

MARIANA CAVALCANTE PEDROSA PESSOA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO CONTENDO
NIM (*Azadirachta indica* L.), ANDIROBA (*Carapa guianensis* Aublet)
E CANA DE AÇUCAR (*Saccharum officinarum* L.) EM RATAS WISTAR.**

RECIFE

2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

MARIANA CAVALCANTE PEDROSA PESSOA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO CONTENDO
NIM (*Azadirachta indica* L.), ANDIROBA (*Carapa guianensis* Aublet)
E CANA DE AÇUCAR (*Saccharum officinarum* L.) EM RATAS WISTAR.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador:
Prof. Dr. Frederico Celso Lyra Maia

RECIFE

2009

Ficha Catalográfica

P475a Pessoa, Mariana Cavalcante Pedrosa
Avaliação da toxicidade do extrato contendo NIM
(*Azadirachta indica* L.), andiroba (*Carapa guianensis* Aublet) e
cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) em ratas Wistar /
Mariana Cavalcante Pedrosa Pessoa. -- 2009.
51 f. : il.

Orientador: Frederico Celso Lyra Maia.
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento
de Medicina Veterinária.
Inclui referências

CDD 636.089

1. Inseticida natural
 2. Fitoterápicos
 3. Toxicidade
 4. Patologia
- I. Maia, Frederico Celso Lyra
 - II. Título

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO CONTENDO
NIM (*Azadirachta indica* L.), ANDIROBA (*Carapa guianensis* Aublet)
E CANA DE AÇUCAR (*Saccharum officinarum* L.) EM RATAS WISTAR.**

Dissertação de Mestrado elaborada por

MARIANA CAVALCANTE PEDROSA PESSOA

Aprovada em...../...../.....

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. FREDERICO CELSO LYRA MAIA
Orientador – Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

Prof^a Dra. BEATRIZ BERLINCK D'UTRA-VAZ
Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

Prof. Dr. LÊUCIO CÂMARA ALVES
Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

Prof. Dr. VALDEMIRO AMARO DA SILVA JÚNIOR
Departamento de Fisiologia e Morfologia Animal da UFRPE

DEDICATÓRIA

Ao meu querido filho, Artur, maior presente da minha vida, que chegará para encher as nossas vidas de mais amor, alegria e esperança.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida que meu deu, e por ter colocado em meu caminho as pessoas que amo e com quem posso compartilhar momentos como esse.

Ao meu prezado Orientador, Prof. Frederico Maia, por mais essa prazerosa oportunidade de trabalharmos juntos como sua orientada e principalmente pela sua disponibilidade, paciência, carinho e atenção.

Ao Prof. Lêucio Alves, pela calma e pelo imenso apoio e incentivo durante todo o trabalho, e por ter sido um dos principais responsáveis pela realização deste projeto.

Ao Prof. Valdemiro Júnior, por sua colaboração, dando o suporte necessário para realização da parte experimental no biotério.

A Profa. Isabelle Meunier, pela realização da parte estatística, pela disponibilidade e paciência em tentar passar da melhor forma possível seus ensinamentos.

As Professoras Maria Cristina Coelho e Silvana Sueli, por aceitarem o convite em participar da banca examinadora.

Aos colegas, Fábio Brito, Luiza Alexandre e Sandra Torres pelo grande suporte e disponibilidade durante todo o período experimental.

Aos meus queridos pais, Ana e Pedro, grandes incentivadores de tudo na minha vida. Obrigada por serem sempre tão presentes e por terem ajudado a construir muito do que sou.

Aos meu dois amores: meu marido e colega, Homero Pessoa, pelo eterno apoio e amor ao nosso Artur que está para chegar e já meu grande incentivador.

A minha sogra, D. Conceição, que por tantas vezes deixou de resolver seus problemas para que eu pudesse resolver os meus.

Aos meus amigos queridos que perto ou longe sempre acreditaram em mim. Especialmente Joanna, Manoela e Sérgio.

A coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, pelo suporte durante todo o mestrado.

"Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar
irritado algumas vezes, mas não esqueço
que a minha vida é a maior empresa do
mundo.
E que posso evitar que ela vá à falência.
Ser feliz é reconhecer que vale a pena
viver, apesar de todos os desafios,
incompreensões e períodos de crise.
Ser feliz é deixar de ser vítima dos
problemas e se tornar autor da própria
história.
É atravessar desertos fora de si, mas ser
capaz de encontrar um oásis no
recôndito da sua alma.
É agradecer a Deus a cada manhã pelo
milagre da vida.
Ser feliz é não ter medo dos próprios
sentimentos.
É saber falar de si mesmo.
É ter coragem para ouvir um "não".
É ter segurança para receber uma crítica,
mesmo que injusta.
Pedras no caminho? Guardo todas, um
dia vou construir um castelo..."

(Fernando Pessoa)

RESUMO

Atualmente a procura de produtos inseticidas de origem natural vem se tornando crescente, principalmente pelo fato de serem biodegradáveis, evitando-se assim contaminação do ambiente e prejuízos à saúde da população. Dentre esses bioinseticidas podem-se destacar os produtos à base de nim (*Azadirachta indica* L.), árvore de origem asiática utilizada há séculos na Índia para diversos fins, e que teve suas propriedades inseticidas descobertas há apenas 30 anos, quando o seu principal composto, a azadiractina foi isolada. Neste contexto inclui-se também a andiroba (*Carapa guianensis* Aublet), uma das árvores mais cotadas da Região Amazônica, cujo óleo extraído das sementes possui um grande potencial comercial e inúmeras propriedades medicinais, sendo bastante comercializado na Amazônia. Desta forma, este projeto se propõe a estudar os efeitos de um produto piolhicideira à base de extrato concentrado contendo *Azadirachta indica* L., *Carapa guianensis* Aublet e *Saccharum officinarum* L., administrado em ratos Wistar. Os testes foram realizados em quatro grupos com oito ratos, cada um de acordo com as vias de inoculação que se seguem: ocular (OC), oral (P), subcutânea (SC), intraperitoneal (IP) e mais o grupo controle (C), constituído por quatro animais. As análises macroscópicas e microscópicas dos rins, coração, fígado, baço, estômago e intestino das ratas, assim como a realização de toda bioquímica sérica (proteínas totais, creatinina, uréia, aspartato-aminotransferase (AST), alanina-aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina, foram realizadas com o intuito de averiguar os possíveis efeitos tóxicos provocados pela administração deste concentrado. Os resultados das amostras apontaram apenas lesões em órgãos como fígado e baço nos animais do grupo intraperitoneal e na pele dos indivíduos do grupo de aplicação subcutânea. Parâmetros como creatinina, uréia, AST, ALT e fosfatase alcalina mostraram-se alterados nos diversos grupos, incluindo o controle, porém, apenas a AST demonstrou ser um parâmetro seguro para avaliação.

Palavras-chave: Inseticida natural, fitoterápicos, toxicidade.

ABSTRACT

Currently the demand for insecticides of natural origin it has been growing, mainly because they are biodegradable, thus avoiding contamination of the environment and harm people's health. Among these biopesticides may be out products based on neem (*Azadirachta indica* L.), tree of Asian origin used for centuries in India for various purposes, and had their properties insecticides discovered just 30 years, when its main component the azadirachtin was isolated. In this context it also includes the Andiroba (*Carapa guianensis* Aublet), a tree listed more of the Amazon region, whose oil seeds has a great commercial potential and many medicinal properties and is marketed well in the Amazon. Thus, this project aims to study the effects of a product lousiness the basis of extract containing *Azadirachta indica* L., *Carapa guianensis* Aublet and *Saccharum officinarum* L., administered in Wistar rats. The tests were performed in four groups with eight rats, each in accordance with the process of inoculation as follows: ocular (OC), oral (P), subcutaneous (SC), intraperitoneal (IP) and more the control group (C), consisting of four animals. The macroscopic and microscopic analysis of the kidneys, heart, liver, spleen, stomach and intestine of rats, as well as the achievement of all serum biochemistry (total protein, creatinine, urea, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase were performed in order to investigate the possible toxic effects caused by the administration of this concentrate. The results of the samples showed only lesions in organs such as liver and spleen in animals of group intraperitoneal and skin of individuals of the group of subcutaneous application. Parameters as creatininina, urea, AST, ALT and alkaline phosphatase were shown to be altered in various groups including the control, however, only the AST has been shown to be a safe parameter for assessment.

Key words: Natural insecticide, phytomedicines, toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigos Científicos

Artigo 1

Figura 1- Nódulos granulomatosos de tamanhos variados no mesentério. Fígado-
depósitos de fibrina na cápsula. Tecido subcutâneo- Granuloma. Corte histológico do
Tecido subcutâneo- Granuloma inespecífico (4 x). 33

LISTA DE TABELAS

Artigos Científicos

Artigo 1

Tabela 1. Vias de inoculação e doses do extrato contendo *A. indica*, *C. guianensis*, e *S. officinarum* em ratas wistar. 28

Artigo 2

Tabela 1. Vias de inoculação e doses do extrato contendo *A. indica*, *C. guianensis*, e *S. officinarum* L. em ratas Wistar. 42

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos séricos médios \pm desvio padrão, mínimos e máximos de soro de todos os grupos tratados e controle. 43

Tabela 3. Médias de tratamentos comparadas pelo teste de Tukey e coeficiente de variação experimental (CV%) estimado na análise de cada parâmetro. 44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	CONTROLE QUÍMICO.....	16
2.2	NIM (<i>Azadirachta indica</i> L.).....	16
2.3	ANDIROBA (<i>Carapa guianensis</i> Aublet).....	19
2.4	CANA DE AÇUCAR(<i>Saccharum officinarum</i>).....	20
3	REFERÊNCIAS	21
	 ARTIGO 1- Avaliação histomorfológica de órgãos de ratas Wistar submetidas à aplicação por diversas vias do extrato contendo Nim (<i>Azadirachta indica</i> L.), Andiroba (<i>Carapa guianensis</i> Aublet) e Cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i> L.).....	25
	 ARTIGO 2- Perfil bioquímico sérico de ratas Wistar submetidas por diversas vias de aplicação ao extrato contendo Nim (<i>Azadirachta indica</i> L.), Andiroba (<i>Carapa guianensis</i> Aublet) e Cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i> L.).....	34

1- INTRODUÇÃO

A *Azadirachta indica* L., "neem tree", espécie arbórea da família Meliaceae popularmente conhecida no Brasil como nim, tem sido muito estudada quanto às suas propriedades e quanto ao seu potencial como inseticida natural, sendo que seus extratos têm se revelado tão potentes quanto os inseticidas comerciais (PRATES et al., 2003). O nim é originário do sudeste e sudoeste da Ásia e hoje possui grande distribuição nas áreas tropicais e subtropicais da África, América e Austrália, sendo a Azadiractina o ingrediente ativo mais efetivo desse inseticida natural (TEDESCHI et al., 2001).

