

ETYENE CASTRO DIP

EUGENOL E A INTOXICAÇÃO POR "COMIGO-NINGUÉM-PODE"
(DIEFFENBACHIA PICTA SCHOTT.)

ICB/UFRJ
Rio de Janeiro
2002





UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA BÁSICA E CLÍNICA

EUGENOL E A INTOXICAÇÃO POR “COMIGO-NINGUÉM-PODE”
(*Dieffenbachia picta* Schott.)

ETYENE CASTRO DIP

RIO DE JANEIRO

2002



MINUTA DA ATA DE DEFESA DE TESE DE MESTRADO

TÍTULO DO TRABALHO:

**“EUGENOL E A INTOXICAÇÃO POR
“COMIGO-NINGUÉM-PODE”(Dieffenbachia picta Schott).**

CANDIDATA: ETYENE CASTRO DIP

ORIENTADORES: PROF^a. DR^a. PATRICIA DIAS FERNANDES
PROF. DR. NUNO ALVARES PEREIRA

BANCA EXAMINADORA:

1..Prof. Dr. Paulo de Assis Melo	Grau	(10)
2..Prof ^a Dr ^a Tereza Sollero Cláudio-da-Silva	Grau	(10)
3..Prof. Dr. Fabio de Sousa Menezes	Grau	(10)
<u>MÉDIA FINAL</u>	Grau	(10)

Prof. Dr. Paulo de Assis Melo

Prof^a. Dr^a. Tereza Sollero Cláudio-da-Silva

Prof. Dr. Fábio de Sousa Menezes

Revisora Prof^a. Dr^a. Tereza Sollero Cláudio-da-Silva

Suplente Prof. Dr. Newton Gonçalves Castro

Prof. Orientador: Prof^a. Dr^a. Patrícia Dias Fernandes

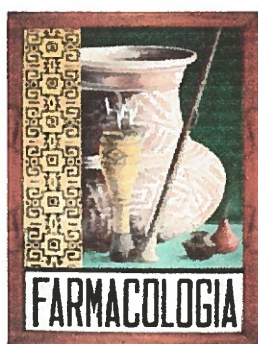
Prof. Orientador: Prof. Dr. Nuno Alvares Pereira

RIO DE JANEIRO EM, 05 DE DEZEMBRO DE 2002

EUGENOL E A INTOXICAÇÃO POR “COMIGO-NINGUÉM-PODE”

(*Dieffenbachia picta* Schott.)

ETYENE CASTRO DIP



Tese apresentada ao Departamento de Farmacologia Básica e Clínica

da UFRJ, visando a obtenção do grau de

Mestre em Ciências (Farmacologia e Terapêutica Experimental)

RIO DE JANEIRO

2002

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Farmacologia de Produtos Naturais e Farmacologia da Inflamação e do Óxido Nítrico, do Departamento de Farmacologia Básica e Clínica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação dos professores Nuno Alvarez Pereira e Patrícia Dias Fernandes. Durante esta tese o Laboratório da prof. Patricia recebeu auxílios financeiros da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, auxílio individual e temático/2001), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq, fitoterápicos/2001). A aluna não recebeu nenhum tipo de bolsa.

Dip, Etyene Castro

Eugenol e a intoxicação por “Comigo Ninguém Pode” (*Dieffenbachia picta* Schott.)/Etyene Castro Dip
Rio de Janeiro, 2002.

xvi, 96 p.

Dissertação: Mestre em Ciências (Farmacologia e Terapêutica Experimental)

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Instituto de Ciências Biomédicas – ICB, 2002.

Orientadores: Nuno Álvares Pereira e Patrícia Dias Fernandes

1. Produtos Naturais;
 2. Edema de língua;
 3. Eugenol;
 4. *Dieffenbachia picta*;
 5. Farmacologia – Teses.
- i. Fernandes, Patrícia Dias; Pereira, Nuno Álvares (Orient.).
 - ii. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Ciências Biomédicas
 - iii. Título

“DE TUDO FICARAM TRÊS COISAS:

A CERTEZA DE QUE ESTAMOS SEMPRE COMEÇANDO

A CERTEZA DE QUE É PRECISO CONTINUAR

A CERTEZA DE QUE SEREMOS INTERROMPIDOS ANTES DE TERMINAR...

PORTANTO DEVEMOS:

FAZER DA INTERRUPÇÃO UM NOVO CAMINHO

DA QUEDA, UM PASSO DE DANÇA

DO MEDO, UMA ESCADA

DO SONHO, UMA PONTE

DA PROCURA, UM ENCONTRO.”

(FERNANDO PESSOA)

DEDICATÓRIA

A DEUS:

QUE NOS DÁ A OPORTUNIDADE DE RENASCER, O LIVRE ARBÍTRIO PARA CRESCER E DIANTE DAS
PROVAS E EXPIAÇÕES, NOS SAÚDA COM SUA MISERICÓRDIA E JUSTIÇA, CERTIFICANDO-NOS DE
QUE SEM FÉ, CARIDADE E PERDÃO NADA SERÍAMOS.

À MINHA FAMÍLIA:

QUE COM AMOR, DEDICAÇÃO E SABEDORIA, ILUMINAM A MINHA VIDA, TORNANDO TUDO MAIS
ALEGRE E LEVE.

ÀS PLANTAS:

MESMO SEM SEU MAIOR ALICERCE, O CAULE, NOS BRINDA E NOS CATIVA COM O MAIS BELO DOS
ENSINAMENTOS: O RENASCIMENTO.

OBRIGADA *DIEFFENBACHIA PICTA* SCHOTT.

AGRADECIMENTOS

AO PROFESSOR NUNO ALVARES PEREIRA, MAIS QUE ORIENTADOR, UM EXEMPLO DE DEDICAÇÃO À PESQUISA, SER HUMANO, PELA CONFIANÇA, CARINHO, INCENTIVO, PACIÊNCIA E SOBRETUDO AMIZADE;

À PROFESSORA PATRICIA DIAS FERNANDES, PELA ORIENTAÇÃO, COMPETÊNCIA PROFISSIONAL E ESPECIALMENTE POR GARANTIR A POSSIBILIDADE DE REALIZAÇÃO DESTES TRABALHOS. NO MOMENTO MAIS DIFÍCIL, ACOLHEU-ME, DISPONIBILIZANDO SEU LABORATÓRIO, DEPOSITANDO TODA A SUA CONFIANÇA E ME CONDUZINDO PELO CAMINHO CORRETO;

À PROFESSORA TEREZA SOLLERO, PELA BRILHANTE REVISÃO DA TESE, IDÉIAS, INCENTIVO, OTIMISMO E ALEGRIA CONTAGIANTE;

AO PROFESSOR DR. FRANCOIS GERMAIN NOEL, CHEFE DO DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA BÁSICA E CLÍNICA, AO PROFESSOR DR. NEWTON G. CASTRO, COORDENADOR DA PÓS GRADUAÇÃO, E A TODOS OS PROFESSORES DO DEPARTAMENTO QUE, SEM EXCEÇÃO, SEMPRE ME TRATAM COM TERNURA, BOA VONTADE E ATENÇÃO;

AOS PROFESSORES VERA LÚCIA GONÇALVES KOATZ, PAULO DE ASSIS MELO E FÁBIO DE SOUSA MENEZES POR TEREM ACEITADO PRONTAMENTE O CONVITE PARA EXAMINAR ESTA TESE;

AO PROFESSOR RICARDO LAINETTI DO LABORATÓRIO DE FARMACOBOTÂNICA-FACULDADE DE FÁRMACIA/UFRJ, PELA IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO;

AO PROFESSOR HÉLIO MATTOS ALVES - FACULDADE DE FARMÁCIA/UFRJ, PELAS ANÁLISES DO EUGENOL EM HPLC;

À PROFESSORA ANA LUIZA PALHARES DE MIRANDA DO DEPARTAMENTO DE FÁRMACOS-FACULDADE DE FARMÁCIA/UFRJ, PELA AJUDA VALIOSA NA REALIZAÇÃO DOS TESTES DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA;

À PROFESSORA MARIA ELINE MATHEUS PELO EXEMPLO DE COMO MINISTRAR AULAS E CARINHOSAMENTE REPARTIR UM POUCO DE SEU CONHECIMENTO;

AO PROFESSOR RICARDO KUSTER DO NPPN/UFRJ, PELOS ENSINAMENTOS E PACIÊNCIA DURANTE O CURSO DE RESSONÂNCIA;

AO PROFESSOR DR. HÉLIO PEREIRA LOPES E TODA A EQUIPE DE PROFESSORES E ALUNOS DA ABE-RJ QUE TANTO CONTRIBUÍRAM PARA MINHA FORMAÇÃO COMO ENDODONTISTA, ACREDITANDO E RECONHECENDO MEU PROFISSIONALISMO;

A DIRETORIA DA ABO-RJ, À EQUIPE DE PROFESSORES E DE FUNCIONÁRIOS, QUE CONTINUAM ME APOIANDO;

AO PROFESSOR DR. ANTONIO JORGE MOLINARO COELHO PELA SENSIBILIDADE DE OBSERVAR MINHA INCLINAÇÃO PARA PESQUISA E MAGISTÉRIO, APOSTANDO EM MEUS DEVANEIOS ODONTOLÓGICOS;

À PROFESSORA DRA. NEDI SOLEDAD, EXEMPLO DE MULHER E PROFISSIONAL;

AOS MEUS QUERIDOS PACIENTES QUE LITERALMENTE SOBERAM SER PACIENTES, NÃO SÓ POR MINHAS AUSÊNCIAS E ATRASOS, MAS PRINCIPALMENTE POR ESCUTAREM SEM QUESTIONAR CADA NOVO RESULTADO DESTES TRABALHOS;

ÀS MINHAS IRMÃS: ANA PAULA, FLÁVIA E PAULA, PELAS LOUCURAS, LÁGRIMAS, GARGALHADAS, POR SIMPLEMENTE EXISTIREM EM MINHA VIDA;

AOS AMIGOS DE TODA A HORA E DE VÁRIOS SÉCULOS: CIDINHA E PAULO PINHEIRO ALVES;

AO QUERIDO YURI PELO CARINHO...

AOS COMPANHEIROS DE MESTRADO:

BRUNO, POUCAS PESSOAS ESTAM INTERESSADAS EM RECONHECER NOSSAS QUALIDADES. CONFIO EM VOCÊ!
OBRIGADO POR ABSOLUTAMENTE TUDO...;

JORGE, "MY BEST FRIEND"...

LEANDRO E LÍVIA PELAS CONVERSAS E AGRADÁVEL CONVIVÊNCIA;

AOS AMIGOS DO LABORATÓRIO DE INFLAMAÇÃO E DO ÓXIDO NÍTRICO, QUE ESTÃO OU ESTIVERAM COMIGO:
DANIELA, FRED, GABRIELA, GISELLE, ILANA, NIELLE... ESPECIALMENTE A SIMONE, EXEMPLO DE DIGNIDADE;
FABÍOLA, COMPANHEIRA DE DESCOBERTAS FARMACOLÓGICAS, UMA AMIGA QUE GANHEI E VICENTE POR ESTAR SEMPRE DISPOSTO A ME AJUDAR!

RESUMO

DIP, ETYENE CASTRO. **EUGENOL E A INTOXICAÇÃO POR “COMIGO-NINGUÉM-PODE”** (*DIEFFENBACHIA PICTA* SCHOTT.). ORIENTADORES: NUNO ALVARES PEREIRA E PATRICIA DIAS FERNANDES. RIO DE JANEIRO: UFRJ/ICB; 2002. DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA EXPERIMENTAL)

Dieffenbachia picta Schott. (Araceae), conhecida no Brasil as “comigo ninguém pode” é uma planta ornamental cujas propriedades tóxicas do suco do caule da planta quando em contato com a boca ou aspirado são responsáveis por casos de intoxicação em crianças e animais domésticos. O mecanismo de toxidez da planta continua sendo alvo de pesquisas. O Eugenol, maior constituinte do óleo essencial do cravo-da-índia, *Caryophyllus aromaticus* (Myrtaceae) é amplamente utilizado principalmente em odontologia. Os objetivos foram padronizar uma metodologia de quantificação do edema de língua em camundongos, induzido pela aplicação tópica do suco da planta; testar a atividade de antiinflamatórios, antihistamínicos, anti-PAF e bloqueadores de canais de cálcio na regressão do edema de língua e avaliar os efeitos do Eugenol. Os parâmetros de mensuração do edema de língua foram à dilatação méso-distal e a projeção frontal. Nenhum dos fármacos foi capaz de reverter completamente o edema de língua, ao contrário do observado com o Eugenol. A associação de adrenalina (20µg/kg), dexametasona e prometazina administrados 5 minutos após a aplicação do suco reduziu em 100% o edema de língua 45 minutos após o início do tratamento, enquanto o Eugenol (0,1%), 15 minutos após a aplicação do suco reduziu em 100% o edema de língua 5 minutos após sua administração. Conclui-se que o Eugenol, na sua menor concentração, independente da via de administração e do tempo de sua aplicação, mostrou-se mais eficaz em reduzir e inibir o edema de língua induzido pelo suco da *Dieffenbachia picta* do que o tratamento utilizado na clínica medica emergencial.

ABSTRACT

DIP, ETYENE CASTRO. **EUGENOL E A INTOXICAÇÃO POR “COMIGO-NINGUÉM-PODE”** (*DIEFFENBACHIA PICTA* SCHOTT.). ORIENTADORES: NUNO ALVARES PEREIRA E PATRICIA DIAS FERNANDES. RIO DE JANEIRO: UFRJ/ICB; 2002. DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA EXPERIMENTAL)

Dieffenbachia picta Schott. (Araceae), known in Brazil as “comigo ninguém pode” is an ornamental plant with toxic properties. The juice when chewed causes a painful oedema of oral mucous membranes, buccal ulcerations and tongue hypertrophy in children and pets. Until now, the nature of the plant toxicity mechanisms remains controversial. The Eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol), the major constituent obtained from the clove essential oil, *Caryophyllus aromaticus* (Myrtaceae) is widely used especially in Odontology. The objectives were standardize a measurable methodology for a tongue oedema in mice models by topical application (buccal cavity) using *D. picta*, steam juice; test the efficacy of steroidal and non steroidal anti-inflammatory, anti-histaminic; anti -PAF and calcium ion channel blockers drugs in this inhibition and examine Eugenol effects through the plant intoxication. Two parameters were used to achieve the measure: mesio-distal dilatation and frontal protrusion of the tongue. No utilized drugs had shown the ability to completely reduce the oedema, being Eugenol the exception. The combination treatment using Epinephrine (20µg/kg), dexametason and prometazin, given 5 minutes after the juice application lead to 100% of the tongue reduction only observed 45 minutes after the beginning of the treatment. However Eugenol (0,1%), 15 minutes after the juice application showed the complete reduction of the oedema 5 minutes after its administration. Eugenol, on its minor concentration, despite of the chosen administration route or the on set treatment, shown better results in the reduction and inhibition of the tongue oedema induced by *Dieffenbachia picta* juice, when compared with the emergencial treatment.

ABREVIATURAS

DMSO – dimetilsulfóxido

EG – Eugenol

IE – índice de edema

PM – peso molecular

PBS – tampão fosfato salina

PG – prostaglandinas

PGE – prostaglandinas da série E

PAF – fator de agregação plaquetária

D.picta – *Dieffenbachia picta* SCHOTT.

a.C – antes de Cristo

SNC – Sistema Nervoso Central

ÍNDICE

Resumo	ix
Abstract	x
Abreviaturas	xi
Introdução	01
1. Histórico	02
2. A Família Araceae	03
3. O Gênero <i>Dieffenbachia</i> e a espécie <i>picta</i> Schott.	04
4. Eugenol	12
Objetivos	17
Materiais e Métodos	19
1. Animais	20
2. Fármacos e Reagentes Utilizados	20
3. Material Vegetal	21
4. Preparo do Suco de <i>Dieffenbachia picta</i> Schott.	21
5. Ensaio Toxicológicos com <i>Dieffenbachia picta</i> Schott.:	22
5.1. Via Tópica	22
5.2. Via Oral	22
5.3. Via Intrapulmonar	22
6. Caracterização do Edema de Língua	23
7. Eugenol	24
8. Cálculo da Dose Letal 50% do Eugenol	24
9. Pré-tratamento com Eugenol	25
10. Pós-tratamento	25
10.1. Antiinflamatórios	25
10.2. Anti-Histamínico, Bloqueador de Canais de Cálcio e Anti-PAF	
10.3. Eugenol	26
10.4. Associação de Adrenalina/Dexametasona/Cloridrato d	26
Prometazina	
11. Análise Estatística	27
Resultados	29
1. Grau de Pureza do Eugenol	30
2. Dose Letal 50% do Eugenol	
2.1. Via Oral	31
2.2. Via Intraperitoneal	34
2.3. Via Intravenosa	36
3. Efeito da Administração Tópica de Diferentes Volumes do Suco d <i>Dieffenbachia picta</i> Schott.	38
4. Pré-tratamento com Eugenol	43
5. Pós-tratamento com Fármacos Antiinflamatórios	46
6. Pós-tratamento com Anti-Histamínico, Bloqueador de Canais de Cálcio Anti-PAF	48
7. Pós-tratamento com Eugenol	51
8. Pós-tratamento com Adrenalina, Corticóide e Anti-histamínico	63
Comparação entre os efeitos do Eugenol e o Tratamento Conjunto Adrenalina/ Dexametasona/ Cloridrato de Prometazina	67

Discussão	71
Conclusões	81
Referências Bibliográficas	83

INTRODUÇÃO

1. HISTÓRICO

As propriedades medicinais das plantas e o interesse na suas utilizações para a cura das doenças tiveram início com as primeiras civilizações. Antigos escritos remontam aos Assírios, Babilônios e Egípcios (LIPP, 1996).

Muitos séculos se passaram para que surgisse um trabalho específico sobre plantas tóxicas. Dioscórides (40 a 90 a.C.) em seu trabalho *De Materia Medica* descreve sistematicamente aproximadamente 579 plantas e comentários acerca da natureza tóxica de algumas delas. Na Europa, a literatura sobre o uso de plantas medicinais ou venenosas aumentou durante o século XIX. Orfila, conhecido como “Pai da Toxicologia”, foi o pioneiro na investigação da natureza química de várias substâncias encontradas em plantas, realizando experimentos e observando casos de envenenamento (KINGSBURY, 1961).

Atualmente, os compêndios e estudos da toxidez dos vegetais tornaram-se abrangentes e pesquisas nessa área cresceram significativamente. A ocorrência de intoxicações agudas e crônicas por produtos vegetais é um fato de incidência mundial. Vários países, incluindo o Brasil, criaram centros de controle e tratamento de intoxicações, como o SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas), implantado desde 1980 na FIOCRUZ.

Segundo dados estatísticos obtidos em 1998, o número de casos registrados de intoxicação humana provocados por plantas, naquele ano foi de 1748. Dados epidemiológicos demonstram que a intoxicação de humanos com plantas tem crescido nos últimos anos e descrevem como sendo as principais responsáveis pelas intoxicações na região Sudeste espécies de *Dieffenbachia*, *Datura*, *Jatropha*, *Ricinus* e *Manihot* (DORE, 1963; DRACH & MALONEY, 1963; MARDEROSIAN & ROIA, 1979).

Em um levantamento estatístico feito em 1995, LAINETTI *et al.* demonstraram a incidência das Araceae nos acidentes provocados por plantas distribuído segundo a faixa etária.

Tabela 1 - Incidência de intoxicação por plantas de acordo com a faixa etária.

	Idade (em anos)										
	1	1 a 4	5 a 9	10 a 14	15 a 19	20 a 29	30 a 39	40 a 49	50 a 79	> 80	Ignorada
Casos número	35	473	222	88	62	113	69	32	35	0	52

Fonte: Sistema Nacional de Informações Tóxico-farmacológicas (SINITOX)-FIOCRUZ 1999-2000.

2. A FAMÍLIA ARACEAE

A família Araceae apresenta ampla distribuição geográfica, sendo subcosmopolita e concentrada em regiões tropicais das Américas, África e sudoeste da Ásia. Das nove subfamílias de Araceae existentes ao menos seis são apontadas como responsáveis por acidentes tóxicos, tais como Photoideae, Monsteroideae, Lasioideae, Philodendroideae, Colocasioideae e Aroideae (LAINETTI *et al.*, 1995). A tabela 2 mostra os resultados de estudos histoquímicos feitos por LAINETTI *et al.* (1995), demonstrando ser comum a presença de ráfides de oxalato de cálcio em aráceas, entretanto os efeitos tóxicos mais intensos somente ocorrem quando da presença da “arma” (ráfides) associado a “munição” (gotículas lipídicas).

Tabela 2 – Efeitos observados em animais expostos a diversas partes de Araceae:

Espécie	Orgão vegetal	CIO	IRO	IR	EFEITOS OBSERVADOS			
					Edema de Pata	Edema bucal	Espasmo de pulmão	Morte
<i>A. aciculata</i>	Folha	+++	+++	-	++	+	++	≤1min
<i>A. macrorrhiza</i>	Folha	+++	+++	-	++	+	++	≤1min
<i>C. bicolor</i>	Tubérculo	++	-	+	+	+	++	≤1min
<i>E. pinnatum</i>	Folha	+	-	+	+	-	+	24h
<i>P. bipinnatifidum</i>	Folha	++	++	-	++	+	++	≤1min
<i>X. sagittifolium</i>	Folha	+	-	+	+	+	+	24h
<i>X. violaceum</i>	Folha	++	+++	-	++	++	+++	≤1min

- negativa; + positiva; ++ muito positiva; +++ fortemente positiva

IRO = idioblasto com ráfides e óleo; CIO = células isoladas com óleo; IR = idioblasto com ráfides sem óleo

3. GÊNERO *Dieffenbachia* E A ESPÉCIE *picta* Schott.

A espécie *Dieffenbachia picta* Schott. tem em sua etimologia uma homenagem ao chefe dos jardineiros, Joseph Dieffenbach (1796-1863), do palácio de Schönbrunn (Áustria), cujo diretor se chamava Schott. *Picta* faz referência a um adjetivo latino que significa pintado ou variegado. Popularmente conhecida como “comigo-ninguém-pode” têm como sinonímia mundial “dumb-cane”, devido ao fato de causar dificuldades na fala quando ingerida ou “elephant ear”, pela morfologia da folha (KISSMAN, 1961).

Planta herbácea, verde, robusta, podendo atingir até 2 metros de altura, apresenta caule em formato cilíndrico com até 5 centímetros de diâmetro nas plantas mais velhas. O caule apresenta internódulos espaçados por 2,5 a 4 cm de comprimento, eretos quando jovens, reclinando nas plantas mais idosas. Sua consistência é macia e de interior suculento. As folhas são numerosas, formando uma coroa apical. Limbo bastante desenvolvido, podendo ultrapassar 50 cm de comprimento e 25 cm de largura. De coloração verde, apresentam manchas irregulares em tons creme a esbranquiçadas, característica que facilita a diferenciação entre as espécies. Esta diferenciação se faz pelo formato do limbo e número de nervuras secundárias, assim como pela variação das tonalidades verde claro e escuro e

algumas vezes a presença de pigmentos brancos, prata, creme ou amarelo. No gênero *Dieffenbachia*, as espécies *D. seguine*, *D. amoena* e *D. picta*, apresentam uma enzima de estrutura não definida, denominada dumbcaína, sobre a qual alguns autores atribuem a toxicidade destas plantas (WALTER & KHANNA, 1972; SPORKE & SMOLINSKE, 1999). Estas três espécies podem ser diferenciadas pela pigmentação presentes nas folhas: na *D. seguine* apresentam-se bem difusa por toda a sua extensão, na *D. amoena* a pigmentação bem esbranquiçada estende-se ao longo da nervura principal e na *D. picta* a pigmentação é puntiforme localizada em toda a extensão da folha (Figura 1).

