

ORIGINALNI RAD – ORIGINAL PAPER

DOI: 10.2298/VETGL1204185J

UDK 547.566.2:599.324.4:615.032

**ISPITIVANJE PODNOŠLJIVOSTI PRODUŽENE PERORALNE
PRIMENE EUGENOLA KOD PACOVA******THE ASSESSMENT OF TOLERABILITY OF PROLONGED ORAL
EUGENOL ADMINISTRATION IN RATS*****Milanka Jezdimirović, Nevenka Aleksić, S. Trailović, S. Ivanović,
N. Jezdimirović****

Ispitivana je potencijalna toksičnost, odnosno opšta podnošljivost eugenola posle dvonedeljne i četvoronedeljne kontinuirane p.o. primene. Ogljed je izveden na 72 mužjaka pacova soja vistar. Četiri grupe pacova tretirane su različitim dozama eugenola (10 mg/kg tm/dan, 50 mg/kg, 200 mg/kg i 400 mg/kg tm/dan), peta grupa dobijala je vehikulum (0,5 % metil-celuloza, propilen-glikol i voda), a šesta je bila kontrolna grupa. Odgovarajuće doze eugenola i vehikuluma aplikovane su gastričnom sondom u volumenu od 1 ml/100 g telesne mase. Opšta podnošljivost eugenola procenjavana je na osnovu dnevnog unosa vode i hrane, telesne mase, opšteg zdravstvenog stanja, ponašanja i letaliteta tokom ogljeda.

U ispitivanim dozama eugenol primenjivan p.o. tokom dve ili četiri nedelje ne utiče značajno na unos hrane, vode i telesnu masu pacova. Doza od 400 mg/kg/dan dovela je do neželjenih reakcija (uznemirenost i hiperestezija) koje su prvi put zapažene 21. dana i trajale su do kraja ogljeda.

Ustanovljena je niska subakutna toksičnost eugenola posle p.o. primene kod pacova. Doze eugenola od 200 i 400 mg/kg tm/dan imaju nizak toksični potencijal i bezbedne su za primenu kod ove vrste životinja.

Ključne reči: eugenol, toksičnost, pacov, unos hrane i vode

* Rad primljen za štampu 07. 10. 2011. godine

** Dr sc. med. vet. Milanka Jezdimirović, red. profesor, dr sc. med. vet. Nevenka Aleksić, red. profesor, dr sc. med. vet. Saša Trailović, vanr., profesor, mr sc. med. vet. Saša Ivanović, asistent, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu; Nemanja Jezdimirović, dipl. vet., Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd

Uvod / Introduction

Savremeni pristup kontroli zdravlja životinja zasnovan je, između ostalog, na ograničenoj primeni antibakterijskih i antiparazitskih lekova. Osim unapređenja dobrobiti životinja, ovim se postižu još dva cilja: dobija se hrana za ljude bez rezidua lekova i smanjuje se kontaminacija životne sredine lekovima i njihovim metabolitima koje eliminišu tretirane životinje.

Upotreba ekstrakta biljaka, esencijalnih ulja i bioaktivnih molekula može da smanji incidenciju bakterijskih, gljivičnih, parazitskih i virusnih infekcija kod životinja, ali i da obezbedi veće proizvodne rezultate i bolji kvalitet mesa i mleka. Veliki broj biljaka i njihovih bioaktivnih jedinjenja može se koristiti kao zoaditivi jer povećavaju konzumiranje, svarljivost i konverziju hrane kod životinja. Mnoge vrste biljaka ili njihovih ekstrakata upotrebljenih u ishrani životinja omogućavaju optimalan masnokiselinski sastav animalnih proizvoda, što je od suštinskog značaja za unapređenje zdravlje ljudi (Grdovic i sar., 2010).

Određene začinske i lekovite biljke, kao što su cimet, karanfilić i slačica, imaju snažnu antibakterijsku aktivnost i efikasnost. Ona je nešto slabija kod kumina, origana, žalfije, majčine dušice i ruzmarina, a sasvim slaba kod bibera i đumbira. Ove biljke i njihova eterična ulja deluju na brojne vrste mikroorganizama, kontaminata hrane namenjene ljudima i životinjama (Beuchat, 1994; Nakatani, 1994; Smith-Palmer i sar., 1998; Hara-Kudo i sar., 2004; Škrinjar i Nemet, 2009).