Nim, também conhecida vulgarmente como amargosa é árvore frondosa que pertence à mesma família do Cedro e do Mogno. É uma planta natural de Burma (atual Myanmar) e das regiões áridas do subcontinente indiano, onde existem aproximadamente 18 milhões de árvores. Como planta medicinal é útil no tratamento de inflamações, hipertensão e infecções virais. Além disso, também é usada na fabricação de cosméticos, reflorestamentos, como madeira de lei, adubo, assim como para paisagismo (NEVES et al, 2003).

A Andiroba (*Carapa guianensis* Aublet.) pertence à mesma família Meliaceae do nim, sendo conhecida comumente como andiroba, uma denominação vulgar derivada das palavras indígenas “nhandi” – óleo e “rob” – manteiga (LEITE, 1997). A espécie tem ampla distribuição nos neotrópicos e na África Tropical. Ocorre no sul da América Central, Colômbia, Venezuela, Suriname, Guiana Francesa, Peru, Paraguai e Brasil. No Brasil, ocorre na bacia Amazônica, principalmente nas várzeas próximas aos leitos de rios e faixas alagáveis ao longo dos cursos d'água, sendo encontrada também em terra firme. Tal habitat é extremamente importante para os indivíduos de *Carapa guianensis* que compõe as populações das áreas inundáveis (SAMPAIO, 2000).

A andiroba é uma árvore cujo óleo, extraído da semente, possui propriedades medicinais com potencial comercial e se destaca entre os óleos tradicionais no norte do país. É uma árvore das mais cotadas em toda a Amazônia, devido à eficácia do óleo contra edemas provocados por pancadas, uma vez que diminui os inchaços do local atingido. Na indústria, o óleo é utilizado para manufatura de velas, xampus, sabonetes e repelentes (RODRIGUES, 1989).

No que concerne a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), de acordo com Doorembos & Kassam (1979), foi na Nova Guiné que o homem teve o primeiro contato com esta planta. Chegou ao Brasil através de Martim Afonso de Souza em 1532, que trouxe a primeira muda para o Brasil e iniciou seu cultivo na Capitania de São Vicente (Hoje, São Paulo).

O açúcar vem sendo utilizado desde algum tempo no tratamento de feridas infectadas ou não infectadas, cujos efeitos principais são sua ação bactericida e bacteriostática, embora outras possíveis ações sejam também consideradas como por exemplo: maior oferta de nutrientes às células lesadas, diminuição do edema local por ação liposcópica, estimulação de macrófagos e formação rápida de tecido de granulação. (VANUCHI et. al., 1984).

Os efeitos tóxicos de produtos inseticidas contendo nim são variáveis, e os resultados diversificam-se de acordo com a via de aplicação e a dose administrada nos animais. Entretanto, informações mais consistentes e específicas a respeito de sua toxicidade ainda são escassos na literatura. No que se refere à andiroba, são inexistentes os relatos na literatura sobre seus possíveis efeitos tóxicos. Assim, objetivou-se avaliar os efeitos tóxicos em ratas Wistar, submetidas a diversas vias de aplicação de um produto constituído de extrato concentrado, contendo *Azadirachta indica* L., *Carapa guianensis* Aublet, e *Saccharum officinarum* L., visando obterem-se informações sobre possíveis lesões nos diversos órgãos, assim como averiguar possíveis alterações da bioquímica sérica ocorridas pela ação do produto nas diversas via de aplicação.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- CONTROLE QUÍMICO

A principal forma de controle de insetos no país está associada à utilização demasiada de pesticidas químicos, o que provoca grandes problemas tanto em relação à saúde pública quanto ao custo de sua implementação. Atualmente o principal problema em relação ao uso destes produtos é o desenvolvimento de resistências, resultando desta forma, na redução da eficácia do produto devido à morte de todos os indivíduos susceptíveis, restando apenas os imunes ao produto (MARCORIS et al, 1999).

O aspecto mais preocupante neste caso é o aumento do risco ambiental e do custo do controle, porque usualmente realiza-se maior número de aplicações para se garantir um resultado satisfatório (POLANCZYK et al., 2003).

O controle químico deve ser a última alternativa de controle a ser utilizada, uma vez que outras ações menos agressivas e eficazes devem ser prioritárias. Recomenda-se que a utilização de substâncias químicas seja restrita a situações de emergência ou quando não se dispuser de outra ferramenta de intervenção (BRASIL, 2001).

A intensa utilização nos últimos anos de inseticidas sintéticos não satisfaz os critérios de Programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP), resultando em grande interesse na utilização de inseticidas naturais. Neste contexto, numerosas espécies de plantas têm sido relatadas por possuírem propriedades capazes de controlar de pragas (PRATES et al., 2003).

2.2- NIM (*Azadirachta indica* L)

A *Azadirachta indica* L.(nim) tem ação sobre mais de quatrocentas espécies de insetos pragas de cultivos e criações, como por exemplo a mosca-do-chifre (*Hematobia irritans*), de grande importância na medicina veterinária (ESTRADA & LOPES, 1998). Além disso, O óleo extraído das sementes de nim teve sua eficácia demonstrada *in vitro* contra carrapatos da família Ixodidae (NDUMU et al., 1999). Outros trabalhos também demonstraram a eficiência do extrato de nim no controle de carrapatos das espécies *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* (SILVA et al, 2007).

A torta de nim, quando adicionada ao sal mineral para grandes animais, vem proporcionando resultados surpreendentes no controle de ectoparasitos como a larva de berne

(*Dermatobia hominis*) e mosca-do-chifre. Em pequenos animais, é eficiente como vermífugo gastrointestinal (GAYA, 2007).

O nim causa múltiplos efeitos nos insetos, como: redução da alimentação, repelência de postura, interrupção do desenvolvimento e da ecdise, atraso no desenvolvimento, redução da fertilidade e fecundidade além de diversas alterações no comportamento e na fisiologia dos insetos, que podem levar à sua morte (MARTINEZ, 2002). A Azadiractina é o principal ingrediente ativo desse inseticida natural (TEDESCHI *et al.*, 2001). Os efeitos dos trestanotriterpenóides (componentes secundários) presentes no nim são variados e incluem manifestações comportamentais, fisiológicas e de repelência (QIU *et al.*, 1998).

Nesse contexto, dentre as manifestações fisiológicas, o extrato de nim pode causar alterações na reprodução de insetos pragas com redução da fecundidade e esterilidade de ovos e também redução da longevidade de machos e fêmeas (TEDESCHI *et al.*, 2001).

De acordo com Mourão *et al.* (2004) a azadiractina, substância com elevada ação inseticida e acaricida, possui baixíssima toxicidade ao homem e animais domésticos, seletividade aos inimigos naturais, além de não agredir o ambiente.

Ainda como vantagem, o nim é biodegradável, tem seu poder de ação rapidamente degradado sob a luz, é pouco tóxico para mamíferos e potencialmente compatível com os inimigos naturais de muitos insetos pragas. Efeitos tóxicos do óleo de nim em mamíferos somente ocorrem em doses altas. A DL50 para o óleo de nim é de 14ml/Kg em ratos e 24 ml/Kg em coelhos. Em ratos, doses acima de 80 ml/Kg causam disfunção respiratória, convulsão e morte. Já a toxicidade do composto mais estudado presente no óleo de nim, a azadiractina é a seguinte: DL50 oral (para ratos) de 5 g/kg de peso corporal, DL50 dermal de 2g/kg de peso corporal. Esta toxicidade não é tão baixa quando comparada com o composto natural rotenona, substância pesticida e inseticida presente nas raízes de diversas plantas, que possui DL50 oral de até 1,5 g/kg de peso corporal e não demonstra toxicidade dermal. (COATS, 1994).

Produtos à base de óleo de Nim têm demonstrado efeitos antifertilidade, ação espermicida direta e atividade antimicrobiana significativa contra patógenos sexualmente transmissíveis (GARG *et al.*, 1998). Killare & Shrivastan (2003) realizaram estudos sobre o efeito do extrato de folhas em espermatozóides humanos e constataram potente ação espermicida, sendo que aproximadamente 3 mg de extrato são necessários para imobilizar e matar 100% de 1 milhão de espermatozóides em 20 segundos.

Sementes e folhas administradas oralmente possuem imunomoduladores que induzem reações imunocelulares, causando interrupção completa da gestação antes do estágio de

implantação em roedores e primatas, de forma reversível, sendo a fertilidade restaurada nos ciclos subseqüentes (MUKHERJEE et al, 1999).

Testes de toxicidade em mamíferos, utilizando produtos à base de Nim, não causaram mortalidade nas doses máximas por via oral aguda, dermal ou por inalação. Extrato aquoso de folhas a 10%, administrado via oral por 24 horas, mostrou leve efeito diurético. Em cães, a administração intravenosa causou diurese, já a administração intramuscular não teve efeito. Atividades mutagênicas e relacionadas a possíveis danos cromossômicos, investigadas *in vivo* e *in vitro*, forneceram resultados negativos (MARTINEZ, 2002).

A DL50/24h do óleo de Nim foi estabelecida como 14 ml/kg em ratos e 24 ml/kg em coelhos; testes avaliando irritação ocular e cutânea primárias, inalação aguda, resposta imune e sensibilização não forneceram resultados preocupantes do ponto de vista toxicológico (SCHMUTTERER, 1990).

