores, refluxo.
- CR: aumento da frequência respiratória, ereção de cauda, taquicardia, movimento circular, movimento de vibrissas, exoftalmia, reação de fuga, frênico-vocal, agitação, piloereção, postura em garra, cianose (petéquias).
- SM: ereção de cauda, movimento estereotipado, aumento da frequência respiratória, movimento de vibrissas, piloereção, movimentos circulares, palidez, refluxo.
- CRL: ereção de cauda, agitação, movimento circular, reação de fuga, exoftalmia, movimento de vibrissas, palidez, exoftalmia, saltos, alteração de marcha (lateralizada), marcha ébria, desorientação (alienação), edema de focinho, cianose (petéquias), diurese.

CM: cabeça marcada; RM: rabo marcado; LM: lombo marcado; CR: cabeça e rabo marcados; SM: sem marca; CRL: cabeça, rabo e lombo marcados.

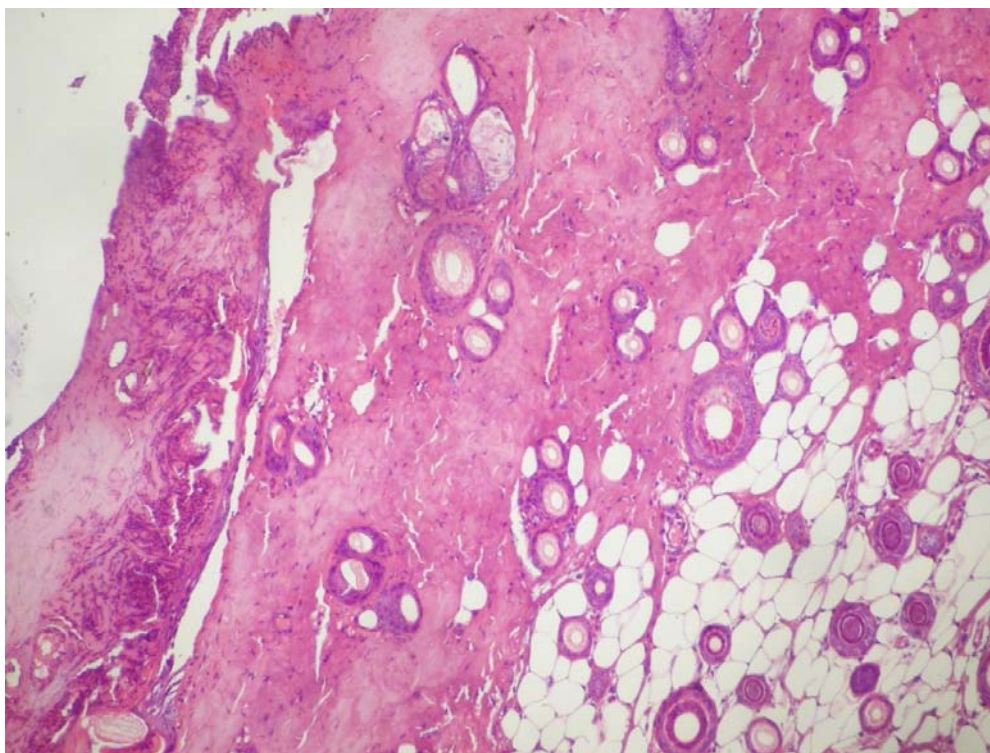
CONSIDERAÇÕES FINAIS: Os animais apresentaram excreção fecal abundante, agitação, palidez acentuada, exoftalmia, marcha ébria (02 animais) e discreta diurese (02 animais apenas). Nenhum animal foi a óbito no período de 24 horas.

A última dosagem estabelecida na literatura (ZAUPA e COLABORADORES, 2002) para o teste de toxicidade oral de medicamentos em animais foi fixada na dose de 5.000 mg/kg – última dose testada neste estudo – sem apresentar, entretanto, a toxicidade necessária para estabelecimento da DL_{50} pelo método de *Karber e Behrens (1964)*, se caracterizando como praticamente **atóxica**.

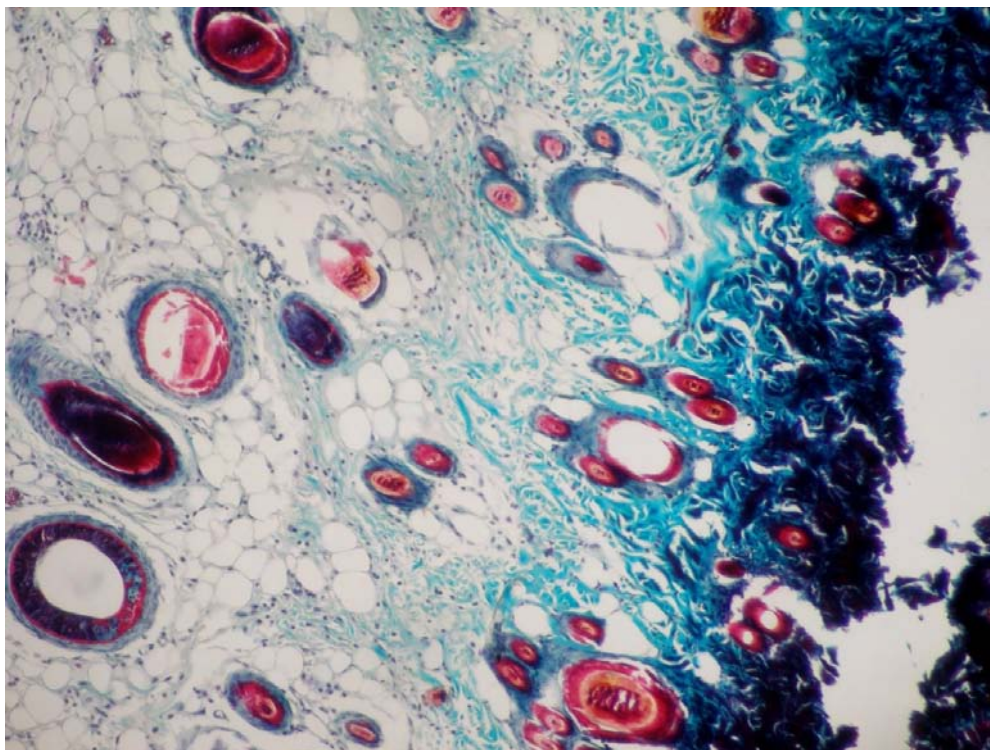
5.4. Ação antiinflamatória e cicatrizante do creme dermatológico à base de extrato de cravo-da-índia

A avaliação microscópica da atividade antiinflamatória e cicatrizante do creme dermatológico de extrato de cravo-da-índia a 5% em comparação com o placebo e o controle-positivo do dexpanthenol a 5% exibiu resultados condizentes com o princípio da *facilitação*, descrito na Introdução deste trabalho, já que foram observados quadros histológicos assim descritos:

- A) Placebo (2 dias): Úlcera ativa. Infiltrado inflamatório acentuado, rico em polimorfonucleares no derma e subcutâneo. Infiltrado inflamatório misto na musculatura. Não há proliferação fibroblástica (pranchas 1 e 2).

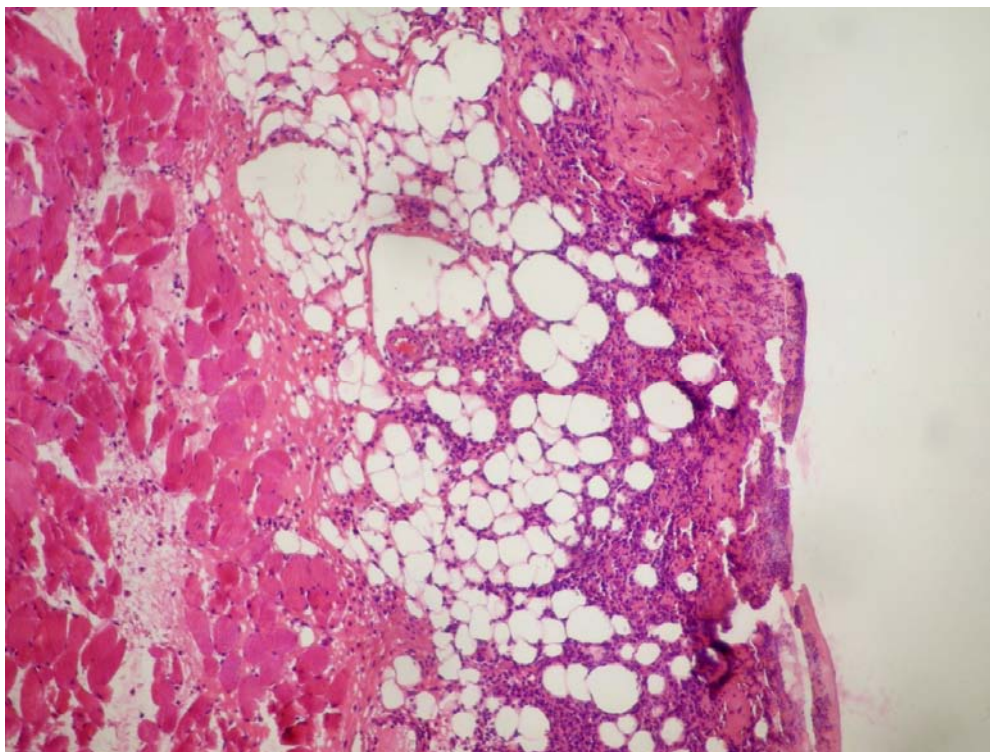


Prancha 1. Placebo (2 dias): Úlcera ativa. Infiltrado inflamatório acentuado, rico em polimorfonucleares no derma e subcutâneo. Infiltrado inflamatório misto na musculatura. Não há proliferação fibroblástica. (Hematoxilina-Eosina). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006)