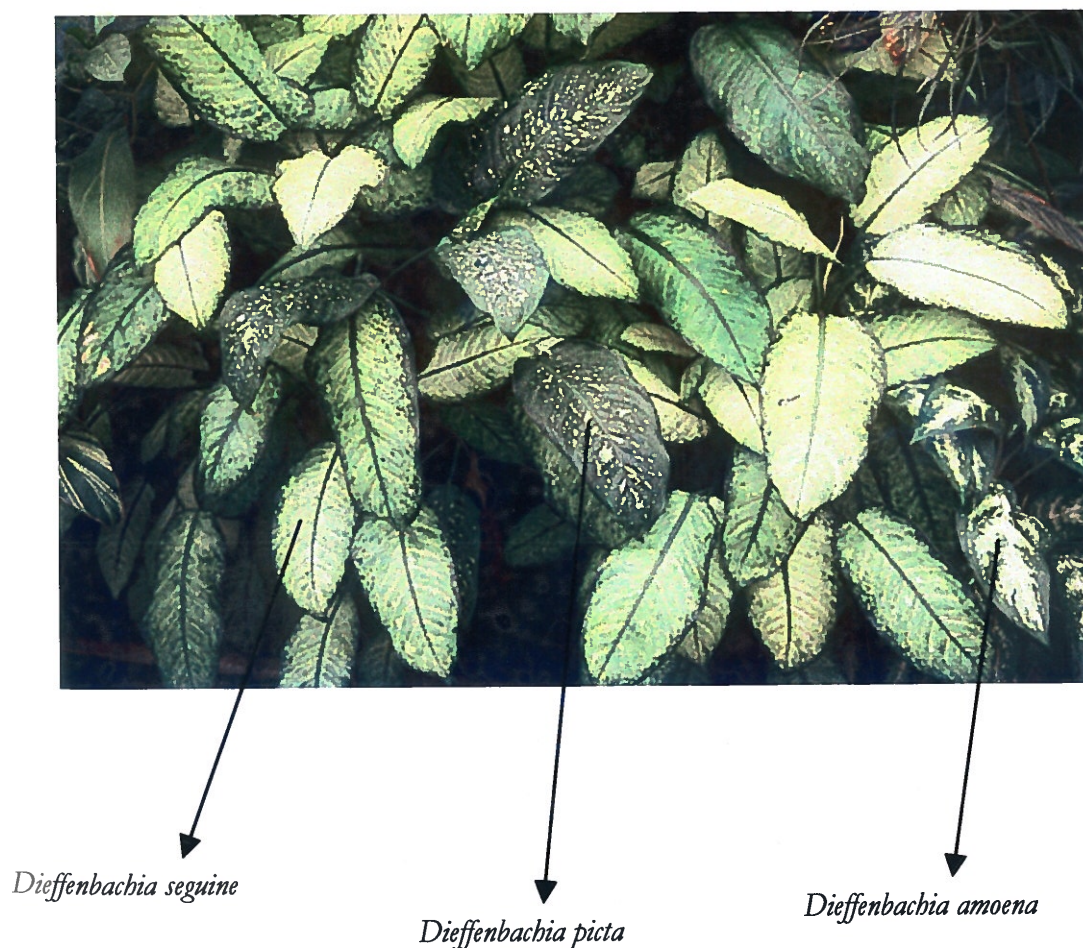


Figura 1 - Espécies de *Dieffenbachia* (*seguine*, *picta* e *amoena*)

A origem da espécie *D. picta* é incerta devido a sua presença em todas as regiões do mundo. KISSMAN (1961) a descreve como sendo nativa da Amazônia e Índias Ocidentais. Como são plantas ornamentais, foram levadas pelo homem e espalhadas pelo mundo dificultando a definição geográfica, entretanto é descrita como de ocorrência em áreas tropicais. As diversas variedades cultivadas, são separadas pelo desenho e diferentes tonalidades de verde nas folhas (Figuras 2 e 3).



Figura 2 - *Dieffenbachia picta* SCHOTT.

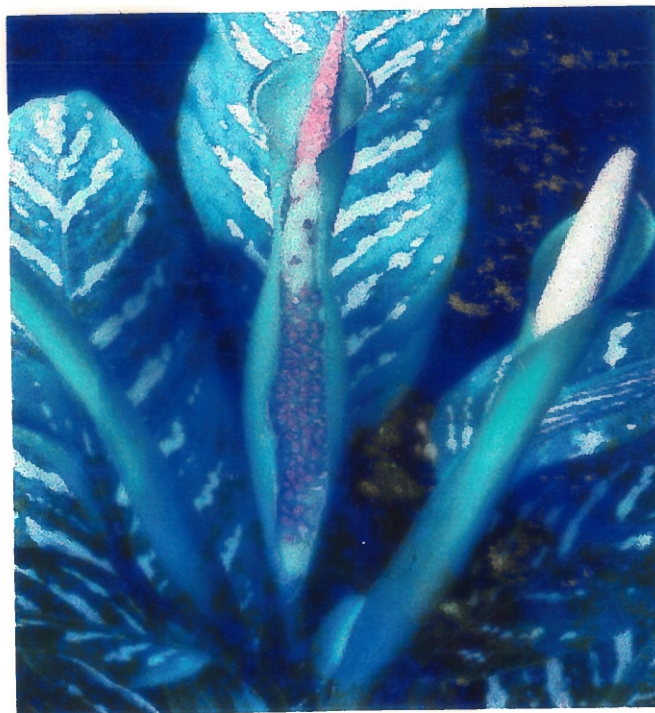


Figura 3 - Inflorescências de *Dieffenbachia picta* SCHOTT.

O gênero *Dieffenbachia* continua pouco explorado do ponto de vista químico. No único trabalho fitoquímico existente, os autores descrevem a presença de L-asparagina e de uma enzima proteolítica nas três espécies do gênero, a *D. seguine*, *D. amoena* e *D. picta* (WALTER & KHANNA, 1972).

A maioria dos trabalhos científicos e etnofarmacológicos faz menção ao gênero de forma ampla, sem a preocupação de definir a espécie utilizada, tendo como explicação para esta unicidade a semelhança morfológica entre elas. Os estudos realizados com o gênero *Dieffenbachia* buscam identificar as substâncias promotoras dos eventos tóxicos, porém sem grandes esclarecimentos.

As primeiras investigações foram realizadas com a espécie *D. seguine* por MADDAUS & KOCH (1941). O suco fresco, quando administrado por via oral ou subcutânea em ratos machos e fêmeas férteis, provocou esterilidade após 30 a 50 dias de tratamento. Os exames histológicos demonstraram a cessação completa da espermogênese e da formação do folículo, sugerindo que o efeito tóxico pudesse ser de natureza hormonal (DVORJETSKI, 1958).

RIZZINI & OCCHIONI (1957) notaram que a atividade estava concentrada na porção do suco insolúvel em água e que a perda de atividade poderia ocorrer durante a digestão. Entretanto, atribui-se a responsabilidade da atividade tóxica a presença de cristais de oxalato de cálcio, possivelmente por serem numerosos e comum às espécies (BLACK, 1918; DORE, 1963; DRACH & MALONEY, 1963; POHL, 1964).

Estudos fitoquímicos apesar de escassos e antigos descrevem a ocorrência de algumas substâncias presentes na planta como: glicosídeos cianogênicos, saponinas, substâncias fenólicas e flavonóides.

As substâncias fenólicas são representadas pelos ácidos cianogênicos, ácido cafêico, *p*-cumarínico, sináptico e ferúlico e os principais flavonóides são as C-glicoflavonas, flavonas e procianidinas (WILLIAMS *et al.*, 1981), e os produtos do metabolismo da tirosina, representados pelas trigloquinonas, tiramina, dopamina e suas amidas, como o ácido homogentísico e um derivado do composto, o 2-glicosilato (BATE-SMITH, 1968).

A característica química mais marcante é a presença de numerosas células especializadas, presentes nas folhas, pistilo e no caule, chamadas de idioblastos (DORE, 1963; POHL, 1964; GARDNER, 1994). Cada idioblasto é composto por 100 a 200 ráfides de oxalato de cálcio. Estas ráfides podem ser consideradas como uma “arma”, que quando impregnada desta substância lipídica, provoca reações edematogênicas. De acordo com RAUBER (1985), as ráfides seriam os “espinhos ou projétis” que penetram no tecido provocando injúrias físicas e servindo como o veículo da substância que os envolvem, agravando o processo inflamatório. Apresentam forma alongada, semelhante a agulhas aglomeradas em forma de feixes alinhados paralelamente. Estes feixes de ráfides estão contidos no interior dos idioblastos e normalmente, se encontram embebidos num tipo de mucilagem (WALTER & KHANNA, 1972; OCCHIONI & RIZZINI, 1974; ARDITTI & RODRIGUES, 1982).

Estudos histológicos de cortes do caule constataram a existência de gotículas de uma substância lipídica, coradas pelo Sudam III, (corante específico para lipídeos e terpenóides) que se mostrou solúvel em éter etílico e de petróleo (Figura 4). Essa substância de natureza lipídica, envolvendo os cristais, é composta por ácidos graxos insaturados, com 18 a 22 átomos de carbono (BARBI, 1999).

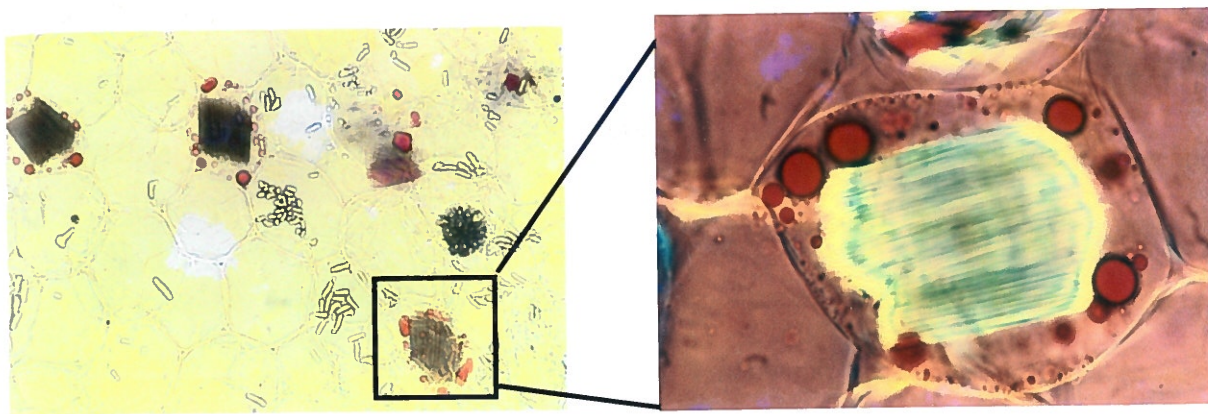


Figura 4 – Microfotografia de Idioblasto de *Dieffenbachia picta* mostrando ao lado das ráfides, as gotículas doradas pelo Sudam III.

Quando os cristais de oxalato de cálcio foram lavados com água continuaram sendo corados pelo Sudam III (Figura 5A), entretanto, quando lavados com éter de petróleo, não foram mais corados pelo Sudam III (CARNEIRO *et al.*, 1985; LAINETTI, 1995) (Figura 5B).

A



B

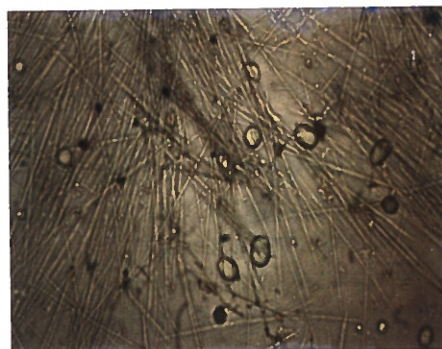


Figura 5 - Cristais de oxalato de cálcio lavados em água e corados pelo Sudam III (em A) e cristais de oxalato de cálcio lavados com éter de petróleo, não se coram pelo Sudam III (em B).

O oxalato de cálcio produzido é depositado no interior dos idioblastos na forma de cristais ou ráfídeos, de onde vem o nome a eles atribuídos (DAHLGREN & CLIFFORD, 1982; VAN DAMME *et al.*, 1995). Idioblasto é um termo que define as células especializadas que diferem das demais, em relação à forma, constituintes internos, ráfídes e pela parede celular. Também já foram descritos a presença de um reservatório mineral formado por cristais residuais derivados do metabolismo vegetal e que representam a principal proteção da planta contra predadores naturais, como os animais herbívoros (ESAÚ, 1965; MADISON, 1979).

Os efeitos tóxicos e irritantes da *D. picta* estão relacionados com a ação mecânica dos cristais de oxalato de cálcio existentes em grande quantidade na planta. LADEIRA *et al.* (1979), atribuem a ação irritante a um polissacarídeo que envolveria essas ráfídes. Entretanto, todos os estudos fitoquímicos que definiram a natureza dos constituintes da planta, não foram suficientes para os correlacionar com o mecanismo tóxico. A dumbcaína, dentre outras enzimas proteolíticas como a L-aspargina, foram relacionadas com o possível agravamento ou perpetuação do processo inflamatório instalado, resultando muitas vezes na necrose tecidual (RIZZINI & OCCHIONI, 1957; WALTER, 1967; FOCHTMAN *et al.*, 1969; WALTER & KHANNA, 1972; KUBALLA *et al.*, 1981). Esse agravamento pode ser resultante de uma liberação maciça de histamina proveniente da desgranulação dos mastócitos e da produção de cininas (BLACK, 1918; DORE, 1963; DRACH & MALONEY, 1963; POHL, 1964).

As intoxicações acidentais em humanos e em animais ocorrem em função do contato principalmente pela ingestão do caule ou contato com fragmentos deste na pele e mucosas (PALMIER *et al.*, 1992; GARDNER, 1994; SEET *et al.*, 1995; CORAZZA *et al.*, 1998). O contato do suco ou da seiva do caule ou então das folhas da planta com os olhos, resulta em um processo inflamatório agudo cujo desenvolvimento é extremamente rápido e doloroso, onde se pode observar outros sintomas como lacrimejamento, blefarite e blefaroespasmos seguido de fotofobia (SEET *et al.*, 1995; CHIOU *et al.*, 1997).

Os principais sintomas do contato com a cavidade bucal incluem edema de lábios e língua e estreitamento da fenda glótica. Quando aspirado e engolido, o edema bucal é caracterizado por intenso prurido, dor e vermelhidão acompanhado de rápido e severo desenvolvimento de edema de língua. Muitas vezes, pode-se observar edema de glote, broncoespasmo severo, seguindo de dificuldade respiratória e morte por asfixia. Outros sintomas clínicos associados a este quadro são as ulcerações da mucosa oral e epitélio labial, seguido de necrose. Mesmo após a melhora local, a dor e o prurido permanecem por dias ou semanas estando normalmente associados à intensa salivação e disfagia. A queimação corrosiva pode ainda estender-se da boca para o esôfago e estômago. A exacerbação da injúria causada pelo contato do suco com a mucosa bucal pode ser explicada pela presença de oligopeptídeos algésicos (MAYO *et al.*, 1997).

O suco extraído por prensagem do caule descascado de *D. picta*, quando em contato com a mucosa oral de camundongos resultou em uma resposta inflamatória aguda e imediata. Este processo inflamatório foi caracterizado clinicamente por sialorréia, ou excessiva salivação, hipertrofia dos lábios e língua, edema e necrose do palato. A dor é caracterizada por intensa queimação, exacerbada por feridas na língua, conseqüentes do toque dos dentes incisivos inferiores (BARNES, 1955; RIZZINI & OCCHIONI, 1957).

A histopatologia da língua de camundongos que tiveram contato com o suco da planta mostrou que o processo inflamatório agudo foi caracterizado pela presença de exudato, neutrófilos, alguns leucócitos e mastócitos ativados tendendo a desgranulação. Foram encontradas numerosas agulhas de cristais de oxalato de cálcio na superfície da língua. Infiltrados de linfócitos e polimorfonucleares ocorreram em toda a cavidade bucal e nos tecidos que compõe a nasofaringe, assim como, hiperemia e hemorragia subepitelial (BARBI, 1999).

4. EUGENOL

A espécie *Caryophyllus aromaticus* L. ou como é popularmente conhecido, “Cravo da Índia”, pertence à família Myrtaceae. A família Myrtaceae é nativa do sudeste da África, região das Ilhas Molucas e chegou ao Brasil após a colonização tendo sido trazida pelos portugueses (COSTA, 1975). O *Caryophyllus aromaticus* L caracteriza-se por ser uma árvore de até 15 metros de altura. Entretanto, quando cultivada atinge altura máxima de 4 metros. No Brasil, é cultivada em Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, sendo conhecida como *Cravo-do-Maranhão* (CORREIA, 1978; VAN DER BERG, 1982).

Apresenta folhas persistentes, conatas, opostas, longo-pecioladas, oblongas de 10 cm de comprimento e 5 cm de largura, sendo geralmente inteiras, coriáceas, pontuadas, luzidias e glabras. As flores são hermafroditas, pequenas e aromáticas, de coloração rósea a avermelhada e dispostas em corimbos terminais.

O cravo da Índia vem a ser os botões florais ainda fechados presente em diversas espécies da família Myrtaceae e, quando secos, os frutos são ovóides, coroados pelas divisões do cálice e freqüentemente monospema (COSTA, 1975). A partir do óleo essencial do botão floral obtem-se o Eugenol (EG), 4-alil-2-metoxifenol (Figura 6).

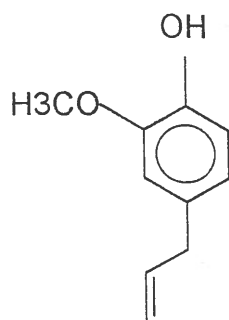


Figura 6 – Estrutura química do Eugenol

Sua indicação na clínica médica e odontológica, como analgésico e antiséptico vem de remotas épocas (a.C.). Também foi descrita sua utilização por primatas que mascavam as folhas, buscando um entorpecimento temporário da boca (KOZAM & MANTELL, 1978).

Atualmente em odontologia o Eugenol está sendo menos indicado tanto como medicamento tópico ou associado ao óxido de zinco o qual lhe confere a possibilidade de ser usado como curativo temporário (MORAIS *et al.*, 1996). No entanto, nos serviços de saúde pública odontológica, contraditoriamente, é um dos medicamentos mais vendidos e utilizados topicamente em casos de alveolite, infecção do osso remanescente ao alvéolo de um dente extraído. Compõe inclusive algumas formulações de pastas obturadoras para os canais radiculares que, associada à guta percha, selam o sistema de canais radiculares após o término do tratamento endodôntico. A citotoxicidade do Eugenol parece ser o principal responsável pela diminuição da sua indicação principalmente na endodontia. Na dentística e na odontologia estética foi descartado pela sua oleosidade, que incrustado nos túbulos dentinários, interfere na adesividade de resinas fotopolimerizáveis e de porcelanas.

Estudos toxicológicos demonstraram que o EG é um fármaco com um potente efeito mucilogênico e descamatório da mucosa gástrica em camundongos e ratos. Esse efeito foi também observado na mucosa dos animais que receberam altas doses de EG. Doses crescentes administradas pelas vias oral e intravenosa, permitiram a determinação da dose letal (SOBER *et al.*, 1950). Os animais apresentaram efeitos adversos especialmente no pulmão, (enfisema pulmonar e distensão bronquiolar) associados a vasodilatação intensa. Foram descritos alguns efeitos sistêmicos como inflamações subcutâneas na mucosa gástricas, entorpecimento e perda de postura quando aspirado (DALLMEIER & CARLINI, 1981; AZUMA *et al.*, 1986; GHELARDINI *et al.*, 2001).

Apesar de sua toxicidez, o EG e seus derivados oxidativos, vem sendo amplamente estudados principalmente nos países orientais e diversas indicações terapêuticas são a eles atribuídas. Atualmente, os interesses farmacológicos pelo EG e seus derivados são decorrentes da ação depressora sobre o SNC, ação anticonvulsivante, hipotérmica e miorrelaxante (DALLMEIER & CARLINI, 1981; AZUMA *et al.*, 1986; COSTA *et al.*, 1994; MONTE *et al.*, 2000; GHELARDINI *et al.*, 2001).

O EG apresenta propriedades anti-agregante plaquetário (RASHEED *et al.*, 1984), anestésico local (STICHT & SMITH, 1971), bloqueador de canais de cálcio (SENSCH *et al.*, 1993), espasmolítico (JURCIC & WAGNER, 1976; BRODIN & ROED, 1984), vasodilatador periférico e responsável pelo aumento da atividade das glândulas salivares, sugerindo efeitos parassimpatomiméticos (CARLINI *et al.*, 1981).

O armazenamento do Eugenol por períodos prolongados, associados à exposição à luz, pode levar ao aparecimento de produtos oxidativos. A maioria dos derivados apresentam atividade farmacológica, o metileugenol, isoeugenol e metiliseugenol são alguns destes, que revelaram efeitos depressores sobre o SNC (MELLO *et al.*, 1973).

O metileugenol é ainda analgésico, miolorrelaxante e anestésico geral, com a vantagem de não produzir secreção brônquica como os barbitúricos. Um dímero do EG, o desidroeugenol, quando metilado forma uma substância tetrametoxilada denominada di-*O*-metil-desidroeugenol, que demonstrou também efeito depressor do SNC, analgésico, relaxante muscular e anti-convulsivante (BRODIN & ROED, 1984; COSTA *et al.*, 1994).

Foi descrito para o EG efeito relaxante muscular, em preparações de músculo liso de traquéia e íleo de cobaia (REITER & BRANT, 1985; LIMA *et al.*, 2000; MONTE *et al.*, 2000), efeito ionotrópico negativo no coração de cobaias (SENSCH *et al.*, 1993; OHKUBO & KITAMURA, 1997).

Tanto o EG como o isoeugenol, demonstraram atividade anti-PAF e inibidor da síntese de prostaglandinas, efeito equiparado com o da Indometacina (OKADA *et al.*, 2000). Foi descrito efeito relaxante nas contrações no estômago induzidas pela prostaglandina E₂ (PGE₂) em modelos experimentais de úlcera (JURCIC & WAGNER, 1976; HUME, 1984).

Um dos seus derivados, o metileugenol também apresenta o efeito espasmolítico em músculo liso, e esta inibição parece estar relacionada com uma ação direta no músculo liso e não necessariamente na diminuição da liberação de algum neurotransmissor (VAN DER BROUKE & LEMLI, 1980; OLIVEIRA *et al.*, 1982; McDONALD & HEFFNER, 1991).

Outros efeitos terapêuticos já foram descritos para o EG e especialmente suas ações antioxidante e sequestrador de radicais livres HO• que parecem ser de grande importância para o controle dos processos inflamatórios (OGATA *et al.*, 2000; ATSUMI *et al.*, 2001). O EG inibe a peroxidação lipídica frente as injúrias causadas pelo oxigênio reativo na camada lipídica da membrana por inibir a peroxidação lipídica do ácido linolênico (TODA *et al.*, 1994; VIDHYA & DEVARAJ, 1999; TEISSEDRE & WATERHOUSE, 2000).

OBJETIVOS

Com o intuito de estudar se o Eugenol é capaz de inibir o edema de língua causado pelo suco da planta, e na tentativa de elucidar seu mecanismo de ação na intoxicação por *Dieffenbachia picta*, os objetivos deste trabalho de tese foram:

1. Padronizar a metodologia de indução e quantificação do edema de língua induzido pela *Dieffenbachia picta*;
2. Avaliar os efeitos de fármacos antiinflamatórios não esteróides e esteróides, anti-histamínicos, bloqueadores de canais de cálcio e anti-PAF, na regressão do edema de língua induzido pela *Dieffenbachia picta*;
3. Avaliar os efeitos do Eugenol administrado por diversas vias e em tempos diferentes, na regressão do edema de língua induzido pela *Dieffenbachia picta*;
4. Comparar os efeitos obtidos com o Eugenol com outras substâncias utilizadas no tratamento do quadro clínico decorrente da intoxicação por *Dieffenbachia picta*.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. ANIMAIS

Foram utilizados 900 camundongos suíços da linhagem 44, adultos, saudáveis, pesando 25 gramas. Os animais foram comprados no Biotério Central do Instituto de Microbiologia Professor Paulo Góes/UFRJ e mantidos em nosso próprio biotério. Receberam alimentação e água à vontade, com ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Todos os experimentos foram realizados em ambiente silencioso e em temperatura constante de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Em torno de 12 horas antes dos experimentos, a comida era retirada com a finalidade de se evitar interferências do alimento na absorção dos fármacos administrados por via oral. No dia do experimento, os animais eram pesados e separados em grupos com pesos o mais próximos possível.