Estudos toxicológicos com óleo de Nim não demonstraram presença de efeitos adversos nos parâmetros reprodutivos em ratos monitorados por três gerações, podendo ser recomendado para uso humano (CHINNASAMY et al, 1992). Efeitos do extrato aquoso foram investigados em *Tilapia zilli* (Gervais), em condições de laboratório por um período de 96 horas, demonstrando toxicidade aguda a estes animais (OMOREGIE & OKPANACHI, 1997).

Em estudos sobre a função tireoidiana em ratos machos, o extrato de folhas exibiu diferentes efeitos: em altas doses não se mostrou seguro quanto à função tireoidiana (decréscimo dos níveis séricos de triiodotironina [T3] e aumento dos níveis de tiroxina [T4]); promoveu aumento na peroxidação lipídica hepática e decréscimo na atividade da glicose-6-fosfatase; já em doses baixas nenhum efeito foi observado (PANDA & KAR, 2000). Estudos investigando o efeito do produto Vepacide (praguicida à base de Nim) sobre as enzimas fosfatase ácida e alcalina em diferentes tecidos de ratos albinos Wistar machos e fêmeas, indicaram aumentos significativos das enzimas no soro, rins, pulmões e tecido hepático. As alterações enzimáticas se mostraram dose e tempo dependentes, reversíveis com a remoção da substância tóxica e passíveis de serem utilizadas como biomarcadores de exposição ao produto (RAHMAN & SIDDIQUI, 2003).

Pesquisas realizadas com um produto inseticida à base de óleo de semente de nim, para determinação de toxicidade em mamíferos revelaram ausência de efeitos adversos ou doença nos animais testados. A DL50 foi estabelecida em 16 ml/kg, com ausência de alterações histológicas em órgãos vitais (KAZMI et al, 2001).

2.3- ANDIROBA (*Carapa guianensis* Aublet)

Revilla (2000) e Sampaio (2000) relataram que o óleo de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) é composto de oleína e palmitina, com menores proporções de glicerina. As amêndoas contêm: lipídios, fibras, minerais e ácidos graxos do óleo. Os mesmos relataram ainda a seguinte composição: umidade 40,2%, proteína 6,2%, gordura 33,9%, fibra bruta 12,0%, cinzas 1,8% e carboidratos 6,1%.

Os índios Mundurucus usavam o óleo para mumificar as cabeças dos inimigos. Os Wayãpi e Palikur usam o óleo para remover carrapatos e piolhos. O chá da casca e das flores é usado contra diversas infecções. O extrato de andiroba misturado com outras plantas repelentes (nim, eucalipto, citronela) é indicado para repelir formigas, cupins, aranhas, baratas e traças. O cerne é usado como fungicida. A andiroba oferece ainda outras possibilidades de agregação de valor ao seu produto básico como fabricação de sabonetes, xampus, velas e tochas repelentes. (REVILLA, 2000; SAMPAIO, 2000).

A *C. guianensis* foi recomendada pelo Programa de Desenvolvimento das Nações Unidas como espécie com grande potencial farmacêutico (HAMMER & JOHNS, 1993). No Brasil, é conhecida popularmente como “andiroba” (TESKE & TRENTINI, 1997) sendo que seu córtex e sua semente são utilizados pelos nativos para tratar inflamações, e também tratamento de cortes e contusões. O potencial da semente está no seu óleo, extraído de forma artesanal, que é administrado por via oral ou tópica (HAMMER & JOHNS, 1993), além de ser utilizado pela indústria farmacêutica na formulação de cosméticos (BOMBARD, 2001).

A Andiroba possui abrangente indicação com resultados satisfatórios justificando, portanto, a utilização da mesma em diversos campos da área da saúde. Composto essas indicações, pode-se citar: o atendimento primário à saúde, a profilaxia da Malária, Dengue, Elefantíase, Febre Amarela e Doença de Chagas, através da vela de Andiroba que ao ser queimada exala forte odor decorrente do agente ativo que inibe a fome dos vetores causadores das referidas doenças, com eficiência de 100%, tendo a vantagem de ser atóxica, de acordo com Orellana et al(2004). A andiroba é apresentada em diversas formas farmacêuticas, tais como: pomada, unguento, bálsamo, emulsões e cápsulas oleosas. Na cosmetologia é utilizada como creme facial, emoliente, xampus, sabonetes, óleos de banho, fixador de perfumes e hidratantes (ENRIQUEZ et al , 2003).

Secundariamente, é indicada no controle afecções do trato respiratório, lesões mio-articulares e edemas; possui ainda ação como protetor solar. Quanto às contra-indicações, não existem registros nas literaturas consultadas (ORELLANA et al, 2004).

Embora seja notória sua ampla utilização pelas populações da Amazônia, tanto na forma de chá como de óleo, ou mesmo usado topicamente, até o momento não se verificou qualquer relato na literatura, em relação à toxicidade da andiroba (COSTA-SILVA et al, 2006).

Em estudo realizado por Costa-silva et al (2006), objetivou-se avaliar o possível efeito tóxico do óleo de sementes de *C. guianensis* sobre a fertilidade e a gestação de ratas Wistar e desenvolvimento da prole. Os resultados mostraram que durante o período de tratamento com o óleo de sementes de *C. guianensis* não foram registradas mortes, nem foram visibilizados sinais clínicos de toxicidade materna, como redução do consumo de ração, piloereção, diarreia, alteração da atividade locomotora ou sangramento vaginal. Outros resultados mostraram também que não houve qualquer alteração no processo de fertilidade, nem no desenvolvimento de prenhez de ratas tratadas com o óleo de sementes de *C. guianensis*.

2.4 CANA DE AÇUCAR

Estudos a respeito dos efeitos da *Saccharum officinarum* são praticamente inexistentes, entretanto em estudo *in vitro*, Rahal et al.(1983) concluíram que o açúcar apresentou atividade bactericida para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiela* e bacteriostático para *Bacillus subtilis*. Este achado deve-se ao baixo pH e a hipertonicidade provocada no meio pela presença do açúcar, que inibe o crescimento bacteriano.

REFERÊNCIAS

- BOMBARD, F. **Cosmetic Technology**, London, v. 4, p. 39-44, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Controle de vetores: procedimentos de segurança**. Brasília , DF. 2001.
- CHINNASAMY, N. et al. **International Journal Immunopharmacology**, Elmsford, v.14, p. 1187-93, 1992.
- COATS, J.R. Risks from natural versus synthetic insecticides. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 39, p. 489-515, 1994.
- COSTA-SILVA, J.H., et al. Estudo toxicológico reprodutivo da *Carapa guianensis* Aublet (Andiroba) em Ratas Wistar. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Argentina, v.25, p.425-8, 2006.
- DOOREMBOS, J.; KASSAM, A.H. **Efectos del agua sobre el rendimiento de los cultivos**. Roma: FAO, 1979, p. 212.
- ENRIQUEZ, G.; SILVA, M. A.; CABRAL, E. **Biodiversidade da Amazônia: usos e potencialidades dos mais importantes produtos naturais do Pará**. Belém: EMBRAPA, 2003.
- ESTRADA, O.; LOPES, D. El nim y sus bioinsecticidas, una alternativa agroecológica. **Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical**, Havana, p. 24, 1998.
- GARG, S.; TALWAR, G.P.; UPADHYAY , S.N. **Journal Ethnopharmacology**. v. 60, p.235-46, 1998.
- GAYA, J.P. Nutrição: a milagrosa torta do Neem. **O Berro**, Recife,v.102, Jun/2007.
- HAMMER, M.L.A ; JOHNS , E.A. **Journal Ethnopharmacology**, Lausanne, v.40, p. 53-75, 1993.

KAZMI, S.A.R.; QADRI ,N.M. ;BADAR, Y. **Pakistan Journal of Science and Industrial**, Pakistan, v.44, p. 234-8, 2001.

KHAN, P.K.; AWASTHY ,K.S. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam,v. 41, p. 1325-8. 2003.

KHILLARE, B.; SHRIVASTAV , T.G.**Contraception**, Stonehom, v. 68, p. 225-9, 2003.

LEITE, A. M. C. *Ecologia de Carapa guianensis Aublet. (MELIACEAE) “ANDIROBA”*. 1997. 180 f. Tese (Doutorado em Biologia Ambiental) - Universidade Federal do Pará e do Museu Paraense Emilio Goeldi, Belém, 1997.

MACORIS, M. L. G. et al. Alteração da resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 33, p. 521-522, 1999.Disponível em:< www.scielo.br/rsp >. Acesso em : 15 fev. 2007.

MARTINEZ, S. S. O Nim – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção. **Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR)**. 2002. 142f. Disponível em: <www.iapar.br >. Acesso em: 27 Mar. 2008.

MOURÃO, S. A. et al. Seletividade de extratos de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) ao ácaro predador *Iphiseiodes zuluagai* Denmark & Muma (Acari: Phytoseiidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 5, p. 613-617, set./out. 2004.

MUKHERJEE, S.; GARG, S.; TALWAR, G.P. **Journal Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 67, p. 287-96,1999.

NDUMU, PA.; GEORGE, J.B.D.; CHOUDHURY, M.K. Toxicity of Neem Seed Oil (*Azadirachta indica*) against the larvae of *Amblyomma variegatum* a three-host tick in cattle. **Phytoterapy Research**, London, v.13, p.532-534, 1999.

NEVES, B.P ; OLIVEIRA, I.P ; NOGUEIRA, J.C.M. **Cultivo e utilização do Nim Indiano**. Goiás. EMBRAPA, 2003. (Circular Técnica, nº62).