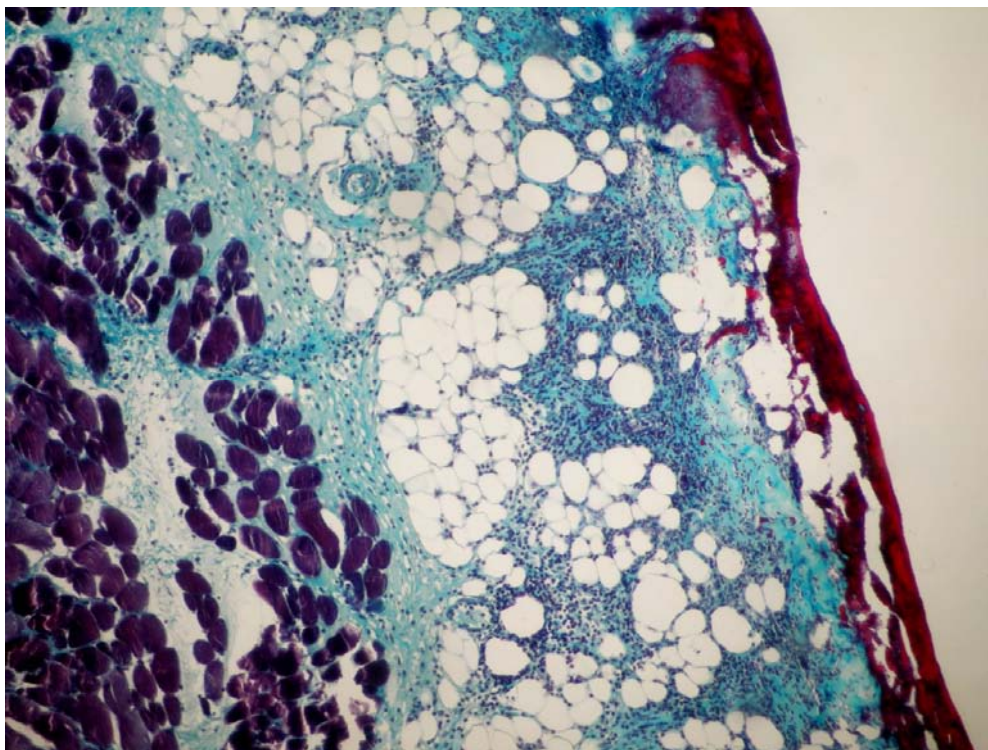


Prancha 2. Placebo (2 dias): Úlcera ativa. Infiltrado inflamatório acentuado, rico em polimorfonucleares no derma e subcutâneo. Infiltrado inflamatório misto na musculatura. Não há proliferação fibroblástica. (Tricrômio de Masson). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006)

B) Placebo (7 dias): Úlcera ativa com crosta. Infiltrado inflamatório moderado predominantemente polimorfonuclear no derma e subcutâneo. Infiltrado mononuclear na musculatura. Migração neutrofílica para o interstício. Discreta proliferação fibroblástica (pranchas 3 e 4).

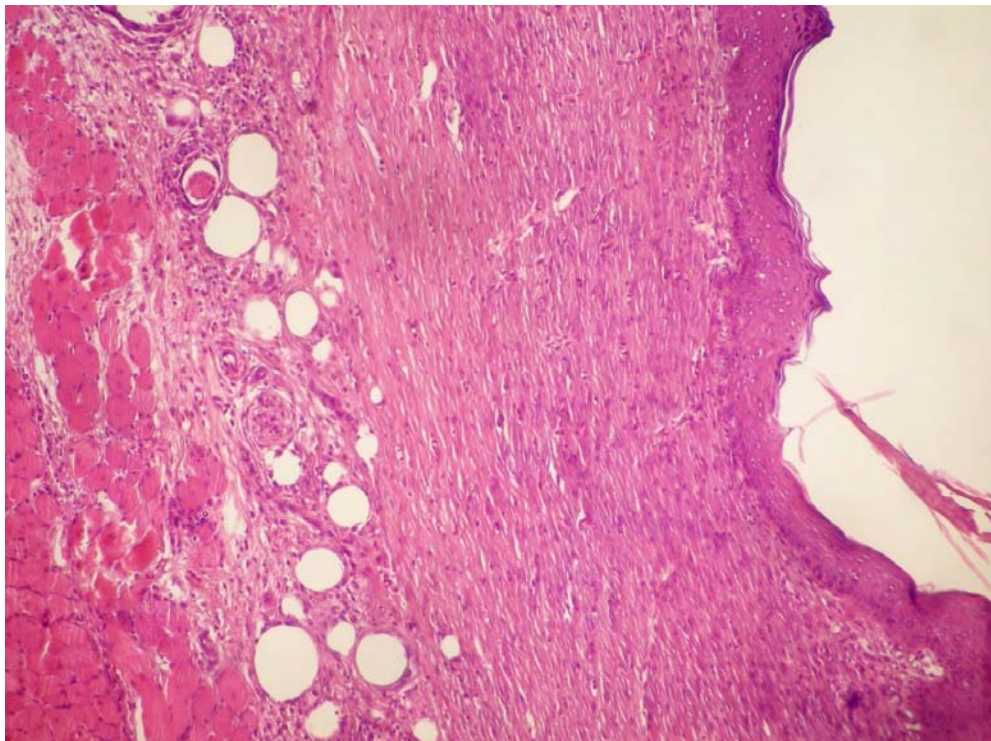


Prancha 3. Placebo (7 dias): Úlcera ativa com crosta. Infiltrado inflamatório moderado predominantemente polimorfonuclear no derma e subcutâneo. Infiltrado mononuclear na musculatura. Migração neutrofílica para o interstício. Discreta proliferação fibroblástica. (Hematoxilina-Eosina). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006)

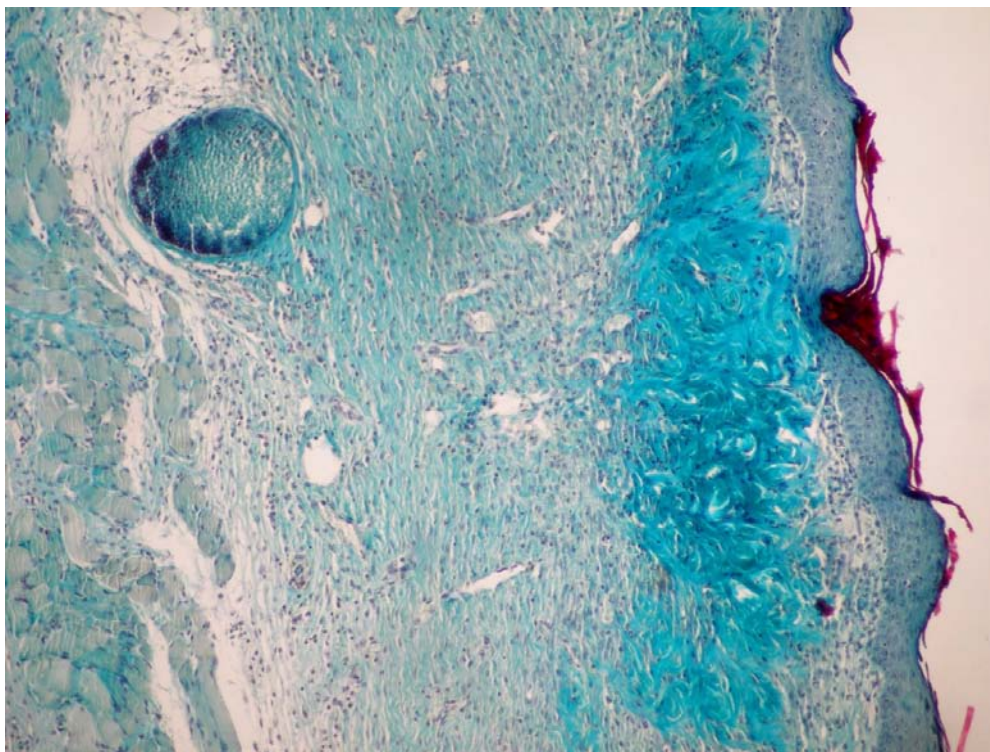


Prancha 4. Placebo (7 dias): Úlcera ativa com crosta. Infiltrado inflamatório moderado predominantemente polimorfonuclear no derma e subcutâneo. Infiltrado mononuclear na musculatura. Migração neutrofílica para o interstício. Discreta proliferação fibroblástica. (Tricrômio de Masson). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006)

- C) Placebo (14 dias): Úlcera cicatrizada com reepitelização. Infiltrado dérmico leve, predominantemente mononuclear, incluindo alguns neutrófilos. Proliferação moderada de fibroblastos com deposição de colágeno (pranchas 5 e 6).