Dokazana je antimikrobna aktivnost aktivnih komponenti esencijalnih ulja začinskih i lekovitih biljaka: eugenola iz karanfilića, timola iz majčine dušice i origana, karvakrola iz origana, vanilina iz vanile, alicina iz belog luka, cinamaldehida iz cimeta i alil-izotiocijanata iz senfa (Lopez-Malo i sar., 2006). Do sada su opisana brojna farmakološka dejstva eugenola i srodnih jedinjenja (metil-eugenol, izo-eugenol). Za veterinarsku praksu značaj imaju antibakterijsko (Ratajac, 2005; Chaieb i sar., 2007; Seed i Tariq, 2008), antigljivično (Chami i sar., 2004, 2004a; Choi, 2005) i antiparazitsko (Asha i sar., 2001; Pessoa i sar., 2002; Yang i sar., 2003; Kim i sar., 2003; Jezdimirović i sar., 2006; Jezdimirović i sar., 2010; Aleksić i sar., 2011) dejstvo.

S obzirom na široku mogućnost primene eugenola u veterinarskoj medicini, kako za prevenciju tako i za lečenje bolesti različite etiologije, ovo ispitivanje izvedeno je sa ciljem da se ustanovi njegova subakutna peroralna toksičnost, odnosno bezbednost primene kod pacova. Utvrđivanje doza eugenola koje prouzrokuju neželjene i toksične efekte omogućava sagledavanje toksikološkog profila ovog zoaditiva i potencijalnog leka.

Materijal i metode rada / *Material and methods*

Ispitivanje opšte podnošljivosti, odnosno toksikološkog profila eugenola, izvedeno je na ukupno 72 pacova muškog pola soja vister, uzrasta oko dva meseca i prosečne telesne mase $227,02 \pm 26,37$ g.

Adaptacija životinja pre početka eksperimenta trajala je sedam dana, posle čega su metodom slučajnog izbora podeljene u šest jednakih grupa. Četiri grupe tretirane su različitim dozama eugenola, peta je dobijala vehikulum, a šesta nije bila tretirana.

Pacovi su bili smešteni u kavezima od pleksiglasa (po šest životinja u svakom kavezu), u prostoriji sa prirodnim svetlošću, temperaturom 18° - 24° C i relativnom vlažnošću vazduha 50-70 %. Hranjeni su peletiranom hranom za pacove (Veterinarski zavod Subotica a.d, Subotica). Hrana i voda bile su im na raspolaganju bez ograničenja.

Tokom ogleada sa životinjama je postupano u skladu sa etičkim principima Pravilnika o radu sa životinjama na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu (2008).

Eugenol je aplikovan u dozama od 10 mg/kg telesne mase (I grupa), 50 mg/kg tm (II grupa), 200 mg/kg tm (III grupa) i 400 mg/kg tm (IV grupa), peroralno, svakodnevno, tokom četiri nedelje. Etanolni 50 % rastvor eugenola (Essentico, Kula) razblaživan je metil-celulozom (sa udelom mase od 0,5 %), propilen-glikolom (20 %) i vodom do rastvora koji u volumenu od 100 ml sadrži 100 mg, 500 mg, 2000 mg i 4000 mg eugenola. Volumen odgovarajućeg rastvora eugenola i vehikuluma aplikovani su gastričnom sondom u količini od 1 ml/100 g telesne mase pacova.

Kontrolna grupa pacova dobijala je vehikulum, koji se sastoji od metil-celuloze, etanola, propilen-glikola i prečišćene vode, u dozi od 1 ml/100 g telesne mase. Kontrolna grupa pacova nije tretirana niti jednom supstancom.

U cilju provere opšte podnošljivosti i peroralne subakutne toksičnosti eugenola ispitan je njegov uticaj na:

- dnevni unos vode i hrane,
- telesnu masu pacova,
- opšte zdravstveno stanje, ponašanje i letalitet pacova.

Unos hrane i vode meren je svaki drugi dan, a telesna masa pacova svaki dan neposredno pre aplikacije eugenola, odnosno vehikuluma.

Telesna masa pacova merena je elektronskom vagom VLC B1 (Radwag, Poljska).

Rezultati su obrađeni primenom mera varijacije (srednja vrednost, standardna devijacija, standarna greška aritmetičke sredine). Za testiranje statističke značajnosti razlika srednjih vrednosti ispitivanih parametara između grupa pacova primenjena je analiza varijanse i Tukey test. Za promenu unosa hrane i vode i telesne mase u funkciji vremena određeni su koeficijenti korelacije. Statistička obrada podataka urađena je primenom Excell 2007 (MS Office 2007, Microsoft Corporation).

Rezultati i diskusija / Results and Discussion

Uticaj eugenola na unos hrane kod pacova / *The influence of eugenol on food intake in rats*

Prosečan unos hrane, izražen na 100 g telesne mase, smanjivao se u svim grupama pacova tokom ispitivanja (tabela 1).