- OMOREGIE, E. ; M.A. OKPANACHI .**Acta Hydrobiologica**, Poland, v. 39, p. 47-51, 1997.
- ORELLANA, B.J.P.; KOBAYASHI, E.S.; LOURENÇO, G. M. Terapia alternativa através do uso da Andiroba. **Lato & Sensu**, Belém-PA, v. 5, n. 1, p. 136-141, 2004.
- PANDA, S. ; KAR , A. **Pharmacology Research**, Carlifórnia, v. 41, p. 419-22, 2000.
- PRATES, H.T.; VIANA, P.A.; WAQUIL, J.M. Atividade de extrato aquoso de folhas de nim (*Azadirachta indica*) sobre *Spodoptera frugiperda*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília-DF**, v.38, n.3, p.437-439, 2003.
- POLANCZYK, R.A; GARCIA, M.O; ALVES, S.B. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle do *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.37, n. 6, p.2-5, 2003. Disponível em: < www.scielo.br/rsp > Acesso em: 8 ago. 2008.
- QIU, Y.T.; LOON, J.J.A.; ROESSINGH, P. Chemoreception of oviposition inhibiting terpenoids in the diamondback moth *Plutella xylostella*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v.87, p.143- 155, 1998.
- RAHAL, F. et al. O açúcar no tratamento local das infecções das feridas cirúrgicas. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio e Janeiro, v. 4, p 135-136. 1983.
- RAHMAN, M.F.; SIDDIQUI, M.K.J. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.117, p. 51-60. 2003.
- REVILLA, J. Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis. Manaus. [s.n], 2000. 405 p.
- RODRIGUES, R. M. **A Flora da Amazônia**. Belém: CEJUPE, 1989. 462 p.
- SAMPAIO, P. de T. B. Andiroba (*Carapa guianensis*). In: CLAY, J. W.; SAMPAIO, P. de T. B.; CLEMENT, C. R. **Biodiversidade Amazônica: exemplos e estratégias de utilização**. Manaus. [s.n], 2000, p. 243-251.

SCHMUTTERER, H. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.35, p. 271-97, 1990.

SILVA, W.W., et al. Efeitos do neem (*Azadirachta indica* A. Juss) e do capim santo [*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf] sobre os parâmetros reprodutivos de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) no semiárido paraibano. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu. v.9, n.3, p.1-5, 2007.

TEDESCHI, R.; ALMA, A.; TAVELLA, M. Side-effects of three neem (*Azadirachta indica* A. Juss) products on the predator *Macrolophus caliginosus* Wagner (Heteroptera: Miridae).., **Journal of Applied Entomology**, Berlim, v.125, p.397-402, 2001.

TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. “**Herbarium**: compêndio de fitoterapia”. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1997, p.35.

VANUCHI, M.T.O., et al. Açúcar no tratamento de feridas operatórias de pacientes Portadores de Câncer. **Revista Enfermagem Moderna**, Rio de Janeiro,v.4, n.2, p.27-30. 1984.

.

ARTIGO I

“Avaliação histomorfológica de órgãos de ratas Wistar submetidas à aplicação por diversas vias do extrato contendo Nim (*Azadirachta indica* L.), Andiroba (*Carapa guianensis* Aublet) e Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)”

Artigo Submetido à Revista Acta
Amazônica

ISSN 0044-5967 *versão impressa*
ISSN 1809-4392 *versão online*

Avaliação histomorfológica de órgãos de ratas Wistar submetidas à aplicação por diversas vias do extrato contendo Nim (*Azadirachta indica* L.), Andiroba (*Carapa guianensis* Aublet) e Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)

RESUMO: Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito tóxico do extrato contendo *Azadirachta indica* L., *Carapa guianensis* Aublet e *Saccharum officinarum* L., administrado em ratas Wistar. Os testes foram realizados em quatro grupos com oito ratas cada um, de acordo com as seguintes vias de inoculação: ocular (OC), oral (P), subcutânea (SC), intraperitoneal (IP) e grupo controle (C). Os resultados das análises macroscópicas e microscópicas mostraram que as lesões ocorreram em função das diferentes vias de inoculação, porém não foram registradas mortalidades nesses grupos. Estes resultados indicam a segurança deste extrato para a via recomendada.

Palavras-chave: inseticida, azadiractina, piolhicida.

INTRODUÇÃO

A utilização do nim (*Azadirachta indica* L.) como inseticida se tornou mais conhecida nos últimos 30 anos, quando seu o principal composto, a azadiractina (grupo limonóide) foi isolado. Os inseticidas naturais de nim são biodegradáveis, portanto não deixam resíduos tóxicos nem contaminam o ambiente. Por sua natureza, os extratos de nim são mundialmente aprovados para uso em cultivos orgânicos. A planta possui mais de 50 compostos terpenóides, a maioria com ação sobre os insetos. Todas as partes da planta possuem esses compostos tóxicos, porém é no fruto que se encontra a maior concentração. Esses compostos são solúveis em água e podem ser preparados de maneira simples e barata, por pequenos e médios produtores (Martinez, 2006).

A semente de andiroba (*Carapa guianensis* Aublet) produz um óleo com propriedades medicinais muito comercializado na Amazônia. O óleo é usado pelos extrativistas, índios e ribeirinhos em picadas de serpentes e insetos, vermicida, afecções do trato respiratório e da pele. O extrato de andiroba misturado com outras plantas repelentes (nim, eucalipto, citronela) é indicado para repelir formigas, cupins, aranhas, baratas e traças. O cerne é usado como fungicida (Shanley et al., 1998; Sampaio, 2000).

No que concerne a cana de açúcar, um experimento contendo *Saccharum officinarum* e ácidos palmítico, oléico e linoléico foi realizado e testes em modelos de inflamação para artrite e psoríase em camundongos demonstraram importante atividade anti-inflamatória, possivelmente devido a inibição do metabolismo do ácido aracdônico (Ledón et al, 2007).

No que diz respeito à toxicidade de produtos a base nim em mamíferos, diversos testes já foram realizados, e os resultados variam principalmente de acordo com a dose administrada aos animais. No que se refere a andiroba, não existem registros na literatura sobre sua toxicidade em mamíferos (Costa-silva et al., 2006). Assim, este estudo objetivou avaliar a toxicidade em ratas Wistar, submetidas à diversas vias de aplicação do extrato contendo *Azadirachta indica* L., *Carapa guianensis* Aublet e *Saccharum officinarum* L.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se 36 ratas wistar com 90 dias de idade e média de peso corporal de 179 gramas. Os animais foram distribuídos em quatro grupos de acordo com a via de aplicação do referido extrato, contendo oito animais cada, e o grupo controle constituído por quatro animais (Tabela 1).

O produto¹ utilizado é constituído essencialmente de extrato contendo *Azadirachta indica* L. (Nim) a 1%, *Carapa guianensis* Aubl. (Andiroba) a 3% e *Saccharum officinarum* L. (Cana-de-açúcar) a 20%.

TABELA 1. Vias de inoculação e doses do extrato contendo *A. indica*, *C. guianensis*, e *S. officinarum* L em ratas wistar.

Grupos	Via de inoculação	Doses [*]
Grupo I	Via intraperitoneal	1 mL
Grupo II	Via subcutânea	0,5 mL
Grupo III	Instilação ocular	0,2 mL
Grupo IV	Via orogástrica	1 mL
Grupo V (controle)	Via intraperitoneal (soro fisiológico) [**]	1 mL

Todos os animais foram alocados no Biotério do Departamento de Fisiologia e Morfologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco durante todo o período do

experimento (15 dias), com exceção do Grupo 3 (OC) cujos animais submetidos à eutanásia 72 horas pós instilação. Os animais deste grupo foram observados diariamente a cada 30 minutos nas primeiras 24 horas e posteriormente a cada seis horas. Todos os animais foram submetidos à eutanásia com doses de 40 mg/rata/IP a 60mg/rata/IP de xilazina² e 90 mg/rata/IP de pentobarbital sódico (injetável)³ obedecendo ao código de ética e as normas recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005). Este estudo obedeceu ao parecer da Comissão de Pesquisa e Comissão de ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, sob o processo de nº 8318/2008.

Após a eutanásia, todos os animais foram examinados macroscopicamente para visibilização de possíveis lesões e fragmentos de fígado, rins, coração, baço, estômago e intestinos que foram colhidos em formalina tamponada a 10%, processados segundo as técnicas de rotinas para exames histopatológicos (Tolosa et al., 2003) e examinados a microscópio óptico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Macroscopicamente foram observados nódulos de tamanhos variados com coloração clara e consistência firme localizados no mesentério de 62,5% (5/8) dos animais do grupo I (IP) (Figura 1-a). Dos grupos I (IP) e II (SC) foram colhidos fragmentos de nódulos granulomatosos observados na necropsia de alguns animais. Além de intensos e disseminados depósitos de fibrina na cavidade abdominal, moderados depósitos de fibrina localizados no baço, fígado e diafragma (Figura 1-b) em 12,5% (1/8) e 50% (4/8) dos animais do grupo I.

Vale salientar que foi observada aderência entre diversos órgãos da cavidade abdominal em 25% (2/8) dos animais.

¹ Piolhícida Humano de uso tópico

² Virbaxyl 2% ® - Virbac do Brasil, Av. Engenheiro Eusébio Stevaux, 1368, Jurubatuba - São Paulo -04696-000

³ Nembutal ® - Abbott Brasil- Caixa Postal: 29246;CEP: 04561-990,São Paulo/SP

Os resultados observados sugerem que a presença de substâncias contidas no extrato em questão, especialmente por se tratar de extrato oleoso, em contato com o mesentério provocou reação inflamatória dos tipos fibrinosa e granulomatosa.

Costa-Silva et al (2006) afirmaram que embora a andiroba possua um amplo uso pelas populações da Amazônia, tanto na forma de chá como de óleo, usado topicamente, não há dados registrados na literatura, em relação à sua toxicidade.

Raji et al. (2004) verificaram que a administração intraperitoneal de *Azadirachta indica* (1000 mg/kg de extrato) não produziu sinal de toxicidade em ratos, nem alteração significativa no peso corpóreo ou de órgãos durante três semanas após aplicação. No entanto, a administração oral de 3.200 mg kg⁻¹ de extrato causou 100% de mortalidade dos ratos.

No Grupo II (SC) nodulações na pele de tamanhos variados, de cor clara, circunscritos, móveis, consistentes e de conteúdo firme (Figura 1-c) foram observadas em 100% dos animais.

Testes de toxicidade em mamíferos, utilizando produtos à base de nim, não causaram mortalidade nas doses máximas por via dermal ou por inalação (Schmutterer, 1990).

É provável que as mesmas razões descritas anteriormente no Grupo I sejam responsabilizadas pelas alterações observadas no Grupo II.