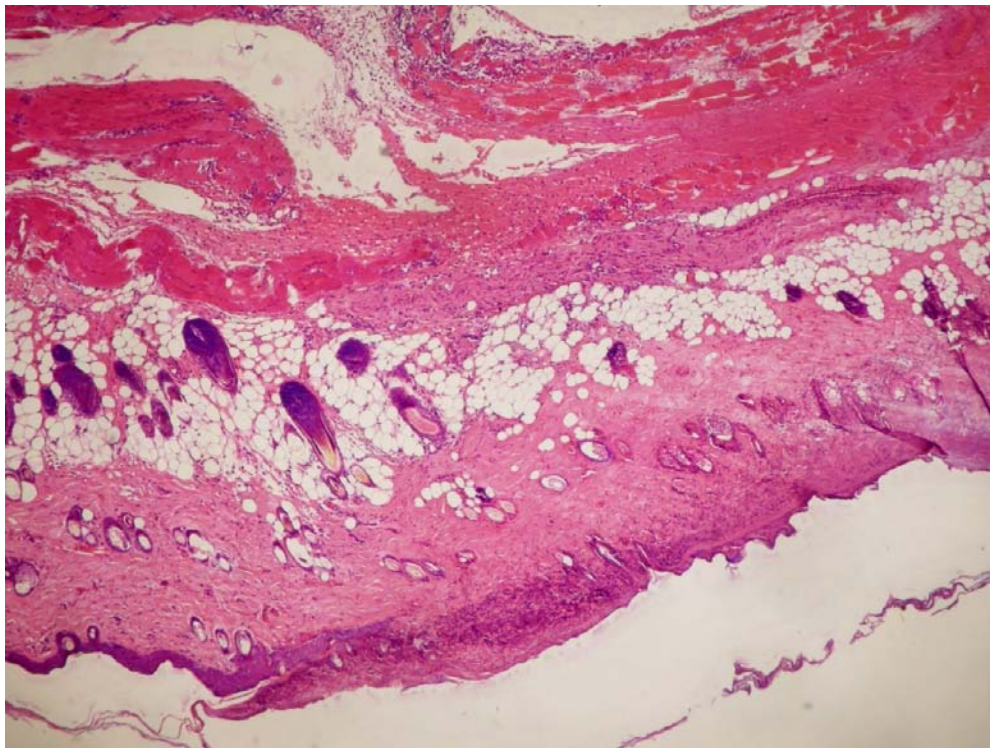


Prancha 5: Placebo (14 dias): Úlcera cicatrizada com reepitelização. Infiltrado dérmico leve, predominantemente mononuclear, incluindo alguns neutrófilos. Proliferação moderada de fibroblastos com deposição de colágeno. (Hematoxilina-Eosina). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006)

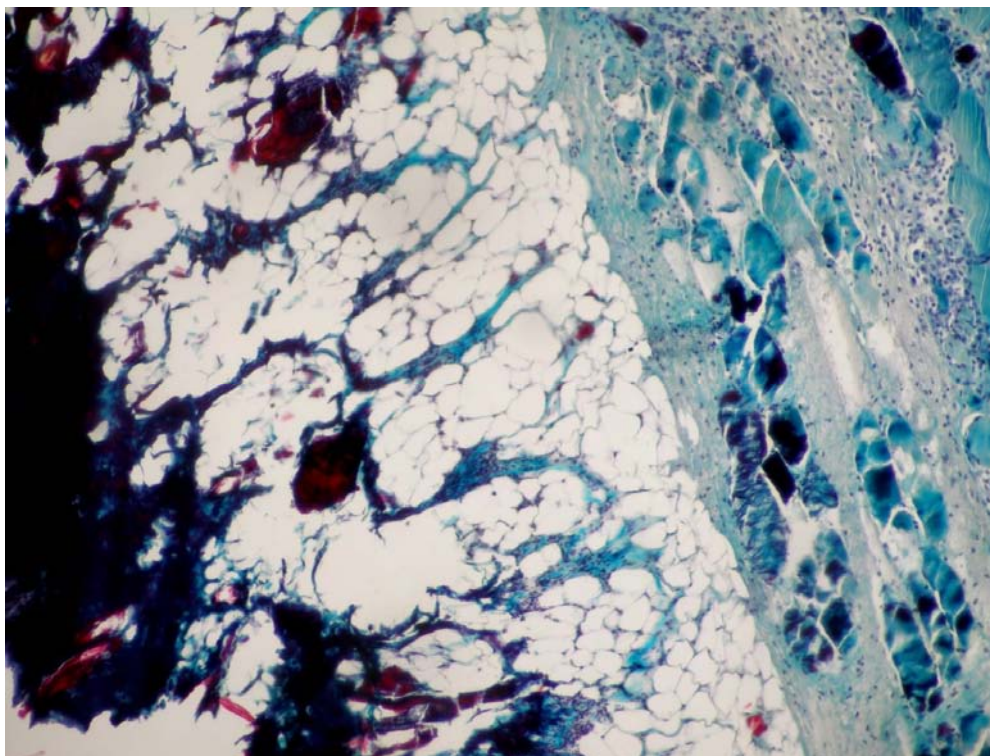


Prancha 6. Placebo (14 dias): Úlcera cicatrizada com reepitelização. Infiltrado dérmico leve, predominantemente mononuclear, incluindo alguns neutrófilos. Proliferação moderada de fibroblastos com deposição de colágeno. (Tricrômio de Masson). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006)

D) Cravo-da-Índia (2 dias): Úlcera ativa. Infiltrado inflamatório acentuado rico em polimorfonucleares no derma e subcutâneo. Infiltrado mono e polimorfonuclear na musculatura. Marginação neutrofílica e migração para o interstício. Não se observa proliferação fibroblástica (pranchas 7 e 8).

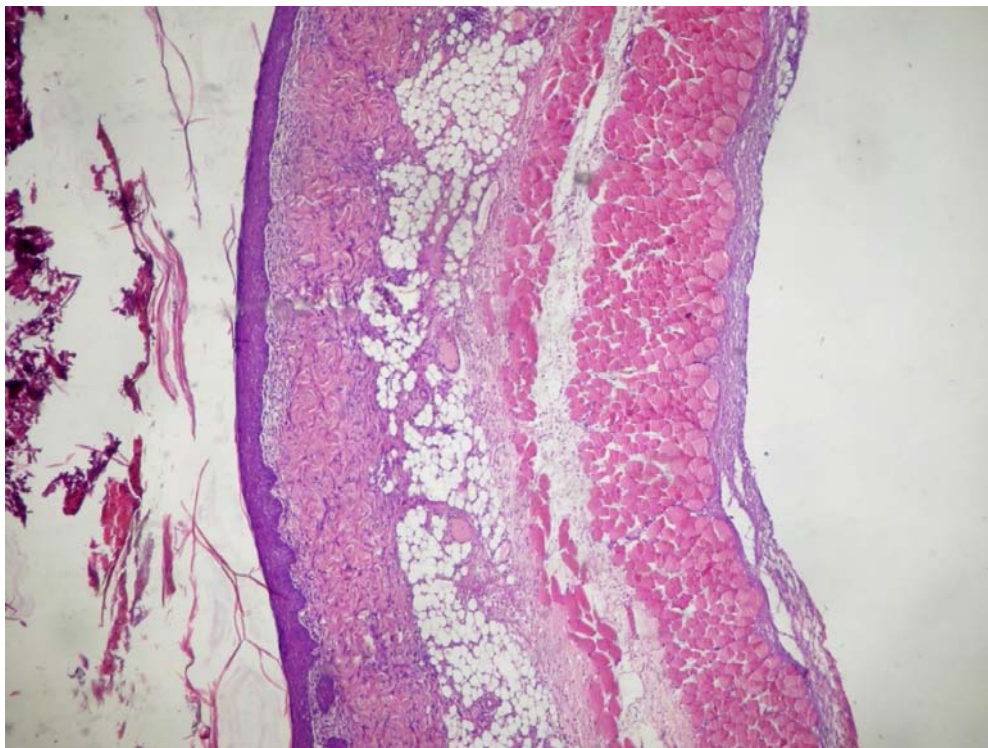


Prancha 7. Cravo-da-Índia (02 dias): Úlcera ativa. Infiltrado inflamatório acentuado rico em polimorfonucleares no derma e subcutâneo. Infiltrado mono e polimorfonuclear na musculatura. Marginação neutrofílica e migração para o interstício. Não se observa proliferação fibroblástica. (Hematoxilina-Eosina). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006)

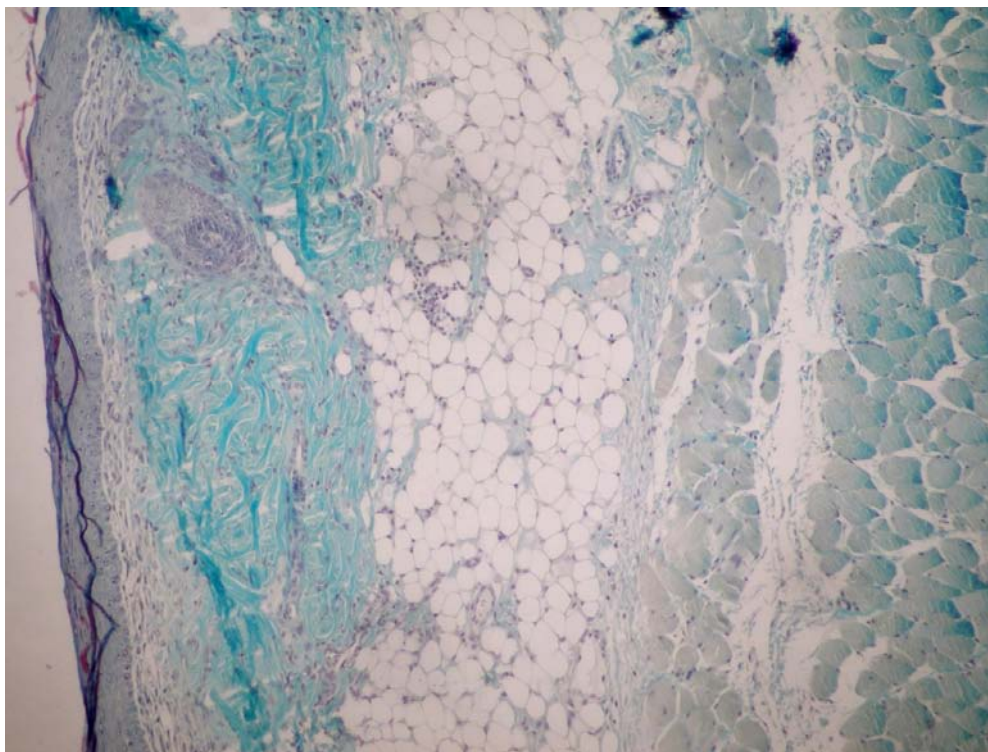


Prancha 8. Cravo-da-Índia (02 dias): Úlcera ativa. Infiltrado inflamatório acentuado rico em polimorfonucleares no derma e subcutâneo. Infiltrado mono e polimorfonuclear na musculatura. Marginação neutrofílica e migração para o interstício. Não se observa proliferação fibroblástica. (Tricrômio de Masson). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006)

E) Cravo-da-Índia (7 dias): Úlcera cicatrizada com reepitelização. Infiltrado predominantemente mononuclear discreto. Proliferação fibroblástica moderada com deposição de colágeno (pranchas 9 e 10)