Tabela 1. *Prosečan dnevni unos hrane kod kontrolnih pacova i tretiranih eugenolom (g/100 g tm)*
Table 1. *The average daily food intake in control rats and those treated with eugenol (g/100 g bm)*

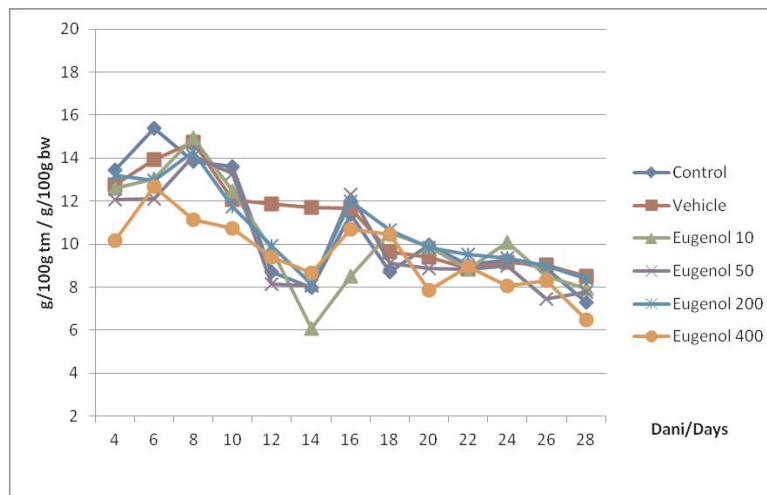
Tretman/Treatment	Dani / Days				
	1	7	14	21	28
Apsolutna kontrola / <i>Absolute control</i>	13,44	14,43	7,98	9,50	7,29
Vehikulum / <i>Vehicle</i>	12,75	14,32	11,71	9,15	8,50
Eugenol 10 mg/kg	12,58	14,00	6,09	9,36	7,95
50 mg/kg	12,05	13,11	8,07	8,85	7,77
200 mg/kg	13,19	13,62	8,13	9,68	8,38
400 mg/kg	10,16	11,91	8,68	8,40	6,48

Eugenol primenjivan u različitim dozama nije statistički značajno uticao na količinu unete hrane: prosečan dnevni unos kretao se u rasponu od 6,48 do 14,43 g/100 g telesne mase.

Prosečan dnevni unos hrane kod kontrolnih pacova u ovom ogledu ne razlikuje se bitno od podataka koje su dobili Harkness i Wagner (1989) (od 10 do 14,2 g hrane/100 g tm/dan) tokom jednogodišnjeg ispitivanja. Takođe, naš nalaz je u saglasnosti sa literaturnim podacima koji ukazuju na to da najviša ispitivana doza eugenola, koja je tri do sedam puta manja od akutne peroralne LD 50 za pacova, kao ni niže testirane doze, ne utiču značajno na prosečan unos hrane kod ove vrste životinja (<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v56je09.pdf>; <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v17je10.htm>).

Prosečan unos hrane kod kontrolnih pacova (AK, K) i pacova tretiranih eugenolom tokom četiri nedelje nije se značajno razlikovao (slika 1).

Najmanji prosečan unos hrane tokom oglada zabeležen je kod pacova tretiranih najvišom dozom eugenola: od 10,16 g/100 g tm (1. dan) do 6,48 g/100 g tm (28. dan) (tabela 1, slika 1). Vrlo je verovatno da je ova pojava posledica kontinuiranog lokalnog nadražajnog dejstva eugenola na sluznicu želuca, odnosno razvoja gastritisa praćenog povećanom sekrecijom gastričnih žlezda (hiperaciditet, pojačana aktivnost tripsina) (EMEA, 1998). Slične promene u želucu pacova prouzrokovao je metil-eugenol primenjivan p.o. tokom trideset dana u doznom rasponu od 37 do 150 mg/kg/dan (Abdo i sar., 2001).



Slika 1. Prosečan unos hrane kod kontrolnih pacova i tretiranih eugenolom /
Figure 1. The average food intake in control rats and those treated with eugenol

Smanjenje dnevnog unosa hrane zabeleženo u poslednjoj nedelji oglada u direktnoj je vezi sa smanjenim dnevnim unosom vode, što je već ranije bilo zapaženo (Crampton i Lloyd, 1954).

Koeficijent korelacije između prosečnog unosa hrane po jedinici telesne mase pacova i vremena proteklog od početka oglada bio je visok u svim grupama ($p < 0,01$). U kontroli iznosio je $r = -0,80$, u grupi tretiranoj vehikulom $r = -0,92$, u grupi tretiranoj eugenolom u dozi od 10 mg/kg $r = -0,67$, dozom od 50 mg/kg $r = -0,74$, 200 mg/kg $r = -0,79$ i $r = -0,81$ u grupi pacova tretiranoj eugenolom u dozi od 400 mg/kg.