Todos as técnicas e procedimentos realizados seguiram os padrões internacionais de bioética na utilização de pequenos animais em experimentação científica laboratorial (ZIMERMANN, 1983).

2. FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS

Adrenalina, Cloridrato de Prometazina, Dexametasona, WEB2170, Verapamil, Fenidona, Dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos na MERK. Os reagentes não citados foram adquiridos de Indústrias Farmacêuticas locais com o mais alto grau de pureza (P.A.). O Eugenol foi adquirido da SSWhite. O PBS foi obtido de acordo com a seguinte formulação:

PBS (“phosphate buffer saline”):	
KCl	0,2g
KH ₂ PO ₄	0,2g
NaCl	8,0g
Na ₂ HPO ₄	2,9g
Água do NanoPure q.s.p.	1000ml

O pH da solução foi ajustado para 7,0. O PBS foi separado em alíquotas, esterelizado em autoclave e armazenado em tubos estéreis de 5ml e em temperatura ambiente.

3. MATERIAL VEGETAL

A identificação botânica dos arbustos de *Dieffenbachia picta* Schott. plantados no jardim de acesso do estacionamento do Departamento de Farmacologia/UFRJ foi realizada pelo Professor Dr. Ricardo Lainetti, Faculdade de Farmácia - Laboratório de Farmacobotânica/UFRJ.

4. PREPARO DO SUCO DE *Dieffenbachia picta*

No dia do experimento, 10 cm do caule de *D. picta* era coletado, descascado, cortado em pedaços de 4 cm e prensado. O suco resultante, de aspecto leitoso e coloração esbranquiçada, era filtrado em gaze estéril e utilizado nos experimentos enquanto que o bagaço remanescente era descartado.

5. ENSAIOS TOXICOLÓGICOS COM *Dieffenbachia picta*

Para avaliarmos o grau de toxidez do suco de *D. picta*, testamos o mesmo pelas vias tópica, oral e intrapulmonar, utilizando diferentes volumes (10; 30; 50; 100µl).

5.1 VIA TÓPICA

O suco de *D. picta*, foi administrado, com o auxílio de uma pipeta automática, diretamente sobre a língua do animal no volume de 10, 30, 50 e 100 µl. Durante a aplicação do suco evitou-se a deglutição e aspiração do material.

5.2 VIA ORAL

O suco de *D. picta* foi administrado por via oral com o auxílio de uma cânula apropriada acoplada a uma seringa. O volume de administração foi de 10, 30, 50 e 100 µl.

5.3 VIA INTRAPULMONAR

O suco foi administrado com auxílio de cânula adaptada, diretamente no pulmão dos animais, no volume de 100µl. Antes do procedimento os animais foram anestesiados com éter etílico.

6. CARACTERIZAÇÃO DO EDEMA DE LÍNGUA

Após aplicação do suco de *D. picta*, no volume de 100 μ l, diretamente sobre a língua de 30 animais, realizou-se a medição do edema de língua. O critério de avaliação do grau do edema lingual observado nos animais foi constituído de duas medidas, a projeção frontal (PF) e a dilatação méso-distal (D). As medidas em milímetros (mm) foram obtidas com o auxílio de paquímetro, seguindo os seguintes parâmetros:

- Para a projeção frontal os parâmetros foram a face incisal dos incisivos centrais inferiores e a porção mais anterior da língua do animal;
- Para a dilatação méso-distal os limites foram as bordas laterais, esquerda e direita, que delimitam o dorso da língua dos animais.

Tanto a projeção frontal como a dilatação méso-distal, foram medidas nos tempos de: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após a aplicação do suco.

O edema dos lábios, prurido intenso, rubor, ulcerações na mucosa jugal e língua, bem como, sangramento, necrose tecidual e dificuldade respiratória também foram validados.

Em todos os ensaios, os animais foram avaliados 24 horas após a indução do edema de língua, quanto à perda de peso, irritabilidade ou dificuldade de locomoção.

7. EUGENOL

As amostras de Eugenol foram compradas nos anos de 1999 (lote102) e 2001 (lote 923) e mantidos em ambiente seco, em baixas temperaturas (10° C) e fora do alcance da luz.

A análise em HPLC do Eugenol foi gentilmente realizada pelo Professor Hélio de Mattos Alves, Faculdade de Farmácia/UFRJ, com a finalidade de comprovarmos que o Eugenol utilizado não apresentava nenhum produto de sua oxidação que pudesse interferir nos resultados. Cada amostra de Eugenol adquirida e utilizada nos ensaios tinha no mínimo 98% de pureza.

8. CÁLCULO DE DOSE-LETAL DE EUGENOL (DL₅₀)

O EG foi diluído em DMSO, imediatamente antes do ensaio, originando soluções a 10%, 15% e 20%. A partir da solução a 10% foram feitas diluições em PBS. O cálculo da DL₅₀ aproximada foi feito após a administração, por diversas vias, de 100µl de cada uma das concentrações de EG preparadas. Após a administração, todos os animais permaneceram em observação pelo período de 48 horas, onde observamos perda de peso, pêlo, perda de postura, dificuldade respiratória, convulsões e morte.

As concentrações testadas foram diferentes para cada via utilizada. Na via oral as concentrações foram de 1%; 3%; 5%; 8%; 10%; 15% e 20%, na via intraperitoneal de 0,1%; 0,3%; 0,5%; 1%; 4% e 8% e na via intravenosa de 0,1%; 0,3%; 0,5%; 1%; 4% e 8%. Independente da via de administração, foram utilizados 12 animais para cada concentração testada.

Nos grupos controle foram testados o mesmo volume acima descrito, para cada uma das diferentes vias e para cada um dos veículos utilizados, (DMSO e PBS). Foram utilizados 60 animais escolhidos ao acaso, divididos em 2 grupos com 30 animais para cada veículo. Cada grupo foi subdividido em 3 grupos de 10 animais para cada via de administração testada (oral, intraperitoneal e intravenosa). O edema de língua foi mensurado de acordo com o protocolo descrito anteriormente.

9. PRÉ-TRATAMENTO COM EUGENOL

Os 40 animais escolhidos ao acaso, foram divididos em 4 grupos de 10 animais cada e receberam EG nas concentrações de 0,1%; 0,3%; 1% e 3%, por via oral no volume final de 100 µl. No pré-tratamento, o EG foi administrado 24, 12, 6 e 1 hora antes da aplicação tópica de 100 µl do suco de *D. picta*. O edema de língua foi medido seguindo o protocolo descrito anteriormente.

10. PÓS-TRATAMENTO

10.1 ANTIINFLAMATÓRIOS:

Para avaliar a ação dos diferentes antiinflamatórios, os 30 animais foram divididos ao acaso em 3 grupos com 10 animais cada. O primeiro grupo foi tratado com Dexametasona (10mg/kg); o segundo grupo com Indometacina (10mg/kg) e o terceiro grupo com Fenidona (100mg/kg). Em todos os grupos os antiinflamatórios foram injetados por via intraperitoneal, 5 minutos após a aplicação tópica de 100 µl do suco de *D. picta*.

10.2 ANTI-HISTAMÍNICO, BLOQUEADOR DE CANAIS DE CÁLCIO E ANTI-PAF:

Da mesma forma descrito anteriormente, os 30 animais foram divididos ao acaso em 3 grupos de 10 animais cada. O primeiro grupo foi tratado com anti-PAF, WEB 2170 (10mg/kg); o segundo grupo foi tratado com bloqueador de canais de cálcio, Verapamil (50mg/kg) e o terceiro grupo com anti-histamínico, Cloridrato de Prometazina (10mg/kg). Em todos os grupos os fármacos foram injetados por via intraperitoneal, 30 minutos após a aplicação tópica de 100 µl do suco de *D. picta*.

10.3 EUGENOL

Após a caracterização do edema de língua induzido por 100µl do suco de *D. picta*, os 210 animais foram divididos ao acaso em 2 grupos. No primeiro grupo foram utilizados 120 animais, subdivididos em 12 grupos de 10 animais para cada concentração utilizada por via intraperitoneal (IP) e para cada intervalo de tempo do tratamento. As concentrações utilizadas por via IP foram de: 0,1; 0,3; 0,5 e 1%. No segundo grupo foram utilizados 90 animais subdivididos em 9 grupos de 10 animais para cada concentração utilizada por via intravenosa (IV) e para cada intervalo de tempo do tratamento. As concentrações utilizadas por via IV foram de: 0,1; 0,3 e 0,5%. Os intervalos de tempo do tratamento foram os mesmos para cada via: 15, 30 e 60 minutos, após a aplicação tópica de 100 µl do suco de *D. picta*. O edema de língua foi quantificado como descrito anteriormente.

10.4. ASSOCIAÇÃO DE ADRENALINA/ DEXAMETASONA/ CLORIDRATO DE PROMETAZINA:

Para avaliarmos os efeitos dos medicamentos utilizados na prática médica emergencial, no tratamento agudo da intoxicação pela planta, tratamos os animais com adrenalina, Cloridrato de Prometazina e corticóide, analisando a recuperação do edema de língua nestes animais.

Os 50 animais foram divididos ao acaso em 5 grupos de 10 animais cada. O primeiro, o segundo e o terceiro grupo receberam adrenalina em três diferentes doses: (10; 15 e 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$), Cloridrato de Prometazina (0,3 mg/kg), por via intravenosa (IV) e Dexametasona (10 mg/kg), por via intraperitoneal (IP). O intervalo de tempo do tratamento para os 3 primeiros grupos foi o mesmo, 5 minutos após a aplicação tópica do suco. O quarto e o quinto grupo receberam adrenalina (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$), Cloridrato de Prometazina (0,3 mg/kg), por via intravenosa (IV) e Dexametasona (10 mg/kg), por via intraperitoneal (IP), 15 e 30 minutos após a aplicação do suco. O edema de língua foi quantificado como descrito anteriormente.

11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os grupos experimentais foram compostos no mínimo de 10 animais. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da projeção frontal (PF) ou da dilatação méso-distal (D), em milímetros.

Os resultados dos gráficos foram expressos como índice de edema de língua (IE), calculado de acordo com a fórmula: $IE = PF \times D$

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Sigma-Stat (1.0 *Jandel Corporation*). Os resultados foram analisados com os testes análise de variância (ANOVA) e complementados pela análise não paramétrica (DUNNETT'S).

Foram considerados significativos os resultados com intervalo de confiança de 95%, onde $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. GRAU DE PUREZA DO EUGENOL

Os resultados obtidos a partir das diluições do Eugenol somente poderiam ser validados se tivéssemos certeza do seu grau de pureza, estando livre dos produtos de sua oxidação. Para que pudéssemos comprovar isso, foram feitas análises em HPLC (High Performance Liquid Chromatography) para ambas as amostras, adquiridas em diferentes datas. O cromatograma abaixo demonstra resultado obtido no mês de julho de 2002, da amostra de Eugenol comprada em 1999. A pequeno sinal registrada no tempo de 3,5 minutos é considerada irrelevante e provavelmente refere-se a reação do Eugenol com substâncias presentes na tampa plástica do frasco. O cromatograma mostra seu grau de pureza desde que pode-se observar apenas um sinal, com absorbância entre 1,2 e 1,4 no tempo de 14 minutos, o que demonstra que, mesmo após três anos de armazenamento e uso constante cerca de 99,9% do material está puro, não tendo sido observado metabólitos oxidativos.

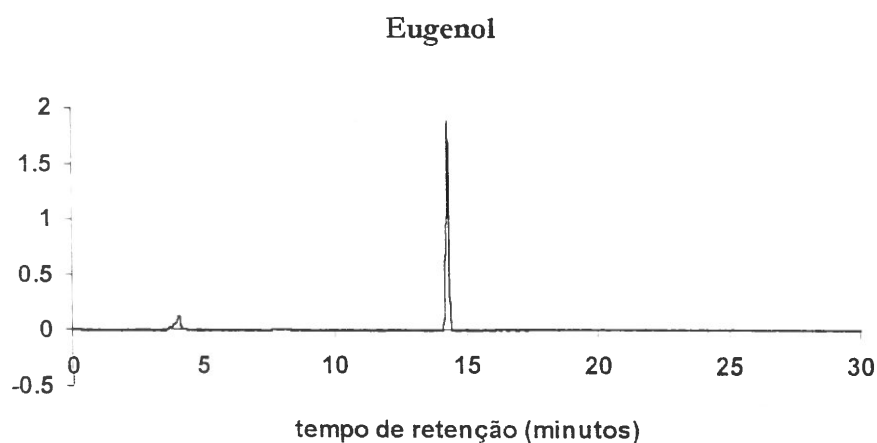


Gráfico 1- HPLC de amostra de Eugenol comprada em 1999.

2. DOSE LETAL 50% DO EUGENOL

A fim de avaliarmos o grau de toxidez do Eugenol nos animais, iniciamos os ensaios para o cálculo da dose letal da substância quando administrada por três vias diferentes a oral, a intraperitoneal e a intravenosa.

Nos animais foram observados grau de sedação e depressão do sistema nervoso central, arqueamento dos membros posteriores, perda da postura, depressão respiratória, resposta a estímulos visuais e ao toque, tempo de recuperação e morte. A autópsia e dissecação dos órgãos do aparelho gastrointestinal foi efetuada com o intuito de se observar possíveis danos teciduais.

2.1. VIA ORAL

A tabela 3 mostra os resultados obtidos com a administração do Eugenol por via oral e em diferentes concentrações. Com a maior concentração (20%) o primeiro efeito observado em todos os animais foi o arqueamento dos membros posteriores após 5 minutos, seguida de completa sedação após 15 minutos. A ataxia foi observada em 70% dos animais. A intensa depressão do SNC e o coma observado nos animais parecem ter sido responsáveis pelos 95% dos animais que morreram após 180 minutos. Durante o coma, os animais apresentaram respiração abdominal irregular, variando de lentas e breves para rápidas e profundas excursões torácicas. As extremidades ficaram cianóticas e frias após 10 minutos. A parada respiratória antecedeu a parada cardíaca nos animais que morreram.

Na concentração de 15% os mesmos efeitos foram observados, entretanto em menor intensidade. O pico de toxidez ocorreu entre os 20 e 45 minutos após a administração. A recuperação da postura foi observada após 60 minutos. Entretanto, os animais mantinham-se pouco sedados (++) . Na concentração de 10% os animais

apresentaram sedação moderada, arqueamento dos membros posteriores entre 5 e 25 minutos, após a administração do Eugenol. No entanto após 30 minutos apresentavam-se completamente recuperados. Na concentração de 8%, a ataxia e a sedação moderada ocorreram entre 5 e 15 minutos da administração, sendo que no tempo de 90 minutos, todos os animais estavam completamente recuperados. As concentrações abaixo de 8% foram consideradas seguras, quando administradas por via oral, e foram as concentrações utilizadas nos experimentos posteriores (Tabela 3).

Tabela 3 - Efeitos de diferentes concentrações de Eugenol quando administrados por via oral. Foram utilizados 12 animais para cada concentração de Eugenol testada.

		Tempo (minutos)										
		Eugenol	0	5	10	15	20	25	30	45	60	90
Sedação	20 %	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++
	15 %	-	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
	10 %	-	++	++	++	++	++	+	+	+	+	-
	8 %	-	++	++	++	+	+	+	+	+	-	-
	5 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Perda de postura	20 %	-	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
	15 %	-	s	s	s	s	s	s	s	R	R	R
	10 %	-	s	s	s	s	R	R	R	R	R	R
	8 %	-	s	s	s	s	s	R	R	R	R	R
	5 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- ++++ muito sedado, ausência de reflexos palpebrais, ataxia, dificuldade respiratória;
- +++ sedado, ausência de reflexos palpebrais, ataxia;
- ++ pouco sedado, o animal apresenta arqueamento dos membros posteriores;
- + levemente sedado, não apresenta dificuldades de locomoção;
- R animal recuperado;
- s perda de postura presente;
- animal normal;

Algumas características comuns foram observadas, independente das concentrações de EG administrado, variando apenas quanto à intensidade do efeito. Entre elas podemos citar o arqueamento dos membros posteriores, ataxia, dificuldade respiratória, bem como agravamento desses sintomas clínicos quando o EG foi aspirado pelos animais. Neste caso, um leve sangramento nasal pode ser observado. Todos os animais, exceto os que constituíram o grupo 20%, ainda que sedados respondiam a estímulos visuais e ao toque. Durante 180 minutos do ensaio, os animais apresentavam os olhos com a coloração vermelha escuro.

A autópsia detectou em todos os animais odor de EG no estômago e no duodeno. No grupo dos animais que receberam as concentrações de 15% e 20%, o fígado apresentava-se mais escuro do que quando comparado ao órgão dos animais controle. O interior do estômago continha muco, sangue coagulado e áreas ulceradas. Coágulos sanguíneos eram constantemente vistos no lúmen e intestino. Uma intensa dilatação causada por gases, também foi observada no estômago e no intestino dos animais. Os pulmões e o coração estavam, em geral, mais avermelhados do que o normal com aparente dilatação das veias.

2.2. VIA INTRAPERITONEAL

Para determinarmos as concentrações clinicamente seguras do EG quando administrado por via intraperitoneal, testamos as concentrações de 0,1%, 0,3%, 0,5%, 1%, 4% e 8%. Os parâmetros de avaliação dos animais foram idênticos aos descritos para a via oral.

Com a maior concentração (8%) todos os animais chegaram ao óbito em cinco minutos. A parada respiratória antecedeu a parada cardíaca. Os animais do grupo nos quais administrou-se EG a 4% ficaram intensamente sedados (+++), com completa perda de postura precedida de arqueamento dos membros posteriores após 10 minutos da administração. Entretanto, os animais retomaram a postura permanecendo somente sedados (+++), não apresentando reflexos palpebrais. Também observamos depressão respiratória. A completa recuperação foi observada após 60 minutos. Nos grupos com concentrações menores, observou-se apenas menor grau de sedação (Tabela 4).

Tabela 4 - Efeitos do Eugenol quando administrados por Via Intraperitoneal. Foram utilizados 12 animais para cada concentração de Eugenol testada.

Eugenol		Tempo (minutos)										
		0	5	10	15	20	25	30	45	60	90	120
Sedação	8 %	-	∅									
	4 %	-	++	++++	++++	++++	++++	+++	+	R	R	R
	1 %	-	++	++++	++++	++++	++++	+	+	+	+	R
	0,5 %	-	++	++	++	+	+	+	+	+	R	R
	0,3 %	-	-	-	+	+	+	R	R	R	R	R
	0,1 %	-	-	-	+	+	+	R	R	R	R	R
Perda de postura	8 %	-	∅									
	4 %	-	s	s	s	s	s	s	s	R	R	R
	1 %	-	s	s	s	s	s	R	R	R	R	R
	0,5 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,3 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,1 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- ∅ convulsão tônico-clônica seguida de morte do animal;
 ++++ muito sedado, ausência de reflexos palpebrais, ataxia, dificuldade respiratória;
 +++ sedado, ausência de reflexos palpebrais, ataxia;
 ++ pouco sedado, o animal apresenta arqueamento dos membros posteriores;
 + levemente sedado, não apresenta dificuldades de locomoção;
 R animal recuperado;
 s perda de postura presente;
 - animal normal;

Poucas mudanças significativas puderam ser observadas durante a autópsia. Em todos os animais odor de EG estava presente no estômago e no duodeno. No grupo dos animais que receberam a concentração de 8%, o interior do estômago continha grande quantidade de muco, mas pouca quantidade de sangue coagulado ou áreas ulceradas. Alguns coágulos sanguíneos foram vistos no lúmen e no intestino. A dilatação causada por gases não foi marcante quando o fármaco foi administrado por via intraperitoneal. Os pulmões e o coração estavam em geral, mais avermelhados do que quando comparados aos animais do grupo controle.

Algumas características comuns como a ausência de óbito e a recuperação completa dos animais foi observada nos animais após 45 minutos decorridos da administração. Sendo assim, o EG nas concentrações de 1%, 0,5%, 0,3% e 0,1% asseguraram seu uso por via intraperitoneal nos experimentos posteriores.

2.3. VIA INTRAVENOSA

Para determinarmos as concentrações seguras do EG quando administrado por via intravenosa, testamos as concentrações de 8%, 4%, 1%, 0,5%, 0,3% e 0,1%. A administração do fármaco foi no plexo orbital precedida por anestesia com éter etílico. Os parâmetros de avaliação dos animais foram idênticos aos descritos anteriormente.

Nos animais que receberam EG a 8% e 4% o óbito foi imediato. A diferença marcante observada nesses animais foi a parada cardíaca preceder a parada respiratória.

As concentrações de 1%, 0,3% e 0,1% foram seguras quando administradas pela via intravenosa. A concentração de 1% mostrou algum efeito nos animais, causando perda de postura e intensa sedação. Entretanto, após 45 minutos da injeção, os animais já se mostravam totalmente recuperados (Tabela 5).

Tabela 5 - Efeitos do Eugenol quando administrados por Via Intravenosa Foram utilizados 12 animais para cada concentração de Eugenol testada.

Eugenol		Tempo (minutos)											
		0	5	10	15	20	25	30	45	60	90	120	
Sedação	8 %	Ø											
	4 %	Ø											
	1 %	-	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+	-	-	-	
	0,5 %	-	++	++	++	+	+	+	+	+	-	-	
	0,3 %	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	
	0,1 %	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	
Perda de postura	8 %	Ø											
	4 %	Ø											
	1 %	-	s	s	s	s	s	s	R	R	R	R	
	0,5 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	0,3 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	0,1 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

- Ø convulsão tônico-clônica seguida de morte do animal;
- ++++ muito sedado, ausência de reflexos palpebrais, ataxia, dificuldade respiratória;
- +++ sedado, ausência de reflexos palpebrais, ataxia;
- ++ pouco sedado, o animal apresenta arqueamento dos membros posteriores;
- + levemente sedado, não apresenta dificuldades de locomoção;
- R animal recuperado;
- s perda de postura presente;
- animal normal;

Com base nos resultados mostrados nas tabelas 3, 4 e 5 foi possível selecionar as concentrações para cada via que poderiam ser usadas sem causar a morte dos animais. Desta forma, para a via oral a maior concentração segura foi a de 15%. Para a via intraperitoneal de 1% e para a via intravenosa de 0,5%.

3. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA DE DIFERENTES VOLUMES DO SUCO DE *Dieffenbachia picta* SCHOTT

Com o objetivo de padronizar melhores condições para a indução e para a quantificação do edema de língua, administramos nos animais, topicamente na língua, volumes do suco de *D. picta* que variaram de 10 a 100 μ l. Após a aplicação dos diferentes volumes do suco da planta, medimos o edema de língua em intervalos de 5, 15 e 30 minutos até o total de 120 minutos. Os parâmetros de medição do edema foram: a projeção frontal (PF) e a dilatação méso-distal (D). A variação nos volumes administrados teve o objetivo de identificarmos o maior efeito edematogênico sem entretanto, causar a morte do animal.

Após a administração do suco de *D. picta* observamos que, independente do volume aplicado, os valores de PF e D eram zero nos primeiros dez minutos. Somente após dez minutos foi possível quantificarmos valores para PF e D. Vale ressaltar que os valores de D sempre se mostraram maiores do que os de PF. As curvas de 10 μ l, 30 μ l e 50 μ l se mostraram muito parecidas, com pequenas variações tanto para os valores de D como para os valores de PF (Gráficos 2A e B).