Sabe-se que o óleo de sementes de outras espécies da família Meliaceae como a *Azadirachta indica* (nim) interfere na fertilidade e no desenvolvimento da prenhez em roedores (MUKHERJEE & TALWA, 1996). Embora existam semelhanças na composição fitoquímica dos óleos de *A. indica* e de *C. guianensis* (andiroba), os resultados obtidos por Costa-Silva et al. (2006) mostram que não houve qualquer alteração no processo de fertilidade, nem no desenvolvimento da prenhez de ratas tratadas com o óleo de sementes de *C. guianensis*.

Os animais do grupo III submetidos à instilação ocular do produto testado, não apresentaram nenhuma irritação ocular ou qualquer outra alteração durante o período de teste estabelecido para esse tipo de aplicação que é de zero a 72 horas, com frequência de observação a cada 30 minutos nas primeiras 6 horas e a cada 6 horas subsequentes.

Convém salientar que reações como quemose (edema de conjuntiva) conseqüentes à hipersensibilidade da conjuntiva são comuns na maioria dos produtos instilados no olho, fato que não ocorreu neste experimento, o que nos permite admitir que o produto utilizado não seja irritativo para a dosagem testada caso haja uma deposição acidental do produto neste local.

Estes resultados confirmam a segurança do extrato testado que se encontra dentro das normas estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância sanitária - Revisão da Resolução GMC nº49/99 (BRASIL, 2004), o qual assegura que só será permitida a liberação para venda livre à população, os produtos desinfestantes domissanitários em formulações que não apresentem, de modo algum, opacidade na córnea e aquelas que apresentem irritação leve a reversível até 72 (setenta e duas) horas nas mucosas oculares dos animais testados.

Os animais do grupo IV submetidos à ingestão orogástrica do produto, não apresentaram alterações macro ou microscópicas.

Observações semelhantes foram obtidas por Raizada et al. (2001) que constataram ausência de efeitos adversos à administração de azadiractina a 12% via oral, a ratos machos e fêmeas até 1500 mg/kg/dia pelo período de 90 dias, não tendo verificado sinais de toxicidade, mortalidade, alterações de peso ou dos parâmetros sanguíneos.

Os resultados obtidos neste estudo reforçam a segurança do produto testado no que se refere a uma possível ingestão acidental ou inadequada.

A exemplo do que foi observado macroscopicamente, as lesões microscópicas apenas foram observadas no grupo I (IP) e II (SC).

No grupo I (IP), estas lesões consistiram de nódulos granulomatosos constituídos de necrose central circundado por fibroblastos e células mononucleares e mais externamente por tecido de granulação (Figura 1-d). O aspecto histológico das lesões assemelhava-se aqueles observados nos granulomas inespecíficos. Estas lesões estavam localizadas no mesentério em 100% (8/8) dos animais, aderidas à cápsula de Glisson no fígado em 25% (2/8), no baço em 12,5% (1/8), na camada serosa do intestino em 12,5% (1/8) e na camada serosa do estômago estavam presentes em 50% (4/8) dos animais.

No grupo II (SC) as lesões granulomatosas estavam presentes em 100% dos animais e assemelhavam-se as descritas no grupo I, entretanto em 25% (2/8) dos animais observou-se ulceração dos nódulos e a pele por esta razão apresentava-se úmida e com pêlos eriçados no local.

Kazmi et al. (2001) não observaram toxicidade, efeitos adversos além de ausência alterações histológicas em órgãos vitais em mamíferos submetidos ao tratamento com produtos à base de nim.

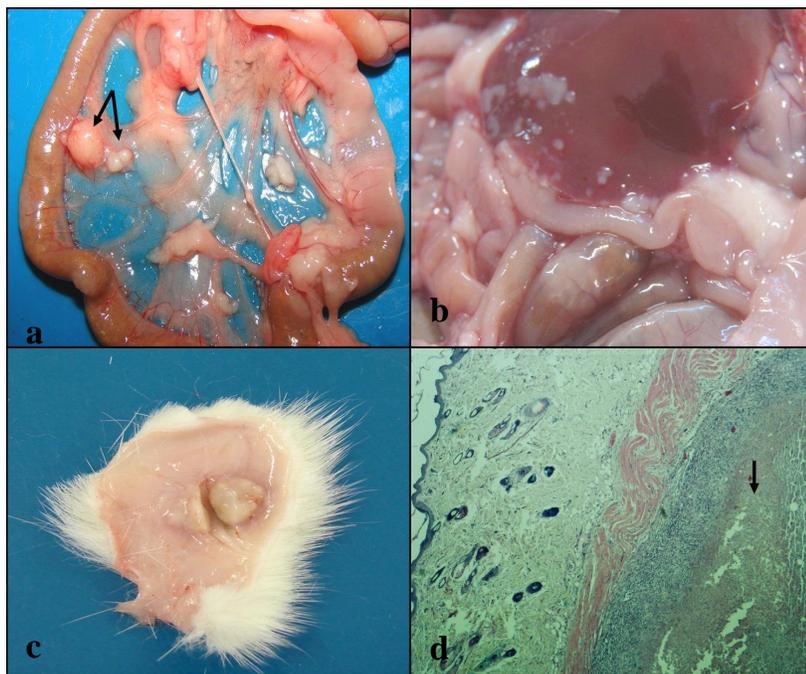


FIGURA 1. Rata. (a) mesentério. Nódulos granulomatosos de tamanhos variados (setas). (b) Fígado. Depósitos de fibrina na cápsula. (c) Tecido subcutâneo. Granuloma. (d) Tecido subcutâneo. Granuloma inespecífico (4 x). Observar necrose central (seta).

Neste estudo não foi observada mortalidade em nenhum dos animais testados, salientando-se que as alterações macroscópicas e/ou microscópicas foram variáveis e/ou ausentes de acordo com o grupo e a via de inoculação do produto.

O produto testado é um piolhicide de aplicação tópica e com base na ausência de alterações verificadas nos grupos III e IV, podemos afirmar que este é seguro na dose testada, mesmo que haja ingestão e/ou deposição acidental ocular.

A utilização do produto através das vias intraperitoneal e intradérmica não deve ser recomendada.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Regulamento técnico para produtos desinfestantes (praguicidas) domissanitários: **Pedido de revisão da resolução GMC n.49/99. Brasília, DF.2004.**

COSTA-SILVA, J.H., et al. Estudo Toxicológico Reprodutivo da *Carapa guianensis* Aublet (Andiroba) em Ratas Wistar. **Acta Farm. Bonaerense.** V.25, p.425-8, 2006.

KAZMI, S.A.R.; QADRI, N.M.; BADAR, Y. **Pakistan Journal of Science and Industrial Resources.** v. 44, p. 234-8, 2001.

LÉDON, N., et al. Effects of a mixture of fatty acids from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) wax oil in two models of inflammation: zymosan-induced arthritis and mice tail test of psoriasis. **Phytomedicine.** V. 14, p 690-5, 2007.

MARTINEZ, S.S.O Nim - *Azadirachta indica*: um Inseticida Natural. **Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR).** 2006. Londrina. Disponível em: <<http://200.201.27.14/noticias/novonim>>. Acesso em: 28 Mar. 2008.

MUKHERJEE, S. ; TALWA, G.P. r . **American Journal Reprod.Immunology.**v.35, p.51-6, 1996.

RAIZADA, R.B. et al. *Azadirachtin*, a neem biopesticide: subchronic toxicity assessment in rats. **Food and Chemical Toxicology**.v. 39, p. 477-83, 2001.

RAJI, Y., et al. Effects of *Azadirachta indica* extract on gastric ulceration and acid secretion in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 90, p.167-70, 2004.

SAMPAIO, P. de T. B. **Andiroba** (*Carapa guianensis*). In: CLAY, J. W.; SAMPAIO, P. de T. B.; CLEMENT, C. R. *Biodiversidade Amazônica: exemplos e estratégias de utilização*. Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico. 2000, p. 243-251.

SCHMUTTERER, H. Properties and potencial of nature pesticides from the nim tree *Azadirachta indica*. **Annual review of entomology**, v.35, p.271-97, 1990.

SHANLEY, P.; CYMERYYS, M.; GALVÃO, J. **Frutíferas da mata na vida amazônica**. Belém: INPA, 1998, 127 p.

TOLOSA, E.M.C. et al. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2.ed. São paulo: Manole. 2003. 331 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Programme on Disease Control in Humanitarian Emergencies (DCE)**. Geneva, 2005.

ARTIGO II

“Perfil bioquímico sérico de ratas Wistar submetidas por diversas vias de aplicação ao extrato contendo Nim (*Azadirachta indica* L.), Andiroba (*Carapa guianensis* Aublet) e Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)”

Artigo Submetido à Revista Acta
Amazônica

ISSN 0044-5967 *versão impressa*
ISSN 1809-4392 *versão online*

Perfil bioquímico sérico de ratas Wistar submetidas por diversas vias de aplicação ao extrato contendo Nim (*Azadirachta indica* L.), Andiroba (*Carapa guianensis* Aublet) e Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar através da bioquímica sérica os efeitos do extrato contendo *Azadirachta indica* L., *Carapa guianensis* Aublet e *Saccharum officinarum* L., administrado por diversas vias a ratas Wistar. Os exames foram realizados em três grupos com oito ratas cada um, de acordo com as vias de inoculação que se seguem: grupo 1 - intraperitoneal (IP); grupo 2 - oral (P); grupo 3 - subcutânea (SC), além do grupo controle (C). O sangue das ratas foi colhido por punção cardíaca e obtidos os soros. Os seguintes parâmetros foram avaliados: proteínas totais, creatinina, uréia, aspartato-aminotransferase (AST), alanina-aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina. As análises dos resultados demonstraram uma possível interferência biológica do referido extrato concentrado quando se compara as alterações dos valores médios dos grupos tratados e a ausência dessas no grupo controle, sobre o parâmetro AST (UI/L): 268,64±29,01 (grupo 1), 265,12±58,21 (grupo 2), 220,15±79,21 (grupo 3) e 48,43±4,34 (controle).

Palavras-chave: bioquímica, inseticida, azadiractina, piolhida.