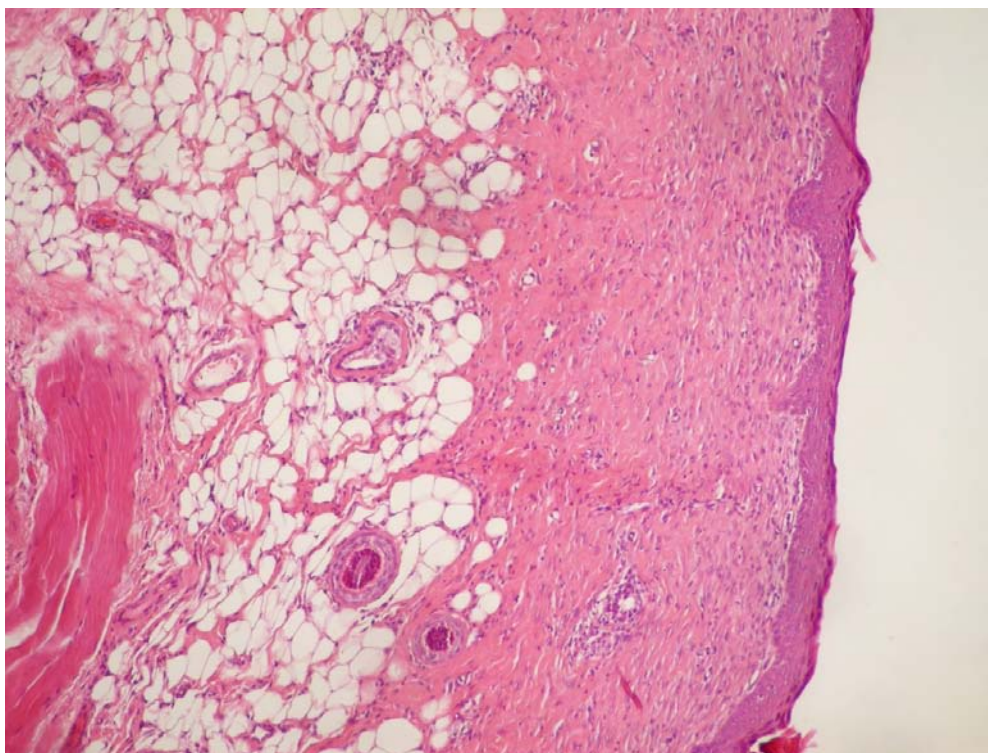


Prancha 9. Cravo-da-Índia (07 dias): Úlcera cicatrizada com reepitelização. Infiltrado predominantemente mononuclear discreto. Proliferação fibroblástica moderada com deposição de colágeno. (Hematoxilina-Eosina). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006)

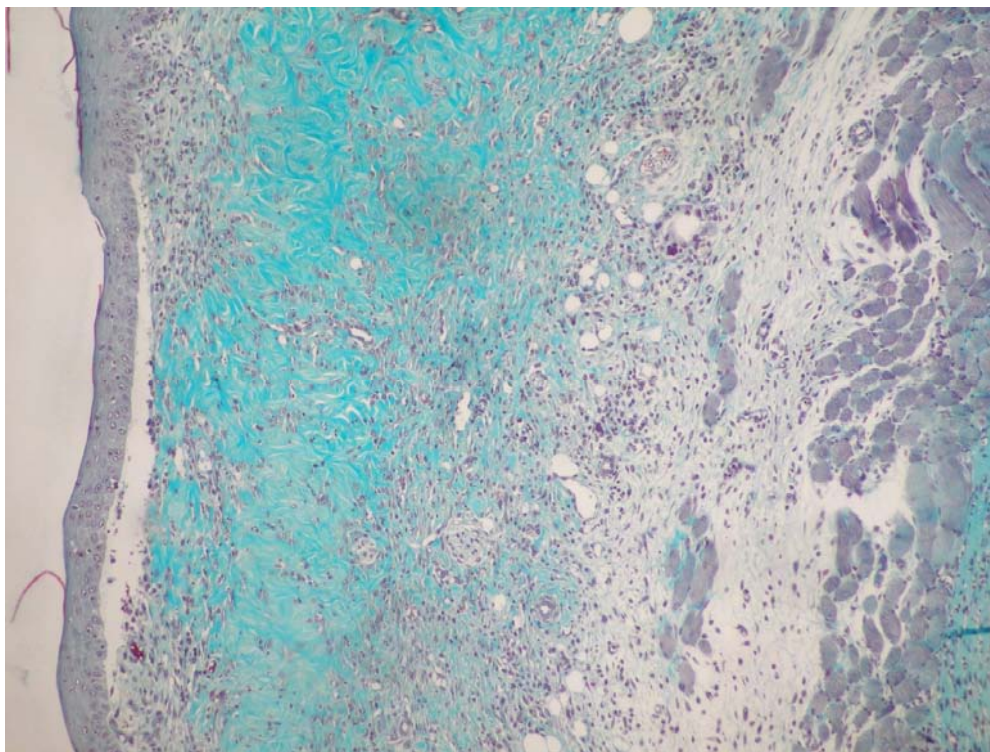


Prancha 10. Cravo-da-Índia (07 dias): Úlcera cicatrizada com reepitelização. Infiltrado predominantemente mononuclear discreto. Proliferação fibroblástica moderada com deposição de colágeno. (Tricrômio de Masson). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006)

F) Cravo-da-Índia (14 dias): Úlcera cicatrizada com reepitelização. Infiltrado inflamatório mínimo, rico em mononucleares com neutrófilos ocasionais. Marcante proliferação fibroblástica com deposição de colágeno (pranchas 11 e 12).

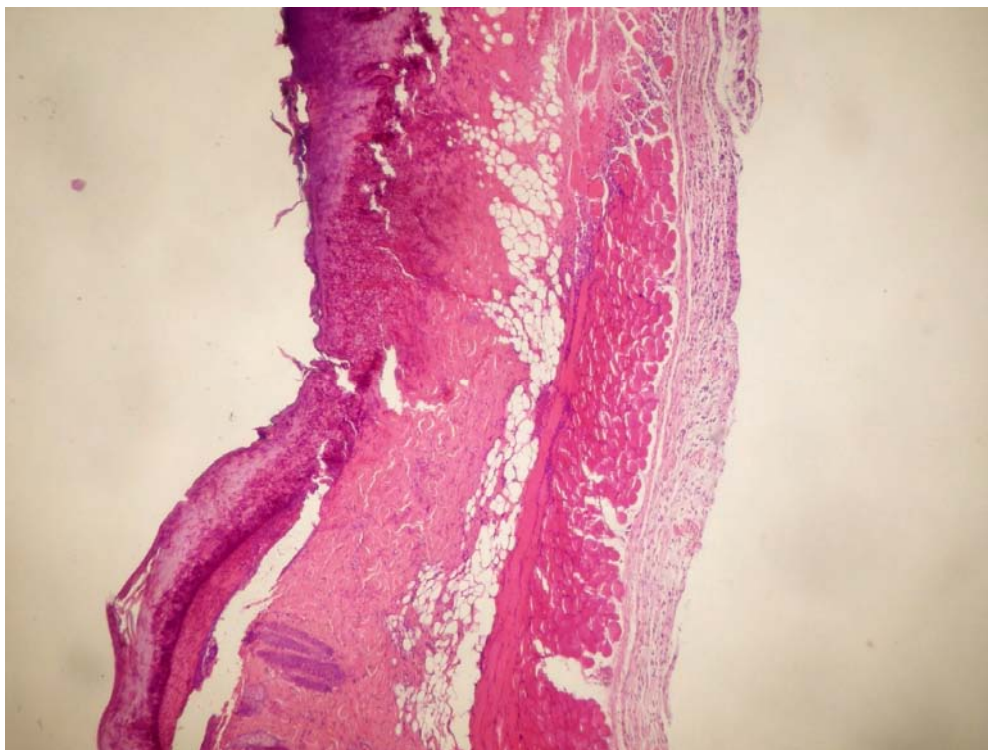


Prancha 11. Cravo-da-Índia (14 dias): Úlcera cicatrizada com reepitelização. Infiltrado inflamatório mínimo, rico em mononucleares com neutrófilos ocasionais. Marcante proliferação fibroblástica com deposição de colágeno. (Hematoxilina-Eosina). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006)

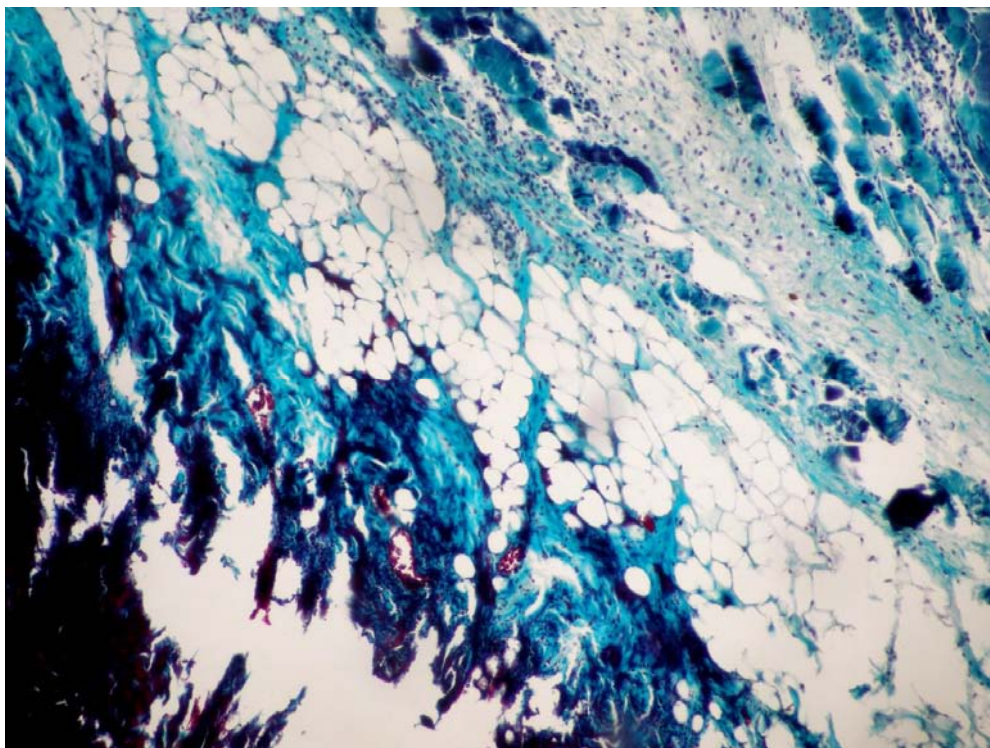


Prancha 12. Cravo-da-Índia (14 dias): Úlcera cicatrizada com reepitelização. Infiltrado inflamatório mínimo, rico em mononucleares com neutrófilos ocasionais. Marcante proliferação fibroblástica com deposição de colágeno. (Tricrômio de Masson). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006)

G) Dexpanthenol (2 dias): Úlcera ativa. Infiltrado inflamatório acentuado, rico em polimorfonucleares no derma e subcutâneo. Infiltrado mononuclear na musculatura. Não há proliferação fibroblástica (pranchas 13 e 14).