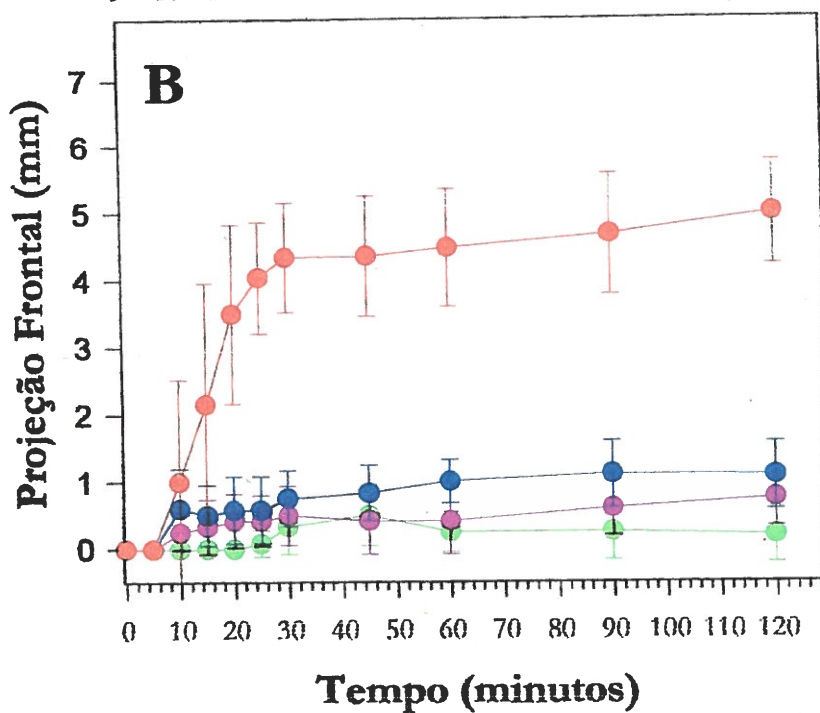
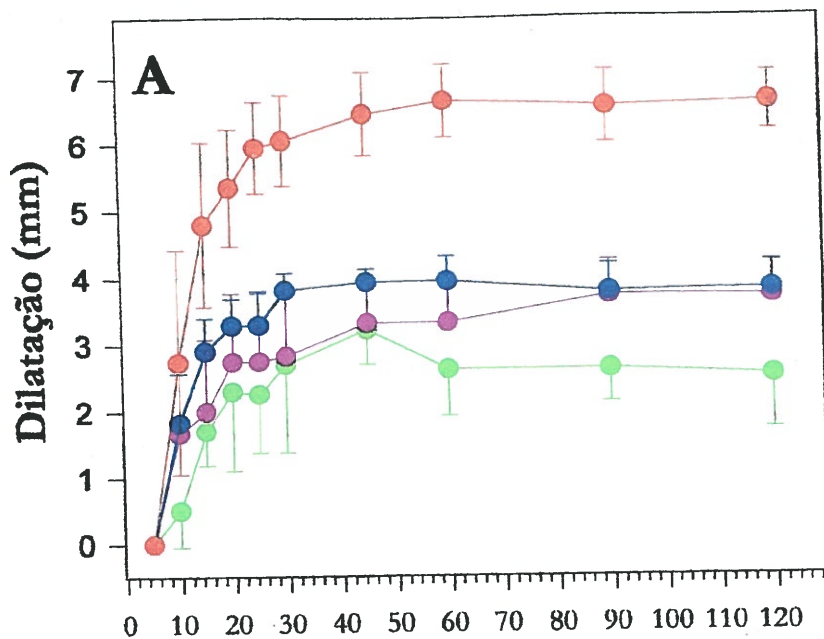


Gráfico 2 A e 2 B - Curvas de Dilatação (em A) e Projeção Frontal (em B). Os 80 animais divididos em quatro grupos compostos por 20 animais cada receberam aplicação tópica de 10 µl (●); 30 µl (●); 50 µl (●) ou 100 µl (●) do suco de *D. picta*. Os dados foram expressos em X (média) ± DP (desvio padrão). O edema de língua foi medido em diferentes intervalos de tempo: 0; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 45; 60; 90; 120 minutos, e representados pelos símbolos cheios após a aplicação de cada volume do suco.

Além da PF e D da língua também pode-se observar no volume de 100µl, edema de lábio, mucosa jugal, ulcerações generalizadas na mucosa que muitas vezes levou ao sangramento e necrose tecidual. Esses efeitos dificultaram ou impediram tanto a alimentação quanto a hidratação dos animais, prejudicando sua recuperação.

A autópsia realizada nos animais mostrou que todos apresentavam pulmão, traquéia e aparelho digestivo normais. Após 24 horas do término do experimento, naqueles animais que sobreviveram, notou-se perda de peso e menor locomoção.

Quando o mesmo volume de suco (100 µl) foi administrado por via intraperitoneal ou intracárdica, os animais chegaram ao óbito em segundos. A administração por via oral, diretamente no estômago dos animais (em volumes de 100 µl, 50 µl, 30 µl e 10 µl) não causou nenhuma injúria. A autópsia não revelou ulceração no trato gastrintestinal, e na manutenção dos animais a perda de peso foi insignificante.

O suco de *D. picta* foi injetado diretamente no pulmão dos animais nos volumes de 100 µl, 50 µl, 30 µl e 10 µl. Observou-se que para os volumes de 100 µl, 50 µl e 30 µl os animais apresentavam um broncoespasmo violento levando-os a morte imediata, antes mesmo do término da aplicação. No volume de 10 µl os animais morreram em média 30 segundos após o término da injeção do suco.

Com base nos resultados obtidos de PF e D pelos diferentes volumes aplicados topicamente na cavidade oral dos animais, escolhemos o volume de 100 µl para usarmos nos ensaios posteriores (Tabela 6). A partir dos valores de PF e D, calculamos um índice que passamos então a denominar como “índice de edema” (IE). A intenção foi facilitar o modo de expressão e de visibilizar os resultados.

O cálculo do IE foi feito pela multiplicação dos valores de PF e D. Apesar de ambos os valores serem expressos em mm e do índice de edema ser uma multiplicação, o valor obtido não reflete área (mm²) e sim um índice (Tabela 7).

Tabela 6 – Valores do edema de língua induzido por 100 µl do suco da *D. picta*.

D = Dilatação e PF =Projeção Frontal.

	Tempo (minutos)										
	0	5	10	15	20	25	30	45	60	90	120
D	0 ± 0	0 ± 0	2,7 ±	4,8 ±	5,4 ±	6,0 ±	6,1 ±	6,5 ±	6,7 ±	6,5 ±	6,6 ±
			1,5	1,2	0,9	0,7	0,7	0,6	0,6	0,5	0,4
PF	0 ± 0	0 ± 0	1,0 ±	2,2 ±	3,5 ±	4,0 ±	4,3 ±	4,4 ±	4,5 ±	4,7 ±	5,0 ±
			1,5	1,8	1,3	0,8	0,8	0,9	0,9	0,9	0,8

Tabela 7 – Valores do índice de edema obtidos após a administração de 100 µl do suco da *D. picta*.

	Tempo (minutos)										
	0	5	10	15	20	25	30	45	60	90	120
IE	0	0	2,7	10,4	18,8	24,2	26,4	28,2	29,8	30,6	33,2

Quando os valores do índice de edema foram plotados em um gráfico, observamos um acentuado aumento nos valores já a partir dos dez minutos iniciais, alcançando um platô 45 minutos após a aplicação do suco (Gráfico 3).

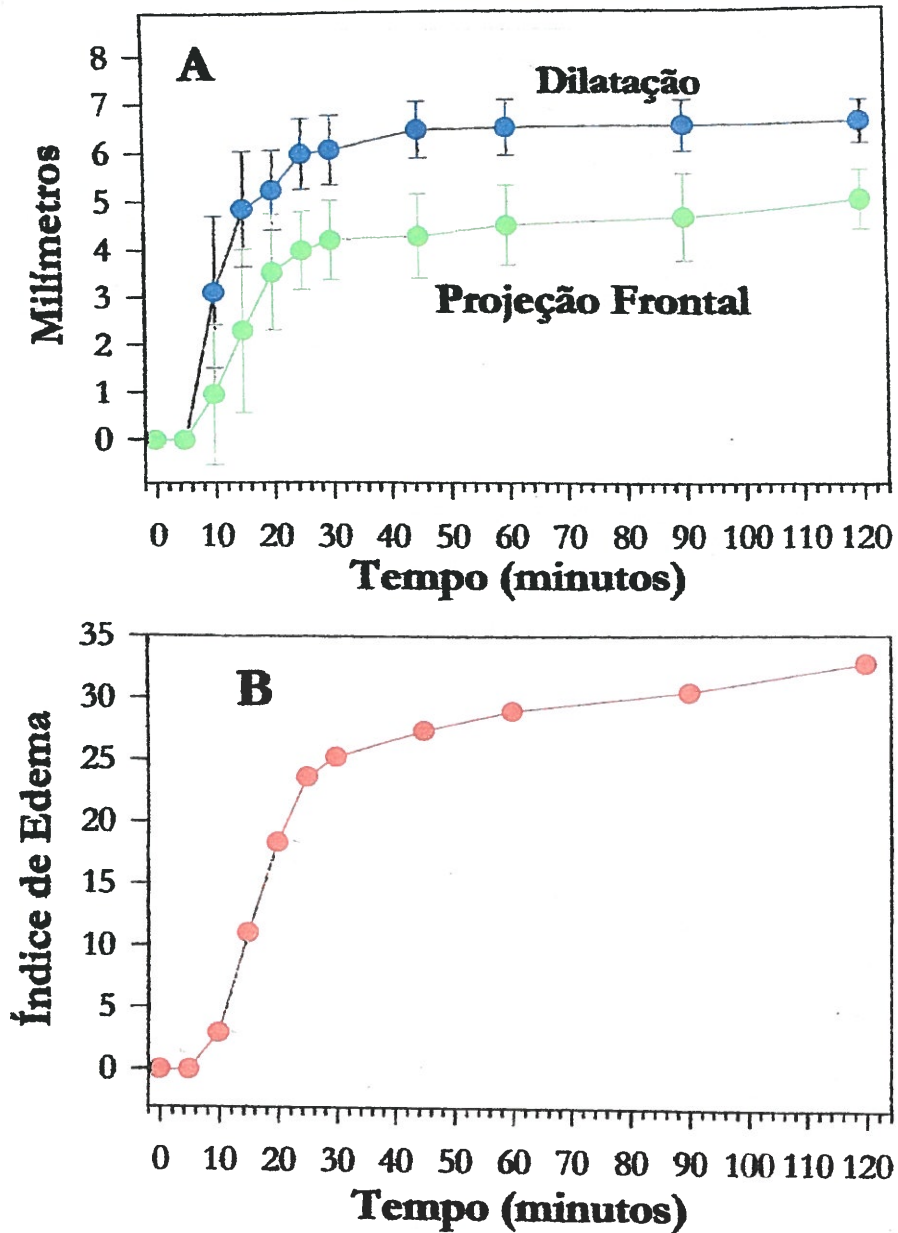


Gráfico 3 - Curvas de Dilatação (●) e Projeção Frontal (●) (em A). Os 30 animais receberam aplicação tópica de 100 μ l do suco de *D. picta*. Os dados foram expressos em X (média) \pm DP (desvio padrão). O Índice de Edema (●) (em B) reproduz para ambos os parâmetros, o edema de língua medido em diferentes intervalos de tempo: 0; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 45; 60; 90; 120 minutos, e representados pelos símbolos cheios após a aplicação de 100 μ l do suco.

4. PRÉ-TRATAMENTO COM EUGENOL

Uma vez padronizado o edema induzido pela *D. picta* passamos a avaliar o efeito do EG administrado prévia ou posteriormente a aplicação do suco.

O primeiro ensaio realizado foi o pré-tratamento dos animais com doses que variaram entre 0,1% e 3% do Eugenol. O EG foi administrado por via oral nas doses de 0,1%; 0,3%; 1% ou 3% em intervalos de tempo de 24, 12, 6 e 1 hora antes da aplicação do suco. Avaliamos em seguida as alterações dos parâmetros de medição do edema, PF e D quantificados como descrito anteriormente.

Como podemos observar na tabela 8 e no gráfico 4, o início da redução do índice de edema foi observado a partir de 25 minutos após a aplicação do suco. Não houve diferença significativa entre cada concentração. Entretanto, quando o resultado foi comparado com o grupo controle a redução do edema foi bastante evidente.

O pré-tratamento com EG preveniu o aparecimento do edema, reduzindo-o e impedindo o edema de glote e a morte dos animais. Outro fato observado foi que apesar da escolha dos animais ter sido aleatória, quando individualmente observados, após cada administração de EG, nos animais de maior peso e que receberam EG a 3% resistiam melhor aos efeitos colaterais.

Quanto a autopsia realizada após as duas horas de experimento, o intestino dos animais apresentava gases e odor característico do EG, no entanto a mucosa gástrica estava livre de ulcerações.

Na tabela 8 a concentração de 0,1% apresentou a maior redução do IE a partir de 15 minutos decorridos da aplicação do suco. O menor IE observado ocorreu no tempo de 20 minutos.

Na concentração de 0,3% o menor índice de edema também foi observado a partir de 20 minutos da aplicação do suco, permanecendo por todo o experimento, 120 minutos, e com índice de edema inferior aos quantificados com EG a 0,1%. Quanto ao EG a 1%, a maior redução ocorreu no tempo de 45 minutos e para 3% no tempo de 90 minutos.

Tabela 8 – Valores de índice de edema dos animais pré-tratados com Eugenol nas concentrações de 0,1%, 0,3%, 1% e 3%.

Dose (%)	Tempo (minutos)										
	0	5	10	15	20	25	30	45	60	90	120
Controle	0	0	2,7	10,4	18,8	24,2	26,4	28,2	29,8	30,6	33,2
0,1	0	0	9,6	9,6	9,6	21,9	21,3	21,6	24,1	22,5	19,8
0,3	0	0,01	9,8	9,8	9,8	14,7	16,2	20,1	18,7	19,5	18,8
1	0	0,25	15,04	15,0	15,0	17,0	20,0	17,1	19,8	20,6	19,5
3	0	0,06	12,9	20,0	20,0	21,0	22,0	17,2	21,0	19,7	19,2

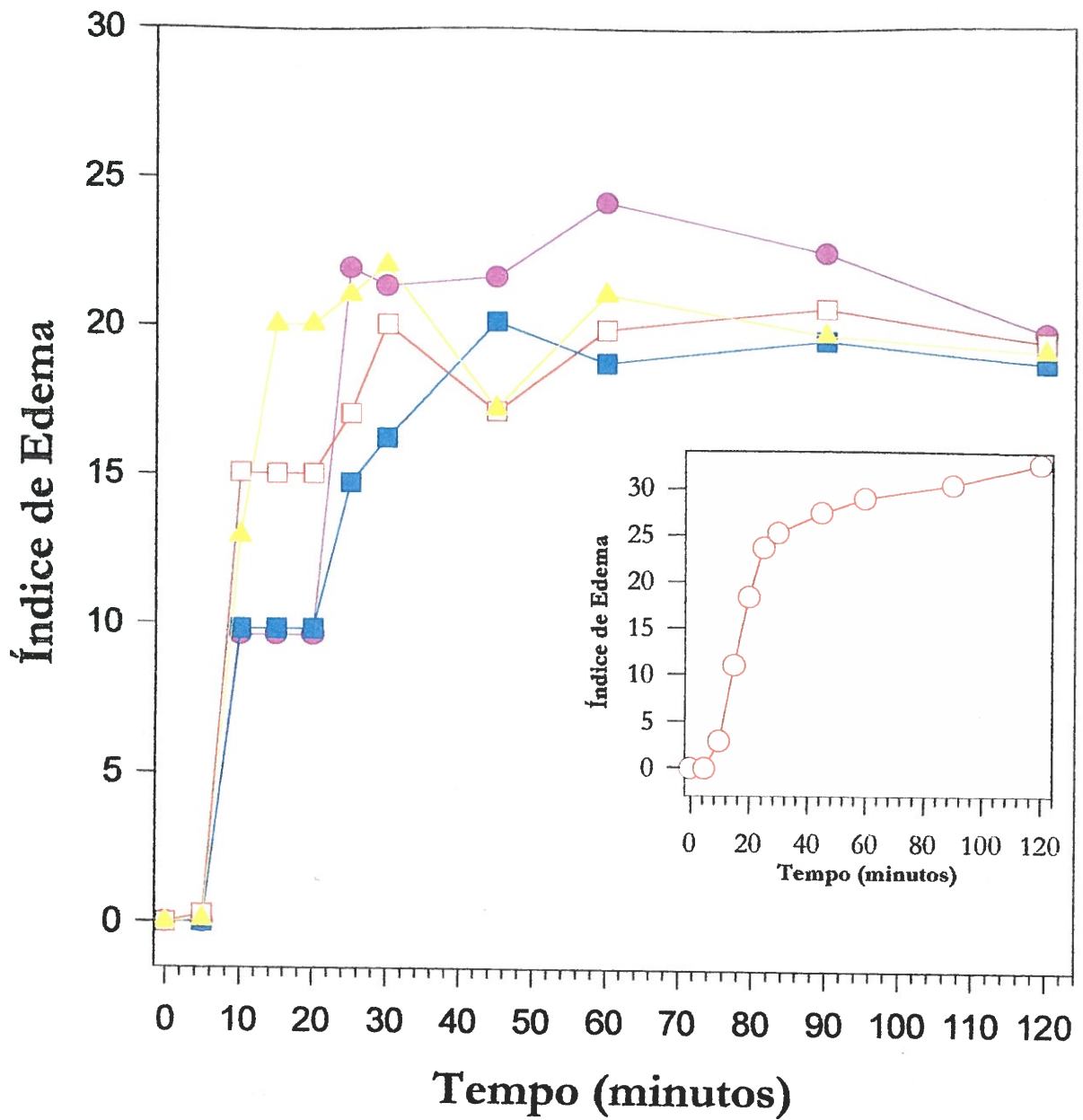


Gráfico 4 - Curva temporal do índice de edema dos animais pré-tratados com Eugenol nas concentrações de 0,1% (●), 0,3% (■), 1% (□) e 3% (▲). No *insert* plotamos o gráfico do índice de edema do grupo controle.

Apesar do EG ter inibido o edema de língua quando administrado previamente, resolvemos simular uma situação de intoxicação seguida de atendimento médico.

5. PÓS-TRATAMENTO COM ANTIINFLAMATÓRIOS

Baseando-se em dados da literatura que argumentam que o edema de língua induzido pela *D. picta* seria mediado por PAF e outros mediadores endógenos liberados durante a resposta inflamatória, resolvemos testar fármacos antiinflamatórios com diferentes mecanismos de ação e comparar seus efeitos com os resultados do tratamento com Eugenol.

Num primeiro ensaio tratamos os animais com corticóide, a dexametasona (10mg/kg), antiinflamatório não esteroide, a indometacina (10 mg/kg) e inibidor duplo de ciclo e lipoxigenase, a fenidona (100 mg/kg). Observamos pelo gráfico 5 que nenhum dos 3 fármacos utilizados foi capaz de inibir completamente o edema de língua causado pela *D. picta*. Quando comparado com o índice de edema do grupo controle, a dexametasona e a indometacina foram capazes de reduzir o edema de língua em 26,17 e 36,24 % respectivamente, 60 minutos após o início do tratamento. Enquanto que a fenidona no mesmo tempo, mostrou efeito maior, reduzindo 50,3% o edema de língua, ou seja, 65 minutos após a aplicação de 100 µl do suco da planta. Quando os animais foram observados no tempo de 24 horas após o término do ensaio, todos os animais estavam mortos, ainda com lesões na cavidade oral, perda de peso e desidratação (Gráfico 5).

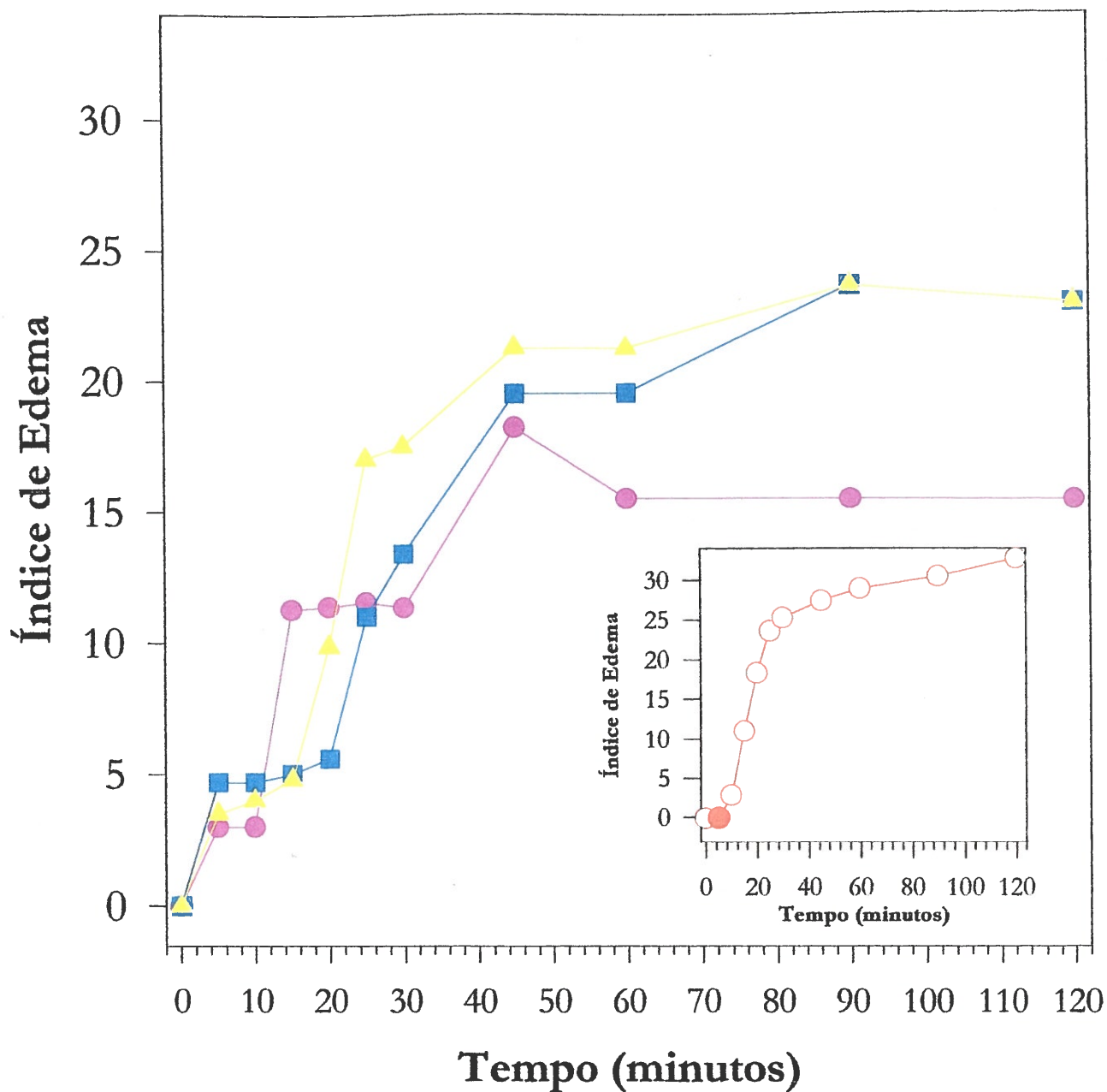


Gráfico 5 - Efeito do pós-tratamento com Dexametasona (10 mg/kg, ▲), Indometacina (10 mg/kg, ■) e Fenidona (100 mg/kg, ●) por via intraperitoneal, 5 minutos após a aplicação de 100 µl do suco de *Dieffenbachia picta*. No *insert* plotamos o gráfico do índice de edema do grupo controle, onde o símbolo cheio representa o início do tratamento.