INTRODUÇÃO

O nim (*Azadirachta indica* L.) tem sido muito estudado quanto às suas propriedades medicinais e quanto ao seu potencial como inseticida natural. Nos insetos, causa múltiplos efeitos, como redução da alimentação, repelência de postura, interrupção do desenvolvimento e da ecdise, atraso no desenvolvimento, redução da fertilidade e fecundidade além de diversas alterações no comportamento e na fisiologia dos insetos, que podem levar à sua morte (MARTINEZ, 2002).

Os insetos da ordem Phitiraptera: piolho da cabeça (*Pediculus humanus capitis*), do corpo (*P. h. humanus*) e o piolho pubiano (*Phitirus pubis*) também podem ser controlados com produtos à base de nim. Para o controle da pediculose capitis são indicados genericamente todos os tipos de formulações com nim: creme, loção, sabonete, “spray”, extrato, óleo e cápsula das folhas. Formulações em creme e shampoo podem ainda ter o extrato de nim incorporado (SANTOS & ANDRADE, 2000).

O óleo de Andiroba (*Carapa guianensis* Aublet) misturado com o corante de urucum (*Bixa orellana* L.) é usado pelos indígenas por apresentar ação repelente contra insetos. O chá da casca e das flores é usado contra febre, vermes, bactérias, tumores, como antidiarréico, antianêmico, contra bronquites e infecções das vias respiratórias, analgésico e balsâmico. É uma árvore das mais cotadas em toda a Amazônia, devido à eficácia do óleo contra edemas provocados por pancadas, uma vez que diminui os inchaços do local atingido. O extrato de andiroba misturado com outras plantas repelentes (nim, eucalipto, citronela) é indicado para repelir formigas, cupins, aranhas, baratas e traças (REVILLA, 2000).

No Brasil, ocorre na bacia Amazônica, principalmente nas várzeas próximas aos leitos de rios e faixas alagáveis ao longo dos cursos d'água, sendo encontrada também em terra firme. Tal habitat é extremamente importante para os indivíduos de *Carapa guianensis* que compõe as populações das áreas inundáveis (SAMPAIO, 2000). É uma árvore das mais cotadas em toda a Amazônia, devido à eficácia do óleo contra edemas provocados por pancadas, uma vez que diminui os inchaços do local atingido (RODRIGUES, 1989).

A sacarose da cana-de-açúcar, por suas propriedades terapêuticas ressaltadas na bibliografia especializada e na crença popular, além do baixo custo e da fácil aquisição, esta vem sendo utilizada no tratamento de feridas em humanos e animais (HADDAD et al., 2000).

A sacarose da cana-de-açúcar diminui a congestão passiva e o edema local, estimulando a epitelização e a granulação tissular, além de possuir efeito bactericida (PAIM et al., 1991). Em estudo bacteriológico evidenciou-se que o açúcar tem efeito bactericida “in vivo” para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella enterobacter* (MONTEIRO et al, 2001)

Quanto à toxicidade de produtos a base de andiroba não existem relatos na literatura sobre sua possível toxicidade, enquanto nos inseticidas a base de nim em mamíferos, diversos testes já foram realizados, e os resultados variam de acordo com a dose e a via de aplicação

administrada aos animais. Entretanto, informações mais consistentes e específicas a respeito de sua toxicidade ainda são escassos na literatura.

Assim, objetivou-se avaliar toxicidade em ratas Wistar, submetidas a diversas vias de aplicação de um produto piolhicide humano constituído de extrato contendo *Azadirachta indica* L., *Carapa guianensis* Aublet e *Saccharum officinarum* L. visando averiguar possíveis alterações da bioquímica sérica ocorridas pela ação do produto nas diversas via de aplicação.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se 28 ratas wistar com 90 dias de idade e média de peso corporal de 179 gramas. Os animais foram distribuídos em três grupos de acordo com a via de aplicação do referido extrato, contendo oito animais cada, e o grupo controle constituído por quatro animais (Tabela 1).

O produto utilizado é constituído essencialmente de extrato contendo *Azadirachta indica* L. (Nim) a 1%, *Carapa guianensis* Aubl. (Andiroba) a 3% e *Saccharum officinarum* L a 20%. (Cana-de-açúcar).

TABELA 1

Todos os animais foram alocados no Biotério do Departamento de Fisiologia e Morfologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco durante todo o período do experimento (15 dias).

Ao final deste período, os animais foram submetidos à eutanásia com doses de 40 mg/rata/IP a 60mg/rata/IP de xilazina² e 90 mg/rata/IP de pentobarbital sódico (injetável)³, obedecendo ao código de ética e as normas recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005). Este estudo obedeceu ao parecer da Comissão de Pesquisa e Comissão de ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, sob o processo de nº 8318/2008.

O sangue para realização da bioquímica foi colhido através de punção cardíaca e o soro separado, antes da realização da eutanásia dos animais.

A determinação da bioquímica foi realizada através de aparelho automatizado de alto desempenho, com método analítico de uso consolidado nos laboratórios de análises clínicas, através da utilização de *Kits* reagentes⁴ de marca tradicional comumente utilizada no Brasil.

Foram analisados os seguintes parâmetros bioquímicos séricos: proteínas totais, pelo método colorimétrico baseado na metodologia de Biureto modificado (GIESE & ANNINNO, 1978); creatinina, pelo sistema cinético baseado na metodologia de Jaffé modificado (RAVEL, 1988); uréia, pelo sistema enzimático baseado na metodologia de urease modificada (PESCE, 1987); alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), pelo sistema cinético baseada na metodologia cinética ultravioleta (KAPLAN et al., 1996); fosfatase alcalina, pelo sistema cinético baseado na metodologia cinética colorimétrica DGKC (KAPLAN et al., 1996).

Utilizou-se como referência o seguinte perfil bioquímico para ratos, de acordo com Campbell (2006): para creatinina (mg/dL) 0,5-1,4; proteína total (g/dL) 6,4-8,5; Fosfatase alcalina (UI/L) 132-170; AST (UI/L) 40-53; ALT (UI/L) 26-37 e, segundo Quinton (2005), para uréia (g/L) 0,32-0,54.

Para a análise estatística dos grupos foi utilizada análise de variância (ANOVA) com o teste de Tukey ($p=0,05$) para comparação múltipla entre os grupos.

² Virbaxyl 2% ® - Virbac do Brasil. Av. Engenheiro Eusébio Stevaux, 1368, Jurubatuba - São Paulo -04696-000

³ Nembutal ® - Abbott Brasil- Caixa Postal: 29246; CEP: 04561-990, São Paulo/SP

⁴ Doles ® - Cral Distribuidora : Rua San Jose, 361 - Parque Industrial San Jose-Cotia - SP - CEP: 06715-862

RESULTADOS

Os parâmetros avaliados e seus respectivos resultados para os grupos tratados e o controle estão demonstrados na tabela 2.

TABELA 2.

A análise da variância evidenciou diferenças entre as médias dos grupos nos parâmetros PPT, creatinina, uréia e AST ($p < 0,05$).

As médias de tratamentos comparadas pelo teste de Tukey para comparação entre os grupos são demonstrados a seguir na Tabela 3.

TABELA 3

A análise dos valores das proteínas totais revela que a variação entre os dados foi pequena, evidenciada pela pequena amplitude da distribuição, de 6,2 a 6,9 no controle, e de 5,7 a 8,4 nos demais grupos.

Apenas o grupo 1 diferiu significativamente do grupo 2, e os demais não diferiram entre si.

O coeficiente de variação experimental foi o mais baixo dos parâmetros avaliados (9,08%).

As médias de creatinina e uréia mostraram-se superiores nos grupos tratados com o extrato, mas foram encontrados resultados alterados também no controle, o que se refletiu na elevada variabilidade, não sendo considerados parâmetros seguros para avaliação.

As maiores alterações nos valores médios, mínimos e máximos foram observadas na AST. Apenas o grupo controle não apresentou alteração nas medidas. O teste de Tukey confirma esta observação, já que a média do grupo controle foi significativamente inferior às demais, que por sua vez não diferiram entre si.

Nos valores da ALT a variabilidade foi muito pequena, a não ser no grupo 2, onde um valor ultrapassou o valor de referência, elevando os valores da média e do coeficiente de

variação dentre as observações do grupo (90,77%), parecendo tratar-se de um ponto de *outlier*. A ocorrência desse valor elevou o Coeficiente de Variação Experimental (37,99%).

Na fosfatase alcalina os valores mostram-se alterados nos grupos tratados, alcançando resultados individuais inferiores e superiores aos valores de referência. A variabilidade entre as observações dos grupos tratados foi elevada (Coeficiente de variação entre 24,7 e 47,6%), enquanto no grupo controle foi de 3,9%. A ampla variação e a inexistência de tendência de elevação ou redução dos teores de fosfatase alcalina nos grupos tratados resultaram em médias consideradas semelhantes estatisticamente ($p > 0,05$).

DISCUSSÃO

No estudo em questão não houve alteração nos valores das proteínas totais, já que os valores achados em todos os grupos, incluindo o controle, não diferiram dos valores de referência adotados para esta espécie.

De acordo com Kerr (2003) a elevação na concentração plasmática de uréia possui diversas causas incluindo fatores pré-renais, renais e pós-renais. Os pré-renais incluem fatores alimentares como o excesso de proteína na alimentação, proteína alimentar de baixa qualidade, sangramentos intestinais e deficiência de carboidratos. Nos fatores renais inclui-se a disfunção renal, destacando-se a insuficiência renal que é a razão mais comum para as mensurações das concentrações plasmáticas de uréia. Na insuficiência renal primária a concentração de creatinina geralmente se eleva na mesma proporção da concentração de uréia. Têm-se ainda os fatores pós-renais, que têm como principais causas obstrução uretral e ruptura de bexiga. Devido à variedade de lesões patológicas que podem estar envolvidas, deve-se ter cuidado ao usar a uréia como indicador prognóstico.

Meyer et al. (2003) citam que assim como ocorre com a uréia, a creatinina é um índice grosseiro da filtração glomerular. A creatinina sérica não é marcadamente influenciada pela dieta ou por sangramentos intestinais. De forma semelhante à uréia, uma redução na taxa de

filtração glomerular (TFG) aumenta a concentração sérica de creatinina. Os mesmos fatores pré-renais, renais e pós-renais que influenciam a uréia também afetam a creatinina.