Uticaj eugenola na unos vode kod pacova / *The influence of eugenol on water intake in rats*

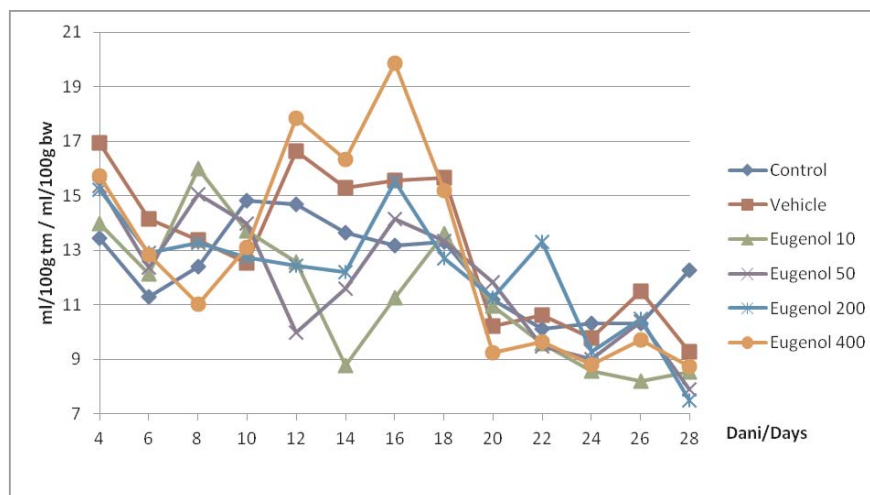
Prosečan unos vode u kontrolnoj i svim oglednim grupama pacova nije se statistički značajno razlikovao tokom trajanja oglada (tabela 2 i slika 2).

U kontrolnoj grupi pacova prosečan unos vode kretao se od 9,45 do 14,37 ml/100 g tm, u kontrolnoj grupi sa vehikulom od 9,23 do 15,30 ml/100 g tm. U grupi pacova koja je dobijala eugenol u dozi od 10 mg/kg tm prosečan unos vode iznosio je od 8,54 do 14,63 ml/100 g tm, u grupi koja je dobijala dozu od 50 mg/kg tm od 7,91 do 14,06 ml/100 g tm, u grupi tretiranoj eugenolom u dozi od 200 mg/kg tm od 7,49 do 15,49 ml/100 g tm, a u grupi tretiranoj najvišom dozom eugenola, 400 mg/kg tm, prosečan unos vode kretao se od 8,73 do 16,33 ml/100 g tm tokom perioda ispitivanja (tabela 2).

U periodu od 12. do 18. dana ogleđa prosečan unos vode kod pacova tretiranih najvišom dozom eugenola znatno se povećao u odnosu na sve ostale grupe. Dvanaestog dana iznosio je 17,83 ml/100 g tm, 14. dana 16,33 ml, 16. dana 19,86 ml i 18. dana 15,20 ml/100 g tm. Posle ovog perioda prosečan unos vode značajno se smanjivao do kraja ispitivanja. Slično smanjenje zabeleženo je od 20. dana do kraja ogleđa i u grupi pacova tretiranoj eugenolom u dozi od 200 mg/kg, 50 mg/kg i 10 mg/kg tm (tabela 2, slika 2).

Tabela 2. Prosečan unos vode (ml/100 g tm) kod kontrolnih pacova i tretiranih eugenolom
Table 2. The average water intake (ml/100 g BM) in control and rats treated with eugenol

Tretman / Treatment	Dani / Days				
	1	7	14	21	28
Kontrola / Control	14,37	11,93	13,64	9,45	12,26
Vehikulum / Vehicle	14,12	13,08	15,30	12,28	9,23
Eugenol 10 mg/kg	14,63	13,71	8,75	10,66	8,54
Eugenol 50 mg/kg	13,62	14,06	11,59	10,26	7,91
Eugenol 200 mg/kg	15,49	13,76	12,20	10,41	7,49
Eugenol 400 mg/kg	13,40	11,86	16,33	10,66	8,73



Slika 2. Prosečan unos vode kod kontrolnih pacova i tretiranih eugenolom /
Figure 2. The average water intake in control rats and those treated with eugenol

Smanjen unosa vode nije zavisio od veličine doze eugenola, te se ne može pripisati njegovom toksičnom dejstvu. Prosečan dnevni unos vode u ovom

ispitivanju nije se bitno razlikovao od ranije objavljenih podataka za odrasle pacove soja vistar (Harkness i Wagner, 1989; Hau i Van Hoosier, 2002).