6. PÓS-TRATAMENTO COM ANTI-HISTAMÍNICO, BLOQUEADOR DE CANAIS DE CÁLCIO E ANTI-PAF

Como o tratamento dos animais com fármacos antiinflamatórios (esteroidais e não esteroidais) não causou uma inibição ou redução significativa no edema de língua causado pela *D.picta* (Gráfico 5), tratamos os animais com outros fármacos, de diferentes mecanismos de ação, com o intuito de esclarecer quais os outros mediadores envolvidos no processo inflamatório. Tratamos os animais com bloqueador de canais de cálcio, o verapamil (50 mg/kg); antagonista de PAF, o WEB 2170 (10 mg/kg) e antagonista de receptor H₁ de histamina, o cloridrato de prometazina (10 mg/kg), 30 minutos após aplicação de 100µl do suco de *D.picta*.

Pelo gráfico 6 podemos observar que o percentual de inibição de cada um desses fármacos sobre o edema de língua, foi maior quando comparado com o efeito dos antiinflamatórios testados. A redução máxima observada para o verapamil ocorreu 25 minutos após sua administração (ou seja com 55 minutos de edema de língua) reduzindo o edema de língua com percentual de inibição 66,4 %. Seu efeito permaneceu por apenas 5 minutos e após este tempo o índice do edema de língua voltou a subir, mantendo o percentual de inibição do índice de edema similar ao obtidos 5 minutos após o início do tratamento, 51 %. Esse percentual de inibição também pode ser vistos para o grupo de animais tratados com o WEB 2170. O WEB 2170 foi capaz de reduzir o edema de língua 5 minutos após sua aplicação (ou seja com 35 minutos de edema de língua), mantendo o índice de edema entre 10 e 12. Essa inibição foi mantida até o final do ensaio. Após 24 horas do início do experimento todos os animais estavam mortos, apresentando ulcerações na cavidade bucal e perda de peso. O cloridrato de prometazina inibiu em 73 % o edema de língua, 40 minutos após sua administração, ou seja, 70 minutos após a aplicação de 100 µl do suco da planta. O pico de inibição máxima (IE=7) foi mantido por 5 minutos após o

início do tratamento e os valores de inibição e redução do edema (IE com valores entre 11 e 13) foram mantidos até o término do experimento.

Durante os 120 minutos observamos que o grupo de animais tratados com cloridrato de prometazina desenvolveu ulcerações menores na cavidade oral. A sedação dos animais, efeito adverso do fármaco, foi responsável por uma menor irritabilidade dos animais, evitando o agravamento do processo edematogênico causado pelo suco. Entretanto a morte dos animais não foi evitada 24 horas após o início do experimento. (Gráfico 6).

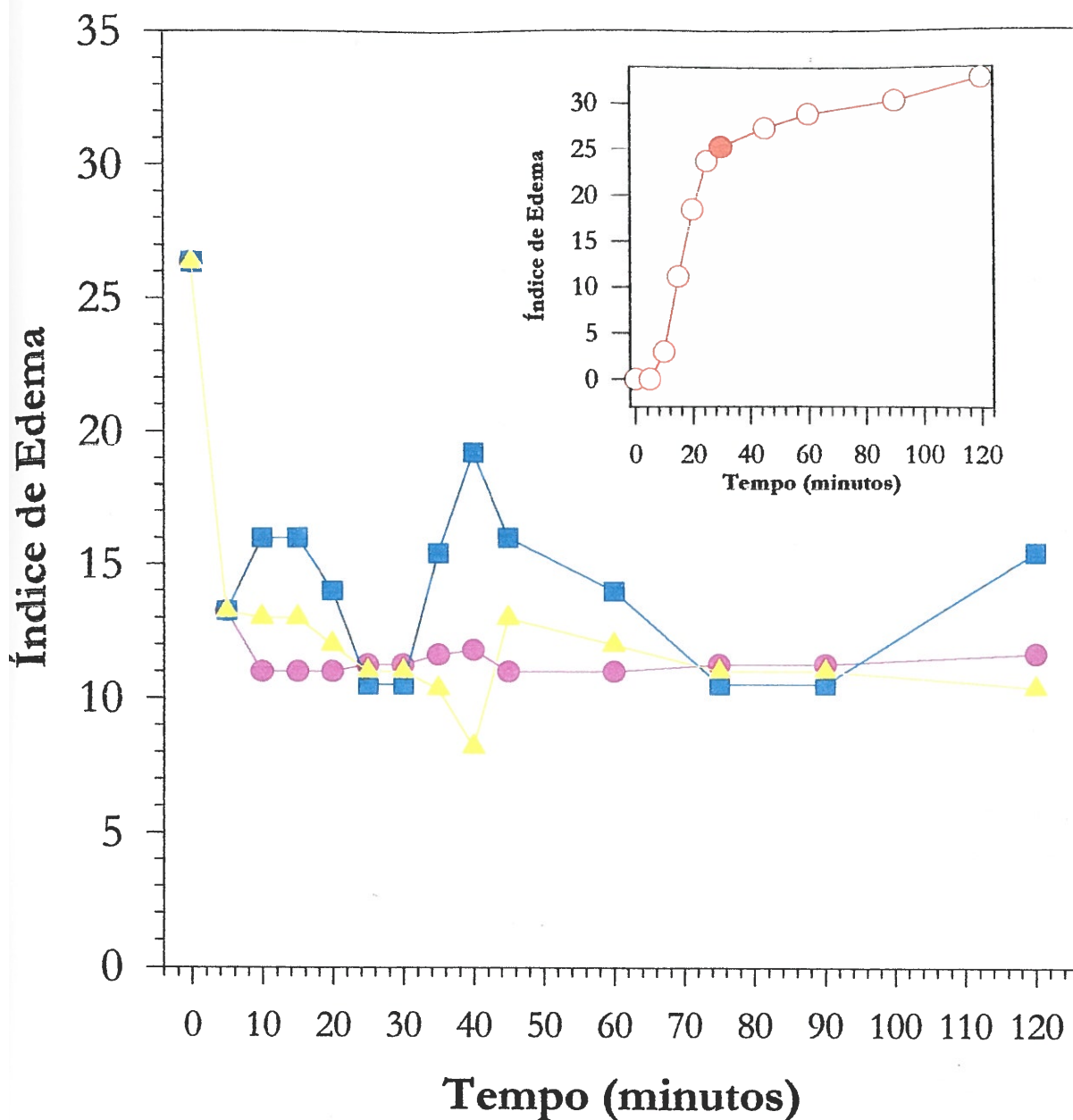


Gráfico 6 - Efeito do pós-tratamento com Cloridrato de Prometazina (10 mg/kg, ▲), Verapamil (50 mg/kg, ■) ou WEB 2170 (10 mg/kg, ●) por via intraperitoneal, 30 minutos após a aplicação de 100 µl do suco de *Dieffenbachia picta*. No insert plotamos o gráfico do índice de edema do grupo controle, onde o símbolo cheio representa o início do tratamento.

7. PÓS-TRATAMENTO COM EUGENOL

O passo seguinte foi avaliarmos o efeito do EG após a aplicação do suco. Tratamos os animais com diferentes concentrações de EG (entre 0,1 e 1 %), tanto por via IP como por via IV. Independente da via de administração, o EG foi administrado nos tempos de 15, 30 e 60 minutos após a aplicação de 100µl do suco de *D. picta*.

Os resultados obtidos no pós-tratamento com EG quando administrado por via intraperitoneal (IP), 15 minutos após a aplicação de 100 µl do suco de *D. picta*, foi melhor do que quando comparados com os resultados obtidos na redução do mesmo no pré-tratamento por via oral.

A redução do edema de língua tanto para PF como para D foi estatisticamente significante quando comparado com os resultados obtidos no grupo controle. Quando as concentrações do EG foram comparadas entre si, não houve diferença que pudesse justificar o melhor efeito com a maior concentração de EG administrada (Gráfico 7). Mesmo assim o edema de língua e a morte dos animais foram evitados.

No tempo de 15 minutos após a aplicação do suco, os camundongos apresentaram média de D = $4,8 \pm 1,2$ e PF = $2,2 \pm 1,8$ com conseqüente IE = 10,4. A redução do edema começa a ser nitidamente observada, 5 minutos após a administração do EG, ou seja, 20 minutos de edema de língua, com redução do índice de edema para valores entre 0 e 2, independente das concentrações utilizadas, 95 % de percentual de inibição do índice de edema de língua.

Pode-se observar que na concentração 0,1% após 90 minutos de edema de língua, um ligeiro aumento no edema de língua, alcançando valores acima de 2. Entretanto, este aumento foi irrelevante para a completa recuperação dos animais.

Nas concentrações maiores (0,5 e 1%) foi possível observar uma redução drástica do índice de edema, mantendo-se entre valores de zero e dois, permanecendo assim até o final do ensaio. Vale ressaltar que 120 minutos após o início do experimento 100 % de percentual de inibição do edema de língua poderia ser visto para essas concentrações. Após 24 horas do início do experimento todos os animais apresentavam-se completamente recuperados.

Ainda pelo gráfico 7 pode-se observar que a redução do edema ocorreu 5 minutos após a administração do EG (ou seja 20 minutos após a aplicação do suco), não havendo diferenças entre cada concentração.

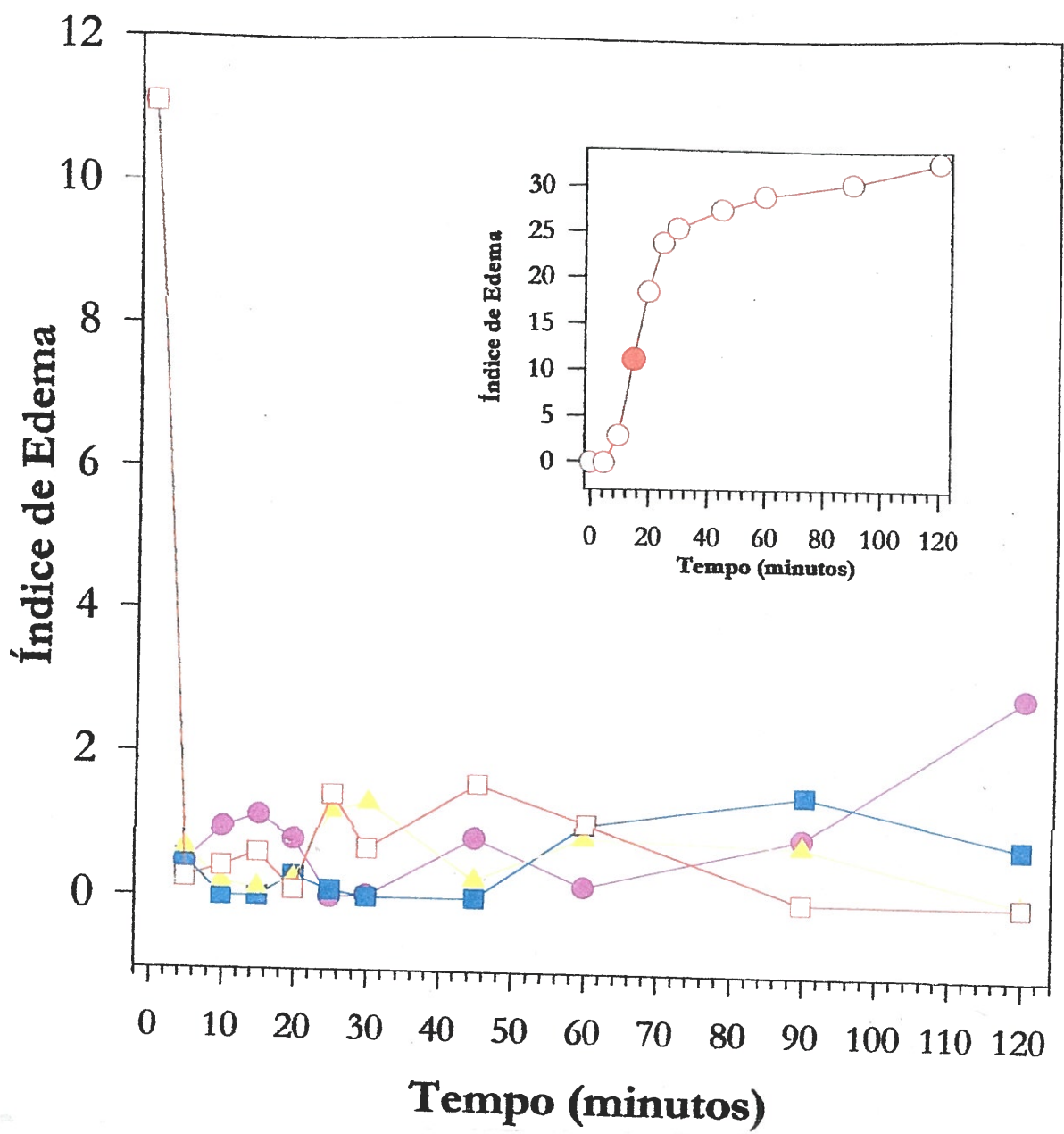


Gráfico 7 – Efeito do pós-tratamento com Eugenol, por via intraperitoneal, nas concentrações de 0,1% (●), 0,3% (■), 0,5% (▲) e 1% (□), 15 minutos após a aplicação de 100 µl do suco de *Dieffenbachia picta*. No insert plotamos o gráfico do índice de edema do grupo controle, onde o símbolo cheio representa o início do tratamento.

Considerando o tempo de 15 minutos um período curto, a inibição máxima poderia não estar sendo decorrente do efeito do EG, mas talvez por não ter havido tempo suficiente para que o edema atingisse valores máximos. Observamos que houve pouca diferença entre as concentrações de EG administradas.

Resolvemos aumentar o intervalo de tempo entre o início do tratamento com o EG e a aplicação do suco para 30 minutos. Os animais apresentam índice de edema 26,4 e após cinco minutos de tratamento com EG foi possível observar uma redução para índice de edema entre 0 e 5. Nas concentrações 0,3 e 0,5 % o percentual de inibição do índice de edema foi de 85 % e para as concentrações de 0,1 e 1 % de 100 %. Todas as concentrações utilizadas foram capazes de inibir maximamente o edema de língua após 120 minutos do início do experimento. Após 24 horas do início do experimento todos os animais apresentavam-se completamente recuperados.

Exceto para a concentração de 0,3%, todas as demais concentrações de EG utilizadas, a redução máxima do índice de edema, 100 %, foi observada. Para a concentração de 0,5% essa inibição foi observada 90 minutos após sua administração, ou seja, 120 minutos após a aplicação do suco da planta. A partir deste tempo, 90 minutos da administração do EG, para a concentração de 0,1% ocorreu um aumento do índice de edema, mantendo-se em valores inferiores a 10, não sendo relevantes para a sobrevivência ou recuperação dos animais.

A inibição completa do índice de edema foi observada nos animais tratados com EG a 0,5 e 1%, 120 minutos após o início do experimento. Após 24 horas do início do experimento todos os animais apresentavam-se completamente recuperados (Gráfico 8).

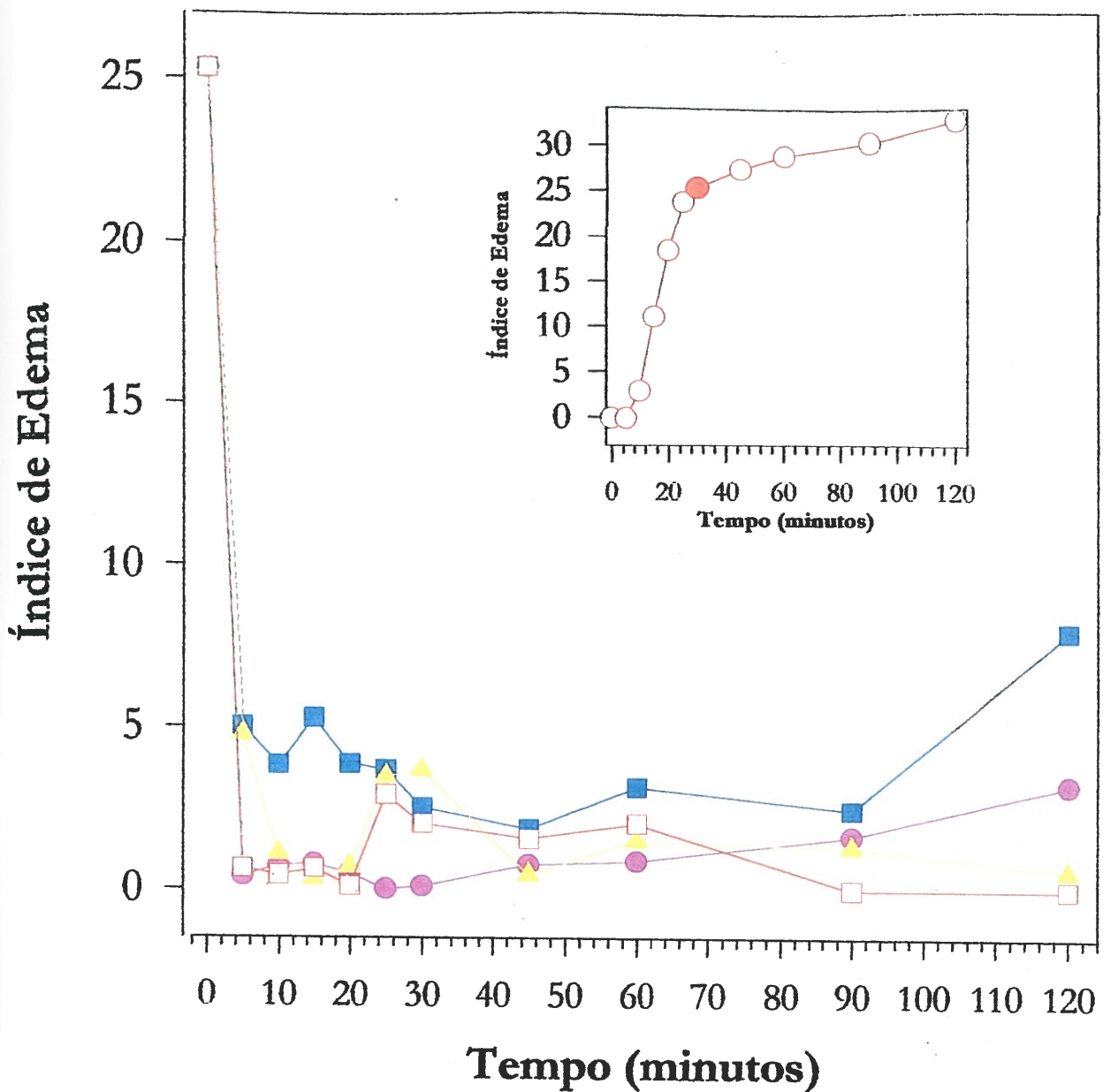


Gráfico 8 – Efeito do pós-tratamento com Eugenol, por via intraperitoneal, nas concentrações de 0,1% (●), 0,3% (■), 0,5% (▲) e 1% (□), 30 minutos após a aplicação de 100 µl do suco de *Dieffenbachia picta*. No *insert* plotamos o gráfico do índice de edema do grupo controle, onde o símbolo cheio representa o início do tratamento.

Como o tratamento dos animais com EG administrado 30 minutos após a aplicação do suco continuava a mostrar elevados níveis de inibição, resolvemos aumentar o intervalo de tempo entre a aplicação do suco e o tratamento com o EG para 1 hora. Nesse tempo, 60 minutos após a aplicação do suco, o edema de língua mostra $PF = 4,5 \pm 0,9$ e $D = 6,7 \pm 0,6$ ou seja, um $IE = 29,8$.

A redução do índice de edema começa a ser nitidamente observada, 5 minutos após a administração do EG, independente das concentrações utilizadas, diminuindo em 66,4% o IE. Os valores de índice de edema variaram de 10 a 13, mantendo-se neste patamar durante 120 minutos para a concentração de 0,1 %. Nas maiores concentrações (0,3; 0,5 e de 1%) foi possível observar um pico de redução máxima do índice de edema, 30 minutos após o início do tratamento, mantendo valores entre 0 e 5. Neste tempo o percentual de inibição foi de aproximadamente 90 %, permanecendo durante a primeira hora do experimento. Após esse período, os valores igualaram-se aos resultados obtidos 5 minutos após o início do tratamento. Vale ressaltar que após os 120 minutos do experimento o índice de edema ainda era considerado muito baixo, mantendo-se entre 10 e 15. Vinte e quatro horas após o início do experimento, todos os animais apresentavam-se completamente recuperados (Gráfico 9).

Vale ressaltar que para as concentrações 0,1% e 0,5%, diferente do que normalmente ocorreria, a redução do edema de língua, principalmente para o parâmetro de avaliação PF, foi menor do que os resultados observados para as concentrações 0,3% e 1%, que praticamente inibiram a protrusão da língua no tempo de 90 minutos.

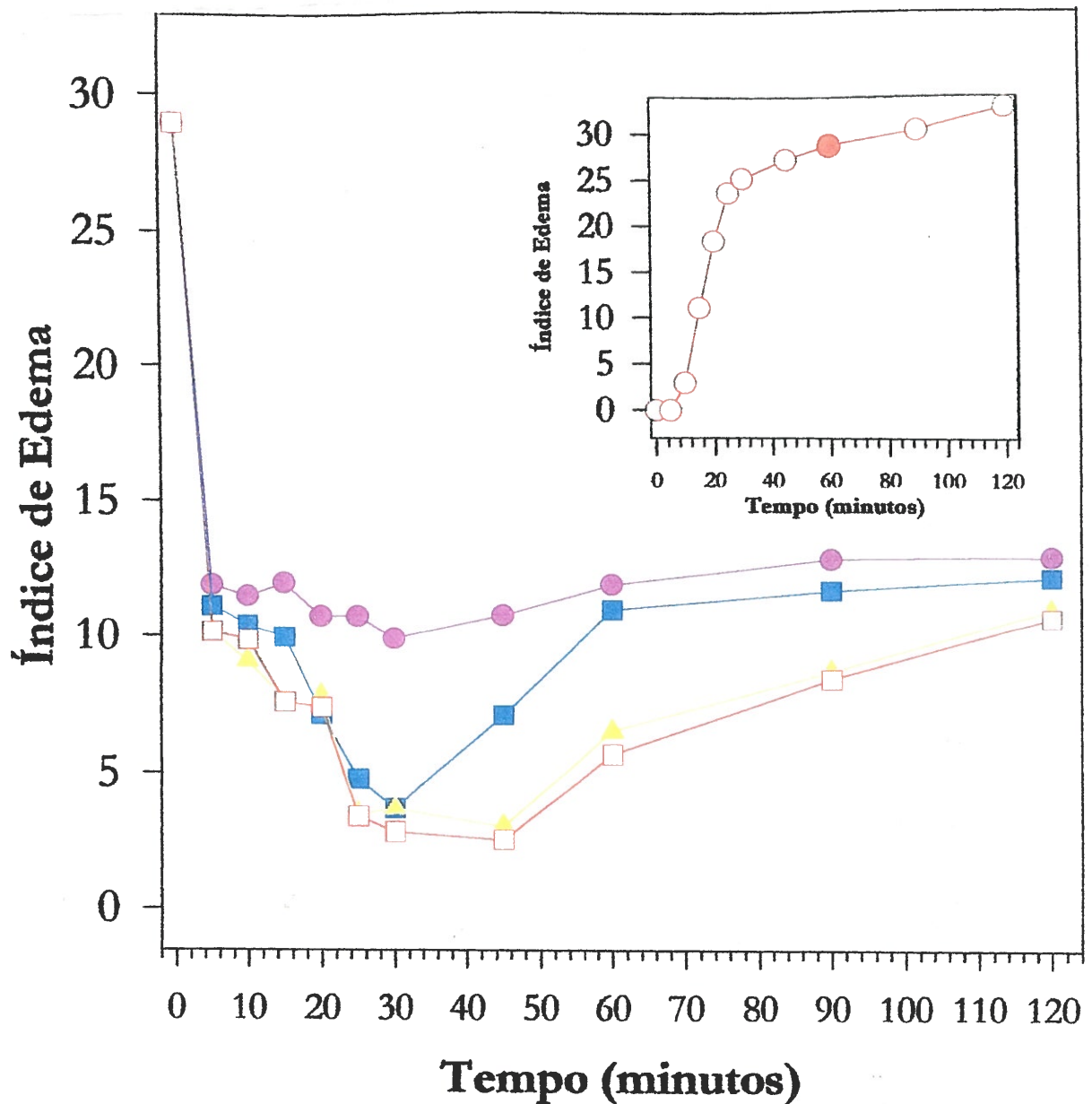


Gráfico 9 – Efeito do pós-tratamento com Eugenol, por via intraperitoneal, nas concentrações de 0,1% (●), 0,3% (■), 0,5% (▲) e 1% (□), 60 minutos após a aplicação de 100 µl do suco de *Dieffenbachia picta*. No *insert* plotamos o gráfico do índice de edema do grupo controle, onde o símbolo cheio representa o início do tratamento.