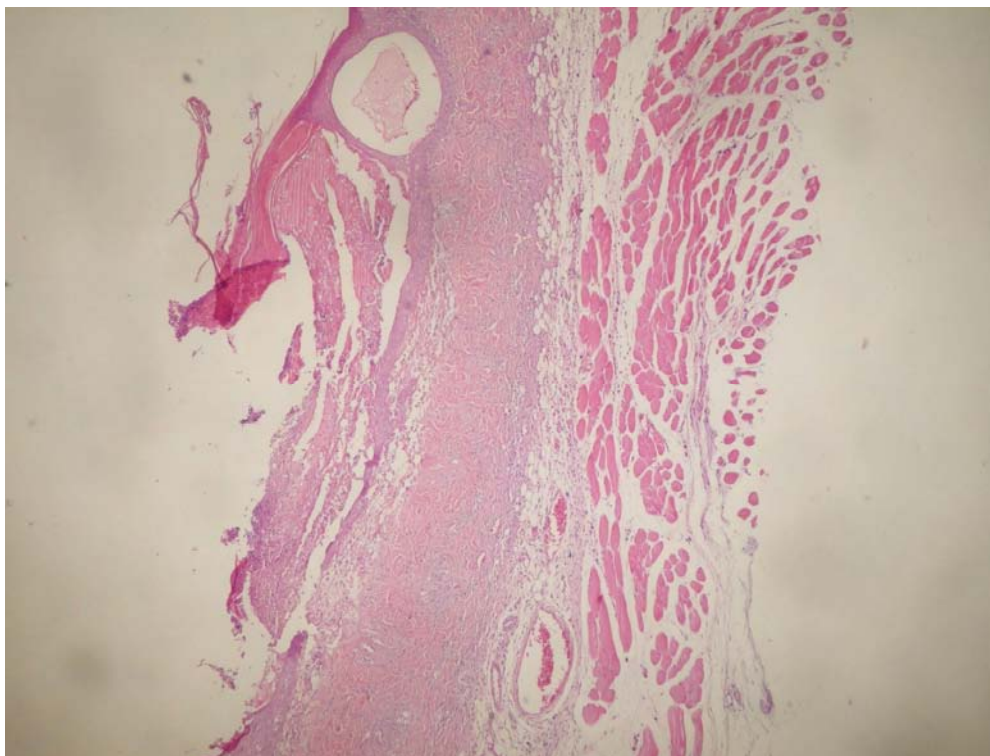


Prancha 13. Dexpanthenol (02 dias): Úlcera ativa. Infiltrado inflamatório acentuado, rico em polimorfonucleares no derma e subcutâneo. Infiltrado mononuclear na musculatura. Não há proliferação fibroblástica. (Hematoxilina-Eosina). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006)

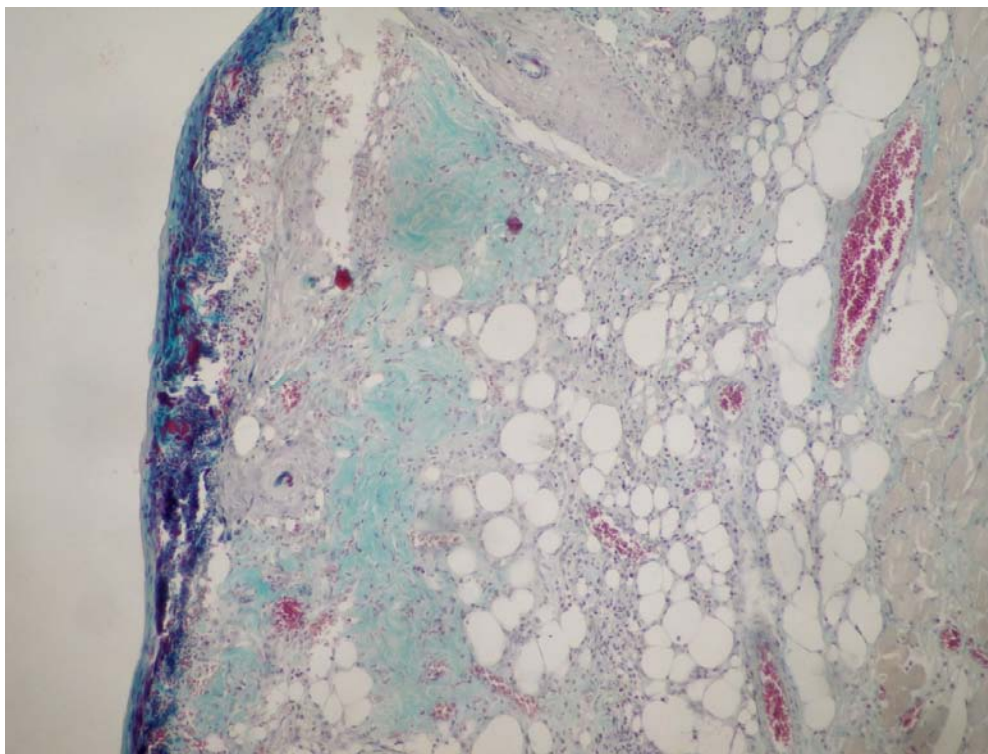


Prancha 14. Dexpanthenol (02 dias): Úlcera ativa. Infiltrado inflamatório acentuado, rico em polimorfonucleares no derma e subcutâneo. Infiltrado mononuclear na musculatura. Não há proliferação fibroblástica. (Tricrômio de Masson). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006)

H) Dexpanthenol (7 dias): Úlcera ativa. Intenso infiltrado inflamatório no derma, subcutâneo e musculatura, rico em polimorfonucleares. Migração neutrofílica para o interstício. Proliferação fibroblástica discreta (pranchas 15 e16).

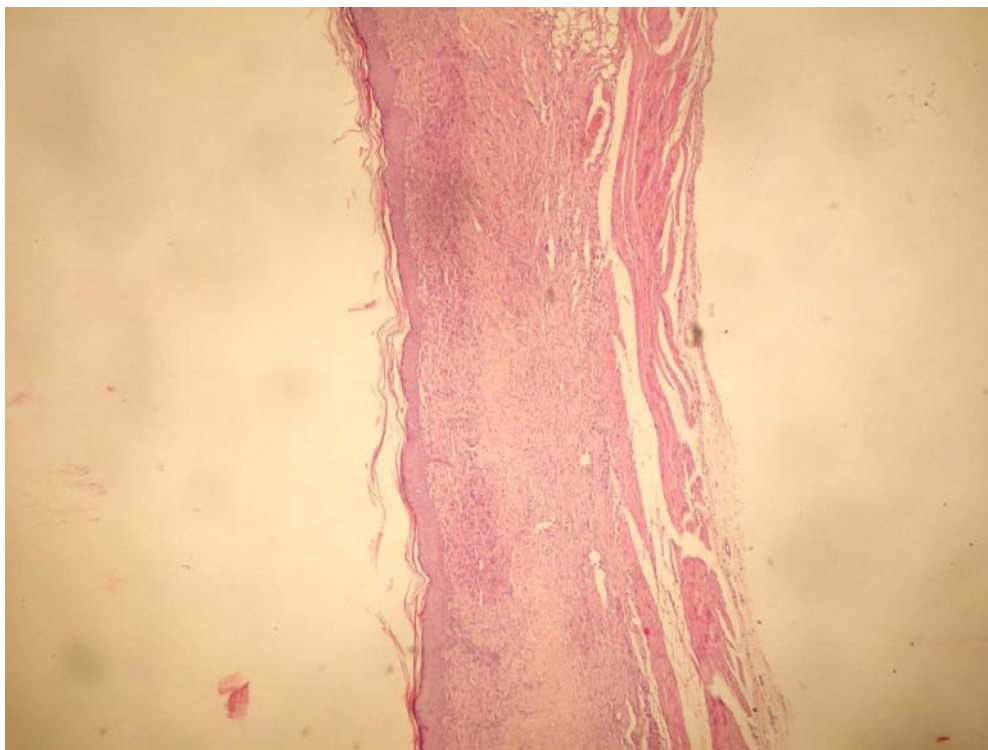


Prancha 15. Dexpanthenol (07 dias): Úlcera ativa. Intenso infiltrado inflamatório no derma, subcutâneo e musculatura, rico em polimorfonucleares. Migração neutrofílica para o interstício. Proliferação fibroblástica discreta. (Hematoxilina-Eosina). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006)