Koeficijent korelacije između prosečne količine unete vode po jedinici telesne mase pacova i vremena proteklog od početka oglada bio je umeren do visok u svim grupama ($p < 0,05$). U kontrolnoj grupi iznosio je $r = -0,53$, u grupi tretiranoj vehikulomom $r = -0,78$, u grupi tretiranoj eugenolom u dozi od 10 mg/kg $r = -0,76$, dozama od 50 i 200 mg/kg $r = -0,78$ i $r = -0,56$ u grupi pacova tretiranoj dozom eugenola od 400 mg/kg.

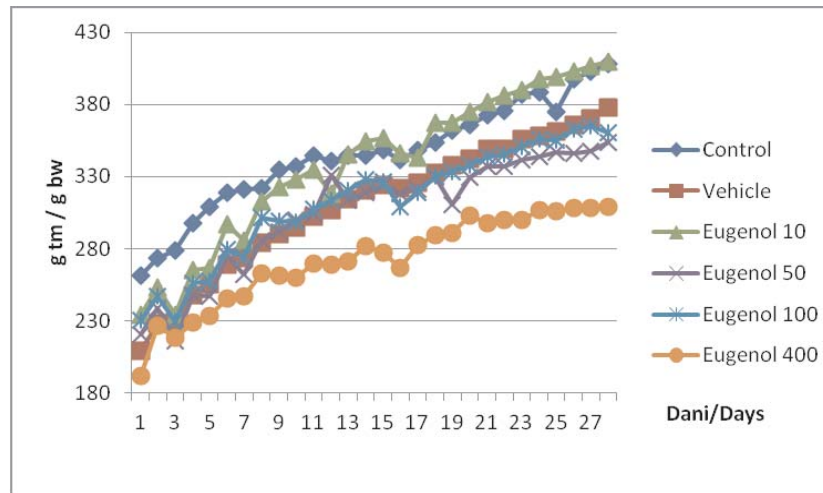
Uticaj eugenola na telesnu masu pacova / *The influence of eugenol on body weight in rats*

Prosečna telesna masa pacova u eksperimentu i najvažniji statistički parametri koji ih definišu prikazani su u tabeli 3.

Tabela 3. Prosečna telesna masa pacova tokom oglada
Table 3. The average rat body mass throughout the research

Tretman / Treatment	Dan / Day	\bar{X}	SD	SE	IV
Kontrola / Control	1	261.50	11.72	3.71	244-284
	7	320.80	19.54	6.18	290-350
	14	344.60	22.50	7.12	300-374
	21	372.40	19.49	8.72	340-390
	28	422.40	29.64	13.26	388-460
Vehicle	1	209.00	24.24	7.67	180-240
	7	273.80	23.69	7.49	226-302
	14	320.20	24.85	7.86	264-350
	21	342.40	24.35	10.89	306-366
	28	385.20	30.55	13.66	348-418
Eugenol 10 mg/kg	1	233.83	18.77	5.42	210-280
	7	285.33	23.79	6.87	250-340
	14	354.17	24.37	7.03	322-406
	21	375.67	19.99	8.16	354-394
	28	414.00	27.07	11.05	382-452
Eugenol 50 mg/kg	1	220.83	20.65	5.96	190-250
	7	262.24	24.45	7.06	212-300
	14	319.00	25.63	7.40	270-352
	21	329.33	36.74	15.00	284-384
	28	359.60	52.56	23.51	280-414
Eugenol 200 mg/kg	1	230.17	18.02	5.20	200-270
	7	274.00	24.86	7.18	226-320
	14	327.83	31.35	9.05	280-386
	21	338.00	37.39	15.27	302-384
	28	364.67	37.90	15.47	324-410
Eugenol 400 mg/kg	1	192.00	5.06	2.07	186-200
	7	246.67	32.71	7.71	184-300
	14	281.72	37.14	8.75	216-342
	21	302.67	38.41	11.09	232-372
	28	314.00	30.43	8.78	274-382

Prosečna telesna masa pacova kontrolne grupe i onih tretiranih eugenolom i vehikulom imala je pozitivan trend (tabela 3, slika 3).



Slika 3. Prosečna telesna masa kontrolnih pacova i tretiranih eugenolom tokom ogleđa / Figure 3. The average body mass in control rats and those treated with eugenol throughout the experiment

Na početku ispitivanja prosečna telesna masa pacova tretiranih eugenolom u dozi od 10 mg/kg tm iznosila je 233,83 g, dozom od 50 mg/kg 220,83 g, od 200 mg/kg (230,17 g), a najvišom dozom eugenola (400 mg/kg) 192,00 g. Do kraja ispitivanja razlike u telesnoj masi pacova tretiranih različitim dozama eugenola ostale su srazmerne vrednostima prvog dana ispitivanja.

Telesna masa pacova kontrolnih grupa se povećavala vremenom bez značajnih varijacija. Eugenol primenjivan u dozama od 10, 50 i 200 mg/kg tm neznatno je uticao na telesnu masu pacova. Izuzetak predstavlja najviša ispitivana doza, 400 mg/kg, koja prouzrokuje značajno smanjenje prirasta telesne mase u poređenju sa kontrolama, ali ne i sa nižim dozama eugenola (slika 3).