Os valores de uréia e creatinina encontrados neste estudo mostraram elevada variabilidade com alterações também no controle. Desta forma, não se pode afirmar que os valores desses parâmetros possam ter relação direta com a aplicação do extrato utilizado.

O aumento nos níveis de AST observado neste estudo, além de ser estatisticamente significativo, ficou acima dos níveis de referência para a espécie, que se situam entre 40-53 UI/l, segundo Campbell (2006). Este foi o único teste onde não houve alterações no grupo controle e os grupos tratados apresentaram médias semelhantes entre si.

Campbell (2006) admite que a AST seja uma enzima citosólica e mitocondrial com alta atividade no fígado, coração, músculo esquelético e nos rins, e baixa atividade no intestino, cérebro, pulmão e nos testículos. O aumento na atividade plasmática ou sérica de AST geralmente está associado à lesão do fígado, músculo cardíaco ou esquelético.

Tennant (1997) salienta que, em todas as espécies domésticas, a atividade da AST é alta no fígado, portanto, na lesão hepática aguda ou crônica, a atividade sérica de AST está elevada. Segundo Cardinet (1997), essa enzima também tem sido usada como auxílio diagnóstico em alterações musculares dos animais domésticos.

Para González (2003) os aumentos de AST podem ser observados nas hepatites infecciosas e tóxicas, cirroses, obstruções biliares e nas lipidose hepáticas. Seus níveis também estão aumentados quando ocorre hemólise, deficiência de selênio/vitamina E, e no exercício físico intenso. Em lesões musculares, convém conferir também a atividade da Creatina quinase (CK). A AST é usada para avaliar condicionamento físico em animais de esportes, e em suínos, pode ser um indicador da capacidade de suportar estresse por transporte (teste do halotano).

Al-Habori et al. (2002) afirmam que a AST tem uma isoenzima mitocondrial e não é liberada tão rapidamente quanto a ALT, que é essencialmente citoplasmática. Além disso, a ALT é um indicador mais sensível de hepatotoxicidade aguda do que a AST, pois enquanto a primeira é essencialmente hepática, a segunda também pode ser encontrada em concentrações elevadas em outros órgãos, como rins, pulmões e coração.

Os resultados da ALT mostraram que apesar de os valores da média dos grupos e do coeficiente de variação se apresentar elevados (*out-lier*), a variabilidade entre eles foi muito pequena, demonstrando que essas alterações podem não estar diretamente relacionadas à aplicação do piolhicide.

A enzima ALT é considerada hepato-específica porque um significativo aumento em sua atividade sérica somente é observado na degeneração ou necrose hepatocelular. A necrose muscular severa pode elevar os valores de ALT em cães sem que haja doença hepática concomitante, no entanto degenerações ou necrose focal da massa muscular não elevam sua atividade sérica. De forma geral, em primatas, cães, gatos, coelhos e ratos, a ALT pode ser considerada uma enzima indicadora de dano hepático (WILLARD et al, 1993).

Diversas drogas podem induzir um incremento da atividade sérica da ALT. Inúmeras substâncias químicas (fenóis, alcatrão e outros), plantas hepatotóxicas e aflatoxina podem causar o mesmo efeito (OSWEILER, 1998).

Os resultados da Fosfatase Alcalina mostraram-se com elevada variabilidade apenas nos grupos tratados, com valores aumentados e diminuídos em relação aos valores de referência. Diante desses resultados não se pode afirmar que essas alterações resultam da aplicação do piolhicide, já que a enzima em questão não apresentou em seus valores uma tendência de variabilidade confiável.

A fosfatase alcalina está presente nos intestinos, nos rins, no fígado e nos ossos. Kramer & Hoffmann (1997) citam duas isoenzimas, uma de origem intestinal e outra

inespecífica. Além delas, existe uma isoenzima induzida por corticosteróide. É mencionado que no soro de cães podem ser encontradas isoenzimas de origem óssea, hepática e induzidas por corticosteróides. Além dos corticosteróides, outras drogas induzem o aumento da fosfatase alcalina (CORNELIUS, 1996).

Willard et al. (1993) citam que nem toda hepatopatia causa aumento significativo da enzima. Em cães, a hepatopatia que causa aumento da fosfatase alcalina, cursa com colestase. A obstrução biliar extra-hepática, assim como a introdução por corticosteróides pode aumentá-la em até 10 vezes. Necrose hepatocelular geralmente cursa com aumento transitório da fosfatase alcalina.

CONCLUSÃO

Os valores observados nos parâmetros proteínas totais, uréia, creatinina, fosfatase alcalina e ALT dos grupos, incluindo o grupo controle, não são parâmetros confiáveis para relacioná-los a utilização do produto.

Os valores aumentados da AST, no entanto, sugerem que a alteração deste parâmetro pode estar relacionada à aplicação do piolhida em questão.

Desta forma, concluí-se qualquer outra via que não seja a via tópica indicada pelo fabricante do produto deve ser evitada devido à possibilidade de danos a órgãos como fígado e rins.

REFERÊNCIAS

AL-HABORI, M et al. 2002. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 83: p.209-217, 2002.

CAMPBELL, T.M. Bioquímica Clínica de Mamíferos: animais de laboratório. In: TRHALL, M.A. et al. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: Roca. 2006, p. 433-434.

CARDINET, G.H. Skeletal muscle function. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of domestic animals**. 5 ed. London: Academic Press. 1997, p.407-440.

CORNELIUS, L.M. Anormalidade do Perfil Bioquímico Padrão. In: LORENZ, M.D.; CORNELIUS, L.M. **Diagnóstico Clínico em Pequenos Animais**. 2 e.d. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996, cap. 61, p. 435-478.

GIESE, R.W.; ANNINNO, J.S. **Química clínica: Princípios e métodos**. 4ª Ed. São Paulo: Manole. 1978, 191-195.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Introdução a bioquímica clínica veterinária**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. v. 1. 1998p.

HADDAD, M.C.L. et al. Influência do açúcar no processo de cicatrização de incisões cirúrgicas infectadas. **Revista Latino Americana de Enfermagem**, v.8, n.1, p.1-14, 2000.

KAPLAN, L.A. et al. **Clinical Chemistry**. 3ª ed. St. Louis: Mosby. 1996, 514-522.

KERR, M.G. **Exames laboratoriais em Medicina Veterinária : Bioquímica e Hematologia**. 2ª Ed. São Paulo: Roca. 2003, 120-175.

KRAMER, J.W.; HOFFMANN, W.E. Clinical Enzymology. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5th ed. London: Academic Press, 1997. p.303-325.

MARTINEZ, S. S. O Nim – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção. **Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR)**. Londrina, 142p, 2002. Disponível em: <www.iapar.br>. Acesso em: 27 Mar. 2008.

- MEYER, D.J.;COLES, E.H.; RICH, L.J. **Medicina de Laboratório Veterinária: Interpretação e Diagnóstico**. 1 ed.São Paulo: Roca.2003, 308p.
- MONTEIRO, V. L.C. et al. Utilização experimental do biopolímero da cana-de-açúcar no tratamento de feridas limpas e contaminadas por *Staphylococcus aureus* em camundongos (*Mus musculus*). **Veterinária Notícias**, v.9, n14, p.51- 64, 2001.
- OSWEILER, G. D. **Toxicologia veterinária**. Porto Alegre: ArtMed, 1998. p.526.
- PAIM S, MAFRA JÚNIOR C, TOSTES R. Uso tópico do açúcar em feridas. *Revista Médica de Minas Gerais*. v 1, p. 888-890, 1991.
- PESCE. J. **Methods in clinical chemistry**. Missouri: Mosby.1987, 24-45.
- QUINTON, J-F. **Novos Animais de Estimação: Pequenos Mamíferos**. São Paulo: Roca. 2005, p.217.
- RAVEL R. **Laboratório clínico - aplicações clínicas dos achados laboratoriais**. 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1988, 429p.
- REVILLA, J. **Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis**. Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico, 2000. 405 p.
- RODRIGUES, R. M. **A Flora da Amazônia**. Belém: CEJUPE, 1989. 462 p.
- SAMPAIO, P. de T. B. Andiroba (*Carapa guianensis*). In: CLAY, J. W.; SAMPAIO, P. de T. B.; CLEMENT, C. R. **Biodiversidade Amazônica: exemplos e estratégias de utilização**. Manaus. [s.n], 2000, p. 243-251.
- SANTOS, L.U.; ANDRADE, C.F.S. *Azadirachta indica* – A árvore do Nim e o controle de piolhos. **Instituto de Biologia da UNICAMP**. 2000. Campinas.Disponível em: <http://www.unicamp.br/unicamp>. Acesso em: 15 mai.2008.
- TENNANT, B.C. Hepatic function. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5ed. London: Academic Press. 1997, p.327-352.

WILLARD, M.; TVEDTEN, H.; TURNWALD, G. H. **Diagnóstico clínico patológico práctico en los animales pequeños**. Buenos Aires: Intermedica, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Programme on Disease Control in Humanitarian Emergencies (DCE)**. Geneva, 2005.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A **ACTA AMAZONICA** tem como missão publicar resultados de pesquisas originais relativas à Amazônia, na forma de artigos científicos, notas e outras seções, que podem incluir resenhas, entrevistas e cartas do leitor.

A submissão de trabalhos para publicação será efetuada somente em formato eletrônico, através do Sistema de Editoração Eletrônica de Revistas – SERR, disponível no endereço: <https://actaonline.inpa.gov.br>, ressaltando que o arquivo anexado DEVE estar salvo em extensão RTF (Rich Text Format) ou DOC e deverão ser observados os seguintes itens:

- A submissão de um trabalho prescinde que o mesmo seja original, não podendo ter sido publicado ou estar em processo de avaliação para publicação em outra revista. A veracidade das informações e das citações bibliográficas é de responsabilidade exclusiva dos autores.
- São admitidos artigos nas línguas portuguesa, espanhola e inglesa. Quando nas duas últimas, devem ser revisados por alguém que as tenha como primeira língua e que, preferencialmente, seja um especialista da área.
- A extensão máxima do material é de 40 páginas para artigos, seis páginas para notas e cinco páginas para outras seções. O número de páginas deve incluir tabelas, figuras e bibliografia citada.
- A linguagem utilizada no texto deve ser a indireta analítica, por exemplo: "foi analisado" e não "analisou-se".
- Os artigos adequados às normas da revista serão direcionados aos subeditores de áreas temáticas, os quais farão as análises preliminares e os encaminharão aos revisores científicos, especialistas reconhecidos nos temas tratados. Os revisores indicados podem, opcionalmente, identificar a autoria em seus pareceres, porém, os trabalhos serão devolvidos aos autores sem a identificação.