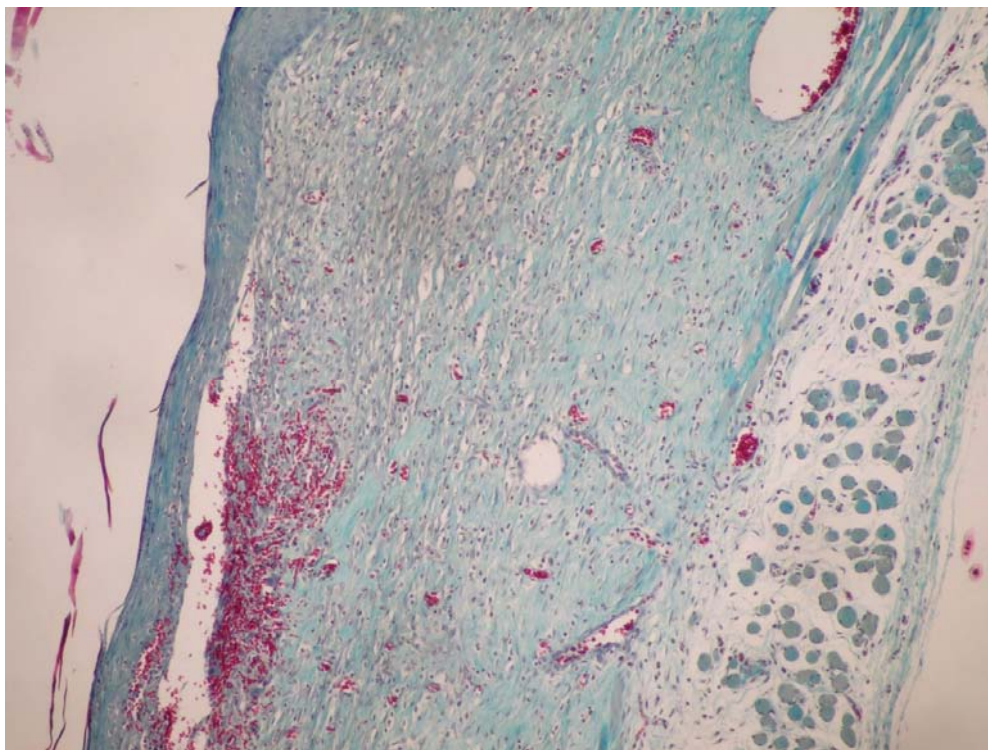


Prancha 16. Dexpanthenol (07 dias): Úlcera ativa. Intenso infiltrado inflamatório no derma, subcutâneo e musculatura, rico em polimorfonucleares. Migração neutrofílica para o interstício. Proliferação fibroblástica discreta. (Tricrômio de Masson). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006)

- I) Dexpanthenol (14 dias): Úlcera em cicatrização. Infiltrado dérmico moderado mono e polimorfonuclear, com tecido de granulação. Proliferação fibroblástica moderada com deposição de colágeno (pranchas 17 e 18).



Prancha 17. Dexpanthenol (14 dias): Úlcera em cicatrização. Infiltrado dérmico moderado mono e polimorfonuclear, com tecido de granulação. Proliferação fibroblástica moderada com deposição de colágeno. (Hematoxilina-Eosina). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006)



Prancha 18. Dexpanthenol (14 dias): Úlcera em cicatrização. Infiltrado dérmico moderado mono e polimorfonuclear, com tecido de granulação. Proliferação fibroblástica moderada com deposição de colágeno. (Tricrômio de Masson). (Fonte: VALENTE e COLABORADORES, 2006)

6 DISCUSSÃO

Esta pesquisa apresentou enfoques distintos relativos à toxicidade e efeitos cicatrizantes e antiinflamatórios do extrato de cravo-da-índia, sendo, pois segmentada em etapas distintas de experimentação bem como na sua forma de apresentação dos resultados obtidos e sua discussão.

6.1 Toxicidade aguda do extrato pilular e determinação da DL₅₀

O estudo da origem, composição, propriedades e as indicações das substâncias usadas nos medicamentos aliado ao conhecimento da toxicidade destes compostos conferem uma boa margem de segurança na utilização dos mesmos como fitomedicamentos a serem testados. A avaliação da toxicidade de qualquer substância a ser utilizada como alimento ou medicamento é passo fundamental para uso seguro na saúde humana e ambiental, e estes estudos devem contemplar diferentes formas de exposição da substância testada, como tempo e frequência de uso e as vias de administração da mesma, como bem definido por Barros e Davino (1996).

O emprego do cálculo da DL₅₀ como método de avaliação da toxicidade, apesar de ser um método há muito descrito, ainda é amplamente utilizado como forma de conhecer os limites de segurança de substâncias das quais se queira fazer uso como medicamento ou alimento, como descrito por Carvalho (2002); Melo (2002) e Zaupa *et al.*; colaboradores (2002).

Ao utilizar a escala de *Schuartsman* (1980) (apud Silva *et al.*; 2006) como parâmetro para quantificação do grau de toxicidade de uma dada substância, ficou claramente estabelecido a toxicidade do extrato de cravo-da-índia como *muito tóxico* (grau 4 de toxicidade) para via intraperitoneal com a DL₅₀ estabelecida em 255 mg/kg. Este estudo ratifica os achados de Wright, Baron e Heffner (1995) onde os ratos apresentaram efeitos tóxicos evidentes à injeção intravenosa de eugenol onde houve insuficiência respiratória aguda com edema pulmonar hemorrágico. Não foi objetivo desta pesquisa a realização da análise histológica das vísceras dos animais mortos, mas por analogia - a observação do aumento da frequência respiratória e/ou dispnéia em todos os grupos experimentais de toxicidade aguda intraperitoneal - pode se inferir que os óbitos verificados por ação tóxica do extrato de cravo-da-índia

provavelmente ocorreram por edema pulmonar hemorrágico com seqüestro neutrofílico intrapulmonar. Estes dados que vem a reforçar os achados de Saeed e Gilani (1994), que demonstram ação anticoagulante sobre a agregação plaquetária, o que pode levar a uma maior propensão a episódios hemorrágicos.

Já na questão do uso por via oral, esta pesquisa apresentou resultados que divergem em alguns aspectos da literatura consultada. Primeiramente, a literatura contempla muitos aspectos relacionados à toxicidade do óleo essencial de cravo-da-índia e não do extrato sólido, onde o referido óleo, segundo Alonso (1998), constitui-se em apenas 15 a 20% do total do extrato puro, e destes, 60 a 80% é que correspondem efetivamente a eugenol. Os demais componentes o autor classifica em fitoesteróis e outros, sendo neste último incluídos ácidos, salicilatos, derivados do eugenol, flavonóides derivados do quercetol e kempferol, carboidratos, vitaminas, taninos, etc. Logo, quando se trata de óleo essencial o autor demonstra ser neurotóxico e irritante das mucosas, fato claramente observado na análise comportamental dos animais que receberam o extrato diluído em solução fisiológica, traduzidos pelas alterações de marcha, convulsões, tremores, agitação; e ainda fotofobia, lacrimejamento e exoftalmia. Observa-se que a DL_{50} do óleo essencial em ratos por via oral alcança 2.650 mg/kg, e em humanos estima que a dose diária permitida de eugenol seja de 2,5 mg/kg.

A experiência de Hartnoll, Moore e Douek (1993); Brown, Biggerstaff e Savidge (1992); Lane *et al.*; (1991) enriquecem bastante o conhecimento sobre os efeitos da toxicidade do cravo-da-índia em seres humanos, já que por razões óbvias de limites éticos, esta perspectiva de avaliação só ocorre em situações acidentais, como descritos pelos autores. Entre os achados incluíram coagulopatias graves, lesões hepáticas, depressão do sistema nervoso central, alteração da diurese e acidose metabólica.

Neste estudo foi impossível estabelecer a DL_{50} do extrato sólido de cravo-da-índia porque ao estabelecerem-se doses mais elevadas para a análise da toxicidade oral, a diluição do extrato passou a ser dificultada por saturação da solução, principalmente de compostos lipofílicos, sendo complementada a diluição com a adição de óleo de girassol. Esta diluição pareceu interferir na absorção gástrica dos componentes do extrato, já que a discrepância da toxicidade observada em relação a Alonso (1998) não pode ser fidedigna por se tratar de óleo essencial *versus* extrato puro, fazendo que o primeiro seja mais puro e concentrado em teor de

eugenol, enquanto o segundo seja bem mais rico em outros constituintes, e do modo como é encontrado para consumo humano.

O que foi observado foi uma clara diferença comportamental em animais submetidos a doses iguais - com e sem adição do referido diluente, ainda que com diluição incompleta no segundo caso – e diferentes graus de toxicidade, frente à necessidade de repetir alguns ensaios para manutenção da mesma perspectiva metodológica. A necessidade da diluição complementar só veio a aparecer a partir de 2.400 mg/kg, mas os estudos conduzidos anteriores a este demonstraram maior toxicidade – inclusive da mesma dose sem o diluente oleoso – mas não foram incluídos neste estudo pela necessidade de homogeneizar os grupos experimentais a partir da diluição completa do extrato.

6.2 Ação antiinflamatória e cicatrizante do creme dermatológico à base de extrato de cravo-da-índia

A compreensão do processo inflamatório e cicatricial habitual permite a avaliação evolutiva da ferida, observando assim a influência que os fármacos utilizados no tratamento das mesmas promovem sobre a mesma de acordo com a fase de reparação em que se encontram. Mas não é apenas o tipo de agente etiológico que influencia a cicatrização, mas diversos outros fatores – de ordem local e geral - tais como localização anatômica, tipo de tecido envolvido na ferida, metodologia cirúrgica empregada, além da idade do paciente e as alterações de ordem sistêmica – como nos casos de diabetes, imunossupressão, doenças degenerativas, estado nutricional, etc.