Avaliamos o efeito do EG por via intravenosa (IV), nas concentrações de 0,1%; 0,3% e 0,5% em tempos de 15, 30 e 60 min após a aplicação do suco.

Quando o EG é administrado 15 minutos após a aplicação do suco, o valor de índice de edema que era de 10,4 no grupo controle, atinge valor zero já 5 minutos após a injeção do EG, ou seja com 20 minutos de edema de língua.

Essa redução de 100% foi observada com todas as concentrações e assim permaneceu durante todo o ensaio. E mesmo após 24 horas, os animais estavam totalmente recuperados (Gráfico 10).

Mesmo quando ampliamos o tempo de administração do EG para 30 minutos após a aplicação do suco, os valores do grupo controle (de 26,4) eram reduzidos em 100%, já no tempo de 5 minutos após a injeção do EG. Essa inibição foi observada independente da concentração e perdurou por todo o ensaio (Gráfico 11).

Novamente aumentamos o intervalo entre a aplicação do suco e a administração do EG, sendo agora de 60 minutos. Neste tempo, o índice de edema é de 29,8, nos animais não tratados. Já após 5 minutos da aplicação do EG, os valores do índice de edema foram reduzidos para 5 e 10, independente da concentração utilizada. Os valores do índice de edema permaneceram entre 5 e 10 durante todo o ensaio (Gráfico 12).

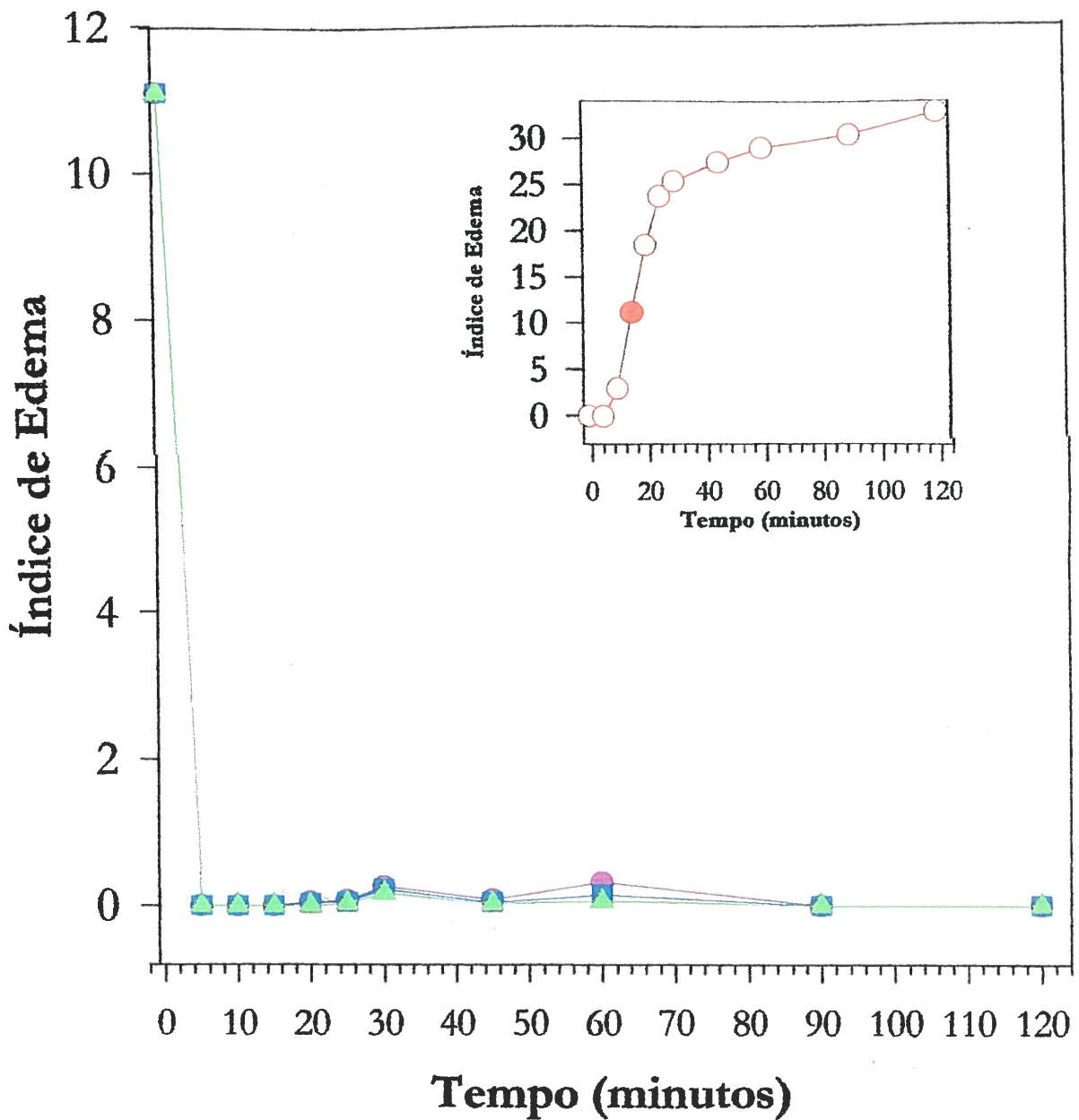


Gráfico 10 – Efeito do pós-tratamento com Eugenol, por via intravenosa, nas concentrações de 0,1% (●), 0,3% (■), 0,5% (▲), 15 minutos após a aplicação de 100 µl do suco de *Dieffenbachia picta*. No *insert* plotamos o gráfico do índice de edema do grupo controle, onde o símbolo cheio representa o início do tratamento.

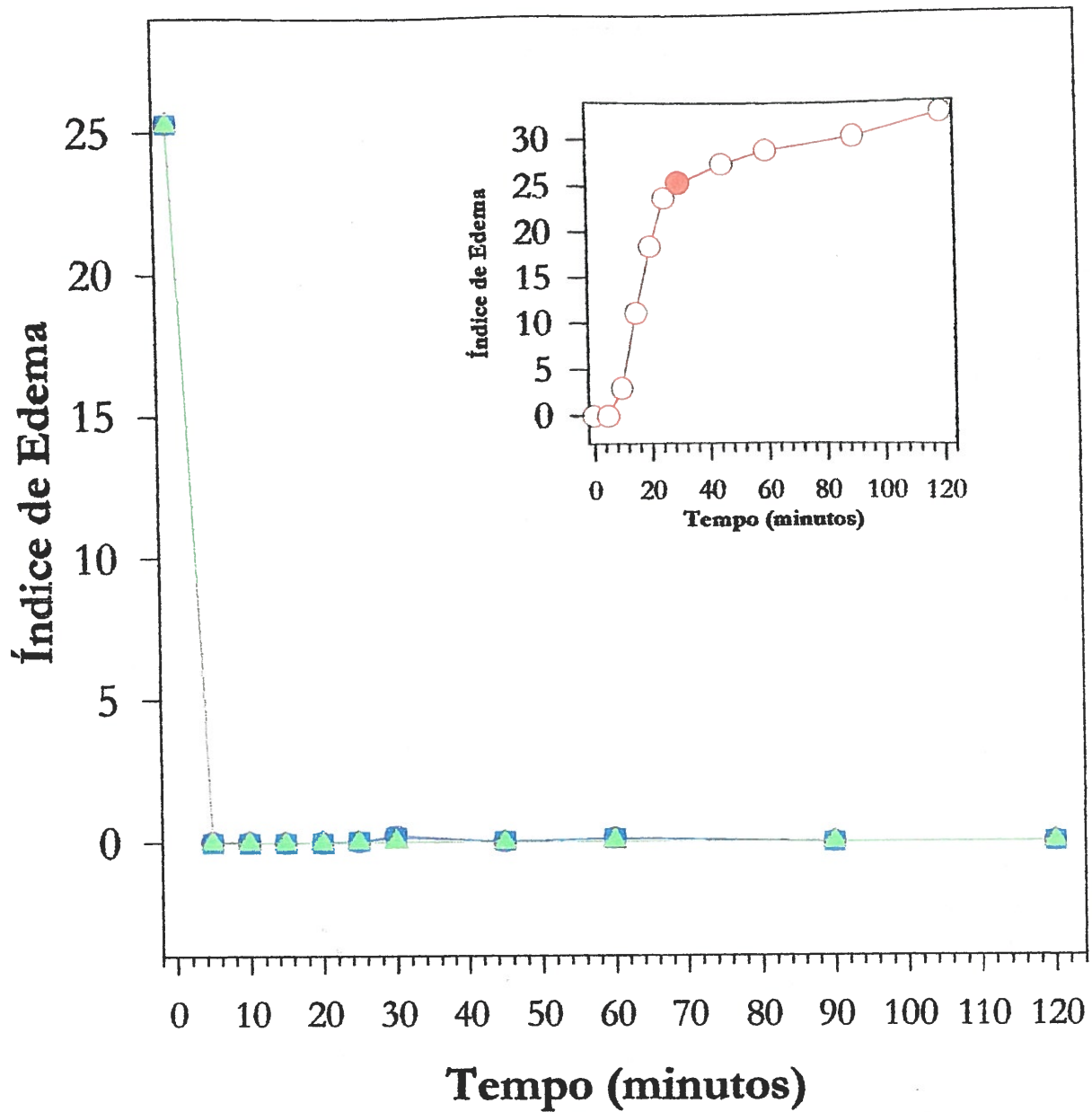


Gráfico 11 – Efeito do pós-tratamento com Eugenol, por via intravenosa, nas concentrações de 0,1% (●), 0,3% (■) e 0,5% (▲), 30 minutos após a aplicação de 100 µl do suco de *Dieffenbachia picta*. No *insert* plotamos o gráfico do índice de edema do grupo controle, onde o símbolo cheio representa o início do tratamento.

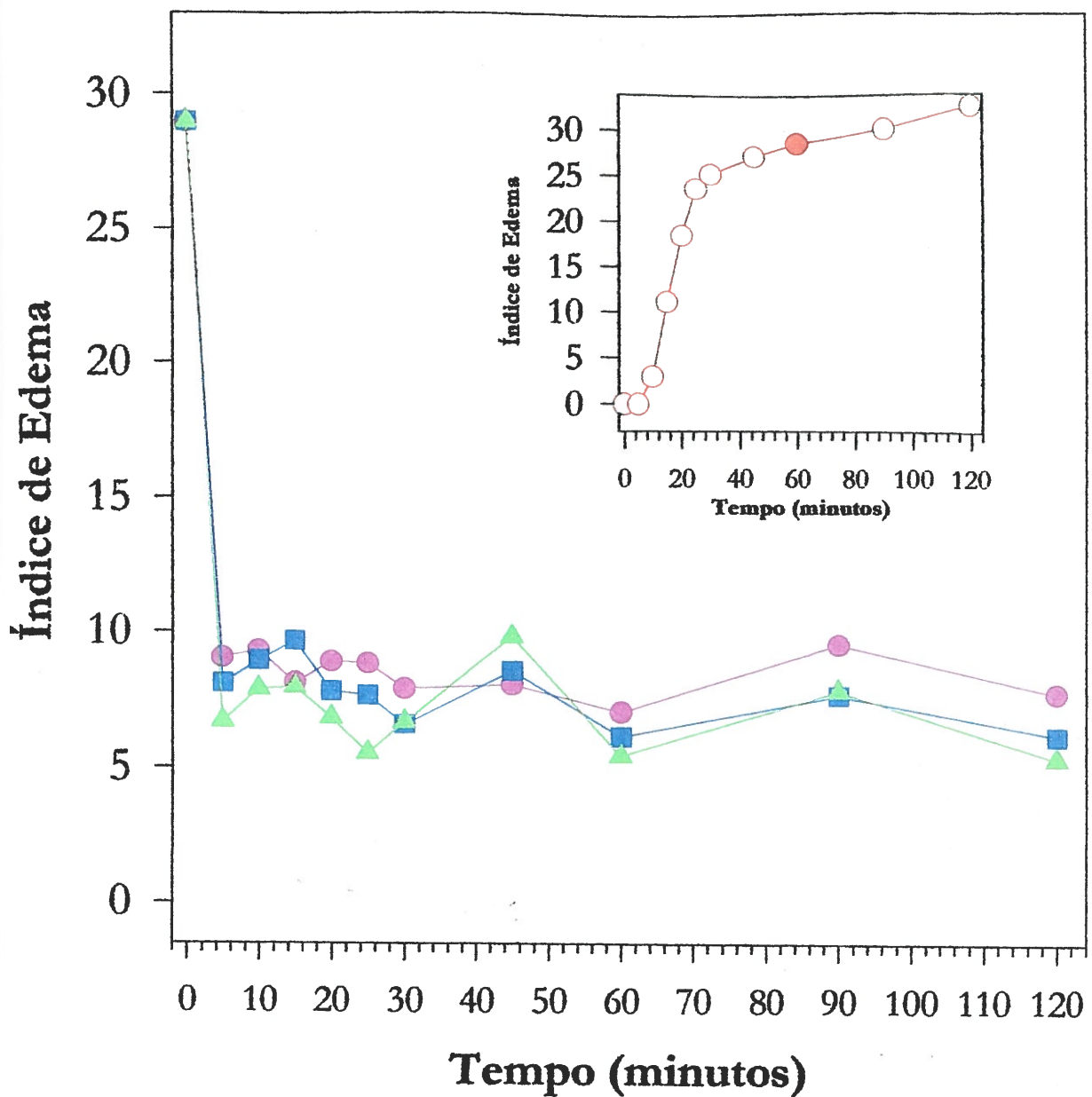


Gráfico 12 - Efeito do pós-tratamento com Eugenol, por via intravenosa, nas concentrações de 0,1% (●), 0,3% (□) e 0,5% (▲), 60 minutos após a aplicação de 100 µl do suco de *Dieffenbachia picta*. No *insert* plotamos o gráfico do índice de edema do grupo controle, onde o símbolo cheio representa o início do tratamento.

8. PÓS-TRATAMENTO COM ADRENALINA, CORTICOSTERÓIDE E ANTI-HISTAMÍNICO

Atualmente, em casos de ingestão acidental com a planta, o tratamento feito nos hospitais consiste de injeção intravenosa de adrenalina, um corticóide e um anti-histamínico. O paciente também recebe suporte ventilatório e alimentação parenteral quando necessário.

Resolvemos então tentar reproduzir nos animais o tratamento utilizado na clínica médica e comparar seus efeitos com aqueles obtidos com o Eugenol. Os animais receberam injeção intravenosa de diferentes doses de adrenalina (10, 15, 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e cloridrato de prometazina (0,3 mg/kg), seguida de injeção intraperitoneal de dexametasona (10 mg/kg), 5 minutos após a aplicação do suco. Os resultados demonstram que ao contrário do esperado, não foi observada uma redução inicial do edema e sim um aumento significativo, tanto na dilatação quanto na projeção frontal, atingindo valores de IE entre 4 e 6. O tratamento com a menor dose de adrenalina (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) não foi capaz de reduzir o edema durante 120 minutos do ensaio. Após 24 horas, todos os animais deste grupo estavam mortos.

Entretanto, nos grupos tratados com as maiores doses de adrenalina (15 e 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$), após 45 minutos a redução total do edema pode ser observada permanecendo até o final do experimento. Não houve diferença significativa entre as curvas obtidas com adrenalina 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e adrenalina 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Em qualquer uma das duas doses utilizadas, após 24 horas os animais se mostraram totalmente recuperados e sem nenhum sinal de ferida na cavidade oral. Apesar disso, apresentavam perda de peso de 33% (Gráfico 13).

Apesar do tratamento no tempo de 5 minutos após a aplicação do suco mostrar efeitos significativos, resolvemos aumentar o intervalo de tempo entre a aplicação tópica do suco da planta e o início da administração dos medicamentos para os intervalos de 15 e 30

minutos após a aplicação do suco. Utilizamos a associação dos 3 fármacos com a maior dose de adrenalina (20 µg/kg).

Independente do tempo de administração dos fármacos, os resultados mostram que não houve um retardo do processo edematogênico e apesar de uma nítida elevação dos valores para ambos os parâmetros de medida, quando a associação dos fármacos foi administrada 30 minutos após a aplicação de 100 µl do suco da planta, o pico máximo de inibição do índice de edema de língua mantiveram valores próximos a 13. O maior efeito foi principalmente em relação à projeção frontal, causou uma excelente inibição 10 minutos após o início do tratamento. Em relação à dilatação mésio-distal da língua os valores obtidos não foram suficientes para provocar a morte dos animais por asfixia, durante os 120 minutos do ensaio. Após 24 horas o início do experimento, todos os animais tratados nos tempos de 15 e 30 minutos após a aplicação do suco estavam mortos, com algum edema bucal e ulcerações na língua. Apenas o grupo de animais tratados 5 minutos após a aplicação do suco estavam vivos e completamente recuperados 60 minutos após o início do ensaio. Vale ressaltar que apesar de evitar a morte dos animais, o tratamento não evitou o aparecimento do edema bucal. A perda de peso dos animais neste grupo foi de 28,3% (Gráfico 14).

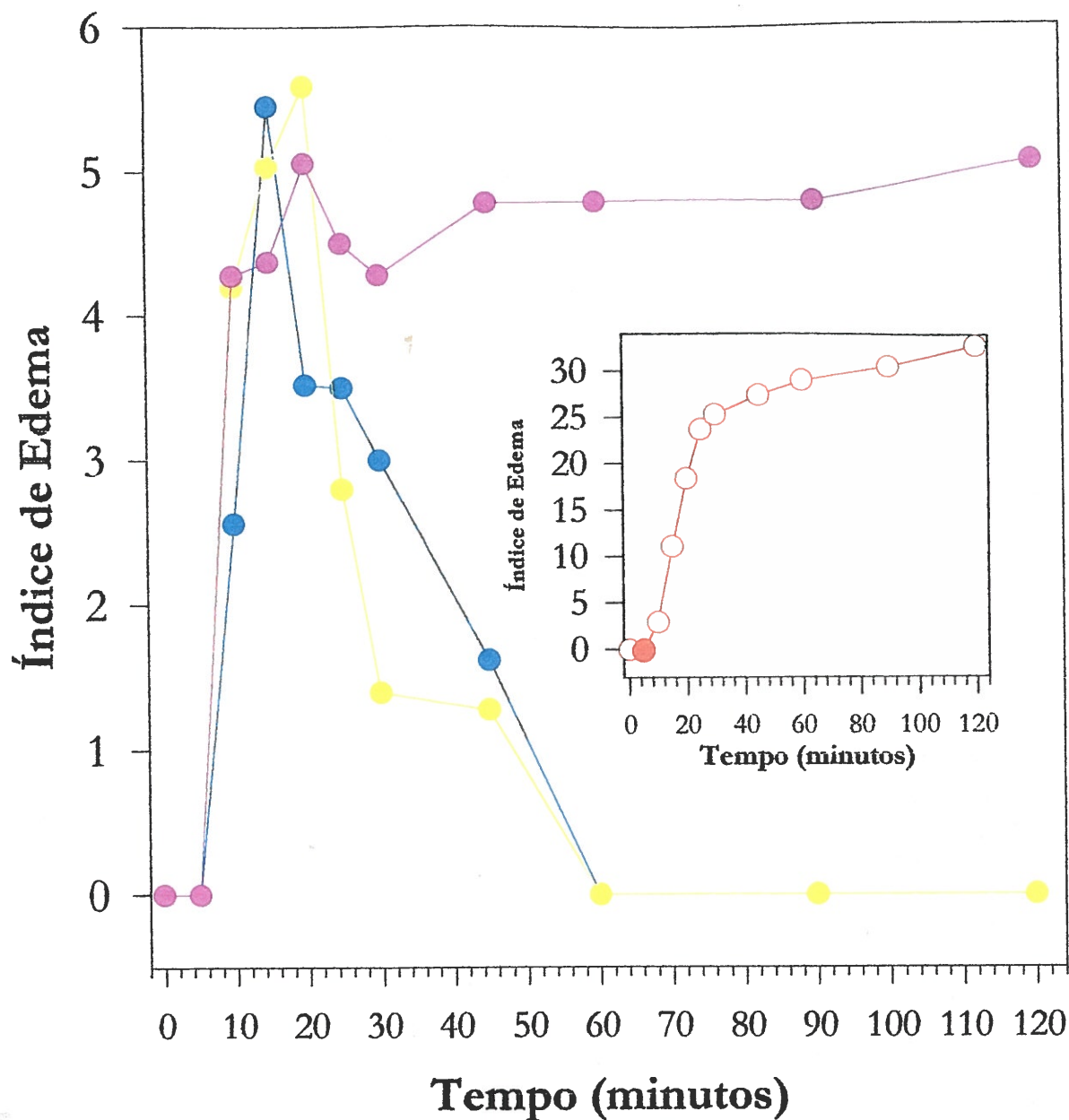


Gráfico 13 - Efeito do pós-tratamento com Adrenalina nas doses de: 10 µg/kg (—●—), 15µg/kg (—●—) ou 20 µg/kg (—●—); Cloridrato de Prometazina (0,3 mg/kg), por via intravenosa e Dexametasona (10 mg/kg), por via intraperitoneal, 5 minutos após a aplicação de 100 µl do suco de *Dieffenbachia picta*. No *insert* plotamos o gráfico do índice de edema do grupo controle, onde o símbolo cheio representa o início do tratamento.