Naši rezultati ispitivanja uticaja eugenola na prirast telesne mase pacova tokom 28 dana uglavnom su u saglasnosti sa odgovarajućim iz relevantne literature koji su dobijeni sa komparabilnim ili nekoliko puta većim dozama eugenola primenjivanim tokom različitih vremenskih perioda. Ustanovljeno je, na primer, da eugenol davan u hrani tokom tri meseca u dozi od 89,7 mg/kg ne utiče na telesnu masu pacova (Trubek Laboratories, 1958), kao ni u dozi od 800 mg/kg/dan ako se primenjuje tokom tri meseca (<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v17je10.htm>).

Slični rezultati dobijeni su posle primene eugenola u hrani u dozi većoj od 1000 mg/kg/dan tokom 133 dana (Hagan i sar., 1967), kao i posle primene doza od 1400 do 4000 mg/kg tokom mesec dana (Hagan i sar., 1965; 1967).

Naš nalaz da najviša testirana doza eugenola, 400 mg/kg, primenjena tokom četiri nedelje prouzrokuje značajno smanjenje prirasta telesne mase u odnosu na netretirane pacove u saglasnosti je sa rezultatima drugih autora koji su dokazali da eugenol primenjivan u dozi od 250 i 500 mg/kg tm/dan tokom deset dana prouzrokuje dozno zavisno smanjenje prirasta kod pacova (Rompelberg, 1993). Smanjeni prirasta telesne mase za 10 do 15 % uočen je posle tromesečnog tretiranja pacova eugenolom u dozi od 1250 mg/kg (NTP, 1983) i posle jednomesečnog tretmana dozom od 2000 mg/kg tm (Hirose i sar, 1987).

Uticaj eugenola na ponašanje i preživljavanje pacova / *The influence of eugenol on rat behavior and survival*

Ispitivanje podnošljivosti eugenola tokom četvoronedeljne primene podrazumevalo je praćenje ponašanja i preživljavanja tretiranih pacova. Ustanovljeno je da eugenol primenjivan u dozama od 10, 50 i 200 mg/kg tm ne utiče na ponašanje pacova. Međutim, najviša ispitivana doza (400 mg/kg/dan) prouzrokovala je uznemirenost i preosetljivost (hiperestezija), što je zapaženo prilikom hvatanja i sputavanja pacova u cilju aplikacije eugenola. Ove promene u ponašanju prvi put su uočene posle tri nedelje od početka svakodnevne aplikacije leka.

Zaključak / Conclusion

Na osnovu rezultata ispitivanja podnošljivosti, odnosno stepena toksičnosti eugenola primenjivanog p.o. kod pacova tokom 14 i 28 dana, mogu da se izvedu određeni zaključci.

Eugenol primenjivan tokom 14 i 28 dana u dozama od 10, 50, 200 i 400 mg/kg ne utiče značajno na unos hrane i vode, niti na telesnu masu pacova.

Niže testirane doze eugenola (10, 50 i 200 mg/kg) primenjivane tokom 28 dana ne prouzrokuju uginuće, neželjene reakcije niti promene u ponašanju pacova. Najveća ispitivana doza eugenola, 400 mg/kg, prouzrokuje povećanu osetljivost pacova na dodir i uznemirenost počev od 21. dana primene.

Pacovi dobro podnose produženu p.o. primenu eugenola. Njegova subakutna peroralna toksičnost kod pacova je niska, a doze od 200 i 400 mg/kg mogu da se smatraju bezbednim.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT

Rezultati rada su deo naučno-istraživačkog projekta u oblasti integralnih i interdisciplinarnih istraživanja (evidencioni broj Projekta 46009) koji je finansiran od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

The results are part of a scientific-research project in the area of integral and interdisciplinary investigations (project number 46009) which is financed by the Ministry for Science and Technological Development of the Republic of Serbia.