O conhecimento destas variáveis é fundamental para exclusão dos fatores intervenientes na reparação, já que estudos histológicos revelam que não há nenhum mecanismo que torne diferente o reparo das queimaduras das feridas cutâneas usuais (BAYAT *et al.*; 2005) em complementação aos dados de Gomes (1997) que analisa a fisiopatologia de uma queimadura em três zonas distintas: *zona de coagulação ou necrose de coagulação*, *zona de estase* e *zona de hiperemia*, mas não estabelece nenhuma diferença entre os mecanismos de reparo das mesmas, comparativamente às feridas cortantes. Pode-se inferir daí que o tecido queimado, experimentalmente, representa um excelente modelo de avaliação inflamatória - pela exuberância do mesmo - sem apresentar, no entanto, qualquer particularidade que

inviabilize a sua analogia com as demais feridas, tais como descritos por Gregori (1996).

Conclui-se assim que a inflamação e cicatrização da pele ou da mucosa, qualquer que seja sua etiologia e origem, seguem um processo semelhante de reparo, fato que por si só valida a metodologia empregada nesta pesquisa, já que as variáveis de ordem biológica – infecções secundárias ao trauma, por exemplo – são contornáveis, na prática clínica, pela utilização de agentes químicos com ação antimicrobiana de uso tópico ou sistêmico antes, durante ou após o trauma. Neste cenário, seria ideal o desenvolvimento de drogas com atividades sinérgicas e complementares sobre a infecção bacteriana oportunista ao trauma e a inflamação tecidual decorrente do mesmo.

É importante também a compreensão que a ação de fármacos, como os corticóides (mesmo para uso tópico) podem favorecer ou atrapalhar o processo de cicatrização e migração epitelial no fechamento ou reepitelização da ferida, a exemplo do acetonido de triancinolona a 0,1% que diminui em 34% a taxa relativa de cura. (FAZIO; ZITELLI e GOSLEN, 2000).

Logo, como citado anteriormente, a destruição tecidual promovida por eletrocauterização constitui um método experimentalmente válido, pois predispõe à formação de uma úlcera que cicatriza por segunda intenção, ou seja, com um processo de reparo mais lento e difícil, constituindo um excelente biomodelo para estudos de inflamação e reparo. Assim, o estudo histológico dos efeitos dos fármacos aplicados, em relação ao grupo-controle, pode ser mais bem observado a partir de um processo inflamatório mais intenso no tecido. A técnica, por fim, demonstrou-se prática e como a melhor opção no estudo histológico da inflamação e da cicatrização a partir da padronização de feridas similares.

A determinação da periodicidade do ciclo de morte relaciona-se com a necessidade de comparar histologicamente os efeitos dos fármacos sobre a cicatrização das feridas, comparando-os aos achados habituais já descritos por Gilmann em 1968 (apud GREGORI, 1996), que devem ser encontrados no grupo-controle ou placebo.

Com relação à fixação das peças, as mesmas foram acondicionadas em recipiente individual (coletor) com solução de Bouin por 24h e estocadas em álcool a 70% em quantidade igual ou superior a 20 vezes ao próprio volume devido à necessidade de manutenção da hidratação da mesma, melhorando os métodos de

coloração tecidual para avaliação histológica, e evitando a desidratação, elemento prejudicial para o estudo proposto.

Os achados naturais de uma ferida que repara espontaneamente, sem a interferência de fatores externos, deve contemplar a presença de um infiltrado neutrofílico desde o trauma até o quinto dia aproximadamente, de macrófagos – do terceiro ao décimo dia – e um infiltrado linfo-plasmocitário depois de decorridos sete dias após o trauma (MANDELBAUN; DI SANTIS e MANDELBAUN, 2003).

Nesta pesquisa ao se comparar os eventos inflamatórios dos três grupos experimentais pesquisados, observou-se um aumento de grande magnitude da atividade fibroblástica entre o 2º e o 7º dia de tratamento com o creme contendo extrato vegetal, ficando, porém, o quadro praticamente inalterado entre o 7º e o 14º dia no tocante à fibroplasia. Já o dexpanthenol – conhecido composto cicatrizante comercializado sob o nome de Bepantol® - apresentou discreto aumento da atividade fibroblástica no período analisado, porém com efeito crescente à medida que o tempo de tratamento foi maior.

A redução do infiltrado de células polimorfonucleares (PMN) entre os grupos placebo e dexpanthenol a 5% obedeceram a um padrão gradativo de redução, enquanto que os grupos tratados com o extrato vegetal apresentaram uma redução maior entre o 2º e o 7º dia de tratamento, seguido por uma redução proporcionalmente igual aos outros grupos entre o 7º e o 14º dia.

A frequência relativa de células mononucleares fagocitárias (MNF) foi praticamente igual entre os três grupos testados, sendo observado um discreto aumento da atividade fagocitária – pelo aumento dos MNF - entre o 7º e o 14º dia de tratamento.

Estes fatos coincidem com o fenômeno descrito por Trummel (1993) denominado de “facilitação”, onde, nestes casos, o processo inflamatório do trauma cirúrgico é exacerbado por uma substância cáustica ou irritante, para ativar o reparo tecidual.

Não foi observada a presença de infiltrado linfo-plasmocitário, que deveria ser esperado a partir do 7º dia de tratamento, segundo Mandelbaun, Di Santis e Mandelbaun (2003).

Os achados desta pesquisa criam a perspectiva ideal para estudos posteriores, onde a realização de uma análise morfométrica e de um estudo estereológico quantificaria de forma mais precisa as células presentes no infiltrado

inflamatório, bem como a sua disposição no tecido reparado. A observação do aumento exacerbado da fibroplasia entre o 2º e o 7º dia de tratamento no grupo do extrato vegetal é fato digno de nota e pode ser investigado mais profundamente, obtendo assim um perfil mais preciso sobre o cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) nesse tipo de lesão.

Os achados deste trabalho e da literatura por si só justificam a busca de alternativas terapêuticas também efetivas, mas com menos efeitos colaterais sistêmicos, evoluindo, naturalmente, para o desenvolvimento de formas alternativas de tratamento, como a fitoterapia, onde a indicação de uso na medicina humana não visa substituir medicamentos registrados e já comercializados, mas sim aumentar a opção terapêutica dos profissionais de saúde.

CONCLUSÕES

- Através da avaliação de toxicidade aguda foi estabelecido que o extrato pilular de cravo-da-índia é *muito tóxico* para via intraperitoneal, enquanto que para a via oral foi considerada *atóxica* , a despeito da diluição do extrato com óleo de girassol. Pode-se admitir a hipótese que o veículo oleoso utilizado na diluição da porção lipofílica do extrato pode ter reduzido a absorção gástrica do extrato vegetal, reduzindo a sua toxicidade e oferecendo, assim, um meio aparentemente eficaz de restringir a intoxicação pela ingestão inadequada do mesmo.
- O creme dermatológico de extrato de cravo-da-índia a 5% (*Syzygium aromaticum*) demonstrou ser bastante efetivo na redução do infiltrado inflamatório de células polimorfonucleares e no grande aumento da fibroplasia entre o 2º e o 7º dia de tratamento, demonstrando uma antecipação dos eventos inflamatórios e cicatriciais da ferida cirúrgica (facilitação), quando comparado ao grupo-controle (placebo) e ao controle-positivo (dexpanthenol a 5%).

REFERÊNCIAS

ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina – bases clínicas y farmacológicas**. 1ª ed. Buenos Aires: ISIS, 1998. p. 397-400.

ARAÚJO, M. **Das ervas medicinais à fitoterapia**. 1ª ed. Cotia: Ateliê editorial, 2002. p. 19-28.

BALACHANDRAN, B. e SIVARAMKRISHNAN, V. M. Induction of tumours by Indian dietary constituents. **Indian Journal of Cancer**. v. 32, n. 3, p. 104-109, 1995.

BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: Uma revisão. **Brazilian journal of Pharmaceutical Sciences**. jan./mar. (2005); 41 (1) : 27-50.

BARROS, S. B. M. e DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 1ª ed. São Paulo: Atheneu, 1996. parte 1. p. 59-70.

BAYAT, M.; VASHEGHANI, M.M.; RAZAV, N.; TAHER, S.I.; RAKHSHAN, M. Efeito da terapia laser de baixa potência na cura de queimaduras de segundo-grau em ratos: um histológico e estudo de microbiologia. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.78, n.2, p.171-177, 2005.

BERTOLAMI, C. N. e MESSADI, D. V. Complications associated with wound healing. In: KABAN, L. B; POGREL, M. A. ; PERROTT, D. H. **Complications in Oral and Maxillofacial Surgery**. 1ª ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1997. cap. 4. p. 47-58.

BOSQUEIRO, C.M. *et al.* **Manual de Tratamento de Feridas**. Campinas: Hospital das Clínicas – UNICAMP, 1999.

BRASIL, Ministério da Saúde. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Série B: Textos Básicos de Saúde**. Brasília. 1ª ed. 2006. 59 p.

BROWN, S. A.; BIGGERSTAFF, J ; SAVIDGE, G. F. Disseminated intravascular coagulation and hepatocellular necrosis due to clove oil. **Blood Coagulation Fibrinolysis**. v. 3, n. 5, p. 665-668, 1992.

CANDIDO, L.C. *et al.* **Nova Abordagem no Tratamento de Feridas**. São Paulo: SENAC, 2001.

CARVALHO, A. A. T. **Estudos microbiológico in vitro e toxicológicos agudo e sub-agudo, com determinação da DL₅₀ do extrato hidroalcoólico de Psidium guajava Linn**. João Pessoa, 2002. 81 p. Tese de Doutorado em Odontologia. Área de Concentração em Estomatologia do Programa Integrado de doutorado em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba e Universidade Federal da Bahia.

CLARK, R.A.F. Cutaneous tissue repair: Basic biologic considerations. **J. Am. Acad. Dermatol**. v. 13. p. 701, 1985.

COLLINS, T. Inflamação aguda e crônica. *In*: ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. 44-79.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S; SOUSA, R.S.; BAUDI, D.L.K.; CASTRO, J.H.T. Cicatrização secundária em feridas dermoepidérmicas tratadas com ácidos graxos essenciais, vitaminas A e E, lecitina de soja e iodo Polivinilpirrolidona em cães. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2004.