Os artigos serão considerados "aceitos para publicação" mediante parecer positivo de dois avaliadores. A aprovação dos trabalhos será baseada no conteúdo científico e na apresentação adequada às normas da revista.

- Ao critério dos autores, os trabalhos rejeitados, uma vez revisados, poderão ser novamente submetidos, porém, como um novo processo. Os trabalhos que necessitem de correções, retornarão aos autores para que procedam às modificações sugeridas pelos revisores e, em seguida, devem devolver o artigo com as modificações e/ou as justificativas para a não incorporação daquelas consideradas inaceitáveis. Todo o processo é eletrônico e poderá ser acompanhado no site <https://actaonline.inpa.gov.br>
- O trabalho, incluindo tabelas e referências bibliográficas, deve ser preparado em um software para edição de textos (RTF ou DOC), em espaço duplo, fonte 12 e as margens devem ser de pelo menos 3 cm.

• A seqüência do artigo científico constará da seguinte ordem: Título, resumo, introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões (opcional), Agradecimentos (quando houver e os mínimos necessários) e Bibliografia Citada.

Nome(s) completo(s) do(s) autor(es) com último nome em letras maiúsculas. Instituição(ões) com o endereço completo, incluindo telefone, fax, e-mail. Nesse campo, pode ser inserida a fonte de financiamento. Essas informações NÃO devem aparecer no corpo do trabalho. Porém, deverão ser cadastradas *on line* no ato da submissão do artigo.

Tabelas e figuras devem ser apresentadas fora do texto e em arquivos separados, porém com indicação clara da posição onde devem ser inseridas.

Os artigos que não estiverem de acordo com estas instruções serão imediatamente devolvidos.

FORMATO E ESTILO

Os artigos devem ser preparados em editor de texto (com extensão DOC ou RTF), utilizando as fontes "Times New Roman" ou "Arial", tamanho 12m e espaçamento duplo. As páginas devem estar numeradas.

a) Título Justificado a esquerda, primeira letra da sentença maiúscula.

b) Resumo com até 250 palavras (100 palavras no caso de notas). Contendo, de forma sucinta, os objetivos do estudo ou pesquisa, seus procedimentos básicos; os métodos analíticos ou de observação; as principais descobertas ou resultados (oferecendo dados específicos e seu significado estatístico, se possível) e as principais conclusões, enfatizando importantes aspectos do estudo ou observações. Será apresentado em itálico, estando o nome científico das espécies e os demais termos em latim, diferenciados do formato do texto, em negrito ou sublinhados.

OBS.: Os trabalhos em espanhol ou inglês devem conter título, resumo e palavras-chave em português.

c) Palavras-chave. Devem ser fornecidos de três a cinco termos. No caso de trabalhos em português, incluir *Key-words*.

d) Introdução. Deve enfatizar o propósito do estudo e fornecer um breve resumo (e não uma revisão de literatura), dos estudos anteriores relevantes, além de especificar quais avanços pretendem ser alcançados através da pesquisa. NÃO deve incluir os dados ou conclusões do trabalho em referência.

e) Material e Métodos. Devem oferecer, de forma resumida e clara, informações suficientes para explicar os procedimentos realizados e permitir que o estudo seja repetido por outros pesquisadores. Técnicas padronizadas bastam ser referenciadas. As unidades de medidas e as suas abreviações seguirão o Sistema Internacional de Medidas e, quando necessário, deve constar uma lista com as abreviaturas utilizadas.

Ética: Ao descrever experimentos relacionados a temas humanos, indicar se os procedimentos seguidos estiveram de acordo com os padrões éticos do comitê responsável por experimentos humanos (institucional ou regional). Enfatizando que não devem constar os nomes ou iniciais,

bem como informações específicas, como registros de hospitais, por exemplo, especialmente nos materiais ilustrativos.

f) Resultados. Devem indicar uma descrição concisa sobre as informações descobertas, com o mínimo julgamento pessoal. Não repetir no texto todos os dados contidos em tabelas e ilustrações.

g) Discussão. Deve limitar-se ao significado dos resultados e relacioná-los às informações existentes, preferencialmente, mais recentes. Somente citações indispensáveis devem ser incluídas.

Ao critério dos autores, os resultados e discussão podem ser apresentados em conjunto.

h) Conclusões. Tópico opcional. Os resultados alcançados no estudo podem ser enfatizados separadamente nesse tópico ou estarem implícitos na discussão.

i) Agradecimentos. Restritos ao absolutamente necessário, e devem ser breves e concisos.

j) Bibliografia Citada. Serão apresentadas no final do trabalho e devem restringir-se às citações que aparecem no texto.

As abreviaturas dos nomes dos periódicos citados devem ser dispostas de acordo com o "World List of Scientific Periodicals and Supplements".

ILUSTRAÇÕES

As ilustrações devem limitar-se ao mínimo possível e serão utilizadas se absolutamente necessárias à clareza do texto. Detalhes de resultados apresentados nessa forma não devem ser repetidos no texto. Figuras e tabelas devem ser auto-explicativas e devem vir em arquivos separados, preferencialmente, nas extensões JPG, TIFF, EPS e XLS. Porém, com indicação precisa onde devem ser inseridas no texto.

Observando que as figuras e tabelas, não devem constar no arquivo de texto, mas em arquivos separados.

O material ilustrativo deve estar configurado de forma a se enquadrar nas dimensões da página útil do periódico, em uma coluna (8 cm) ou na largura completa da página (17,5 cm), e devem permitir a inclusão de legenda.

A Comissão Editorial reserva-se o direito de configurar o material ilustrativo ao modo mais econômico, desde que não prejudique sua apresentação.

FIGURAS

Fotografias, desenhos e gráficos devem estar bem nítidos, com alto contraste e em preto e branco, numerados seqüencialmente em algarismo arábico, com posição inferior, seguida de uma breve descrição. Trabalhos em português e espanhol devem conter também legendas em inglês.

- As escalas devem ser indicadas por uma linha ou barra na figura, e referenciadas, se necessário, na legenda (por exemplo, bar = 1 mm).
- A citação no texto pode ser feita na forma direta ou indireta (entre parêntesis) com inicial maiúscula. Ex: Figura 1 ou (Figura 1). Na legenda, seguida de hífen antes do título. Ex: "Figura 1 - Análise...".
- Ilustrações que já tenham sido publicadas anteriormente devem conter informações da fonte e a permissão para reprodução.
- Fotografias e ilustrações (BITMAP) devem estar no formato TIFF ou JPEG, com resolução mínima de 300 dpi. Em ilustrações e gráficos (vetoriais), utilizar o formato EPS, CDR, AI ou WMF.
- Fotografias devem estar, preferencialmente, em preto e branco. Fotografias coloridas podem ser admitidas, porém, os custos de impressão correrão por conta dos autores.

No entanto, os autores podem ser convidados a submeter uma fotografia colorida, para ilustrar a capa de um número da revista. Nesse caso, os custos de produção serão da revista.

TABELAS

- Devem ser nítidas e numeradas sequencialmente em algarismo arábico, com posição superior à tabela e devem conter título breve e descritivo, com explicações ou notas de rodapé. Trabalhos em português e espanhol devem conter também legendas em inglês.
- Tabelas pequenas devem ser produzidas em editor de texto (RTF ou DOC), e não podem ser inseridas como figura. Nas tabelas grandes, utilizar planilha eletrônica (formato XLS). Linhas verticais ou pontilhadas não serão admitidas.
- A citação no texto pode ser feita na forma direta ou indireta (entre parêntesis) e sempre deverá ser por extenso, com inicial maiúscula. Ex: Tabela 1 ou (Tabela 1). Porém, na legenda, a citação deverá estar por extenso, seguida de hífen antes do título. Ex: "Tabela 1 - Análise...".

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Uma vez que um trabalho tenha sido aceito para publicação, os autores devem enviar:

- Um arquivo (digital) contendo o texto completo da versão final aprovada pelos revisores, incluindo tabelas e figuras, processado em um editor de texto (RTF ou DOC);

- Uma declaração assinada por todos os autores afirmando que:

(i) todos os dados contidos no trabalho são originais e precisos;

(ii) todos os autores participaram do trabalho de forma substancial e estão preparados para assumir responsabilidade pública pelo seu conteúdo;

(iii) o trabalho ora apresentado a essa revista não está sendo publicado, no todo ou em parte, por outra revista. Assim como, não está sendo encaminhado para outra publicação. Autores de

diferentes países ou instituições podem assinar em documentos distintos, que contenham a mesma declaração.

À **Acta Amazonica** é reservado o direito de efetuar alterações de ordem normativa, ortográfica e gramatical nos originais dos artigos, com vistas a manter o padrão culto da língua, respeitando, porém, o estilo dos autores. Após a editoração, as provas finais serão enviadas aos autores para a correção, restrita a erros de composição, e devem retornar à produção editorial na data estipulada. Outras mudanças no manuscrito original não serão aceitas nesta fase.

- O primeiro autor receberá gratuitamente 20 cópias do artigo. Cópias extras poderão ser solicitadas com antecedência, porém, os custos de impressão correrão por conta dos autores.
- Os arquivos originais não serão devolvidos aos autores.
- A **Acta Amazonica** não cobra taxas para publicação.

Informações adicionais e esclarecimentos em eventuais problemas técnicos podem ser solicitados no site <https://actaonline.inpa.gov.br/>, ou pelos telefones (92) 3643 3223/3642 3438 e, se especificamente a um artigo, o autor deve sempre reportar o número do processo na revista.

© 2009 Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

Av. André Araujo, 2936 Aleixo
CEP 69011-970 Manaus AM Brasil
Caixa Postal 478
Tel.: +55 92 642-3438
Fax: +55 92 643-3223