Literatura / References

1. Abdo KM, Cunningham ML, Snell ML, Herbert RA, Travlos GS, Eldridge SR, Bucher JR. 14-Week toxicity and cell proliferation of methyleugenol administered gavage to F344 rats and B6C3F1 mice. *Food Chem Toxicol* 2001; 39: 303-16.
2. Aleksić N, Jezdimirović M, Jezdimirović N. On the efficacy of eugenol in the treatment of sheep mange, 19th International Congress of Mediterranean Federation of Health and Production of Ruminants (Femesprum), Belgrade 2011, Congress Proceedings, 322-7.
3. Asha MK, Prashanth D, Murali B, Pdmja R, Amit A. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum sanctum* and eugenol. *Fitoterapia* 2001; 72: 669-70.
4. Beuchat LR. Antimicrobial properties of spices and their essential oils. In: *Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation*. Y M Dillon and R G Board (editors), CAB International, Oxon, 1994; 167-79.
5. Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Kahla-Nakbi A, Rouabhia M, Mahdouani K, Bakhrouf A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. *Myrtaceae*) *Phytother Res* 2007; 21: 501-6.
6. Chami F, Chami N, Bennis S, Trouillas J, Remmal A. Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model. *J Antimicrob Chemother* 2004a; 54: 909-14.
7. Chami N, Chami F, Bennis S, Trouillas J, Remmal A. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *BJID* 2004; 8(3): 217-26.
8. Choi IG. Antifungal compounds from several essential oils against dermatophytes. *China Wood Sci Res.* 2005; 8: 28-34.
9. Crampton EW, Lloyd LE. The effect of water restriction on the food intake and food efficiency of growth rats. *J Nutrition* 1954; 54: 221-4.
10. CVMP EMEA/MRL/406/98 Final Caryophylli aetheroleum summary report, 1998.
11. Eugenol, <http://chemicaland21.com/specialtychem/perchem/EUGENOL.htm>. Accessed Oct 4, 2011.
12. Eugenol, <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v17je10.htm>.
13. European Medicines Agency. Assessment report on *Syzygium aromaticum* (L.) Merrill et L.M. Perry, flos and *Syzygium aromaticum* (L.) Merrill et LM Perry, floris aetheroleum, 2011, http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPC_assessment_report/2011/03/WC500104268.pdf.
14. Grdović S, Šefer D, Petrujkić B. Uticaj biljnih ekstrakata dodatih u hranu na proizvodne i reproduktivne rezultate preživara. *Vet. glasnik* 2010; 64(3-4): 207-18.
15. Hagan EC, Hansen WH, Fitzhugh OG, Jenner PM, Jones WI, Taylor JM, Long EL, Nelson AA, Brouwer JB. Food flavorings and compounds of related structure II. Subacute and chronic toxicity. *Food Cosmet Toxicol* 1967; 5: 141-57.
16. Hagan EC, Jenner PM, Jones WH, Fitzhugh OG, Long EL, Brouwer JG, Webb WK. Toxic properties of compounds related to safrole. *Toxicol Appl Pharmacol* 1965; 7: 18-24.
17. Hara-Kudo Y, Kobayashi A, Sugita-Konishi Y, Kondo K. Antibacterial activity of plants used in cooking for aroma and taste. *J Food Protect* 2004; 67: 2820-4.
18. Harkness JE, Wagner JE. *The Biology and Medicine of rabbits and rodents*, 3rd Ed., Lea and Febiger, Philadelphia, 1989.

19. Hau J, Van Hoosier GL. Jr (Editors) Handbook of Laboratory animal Science, 2nd Ed: Animal Models, Volume II, CRC Press, Boca Raton, 2002.
20. Hirose M, Masuda A, Imaida K, Kagawa M, Tsuda H, Ito N. Induction of forestomach lesions in rats by oral administrations of naturally occurring antioxydants for 4 weeks. *Jpn J Cancer Res* 1987; 78: 317-21.
21. Jezdimirović M, Aleksić N, Radojičić B. Komparativno ispitivanje efikasnosti eugenola i benzil-benzoata u terapiji šuge ovaca. *Veterinarski glasnik* 2010; 64(3-4): 177-85.
22. Jezdimirović M, Kulišić Z, Aleksić N, Bjelić N, Ivanović S. Efikasnost eugenola u lečenju šuge svinja. *Veterinarski glasnik* 2006; 60: 33-42.
23. Kim EH, Kim HK, Ahn Yj. Acaricidal activity of clove bud oil compounds against *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphoidea). *J Agric Food Chem* 2003; 51: 885-9.
24. López-Malo A, Barreto-Valdivieso J, Palou E, Martin FS. Aspergillus flavus growth response to cinnamon extract and sodium benzoate mixtures. *Food Control* 2006; 18: 1358-62.
25. Methyleugenol, Report on carcinogenesis, Twelfth Edition, 2011, <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/twelfth/profiles/Methyleugenol.pdf>, Accessed Oct 4 2011, 15:45.
26. Nakatani N. Antioxidative and antimicrobial constituents of herbs and spices. In: Spices, Herbs and Edible Fungi. Ed. G. Charalambous, Elsevier Science, New York, 1994: 251-71.
27. NTP: Carcinogenesis studies of eugenol (CAS No. 97-53-0) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed studies), US Department of Health and Human Services, December 1983.
28. Pessoa LM, Morais SM, Berilaqua CML, Luciano JHS. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 2002; 109: 59-63.
29. Pravilnik o radu sa životinjama na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd 2008.
30. Ratajac R. Ispitivanje efikasnosti eugenola u preveniranju i lečenju infekcija brojlera izazvanih sa *Sallmonela enteritidis*. Specijalistički rad, Beograd, 2005.
31. Rompelberg CJM, Verhagen H, van Blanderen PJ. Effect of the naturally occurring alkylbenzenes eugenol and transanetole on drug metabolizing enzymes in rat liver. *Food Chem Toxicol* 1993; 31: 637-45.
32. Seed S, Tariq P. *In vitro* antibacterial activity of clove against gram negative bacteria. *Pak J Bot* 2008; 41: 2157-60.
33. Sipes IG, Mattia A. Eugenol, Related Hydroxyallylbenzene Derivatives. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v56je09.pdf>.
34. Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett Appl Microbiol* 1998, 26: 118-22.
35. Škrinjar M, Nemet N. Antimicrobial effects of species and herbs essential oils. *APTEFF* 2009; 40: 195-209.
36. Trubek Laboratories Inc. Toxicological screening of eugenol, p-methoxybenzaldehyde and piperonal in rats. Class IX: Aromatic aldehydes. Unpublished report to the Flavor and extract manufacturers of the USA. Submitted to WHO by the Flavor and extract manufacturers asociacion of the United States, Washington DC, USA, 1958.