DEUBEN, R. R. e DESJARDINS, P. J. Anti-sépticos e Desinfetantes. *In*: NEIDLE, E. A. e YAGIELA, J. A. **Farmacologia e Terapêutica para Dentistas**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. cap. 43. p. 495-502.

DICIONÁRIO DE ESPECIALIDADES TERAPÊUTICAS: **DEF** 2006/2007. 35ª. ed. - Rio de Janeiro: De Publicações Científicas, 2006.

ELISABETSKY, E. Fitoterapia com base científica. **Ciência hoje**. v. 31, n. 182, p. 78-79, 2002.

FAZIO, M.J. ; ZITELLI, J.A.; GOLSLEN, J. B. Cicatrização de feridas. *In*: COLEMAN III, W. P. ; HANKE, C. W. ; ALT, T. H. ; ASKEN, S. **Cirurgia Cosmética- Princípios e Técnicas**. 2ª ed, Rio de Janeiro: Revinter, 2000: p. 18-23.

GREGORI, C. **Cirurgia Buco-Dento-Alveolar**. 1ª ed. São Paulo: Sarvier, 1996. cap. 11. p. 104-108.

GREGORI, C. *et al.* Suporte medicamentoso em cirurgia buco-dento-alveolar. *In*: GREGORI, C. **Cirurgia Buco-Dento-Alveolar**. 1ª ed. São Paulo: Sarvier, 1996. cap. 7. p. 33-52.

GUYTON, A.C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 10ª. Ed: Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro; 2002. p. 973.

GOLDBERG, M. H. Prevenção e controle da infecção no paciente cirúrgico. *In*: TOPAZIAN, R. G. e GOLDBERG, M. H. **Infecções Maxilofaciais e Orais**. 1ª ed. São Paulo: Santos, 1997. cap. 19. p. 518-536.

GOMES, D. R. Fisiologia e fisiopatologia. *In*: GOMES, D. R. ; SERRA, M. C. ; PELLON, M. A. **Tratamento das queimaduras – um guia prático**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1997. cap. 02. p. 8-22.

HAAS, D. A. An update on analgesics for the management of acute postoperative dental pain. **J. Can. Dent. Assoc.** v. 68, n. 8, p. 475-482, 2002.

HARTNOLL, G. ; MOORE, D. ; DOUEK, D. Near fatal ingestion of oil of cloves. **Arch Dis Child.** v. 69, n. 3, p.392-393, 1993.

HELFRICK, J. F. Complicações imediatas e tardias das infecções odontogênicas. In: TOPAZIAN, R. G. e GOLDBERG, M. H. **Infecções Maxilofaciais e Orais.** 1ª ed. São Paulo: Santos, 1997. cap. 17. p. 480-495.

LANE, B. W. *et al.* Clove oil ingestion in an infant. **Human Experimental Toxicology.** v. 10, n. 4, p. 291-294, 1991.

LAPA, J. A. *et al.* Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia – da planta ao medicamento.** 3ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS e da UFSC, 2001. cap. 11. p. 183-197.

LEAL, J. M. Materiais obturadores de canais radiculares. In: LEONARDO, M. R. e LEAL, J. M. **Tratamento de Canais Radiculares.** 2ª ed. São Paulo: Panamericana, 1991. cap. 23. p. 348-404.

LÓPEZ, A. B. ; CAPÓ, J. T. ; GONZÁLEZ, Y. C. Actividad analgésica y antipirética de un extracto fluido de *Pimenta dioica* L. y evaluación de su toxicidad aguda oral. **Rev Cubana Farm.** v. 32, n. 3, p. 198-203, 1998.

MASSONE, F. **Anestesiologia Veterinária.** 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. cap. 10. p. 103-108.

MASSONE, F. **Anestesiologia Veterinária.** 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. cap. 21. p. 239-248.

MANDELBAUN, S. H. ; DI SANTIS, E. P. ; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: Conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. **An Bras Dermatol**. Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 394-410, 2003.

MELO, A. F. M. **Estudo galênico das formas plásticas (gel e pomada) do extrato bruto de *Anacardium occidentale* L.** Recife, 2002. 105 p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco.

MELO JÚNIOR, E. J. M. Alveolite: **Propedêutica clínica, subsídios ao emprego de fitoterápicos como recurso terapêutico.** São Paulo, 2002. 42 p. Dissertação de Mestrado em Cirurgia e Traumatologia Bucal Maxilo Facial da Universidade de São Paulo.

MIHAIL, R. C. Oral leukoplakia caused by cinnamon food allergy. **Journal of Otolaryngology**. v. 21, n. 5, p.366-367, 1992.

MILLER, R. L. ; GOULD, A. R. ; BERNSTEIN, M. L. Cinnamon-induced stomatitis venenata, clinical and characteristic histopathologic features. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. v. 73, n. 6, p. 708-716, 1992.

MUKHERJEE, D. ; NISSEN, S. E. ; TOPOL, E. J. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. **JAMA**. v. 286, p. 954-959, 2001.

NEWBRUN, E. Agentes anticárie e antiplaca/antigengivite. *In*: NEIDLE, E. A. e YAGIELA, J. A. **Farmacologia e Terapêutica para Dentistas**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. cap. 42. p. 483-494.

NUNES, D. A. *et al.* A utilização de agentes fitoterápicos em Odontologia. **Rev. Fac. Odontol. Univ. Fed. Bahia**. v.18, p. 11-14, 1999.

PERRY, P. A. ; DEAN, B. S. ; KRENZELOK, E. P. Cinnamon oil abuse by adolescents. **Vet Hum Toxicol.** v. 32, n.2, p. 162-164, 1990.

RIENDEAU, D. *et al.* Etoricoxib (MK-0663): Preclinical profile and comparison with other agents that selectively inhibit cyclooxygenase-2. **J Pharmacol Exp Ther** v. 296, n. 2, p. 558-566, 2001.

ROTHENSTEIN, A. S. *et. al.* Eugenol and clove leaf oil. A survey of consumer patch-test sensitization. **Food Chem Toxicol.** v. 21, n. 6, p. 727-733, 1983.

SAEED, S. A. e GILANI, A. H. Antithrombotic activity of clove oil. **J Pak Med Assoc.** v. 44, n. 5, p. 112-115, 1994.

SAINIO, E. L. e KANERVA, L. Contact allergens in toothpastes and a review of their hypersensitivity. **Contact Dermatitis.** v. 33, n. 2, p. 100-105, 1995.

SARTI, S. J. e CARVALHO, J.C.T. Fitoterapia e fitoterápicos. In: CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos Anti-inflamatórios – aspectos clínicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas.** 1ª ed. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004. cap. 1. p. 13-38.

SHYMALA, M. P. ; VENUKUMAR, M. R. ; LATHA, M.S. Antioxidant potential of the *Syzygium aromaticum* (Gaertn) Linn. (cloves) in rats fed with high fat diet. **Indian J Pharmacol.** v. 35, p. 99-103. 2003.

SILVA, M. C. e CARVALHO, J.C.T. Inflamação. In: CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos Anti-inflamatórios – aspectos clínicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas.** 1ª ed. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004. cap. 4. p. 49-68.

- SILVA, E. C. B. *et al.* **Avaliação biológica de *Caesalpinia echinata* Lam. - Fabaceae / Caesalpinioideae – usos e riscos**. Recife, 2006. 116 p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco.
- SONAGLIO, D. *et al.* Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. L. O. *et al.* **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 3ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS e da UFSC, 2001. cap. 13. p. 223-260.
- SOUDAMINI, K. K. *et al.* Mutagenicity and anti-mutagenicity of selected spices. **Indian J Physiol Pharmacol**. v. 39, n. 4, p. 347-353, 1995.
- SOUTO, G. S. S. **Avaliação da capacidade cicatrizante de gel à base de *Punica granatum* Linn. em ratos não diabéticos e diabéticos (aloxânicos)**. João Pessoa, 2004. 96 p. Tese de Doutorado em Odontologia do Programa Integrado de Doutorado em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba e Universidade Federal da Bahia.
- TERKELTAUB, R.A. e GINSBERG, M. H. Platelets and response to injury. In: Clark, R.A.F.; HENSON, P.M. **The molecular and cellular biology of wound repair**. New York: Plenum Press. 1998.
- TRUMMEL, C. L. Drogas antiinflamatórias. In: NEIDLE, E. A. e YAGIELA, J. A. **Farmacologia e Terapêutica para Dentistas**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. cap. 22. p. 250-269.
- WRIGHT, S. E.; BARON, D. A.; HEFFNER, J. E. Intravenous eugenol causes hemorrhagic lung edema in rats: proposed oxidant mechanisms. **J Lab Clin Med**. v. 125, n. 2, p. 257-264, 1995.

ZAUPA, C. *et al.*; Estudo toxicológico pré-clínico (agudo e sub-agudo) do produto Propovit Plus[®] em roedores. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 21, n. 4, p. 265-272, 2002.

http://geocities.yahoo.com.br/ervas_dilenemaia

ANEXO – Certidão de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL

CERTIDÃO

João Pessoa, 27 de setembro de 2006

CEPA Nº. 0511/06

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisadores: Fábio Correia Sampaio (Orientador) / Rômulo Oliveira de Hollanda Valente (Pós-Graduando)

Departamento/Setor: Programa Integrado de Odontologia, UFBA/UFPB

Ref.: Projeto de Pesquisa: AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA “*In vitro*” E TOXICOLÓGICA (DL50) dos extratos de *Syzygium aromaticum* (CRAVO DA ÍNDIA) E *Cinnamomum zeylanicum* (CANELA) E A AÇÃO ANTIINFLAMATÓRIA E CICATRIZANTE DA POMADA DESTES EXTRATOS SOBRE FERIDAS ELETROCIRÚRGICAS EM DORSO DE CAMUNDONGOS

O Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, em reunião, **ANALISOU e APROVOU** a execução do projeto acima.

Atenciosamente,

Prof. Dr. **REINALDO NOBREGA DE ALMEIDA**
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.