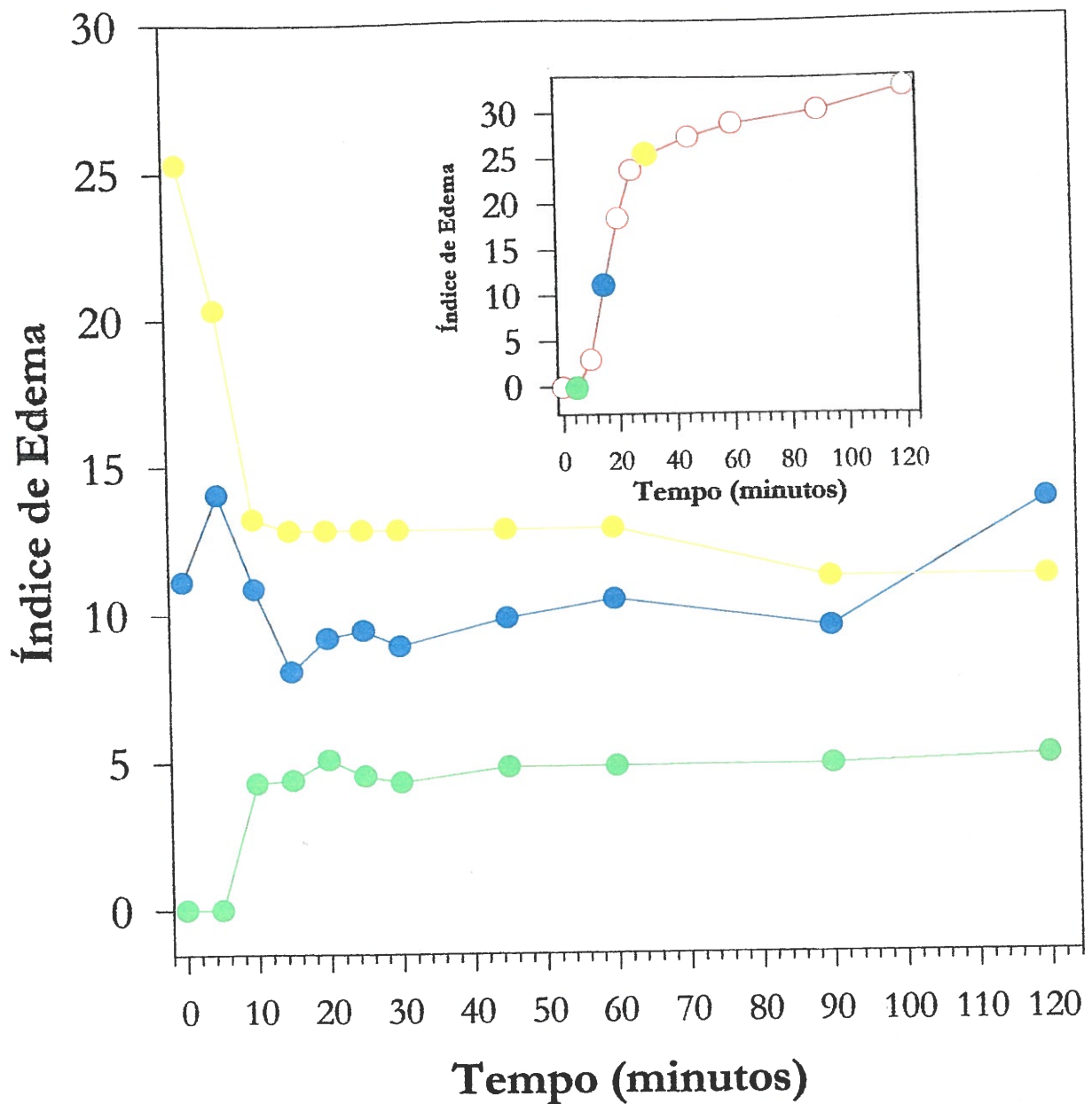


Gráfico 14 - Efeito do pós-tratamento com Adrenalina na dose de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$; Cloridrato de Prometazina (0,3 mg/kg), por via intravenosa e Dexametasona (10 mg/kg), por via intraperitoneal, 5 minutos (●); 15 minutos (●) e 30 minutos (●) após a aplicação de 100 μl do suco de *Dieffenbachia picta*. No *insert* plotamos o gráfico do índice de edema do grupo controle, onde cada símbolo cheio representa o início do tratamento.

9. COMPARAÇÃO ENTRE OS EFEITOS DO EUGENOL E O TRATAMENTO CONJUNTO ADRENALINA/DEXAMETASONA/ CLORIDRATO DE PROMETAZINA

A fim de comprovarmos melhor comparar os efeitos do tratamento dos animais com o Eugenol e com adrenalina + dexametasona + cloridrato de prometazina, plotamos em dois gráficos os resultados obtidos em cada uma das situações. No primeiro gráfico (Gráfico 15) colocamos a curva obtida com a associação dos 3 fármacos: a maior dose de adrenalina (20 µg/kg); cloridrato de prometazina (0,3 mg/kg), por via intravenosa e dexametasona (10 mg/kg), por via intraperitoneal, administrados 5 minutos após a aplicação de 100µl do suco de *D.picta* e a curva do Eugenol a 0,1%, administrado por via intraperitoneal, 30 minutos após a aplicação do suco da planta.

No gráfico 15 observamos que, mesmo quando o Eugenol na menor concentração (0,1%) e administrado pela via intraperitoneal, 30 minutos após a aplicação do suco, o efeito do tratamento é significativamente mais rápido e eficaz. Considerando que os animais apresentavam índice de edema de 26,4 e após 5 minutos da administração do EG, o edema de língua é inibido e reduzido em 100 %. Na associação dos 3 fármacos, a inibição do edema de língua ocorre somente após 45 minutos do início do tratamento. A máxima regressão do edema de língua ocorre após 60 minutos do início do tratamento, (65 minutos de edema de língua). Considerando que no início do tratamento os animais ainda não apresentavam índice de edema mensurável e que até 20 minutos após a aplicação do suco, os animais apresentavam índice de edema com valores entre 0 e 6, a impossibilidade do tratamento em inibir inicialmente o edema deve ser ressaltada. O efeito do Eugenol é significativamente mais rápido, já que 5 minutos após sua administração o edema é inibido e reduzido em 100%.

No gráfico 16 plotamos os resultados dos animais que receberam Eugenol 0,1%, por via intravenosa, 15 e 60 minutos após a aplicação do suco e o resultado do tratamento com a associação dos 3 fármacos: a maior dose de adrenalina (20 µg/kg); cloridrato de prometazina (0,3 mg/kg) por via intravenosa e dexametasona (10mg/kg), por via intraperitoneal, administrados 15 minutos após a aplicação tópica de 100 µl do suco *D.picta*. O Eugenol na menor concentração: 0,1% e, administrado 1 hora após a aplicação do suco, foram capazes de inibir e reduzir o edema de língua, mantendo índice de edema entre 5 e 10 até o final do ensaio. Os efeitos do Eugenol são observados 5 minutos após sua administração. O resultado conseguido com o EG não demonstrou diferença significativa quando comparado com o resultado obtido na associação dos 3 fármacos, administrados 15 minutos após a aplicação do suco. Considerando que no início do tratamento com EG, os animais apresentavam índice de edema de 29,8, observamos um percentual de redução do índice de edema de 73,1 %, 5 minutos após sua administração. Para a os animais tratados com a associação dos 3 fármacos, o índice de edema no início do tratamento era de 10,4, permanecendo até o final do ensaio com valores entre 8 e 12. O Eugenol 0,1% (IV), 20 minutos após a aplicação tópica de 100µl do suco de *D. picta* a redução e a inibição máxima do edema de língua (100%) já pode ser vista, ou seja, 5 minutos após o início do tratamento.

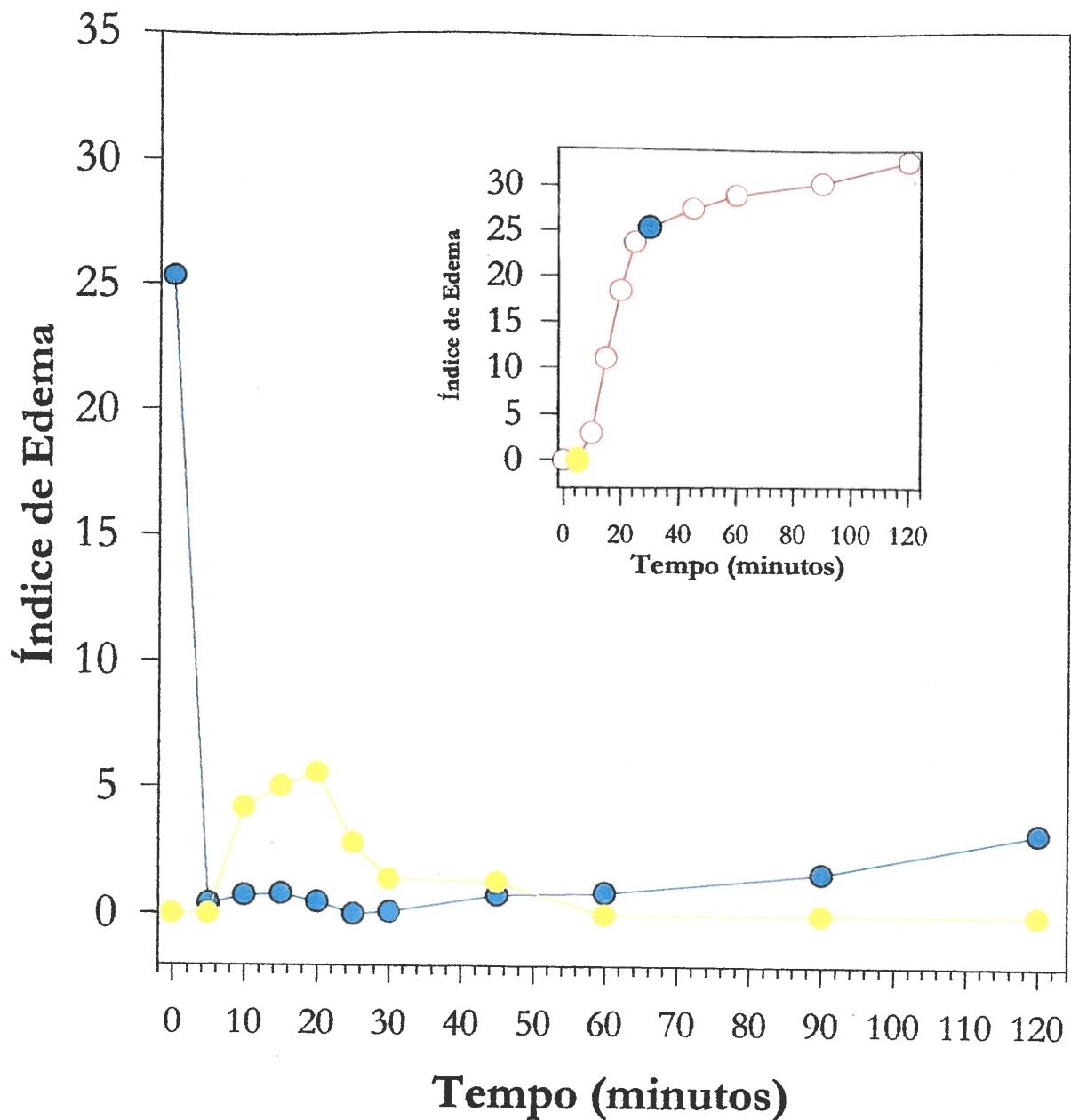


Gráfico 15 - Efeito do pós-tratamento com Adrenalina na dose de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$; Cloridrato de Prometazina (0,3 mg/kg), por via intravenosa e Dexametasona (10 mg/kg), por via intraperitoneal, 5 minutos (●) após a aplicação de 100 μl do suco de *Dieffenbachia picta* e Eugenol 0,1%, por via intraperitoneal, 30 minutos (●) após a aplicação de 100 μl do suco de *Dieffenbachia picta*. No *insert* plotamos o gráfico do índice de edema do grupo controle, onde o símbolo cheio representa o início dos tratamentos.

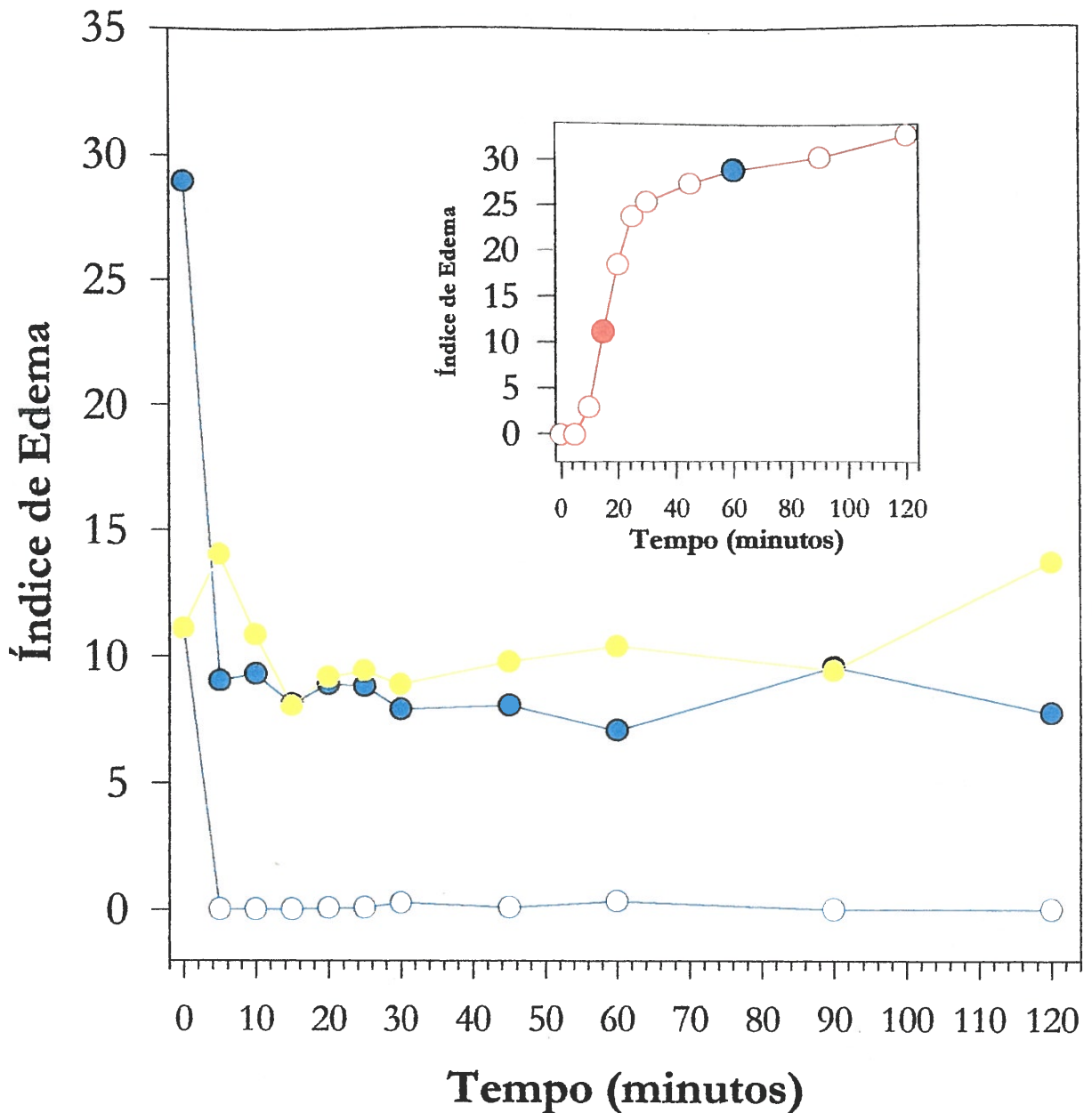


Gráfico 16 - Efeito do pós-tratamento com adrenalina na dose de 20 µg/kg; Cloridrato de Prometazina (0,3 mg/kg), por via intravenosa e Dexametasona (10 mg/kg), por via intraperitoneal, 15 minutos (●), após a aplicação de 100 µl do suco de *Dieffenbachia picta*. e Eugenol 0,1%, 15 minutos (⊕) e 60 minutos (⊙), por via intravenosa, após a aplicação de 100 µl do suco de *Dieffenbachia picta*, No insert plotamos o gráfico do índice de edema do grupo controle, onde os símbolos cheios representam o início dos tratamentos: 15 minutos (●) e 60 minutos (⊙).

DISCUSSÃO

A planta popularmente conhecida como “comigo-ninguém-pode”, pertencente ao gênero *Dieffenbachia* é um dos principais responsáveis pelo grande número de casos de intoxicação por plantas no Brasil. O estudo e o esclarecimento dos processos envolvidos na intoxicação por *Dieffenbachia picta* se mostra importante na tentativa de se encontrar fármacos capazes de reduzir o processo patológico decorrente do contato com a planta. Esse quadro se torna mais grave se observarmos que o maior percentual de indivíduos intoxicados pela planta se encontra na faixa etária entre 1 e 4 anos (40%). Se ampliarmos a faixa até os 9 anos, observamos que elas correspondem a quase 60% dos casos totais (vide Tabela 1). A grande incidência em crianças pode ser explicada pelo fato de seu amplo uso como planta ornamental aliado à constatação da sua utilização pelas crianças nas brincadeiras de se “fazer comida” (LADEIRA *et al.*, 1975; LORENZI & SOUZA, 1981).

No presente trabalho avaliamos o efeito do Eugenol (EG) no edema de língua (EL) induzido pela *Dieffenbachia picta*. Inicialmente, padronizamos a metodologia de indução e quantificação do edema de língua. Mostramos que as condições ideais para a indução de um edema de língua mensurável e que não causa a morte do animal ocorre quando o suco da planta é administrado sobre a língua, no volume de 100 µl de tal forma que seja evitada a deglutição ou aspiração do suco e conseqüente morte do animal. O edema de língua já é mensurável, 10 minutos após sua aplicação atingindo platô com 45 minutos.

Especula-se que o efeito tóxico da *D. picta*, pode estar relacionada com um desequilíbrio entre os ácidos graxos que participam da resposta inflamatória (GUPTA *et al.*, 1999; LEE & SHIBAMOTO, 2000). Este desequilíbrio poderia ser responsável pelo desencadeamento do processo inflamatório por estimular a síntese do fator de agregação plaquetária (PAF) em várias células inflamatórias como neutrófilos, monócitos,

macrófagos, eosinófilos e células endoteliais vasculares (WALTER & MUNI, 1968; WILLIAMS & HARBONE, 1971; THOM *et al.*, 2001). Pereira, (2000 comunicação pessoal) constatou uma similaridade química estrutural entre a substância de natureza lipídica que envolve os cristais de oxalato de cálcio e a estrutura do PAF. Essa substância associada aos cristais de oxalato de cálcio quando injetada na pata de camundongos, foi capaz de provocar edema e vasodilatação dérmica comprovada pela difusão do Azul de Evans (LAINETTI & PEREIRA, 1995).

O PAF está envolvido com diversas patologias como a trombose arterial, inflamações agudas de caráter alérgico, asma e choques endotóxicos. Algumas lignanas e neolignanas isoladas de plantas, bem como os conhecidos terpenóides e ginkgolídeos, são comprovadamente inibidores do PAF.

A administração do suco *D. picta* topicamente na mucosa oral de camundongos ou quando em contato com a derme em humanos causou reações alérgicas intensas que resultaram em um quadro inflamatório (McGOVERN, 2000). Entretanto quando administrado diretamente no estômago de camundongos, não causa nenhum efeito. A inativação do princípio ativo pode estar relacionada com a decorrente ação de enzimas intestinais, secreções gástricas ou má absorção (RIZZINI & OCCHIONI, 1957; FOCHTMAN *et al.*, 1969; LADEIRA *et al.*, 1975; MADEROISIAN & ROIA JR., 1979).

Observamos um intenso processo inflamatório durante o desenvolvimento do edema de língua induzido pelo suco de *D. picta*. Tratamos os animais com fármacos antiinflamatórios esteroidais e não esteroidais e avaliamos o grau de inibição e regressão do edema de língua. Para nossa surpresa o máximo de redução do índice de edema conseguido com Dexametasona, Indometacina ou Fenidona foi de no máximo 50%, o que indicou que no edema de língua induzido pelo suco da planta, além de metabólitos da cascata do ácido araquidônico outros mediadores inflamatórios estavam envolvidos. Como a injúria mecânica causada pelos cristais de oxalato de cálcio causa liberação maciça de histamina por parte dos mastócitos além de liberação de cininas, provavelmente estes mediadores favoreçam e amplifiquem o edema bucal (BLACK, 1918; DORE, 1963; DRACH & MALONEY, 1963; POHL, 1964; RIZZINI & MORS, 1976; EVANS, 1987). Este fato foi confirmado vinte quatro horas após o início do ensaio onde todos os animais, independente dos antiinflamatórios utilizados, estavam mortos.

Especula-se que o mecanismo pelo qual a *D. picta* desenvolve sua toxicidez seria devido a grande liberação de histamina por parte dos mastócitos, visto que os níveis plasmáticos de histamina, estão significativamente elevados no hemograma de animais intoxicados pelo suco (RIZZINI & OCCHIONI, 1957). Os resultados do nosso trabalho sugerem que o anti-histamínico, Cloridrato de Promerazina, quando comparado ao grupo controle e administrado por via intraperitoneal, 70 minutos após a aplicação do suco, diminui o mesmo em torno de 73%, entre 30 e 40 minutos após o início do tratamento . Após 120 minutos de experimento, apesar do edema de língua estar reduzido, 24 horas após o início do experimento todos os animais estavam mortos. Como a média da perda de peso foi em torno de 50% do peso corporal após o início do ensaio, a morte dos animais pode ter ocorrido pela impossibilidade de alimentação e hidratação.

O suco de *D. picta* isento dos cristais de oxalato de cálcio quando em contato com a mucosa oral de camundongos não causou edema de língua. Quando injetado na pata dos animais, o edema de pata também não foi observado (BARNES *et al.*, 1955; LADEIRA *et al.*, 1975; KUBALLA *et al.*, 1981; CARNEIRO *et al.*, 1985; CARNEIRO *et al.*, 1989). Conforme descrito anteriormente, o suco quando lavado em água e centrifugado, o sobrenadante, isento de cristais, é composto por uma mistura de uma substância de natureza lipídica constituída por ácidos graxos não saturados de 18 a 22 átomos de carbono. Ainda que fundamental para o desenvolvimento do processo inflamatório tanto na cavidade oral como na pata dos animais, o edema somente ocorre quando essa substância de estrutura química desconhecida envolve os cristais de oxalato de cálcio.

Da mesma forma, quando os cristais de oxalato de cálcio são lavados com éter de petróleo e portanto ficam isentos da substância lipídica que os envolvia, aplicado topicamente na mucosa oral ou injetado na pata de camundongos, também não é capaz de desenvolver o mesmo processo inflamatório. Desta forma podemos afirmar que a toxicidade da planta está relacionada com uma ação conjunta e associada dos cristais de oxalato de cálcio, as ráfides, funcionando como a arma e da substância lipídica que os envolve, sendo considerada a munição.

A substância lipídica que envolve os cristais possui uma analogia estrutural com o fator de agregação plaquetária (PAF) e possivelmente está envolvida com o edema de língua e aumento da permeabilidade cutânea. Contudo o WEB2170 (10 mg/kg), quando administrado por via intraperitoneal, 35 minutos após a aplicação do suco da planta, inibiu em 67% o edema de língua, permanecendo sem modificações após os 120 minutos do início do experimento. Como observado no grupo de animais tratados com WEB 2170, o grupo tratado com anti-histamínico estavam mortos e com edema de língua associado a ulcerações bucais. Vale ressaltar que no grupo tratado com WEB 2170, a inibição do edema

de língua ocorreu 5 minutos após sua administração. O Cloridrato de Prometazina evitou o agravamento das ulcerações na cavidade oral desenvolvidas durante os 120 minutos do experimento.

Os resultados observados em animais que foram tratados com Dexametasona, Indometacina ou Fenidona regrediram o índice de edema em aproximadamente 26%, 36% e 50% respectivamente, porém não evitaram tanto a perda de peso dos animais quanto a sua morte 24 horas após o início do experimento.

Apesar de algumas especulações na atividade do EG como bloqueador de canais de cálcio (BENNETT *et al.*, 1974; SZABADICS & ERDELYI, 2000), esse não parece ser o mecanismo de ação com o qual o EG inibe o edema de língua causado pelo suco de *D. picta*. Os resultados demonstram que quando os animais foram tratados com Verapamil (50 mg/kg) a inibição do mesmo foi de 66,4 %, sendo que neste caso alguns animais morreram durante os 120 minutos de experimento.

Os resultados obtidos na inibição e redução do edema de língua no tratamento dos animais com antiinflamatórios e outros fármacos foram melhores do que quando comparados com os resultados obtidos no pré-tratamento com o EG. Vale ressaltar que apesar de manter índices de edema superiores durante os 120 minutos do ensaio, 24 horas após o início todos os animais pré-tratados estavam completamente recuperados e todos vivos. Observamos ainda que este resultado no pós-tratamento foi independente da via de administração, IP ou IV e do tempo de administração do fármaco (60, 30 e 15 minutos) após a aplicação do suco de *D.picta* (100µl).

Com o objetivo de observar se a farmacocinética do EG estaria interferindo no resultado da inibição do edema de língua nos animais, o mesmo protocolo experimental do tratamento com EG por via IP foi utilizado para a via IV. Para a via intravenosa, de acordo

com os estudos prévios de toxicologia do EG, as concentrações que seguramente poderiam ser administrada nos animais eram de 0,1%; 0,3% e 0,5%.