37. Yang YC, Lee SH, Lee WJ, Choi DH, Ahn Yj. Ovicidal and adulticidal effects of *Eugenia caryophyllata* bud and leaf oil compounds on *Pediculus capitis*. J Agric Food Chem 2003; 51: 4884-8.

ENGLISH

THE ASSESSMENT OF TOLERABILITY OF PROLONGED ORAL EUGENOL ADMINISTRATION IN RATS

Milanka Jezdimirović, Nevenka Aleksić, S. Trailović, S. Ivanović, N. Jezdimirović

The potential toxicity and general tolerability of eugenol following two-week or four-week continuous p.o. administration to rats has been investigated. An experiment was performed on 72 male rats of the Wistar strain. Four groups of rats were treated with different doses of eugenol (10 mg/kg bm/day, 50 mg/kg, 200 mg/kg and 400 mg/kg bm/day), the fifth group was administered vehicle (0.5 % methylcellulose, propylene glycol and water), and the sixth group comprised absolutely untreated controls. The corresponding doses of eugenol and vehicle were applied using a gastric probe in a volume of 1 ml/100 g body mass. The general tolerability of eugenol was evaluated on the basis of the daily intake of water and food, body mass, general health condition, behaviour, and lethality in the course of the experiment.

In the investigated doses, eugenol applied p.o. in the course of two or four weeks does not influence significantly the intake of food, water, or body mass of rats. The dose of 400 mg/kg/day produced undesired reactions (agitation and hyperesthesia) that were first observed on day 21 and lasted until the end of the experiment.

Low subacute toxicity of eugenol was established following p.o. administration to rats. Eugenol in doses of 200 and 400 mg/kg tm/day has a low toxic potential and is safe for administration to this animal species.

Key words: eugenol, toxicity, rat, food and water intake

РУССКИЙ

ИСПЫТАНИЕ СНОСНОСТИ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОГО ПЕРОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ЭУГЕНОЛА У КРЫС

Миланка Ездимирович, Невенка Алексич, С. Траилович, С. Иванович, Н. Ездимирович

Испытана потенциальная токсичность, то есть общая сносность эугенола после двухнедельного непрерывного п.о. применения. Опыт выведен на 72 самца крыс штамма *Wistar*. Четыре группы крыс лечены различными дозами эугенола (10 мг/кг тм/день, 50 мг/кг, 200 мг/кг и 400 мг/кг тм/день), пятая группа получала вехикулум (0,5% метил-целлюлоза, пропилен-гликол и вода), а шестая была абсолютный нелеченный контроль. Отвечающие дозы эугенола и вехикулума апплицированы гастричным зондом в объеме от 1 мл/100 г телесной массы. Общая снос-

ность эугенола оценивна на основе дневного дохода воды и корма, массы тела, общего состояния здоровья, поведения и летальности в течение опыта.

В испытанных дозах эугенол применен п.о. в течение две или четыре недели не влияет значительно на прибыль корма, воды и массы тела крыс. Доза от 400 мг/кг/день привела до нежелательных реакций (беспокойство и гиперестезия), которые первый раз замечены 21 дня и продолжались до конца опыта.

Установлена низкая подострая токсичность эугенола от 200 и 400 мг/кг тм/день имеют низкий токсический потенциал безопасные для применения у этого вида животных.

Ключевые слова: эугенол, токсичность, крыса, доход корма и воды