Para as concentrações de 0,1 e 0,3% de EG administradas 60 minutos após a aplicação do suco da planta, a inibição do índice de edema não foram superiores quando comparados com os resultados obtidos com a administração do EG por via intraperitoneal. Este fato demonstrou que a via de administração não pareceu interferir no tratamento e sim o tempo decorrido após a aplicação do suco, para iniciarmos o tratamento com o EG.

Os animais que receberam tratamento com EG por via IP, 60 minutos após a aplicação do suco da planta, apesar de não apresentarem redução de 100% do edema, apresentavam 90 % de inibição do índice de edema, 30 minutos após a administração do EG e a completa recuperação que podia ser observada 24 horas após o início do ensaio.

A deposição do fármaco em tecido adiposo pode ter sido responsável por observamos um menor efeito quando comparadas as concentrações de 0,1 e 0,3 %, sugerindo que a biodisponibilidade do EG a 0,3 %.

Quando o EG foi administrado por via IV, 15 e 30 minutos após a aplicação do suco, observamos 100% de redução do edema de língua. Este efeito não somente foi eficaz na redução do edema mas também na rapidez do seu efeito. Após cinco minutos da administração do EG os animais já apresentavam índice de edema de zero, estando completamente recuperados 1 hora após o início do tratamento.

Na tentativa de reproduzir o tratamento emergencial clínico indicado nas intoxicações por “comigo-ninguém-pode”, tratamos os animais associando três fármacos, a adrenalina, antihistamínico seletivo para receptores histaminérgicos H₁, por via intravenosa e corticosteróide, por via intraperitoneal. A adrenalina tem como função principal retirar o paciente do choque anafilático atuando no aparelho cardio-vascular e pulmonar de forma eficaz, rápida e seletiva. Para minimizar o agravamento do processo inflamatório pela extensa liberação de histamina, consequência da maciça degranulação de mastócitos, tratamos os animais com o Cloridrato de Prometazina e com o objetivo de minimizar os efeitos deletérios do edema a longo prazo, utilizamos a Dexametasona, buscando diminuir a síntese de metabólitos do ácido araquidônico e de outros mediadores importantes no processo inflamatório. As doses de ambos medicamentos foram calculadas de acordo com o peso dos animais. Os grupos diferiram entre si quanto ao tempo decorrido para a administração dos fármacos após a aplicação de 100 µl do suco de *D.picta*, ou seja 5; 15 e 30 minutos. Diferentes doses de adrenalina (10, 15 e 20 µg/kg) foram administradas 5 minutos após a aplicação do suco da planta, demonstrando diferenças significativas na inibição do edema. Com exceção da menor dose 10 µg/kg, as demais doses foram capazes de inibir e reduzir o edema de língua durante os 120 minutos de experimento. Contudo esse resultado somente pode ser visto após 45 minutos após o início do tratamento com os fármacos. Quando comparamos com o resultado obtido com o EG este, além de reduzir o edema em apenas 5 minutos, também é capaz de inibi-lo quando administrado 5 minutos após a aplicação do suco. Seguindo o protocolo previamente descrito, os animais foram observados até 24 horas após o término do experimento. Todos os animais tratados com a associação dos 3 fármacos: adrenalina na dose de 10 µg/kg estavam mortos e ainda apresentavam edema bucal, ulcerações na língua e 33,6% de perda

de peso. Apresentavam também graves ulcerações na língua provocada pelo toque com os dentes incisivos inferiores além de sinais de desidratação.

Nas doses de 15 e 20 µg/kg os animais encontravam-se totalmente recuperados após 60 minutos do início do tratamento. Os resultados demonstram que ao administrar os fármacos 5 minutos após a aplicação tópica do suco de *D. picta*, ao contrário do esperado, não foi observada uma redução inicial do edema, e sim, seu aumento significativo tanto na dilatação, quanto na projeção frontal. Entretanto, em 45 minutos decorridos do experimento a redução do edema bucal pode ser observada.

Na clínica médica o tratamento dos acidentes relacionados com a *D. picta*, além de utilizarmos os mesmos fármacos, medidas como ventilação e hidratação são também indicadas, favorecendo rapidamente a recuperação do paciente. No nosso experimento não foi possível manter os animais ventilados artificialmente, recebendo alimentação e hidratação enteral, o que levou inevitavelmente a morte com a menor dose de adrenalina. Ainda assim, as melhores respostas com o proposto tratamento foram possíveis quando aumentamos as doses de adrenalina e quando antecipamos a administração dos fármacos.

Os resultados mostram que não houve um retardo do processo edematogênico e apesar de uma nítida elevação dos índices para ambos os parâmetros de medida, o pico máximo foi inferior aos do grupo controle, observados no mesmo tempo de experimento. Principalmente em relação à projeção frontal, uma excelente inibição do edema foi observada, considerando que após 24 horas, os animais estavam isentos da mesma. Em relação à dilatação méso-distal da língua os índices obtidos não foram suficientes para provocar a morte dos animais por asfixia. Vale ressaltar que apesar de evitar a morte dos animais, o tratamento com adrenalina, antihistamínico e corticóide não evitou o aparecimento do edema bucal, justificando seu caráter emergencial. Apesar dos 28,3% de perda de peso, 24 horas após o experimento os animais estavam totalmente recuperados.

Trabalhos recentes da literatura relatam a atividade antioxidante do Eugenol e de outros compostos fenólicos (SUZUKI *et al.*, 1985; WRIGHT *et al.*, 1995; ATSUMI *et al.*, 2000). Nossos resultados demonstraram que o Eugenol é capaz de inibir e regredir o edema de língua, causado pela intoxicação suco de *D. picta*. Poderíamos relacionar esse efeito com sua atividade antioxidante, porém neste trabalho não foi possível investigar a ação antioxidante do Eugenol.

CONCLUSÕES

- Foi possível caracterizar e identificar o edema de língua induzido pela aplicação tópica de 100 µl do suco de *Dieffenbachia picta*, sem causar a morte dos animais;
- O tratamento emergencial indicado nas reações anafiláticas, ou seja, a associação de adrenalina, anti-histamínico e corticosteróide, permite a sobrevivência dos animais e inibe o edema da língua apenas quando são administrados cinco minutos após o suco da *D. picta*. Quando administrados 15 ou 30 minutos após a aplicação do o suco da planta não evitaram a morte dos animais após 24hs do início do experimento;
- O pré-tratamento com EG, permitiu que o mesmo volume do suco da planta (100µl), desenvolvesse um índice de edema (IE) significativamente menor quando comparado com o grupo controle, sugerindo que poderíamos prevenir o edema ou ainda, minimizar os efeitos tóxicos e melhorar o prognóstico dos ferimentos ou do possível choque anafilático;
- O EG utilizado no pós-tratamento, independente do tempo de administração, das concentrações e das vias de administração, apresentou atividade inibitória do edema de língua resultante da intoxicação por *D.picta*,. Quando por via intravenosa, 1 hora após o início do tratamento, os animais estavam completamente recuperados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARDITTI, J.; RODRIGUES, E. (1982): *Dieffenbachia*-uses, abuses and toxic constituents: a review. *J.Ethnopharmacol.* **5**: 293-302.

ATSUMI, T.; IWAKURA, I.; FUJISAWA, S.; UEHA, T.(2001): Reactive oxygen species generation and photo-cytotoxicity of Eugenol in solutions of various pH. *Biomaterials*, **22**: 1459-1466.

ATSUMI, T.; FUJISAWA, S.; SATOH, K.; SAKAGAMI, H.; IWAKURA, I.; UEHA, T.; SUGITA, T.(2000): Cytotoxicity and radical intensity of eugenol, isoeugenol or related dimers. *Anticancer Res.*, **20**: 2519-2524.

AZUMA, Y.; OZADA, N.; UEDA, Y.; TAKAGI, N. (1986): Pharmacological studies on the anti-inflammatory action of phenolic compounds. *J. Dent. Res*, **65**: 53-56.

BARBI, N. S. (1999): Estudo Químico dos Constituintes Tóxicos da *Dieffenbachia picta*. Tese de Doutorado. Faculdade de Farmácia, UFRJ.

BARNES, B. A., FOX, L. E. (1955): Poisoning with Dieffenbachia. *J. Hist. Med.*, **10**: 173-181.

BATE-SMITH, E.C. (1968): The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance.II. Monocotyledons. *J. Linn. Soc. (Bot)*, **60**: 325-356.

- BLACK, O. F. (1918): Calcium oxalate in the dasheen. *Am. J. Bot.*, **5**: 447-451.
- BENNETT, A.; GRADIDGE, C. F.; STAMFORD, I. F. (1974): *N. Engl. J. Med.*, **290**: 110.
- BRODIN, P.; ROED, A.. (1984): Effects of Eugenol on rat phrenic nerve and phrenic nerve-diaphragm preparations. *Arch. Oral Biol.*, **29**:611-615.
- CARLINI, E.A.; DALLMEIER, K.; ZELGER, J. L. (1981): Methyleugenol as surgical anesthetic in rodents. *Experientia*, **37**:588-589.
- CARNEIRO, C. M. T. S. (1985): Mecanismo tóxico de *Dieffenbachia picta* Schott. Araceae. Tese de Mestrado em Ciências Biológicas (Botânica), UFRJ, 1985.
- CARNEIRO, C. M. T. S.; NEVES, L.; PEREIRA, E. F. R.; PEREIRA, N. A. (1985): Mecanismo tóxico de “comigo-ninguem-pode”, *Dieffenbachia picta* Schott. (Araceae) *An. Acad. Bras. Ciências*, **57**:392-393.
- CARNEIRO, C. M. T. S.; NEVES, L.; PEREIRA, E. F. R.; PEREIRA, N. A. (1989): Mecanismo tóxico de “comigo-ninguem-pode”, *Dieffenbachia picta* Schott. (Araceae). *Rev. Bras. Farm.*, **70**: 11-13.

CHIOU, A.G.Y.; CADEZ, R.; BOHNKE, M. (1997): Diagnosis of *Dieffenbachia* induced corneal injury by confocal microscopy. *Br. J. Ophthalmol.*, **81**: 168-173.

CORAZZA, M.; ROMANI, I.; POLI, F.; VIRGILI, A. (1998): Irritant contact dermatitis due to *Dieffenbachia spp.*. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, **10**: 87-89.

CORREIA, P.M. (1978): Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. 1ª.Ed, Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, Vol.2, 427-428.

COSTA, A. F. (1975): Farmacognosia. 3ª. Ed. Lisboa. Fundação Calouste Gulbenkian. **1**: 760.

COSTA, J.A.; OLIVEIRA, R. A. G.; BARBOSA, J. M.; SOUZA BRITO, A. R. M. (1994): Estudo químico-farmacológico de um derivado semi-sintético do eugenol. *Rev. Bras. Farm.*, **75**: 40-45.

DALLMEIER, K.; CARLINI, E. A. (1981): Anesthetic, hipotermic, myorrelaxant and anticonvulsivant effects of synthetic Eugenol derivatives and natural analogs. *Pharmacol.*, **22**: 113-127.

DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, H. T. (1982): The Monocotyledons – A Comparative Study. *Academic Press: London*, **21**: 255-263.

DORE, W. G. (1963): Cristalline raphides in the toxic house plant *Dieffenbachia*. **JAMA**, 184:1045.

DRACH, G.; MALONEY, W. H. (1963): Toxicity of the common house plant *Dieffenbachia*. **JAMA**, 184:1047.

DVORJETSKI, M. (1958): La plante stérilisante *Caladium seguinum* et ses propriétés pharmacodynamiques, **Ver. Fr. Gynécol. Obst.**, 53:139-158.

ESAU, K. (1965): **Plant Anatomy**, p. 767, 2^a ed., John Wiley & Sons, New York.

EVANS, C. R. H. (1987): Oral Ulceration after contact with the houseplant *Dieffenbachia*. **Br. Dent. J.**, 162: 467.

FOCHTMAN, F. W.; MANNO, J. E.; WINEK, C. L.; COOPER, J. E. (1969): Toxicity of the genus *Dieffenbachia*. **Toxicol Appl Pharmacol.**, 15: 38-45.

GARDNER, D. G. (1994): Injury to the mucous membranes caused by the common houseplant, *Dieffenbachia*. **Oral Sur. Oral Med. Oral Pathol.**, 78: 631-633.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; MAZZANTI, G. (2001): Local anaesthetic activity of Monoterpenes and Phenylpropanes of essential oils. **Planta Medica** , 67: 564-566.

GUPTA, O. P.; SING, S.; BANI, S.; SHAMA, N.; MALHOTRA, S, GUPTA, D. B.; BANERJEE, S. K.; HANDA, S. S. (1999): Anti-inflammatory and anti-arthritic activities of Silymarin acting through inhibition of 5-lipoxygenase. *Phytomedicine* ,7:21-24.

HUME, W. R. (1984): Effects of Eugenol on respiration and division in human pulp, mouse fibroblasts and liver cells in vitro. *J. Dent. Res.*; 63: 1262-1265.

JURCIC, K.; WAGNER, H. (1976): The spasmolytic activity of Eugenol derivatives and valepatriatum. Proc.1st Int. Congr. Medicinal Plant Research, Munich, set.(6-10).

KOZAM, G.; MANTELL, G. M. (1978): The effect of Eugenol on oral mucous membranes. *J. Dent. Res.*, 57: 954-957.

KINGSBURY, J. M. (1961): Philodendron-induced dermatites: Report of cases and review of the literature. *Cutis*, 48: 357-378.

KISSMAN, K. G. (1961): Knowledge of poisonous plants in the United States- Brief history and conclusions. *Economic Botanic*, 38: 119-130.

KUBALLA, B.; LUGNIER, A. A.; ANTÓN, R. (1981): Study of Dieffenbachia-induced-edema in mouse and rat hindpaw: respective role of oxalate needles and trypsin-like portease. *Toxicol Appl Pharmacol.*; 58: 444-451.

LADEIRA, A. M.; ANDRADE, S. A.; SAWAIA, P. (1975): Studies on *Dieffenbachia picta* Schott.: Toxic effects in guinea pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **34**: 363-373.

LADEIRA, A. M.; ORNELLAS, S. O. A.; SAWAIA, P. (1979): *Dieffenbachia picta* Schott. Atividade irritante e tóxica. Ciência e Cultura – V Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 128-129.

LAINETTI, R. (1995): Mecanismo de Atividade de *Araceae*. Rio de Janeiro: Museu Nacional, UFRJ, 1995. Tese (Mestrado em Botânica).

LAINETTI, R.; PEREIRA, N. A.; NEVES, L. (1995): Mecanismo Tóxico de Comigo-Ninguém-Pode *Dieffenbachia picta* SCHOTT, a “Planta Armada”, e de Outras Aráceas Ornamentais. *Ver. Infarma*, **4**:5-7.

LEE, K. G.; SHIBAMOTO, T. (2000): Antioxidants Properties of aroma compounds isolated from soybeans and mung beans. *J. Agric. Food Chem.*, **48**: 4290-4293.

LIMA, C. C.; CRIDDLE, D. N.; SOUZA, A. N. C.; MONTE, F. J.; JAFFAR, M.; LEAL-CARDOSO, J. H. (2000): Relaxant and antispasmodic actions of methyleugenol on guinea pig isolated ileum. *Planta Med.*, **66**: 408-411.

LIPP, F. J. (1996): La maladie, la médecine et l’histoire. In *Lés Plantes et Leurs Secrets*, 18-21. Albin Michel S.A., Paris:

LORENZI, H., SOUZA, H. M. (1981): Plantas Ornamentais do Brasil. Ed. Plantarum Ltda. São Paulo, 143-179.

MADAUS, G.; KOCH, F. E. (1941): Tierexperimentelle studien zur frage der medikamentönsen sterilisierung (durch *Caladium seguinum* [*Dieffenbachia seguinum*]). *Zeitsch. f. d. Gesante Experimentelle Medizin*, 109: 68-87.

MADISON, M. T. (1979): Protection of developing seeds in neotropical Aracea. *Aroideana*, 2: 52-61.

MARDEROSIAN, A. D.; ROIA, F. R. (1979): Literature review and clinical management of household ornamental plants potencially toxic to humans. EM Kinghorn, A.D. *Toxic Plants*, 101-124, Columbia University Press, USA.

MAYO, S. J.; BOGNER, J.; BOYCE, P. C. (1997): *The genera of Araceae*. Royal Botanic Gardens, Kew, Belgium.

MELLO, A. C.; CARLINI, E. A.; DRESSER, K.; GREEN, J. P.; KANG, S.; MARGOLIS, S. (1973): Behavioral observations on coumpounds found in nutmeg. *Psycopharmacol.*, 31: 349-363.

McDONALD, J. W.; HEFFINER, J. E. (1991): Eugenol causes oxidant-mediated edema in isolated perfused rabbit lungs. *Am. Rev. Respir. Dis.*; 143:806-809.

McGOVERN, T. W. (2000): Botanical briefs: dumb-cane *Dieffenbachia picta* (Lodd.) Schott. *Cutis*, **66**: 333-334.

MONTE, F. J. Q.; JAFFAR, M.; CARDOSO, J. H. L. (2000): Relaxant and Antiespasmotic Actions of Methyleugenol on Guinea-Pig Isolated Ileum, *Planta Med.*, **66**: 408-411.

MORAIS, S. M.; FERNANDES FILHO, E. S.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L.; SOARES, J. B.; ANDRADE, A. P. S. (1996): Óleos essenciais de plantas brasileiras: estudo químico, atividade bactericida e possível utilização em cimentos dentários. *Rev. Bras. Farm.*, **77**:42-44.

OCCHIONI, P.; RIZZINI, C. T. (1974): Ação tóxica de duas espécies de *Dieffenbachia*, *Rev. Bras. Med.*, **15**: 10-16.

OGATA, M.; HORSHI, M.; URANO, S.; ENDO, T. (2000): Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. *Chem. Pharm. Bull*, **48**: 1467-1469.

OHKUBO, T.; KITAMURA, K. (1997): Eugenol activates Ca^{2+} permeable currents in rat dorsal root ganglion cells. *J. Dent. Res.*, **76**: 1737-1744.

OKADA, N.; SATOH, K.; ATSUMI, T.; TAJIMA, M.; ISHIHARA, M.; SUGITA, Y.; YOKOE, I.; SAKAGAMI, H.; FUJISAWA, S.(2000): Radical modulating activity and

citotoxic activity of synthesized eugenol-related compounds. *Anticancer Res.*, 20: 2955-2960.

OLIVEIRA, A. B.; OLIVEIRA, J. J.; SHAAT, V. T. (1982): Synthesis and biological activity of eugenol derivatives. *Rev. Latinoamer. Quim.*, 13: 8-11.

PAMIES, R. J.; POWELL, R.; HEROLD, A. H.; MARTINEZ, J. (1992): The *Dieffenbachia* plant: case history. *J. Fla. Med. Assoc.*, 79: 760-761.

POHL, R.W. (1964): *Dieffenbachia* poisoning: a clarification. *JAMA*, 187: 963.

RASHEED, A; LAKEMAN, G. M.; VLIETINK, J.; HATFIELD, G.; TOTTE, J.; HERMAN, A G. (1984): Pharmacological Influence of nutmeg and nutmeg constituents on rabbit platlet function. *Planta Med.*, 37: 222-226.

RAUBER, A. (1985): Observations on the idioblasts of *Dieffenbachia*. *J. Toxicol Clin. Toxicol.* 23: 79-90.

REITER, M.; BRANT, W. (1985) : Relaxant effects on tracheal and ileal smooth muscles of the guinea pig. *Arzneimittelforschung*, 35(1A): 408-14.

RIZZINI, C. T.; OCCHIONI, P. (1957): Ação Tóxica das *Dieffenbachia picta* e *D. seguine*. *Rodriguesia*; 32: 5-19.

- RIZZINI, C. T.; MORS, W. B. (1976): Botânica Econômica Brasileira, São Paulo, EPU, Ed. Universidade de São Paulo, 65-66.
- SEET, B.; CHAN, W. K.; ANG, C. L. (1995): Crystalline Keratopathy from *Dieffenbachia* plant sap, *Br. J. Ophthalmol.*, **79**: 98-99.
- SENSCH, O.; VIERLING, W.; BRANT, W.; REITER, M. (1993): Calcium-Channel Blocking Effect of Constituents of Clove Oil. *Planta Med.*, **59**; Supp.: A 687.
- SOBER, H. A.; HOLLANDER, F.; SOBER, E. K. (1950): Toxicity of Eugenol: Determination of LD50 on Rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **73**: 148-151
- SPORKE, D. G.; SMOLINSKE, S. C. (1999): Toxicity of Houseplants. POISINDEX[®] System, Denver, Colorado, EUA, CRC Press, 119-121.
- STICHT, F. D.; SMITH, R. M. (1971): Eugenol: some pharmacologic observations. *J. Dent. Res.*, **50**: 1531-1535.
- SUZUKI, Y.; SUGIYAMA, K.; FURUTA, H. (1985): Eugenol-mediated superoxide generation and cytotoxicity in guinea pig neutrophils. *Jpn J. Pharmacol.*, **39**: 381-386.
- SZABADICS, J.; ERDELYI, L. (2000): Pre and postsynaptic effects of eugenol and related compounds on *Helix pomatia* L. neurons. *Acta. Biol. Hung.*; **51**:256-273.

TEISSEDRE, P. L.; WATERHOUSE, A. L. (2000): Inhibition of oxidation of human low-density lipoproteins by phenolic substances in different essential oils varieties. *J. Agric. Food Chem.*, **48**: 3801-3805.

THOM, S. R.; FISHER, D.; MANEVICH, Y. (2001): Roles for platelet-activating factor and NO-derived oxidants causing neutrophil adherence after CO poisoning. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, **281**: H923-H930.

TODA, S.; OHNISHI, M.; KIMURA, M.; TODA, T. (1994): Inhibitory effects of Eugenol and relatives compounds on lipid peroxidation induced by reactive oxygen. *Planta Med.*, **60**.

VAN DAMME, E. J. M.; GOOSSENS, K.; SMEETS, K.; VAN LEUVEN, F.; VEHAERT, P.; PEUMANS, W. J. (1995): The major tuber storage protein of Araceae Species is a Lecitin: *Plant Physiol.*, **107**: 1147-1158.

VAN DER BERG; M. E. (1982): Plantas Mediciniais da Amazônica, Belém, pg 58-59.

VAN DER BROUKE, C. O.; LEMLI, J. A. (1980): Antispasmodic activity of *Origanum compactum*. *Planta Med.*, **38**: 317-331.

- VIDHYA, N.; DEVARAJ, S. N. (1999): Antioxidant effect of eugenol in rat intestine. *Indian J. Exp. Biol.*, **37**: 1192-1195.
- WALTER, W. G. (1967): *Dieffenbachia* toxicity. *JAMA.*, **201**: 140-141.
- WALTER, W. G.; MUNI, I. A. (1968): Toxicology of several *Dieffenbachia* species. *Ind. J. Hosp. Pharm.*, **132**: 212-214.
- WALTER, W. G.; KHANNA, P. N. (1972): Chemistry of the aroids. I *Dieffenbachia seguine, amoena* and *picta.*, *Econ. Bot.*, **26**: 364-372.
- WILLIAMS, C. A.; HARBONE, J. B. (1971): Flavonoid patterns in the monocotyledons. Flavonols and flavones in some families associated with the Poaceae. *Phytochemistry*, **10**: 1059-1063.
- WILLIAMS, C. A.; HARBONE, J. B.; MAYO, S. J. (1981): Anthocyanin pigments and leaf flavonoids in the family Araceae. *Phytochemistry*, **20**: 217-234.
- WRIGHT, S. E.; BARON, D. A.; HEFFNER, J. E. (1995): Intravenous Eugenol causes hemorrhagic lung edema in rats: proposed oxidant mechanisms. *J. Lab. Clin. Med.*, **125**: 257-264.

ZIMMERMANN, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, *16*: 109-110.